

N° d'ORDRE:15/2008- M/CH

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE HOUARI  
BOUMEDIENE  
U.S.T.H.B

**FACULTE DE CHIMIE**



MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de **MAGISTER**  
EN CHIMIE

Spécialité : Chimie Organique Appliquée

Par :

**CHABAI HASSINA**

**THEME**

**ETUDE D'UNE MOLÉCULE BIOLOGIQUEMENT  
ACTIVE «LE CLOPIDOGREL» PAR HPLC**

Soutenu le 27 /12/2008, devant le jury composé de :

Mr A.DAHMANI	Professeur (USTHB)	Président
Mme O.FERROUKHI	Maître de conférences (USTHB)	Directeur de thèse
Mme S.GHERMOUCHE	Professeur (USTHB)	Examinatrice
M <sup>elle</sup> L.BOUDARENE	Maître de conférences (USTHB)	Examinatrice



I-5-1/ Introduction	10
I-5-2 / Stéréochimie et chiralité	11
I-5-2-1/ Définitions et concepts	11
I-5-2-2/ Propriétés physico-chimiques des énantiomères	11
I-5-3/Chiralité et pharmacie	12
I-5-4/ Obtention d'énantiomères par les méthodes chromatographiques	12
I-5-5/ Classement des principaux sélecteurs chiraux	15
I-5-6/ Les homopolymères à cavités	16
a) Les cyclodextrines	16
b) Les polysaccharides	18
I-5-7/ Les protéines	19

## Chapitre II : Validation

II-1- Introduction	20
II-2- Définition d'une validation analytique	20
II-2-1- Critères de validation	21
II-2-1-1/ Spécificité	21
II-2-1-2/ Linéarité	21
II-2-1-3-/ Fidélité	22
II-2-1-4/ Robustesse	23
II-2-1-5- Exactitude	23
II-2-1-6 - Limite de détection/ Limite de quantification	24

## Chapitre III : Partie Expérimentale

III-1-1/ Recherche d'impuretés	25
III-1-1-1/ Les substances apparentées	25
III-1-1-2-Conditions chromatographiques	25
a) Phase mobile	26
b) Préparation des solutions	26
III-1-2-/ Dosage du Clopidogrel dans les comprimés	27
1/ Préparation de la solution standard	27

2/ Préparation de la solution à examiner	í í í í í í í í í í í í í í	..27
III-2-1-Matériel et méthode	í í í í í í í í í í í í í í í í í	..28
a) Matériel	í í	...28
b) Réactifs et produits	í í	...28
III-2-2/Mise au point de la méthode et optimisation des conditions	í	28
III-2-3-Validation de la méthode	í í í í í í í í í í í í í í í í í	.. 29
III-2-3-1/ Spécificité	í í	29
III-2-3-2/ Linéarité	í í	. 29
III-2-3-3-Fidélité	í í	.. 30
III-2-3-4-La robustesse	í í	... 30
III-3-1/Matériel et méthode	í í í í í í í í í í í í í í í í í í í	. 31
a)Matériel	í í	....31
b) Réactifs et produits	í í	...31

## Chapitre IV : Résultats et discussion

IV-1-1/Recherche d'impuretés	í í í í í í í í í í í í í í í í í	. 34
IV-1-1-1/Les substances apparentées	í í í í í í í í í í í í í í í í í	34
IV-1-2/ Dosage du Clopidogrel dans les comprimés	í í í í í í í í í í í í í í í í í	35
IV-2-1/ Spécificité	í í	39
IV-2-2/ Linéarité	í í	.41
IV-2-3 / Fidélité	í í	43
IV-2-4/ Exactitude	í í	47
IV-2-5/ Robustesse	í í	48
IV-2-6/ Limite de détection/ Limite de quantification	í í í í í í í í í í í í	..48
IV-3-1/ Phase mobile (1)	í í	..49
IV-3-2/Phase mobile (2)	í í	....50
IV-3-3/Phase mobile (3)	í í	51
IV-3-4/ Phase mobile (4)	í í	...51
Conclusion générale	í í í í í í í í í í í í í í í í í í í	54

### Références bibliographiques

# Remerciements

*Avant toute chose, je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné la patience et le courage de terminer ce travail.*

*Ce travail a été réalisé au laboratoire de Chromatographie de la faculté de chimie à l'U.S.T.H.B, dirigé par le Professeur M.H. GUERMOUCHE que je remercie pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et conseillé dans mon travail.*

*Je tiens tout particulièrement à remercier Mme O. FERROUKHI maître de conférences à l'U.S.T.H.B, pour m'avoir dirigée tout au long de ce travail, pour l'aide précieuse, les encouragements qu'elle n'a cessés de me prodiguer, qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.*

*Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Madame S. GUERMOUCHE, Professeur à l'U.S.T.H.B, pour sa gentillesse et pour l'aide qu'elle m'a apportée au cours de ce travail. Son intérêt, sa disponibilité, son suivi quotidien de mes travaux et ses précieux conseils m'ont été d'un grand profit. Je la remercie infiniment. Et pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de juger ce travail.*

*Je prie Monsieur A.DAHMANI, Professeur à l'U.S.T.H.B, d'accepter mes plus vifs remerciements, en me faisant l'honneur de présider le jury de thèse.*

*Ma gratitude et mes plus vifs remerciements vont également à M<sup>elle</sup> L.BOUDARENE maître de conférences à l'U.S.T.H.B, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de juger ce travail.*

*C'est avec une certaine émotion et beaucoup de sincérité que je voudrais remercier tous mes collègues du laboratoire pour leurs encouragements et leur aide.*

# *Dédicaces*

Je dédie ce travail à la mémoire de mon père et ma chère maman, à la quelle je dois tout le respect et une grande considération pour son soutien et ces encouragements continus.

Que dieu te garde pour moi.

- A mes frères adorés,
- A mes sœurs,
- A mes anges Fadia et Said
- A toutes mes amis surtout : Radia, Wahiba.....

A tout ceux qui me sont chers

*H. Chabai*

Introduction

Générale

# Introduction générale

Depuis les années 60, après le drame de la thalidomide, la législation concernant les molécules biologiquement actives chirales est devenue plus rigoureuse.

En effet, avec ce type de substance, une forme est active et l'autre forme peut ne posséder aucune activité, être responsable d'effets secondaires ou même être toxique.

La séparation des deux formes est difficile à mettre en œuvre. La réglementation impose actuellement un excès énantiomérique d'au moins 98 % pour tout médicament commercialisé sous un seul énantiomère.

La chromatographie en phase liquide à haute performance avec phase stationnaire chirale est la méthode la plus utilisée pour évaluer les excès énantiomériques.

Le présent travail porte sur l'analyse d'une molécule biologiquement active ayant une activité optique : Le Clopidogrel. Cette molécule est administrée sous forme énantiopure.

C'est un médicament qui est utilisé en prévention des complications artérielles (infarctus, accident vasculaire cérébral) chez des patients ayant présenté un accident vasculaire cérébral ischémique, un infarctus du myocarde ou une artérite des membres inférieurs. Il est aussi utilisé chez certains patients souffrant d'un syndrome coronaire aigu en association avec l'aspirine.

Il agit en bloquant la fixation de l'adénosine diphosphate (ADP) sur son récepteur au niveau des plaquettes sanguines. Ce blocage empêche l'activation des plaquettes point de départ d'une cascade de réactions aboutissant à la formation d'un caillot.

Ce travail est divisé en trois parties :

Dans une première partie, nous nous proposons de déterminer la pureté énantiomérique, la recherche des substances apparentées, le dosage de la matière première et la quantification du clopidogrel dans les préparations pharmaceutiques selon une méthode validée de la pharmacopée.

La deuxième partie sera consacrée à la mise au point et à la validation d'une méthode de dosage du Clopidogrel sur une phase stationnaire achirale. En effet, les colonnes chirales sont

très onéreuses et il serait donc intéressant de pouvoir disposer d'une méthode d'analyse accessible.

Dans la troisième partie, nous nous proposons de réaliser la séparation des isomères optiques du Clopidogrel sur trois différents sélecteurs chiraux appartenants à trois principales familles chimiques, les cyclodextrines, les protéines et les polysaccharides. Les résultats obtenus seront comparés et discutés.

# CHAPITRE I

## Généralités

## **I/ Introduction :**

Les maladies cardiovasculaires constituent l'un des problèmes majeurs de santé publique et affectent un nombre toujours croissant d'individus dans le monde entier. Ainsi les dernières statistiques disponibles décrivent une prévalence de 34,2% dans la population générale (soit 70,1 millions de personnes) [1].

Plusieurs classes de médicaments ont permis une diminution significative de la survenue d'évènements cardiovasculaires, en prévention primaire ou secondaire. Parmi ces classes il y a le clopidogrel.

Le Clopidogrel est un puissant médicament anti-agrégant plaquettaire [2], de la classe des thienopyridines, administré par voie orale. Il inhibe sélectivement et de manière irréversible l'activation plaquettaire induite par l'Adénosine Diphosphate (ADP) [3]. L'absorption régulière de ce médicament réduit de façon significative les risques d'une crise cardiaque ou d'un accident vasculaire cérébral chez les malades cardiovasculaires.

Le Clopidogrel joue un rôle central dans la prévention des évènements cardiovasculaires. Son rôle dans la prise en charge des syndromes coronariens aigus est récapitulé dans un article récent [4].

Ce produit a été approuvé par la FDA (Food and Drug Administration américaine) en novembre 1997, après que l'étude CAPRIE ait montré une réduction supérieure des infarctus du myocarde, accidents vasculaire cérébraux, et une démonstration d'une efficacité supérieure par la suite d'une association de l'aspirine[5].

L'étude Cure [6] a montré qu'un traitement prolongé par le Clopidogrel réduit 20% le risque d'une crise cardiaque, d'un accident vasculaire cérébral et de décès par la maladie.

## I.1/ Propriétés physico-chimiques du Clopidogrel :

Les différentes propriétés physicochimiques du Clopidogrel sont regroupées dans le tableau (1) suivant :

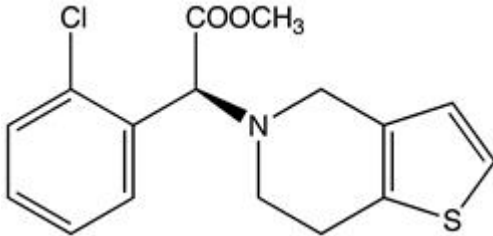
<b>Le principe actif</b>	<b>S-Clopidogrel</b>
<b>Dénomination chimique</b>	[methyl(+)-(S)-(o-chlorophenyl)-6,7-dihydrothieno[3,2-c]pyridine-5(4H)-acetate
<b>Formule brute</b>	$C_{16}H_{16}ClNO_2S$
<b>Formule développée</b>	
<b>Poids moléculaire (g/mol)</b>	321.20
<b>Caractères</b>	<u>Aspect</u> : poudre blanche <u>Solubilité</u> : très soluble dans le méthanol et l'acétonitrile et pratiquement insoluble dans l'éther.

Tableau 1 : propriétés physico-chimiques du Clopidogrel

## **I-2/ Généralités sur les médicaments:**

### **I.2-1 / Définition d'un médicament :**

On entend par médicament, toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animal, en vue d'établir un diagnostic médical, ou restaurer, corriger, modifier leur fonction organiques.

Parmi les principaux composants d'un médicament, , le principe actif .

### **I.2-2 / Le principe actif :**

Le principe actif (PA) est une molécule biologique, minérale ou organique, naturelle ou synthétique, qui confère au médicament son activité thérapeutique.

L'activité biologique et la toxicité de cette molécule sont appréciées par des tests appropriés et comparatifs. Sa structure chimique est la plus souvent connue [7].

### **I.2-3 / Passage du médicament dans l'organisme :**

Une fois administré, un médicament suit trois phases : l'absorption, la distribution et l'élimination [7].

Leur étude est nommée pharmacocinétique.

#### **d) Absorption :**

L'absorption est le passage du médicament de son site d'administration vers la circulation générale. Une fraction seulement de la dose administrée atteint la circulation générale (biodisponibilité).

La biodisponibilité doit être assez grande pour que le médicament soit absorbé en quantité suffisante et assez rapidement pour avoir l'efficacité souhaitée. Elle dépend des propriétés physicochimiques du médicament (solubilité, vitesse de dissolution, etc.).

**b) Distribution :**

Après son entrée dans la circulation générale, un médicament se distribue dans tout l'organisme. Sa répartition entre les différents tissus est inégale, du fait des différences de perméabilité, de volume ou de circulation sanguine de ces tissus.

Le médicament commence à être métabolisé (transformation physicochimique) dès son entrée dans l'organisme rend le processus de distribution instable et complexe.

**c) Elimination :**

L'organisme tente d'éliminer le plus rapidement possible toute substance étrangère et/ou toxique qui a été introduite. L'élimination se fait par excrétion directe (élimination sans transformation du médicament) ou par excrétion des médicaments dans l'organisme grâce aux divers organes servant à évacuer les déchets du métabolisme : rein, foie, poumon, intestin, etc.

**I-3 / Pharmacocinétique du Clopidogrel:****I.3.1/ Absorption :**

La résorption est rapide, après administration orale du clopidogrel de 75 mg/jour et le taux d'absorption est égal à 50%.

**I.3.2/ Métabolisme :**

Le Clopidogrel requiert une biotransformation dans le foie et le tube digestif [8] ; via les cytochromes. Un métabolite actif, dérivé thiol, est formé par oxydation du clopidogrel en 2-oxo-clopidogrel suivie d'une hydrolyse. Cet intermédiaire est ensuite transformé pour former un groupe carboxyle et un groupe thiol (seconde oxydation) [9]. L'interaction du métabolite actif avec son récepteur est donc extrêmement dépendante de sa conformation [10]

**I.3.3/ Elimination :**

La demi- vie d'élimination du principal métabolite circulant est de 8 heures, urinaire (50%) et fécale (46%) au cours des 120 heures, suivant la prise.

## **I-4/ Généralités sur la CLHP:**

### **II.4-1/ -Définition de la chromatographie liquide à haute performance :**

La chromatographie liquide à haute performance (**CLHP**) est une méthode applicable à tous types de chromatographie en colonne avec élution en phase liquide. Elle utilise comme support des particules de faibles diamètres. Elle correspond à une évolution de la chromatographie préparative sur colonne dont les performances, en termes de sélectivité et de résolution, se sont trouvées grandement améliorées par la miniaturisation et l'utilisation de phases stationnaires élaborées. Ces phases, constituées généralement de micro-particules sphériques dont les diamètres sont compris entre 3 et 10  $\mu\text{m}$ , conduisent à une perte de charge importante dans la colonne, il faut donc exercer sur la phase mobile une forte pression pour obtenir un débit convenable.

La CLHP est fondée sur le principe de partage des solutés entre la phase stationnaire et la phase mobile. La phase stationnaire est constituée d'un support, qui est soit imprégné par un liquide, soit greffé de motifs organiques variés (très souvent des hydrocarbures en C8 ou C18). La phase mobile est un liquide pur ou un mélange de liquides dont les interactions avec la phase stationnaire doivent être la plus faible possible (liquide non miscible de polarité différente).

Les méthodes chromatographiques peuvent mettre en œuvre : Une phase stationnaire polaire et une phase mobile apolaire : c'est la chromatographie d'adsorption où la phase stationnaire est polaire. Elle est actuellement peu utilisée. Une phase stationnaire apolaire et une phase mobile polaire, c'est la chromatographie de partage à polarité de phase inversée.

La chromatographie liquide sur phase inversée présente plusieurs avantages :

- Utilise l'eau, principal avantage.
- Une excellente résolution même pour des composés de structures chimiques extrêmement proches.
- Une sélectivité facilement contrôlable par modification de la nature de l'éluant.
- Une excellente reproductibilité des analyses sur des périodes de temps importantes.

Les analyses par chromatographie de phase inversée mettent en jeu une phase mobile polaire constituée d'une solution aqueuse à laquelle est ajouté graduellement un solvant organique.

