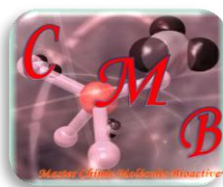


Année Universitaire : 2014-2015

Master Sciences et Techniques : CMBA

Chimie des Molécules Bio Actives



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Etude de la stabilité de l'amlodipine bésilate

Présenté par:

AZOULAY Karima

Encadré par:

- ✓ Dr.L.BENAMEUR (LNCM)
- ✓ Dr.Y.BRIK (LNCM)
- ✓ Pr. A.BOULAHNA (FSTF)

Soutenu Le 24 juin 2015 devant le jury composé de:

- Pr. A.BOULAHNA (FSTF)
- Pr. J.ASOUIK (FSTF)
- Pr. S.SABIR (FSTF)

Stage effectué à : Laboratoire National du Contrôle des Médicaments (LNCM)

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mes chers parents

Qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.

A mon frère et ma sœur

Vous vous êtes dépensés pour moi sans compter, en reconnaissance de tous les sacrifices consentis par tous et chacun pour me permettre d'atteindre cette étape de ma vie

A mes enseignants

De l'école primaire jusqu'à l'université dont les conseils précieux m'ont guidé.

A mes amies

Je vous remercie de votre patience vous m'avez aidé toujours à avancer vous êtes toutes les grandes amies c'est gentil

A Mlle Houda BOUCHAFRA

Remerciement

Je voudrais remercier chaleureusement mes encadrents au sein du Laboratoire National de Contrôle des Médicaments, Docteur L.BENAMEUR et Docteur Y. Brik qui m'a accordé leur confiance et m'a prodigué leurs nombreux et précieux conseils. J'ai pris un grand plaisir à travailler avec ils.

Je remercie également mon encadrant Monsieur le Professeur A. BOULAHNA, pour le privilège qu'elle m'a fait en acceptant de m'encadrer et de diriger ce travail. Je le remercie également pour sa gentillesse, sa modestie, sa riche expérience et l'accueil cordial qu'elle m'a toujours réservé. Toutes ces qualités m'ont inspiré une grande admiration à son égard.

Je tiens à exprimer mes reconnaissances envers Mr F. CHAHDI OUAZANI, Professeur à la Faculté des Sciences et techniques de Fès et chef de Master Chimie des Molécules Bioactives, de m'avoir fait l'honneur en acceptant de préciser ce travail.

Je tiens aussi à remercier chaleureusement toute l'équipe de service Physico-chimie du LNCM pour leur convivialité, leur disponibilité ainsi que leur gentillesse, aussi pour avoir facilité mon intégration et pour la bonne ambiance qu'ils ont maintenue au sein du laboratoire.

Pr.S.SABIR et Pr.J.ASWIK. C'est un grand honneur que vous me faites en jugeant mon travail, veuillez trouver l'expression de mon admiration, ma grande gratitude, ma profonde reconnaissance, et ma haute considération

Enfin je remercie l'ensemble des personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Liste des abréviations

AS : Facteur de symétrie

DTGS: Deutérium Tryglycine Sulfate

FTIR: spectromètre infrarouge à Transformée de Fourier

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance

KF: Karl Fischer

LNCM : Laboratoire Nationale de Contrôle de Médicament

m : masse

M : masse molaire

MP : Matière première

MCT : Mercury Cadmium Telluride:

MPR : Matière première retest

MPR- H : Matière première retest-humidité

MPR- L: Matière première retest lumière

MPR- T : Matière première retest température

OMS : Organisation Mondiale de Santé

PA : Principe actif

RS : résolution

SCR : Les substances chimiques de référence

URTA : Unité de Réflexion Totale Atténuée

Liste des Tableaux

Tableau 1: Formes pharmaceutiques d'un médicament	8
Tableau 2: Matière première étudiée et son origine	27
Tableau 3: Aspect des différents échantillons étudiés.....	29
Tableau 4: Teneurs en eau des échantillons étudiées.....	29
Tableau 5: Temps de rétention de chaque échantillon étudiés	30
Tableau 6: Bandes d'absorption des groupements fonctionnels (FTIR)	32
Tableau 7: Teneur de la molécule d'amlodipine besilate	33
Tableau 8: les impuretés de la molécule d'amlodipine bésilate	35
Tableau 9: Pourcentage des impuretés dans les matières étudiées.....	37

Liste des figures

Figure 1: Organigramme fonctionnel du service physico-chimie	4
Figure 2: Composantes de l'appareil de HPLC.....	15
Figure 3: Appareil HPLC « Agilant »	19
Figure 4: Principaux éléments d'un spectromètre IR.....	21
Figure 5: Interferometre de michelson.....	22
Figure 6: Appareil ATR (TENSOR 27).....	22
Figure 7: <i>Appareil de KARL FISHER</i>	24
Figure 8: Structure chimie de l'amlodipine bésilate.	28
Figure 9: Spectres FTIR des différents échantillons étudiés	30
Figure 10: Zoom de la partie empreinte digitale	31
Figure 11: Chromatogrammes relatives aux échantillons étudiés	33
Figure 12: Chromatogrammes des substances apparentes des échantillons étudiées	38
Figure 13: Spectres FTIR de l'impureté A ; SCR et MPR-T.....	39
Figure 14: Spectres FTIR du mélange contenant l'impureté D, E et F; SCR et MPR-L	40

Sommaire

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

Présentation du Laboratoire National de Contrôle des Médicaments

I-Historique.....	2
-------------------	---

II-Accréditation du laboratoire.....	3
--------------------------------------	---

III-Missions.....	3
-------------------	---

IV-Services de Laboratoire National de Contrôle des Médicaments	4
---	---

IV-1Service physico-chimie	4
----------------------------------	---

Chapitre I: Etude bibliographique

I- Généralités sur le médicament	5
--	---

I.1 Médicament princeps.....	6
------------------------------	---

I.2 Médicament générique	6
--------------------------------	---

I-3 Composition d'un médicament.....	6
--------------------------------------	---

I-4 Les formes pharmaceutiques	8
--------------------------------------	---

I-5- Quelques termes relatifs aux médicaments.....	8
--	---

II-Amlodipine bésilate.....	9
-----------------------------	---

II-1 Historique.....	9
----------------------	---

II-2 Synthèse.....	10
--------------------	----

II-3 Propriétés pharmacocinétiques.....	10
---	----

II-3-1 Absorption	10
-------------------------	----

II-3-2 Distribution	11
---------------------------	----

II-3-3 Métabolisme	11
--------------------------	----

II-3-4 Elimination.....	11
-------------------------	----

II-4 Les effets secondaires de la molécule d'amlodipine	11
---	----

III-Etude de stabilité	11
------------------------------	----

Chapitre II:Techniques d'analyses utilisées

I-Chromatographie liquide haute performance (HPLC)	13
I-1 Généralités.....	14
I-2 Principe.....	14
I-3 Appareillage	14
I-4 Méthode de Calcul	18
II-La spectroscopie Infrarouge (IR)	20
II-1. Principe	20
II.2. Appareillage	21
III- Technique de Karl Fischer	23
III-1 Principe.....	23
III-2 Appareillage	23
III-3 Calcul	25

Chapitre III:Etude de la stabilité de l'amlodipine bésilate

Introduction	26
I -propriétés physico-chimiques.....	27
I-1 Définition	27
I-2 Description.....	28
1. Structure.....	28
2. Nomenclature	28
3. Solubilité.....	28
4. Caractères.....	28
II-Détermination de la teneur en eau par Karl Fischer.....	29
III-Test d'identification	29
1. Identification par HPLC.....	29
2. Identification par Spectroscopie FTIR.....	30
IV-Dosage par HPLC.....	32

V-Dosage des substances apparentées par HPLC	34
VI- Étude par Spectroscopie FTIR des substances apparentées	39
Conclusion.....	Erreur ! Signet non défini.
Conclusion générale	41
ANNEXE I	42
ANNEXE II.....	44
ANNEXE III	45
ANNEXE IV.....	45
ANNEXE V	47
Référence Bibliographie	49

Introduction

Dans la fabrication des produits pharmaceutiques, les médicaments génériques utilisent des MP multi sources. Ces MP sont issues de voies de synthèse différentes et subissent des purifications par des techniques distinctes, ce qui peut aboutir à des MP de qualité différente, assez remarquables.

Le produit de référence Amlodipine existe sous forme de sel maléate d'amlodipine. Cette molécule est instable, d'où l'idée de remplacer le sel maléate par le sel bésilate afin d'augmenter sa stabilité.

L'objectif de ce travail est d'étudier la stabilité de l'amlodipine bésilate, l'une des matières premières utilisées comme principe actif dans certains médicaments génériques au Maroc.

Le plan de ce travail comporte trois principaux chapitres :

- Le premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique concernant quelques concepts généraux sur les médicaments et une présentation sur la matière première à contrôler.
- Le deuxième chapitre présente les techniques expérimentales utilisées dans cette étude.
- Le troisième chapitre est réservé aux résultats et discussion de l'étude de la stabilité de principe actif de la molécule d'amlodipine bésilate.

**Présentation du Laboratoire
National de Contrôle
des Médicaments**

I-Historique

Le laboratoire national de contrôle des médicaments (LNCM) a été créé en octobre 1969. Depuis sa création, ce laboratoire connaît un essor (croissance) permanent caractérisé par son inscription sur la liste des laboratoires officiels de l'organisation mondiale de la santé (OMS) pour la zone européenne. Il est considéré comme le laboratoire de référence de la ligue arabe et il est inscrit au réseau européen des laboratoires officiels de contrôle des médicaments (OMCL).

II-Accréditation du laboratoire

La démarche qualité a été introduite dans le LNCM en juillet 1997 en prenant comme référentiel le guide des bonnes pratiques de fabrication (BPF) tel qu'il est décrit par l'OMS.

En décembre 2001, cette démarche a été évoluée vers un nouveau concept d'accréditation en prenant comme référentiel la norme internationale ISO 17025 qui contient l'ensemble des exigences que les laboratoires doivent respecter pour démontrer à leur clients et aux autorités réglementaires qu'ils appliquent un système de management leur permettant de maîtriser entièrement leurs processus, qu'ils ont la compétence technique et qu'ils sont aptes à produire des résultats techniquement valides. Et en février 2007 le LNCM a obtenu l'accréditation, par le réseau européen des laboratoires nationaux de contrôle des médicaments, pour l'ensemble des analyses effectuées. Cette accréditation a été renouvelée en Mars 2011.

Son objectif actuel est de maintenir le niveau de qualification aussi bien du personnel que des tests effectués.

III-Missions

- Contrôle des médicaments (matière première et produit fini), des dispositifs médicaux, des articles de puériculture et de tout autres articles destinés à l'usage de la médecine humaine.
- Evaluation de la documentation chimique, biologique et pharmaceutique
- Contribution à l'enseignement médico-pharmaceutique et à la recherche scientifique

IV-Services de Laboratoire National de Contrôle des Médicaments

Le LNCM est composé de quatre services :

- service assurance qualité
- service des essais biologiques
- service de normalisation et de contrôle des dispositifs médicaux
- service physico-chimie

IV-1Service physico-chimie

□ Objectif

Contrôle analytique et documentaire des spécialités pharmaceutiques (matières premières, produits finis).