Les solvants organiques les plus couramment utilisés sont l'acétonitrile, le méthanol et le tétrahydrofurane. Chacun de ces éluants présente une transparence optique aux longueurs d'ondes d'absorption utilisées [11].

La chromatographie en phase liquide à haute performance utilisée de nos jours se distingue de la chromatographie classique par les points suivants :

- \* Colonnes de petits diamètres : 4 à 10mm, réutilisables.
- \* Remplissage des colonnes avec un matériau composé de particules très fines 3 à 10  $\mu\text{m}$ .
- \* Introduction de très petites quantités d'échantillons à analyser.
- \* Extrême sensibilité de détection.
- \* Grand pouvoir séparateur.
- \* Excellente reproductibilité grâce au contrôle du débit par la pompe.
- \* Séparation rapide.

#### **I-4-2/ Paramètres d'un chromatogramme :**

##### **I-4-2-1/ volume de rétention ( $V_r$ ) :**

$$V_r = D \cdot t_r$$

$D$  : Débit de la phase mobile supposé constant pendant l'analyse.

$t_r$  : Temps de rétention, c'est le temps d'éluion au maximum de pics mesuré à partir de l'injection.

##### **I-4-2-2/ Facteur de capacité ( $K'$ ) :**

Le facteur de capacité représente la manière dont un composé est retenu sur une colonne puisque c'est le rapport du temps de rétention réduit de la substance à celui d'un composé non retenu

$$K' = (t_r - t_m) / t_m$$

$t_m$  : temps de rétention d'un soluté non retenu.

##### **I-4-2-3/ Sélectivité d'une colonne ( $\alpha$ ):**

Pour caractériser la distance séparant les sommets des deux pics, on utilise la sélectivité définie par la relation :

$$\alpha = (\mathbf{tr}_2 - \mathbf{t}_m) / (\mathbf{tr}_1 - \mathbf{t}_m)$$

**tr<sub>1</sub>** : temps de rétention du premier composé

**tr<sub>2</sub>** : temps de rétention du deuxième composé

**t<sub>m</sub>** : temps de rétention d'un soluté non retenu

#### **I-4-2-4/ Résolution (Rs) :**

Pour distinguer une bonne ou une mauvaise séparation des composés on fait intervenir une grandeur élémentaire de la chromatographie qui est la résolution désignée par les lettres Rs et exprimé par la formule :

$$\mathbf{Rs} = 2[(\mathbf{tr}_2 - \mathbf{tr}_1) / (\mathbf{W}_1 + \mathbf{W}_2)].$$

**W1** et **W2** étant les largeurs des deux pics à la base.

Plus la résolution est grande, meilleure est la séparation entre les deux pics.

#### **I-4-2-5/ Nombre de plateaux théoriques (N) :**

L'efficacité d'une colonne vis-à-vis d'une substance est définie par son nombre de plateaux théoriques. Ce nombre N est aisément déterminé à partir du pic chromatographique.

$$\mathbf{N} = 16(\mathbf{Tr} / \mathbf{w})^2$$

**W** : largeur du pic à la base.

**tr** : Temps de rétention

## **I-5- Chiralité en HPLC :**

### **I-5-1/ Introduction :**

La chiralité est une propriété géométrique qui caractérise le fait qu'un objet et son image dans un miroir ne sont pas identiques. Bien que découverte il y a près de deux siècles, la chiralité reste sujet ouvert et passionnant, à l'interface de la chimie, de la physique et de la biologie. Elle soulève encore des interrogations. Le rôle primordial des molécules chirales en thérapeutique a été révélé et mis en évidence suite aux événements dramatiques survenus dans les années 70, dus à l'utilisation de médicaments tels que la thalidomide. La commercialisation de médicaments sous forme racémique a été longtemps privilégiée par l'industrie pharmaceutique car elle permettait d'abaisser le coût de production, la séparation des énantiomères étant relativement onéreuse.

Actuellement, étant donné que deux énantiomères peuvent avoir des comportements totalement différents, la séparation chirale est devenue un sujet d'intérêt croissant dans de nombreux domaines tels que la pharmacie clinique, le contrôle qualité des médicaments et des aliments, l'environnement ou encore en biochimie. Par conséquent, les procédés industriels de fabrication de médicaments s'orientent aujourd'hui largement vers la commercialisation d'un principe actif énantiomériquement pur. Pour atteindre cet objectif deux stratégies sont possibles : soit développer le médicament optiquement pur par des synthèses énantiosélectives, celles-ci restant difficile à réaliser, soit résoudre le racémique en ses deux énantiomères par une méthode de discrimination chirale.

A l'heure actuelle, parmi les nombreuses méthodes de discrimination chirale, la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) représente une technique de choix pour la purification et la quantification d'énantiomères. En effet, outre le fait qu'elle allie à la fois rapidité, efficacité et sensibilité, elle permet également la séparation de composés chiraux sur des phases stationnaires chirales ou après addition de réactifs chiraux à la phase mobile (approche directe). Des séparations après dérivation en pré-colonne en diastéréoisomères sont également possibles en CLHP (approche indirecte). La séparation d'énantiomère par voie directe est devenue de plus en plus fréquente au cours des dernières années.

Un grand nombre de sélecteurs chiraux ont été découverts et utilisés avec succès.

## I-5-2 / Stéréochimie et chiralité :

### **I-5-2-1/ Définitions et concepts :**

Les isomères sont des composés dont la formule moléculaire est identique, mais qui diffèrent par la nature de leurs liaisons ou l'enchaînement de leurs atomes ou par l'arrangement spatial de leurs atomes. Les isomères qui se différencient par la séquence de leurs atomes sont dits isomères de constitution ou de position. Ceux pour lesquels seuls l'arrangement spatial des atomes différent est appelé stéréoisomères.

Deux stéréoisomères (non superposable par simple rotation) sont dits énantiomères, antipodes ou isomères optiques si et seulement si, ils sont images l'un par rapport à l'autre dans un miroir. La molécule est dite alors **chirale**.

Le mot chiralité vient du mot grec « *kheir* » qui signifie main. La chiralité peut être donc définie comme une caractéristique structurale qui fait qu'une molécule est asymétrique et non superposable à son image dans un miroir, exactement à l'image de la main gauche et de la main droite.

### **I-5-2-2/ Propriétés physico-chimiques des énantiomères :**

Les énantiomères ont des propriétés physico-chimiques identiques (fusion, ébullition, solubilité dans un solvant achiral, densité, etc.). En particulier, les pouvoirs rotatoires spécifiques des énantiomères sont opposés. Autrement dit, si une substance chirale est traversée par un faisceau de lumière polarisée plane, elle provoque une rotation du plan de polarisation de cette lumière. On dit qu'elle possède une activité optique ou un pouvoir rotatoire.

Les propriétés chimiques des énantiomères sont les mêmes vis-à-vis d'un réactif non chiral. Un mélange racémique ne peut être résolu dans un tel système. En revanche, les énantiomères peuvent former, en présence d'un réactif optiquement pur, deux diastéréoisomères.

Les diastéréoisomères, contrairement aux énantiomères, présentent des propriétés physico-chimiques différentes et peuvent être séparés par les méthodes d'analyse chimique classiques [12].

### I-5-3/Chiralité et pharmacie :

Le fait que l'activité pharmacologique d'une molécule chirale puisse varier d'une configuration absolue à une autre, a de nombreuses implications. Ceci est la conséquence directe de phénomènes connus de longue date, à savoir que la majeure partie des processus biologiques sont régulés par (ou font intervenir) des molécules énantiomériquement pures tels que les acides aminés, les sucres ou les protéines. La nature est capable de transformer ou de produire des composés chiraux avec une remarquable spécificité.

L'évolution est encore lente : en 1984, sur 666 médicaments parmi les plus utilisés, 355 (53%) possédaient un ou plusieurs centres de chiralité ; 181 principes actifs (d'origine naturelle pour la plupart) étaient administrés sous la forme d'un des stéréoisomères, alors que les 174 autres l'étaient sous la forme du mélange racémique [13].

On classe les médicaments chiraux comme suit :

Ceux pour lesquels toute l'activité réside dans un des isomères.

Ceux pour lesquels l'activité est identique quelle que soit la configuration absolue.

Ceux pour lesquels l'activité reste la même, mais dont l'efficacité diffère.

Ceux pour lesquels l'activité est différente ; notons que dans certains cas extrêmes, le mélange racémique peut présenter une activité différente de celle des énantiomères pris séparément.

\* Ceux pour lesquels, un des deux énantiomères est l'eutomère tandis que l'autre est toxique : une telle situation nécessite une attention toute particulière et ne devrait théoriquement plus se représenter en raison de sa gravité potentielle.

Il est donc indispensable de connaître non seulement l'identité de l'énantiomère responsable de l'activité, mais aussi de s'assurer qu'il ne donne pas lieu à une énantiomérisation rendant son usage peu intéressant [14].

En conclusion, dans le domaine pharmaceutique, tout au moins, la chiralité revêt donc une importance considérable tant au point de vue thérapeutique que réglementaire ou économique. L'augmentation de la demande de composés énantiopurs dans l'industrie pharmaceutique a stimulé ainsi le développement de nouvelles sociétés qui sont spécialisées dans la synthèse

asymétrique [15] et elle a aussi favorisé le développement de nouvelles méthodes de séparation des énantiomères parce qu'il est indispensable dans ce contexte de disposer d'outils performants pour séparer ou évaluer les isomères optiques.

#### **I-5-4/ Obtention d'énantiomères par les méthodes chromatographiques:**

Pour obtenir une substance optiquement pure ou discriminer deux énantiomères, plusieurs méthodes ont été développées telles que la synthèse asymétrique, la biotransformation, la cristallisation, les membranes, les biocapteurs, et enfin les méthodes chromatographiques.

A l'heure actuelle, la méthode chromatographique est la technique qui recueille le plus de succès dans le domaine de la séparation énantiomérique.

Parmi les différentes méthodes chromatographiques, la chromatographie liquide haute performance (CLHP) est sans aucun doute la méthode la plus utilisée pour les séparations chirales. Elle n'est cependant pas la seule, la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie en phase gazeuse (CPG) sont également employées, avec plus ou moins de succès.

Deux approches distinctes de séparation stéréosélective peuvent être utilisées en chromatographie chirale : Une approche indirecte et une autre directe.

a/ L'approche indirecte est fondée sur la séparation après dérivation en diastéréoisomères. Elle consiste à modifier la molécule chirale à analyser en la faisant réagir avec un réactif optiquement pur de façon à former deux diastéréoisomères.

Ces deux nouveaux produits possèdent des propriétés physico-chimiques différentes et sont donc séparables dans un environnement achiral avec des phases stationnaires et mobiles classiques. Cette méthode est toutefois limitée aux molécules ayant des groupements réactionnels (amine, hydroxyle, carboxylique, etc.) et exige soit une grande pureté énantiomérique du réactif chiral, soit que le degré de pureté soit connu. D'ailleurs, la réaction de dérivation doit être rapide et quantitative [16].

Cependant, pour certaines applications telles que les séparations des acides aminés ou des peptides, elle reste une approche intéressante. Elles permettent parfois d'améliorer parallèlement la sensibilité d'une méthode en ajoutant un groupement qui améliore la détection du composé ou qui permet une détection d'un autre type (par fluorimétrie par exemple) [17].

b/ La séparation d'énantiomère par approche directe, c'est-à-dire sans dérivation ou préalable, est devenue de plus en plus fréquente au cours de ces dernières années. Cette approche permet la séparation directe des composés chiraux selon deux voies distinctes :

\* La séparation chirale selon la première voie consiste en la formation de diastéréoisomères labiles par l'addition d'un réactif chiral dans la phase mobile, les phases stationnaires utilisées sont en général achirales.

La nature de la phase stationnaire, le pH, la température, la concentration en solvant organique dans la phase mobile et bien sur, la nature et la concentration du sélecteur chiral, sont autant de facteurs qui influencent la séparation des énantiomères. Toutefois, la nécessité d'ajouter des grandes quantités de sélecteurs chiraux dans la phase mobile peut constituer l'élément restrictif de cette technique.

\* La deuxième voie de l'approche directe de séparation énantiomérique repose sur la formation de diastéréoisomères labiles à la surface de la phase stationnaire chirale (PSCs).

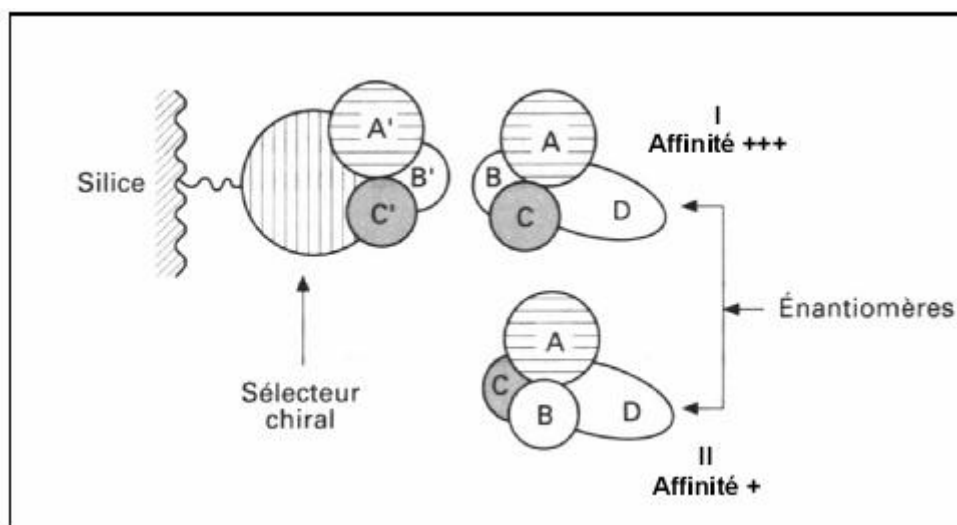
Les PSCs ont fait la preuve de leur efficacité dans le domaine de la séparation des énantiomères par la méthode chromatographie, aujourd'hui, elles représentent la meilleure alternative pour la majorité des applications biochimiques, pharmaceutiques ou pharmacologiques. Les PSCs les plus importantes et les plus utilisées sont disponibles sous forme de plaques, de colonnes ou de capillaires.

De nombreux composés optiquement actifs (naturels, semi-synthétiques ou synthétiques) [18] ont été utilisés comme sélecteurs chiraux en tant que phase stationnaire ou comme additifs à la phase mobile pour la séparation stéréosélective des énantiomères.

Toutefois, pour qu'un sélecteur chiral soit efficace, il doit satisfaire aux conditions suivantes :

- a- Il doit posséder suffisamment de groupes, d'atomes et de cavités pour lui permettre de former des complexes diastéréoisomères avec les énantiomères du soluté.
- b- Il doit être soluble et chimiquement stable dans la phase mobile s'il est utilisé en tant qu'additif.
- c- Il doit être commercialement disponible ou facilement synthétisable et peu coûteux.

La formation de diastéréoisomères labiles à la surface de PSCs est de loin la plus importante. Elle peut être utilisée avec des racémates ne possédant que des groupements faiblement réactifs. Le dédoublement des énantiomères repose sur la formation, dans la phase stationnaire chirale, de complexe diastéréoisomères labiles entre le racémate et le sélecteur chiral.