□ Organigramme

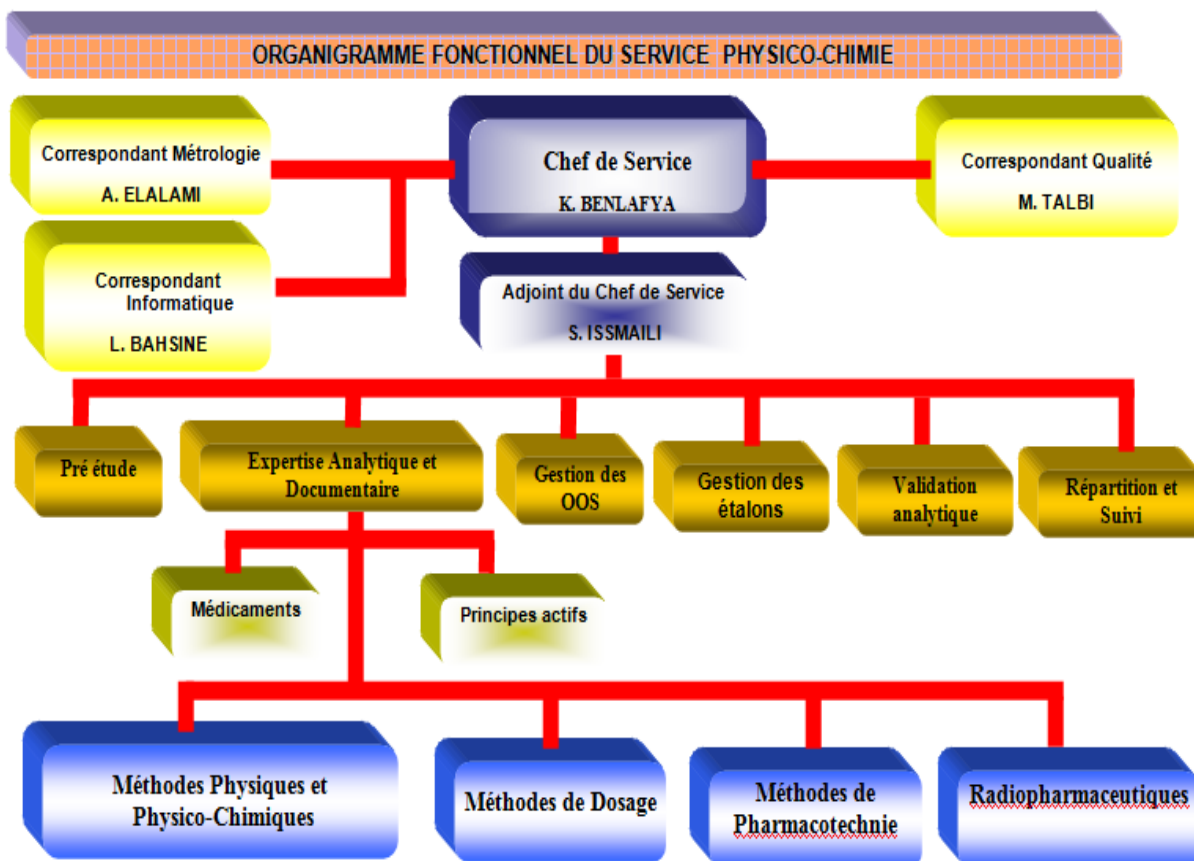


Figure 1: Organigramme fonctionnel du service physico-chimie

Chapitre I
Etude bibliographique

I- Généralités sur le médicament

Un médicament est toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales. Il est administré en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, de corriger ou de modifier leurs fonctions physiologique, en exerçant une action pharmacologique ou métabolique ^[1].

Il existe plusieurs types de médicaments tels que les génériques et les princeps.

I.1 Médicament princeps

Un médicament princeps ou médicament d'origine est un médicament mis au point par un laboratoire pharmaceutique qui en garde l'exclusivité jusqu'à expiration du brevet (environ 20 ans d'exploitation) ^[2].

I.2 Médicament générique

Un médicament générique est une copie d'un médicament original rendu possible par la chute du brevet initial dans le domaine public à la fin de la période légale de protection ^[3].

En effet, le médicament générique doit contenir la même quantité en principe actif et doit être de même forme pharmaceutique que le médicament original. Il ne peut pas avoir de nouvelles indications que la molécule princeps qu'il copie. De même, sa notice scientifique ne peut être transformée qu'après modification de la notice de la molécule princeps.

Un générique est donc conforme à la spécialité de référence, et présente les mêmes effets, même fabrication et même forme pharmaceutique. En revanche, le goût, la couleur, les excipients utilisés peuvent être différents ^[2].

I-3 Composition d'un médicament

Un médicament est un mélange de nombreuses espèces chimiques. Il contient un ou plusieurs principes actifs et des excipients ^[4].

a) Principe actif

Les matières premières susceptibles d'être à l'origine d'un médicament, sont des drogues (« Drug » en anglais est « médicament » et jamais « Drogue »). Ce terme est surtout utilisé pour les produits traditionnels issus des règnes minéraux, végétaux ou animaux. Ces médicaments restent très employés, notamment ceux qui proviennent des plantes qui continuent à fournir des nouvelles substances. La plupart des principes actifs actuels sont cependant préparés par synthèse chimique intégrale où par semi synthèse à partir de substances naturelles.

Avant d'être intégré dans un médicament tel qu'il se présente dans une pharmacie, un principe actif doit être obtenu sous une forme standardisée, reproductible d'un lot de fabrication à l'autre et aussi pure que possible. Les normes auxquelles ils doivent satisfaire sont fixées par la pharmacopée (recueil officiel de normes pharmaceutiques) où précisées dans le dossier préalable à leur autorisation d'utilisation ^[5].

b) Excipients

Un excipient est une substance neutre visant à faciliter la prise du médicament, sa conservation et son absorption. C'est la partie variant réellement entre un générique et le médicament princeps.

La présence d'excipients est indispensable pour assurer la conservation du médicament, lui donner un volume et une présentation utilisables par le malade et permettre son identification, on jouera aussi un rôle important dans la vitesse de mise à disposition de l'organisme du principe actif. Inactifs quant à leur intérêt thérapeutique, ils peuvent néanmoins entraîner des effets nocifs ^[6].

c) Propriétés des excipients

Les excipients sont donnés sur sa notice et dépourvus d'effet thérapeutique Ils permettent de :

- ✧ présenter le médicament sous une forme adaptée pour la voie d'administration souhaitée : (comprimé, solution buvable, gélules...).
- ✧ Modifier le goût et l'odeur du médicament.
- ✧ Moduler la vitesse de libération du principe actif vers l'organisme.
- ✧ Améliorer la conservation du médicament.

I-4 Les formes pharmaceutiques

Les formes galéniques sont généralement regroupées sous trois principales présentations physiques: solide, liquide et semi-solide (tableau 1).

Tableau 1: Formes pharmaceutiques d'un médicament

Solides	Liquides	semi-solides ou pâteuses
Comprimé Gélule Poudre Suppositoire ou Ovule	Goutte optique Shampooing Sirop Solution qui peut être injectable	Crème Gel Pâte Pommade

I-5- Quelques termes relatifs aux médicaments

a) Pharmacopée

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), une pharmacopée est une norme pharmaceutique destinée à assurer dans une entité politique donnée, l'uniformité de la nature, de la qualité, de la composition et de la concentration des médicaments.

Il existe plusieurs pharmacopées : Française, Britannique, américaine (USP), Japonaise, Chinoise et internationale. Chaque pharmacopée est constituée de plusieurs parties : Les monographies, les prescriptions générales, les réactifs et les méthodes générales d'analyses ^[7].

b) Spécialité

La réglementation précise que la spécialité pharmaceutique, est tout médicament préparé à l'avance, présenté sous un conditionnement particulier et caractérisé par une dénomination spéciale portant sa composition, le nom et l'adresse du fabricant^[2].

c) Les impuretés

Les impuretés apparaissent pendant la synthèse du principe actif, elles peuvent comprendre les produits de dégradation, de synthèse, stéréochimique, des produits de réaction secondaires, etc. Elles devraient être identifiées, qualifiées et étudiées sur le plan toxicologique.

Les impuretés sont classées dans les catégories suivantes :

- ✧ Impuretés organiques (liées au procédé et au médicament) ;
- ✧ Impuretés inorganiques ;
- ✧ Solvants résiduels ^[8].

d) Les substances chimiques de référence (SCR):

La substance chimique de référence est définie comme un matériau prévu pour être utilisé dans des essais chimiques et physiques spécifiques, dans lesquels ces propriétés sont comparées aux propriétés des échantillons à examiner. Le degré de pureté d'une telle substance dépend du but de son utilisation. Ils sont classés en étalon primaire et secondaire ^[9].

e) Le lot

Un lot est une quantité définie d'une matière première, d'un article de conditionnement ou d'un produit fabriqué en une opération ou une série d'opérations telle que cette quantité puisse être considérée comme homogène. Chaque lot est caractérisé par un numéro de lot ^[6].

f) Produit fini

Le produit fini est un objet qui a subi tous les processus de fabrication y compris le médicament.

II-Amlodipine bésilate

II-1 Historique

L'amlodipine est une substance chimique de propriété physico-chimique et pharmacologique très particulière. L'amlodipine demeure une molécule modèle en recherche biomédicale et pharmacologique, il existe d'environ 80 sels de l'amlodipine acceptables de point de vue pharmaceutique : maléate, tozelat, bésilate.....

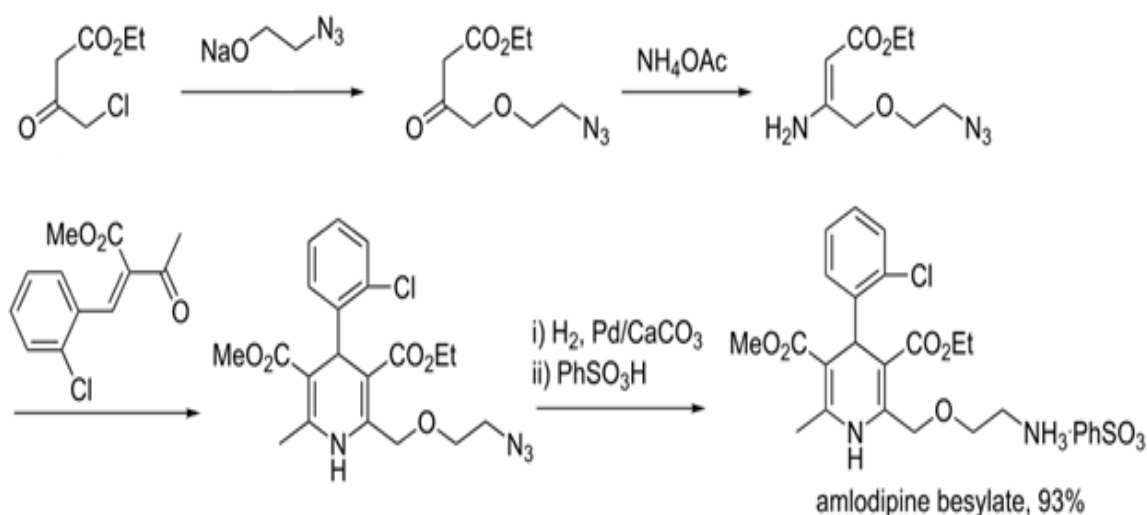
Dans le domaine médicale la sélection d'un sel est également une opération longue et difficile, dans ce sens la société pharmaceutique Pfizer a utilisé l'amlodipine maléate dans la fabrication des spécialités pharmaceutique, et par la suite Pfizer a découvert que le maléate ne se prêtait pas à une formulation sous une forme posologique adéquate, en raison de problème d'instabilité assez importants, Elle a été remplacé par un nouveau sel de l'amlodipine qui résoudrait ces problèmes de formulation.

En 1987 Pfizer a découvert l'amlopidine bésilate comme une nouvelle molécule bio-active qui possède des propriétés pharmaceutique très importante par rapport au forme maléate. Pfizer a choisi le bésilate parce qu'il contient des propriétés de formulation suivante :

- 1) une solubilité suffisante pour permettre l'absorption par le corps.
- 2) la plus grande stabilité possible.
- 3) la plus grande traitabilité possible^[10].

II-2 Synthèse

Condensation Hantzsch suivie d'une réduction du groupe azido dans la synthèse de l'amlopidine bésilate^[11].



II-3 Propriétés pharmacocinétiques

II-3-1 Absorption

Après administration orale de doses thérapeutiques, l'amlopidine bésilate est lentement absorbée dans le plasma. L'absorption de l'amlopidine bésilate n'est pas influencée par la prise simultanée d'aliments. La biodisponibilité absolue de la molécule inchangée est estimée à 64-80%. Les pics plasmatiques sont atteints dans les 6 à 12 heures après la prise.

II-3-2 Distribution

Le volume de distribution est d'environ 20 l/kg. Le pKa de l'amlodipine bésilate est de 8,6. Les études in vitro montrent que l'amlodipine bésilate se lie jusqu'à 98% aux protéines plasmatiques.

II-3-3 Métabolisme

L'amlodipine est en grande partie transformée en métabolites inactifs (90 % environ) par le foie; 10 % de la molécule-mère et 60 % des métabolites sont excrétés dans l'urine.

II-3-4 Elimination

La demi-vie d'élimination plasmatique est d'environ 35 à 50 heures. Les taux plasmatiques d'équilibre sont atteints après 7-8 jours successifs ^[12].

II-4 Les effets secondaires de la molécule d'amlodipine

Un effet secondaire est une réponse indésirable à un médicament lorsqu'il est pris à des doses normales. Il peut être léger ou grave, temporaire ou permanent.

L'Amlodipine bésilate peut provoquer les effets secondaires suivants dont La plupart des effets secondaires sont légers ou modérés :

- ✚ des étourdissements;
- ✚ des bouffées de chaleur;
- ✚ des maux de tête;
- ✚ une envie de dormir ou une somnolence inaccoutumée;
- ✚ une fatigue ou une faiblesse inaccoutumée.

III-Etude de stabilité

La stabilité d'un médicament peut être définie comme son aptitude à conserver sa propriété chimique, physique, microbiologique et bio- pharmaceutiques dans des limites spécifiées pendant toute sa durée de validité ^[13].

Les principes actifs des médicaments génériques étant des molécules connues (mécanisme de dégradation et stabilité du principe actif), il est dans la plupart des cas possible de limiter les études de stabilité au produit fini.

La stabilité des préparations pharmaceutiques dépend des paramètres extrinsèques (température, humidité et lumière) et intrinsèques.

Parmi ces derniers, il faut différencier les facteurs liés aux matières premières à la forme pharmaceutique et au conditionnement.

Il existe deux types d'études de stabilité :

Les études de stabilité en temps réel : étude expérimentale des caractéristiques physiques, chimiques, biologiques et microbiologiques d'un médicament pendant sa durée de validité et d'utilisation prévue et au delà, dans des conditions de stockage prévues pour le marché auquel il est destiné ^[3].

Les études de dégradation accélérée, destinées à augmenter la vitesse de dégradation chimique ou physique d'un médicament en le soumettant à des conditions de stockage extrêmes dans le cas du programme officiel des études de stabilité. Cette étude est basée sur des «Essais de vieillissement accéléré» qui doivent évaluer la «Souffrance» du médicament, en le soumettant à des conditions de stockage extrêmes «condition de conservation agressives» ^[14].

L'objectif des études de stabilité est de découvrir comment un produit pharmaceutique où une substance active se modifie dans des conditions données (température, humidité de l'air, lumière) pendant une période déterminée.

Les résultats détermineront notamment la durée de vie et les conditions de stockage recommandées d'une substance active ou d'un médicament. Les conditions de stockage, la durée de stockage, les échéances de contrôle.

Chapitre II
Techniques d'analyses utilisées

I-Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

I-1 Généralités

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) est actuellement la plus utilisée de toutes les techniques de séparation. C'est une méthode analytique, physicochimique qui a pour but la séparation des différents constituants d'un mélange même très complexe.

I-2 Principe

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique. La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié, les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme ^[15].

I-3 Appareillage

Un chromatographe liquide haute pression comporte une ou plusieurs pompes qui propulsent l'éluant dans une colonne analytique. L'injection de l'échantillon à analyser est pratiquée en introduisant un faible volume de produit (quelques μl) dans l'éluant sous pression. Après leur séparation, les différents constituants de l'échantillon sont détectés en sortie de Colonne. Un logiciel assure l'acquisition et le traitement des données ^[16].

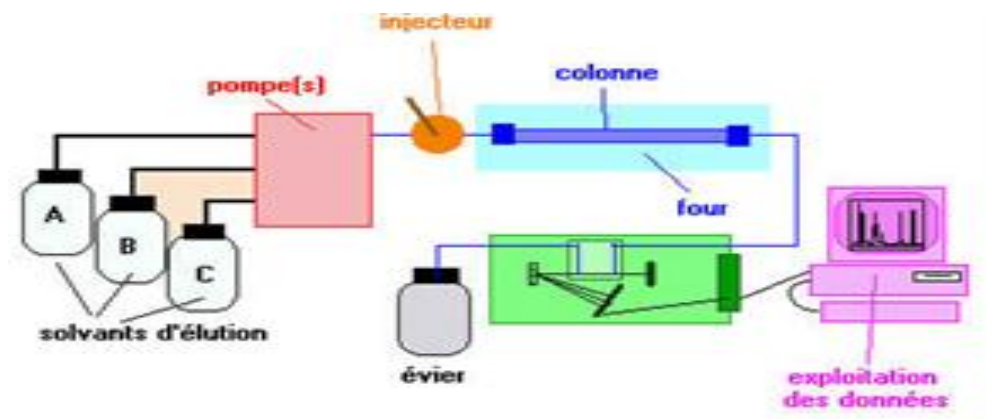


Figure 2: Composantes de l'appareil de HPLC

D'après le schéma de l'appareillage les principaux composants de l'appareil de HPLC sont :

a) Un réservoir de solvant (éluant)

Il contient la phase mobile en quantité suffisante. La phase mobile est un solvant où un mélange de solvants qui doit être de pureté analytique et filtré pour éliminer les particules solides qui risqueraient d'endommager la pompe où de bloquer la colonne. Le filtre, en acier inoxydable d'une porosité de 2 μm , est placé à l'extrémité dans le réservoir à solvant.

Plusieurs flacons d'éluant (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'éluant (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe doseuse.

b) La pompe

Elle est munie d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant (figure 2). Elle permet de travailler:

- ✓ En mode isocratique, c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse, on utilise une pompe simple, réglable en pression, où en débit.
- ✓ En mode gradient (de polarité, de force ionique, où de pH), c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluant.

Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques μl à plusieurs ml/min ^[14].

c) Vanne d'injection

C'est un injecteur à boucles d'échantillonnage. Il existe des boucles de différents volumes, nous utiliserons une boucle de 20 μ l. Le choix du volume de la boucle se fait en fonction de la taille de la colonne et de la concentration supposée des produits à analyser.

Comme la pression dans le circuit pompe colonne est très élevée, on utilise un moyen indirect pour introduire l'échantillon à l'entrée de la colonne :

Celui-ci est d'abord introduit à l'aide d'une seringue dans un injecteur à boucle externe. On injecte toujours un volume supérieur à celui de la boucle, en prenant soin de ne pas introduire de bulles d'air dans la boucle. En tournant la valve en position INJECTE, seul le contenu de la boucle est dirigé en tête de colonne. Cette méthode d'injection a l'avantage de donner des résultats très reproductibles, d'une injection à l'autre. Pour réaliser une injection dans des bonnes conditions, il convient :

- ✧ de ne pas surcharger la colonne; si l'échantillon est trop important on aboutit à des pics très larges et des phénomènes de traîne, autant de facteurs qui concourent à diminuer le pouvoir de résolution de la chromatographie.
- ✧ d'injecter très rapidement. La durée d'une injection est égale à :
$$d \text{ (secondes)} = \text{Volume de la boucle (} \mu\text{l) / Vitesse du flux (} \mu\text{l/s)}$$
- ✧ pour injecter rapidement on injecte des échantillons de faible volume^[17].

d) La colonne

La colonne est la partie la plus importante du système, puisque c'est à cet endroit que se fait la séparation des composés. Les colonnes sont en acier inoxydable, de longueur variant de 15 à 30cm avec un diamètre interne de 2 à 20 mm. Ces colonnes sont remplies de la phase Stationnaire, dont le diamètre des particules varie de 3 à 10 μ m. Des compagnies se Spécialisent dans la vente de colonnes pour HPLC^[15].

e) La phase stationnaire

La phase normale

La phase normale est constituée de gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaire qui sortent en tête.

L'inconvénient d'une telle phase, c'est une détérioration rapide au cours du temps du gel de Silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations.

La phase inverse

La phase inverse est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (MeCN, MeOH, H₂O). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante.

f) La phase mobile

L'interaction plus ou moins forte entre la phase mobile et la phase stationnaire normale où à polarité inversée se répercute sur les temps de rétention des solutés. La polarité de la phase stationnaire permet de distinguer deux situations de principe :

- ✓ si la phase stationnaire est polaire, on utilisera une phase mobile peu polaire la chromatographie est dite en phase normale ;
- ✓ si la phase stationnaire est très peu polaire, on choisira une phase mobile polaire (le plus souvent des mélanges de méthanol où d'acétonitrile avec de l'eau), c'est la chromatographie en phase inverse. En modifiant la polarité de la phase mobile, on agit sur les facteurs de rétention k des composés.

g) Détecteurs

Le détecteur est placé à la sortie de la colonne chromatographique et doit être capable de détecter les composés qui sortent de la colonne. Le signal est converti en impulsion électrique qui est transmise à l'enregistreur. Comme en chromatographie en phase gazeuse,

Les détecteurs utilisés en chromatographie liquide haute pression doivent posséder certaines qualités, dont les principales sont :

- une grande sensibilité
- une réponse linéaire sur une gamme de concentration élevée
- une capacité à détecter le plus de produits possible^[15].

Les principaux détecteurs utilisés en HPLC sont :

i) Détecteur UV- visible

Il mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne et opère à longueur d'onde constante, celle-ci ayant été fixée par l'opérateur. La lampe deutérium est utilisée pour des longueurs d'ondes variant de 190-350 nm et la lampe à vapeur de mercure est utilisée à la longueur d'onde non variable de 254 nm ^[14]. Pour que ce type de détecteur soit utilisable, il faut que:

- ✧ le produit à détecter absorbe la lumière à une longueur d'onde accessible à l'appareil, et que son coefficient d'absorption soit suffisamment grand.
- ✧ la phase mobile n'absorbe pas la lumière à la longueur d'onde choisie par l'opérateur.

ii) Détecteur a indice de réfraction

Le détecteur mesure l'indice de réfraction du liquide sortant de la colonne. C'est un détecteur universel puisque l'indice de réfraction de l'éluant est modifié lorsqu'un composé, quel qu'il soit, sort de la colonne. Il donne une réponse similaire pour les composés de la même famille (ex. Sucres), mais son principal inconvénient est sa faible sensibilité. Ce détecteur exclut les variations de la composition de la phase mobile, il n'est donc possible de travailler qu'en mode isocratique avec ce détecteur ^[15].

Les données sont collectées par l'intermédiaire soit d'un intégrateur ou d'une station d'acquisition.

I-4 Méthode de Calcul

Le calculateur permet l'utilisation des différentes méthodes de calcul (Pourcentage de l'aire, étalonnage interne et externe...).



Figure 3: Appareil HPLC « Agilent »

Formules de calcul :

➤ **Le temps de rétention et volume de rétention:**

En chromatographie d'élution, les mesures de rétention peuvent être exprimées en termes de temps de rétention t_R directement défini par la position du maximum du pic dans le chromatogramme.