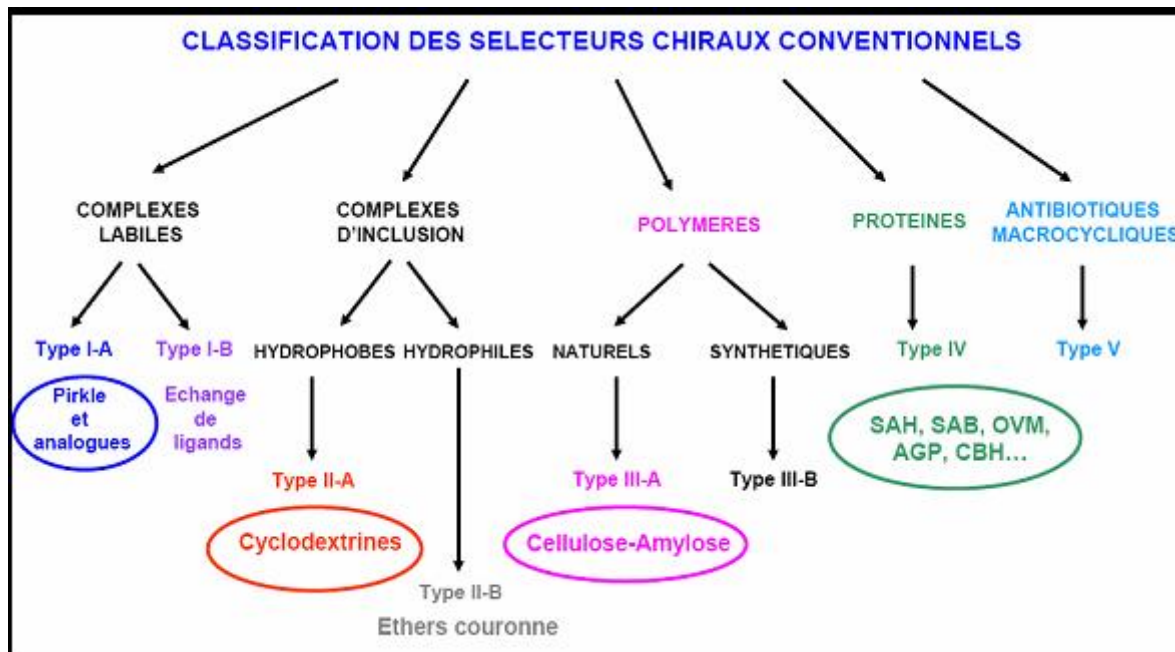
**Figure 1** : Modèle de reconnaissance chirale concept des trois points d'interaction d'après Dalglish [20].

La figure ci-dessus décrit le premier modèle de reconnaissance chirale qui a été proposé par Dalglish [19]. Il suppose, d'une part, l'existence d'interactions (liaisons hydrogène, interaction de type  $\pi$ - $\pi$ , interactions dipôle-dipôle, etc.) entre soluté et sélecteur et, d'autre part, un minimum de trois points d'interaction entre ces deux protagonistes. Si le sélecteur interagit avec trois groupements fonctionnels différents au voisinage du centre d'asymétrie du soluté, il sera capable de différencier les deux énantiomères : un énantiomère maintient trois interactions avec le sélecteur tandis que l'autre énantiomère n'interagit qu'avec deux groupements du sélecteur (Figure 1) [20]. De plus, la meilleure énantiosélectivité sera obtenue si les trois éléments interagissants sont proches du centre de chiralité.

#### **I-5-5/ Classement des principaux sélecteurs chiraux :**

La classification des sélecteurs chiraux est basée sur leur structure et sur les interactions mises en jeu lors du processus de la reconnaissance chirale. On peut ainsi distinguer deux grandes familles de sélecteurs chiraux : les sélecteurs dits « conventionnels » et les sélecteurs dits « sur mesure », spécifiques d'un énantiomère prédéterminé.

Les sélecteurs chiraux conventionnels peuvent être classés en cinq grandes familles selon leur structure chimique et le mécanisme de reconnaissance chirale mis en jeu (figure 2).



**Figure 2** : Classification des sélecteurs chiraux conventionnels. (SAH : Sérum Albumine Humaine ; SAB : Sérum Albumine de Bœuf, OVM : Ovomucoïde ; AGP :  $\alpha$ 1-glycoprotéine acide ; CBH : Cellobiohydrolase).

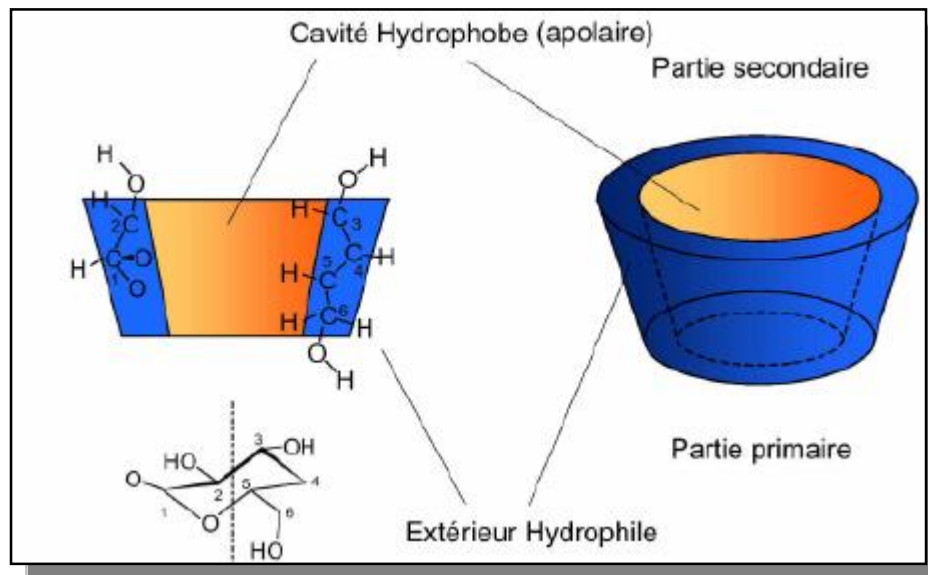
### I-5-6/ Les homopolymères à cavités :

Cette classe rassemble différents sélecteurs qui font intervenir un phénomène d'inclusion de la molécule chirale dans les cavités du sélecteur. Les principaux sélecteurs chiraux employés sont les cyclodextrines, les éthers couronnes et les polymères synthétiques.

#### a- Les cyclodextrines :

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides de structure cyclique obtenus à partir du maïs. Elles sont constituées de plusieurs unités de D-glucose (glucopyranose), en conformation chaise, liées par des liaisons  $\alpha$ -1,4. Les cyclodextrines naturelles  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  comportent respectivement 6, 7 et 8 unités de glucose. L'arrangement spatial des unités de glucose donne à la molécule une forme toroïdale conique. Les groupes hydroxyles secondaires sont localisés du côté le plus ouvert tandis que les groupes hydroxyles primaires sont du côté le plus étroit. Cette disposition des groupes -OH confère à l'extérieur de la

molécule un caractère hydrophile tandis que les groupes  $-CH-$ , localisés à l'intérieur de la cavité, déterminent le caractère hydrophobe de la cyclodextrine (**Figure 3**) [21].



**Figure 3:** représentation schématique de la forme de la cyclodextrine et du Positionnement des différentes fonctions.

Une des propriétés remarquable des cyclodextrines est leur aptitude à former des complexes d'inclusion avec une grande variété de molécules [22,23]. La stabilité de ces complexes d'inclusion est déterminée par les caractéristiques moléculaires de la molécule invitée et est contrôlée par plusieurs phénomènes notamment l'effet hydrophobe, les liaisons hydrogène et les interactions de Van Der Waals.

Les cyclodextrines ont été utilisées dans le domaine de la séparation chirale à partir de 1980 [24]. A présent, leur utilisation en chromatographie (CLHP, CPG et CCM) et en électrophorèse capillaire est devenue très courante [25-29]. Elles sont utilisées comme phases stationnaires [30,31] ou comme additifs de la phase mobile [25, 26, 29,32,33].

Les cyclodextrines natives présentent certains inconvénients tels que des problèmes de solubilité et des contraintes de faible interaction avec l'analyte. La  $\beta$ -cyclodextrine, qui est la plus utilisée (elle représente 95% des cyclodextrines utilisées) a une faible solubilité dans l'eau. L'ajout de solvants organique tels que l'acétonitrile [34] ou l'urée [35] dans le milieu aqueux (phase mobile) permet d'accroître la concentration de cyclodextrine dans l'éluant. Une autre alternative est l'utilisation d'une cyclodextrine modifiée. Les cyclodextrines natives ont été modifiées par substitution de l'atome d'hydrogène du groupe hydroxyle [36] par divers groupement (alkyle, hydroxyalkyle, amino, thio, sulfate méthyle, acétyle, tec.) [37].

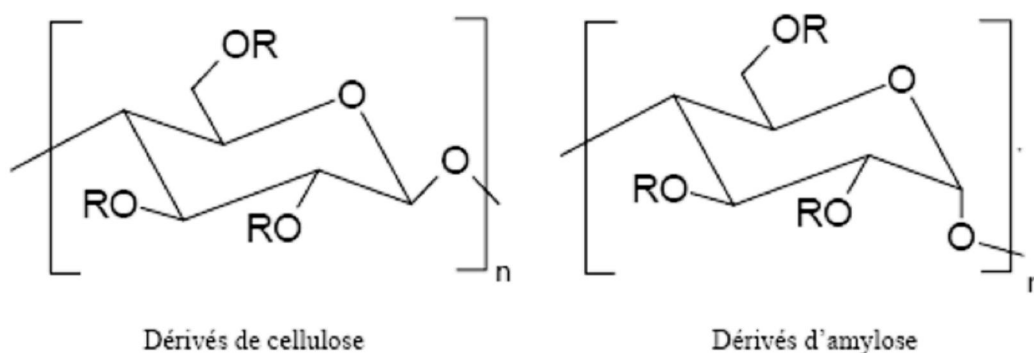
Ces cyclodextrines modifiées sont employées en tant qu'additifs de phase mobile ou comme phase stationnaire chirales. Les phases stationnaires cyclodextrines natives et modifiées sont utilisées en polarité de phase normale, en polarité de phase inversée [37].

Parmi les nombreuses molécules qui ont été résolues avec les cyclodextrines, citons les benzodiazépines [38], les dérivés d'imidazole [39], les  $\beta$ -bloquants [40], les anti-inflammatoires non stéroïdiens [41], la warfarine [32, 42], les alcaloïdes [43], les dérivés d'acides aminés [44], etc.

### b-Les polysaccharides :

Les polysaccharides tels que la cellulose et l'amylose possèdent un fort potentiel d'application en séparation chirale. En effet, ces polysaccharides ont une structure hélicoïdale asymétrique composé de n unités de D-(+)-glucose reliées par des ponts  $\beta$  (1-4) pour la cellulose et par des ponts  $\alpha$  (1-4) pour l'amylose. Chacune de ces unités contribue à la reconnaissance chirale des solutés avec lesquelles elle interagit.

Les résolutions obtenues par ces polymères naturels sont généralement faibles. Afin d'améliorer leur énantiosélectivité, la cellulose et l'amylose ont été modifiées par dérivation des fonctions-OH libres (figure 4).



**Figure 4** : Structure chimique de dérivés de la cellulose et de l'amylose.

La reconnaissance de ces molécules implique des phénomènes d'inclusion, des interactions de type  $\pi$ - $\pi$ , des liaisons hydrogène, des interactions dipôle-dipôle et des interactions électrostatiques [45- 47].

Généralement, les dérivés polysaccharidiques sont utilisés, avec un grand succès, en tant que phase stationnaire en chromatographie liquide haute performance (CLHP) [48-50]. Les

phases stationnaires cellulosiques ou amylosiques sont utilisées en polarité de phase normale ou inversée [47-51].

Le domaine d'application des sélecteurs chiraux composés de dérivés de cellulose ou d'amylose est un des plus vastes domaines. En effet, de nombreux médicaments chiraux à caractère acide, neutre ou basique, présentant un noyau aromatique et un groupement polaire (carbonyle, hydroxyle, sulfoxyde, etc.) près du centre d'asymétrie, ont été résolus sur ce type de sélecteur chiral. Citons par exemple les alcaloïdes, les dérivés atropiniques, les  $\beta$ -bloquants, les anti-histaminiques, les anti-inflammatoires, etc. [52-54].

### **I-5-7/ Les protéines :**

De nombreuses protéines ont été utilisées en séparation chirale. Citons notamment l'albumine humaine [55,56], l'albumine bovine [57, 58], les glycoprotéines telles que l' $\alpha_1$ -glycoprotéine acide [59], l'ovomucoïde du blanc d'œuf du poulet [60], la pepsine [61].

Ces protéines ont été principalement utilisées en tant que phase stationnaire en CLHP. Elles sont très peu utilisées comme additifs chiraux dans la phase mobile [62].

Les mécanismes de reconnaissance chirale semblent être dus à la structure particulière de la protéine et/ou à la formation de cavités hydrophobes capables de reconnaître des molécules chirales. D'autres interactions (effet hydrophobe, électrostatiques, transfert de charges, liaisons hydrogène, échange d'ions, etc) sont probablement également impliquées dans la reconnaissance énantiosélective du ligand [63]. Ces sélecteurs chiraux permettent la résolution d'une large gamme de composés chiraux. Ainsi, des molécules médicamenteuses chirales acides, neutres ou basiques ont été séparées à l'aide des différents sélecteurs chiraux protéiques existants par CLHP ou par électrophorèse capillaire [64].

Les sélecteurs chiraux protéiques présentent un large éventail de résolution de mélanges racémiques. Ainsi, des énantiomères de médicaments acides, neutres ou basiques ont été séparés sur les différents sélecteurs protéiques utilisés en chromatographie liquide haute performance ou en électrophorèse capillaire. Citons notamment les énantiomères du propranolol [65], de l'aténolol [66], de l'ibuprofène [67].

# CHAPITRE II

## Validation

## **II/ Validation d'une méthode d'analyse de médicament :**

### **II-1- Introduction :**

Pour assurer l'uniformité de tous les lots d'un médicament présenté sous une ou plusieurs formes pharmaceutiques, il est nécessaire d'établir une norme appropriée pour l'identité, la pureté, l'exactitude, le comportement et d'autres caractéristiques. C'est le strict respect de ces normes qui permet d'obtenir la qualité souhaitée.

Les normes de qualité peuvent être soit publiées soit confidentielles. Les normes publiées sont en général présentées sous forme d'une monographie et sont énoncées en des termes permettant de procéder à l'évaluation objective du produit. Les monographies établies par la Pharmacopée Européenne sont donc des normes officielles applicables dans la préparation pharmaceutique

Ceci confirme qu'un médicament ne peut être mis sur le marché s'il n'a pas été autorisé conformément par des signataires compétents qui font plusieurs contrôles pour assurer l'autorisation de mise sur le marché. Parmi ces contrôles, on trouve par exemple, le contrôle des matières premières, le contrôle de routine et spécifications, le contrôle du produit fini, la validation des méthodes etc.í .

Toutes les autorisations de mise sur le marché ont une validité de cinq années au terme desquelles il y a lieu une demande de renouvellement [68].

### **II-2- Définition d'une validation analytique :**

La validation analytique d'une méthode est un caractère très important de n'importe quel produit pharmaceutique soumis à l'examen dans l'optique de la mise sur le marché de nouveaux produits. Les procédures chromatographiques font partie des méthodes les plus utilisées en analyse pharmaceutique et on fait l'objet d'un travail important dans la validation de méthodes.

La validation analytique est résumée comme incluant des tests pour confirmer la linéarité, la spécificité, la fidélité, les limites de détection, les limites de quantification, et la robustesse.

La revalidation d'une méthode peut être nécessaire dans certaines circonstances telle que le transfert du développement analytique au contrôle qualité, ou quand il y a des modifications importantes dans le procédé de fabrication du principe actif ou dans la composition du produit fini.

Dans le cas de système chromatographie, un test de conformité doit être fourni, et les formules détaillées pour le calcul du résultat doivent être données. Les méthodes trouvées dans les Pharmacopées sont considérées comme validées, à condition qu'elles soient utilisées dans leur usage envisagé.

### **II-2-1- Critères de validation :**

L'industrie pharmaceutique exige que toute méthode d'analyse doit être validée avant son utilisation routinière.

La validation d'une méthode d'analyse est une procédure permettant d'apporter des preuves que la méthode est adaptée à ces objectifs [69]. Son objectif est de démontrer les performances de la procédure de dosage et de prouver que les résultats obtenus sont fiables et ceci dans des limites bien définies.

La validation d'une méthode analytique fait appel à plusieurs critères dont les plus intéressants sur le plan d'analyse quantitative sont les suivants :

- Spécificité
- Linéarité
- Fidélité
- Exactitude
- Robustesse
- Limite de détection (LOD)
- Limite de quantification (LOQ)

#### **II-2-1-1/ Spécificité :**

La spécificité est la capacité d'une méthode analytique à mesurer avec exactitude la substance à doser sans que cette mesure ne soit faussée par d'autres composants de l'échantillon (excipients, produits de dégradation, etc.).

Pour vérifier qu'il n'y a pas d'interférence des excipients il faut faire une linéarité avec des étalons surchargés en excipients et la comparer à celle réalisée avec les étalons seuls.

#### **II-2-1-2/ Linéarité :**

La linéarité est la capacité d'une méthode d'analyse à l'intérieur d'un certain intervalle à fournir une réponse instrumentale ou des résultats proportionnels à la quantité en substance à doser dans l'échantillon [70]. Cette proportionnalité s'exprime à travers une expression

mathématique défini a priori. On parle de la linéarité quand la courbe d'étalonnage est une droite (réponse du 1<sup>er</sup> ordre  $Y_i = A + BX_i$ ). Elle est vérifiée par le calcul des constantes de droite ainsi que du coefficient de corrélation en utilisant la méthode de moindres carrés (régression linéaire). Ce dernier doit être de l'ordre de 0,99

### Calcul statistique :

↳ Calcul des paramètres de la droite de régression :

Les paramètres de la droite de régression sont établis de la façon suivante :

B : est la pente de la droite de régression

$$B = \frac{\sum_i^N (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sum_i^N (X_i - \bar{X})^2}$$

A : représente l'intersection de la droite de régression avec l'axe des ordonnées.

$$A = \bar{Y} - B\bar{X}$$

### On détermine ensuite :

$$\text{Biais} = 100 (Y_i - A) / BX_i$$

Et le biais moyen  $B_i$

### II-2-1-3- Fidélité :

La fidélité décrit l'écart aléatoire des valeurs par rapport à une valeur moyenne. Elle se subdivise en répétabilité, fidélité intermédiaire, et reproductibilité.

La répétabilité est la fidélité déterminée sous des conditions identiques (même échantillon, même opérateur, même appareil, même jour).

La fidélité intermédiaire est la fidélité issue des répétitions effectuées sur un même échantillon dans des conditions différentes (jours différents, manipulateurs différents).

La reproductibilité est la statistique sur des résultats se référant à des études de différents laboratoires.

On doit calculer le coefficient de variation qui ne doit pas excéder les normes ainsi on a :

### Écart type SD :

$$SD = \sqrt{Var} \quad \text{Avec}$$

$$Var = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2$$

### Calculs statistiques :

1. Calculer la moyenne  $M_i$  et écart type  $SD_i$  de chaque série
2. Calculer la moyenne  $M$  des moyennes et écart type  $SD$  des moyennes des séries
3. Calculer  $SD_{intra} = \sqrt{\sum_i SD_i^2 / (m - 1)}$ ,  $m = m =$  nombre total de séries de mesures
4. Calculer  $SD_{inter} = \sqrt{\sum_i (SD_i^2 - SD_{intra}^2/n)}$ ,  $n =$  nombre de résultats pour chaque série
5. Calculer  $SD_{total} = \sqrt{\sum_i (SD_{intra}^2 + SD_{inter}^2)}$ .
6. Calculer les coefficients de variation suivants :

$$SD_{intra} = 100.SD_{intra}/ M \quad ; \quad \text{norme} < 2\%$$

$$SD_{inter} = 100.SD_{inter}/ M \quad ; \quad \text{norme} < 2\%$$

$$SD_{total} = 100.SD_{total}/ M \quad ; \quad \text{norme} < 2\%$$

### II-2-1-4/ Robustesse :

C'est la capacité d'une méthode à donner des résultats exacts en subissant des petites variations apportées délibérément aux paramètres de la méthode. Elle donne une idée de la fiabilité de la méthode aux conditions normales d'utilisation [71]. La variation est portée soit sur le pH, le débit ou sur la composition de la phase mobile. Cette variation implique la vérification de la fidélité et l'exactitude.

### II-2-1-5- Exactitude :

L'exactitude représente la quantité de l'accord entre la valeur mesurée et la valeur vraie ou conventionnellement vraie. Elle est calculée à partir des résultats de la fidélité. On détermine :

- La moyenne  $X$  de tous les résultats de la fidélité
- Le pourcentage de récupération  $PR$  :  $PR = 100.X/\text{valeur de référence}$

La valeur du pourcentage de récupération  $PR$  est comprise entre deux valeurs limites qui sont :

- Limite supérieure :

$$LS = PR + t_{0,975} * SD_{moy/m}$$

- Limite inférieure :

$$LI = PR - t_{0,975} * SD_{moy/m}$$

Avec :

$t_{0,975}$  = coefficient de Student = 3.182 pour un intervalle de confiance à 95%

On calcul la précision par :

$$\text{Précision} = 100 - PR$$

#### **II-2-1-6 - Limite de détection/ Limite de quantification :**

La limite de détection (LOD) est la plus petite quantité d'une substance à doser mais non quantifiée. [72]

$$LOD = 3 * \text{bruit de fond}$$

La limite de quantification (LOQ) petite quantité pouvant être détectée avec une précision et une exactitude acceptable. [73]

$$LOQ = 10 * \text{bruit de fond}$$

# CHAPITRE III

## Partie expérimentale

## **Partie III-1 : Détermination de la pureté énantiomérique, recherche des impuretés et dosage du Clopidogrel hydrogénosulfate dans les comprimés selon la pharmacopée.**

### **III-1-1/ Recherche d'impuretés :**

#### **III-1-1-1/ Les substances apparentées :**

Le chemin de synthèse des principes actifs peut être décrit par un schéma réactionnel comportant plusieurs étapes. Ces étapes peuvent générer des produits intermédiaires retrouvés à l'état de traces dans le produit fini. Ces traces portent le nom de substances apparentées. Leurs qualités et leurs quantités sont fixées dans les différentes pharmacopées.

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour mettre en évidence ces substances. Il s'agit surtout des méthodes séparatives :

- Chromatographie sur couches minces (CCM)
- Chromatographie en phase gazeuse (CPG)
- Chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) qui est une méthode de choix pour la détermination de ces substances.

Dans le cas de certaines matières premières présentant une isomérisation optique dont un seul énantiomère possède l'activité recherchée, le deuxième peut être considéré comme une substance apparentée.

Dans notre cas la molécule active, le S-clopidogrel est susceptible de contenir des impuretés de synthèse dont l'un est son énantiomère, le R-clopidogrel.

L'objectif de notre travail, consiste à quantifier le clopidogrel et les substances apparentées selon le protocole de la pharmacopée.

#### **III-1-1-2-Conditions chromatographiques :**

Parmi les différentes méthodes chromatographiques existantes, la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) est sans aucun doute la méthode la plus utilisée pour les séparations chirales.

Nous avons utilisé pour notre étude la méthode validée [74] dont les conditions chromatographiques sont :

Conditions chromatographiques	
colonne	Chiral-recognition protéine, ovomucoid (150 * 4,6 mm ; 5µm)
Phase mobile	Acétonitrile /tampon phosphate (0.01M) : (25/75)
Longueur d'onde	220 nm
Débit	1 ml/min
Température de la colonne	17°C
Volume injecté	10µl

Tableau 2 : Conditions chromatographiques

a) Phase mobile :

**La phase mobile est constituée d'un mélange de tampon phosphate et d'acétonitrile dans les proportions (75 :25).**

\* Préparation de la solution tampon :

Nous avons dissout 1,36g de phosphate de potassium monobasique dans 500ml d'eau distillée et complété à 1000 ml avec le même solvant.

**b) Préparation des solutions**

\* **Préparation de la solution standard :**

Dans une fiole de 100ml, nous avons dissout 4mg de Clopidogrel bisulfate SCR(substance chimique de référence), 25mg d'impureté A du Clopidogrel SCR et 30mg d'impureté C du Clopidogrel SCR, dans du méthanol puis complété avec le même solvant afin d'obtenir une solution de concentration finale de 40µg/ml de Clopidogrel bisulfate SCR, 250µg/ml d'impureté A du Clopidogrel SCR et 300µg/ml d'impureté C du Clopidogrel SCR.

Nous avons effectué une dilution de  $1/40^{\text{ème}}$  dans la phase mobile. Les concentrations finales obtenues sont de  $1\mu\text{g/ml}$  de Clopidogrel bisulfate SCR,  $6\mu\text{g/ml}$  d'impureté A du Clopidogrel SCR et  $7,5\mu\text{g/ml}$  d'impureté C du Clopidogrel SCR.

**\*Préparation de la solution à examiner :**

Après broyage de 20 comprimés, nous avons transféré l'équivalent de 75mg de clopidogrel (base) dans une fiole de 200ml contenant 5 ml de méthanol et complété au volume avec la phase mobile.

**III-1-2-/ Dosage du Clopidogrel dans les comprimés :**

Les comprimés font l'objet de différents tests tels que l'uniformité de masse, la friabilité, la dureté et la désintégration, tests que le fabricant fait au cours de la production pour assurer la qualité lot par lot. Comme l'efficacité des médicaments dépend entre autre du contenu en principe(s) actif(s), le dosage du principe actif est recommandé dans les différentes pharmacopées.

**\* Préparation des solutions**

**1/ Préparation de la solution standard :**

Dans une fiole de 100ml nous avons dissout 10mg de clopidogrel bisulfate MP (matière première) dans du méthanol puis complété au volume avec le même solvant afin d'obtenir une solution de concentration finale de  $0,1\text{mg/ml}$  en clopidogrel bisulfate.

**2/ Préparation de la solution à examiner :**

Après broyage de 20 comprimés de chaque lot, une quantité de 75mg de clopidogrel (base) est dissoute dans 50 ml de méthanol, agitée pendant 30 minutes et ajustée avec le même solvant.

Nous avons effectué une dilution de  $1/10^{\text{ème}}$  dans du méthanol. La solution obtenue est filtrée à travers un filtre millipore de porosité  $0,45\mu\text{m}$ .

## **Partie III-2 : validation de la méthode de dosage du Clopidogrel dans le comprimé sur une colonne achirale**

### **III-2-1-Matériel et méthode :**

#### **a) Matériel :**

Le matériel chromatographique utilisé est constitué par :

- Une pompe Jasco PU-980 (intelligent hplc pump).
- Un dégazeur waters IN-LINE degasser.
- Un injecteur Rhéodyne 7725 muni d'une boucle de 20  $\mu$ l.
- Un détecteur Waters 2487 ( Dual absorbance detector ) couplé à un ordinateur Digital PC muni d'un logiciel spécialisé de référence MILLENIUM <sup>32</sup> ;
- Colonne : (Discovery C8 250\*4.6 mm, diamètre des particules 5 microns).

#### **b) Réactifs et produits :**

Les réactifs utilisés sont :

- Acétonitrile pour CLHP (SIGMA)
- Méthanol pour CLHP (SIGMA)
- Monohydrogénophosphate de potassium ( $K_2HPO_4$ )
- Acide phosphorique ( $H_3PO_4$ )

Les produits de références sont :

- Clopidogrel phosphate (matière première) (CL)

### **III-2-2/Mise au point de la méthode et optimisation des conditions :**

Le but est de fixer les meilleures conditions opératoires qui permettront le dosage du Clopidogrel.

Pour notre étude, nous avons sélectionné parmi plusieurs techniques de CLHP à polarité de phase inversée trouvées dans la littérature, celle utilisant une phase mobile constituée d'un mélange tampon phosphate(0.05M)-acétonitrile( 35-65) en mode isocratique.

### III-2-3-Validation de la méthode :

Cette partie de l'étude permet de valider la méthode d'analyse mise au point précédemment. Elle s'effectue en plusieurs étapes et permet de vérifier la linéarité, l'exactitude et la précision de la méthode

#### III-2-3-1/ Spécificité :

La spécificité mesure le degré d'interférences entre un principe actif et d'autres composants présents dans l'échantillon (excipients, produits de dégradation).

Afin de vérifier qu'il n'y a pas d'interférences d'excipient aux temps de rétention du Clopidogrel, nous avons préparé des solutions surchargées en excipients avec des concentrations identiques en PA (principe actif) à celle réalisée dans la gamme d'étalonnage. Le protocole suivi lors de la préparation de ces solutions est décrit dans le tableau suivant :

	S1	S2	S3	S4	S5	S6
Excipient (mg)	250	190	182.5	175	167.5	160
Poids PA (mg)	0	60	67.5	75	82.5	90
Qsp méthanol (ml)	100	100	100	100	100	100
% PA	0	80	90	100	110	120

Tableau 3: Préparation des solutions pour la spécificité

#### III-2-3-2/ Linéarité :

La linéarité d'une procédure analytique est sa capacité, à fournir des résultats directement proportionnels à la concentration (quantité) en substance présente dans l'échantillon à l'intérieur de l'intervalle de dosage.

L'étude est réalisée sur le principe actif seul. L'intervalle de concentration à valider est couvert par une série de cinq concentrations, régulièrement espacées et positionnées autour de 80, 90, 100, 110 et 120 % de la concentration théorique de la poudre de référence choisie (la concentration à 100% est fixée à 25mg/l pour notre cas). Ces solutions sont indépendantes et sont réalisées à partir de pesées différentes, selon le schéma suivant :

<b>Point de la gamme</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Poids PA (mg)</b>	20	22.5	25	27.5	30
<b>Qsp méthanol (ml)</b>	100	100	100	100	100
<b>% PA</b>	80	90	100	110	120
Dilution de cette solution : 10ml dans 100ml de méthanol					
<b>Concentrations des solutions d'étalonnage (mg/l)</b>	20	22.5	25	27.5	30

Tableau 4 : Préparation des solutions pour la gamme d'étalonnage.

### III-2-3-3-Fidélité (essai de répétabilité et de fidélité intermédiaire) :

La fidélité d'une procédure analytique exprime l'étroitesse de l'accord (mesure de la dispersion) entre une série de mesures obtenues à partir de plusieurs prises d'essai d'un même échantillon homogène, dans les conditions prescrites. Pour cela nous avons effectué deux séries de quatre mesures par 2 manipulateurs sur 2 jours différents.

Les solutions de la fidélité sont préparées à partir du produit fini à 100% en PA

### III-2-3-4-La robustesse :

La robustesse d'une méthode est sa capacité à maintenir ses performances lorsqu'elle est soumise à de petites variations fortuites des conditions expérimentales, telles celles susceptibles de se produire lors de sa mise en oeuvre par un autre opérateur, sur un autre matériel ou dans un autre laboratoire.

Dans notre cas, nous avons effectué des modifications sur la composition de la phase mobile et nous avons vérifié l'influence de ce changement sur la fidélité et l'exactitude.

## **Partie III-3 : Séparation analytique des énantiomères du Clopidogrel par chromatographie sur phases stationnaires chirales.**

### **III-3-1/Matériel et méthode :**

**a)Matériel :** cœst le même utilisé dans la partie validation

Le matériel chromatographique utilisé est constitué par :

- Une pompe Jasco PU-980 (intelligent hplc pump).
- Un dégazeur waters IN-LINE degasser.
- Un injecteur Rhéodyne 7725 muni d'une boucle de 20 l.
- Un détecteur Waters 2487 ( Dual absorbance detector ) couplé à un ordinateur Digital PC muni d'un logiciel spécialisé de référence MILLENIUM <sup>32</sup> ;
- Colonne (voir tableau 5).