Le volume de rétention V_R peut être calculé en déduisant le temps de rétention (t_r)

$$V_R = V * t_R$$

V : débit de la phase mobile

t_R : temps de rétention ou distance sur la ligne de base entre le point d'injection et la perpendiculaire abaissée du max du pic correspondant aux composants considérés.

➤ **Facteur de symétrie (ou de traînée) AS**

AS d'un pic est donné par l'expression :

$$AS = 0.05.W/2d$$

W : largeur du pic au vingtième de sa hauteur.

d : distance entre la perpendiculaire abaissée du maximum de pic et le bord d'entrée du pic au vingtième de sa hauteur.

➤ **Résolution :**

$$R_s = 1.18 (t_{R2} - t_{R1}) / (Wh_1 + 2Wh_2)$$

RS entre deux pics peut être calculé par l'expression :

t_{R1} : temps de rétention du premier pic

t_{R2} : temps de rétention du deuxième pic

Wh₁ : largeur a mi-hauteur du premier pic

Wh₂ : largeur a mi-hauteur du deuxième pic

II-La spectroscopie Infrarouge (IR)

La spectroscopie IR est basée sur le fait que toutes les liaisons d'une molécule vibrent. Ces vibrations peuvent être excitée par l'absorption de radiations électromagnétiques et l'observation des fréquences d'absorption donne des informations précieuses sur l'identité de la molécule et fournit des informations quantitatives sur la flexibilité des liaisons. Les méthodes spectroscopiques sont non destructrices et peuvent être utilisées en complément d'autres techniques classiques (TGA, microscopie, DSC, XRD) pour les analyses quantitatives des poudres ^[18].

II-1. Principe

Une molécule peut-être représentée par un ensemble d'atomes liés entre eux par des liaisons chimiques. Or, sous l'action de l'agitation thermique, les molécules vont être animées de mouvements de translation, de rotation et de vibrations de leurs liaisons chimiques. Les vibrations des liaisons chimiques se font à différentes fréquences (ν_{vib}) qui dépendent de la nature des liaisons ainsi que de leur environnement. L'évolution de l'intensité du rayonnement IR transmis en fonction de la fréquence conduit à un spectre contenant des bandes d'absorption aux différentes (ν_{vib}) dont l'analyse permettra de remonter à la structure des molécules ^[19].

II.2. Appareillage

Les éléments principaux d'un spectromètre IR à Transformée de Fourier (FTIR) sont :

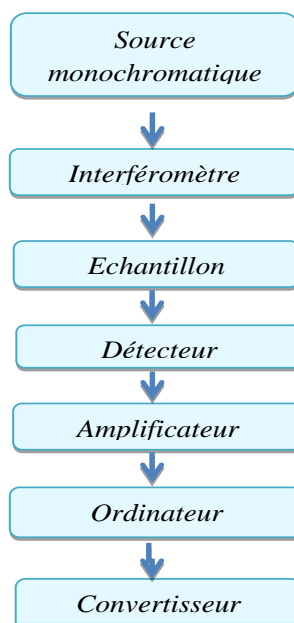


Figure 4: Principaux éléments d'un spectromètre IR

✧ La source :

Le choix de la source dépend de la région infrarouge où l'on veut travailler. Cependant, dans la plupart des cas on travaille dans la région appelée infrarouge moyen c'est-à-dire entre 4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1} . On utilise alors une source Globard à base de carbure de silicium.

✧ L'interféromètre :

Tous les appareils utilisent actuellement un interféromètre de Michelson. Il est constitué de deux miroirs perpendiculaires l'un par rapport à l'autre. L'un des miroirs est mobile et l'autre reste fixe. Les deux miroirs sont séparés par une séparatrice (lame semi réfléchissante) inclinée de 45 degré. Lorsque la radiation atteint la séparatrice, 50% de la radiation est réfléchi sur le miroir fixe et 50% est transmise. Les deux faisceaux sont ensuite réfléchis par le miroir et repartent vers la séparatrice où ils se recombinent et interfèrent. On obtient ainsi un phénomène d'interférence, car on a une différence de chemin optique et donc une différence de phase entre les deux faisceaux. Le faisceau résultant traverse l'échantillon et atteint enfin le détecteur.

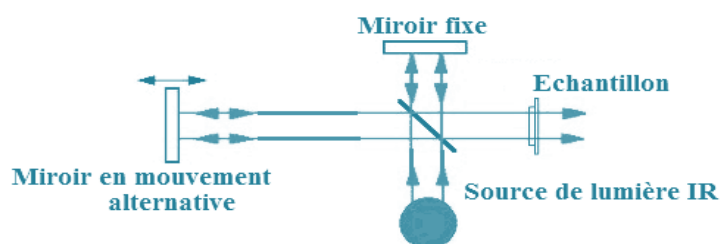


Figure 5: Interferometre de michelson

✧ **Le détecteur :**

Le détecteur le plus communément utilisé est le détecteur DTGS (Deutérium Tryglycine Sulfate). Ce détecteur mesure les variations de température et les transforme en variation d'intensité. Pour avoir une meilleure résolution on peut utiliser un détecteur MCT (Mercury Cadmium Telluride).



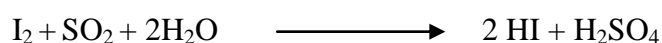
Figure 6: Appareil ATR (TENSOR 27)

III- Technique de Karl Fischer

III-1 Principe

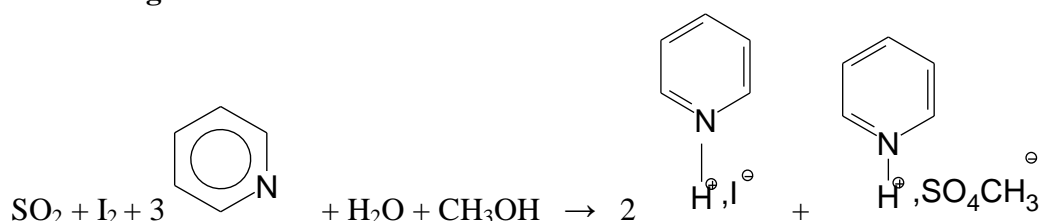
Le dosage de l'eau par la technique KARL FISCHER est basé sur la réaction quantitative entre l'eau et un réactif de Fischer composé de dioxyde de soufre anhydre SO_2 et d'iode I_2 dans la pyridine.

En effet, l'iode est capable d'oxyder l'anhydride sulfureux en présence d'eau pour donner de l'acide sulfurique et l'acide iodhydrique selon la réaction suivante :



Cette réaction correspond à un équilibre, en présence de la pyridine, elle est totalement déplacée vers la droite par combinaison de cette base avec les acides formés, la quantité d'iode consommée est fonction de la quantité d'eau mise en réaction (une molécule d'iode est équivalente à deux molécules d'eau). Il est aussi indispensable d'ajouter un solvant commun à ces trois molécules : le méthanol anhydre. Ce dernier servira également pour solubiliser les échantillons ^[20].

Réaction globale :



D'après la réaction globale, une molécule d'eau consomme une molécule d'iode, une molécule d'anhydride sulfureux, trois molécules de pyridine et une molécule de méthanol.

Le réactif est très sensible à l'humidité et doit être conservé à 0°C à l'abri de la lumière, dans des flacons hermétiquement clos, aussi des précautions doivent être prises lors du dosage pour éviter l'exposition à l'humidité atmosphérique.

III-2 Appareillage

L'appareil est constitué par :

- Le titrant formée d'une bouteille de méthanol et d'une bouteille contenant le réactif de Fischer. Ces dernières sont reliées séparément au bûcher.
- La titrée, constituée du produit à doser et du milieu de titrage, mise dans un bûcher de 60 ml environ, muni d'une électrode de platine.

- Appareil de mesure : c'est un détecteur lié au bûcher qui donne automatiquement la quantité d'eau existante dans la prise d'essai.
- Au dessus du bûcher se trouve un piège de tamis moléculaire dont le rôle est d'absorber l'eau se trouvant dans l'air environnant.



Figure 7: Appareil de KARL FISHER

Avantage :

- ✚ L'eau est déterminée de façon spécifique dans des échantillons divers
- ✚ La gamme de concentration en eau est large
- ✚ Le dosage est rapide
- ✚ Automatisable
- ✚ La reproductibilité est excellente.

Inconvénients :

Cette méthode n'est pas applicable si la substance à étudier est susceptible de réagir avec l'iode. Dans ce cas il est nécessaire de réaliser soit des prétraitements pour éviter les réactions secondaires, soit d'établir la consommation excédentaire en eau produite par ces réactions parasites.

III-3 Calcul

Le calcul de la quantité d'eau présente dans l'échantillon se base d'une part sur la concentration du réactif Karl Fischer en iode et d'autre part sur la quantité consommé en ce réactif lors du tirage.

L'appareil KF mesure le volume versé du réactif KF (composition : I₂ (1M) + SO₂ (3M) +pyridine (10 M) +Méthanol (120 M) nécessaire pour neutraliser toutes les molécules d'eau présentes dans l'échantillon avec compensation automatique de la dérive.

L'humidité en (%) est calculée selon la formule suivante :

$$H\% = m(\text{H}_2\text{O})/m \text{ (essai)}$$

m(H₂O) : masse de l'eau

m (essai) : masse de l'échantillon

D'autre part, la teneur en eau du réactif KF est donné par la formule ;

$$T = m(\text{H}_2\text{O})/ V(\text{KF})$$

V(KF) : volume du réactif KF versé par la burette

Le titre de réactif KF (T) est déterminé à l'aide de l'appareil en utilisant un étalon dont l'humidité est connue et stable dans le temps (par exemple : le Tartrate de sodium (H=15.66%). l'expression final de l'humidité est donc :

$$H(\%) = V(\text{KF}) * T / m \text{ (essai)}$$

Remarque

A cause de son odeur désagréable et de sa toxicité, la pyridine est remplacé par une autre base qui l'imidazole, sur le marché, on trouve plusieurs types de réactifs kF à une seule composante ou à deux composantes.

Chapitre III
Etude de la stabilité de
l'amlodipine bésilate

Introduction

L'amlodipine est une molécule découverte en 1987 par laboratoire Pfizer. Les études menées par le même laboratoire ont montré que le sel de maléate ne se prêtait pas à une formulation sous une forme posologique adéquate, en raison de problèmes d'instabilité et de traitabilité. En effet ces problèmes de formulation ont été résolus par la synthèse du besilate d'amlodipine^[10].

Dans ce chapitre nous allons essayer d'étudier une MP générique fabriqué en Inde par Glochem industries limited. Cette matière dépasse la limite d'utilisation depuis décembre 2013. En effet, les fabricants des matières premières médicamenteuses donnent en général des dates limites de retest et non pas de péremption. L'influence des paramètres telsque la température, la lumière et l'humidité seront étudiés. Ceci peut donner plus d'informations sur le stockage et la conservation de cette MP.

Le tableau suivant regroupe les données de la MP étudié.

Tableau 2: Matière première étudiée et son origine

<i>PA</i>	Date de fabrication	Date de retest
Amlodipine bésilate	11/2008	08/2013

I -propriétés physico-chimiques

I-1 Définition

L'amlodipine bésilate est une substance antagoniste au calcium. Elle est indiquée dans le traitement de certains troubles cardiovasculaires, notamment l'hypertension artérielle et les angines de poitrine (ou angors). Commercialisée par plusieurs laboratoires (pfizer, Aventis, Txeva...), elle se présente sous forme de comprimé et s'administre par voie orale. Elle est parfois associée à d'autres principe actif (tel que : valsartan, olmésartan, telmisartan, atorvastatine). Les effets indésirables les plus fréquents liés à l'amlodipine sont les maux de tête, les rougeurs et les bouffées de chaleur^[20].

I-2 Description

1. Structure

La structure de l'amlopidine bésilate se présente comme suit :

$M=567.1$ g/mol ; Point de fusion = 203°C .

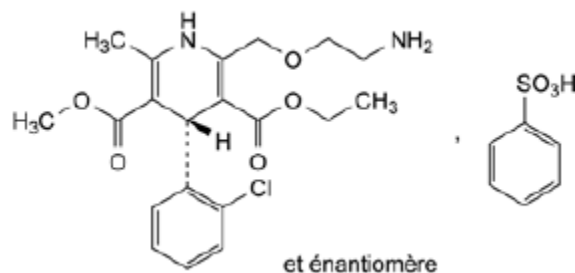


Figure 8: Structure chimie de l'amlopidine bésilate.

2. Nomenclature

La molécule d'amlopidine est connue par le nom chimique suivant :

Benzènesulfonate de (4RS)-2-[(2-aminoéthoxy) méthyl]-4-(2-chlorophényl)-6-méthyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate de 3-éthyle et 5-méthyle.

3. Solubilité

Elle est peu soluble dans l'eau, facilement soluble dans le méthanol, assez soluble dans l'éthanol et peu soluble dans le 2-propanol.

4. Caractères

Selon la monographie de la pharmacopée européenne 8^{ème} édition ^[21]. L'Amlodipine bésilate est une poudre blanche ou sensiblement blanche.

Le tableau 3 regroupe le changement de l'aspect visuel de la MP étudié après chaque traitement (annexe I). Les résultats obtenus montrent que seul le prétraitement par la lumière modifie la couleur de l'échantillon.

Tableau 3: Aspect des différents échantillons étudiés

Echantillons	Traitement	Aspect
MPR	----	Sensiblement blanche
MPR-L	Lumière (5 jours)	Poudre jaunâtre
MPR-T	Etuve (à 60°C/5 jours)	Sensiblement blanche
MPR-H	A l'aire libre et à l'abri de la lumière (5 jours)	Sensiblement blanche

II-Détermination de la teneur en eau par Karl Fischer

La détermination de la teneur en eau se fait par la méthode de KARL FISCHER (annexe III). Les résultats obtenus pour les essais réalisés sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 4: Teneurs en eau des échantillons étudiées

Matières étudiées	Masse	Teneur(%)
MPR	0.012	0.03
MPR-T	0.124	0.106
MPR-L	0.129	0.123
MPR-H	0.146	0.029

La limite mise en place par la pharmacopée européenne est de 0.5%, les valeurs obtenues rentrent bien dans cette norme. On note que la molécule de l'amlodipine ne prend pas d'eau. Ceci pourrait être dû à sa structure cristalline.

III-Test d'identification

1. Identification par HPLC

L'identification par HPLC consiste à comparer les temps de rétention du pic relatif à l'amlodipine standard avec ceux des MP. En effet, les temps de rétention de ces MP sont pratiquement les mêmes que ceux du standard. Selon la pharmacopée européenne la tolérance admise est de $\pm 5\%$. Donc il s'agit du bien de la même substance.

Tableau 5: Temps de rétention de chaque échantillon étudiés

Matières étudiés	Temps de rétention d'amlodipine (min)
STD	16.9
MPR	16.7
MPR-T	17.6
MPR-L	17.7
MPR-H	17.7

2. Identification par Spectroscopie FTIR

On procède à l'identification des MP étudié par spectroscopie FTIR en utilisant une Substance Chimique de Référence (SCR) fournie par la pharmacopée européenne. Pour l'enregistrement des spectres Infrarouge on a utilisé un accessoire spécial qui s'appelle : Unité de Réflexion Totale Atténuée (URTA), les échantillons ne demandent alors aucune préparation préalable, il suffit uniquement de placer une quantité suffisante de l'échantillon sur l'élément de réflexion totale atténuée qui est le cristal de Germanium, puis appliquer une pression et enfin enregistrer les spectres infrarouges.

Les spectres FTIR relatifs aux différentes matières premières présentent des allures similaires avec celui de la substance chimique de référence (figure 9).

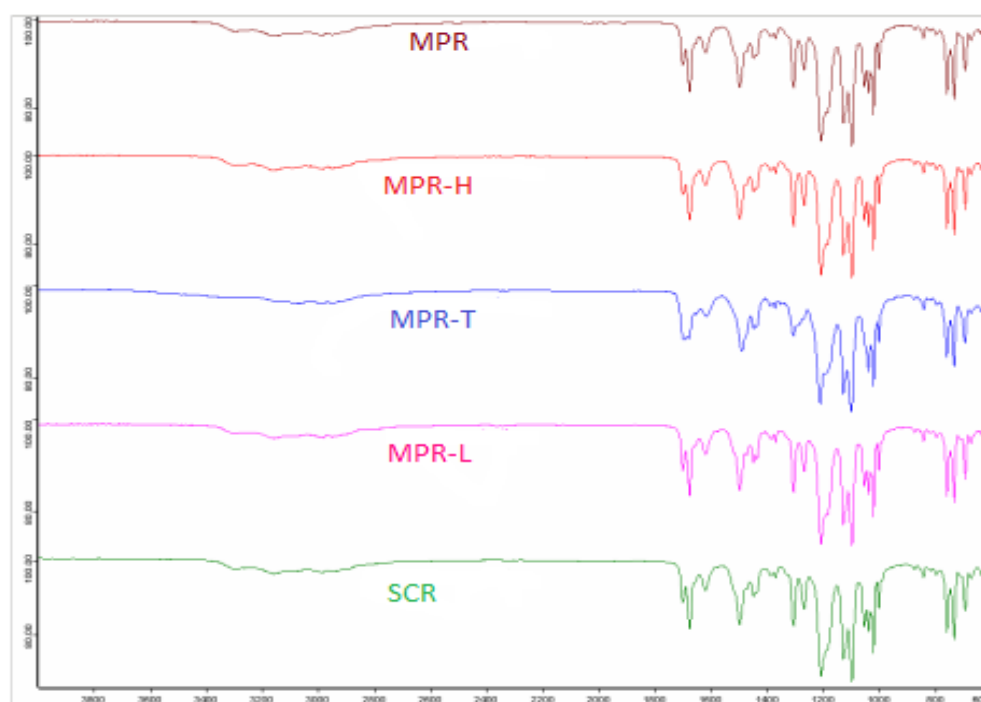


Figure 9: Spectres FTIR des différents échantillons étudiés

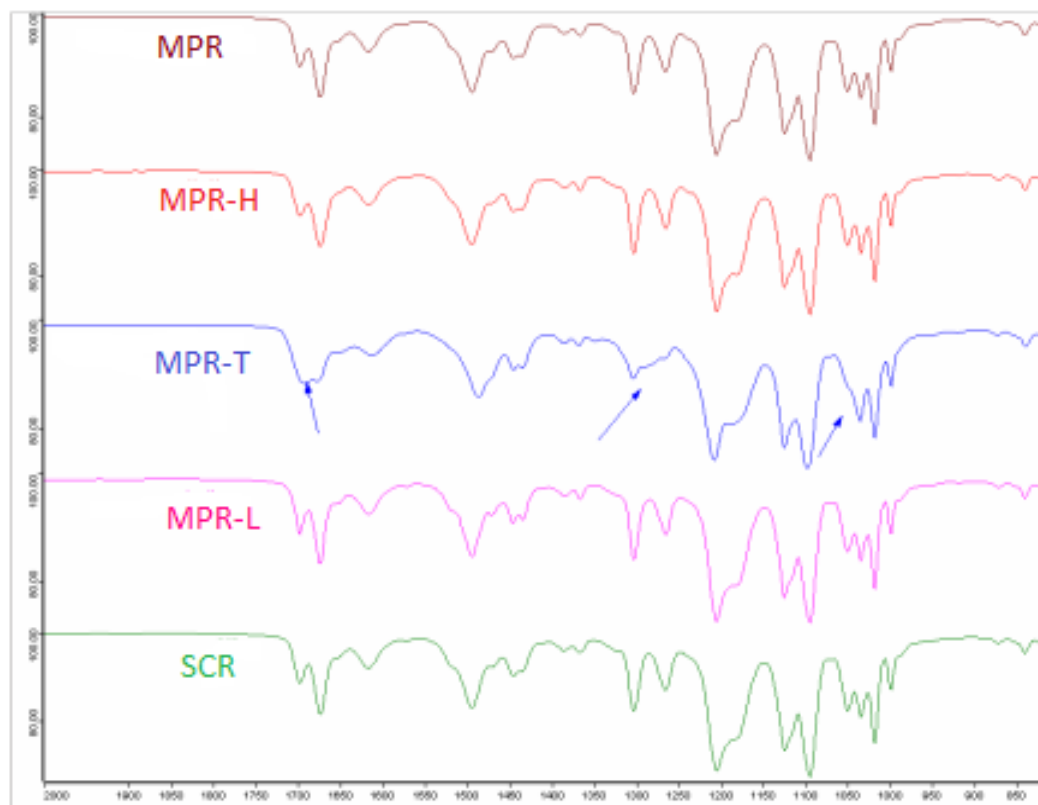


Figure 10: Zoom de la partie empreinte digitale

En effet, les échantillons traités par la lumière et par l'humidité sont restés inchangés (figure 9). Néanmoins des différences notables au niveau des positions et des intensités relatives de certaines bandes et de leurs résolutions ont été observées dans le cas de la MP traité par la température (figure 10 et tableau6). Pour MPR-T nous avons notés:

- des déplacements supérieurs à 4 cm^{-1} des bandes situées à 3306.01 cm^{-1} , 3365.85 cm^{-1} , $2988,24\text{ cm}^{-1}$, et $1612,86\text{ cm}^{-1}$.
- que les intensités des bandes situées à 1673 cm^{-1} et 1697 cm^{-1} sont inversées.
- l'apparition d'une nouvelle bande située à 1285.36 cm^{-1} .
- que bande à 1049 cm^{-1} est devenue sous forme d'épaulement.

Les différents groupements fonctionels de chaque échantillons étudiés sont regroupés dans le tableau 6.

L'analyse par spectroscopie FTIR nous a permis de détecter des différences concernant l'échantillon MPR-T. Il est donc probable qu'une partie de l'amlodipine bésilate s'est transformée en impuretés. Pour mieux cerner cette étude, nous avons essayé de réaliser le dosage par HPLC de ces MP.

Tableau 6: Bandes d'absorption des groupements fonctionnels (FTIR)

SCR en cm ⁻¹	MPR	MPR-L	MPR-T	MPR-H	Les groupements associe
3298.9	3296.69 cm ⁻¹	3297.46 cm ⁻¹	3306.01 cm ⁻¹	3296.46 cm ⁻¹	NH élongation du groupe amine primaire
3156.26	3156.44 cm ⁻¹	3157.31 cm ⁻¹	3065.84 cm ⁻¹	3158.63 cm ⁻¹	OH élongation de SO ₃ H
2983.81	2982.99 cm ⁻¹	2987.65 cm ⁻¹	2988.24 cm ⁻¹	2982.88 cm ⁻¹	CH élongation de cycle benzénique
1673.81	1673.31 cm ⁻¹	1673.15 cm ⁻¹	1676.43 cm ⁻¹	1673.31 cm ⁻¹	C=O élongation de groupe carbonyle
1616.16	1616.28 cm ⁻¹	1616.17 cm ⁻¹	1612.86 cm ⁻¹	1616.21 cm ⁻¹	C=C élongation de groupe carbonyle
1204.35	1204.21 cm ⁻¹	1204.47 cm ⁻¹	1206.98 cm ⁻¹	1204.34 cm ⁻¹	C-S élongation de SO ₃ H
1094.17	1093.20 cm ⁻¹	1093.75 cm ⁻¹	1096.63 cm ⁻¹	1093.60 cm ⁻¹	NH élongation d'un groupe amine secondaire
1018.06	1017.29 cm ⁻¹	1017.27 cm ⁻¹	1017.16 cm ⁻¹	1017.18 cm ⁻¹	C-O élongation de groupe carbonyle
756.09	754.47 cm ⁻¹	754.71 cm ⁻¹	755.08 cm ⁻¹	754.71 cm ⁻¹	OH flexion de SO ₃ H

L'analyse par spectroscopie FTIR nous a permis de détecter des différences concernant l'échantillon MPR-T. Il est donc probable qu'une partie de l'amlodipine bésilate s'est transformé en impuretés. Pour mieux cerner cette étude nous avons essayé de réaliser le dosage HPLC de ces MP.