**b) Réactifs et produits :**

Les réactifs utilisés sont :


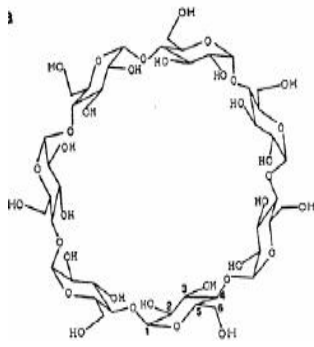
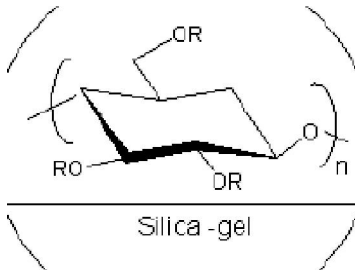
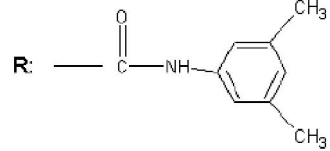
- Acétonitrile pour CLHP (SIGMA)
- Méthanol pour CLHP (SIGMA)
- Acétate d'ammonium
- Ammoniaque
- Monohydrogénophosphate de potassium ( $K_2HPO_4$ )

Au terme de notre recherche bibliographique, nous avons relevé quelques techniques développées pour la séparation énantiomérique du clopidogrel par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en mode normal couplée à une détection spectrophotométrie UV-Visible. Les techniques utilisées sont résumées dans le tableau suivant :

Techniques	1	2	3
Phase mobile	Acétonitrile/acétate d'ammonium (0.007M pH 6.2) (17/83)	(Acétonitrile/MeOH/ KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.01M)(14/5/8)	Borate de sodium (20mM) pH 9/acétonitrile ou MeOH(95/5 à 15/85)
Colonne	Chirale AGP (150*4mm ; 5µM)	Cyclobond δ	Chirale PAK ADRH(150*4.6 ;5µm)
Longueur d'onde (nm)	225	220	225
Débit (ml/min)	0.8	1	0.8

**Tableau 5** : Conditions chromatographiques

Les sélecteurs chiraux choisis dans notre cas sont regroupés dans le tableau suivant :

<b>Sélecteurs chiraux</b>	 <p>Sérum albumine humaine Fichier 1E7C (Protein Data Bank) traité par Chimie</p> <p><math>\alpha</math>-glycoprotéine acide</p>	 <p><math>\gamma</math>-cyclodextrine</p>	 <p>Silica-gel</p> <p>R: </p> <p>Dérivés d'amylose</p>
	<b>source</b>	naturelle	
<b>type</b>	Protéines	Oligosaccharides	polysaccharides
<b>Colonne</b>	Chirale AGP	Cyclobond $\delta$	Chiral PAK

**Tableau 6** : Propriétés de certains sélecteurs chiraux utilisés.

# CHAPITRE IV

## Résultats & discussion

## Résultats et discussion

### Partie IV-1: Détermination de la pureté énantiomérique, recherche des impuretés et dosage du Clopidogrel hydrogénosulfate dans les comprimés selon la pharmacopée.

#### IV-1-1/Recherche d'impuretés :

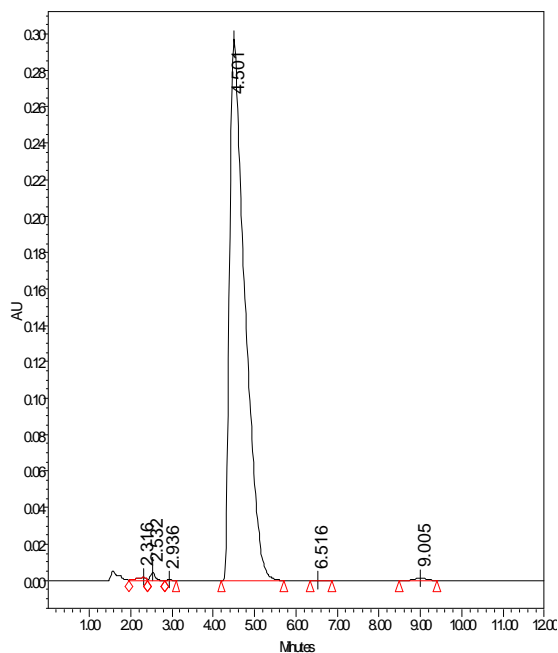
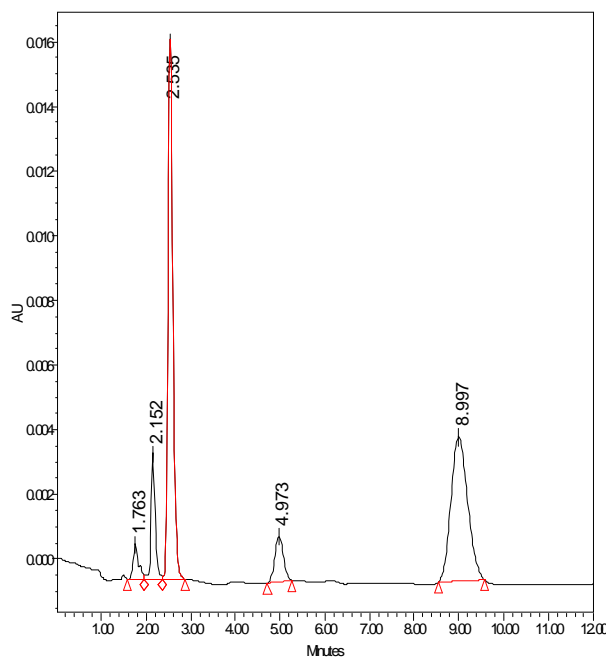
##### IV-1-1-1/Les substances apparentées :

Leur quantification est simplement évaluée en comparant les surfaces des pics obtenus avec les solutions à examiner et celles des solutions témoin.

D'après la Pharmacopée Européenne les temps de rétention relatifs du clopidogrel et des substances apparentées sont les suivants :

- Le temps de rétention relatif de l'impureté A du clopidogrel est de 0,5.
- Le temps de rétention relatif du clopidogrel est de 1,0
- Le temps de rétention relatif de l'impureté C du clopidogrel est de 2,0.

Les figures (5 et 6) représentent les chromatogrammes correspondants. Nous obtenons trois pics, le premier correspond à l'impureté A (temps de rétention  $t_R$  de 3 minutes environ), le second au clopidogrel ( $t_R$  de 5 minutes environ) et le troisième est celui de l'impureté C ( $t_R$  de 9 minutes environ)



**Figure 5 :** Chromatogramme de la solution témoin

**Figure 6 :** Chromatogramme de la solution essai

pics	[C]µg/ml	t <sub>R</sub> (min)	surfaces
Impureté A	6	2.53	125432
Clopidogrel bisulfate	1	4.97	18821
Impureté C	7.5	8.99	115520

pics	t <sub>R</sub> (min)	surfaces
Impureté A	2.53	38922
Clopidogrel bisulfate	4.50	7640178
Impureté C	9.00	38569

**Tableau 7** : Résultats de la solution standard

**Tableau 8** : Résultats de la solution essai

Les pourcentages de l'impureté A et C du clopidogrel sont calculés en utilisant la formule suivante :

$$T = 20 \times \frac{321,82}{419,90} \times \frac{C}{W} \times \frac{S_{ech}}{S_{std}}$$

321,82 : Masse moléculaire du clopidogrel

419,90 : Masse moléculaire du clopidogrel bisulfate

C : Concentration en µg/ml de l'impureté dans la solution standard.

W : Prise d'essai échantillon

S<sub>ech</sub> : Surface du pic de l'impureté obtenu avec la solution échantillon

S<sub>std</sub> : Surface du pic de l'impureté obtenu avec la solution standard

	%	normes	résultats
Impureté A	0.1977	Öl.2	conforme
Impureté C	0.1476	Öl.5	conforme

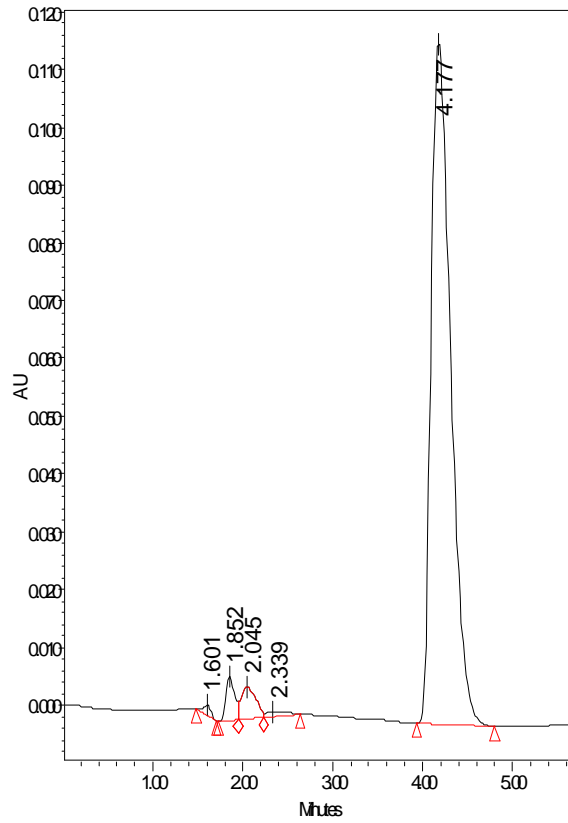
**Tableau 9** : Pourcentages des impureté A et C dans le Clopidogrel

### Conclusion :

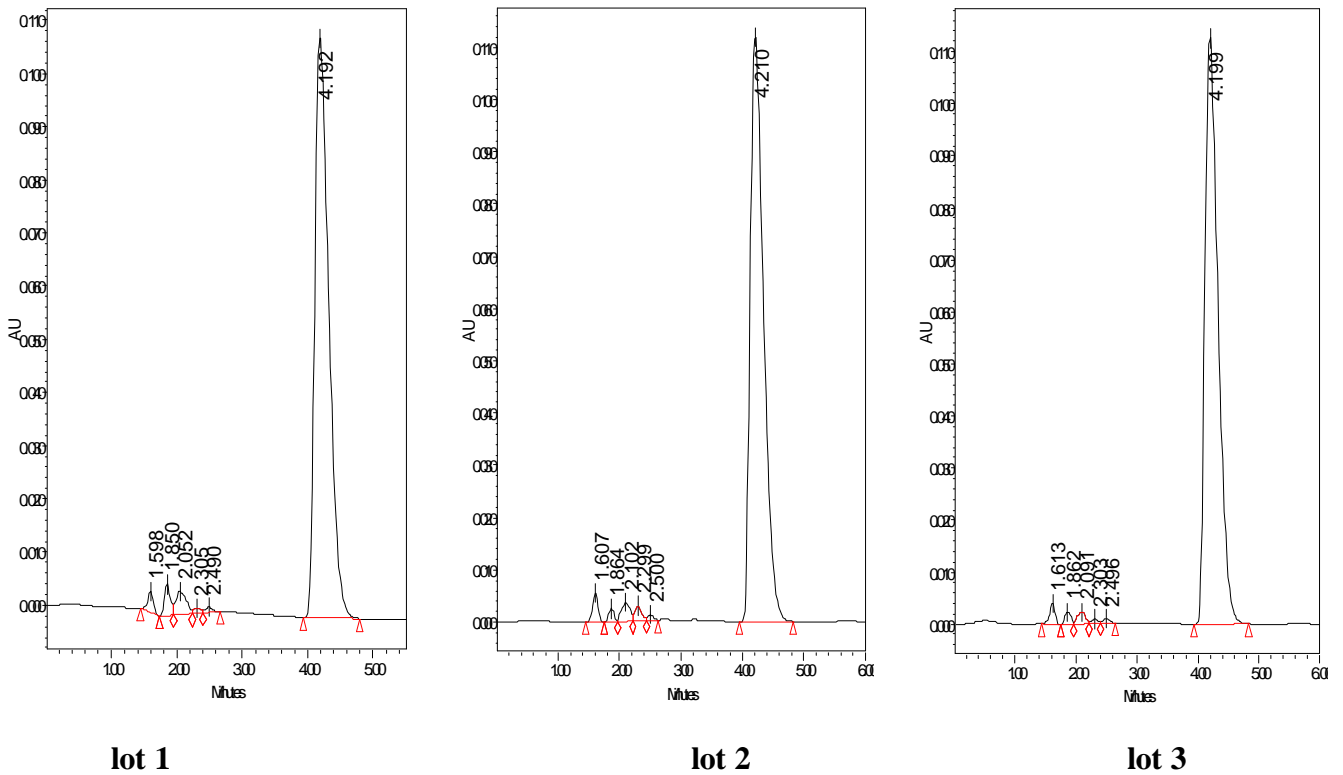
Tous les tests réalisés sur la matière première sont conformes aux normes de la pharmacopée, nous pouvons donc doser le comprimé.

### IV-1-2/ Dosage du Clopidogrel dans les comprimés :

Les chromatogrammes de la solution témoin ainsi que ceux des différents lots sont représentés dans les figures 7 et 8 suivantes :



**Figure 7** : Chromatogramme de solution standard



**Figure 8** : Chromatogrammes des différents lots

La formule suivante donne le pourcentage du clopidogrel bisulfate contenu dans un comprimé par rapport à la quantité théorique indiquée :

$$T = 1000 \times \frac{321,82}{419,90} \times C \times \frac{S_{ech}}{S_{std}}$$

Avec :

321,82 : Masse moléculaire du clopidogrel

419,90 : Masse moléculaire du clopidogrel bisulfate

C : Concentration en µg/ml du clopidogrel bisulfate dans la solution standard.

S<sub>ech</sub> : Surface du pic du clopidogrel bisulfate obtenu avec la solution échantillon

S<sub>std</sub> : Surface du pic du clopidogrel bisulfate obtenu avec la solution standard

Solutions	t <sub>R</sub> (min)	surfaces	%CL	Normes %	résultats
Témoin	4.17	1784441		90,0 - 110,0	
Lot 1	4.19	1636448	93.71		conforme
Lot 2	4.21	1693406	96.97		conforme
Lot 3	4.19	1694998	97.06		conforme

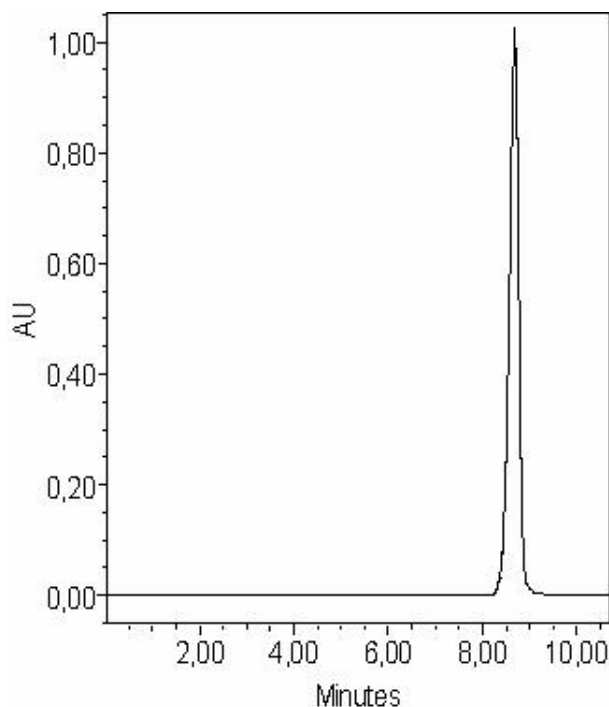
**Tableau 10** : Pourcentage du Clopidogrel bisulfate (pour chaque lot)

### Conclusion :

D'après ces résultats, nous constatons que les comprimés dosés à 75mg (lot1, 2 et 3) que nous avons analysés sont conformes à la pharmacopée. En effet, ils contiennent respectivement 93.71, 96.97 et 97.06 %, valeurs appartenant au domaine préconisé par la pharmacopée.

## **Partie IV-2 : validation de la méthode de dosage du Clopidogrel dans le comprimé sur une colonne achirale**

Dans les conditions chromatographiques retenues, le temps de rétention du Clopidogrel est de 8 min environ comme le montre la figure (9) :



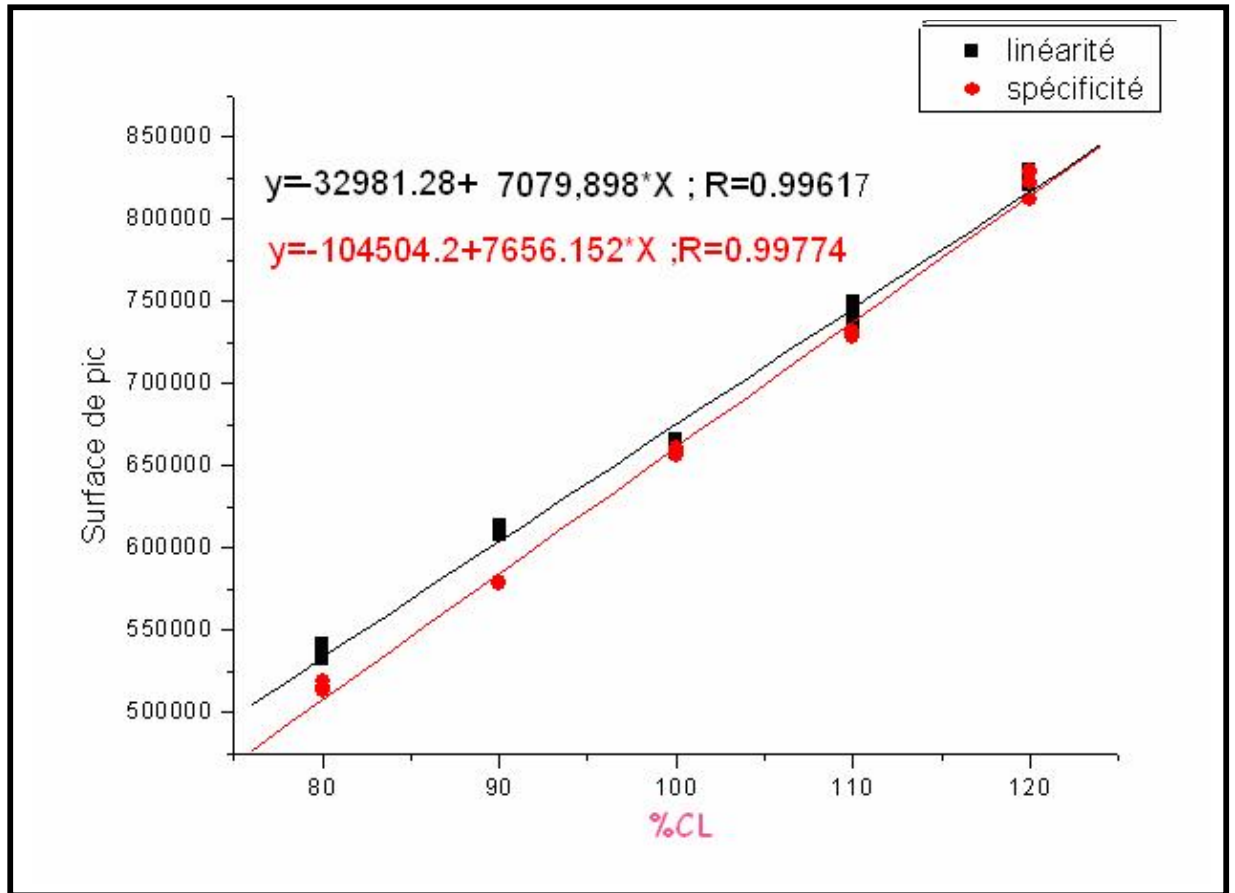
**Figure 9** : Chromatogramme obtenu avec la solution contenant le PA.

### **IV-2-1/ Spécificité :**

L'étude consiste à s'assurer que les conditions analytiques choisies permettent bien de séparer le clopidogrel des excipients. Pour cela nous avons fait en premier lieu :

-Une étude comparative entre la courbe d'étalonnage réalisée avec le principe actif seul (PAS) et celle de la forme reconstituée (FR).

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure (10) :

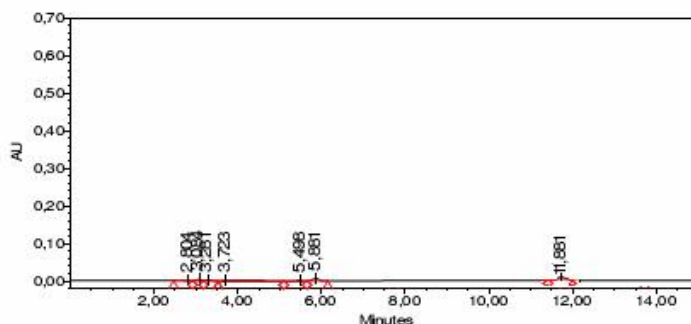


**Figure 10:** Spécificité de la méthode de dosage du Clopidogrel

D'après la figure (10), nous remarquons que les deux droites sont presque superposables ce qui veut dire qu'il n'y a pas d'interférence d'excipients.

En second lieu :

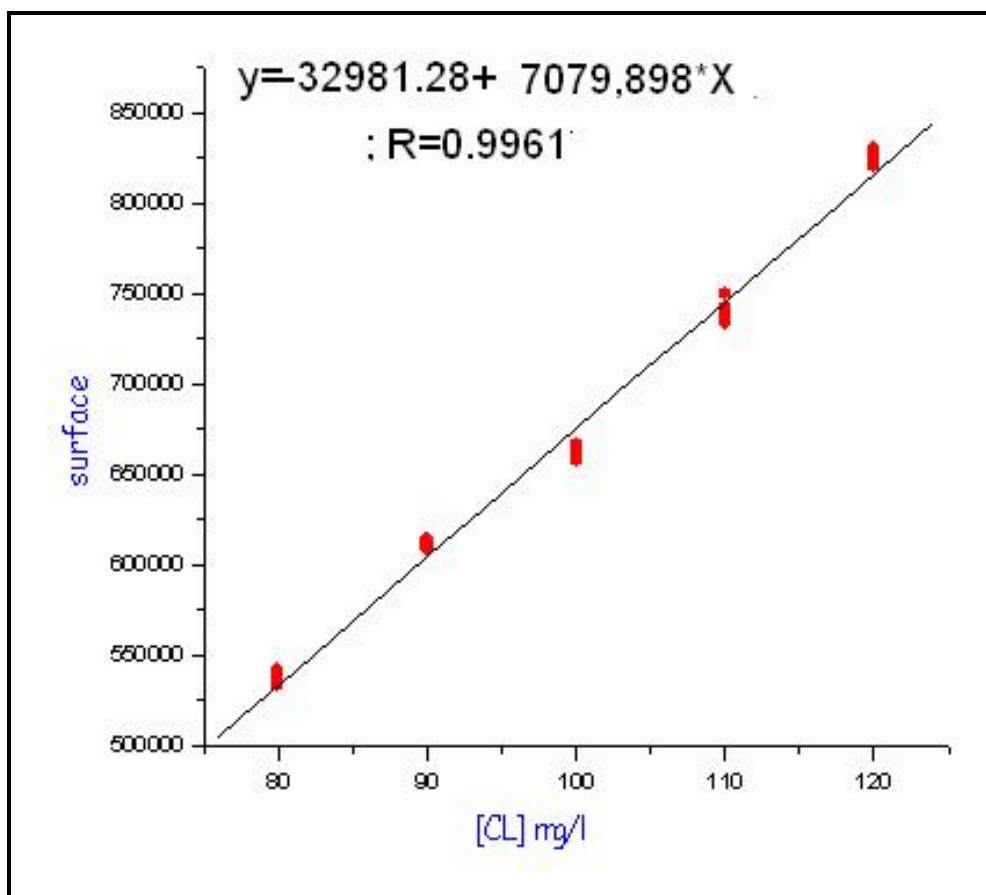
- Le chromatogramme obtenu avec le placebo (figure 11) a été comparé à celui contenant le principe actif (PA) (figure 4). Celui-ci ne montre aucune interférence des excipients étant donné l'absence de pic au temps de rétention du CL (8min). Ainsi, remarque-t-on que la méthode utilisée est bien spécifique.



**Figure 11** : Chromatogramme obtenu avec le placebo

#### IV-2-2/ Linéarité :

La linéarité de la méthode est vérifiée sur cinq points de gamme d'étalonnage dans le domaine de concentrations de 20-30 mg/L en CL. La droite de régression exprimant les surfaces du Clopidogrel en fonction de la concentration (figure 12) est établie sur cinq points de gamme (chaque point de la gamme est une moyenne issue d'une série de cinq valeurs). L'équation du modèle postulé est  $y = -32981,28 + 7079,898x$ .



**Figure 12** : Courbe d'étalonnage

Les paramètres de la courbe d'étalonnage sont représentés dans le tableau suivant :

Domaine de linéarité (mg.L <sup>-1</sup> )	20-30
pente	7079,89 ± 129,62
Ordonnée à l'origine	-32981,28 ± 13091,25
Coefficient de corrélation	0,996

Le coefficient de corrélation ( $r^2=0.99617$ ) voisin de l'unité suggère une bonne linéarité de la réponse du détecteur dans la gamme de concentration analysée.

### Calcul du biais :

Les résultats obtenus lors de l'étude de la linéarité sont regroupés dans le tableau :

Cl theo%	surface	Cl' calc %	Biais
80	5,36E+05	80,34	100,42
80	5,37E+05	80,44	100,55
80	5,33E+05	79,91	99,89
80	5,35E+05	80,27	100,33
80	5,41E+05	81,13	101,42
90	6,08E+05	90,57	100,63
90	6,09E+05	90,61	100,68
90	6,10E+05	90,81	100,90
90	6,12E+05	91,15	101,28
90	6,14E+05	91,32	101,47
100	6,58E+05	97,54	97,54
100	6,65E+05	98,61	98,61
100	6,60E+05	97,90	97,90
100	6,62E+05	98,20	98,20
100	6,66E+05	98,71	98,71
110	7,39E+05	109,02	99,10
110	7,42E+05	109,49	99,53
110	7,50E+05	110,52	100,47
110	7,34E+05	108,29	98,45
110	7,37E+05	108,75	98,86
120	8,23E+05	120,83	100,69
120	8,27E+05	121,53	101,27
120	8,20E+05	120,50	100,41
120	8,27E+05	121,53	101,27
120	8,30E+05	121,89	101,58
<b>Biais moyen</b>			<b>100,01</b>

**Tableau 11** : Résultats de l'étude de la linéarité.

Le biais est calculé en utilisant la formule suivante :

$$\text{Biais} = (\text{Cl}_{\text{calc}}/\text{Cl}_{\text{theo}}) * 100$$

Cl<sub>theo</sub> est la quantité du clopidogrel pesée.

Cl<sub>calc</sub> est la quantité du clopidogrel calculée sur la courbe d'étalonnage (Cl<sub>calc</sub> = surface ó coefficient à l'origine/pente).

Le biais moyen pour le clopidogrel est de 100,01%, cette valeur appartient à l'intervalle [97.5-102.5%] préconisé par la pharmacopée donc, le dosage pourra se faire avec un étalon externe à 100%.

#### IV-2-3 / Fidélité :

La fidélité fournit une indication sur les erreurs liées au hasard, elle est constituée de :

\* La répétabilité étudie les variations très faibles entre les mesures d'un même échantillon durant un intervalle du temps très court, par exemple une journée. La variance de la répétabilité est égale à la moyenne des variances de chaque jour.

\* La fidélité intermédiaire représente les variations obtenues lorsque les analyses sont faites sur des jours différents mais dans un même laboratoire.

Selon le protocole décrit dans la partie expérimentale, deux manipulateurs ont analysés 4 échantillons sur 2 jours. Les chromatogrammes correspondants sont portés dans le tableau (14).

La fidélité consistera à quantifier l'écart de chaque valeur à la moyenne. Cette notion fait intervenir l'écart-type et pour cela nous allons nous servir de l'outil statistique.

Le tableau suivant résume les calculs des coefficients de variation de répétabilité (variations intra-jour) et de fidélité intermédiaire (variations inter-jour) :

	Surfaces			
<b>Série 1 manipulateur 1</b>	7,93212E6	8,33442E6	8,52881E6	8,39963E6
<b>Série 1 manipulateur 2</b>	8,22289E6	8,26407E6	8,66649E6	8,3083E6
<b>Série 2 manipulateur 1</b>	7,88243E6	8,53055E6	8,53E6	8,36744E6
<b>Série 2 manipulateur 2</b>	8,20767E6	8,22973E6	8,62367E6	8,34405E6

**Tableau 12** : Résultats d'étude de la fidélité de Cl

Les résultats obtenus après transformation des aires des pics en concentrations en utilisant la droite d'étalonnage sont les suivants :

	% CL calculé			
<b>Série 1 manipulateur 1</b>	112,50	118,18	120,92	119,10
<b>Série 1 manipulateur 2</b>	116,60	117,18	122,87	117,81
<b>Série 2 manipulateur 1</b>	111,79	120,95	120,94	118,65
<b>Série 2 manipulateur 2</b>	116,39	116,70	122,26	118,31
<b>Moyenne</b>	118,2			

**% CL calculé** = (surface - coefficient à l'origine de la courbe d'étalonnage) / pente

Calculs statistiques :

	<b>X</b>			
<b>Série 1 manipulateur 1</b>	0,95	0,99	1,02	1,00
<b>Série 1 manipulateur 2</b>	0,98	0,99	1,03	0,99
<b>Série 2 manipulateur 1</b>	0,94	1,02	1,02	1,00
<b>Série 2 manipulateur 2</b>	0,98	0,98	1,03	1,00

**X**=% CL calculé/moyenne

	$\bar{x}$	$\bar{\bar{x}}$	<b>SDi</b>	<b>SD<sub>moy</sub></b>
<b>Série 1 manipulateur 1</b>	0,99	1,00	0,03	0,02
<b>Série 1 manipulateur 2</b>	1,00		0,02	
<b>Série 2 manipulateur 1</b>	0,99		0,03	
<b>Série 2 manipulateur 2</b>	1,00		0,02	

SD : écart type

Variations	SD	CV %
Intra-jours	0.03	2,83
Inter-jours	0.02	2.31
Total	0.02	2,44

**Tableau13 :** Coefficients de variation de répétabilité (variations intra-jour) et de fidélité intermédiaire.

CV : coefficient de variation

$$SD_{intra} = \sqrt{\sum_i SD_i^2 / (m - 1)}, m = \text{nombre total de séries de mesures (m=3)}$$

$$SD_{inter} = \sqrt{\sum_i (SD_{moy}^2 + SD_{intra}^2/n)}, n = \text{nombre de résultats pour chaque série (n=4)}$$

$$S_{total} = \sqrt{\sum_i (SD_{intra}^2 + SD_{inter}^2)}$$

$$CV_{intra} = (S_{intra} / \bar{x}) * 100$$

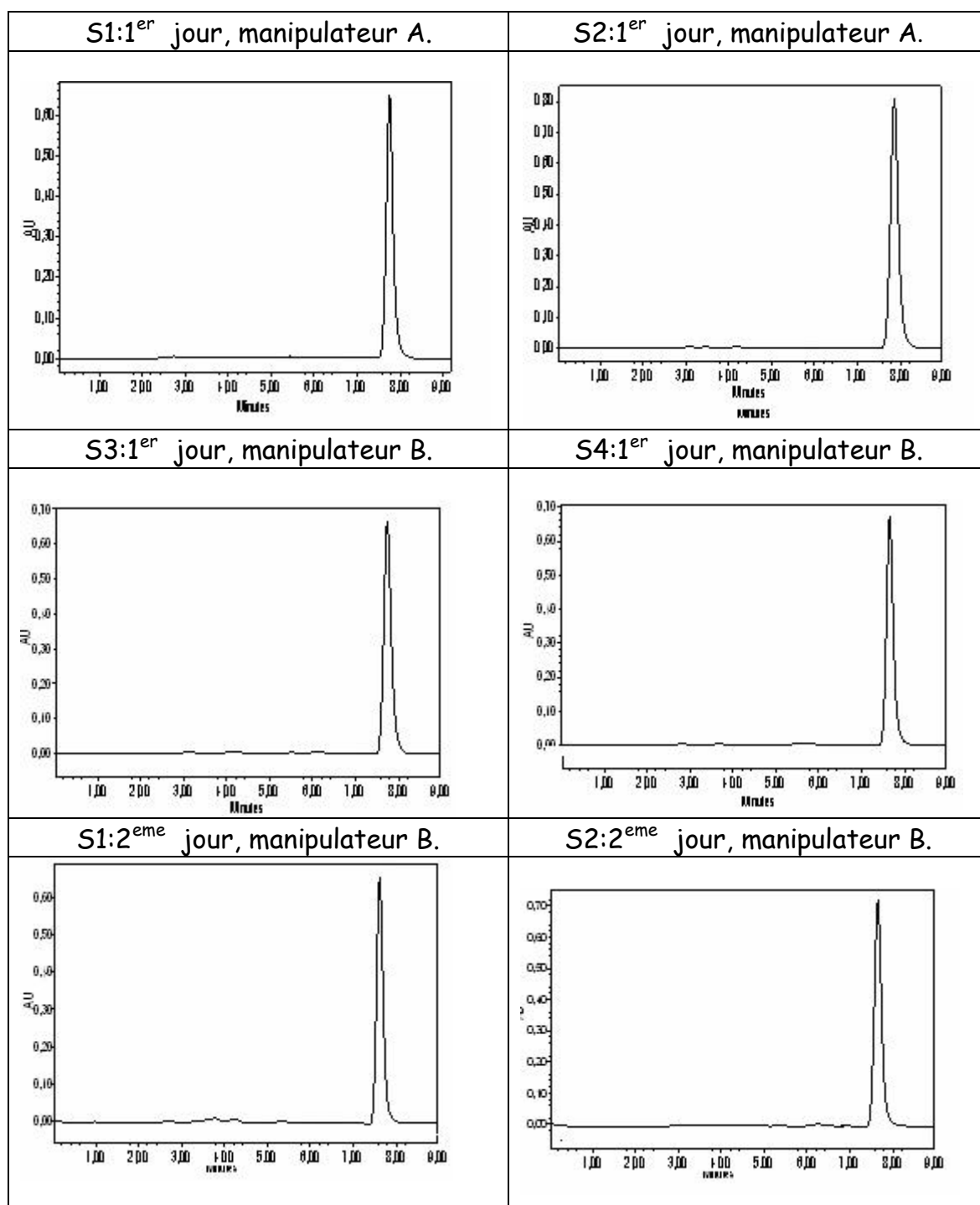
$$CV_{inter} = (SD_{inter} / \bar{x}) * 100$$

$$CV_{total} = (SD_{total} / \bar{x}) * 100$$

Ainsi les coefficients de variation de répétabilité qui reflètent la fidélité intra-jour pour chaque niveau de concentration ne dépassent pas 2,83 %.