IV-Dosage par HPLC

Le dosage des différentes matières premières d'amlodipine bésilate ont été réalisé selon les indications de test de l'identification (voir annexe IV). En effet, le laboratoire national de contrôle des médicaments adopte une méthode qui consiste à préparer deux standards et trois essais différents. Le calcul se fait par rapport SCR ayant un titre de (99.7), en utilisant les surfaces des pics. La formule de calcul est la suivante :

Formule de calcul

$$T\% = \frac{\text{Aire}_{\text{Essai}} \times C_{\text{Témoïn}} \times \text{Titre}}{\text{Aire}_{\text{Témoïn}} \times C_{\text{Essai}}} = \frac{\text{Aire dosage} \times \text{prise étalon} \times \text{titre étalon (99.7)} \times \text{volume dilution dosage}}{\text{Aire étalon} \times \text{prise essai} \times \text{volume dilution étalon}}$$

Les résultats obtenus pour le dosage des quatre matières première sont regroupés dans le tableau 7 selon la pharmacopée européenne le dosage l'amlodipine bésilate doit être compris entre [97-102%].

Tableau 7: Teneur de la molécule d'amlodipine besilate

	AIR	Teneur (%)
MPR	1620.3	100.2(%)
	1642.6	
	1631.2	
MPR-T	1529.2	97.5(%)
	1616.1	
	1620.0	
MPR-L	1558.1	99.3(%)
	1624.8	
	1664.7	
MPR-H	1603.7	101.1(%)
	1679.0	
	1675.1	

N.B : Les aires représente la moyenne de deux injections différentes.

On observe que les dosages de toutes les MP rentrent dans la norme fixée. Ce que signifie que l'amlodipine bésilate est une molécule stable même après les différents traitements. On peut dire qu'il ne s'agit pas d'une date de péremption mais une date de recontrole car l'amlodipine bésilate est une molécule très stable.

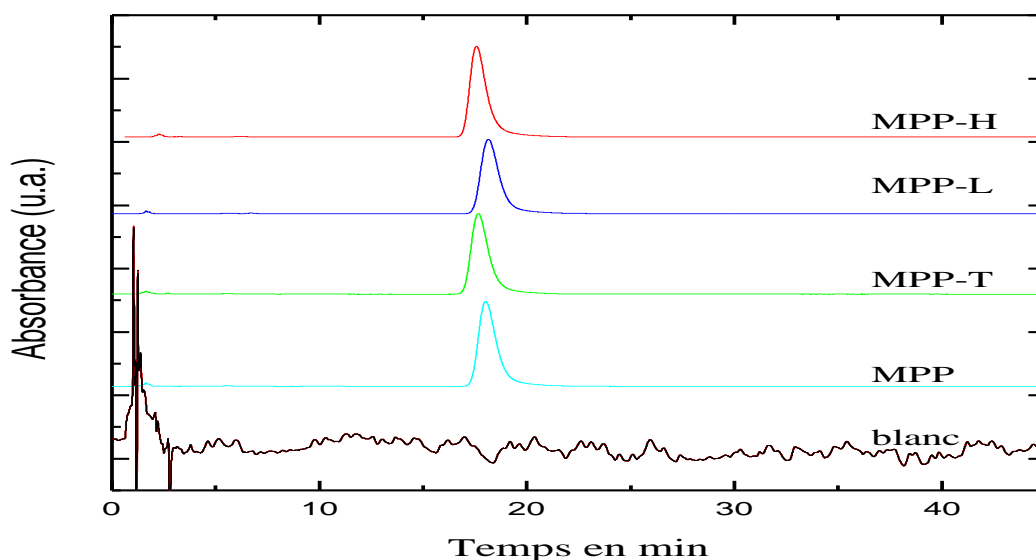


Figure 11: Chromatogrammes relatifs aux échantillons étudiés

La figure 9 regroupe les différents chromatogrammes relatifs aux échantillons étudiés. Après l'analyse de cette figure, On note aussi une diminution du dosage de l'échantillon MPR après traitement T=60°C. Ces résultats concordent parfaitement avec ceux retrouvés par spectroscopie FTIR. Si on considère maintenant l'échantillon MPR-L, on remarque une légère diminution de sa dose.

V-Dosage des substances apparentées par HPLC

Les substances apparentées apparaissent pendant la synthèse du principe actif, et devraient être identifiées, quantifiées et étudiées sur le plan toxicologique. Elles peuvent comprendre les produits de départ et leurs impuretés, des produits de réaction secondaires, d'isomérisation de dégradation, etc.

La méthode consiste à réaliser le test selon les mêmes conditions que celui du dosage (annexe V) avec un temps d'analyse qui correspond environ à trois fois le temps de rétention du principe actif. Deux essais ont été réalisés pour assurer la répétabilité de la méthode.

Le tableau suivant regroupe les structures développées des impuretés de synthèse et de dégradation de l'amlodipine bésilate. La pharmacopée européenne présente cette liste de transparence et permet de les identifier grâce à leurs rétentions relatives par rapport à l'amlodipine. Avant l'analyse HPLC, il est indispensable de faire le test de conformité décrit dans la pharmacopée européenne (le test de suitability) car c'est une étape qui permet de contrôler à la fois l'analyste et les performances du système chromatographique. Dans ce cas, la résolution entre les deux pics des impuretés B et G doit être supérieur à 2.

Tableau 8: les impuretés de la molécule d'amlodipine bésilate

Impuretés	Structures	Nomenclatures
Impureté A		(4RS)-4-(2-chlorophényl)-2-[[2-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)éthoxy]méthyl]-6-méthyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate de 3-éthyle et de 5-méthyle,
Impureté B		(4RS)-4-(2-chlorophényl)-6-méthyl-2-[[2-(méthylcarbamoyle)benzoyl]amino]éthoxy]méthyl]-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate de 3-éthyle et de 5-méthyle,
Impureté D		2-[(2-aminoéthoxy)méthyl]-4-(2-chlorophényl)-6-méthylpyridine-3,5-dicarboxylate de 3-éthyle et de 5-méthyle,
Impureté E		(4RS)-2-[(2-aminoéthoxy)méthyl]-4-(2-chlorophényl)-6-méthyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate de diéthyle,
Impureté F		(4RS)-2-[(2-aminoéthoxy)méthyl]-4-(2-chlorophényl)-6-méthyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate de diméthyle,
Impureté G		4-(2-chlorophényl)-2, diméthyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate de diméthyle,

Etude de la stabilité de l'amlodipine bésilate

Le calcul de la teneur des impuretés se fait selon la pharmacopée européenne et les résultats obtenus sont récupérés dans le tableau 10 :

Impureté A :

$$T(\%) = \frac{\text{Aire}_{\text{Essai}}}{\text{Aire}_{\text{Témoin d}}} \times 0.1$$

Impureté D :

$$T(\%) = \frac{\text{Aire}_{\text{Essai}} * 1.7}{\text{Aire}_{\text{Témoin a}}} \times 0.1$$

Impureté F :

$$T(\%) = \frac{\text{Aire}_{\text{Essai}} * 0.7}{\text{Aire}_{\text{Témoin a}}} \times 0.1$$

Impuretés B, E, G et non spécifiques

$$T(\%) = \frac{\text{Aire}_{\text{Essai}}}{\text{Aire}_{\text{Témoin a}}} \times 0.1$$

Tableau 9: Pourcentage des impuretés dans les matières étudiées

Impuretés	MPR		MPR-T		MPR-H		MPR-L	
	%	Moyens	%	Moyens	%	Moyens	%	Moyens
Impureté inconnu 1 (tr=3.11 min)	-	-	-	-	-	-	0.012	<0.05 *
	-		0.011					
Impureté G (tr=3.6 min)	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.007	<0.05 *
	0.00		0.00		0.00			
Impureté A (tr=4.32 min)	0.037	<0.05 *	0.063	0.234	0.527	0.29	0.039	0.063
	0.039		0.406		0.063		0.086	
Impureté B (tr=4.71 min)	0.089	0.15	0.005	<0.05 *	0.006	<0.05 *	0.009	<0.05 *
	0.060		0.002		0.003		0.015	
Impureté D (tr=6.27 min)	0.006	<0.05 *	0.008	<0.05 *	0.010	<0.05 *	0.014	0.206
	0.009		0.008		0.006		0.399	
Impureté inconnu 2 (tr=8.67 min)	0.030	<0.05 *	0.031	<0.05 *	0.031	<0.05 *	0.047	<0.05 *
	0.031		0.031		0.000			
Impureté F (tr=9.8 min)	0.012	<0.05 *	0.012	<0.05 *	0.011	<0.05 *	0.014	<0.05 *
	0.012		0.012		0.013		0.010	
Impureté inconnu 3 (tr=12.53 min)	-	-	-	-	-	-	0.005	<0.05 *
	-		0.063					
Impureté inconnu 4 (tr=13.06 min)	-	-	-	-	-	-	0.010	<0.05 *
	-		0.009					
Impureté inconnu 5 (tr=25.35 min)	-	-	-	-	-	-	0.025	<0.05 *
	-		0.022					
Impureté E (tr=28.58 min)	0.00	0	0.00	0	0.035	<0.05 *	0.005	<0.05 *
	0.00		0.00		0.006		0.002	
Impureté inconnu 6 (tr=34.47 min)	-	-	-	-	-	-	0.014	<0.05 *
	-		0.011					
Total	0.150		0.234		0.290		0.269	

* limite d'exclusion = 0.05 %

Les normes mises en place par la monographie sont :

- ✓ l'impureté D ; maximum 0.3 %
- ✓ l'impureté A, E, F ; maximum 0.15 %
- ✓ les impuretés non spécifiés ; maximum 0.1 %
- ✓ Somme en total au maximum 0.8 %.

Sur les chromatogrammes, on observe l'apparition de nouveaux pics correspondant aux impuretés spécifiées et non spécifiées.