Pour la fidélité intermédiaire, les coefficients de variation ne dépassent pas 2,31 %, ce qui justifie la fidélité de la méthode

Les chromatogrammes de la fidélité sont regroupés dans le tableau ci-dessous :



**Tableau 14** : Chromatogrammes de la fidélité

#### IV-2-4/ Exactitude :

L'exactitude fournit une indication sur les erreurs systématiques. Elle est calculée à partir des résultats de la fidélité et présente l'écart du pourcentage de récupération par rapport à 100%, le pourcentage de récupération est calculé comme suit :

	<b>Y</b>			
<b>Série 1 manipulateur 1</b>	95,17	99,98	102,30	100,76
<b>Série 1 manipulateur 2</b>	98,65	99,14	103,95	99,67
<b>Série 2 manipulateur 1</b>	94,58	102,33	102,32	100,38
<b>Série 2 manipulateur 2</b>	98,47	98,73	103,44	100,10

$Y = 100 \cdot x / \text{valeur de référence}$  ; valeur de référence = 1

	<b>Y<math>\phi</math></b>	<b>Y<sub>m</sub></b>	<b>SD</b>	<b>SD<sub>moy</sub></b>
<b>Série 1 manipulateur 1</b>	99,55	100,00	3,07	2,86
<b>Série 1 manipulateur 2</b>	100,35		2,43	
<b>Série 2 manipulateur 1</b>	99,90		3,66	
<b>Série 2 manipulateur 2</b>	100,18		2,28	

<b>PR</b>	<b>LI</b>	<b>LS</b>	<b>Exactitude</b>
100,002	97,72	102,28	0,002

Y $\phi$  : la moyenne de chaque serie

Y<sub>m</sub> : la moyenne de Y $\phi$

PR : pourcentage de récupération = (Y<sub>m</sub>/valeur de référence)\*100.

LS : limite supérieure = PR + t<sub>0,975</sub> \*SD<sub>moy</sub>/m

LI = limite inférieure = PR - t<sub>0,975</sub>\*SD<sub>moy</sub>/m

t<sub>0,975</sub> = coefficient de Student = 3.182 pour un intervalle de confiance à 95% et m=4

Exactitude = 100 ó PR

Comme le PR est bien compris entre les deux limites (LI < PR < LS) et la valeur de la précision n'excède pas les 2% alors on peut conclure que notre méthode d'analyse est exacte.

#### **IV-2-5/ Robustesse :**

C'est la capacité d'une méthode à donner des résultats exacts en subissant des modifications sur les conditions opératoires.

Après modification sur la composition de la phase mobile, les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau suivant :

<b>variations</b>	<b>SD</b>	<b>CV</b>
<b>Intra-jours</b>	0.028	2,835
<b>Inter-jours</b>	0.015	1,557
<b>total</b>	0.023	2,37

**Tableau 15** : résultats de la fidélité

D'après les résultats, les coefficients de variation inter et intra-jours restent dans les normes (<2%), ce qui vérifie la fidélité de la méthode donc la robustesse.

#### **IV-2-6/ Limite de détection/ Limite de quantification :**

Dans cette partie nous allons déterminer la limite de détection (LOD) qui correspond généralement à trois fois le signal du bruit de fond et la limite de quantification (LOQ) qui correspond à dix fois le signal du bruit de fond.

Le bruit de fond exprimé en concentration est obtenu à l'aide d'un étalonnage en utilisant la solution la plus diluée.

Le rapport signal/ bruit a donné : LOD= 5ng/mL

LOQ= 15ng/mL

### **Partie IV-3 : Séparation analytique des énantiomères du Clopidogrel par chromatographie sur phases stationnaires chirales.**

La séparation de deux pics adjacents peut être examinée de deux manières différentes, soit en considérant leurs positions relatives (la sélectivité), soit en faisant intervenir la résolution.

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à la deuxième voie c'est-à-dire la résolution.

Dans cette partie on représentera des chromatogrammes spécifiques à chaque phase mobile et on donnera pour chaque chromatogramme la résolution correspondante.

Pour avoir une meilleure séparation des deux isomères, on a testé plusieurs phases mobiles

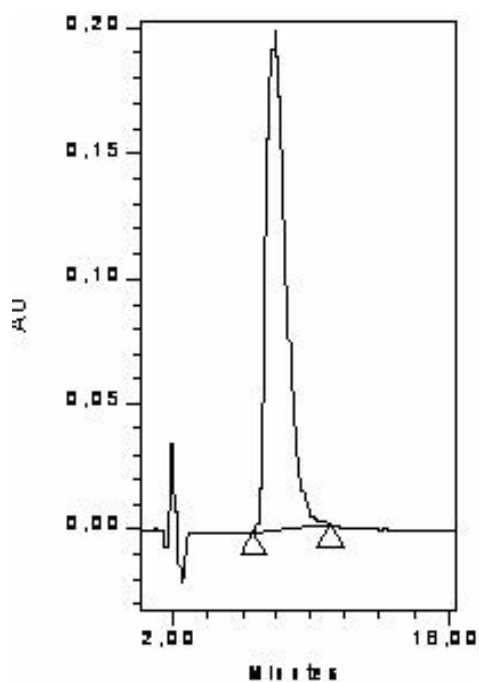
#### **IV-3-1/ Phase mobile (1) :**

Utilisant la phase mobile : Acétonitrile/acétate d'ammonium (0.007M pH 6.2) (17/83) ; sur la colonne AGP :

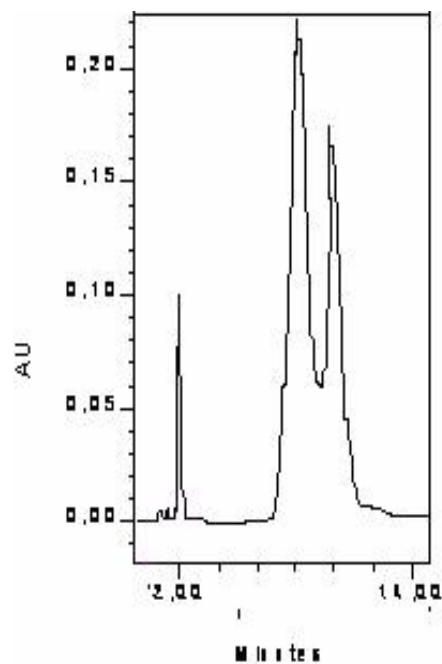
Les figures (8a et 8b) représentent le chromatogramme de la solution contenant la matière première (S-Clopidogrel), ainsi que son spectre U.V correspondant.

Le chromatogramme de la solution contenant les deux énantiomères et son spectre U.V son illustrés par les figures (14a et b).

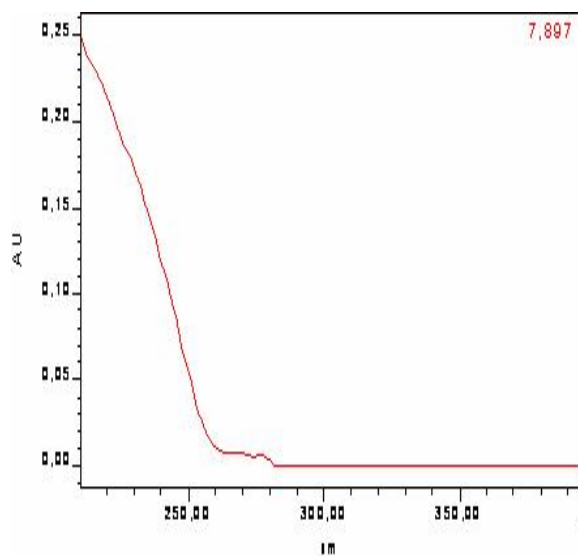
La comparaison des deux spectres nous permet de conclure que les deux pics correspondant aux configurations R et S.



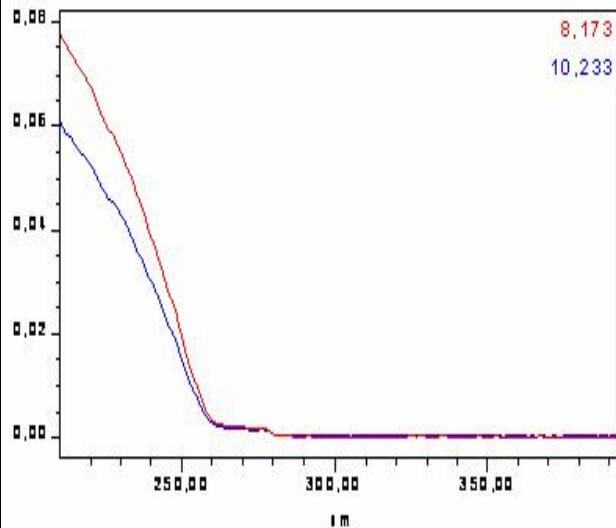
**Figure 14a** : chromatogramme du Clopidogrel



**Figure 15a** : chromatogramme de la solution qui contient les deux énantiomères.



**Figure 14b** : spectre UV du Clopidogrel



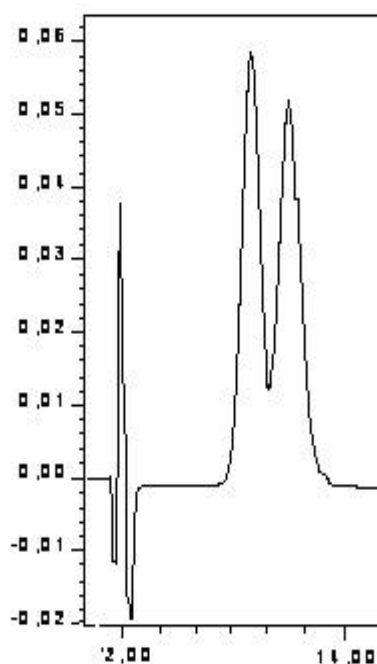
**Figure 15b** : spectre UV des deux énantiomères

#### IV-3-2/Phase mobile (2) :

Utilisant la phase mobile : (Acétonitrile/MeOH/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.01M)(14/5/8) sur la colonne Cyclobond δ , nous constatons qu'il n'y a pas de séparation des deux énantiomères.

#### IV-3-3/Phase mobile 3 :

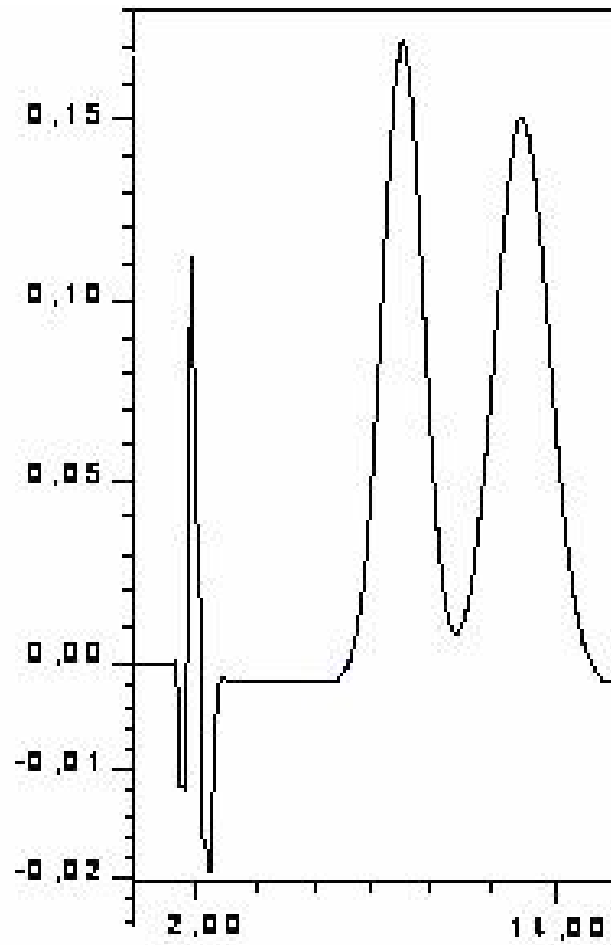
La troisième phase mobile qu'on a utilisé est constituée de : Borate de sodium (20mM) pH 9/ MeOH(50/50) sur la colonne PAK , elle nous a permis de séparer les deux antipodes et la figure (16) représente le chromatogramme correspondant a cette phase mobile.



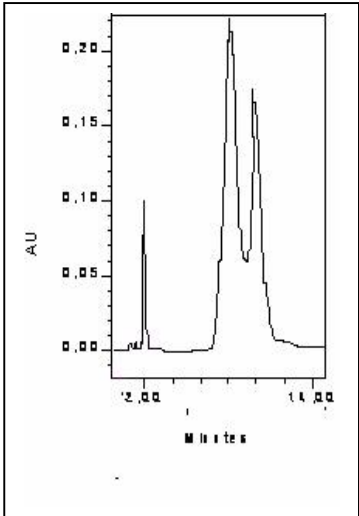
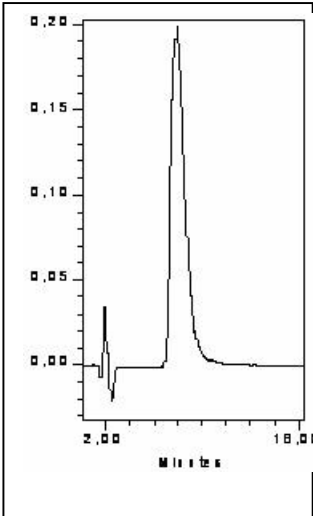
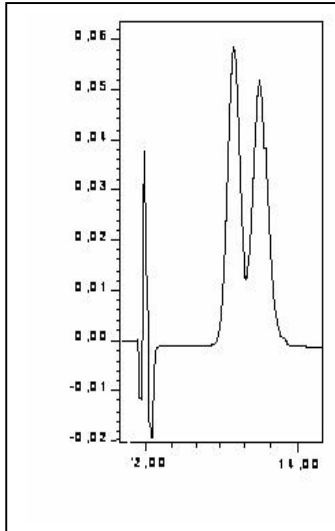
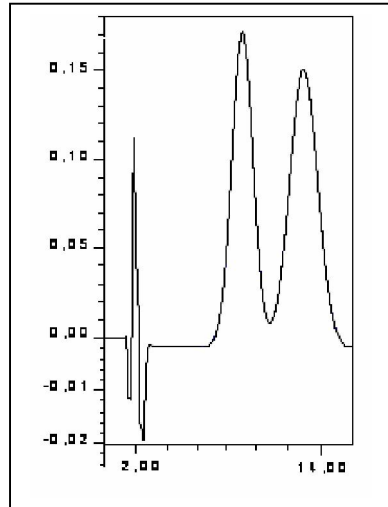
**Figure 16** : Chromatogramme avec la phase mobile Borate de sodium (20mM) pH 9/ MeOH(50/50)(V/V)

#### IV-3-4/ Phase mobile 4 :

Utilisant la phase mobile : Borate de sodium (20mM) pH 9/acétonitrile(50/50) (V/V) sur la colonne PAK, nous remarquons que la résolution des deux énantiomères est acceptable et le chromatogramme spécifique à cette phase mobile est représenté sur la figure ci-dessous :



**Figure 17** : Chromatogramme avec la phase mobile Borate de sodium (20mM)  
pH 9/acétonitrile(50/50)(V/V)

<b>Colonne</b>	Chirale AGP (150*4mm ; 5µM)	Cyclobond δ	Chiral paK ADRH(15*0.46 ;5µm)	
<b>Phase mobile</b>	Acétonitrile/acétate d'ammonium (0.007M pH 6.2) (17/83)	(Acétonitrile/MeOH/ KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.01M)(14/5/8)	Borate de sodium (20mM) pH 9/ MeOH(50/50)	Borate de sodium (20mM) pH 9/acétonitrile(50/50)
<b>Chromatogramme</b>				
<b>Résolution</b>	<b>0.705</b>	<b>Pas de résolution</b>	<b>0.8</b>	<b>0,90</b>

**Tableau 16** : Résolution du Clopidogrel par les PSCs

Le tableau ci-dessus regroupe tous les chromatogrammes et leurs résolutions.

Les isomères optiques du Clopidogrel (R et S) ont été analysés en utilisant des phases mobiles différentes sur trois sélecteurs chiraux : cyclodextrine, chiral AGP, Chiralpak. Ils ont été séparés avec des résolutions acceptables.

Par contre sur la colonne Cyclobond  $\delta$ , la résolution des deux énantiomères été nulle.

Conclusion

Générale

## Conclusion générale

Dans le cadre de ce mémoire, nous nous sommes intéressés au dosage par CLHP d'une molécule biologiquement active et chirale en l'occurrence le Clopidogrel.

Seule la forme énantiopure S-Clopidogrel est un puissant médicament antiagrégant plaquettaire. Son efficacité a été très largement démontrée dans la réduction du risque de survenue d'événements thrombotiques chez des patients aux antécédents cardiovasculaires.

L'autre énantiomère est toxique, il est donc impératif de réaliser la séparation chirale.

Nous avons effectué le dosage de la matière première par CLHP en utilisant une phase stationnaire chirale, l'OVM et une phase mobile constituée d'un mélange d'acétonitrile et de tampon phosphate (0.01M) dans les proportions en volume : (25/75).

La détermination de la pureté énantiomérique et la recherche des substances apparentées dans la matière première ont permis de prouver la conformité de la substance.

Le dosage quantitatif du comprimé dans les mêmes conditions opératoires a donné un taux de Clopidogrel de 93.71, 96.97 et 97.06 % suivant les lots analysés rappelant que ces valeurs sont en accord avec les normes préconisées par la pharmacopée allant de 90 à 110%.

Nous avons effectué par la suite le dosage du Clopidogrel sur une phase stationnaire achirale (Colonne :Discovery C8 250\*4.6 mm, diamètre des particules 5 microns).

La méthode d'analyse a été validée. Les paramètres de validation que nous avons déterminé sont les suivants:

- Spécificité : La comparaison des chromatogrammes obtenu avec le placebo et celui contenant le principe actif ne montre aucune interférence des excipients étant donné l'absence de pic au temps de rétention du CL (8min), Ainsi, nous pouvons conclure que la méthode utilisée est bien spécifique.
- Linéarité : Le coefficient de corrélation ( $r^2=0.996$ ) voisin de l'unité suggère une bonne linéarité de la réponse du détecteur dans la gamme de concentration analysée.

- **Fidélité** : Nous avons remarqué que les coefficients de variation de répétabilité qui reflètent la fidélité intra-jour pour chaque niveau de concentration ne dépassent pas 2,83 %.

**P**our la fidélité intermédiaire, les coefficients de variation ne dépassent pas 2,31 %, ce qui justifie la fidélité de la méthode.

- **Exactitude** : le pourcentage de récupération obtenu est de 98%, nous pouvons dire que notre méthode d'analyse est exacte
- **Robustesse** : D'après les résultats obtenus, les coefficients de variation inter et intra-jours restent dans les normes (<2%), ce qui vérifie la fidélité de la méthode donc la robustesse

**L**a quantification du Clopidogrel dans les préparations pharmaceutiques de plusieurs lots de médicaments, dans ce système chromatographique a donné un résultat conforme.

**E**nfin, les isomères optiques du clopidogrel ont été analysés sur trois sélecteurs chiraux :cyclo dextrine, chiral AGP, Chiralpak. Ils ont été séparés avec des résolutions acceptables.

# Bibliographie

# BIBLIOGRAPHIE

- [1] Association AH. Heart disease and stroke statistics ó 2005 Uptade. In ; (2005).
- [2] S.S.Singh.K. Sharma, D. Barot, P.R. Mohan, V.B. Lohray. J. Chromatogr. B 821 (2005)173.
- [3] T.Richter, T.E. Murdter, G. Heinkele, J. Pleiss, S. Tatzel, M. Schwab, M. Eichelbaum, U.M. Zanger, J. Pharm. Exp. Ther. 308 (2004) 189.
- [4] A.M.Wodlinger, J.A.Pieper. The role of clopidogrel in the management of acute coronary syndromes. Clin Ther. 25 (2003) 215-581.
- [5] A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. Lancet. 348 (1996) 1329-39.
- [6] S. Yusuf, F Zhao, S.R. Mehta, Chrolavicius S Tognoni G, Fox K.K. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. N Engl J Med. 345 (2001) 494-502.
- [7] Dictionnaire òLARROUSSE MÉDICALö
- [8]M.Lindell, M.O. Karlsson, H.Lennernas, L.Pahlman , M.A.Lang , Variable expression of CYP and Pgp genes in the human small intestine. Eur J Clin Invest. 33 (2003) 493-9.
- [9] P.Savi , J.M. Pereillo , M.F.Uzabiaga , J. Combalbert , C. Picard ,J.P. Maffrand , M. Pascal , J.M. Herbert . Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. Thromb Haemost. 84 (2000) 891-6.
- [10] J.M.Pereillo , M. Maftouh , A. Andrieu , M.F. Uzabiaga , O.Fedeli , P. Savi, M. Pascal , J.M. Herbert , J.P. Maffrand , C.Picard . Structure and stereochemistry of the active metabolite of clopidogrel. Drug Metab Dispos. 30 (2002) 1288-95.
- [11] M.Henry, J.Chromatog. 544 (1991) 413.
- [12] R. Rosset, M. Caude, A. Jardy, Chromatographie en phase liquide et supercritique, Masson, Paris, (1991).
- [13] H. Kagan, L'actualité chimique, 269 (2003) 10.
- [14] Jr. Holmes, B. Braun, G. Bremmer, Pharmaceut. Technol., 14 (1990) 46.
- [15] N.M. Maier, P. Franco, W. Lindner, J. Chromatogr. A, 906 (2001) 3.
- [16] A.Ceccato, Ph. Hubert, J. Crommen, STP Pharma Pratiques., 9 (1999) 295.
- [17] F. Lai, A. Mayer, T. Sheehan, BioTechniques, 11 (1991) 236.
- [18] H. Kim, K. Jeong, S. Lee, S. Jung, Bull. Korean Chem. Soc., 24 (2003) 195.
- [19] C.E. Dalgliesh, J. Chem. Soc., 137 (1952) 3940.
- [20] W.H. Pirkle, T.C. Pochasky, Chem. Rev., 89 (1989) 347.
- [21] E.M. Martin Del Valle, Process Biochem., 39 (2004) 1033.
- [22] X. Lu, Y. Chen, J. Chromatogr. A, 955 (2002) 133.
- [23] C. Baudin, C. Pean, B. Perly, P. Goselin, Int. J. Environ. Anal. Chem., 77 (2000) 233.
- [24] S.M. Han, D.W. Armstrong, Chiral separations by HPLC, Ellis Horwood Ltd., Chichester, (1989).
- [25] R. Herraez-Hernandez, P. Campins-Falco, J. Chromatogr. B, 740 (2000) 169.
- [26] L.O. Healy, J.P. Murrhy, A. Tan, D. Cocker, M. McEnery, J.D. Glennon, J.Chromatogr. A, 924 (2001) 459.
- [27] Z. Juvancz, J. Sejtli, Trends Anal. Chem., 21 (2002) 379.
- [28] M. Blanco, I. Valverde, Trends Anal. Chem., 22 (2003) 428.

- [29] D. Mangelings, C. Perrin, D.L. Massart, M. Maftouh, S. Eeltink, W.T. Kok, P.J. Schoenmakers, Y. Vander Heyden, *Anal. Chim. Acta.*, 509 (2004) 11.
- [30] Z.W. Bai, X.H. Lai, L. Chen, C.B. Ching, S.C. Ng, *Tetrahedron Lett.*, 45 (2004) 7323.
- [31] A. Shitangkoon, J. Yanchinda, J. Shiowatana, *J. Chromatogr. A*, 1049 (2004) 223.
- [32] C. Perrin, H. Fabre, M. Maftouh, D.L. Massart, Y. Vander Heyden, *J. Chromatogr. A*, 1007 (2003) 165.
- [33] M.P. Vaccher, E. Lipka, J.P. Bonte, C. Vaccher, *Electrophoresis*, 25 (2004) 1111.
- [34] M. Taghvaei, G.H. Stewart, *Anal. Chem.*, 61 (1991) 1902.
- [35] D.Y. Pharr, Z.S. Fu, T.K. Smith, W.L. Ilinze, *Anal. Chem.*, 61 (1989) 275.
- [36] J. Szejtli, *Med. Res. Rev.*, 14 (1994) 353.
- [37] F. Bressolle, M. Audran, T.N. Pham, J.J. Vallon, *J. Chromatogr. B*, 687 (1996) 303.
- [38] C. Bertucci, E. Domenici, G. Uccello-Barretta, P. Salvadori, *J. Chromatogr. A*, 506 (1990) 617.
- [39] C. Foulon, C. Danel, M.P. Vaccher, J.P. Bonte, C. Vaccher, J.F. Goossens, *Electrophoresis*, 25 (2004) 2735
- [40] M.G. Vargas, Y. Vander Heyden, M. Maftouh, D.L. Massart, *J. Chromatogr. A*, 855 (1999) 681.
- [41] D.W. Armstrong, C.D. Chang, S.H. Lee, *J. Chromatogr. A*, 539 (1991) 83.
- [42] W.P. Yau, E. Chan, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 28 (2002) 107.
- [43] A.M. Stalcup, J.R. Faulkner, Y. Tang, D.W. Armstrong, L.W. Levy, E. Regalado, *Biomed. Chromatogr.*, 5 (1991) 3.
- [44] P. Zakaria, M. Macka, P.R. Haddad, *J. Chromatogr. A*, 1031 (2004) 179.
- [45] H. Nishi, *J. Chromatogr. A*, 792 (1997) 327.
- [46] R. Gotti, V. Cavrini, V. Andrisano, G. Macellani, *J. Chromatogr. A*, 814 (1998) 205.
- [47] E. Belloli, C. Foulon, S. Yous, M.P. Vaccher, J.P. Bonte, C. Vaccher, *J. Chromatogr. A*, 907 (2001) 1001
- [48] P. Franco, A. Senso, L. Oliveros, C. Minguillon, *J. Chromatogr. A*, 906 (2001) 155.
- [49] Y.K. Ye, K.G. Lynam, R.W. Stringham, *J. Chromatogr. A*, 1041 (2004) 211.
- [50] Y.K. Ye, B.S. Lord, L. Yin, R.W. Stringham, *J. Chromatogr. A*, 945 (2002) 147.
- [51] A. Ceccato, B. Boulanger, P. Chiap, P.H. Hubert, J. Crommen, *J. Chromatogr. A*, 819 (1998) 143.
- [52] Y. Okamoto, E. Yashima, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37 (1998) 1020.
- [53] C. Yamamoto, Y. Okamoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 77 (2004) 227.
- [54] B. Chankvetadze, L. Chankvetadze, S. Sidamonidze, E. Yashima, Y. Okamoto, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 14 (1996) 1295.
- [55] A. Ahmed, D.K. Lloyd, *J. Chromatogr. A*, 766 (1997) 237.
- [56] D.K. Lloyd, A. Ahmed, F. Pastore, *Electrophoresis*, 18 (1997) 958.
- [57] X. Zhang, E.W. Davidian, T.H. Nguyen, R.W. Evans, S.J. Im, G.E. Barker, *J. Chromatogr. A*, 745 (1996) 1.
- [58] D. Eberle, R.P. Hummel, R. Kuhn, *J. Chromatogr. A*, 759 (1997) 185.
- [59] Y. Sadakane, H. Matsunaga, K. Nakagomi, Y. Hatanaka, J. Haginaka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 295 (2002) 587.
- [60] J. Haginaka, C. Seyama, N. Kanasugi, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 2539.
- [61] J. Haginaka, Y. Miyano, Y. Saizen, C. Seyama, T. Murashima, *J. Chromatogr. A*, 708 (1995) 161
- [62] R. Isaksson, C. Pettersson, G. Pettersson, S. Jönsson, J. Stalberg, J. Hermansson, I. Marle, *Trends Anal. Chem.*, 13 (1994) 431.
- [63] J. Haginaka, *J. Chromatogr. A*, 906 (2001) 253.

- [64] K.B. Jensen, B.L. Atkinson, M.C. Willis, T.H. Koch, and Gold L., "Using in vitro Selection to Direct the Covalent Attachment of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Rev Protein to High-Affinity RNA Ligands", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92 (1995) 12220-12224.
- [65] H. Henriksson, J. Stahlberg, R. Isaksson, G. Pettersson, *FEBS Lett.*, 390 (1996) 339.
- [66] H. Henriksson, L.G. Munoz, R. Isaksson, C. Pettersson, G. Pettersson, *J. Chromatogr. A*, 898 (2000) 63.
- [67] H. Henriksson, S. Jönsson, R. Isaksson, G. Pettersson, *Chirality*, 7 (1995) 415.
- [68] J. Vial, A. Jardy, *Journal of High Resolution Chromatography*, 22,(1999), 217-221.
- [69] J. Vial, K. Le Mapihan, A. Jardy, *Bioforum International Edition Française*, 2 (2002) 18-21.
- [70] J. Vial, A. Jardy, *J. Chrom. Sci*, 38 (2000) 189-194.
- [71] B. Dejaegher, Y. Vander Heyden, *LCGC Europe*, 19 (2006) 418-423.
- [72] V.P. Shah, K.K. Midha, J.W.A. Findlay, H.M. Hill, J.D. Hulse, I.J. McGilveray, K.J. Miller, R.N. Patnaik, M.I. Powell, A. Tonelli, C.T. Viswanathan, A. Yacobi, *Pharm. Res.*17, (2000) 1551-1557
- [73] Guidance for Industry, *Bioanalytical Method Validation*, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), May 2001.
- [74] Y.Gomezetal./*J.Pharma and Biomedica Analysis* 34 (2004) 3416348.