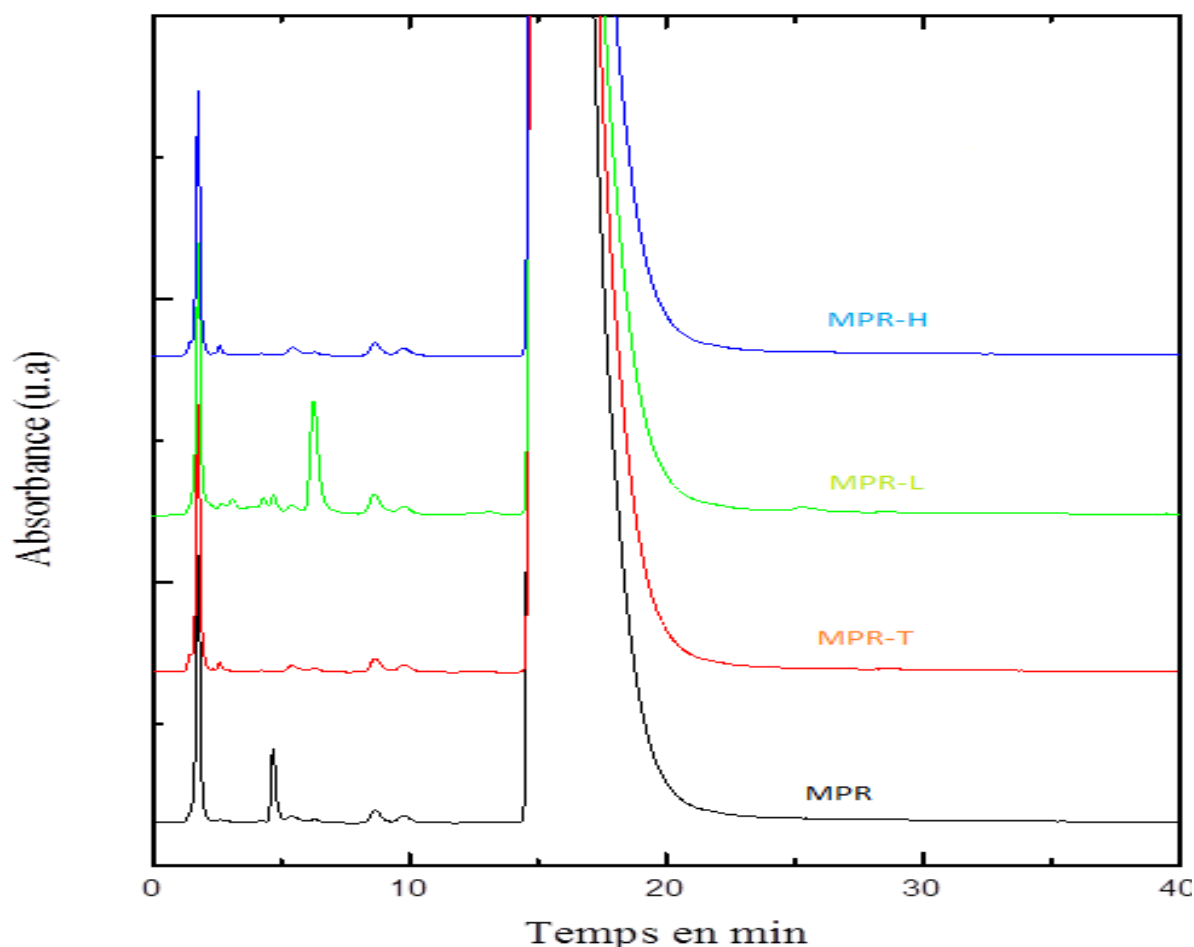


Figure 12: Chromatogrammes des substances apparentes des échantillons étudiés

Les valeurs obtenues pour la MPR rentrent bien dans cette norme, pour les autres échantillons, on note qu'il y a une augmentation du pourcentage de l'impureté **A** surtout dans les échantillons traités par la température et l'humidité, et une augmentation du pourcentage de l'impureté **D** pour l'échantillon MPR-L. Cependant, on note l'apparition de nouveaux pics qui correspondent à des impuretés inconnus ($t_r=3.11\text{min}$; 8.67min ; 12.53min ; 13.06min ; 25.35min ...) dans le cas de la MPR traité par la lumière. Toute fois leur teneur reste inférieure à la limite d'exclusion (0.05%). Il est donc clair que l'exposition à la lumière génère à la fois l'impureté **D** et d'autres impuretés inconnus. Par ailleurs, la somme des impuretés reste inférieure à 0.8 % (norme Pharmacopée européenne) ce qui signifie que même après les différents traitements le dosage des substances apparentées reste conforme.

VI- Étude par Spectroscopie FTIR des substances apparentées

Nous avons procédé au paravent à l'identification par spectroscopie FTIR des échantillons étudiés. En particulier, cette technique nous a permis de détecter plusieurs différences concernant la MPR-T. Nous avons donc essayé de comparer les spectres FTIR des substances chimiques de référence SCR relatives aux impuretés (imp A, imp B, imp G et du mélange contenant l'amlodipine et les impuretés D ; E ; F) avec celui de la MPR-T et MPR-L (figure 13 et 14).

Pour l'échantillon MPR-T nous avons constaté :

- que les bandes situées à 1349.2 cm^{-1} et 1282.9 cm^{-1} proviennent de l'impureté A.
- que les spectres FTIR des autres impuretés ne présentent pas de ressemblance notables.

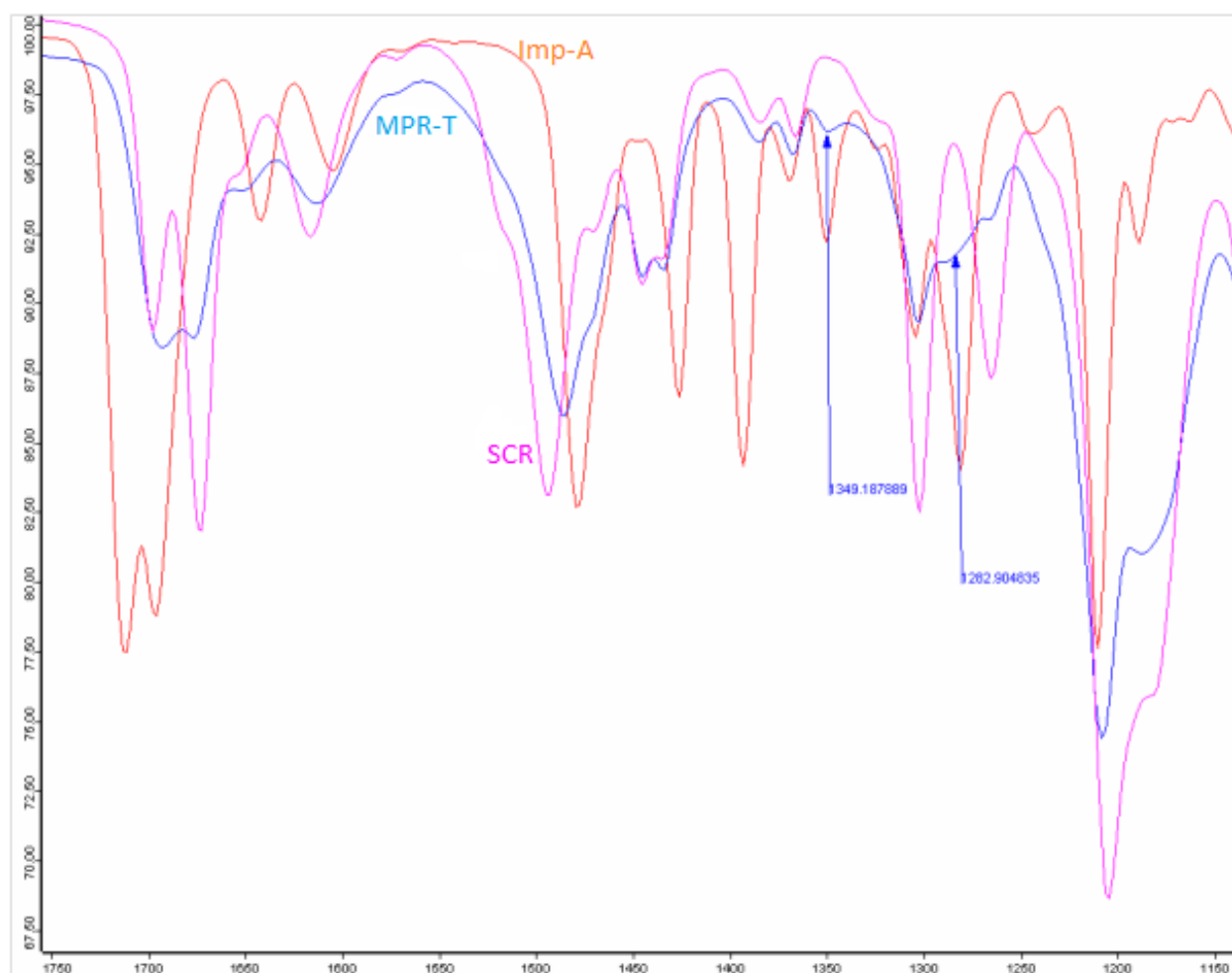


Figure 13: Spectres FTIR de l'impureté A ; SCR et MPR-T.

En ce qui concerne l'échantillon MPR-L, les spectres enregistrés sont identiques à l'amlodipine bésilate, probablement la teneur de ces impuretés est faible (figure 14).

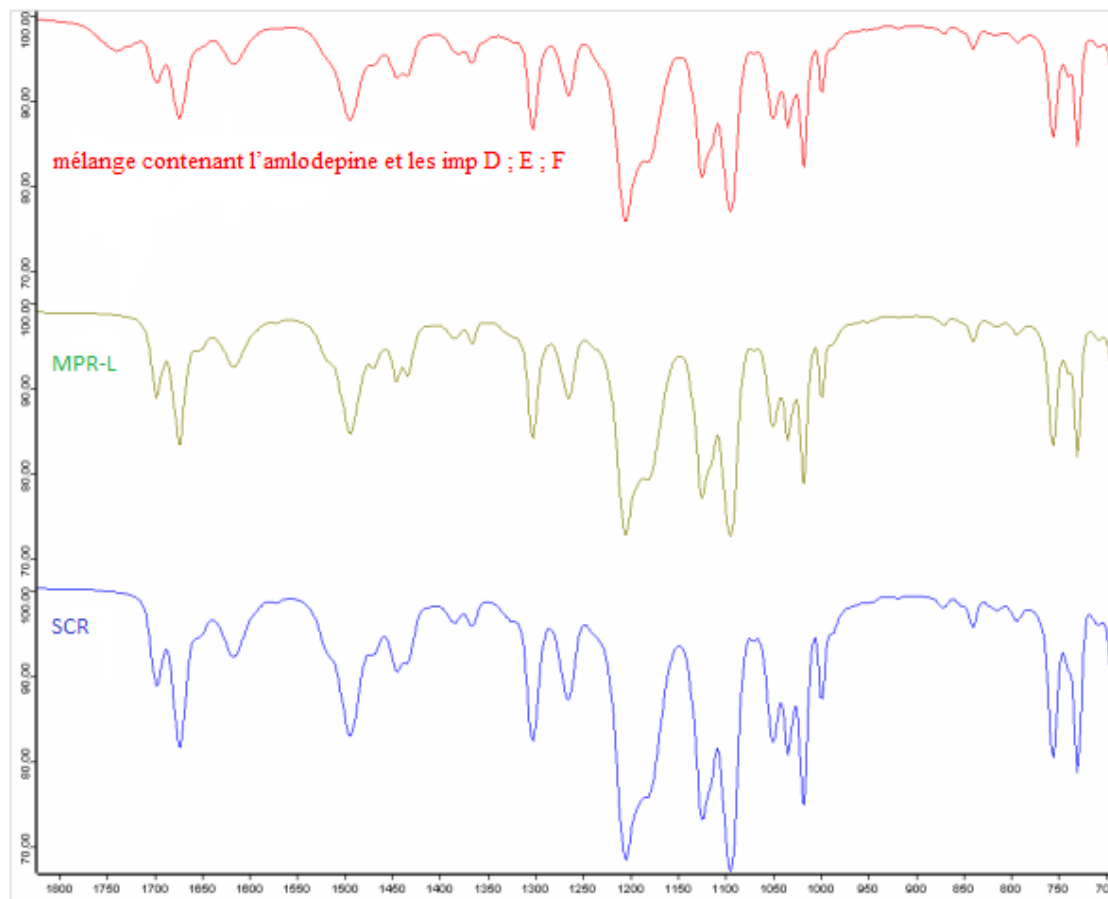


Figure 14: Spectres FTIR du mélange contenant l'impureté D, E et F; SCR et MPR-L

Conclusion

Durant ce stage de fin d'étude, effectué au Laboratoire National de Contrôle des Médicaments, nous avons pu travailler dans le domaine de la caractérisation analytique. En effet, ce stage nous avons permis de pratiquer les différentes techniques utilisées pour le contrôle des produits pharmaceutiques et des matières premières dont ils sont issus.

Les analyses physicochimiques réalisées sur les échantillons traités par l'humidité et la lumière ont montré que l'identification par spectroscopie FTIR, la teneur en eau, le dosage du PA et des substances apparentées restent conformes aux exigences de la Pharmacopée européenne. Par contre, le paramètre de la température conduit à une matière non-conforme au niveau du test d'identification FTIR.

Le contrôle de la MPR a montré une bonne stabilité de ce sel d'amlodipine. Elle pourrait être réutilisée dans la fabrication de spécialités médicamenteuses. Les conditions de stockage et de conservation sont des paramètres à respecter afin de garantir une qualité acceptable que ce soit de la MP ou des produits finis.

ANNEXES

ANNEXE I

A-Matériel:

- ❖ Le système de chromatographie liquide à haute performance(HPLC) est le modèle AGILENT, constitué une pompe, un injecteur automatique 2695 (séparation module) un détecteur à barrette de diode array le tout provenant de la maison de AGILENT France.
- ❖ La colonne de longueur 0.25m× 4 mm ID 5µm taille de particule.
- ❖ Spectroscopie FTIR est le modèle TENSOR 27.
- ❖ Karal fischer
- ❖ Balance : Mettler Tolido AG 204
- ❖ Bain à ultra son : Sonica Soltec

B-Etalons, matière premier et réactifs

- Standard de l'amlodipine bésilate (Etalon de travail d'une société pharmaceutique ayant un titre de 99.7%).
- Impureté A, B, G
- mélange contenant l'amlodepine et les impuretes D ; E ; F
- L'amlodipine bésilate
- Acétate d'ammonium
- Méthanol(CH₃OH) grade HPLC
- L'eau purifiée est filtrée sur membrane 0.45 µm.

ANNEXE II

La méthode de préparation des échantillons étudiés

L'échantillon MPR-T

On prend une quantité d'une MPR d'une molécule d'amlodipine bésilate et on le met dans l'étuve pendant une semaine à T=60°C.

L'échantillon MPR-L

On prend une quantité d'une MPR d'une molécule d'amlodipine bésilate et on le met sous la lumière pendant une semaine.

L'échantillon MPR-H

On prend une quantité d'une MPR d'une molécule d'amlodipine bésilate et on le met sous l'air pendant une semaine.

ANNEXE III

Détermination la teneur en eau des échantillons étudiées par Karl Fisher

On pose environ 1 g de chaque matière étudié et on le met dans le bécher de Karl Fisher puis on ajoute le réactif ; ensuite on prend la valeur du teneur en eau qui est directement mesuré par l'appareil.

ANNEXE IV

I-Dosage d'HPLC

Préparation de la solution standard :

Dans une fiole brune de 50 ml On dissolvé 50 mg d'amlodipine bésilate SCR, puis on ajoute environ 25 ml de la phase mobile, ensuite on le met dans ultrason pendant 5 min, après on complète le volume avec la même phase, enfin on prélève 5.0 ml de solution et on complète à 100.00 ml avec la phase mobile.

Préparation des solutions essais :

Dans une fiole brune de 50 ml On dissolvé 50 mg de la matière premier (amlodipine bésilate), puis on ajoute environ 25 ml de la phase mobile, passé à ultrason pendant 5 min, complété le volume avec la même phase, On prélève 5.0 ml de cette solution et on complète à 100 ml avec la phase mobile

Préparation du tampon :

On mette dans une bécher de 1000 ml environ 2.3g d'acétate d'ammonium et a l'aide d'une éprouvette 1000 ml de l'eau distillé.

Préparation du blanc : phase mobile

Dans un bécher on fait le mélange de 300 ml de la solution tampon et 700 ml de méthanol grade HPLC.

N.B : pour la phase mobile de HPLC il faut la filtrer (filtration sous vide)

Remarque :

* Avant injection dans la colonne, les solutions standard et essais sont filtrées avec un filtre de porosité de 0.45µm.

* Trois échantillons sont préparés pour chaque matière première et deux standards selon les indications de la pharmacopée européenne

Les organes HPLC	Les conditions
Colonne	0.25m× 4 mm ID 5µm taille de particule
Longueur d'onde	237 nm
Débit	1.5ml/min
Volume d'injection	20µl
Phase mobile	acétate d'ammonium , méthanol: 30/70
Temps acquisition	25 min
Temperature de la colonne	30°C

Conditions chromatographiques :

Tableau 1 : les conditions d'HPLC

ANNEXE V

II-Dosage de substances apparentées

Préparation des solutions

Solution à examiner (a)

Dans une fiole brune de 50 ml On dissolvé 50 mg de la matière premier d'amlodipine bésilate, puis on ajoute environ 25 ml de la phase mobile, et on le met dans l'ultrason pendant 5 min, ensuite on complète le volume avec la même phase.

- **Solution à examiner (b)**

On Prélève 5 ml de la solution examiné (a) et on complète à 100 ml avec la phase mobile.

- **Solution témoin (a)**

On Prélève 1ml de la solution à examiner (a) et on complète à 10 ml avec la phase mobile, puis on prélève 1 ml de cette solution et on complète à 100 ml avec la phase mobile.

- **Solution témoin (b)**

Dans une fiole brune de 50 ml On dissolvé 5mg d'impureté B d'amlodipine SCR et 5 mg d'impureté G d'amlodipine SCR, puis on ajoute environ 25 ml de la phase mobile,et on le ,met dans l'ultrason pendant 2 min, ensuite on complète le volume avec la même phase, enfin on Préleve 1 ml de solution et on complète à 10 ml avec la phase mobile.

- **Solution témoin (c)**

Dans une fiole brune de 10 ml On 5 mg d'amlodipine pour identification des pics SCR (contenant les impuretés D, E et F), puis on ajoute environ 5 ml de la phase mobile, et on le ,met dans l'ultrason pendant 2 min, ensuite on complète le volume avec la même phase.

- **Solution témoin (d)**

Dissoudre 5mg d'impureté A d'amlodipine SCR dans l'acétonitrile R et on complète à 5 ml avec le même solvant, puis on prélève 1 ml de solution et on complète à 100 ml avec la

phase mobile, Ensuite on Prélève 1 ml de cette solution et on complète à 10 ml avec la phase mobile.

➤ **Phase mobile**

La phase mobile est un mélange d'acétate d'ammonium R à 2.3g/L et de méthanol R avec des proportions (30 /70).

Conditions chromatographiques

On suit le même protocole utilisé dans le dosage.

Référence Bibliographique

- [1] **Meunier, C.** Opinion vis-à-vis des médicaments génériques : enquête auprès de 300 patients de pharmacies seinomarines ; mise en évidence du rôle joué par le médecin traitant. Rouen : Faculté mixte de médecine et de pharmacie, 2013, p116.
- [2] AMIP, le secteur pharmaceutique marocain : réalités sur le prix des médicaments intérêt du secteur, Maroc, 2010.Haut commissariat au plan
- [3] **Nouhoum T.M.**, « Etude de stabilité des comprimés sous blister de l'Usine Malienne de Produits Pharmaceutiques: Cas du paracétamol et du chloramphénicol », thèse, Université de Bamako Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie (FMPOS), 2009.
- [4] **TABOULET F.**, « La politique du médicament générique en France Un environnement en pleine évolution », Thèse, université Paul Sabatier – Toulouse, faculté des sciences pharmaceutiques, France, p 10, 2014.
- [5] **DANGOUMAU J., MOORE N., MOLIMARD M., FOURRIER-R A., LATRY K., HARAMBURU F., MIREMONT-SALAME G., TITIER K.**, Pharmacologie générale, pp 2 et 4, 2006.
- [6] **Haywood A., Beverley D .G.**, «Pharmaceutical excipients – where do we begin? », vol 34 (4) , 2011.
- [7] Pharmacopée Européenne ;sixième édition ; tome 1 ,01-2008
- [8] Académie national de pharmacie, Rapport, « Médicament générique », p 25, 2012.
- [9] Wangani, l'étalonnage, outil d'amélioration des performances dans les organisations publiques, Paris, Juin 2010.
- [10] A-75-06, CAF 214, Pfizer Canada Inc. et Pfizer Limited (appellantes), 2006.
- [11] **A,Gennady, J, Novakovic, et J,Lewis**, Amlodipine Besylate, thèse, Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology, Volume 37, Canada, 2012.

- [12] **KAOUNI, H**, Étude comparative de la validation d'une méthode de dosage d'amlodipine bésilate dans une spécialité pharmaceutique par HPLC/UV, thèse, université Mohammed v facultés de médecine et de pharmacie, rabat, 2010.
- [13] www.chmp.org/piot.pdf: Médicament Essentiel Multi source : Étude de Stabilité en conditions réelles et, conditions accélérées.
- [14] **Abdoullahi C**. «Etude de la stabilité des comprimés dragéifiés de l'UMPP». Thèse de Pharmacie Bamako 2002.
- [15] **Audigié CL, Dupont G, Zonszain F**, «Principes des méthodes d'analyse biochimiques», Doin Editeurs Paris tome 1, p 44, 1995.
- [16] **Salghi R**, Cours d'analyses physico-chimiques des denrées alimentaires II, GPEE, ENSA, Agadir, Ecole Nationale des Sciences Appliquées d'Agadir, p 7,2003.
- [17] Maîtrise du Polymorphisme dans les Procédés de Cristallisation de Produits d'Intérêts Pharmaceutiques : Application à La Cristallisation de l'Eflucimibe
- [18] **Burgot G. Burgot J.**, méthodes instrumentales d'analyse chimique et d'applications, éditions technique et documentation, pp42-62, 2002.
- [19] **Marta E. Themudo** , Aquiles A Barms and Margarida Bastos, Application of Karl Fischer's Method to materials that only release water at high temperatures, *Portugaliae Electrochimica Acta*, 19 ,pp 301-311, 2001.
- [20] **wang J.** , « A combined role of calcium channel blockers and angiotensin receptor blockers in stoke prevention », *Vascular health and risk management*, Vol. 5, pp 593-605, 2009.
- [21] **EL BERBOUCHI L.**, « Optimisation du test de dissolution a l'aide de la méthodologie des plans d'expériences Cas de l'amlodipine comprimés », thèse doctorat ; Université Mohammed V, Faculté de Médecine et de pharmacie –Rabat, Maroc, p51, 2010.

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques



Nom et prénom: AZOULAY Karima

Année Universitaire : 2014/2015

Titre: Etude de la stabilité de l'amlodipine bésilate

Résumé

La stabilité des préparations pharmaceutiques dépend à la fois des conditions de leur stockage (température, humidité et lumière) et des caractéristiques intrinsèques du produit. La qualité de la matière première occupe une place non négligeable dans la stabilité des produits pharmaceutiques.

L'objectif de ce travail est d'étudier la stabilité de l'amlodipine bésilate, l'une des matières premières utilisées comme principe actif dans certains médicaments génériques au Maroc et les conditions de conservation et de stockage de l'amlodipine bésilate.

Les analyses physicochimiques réalisées sur les échantillons traités par l'humidité et la lumière ont montré que l'identification par spectroscopie FTIR, la teneur en eau, le dosage du PA et des substances apparentées par HPLC restent conformes aux exigences de la Pharmacopée européenne. Sous ces conditions, l'amlodipine bésilate est stable. Par contre, le paramètre de la température conduit à une matière non-conforme au niveau du test d'identification FTIR. Il est donc possible de réutiliser cette matière première dans la fabrication de médicaments.

Mots clés : Stabilité, Amlodipine bésilate, HPLC, FTIR, Karl Fisher,