

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE HOUARI BOUMEDIENE
FACULTE DE CHIMIE



THÈSE

Présentée pour l'obtention du grade de Docteur en Sciences
en CHIMIE

Spécialité : Chimie Organique Appliquée

Par : **DERBOUZ Sofiane**

Thème

**Développement de nouvelles méthodes
séparatives pour l'analyse de molécules
hydrophiles biologiquement actives**

Soutenue publiquement, le 19/03/2018, devant le jury composé de :

Mr S. SEBIH	Professeur	à l'USTHB	Président
Mme S. GUERMOUCHE	Professeur	à l'USTHB	Directrice de thèse
Mr Y. BESSAKHOUD	Professeur	à L'ENSV	Examineur
Mme B. BOUTEMEUR	Professeur	à l'USTHB	Examinatrice
Mme A. HASSANI	Professeur	à l'ENS Kouba	Examinatrice
Mr B. SAÏDAT	Professeur	à l'U. Laghouat	Examineur

REMERCIEMENT

KAWAJSOJAWAKI

Je tiens tout d'abord à remercier monsieur le professeur MOULAY HASSAN QUERMOUCHE, directeur du laboratoire de chromatographie de la faculté de chimie de l'USTHB pour m'avoir fait confiance et accueilli au sein de son laboratoire, pour m'avoir guidé, encouragé et conseillé.

Mes remerciements vont également à madame le professeur SALITA QUERMOUCHE pour la confiance qu'elle m'a témoignée en acceptant la direction scientifique de mes travaux. Je lui suis reconnaissant pour sa grande disponibilité, sa grande gentillesse, ses conseils d'une mère à son fils.

Je tiens à assurer de ma profonde reconnaissance l'ensemble des membres du jury pour l'intérêt qu'ils portent à ce travail et le temps qu'ils ont consacré à sa lecture. Je suis très honoré de remercier de la présence à mon jury :

Monsieur SAID SEBIT, professeur à l'USTHB pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'être président de mon jury.

Monsieur YACINE BESSEKHOUD, professeur à L'ENSV pour sa participation au jury de thèse.

Monsieur BOUBKEUR SAIDAT, professeur à l'université de Laghouat qui a bien voulu examiner ce travail.

Madame BAYA BOUTEMEUR, professeur à l'USTHB, qui a accepté de participer à ce jury.

Madame AICHA HASSANI, professeur à L'ENS Kouba qui nous a fait l'honneur d'être dans le jury d'examen de cette thèse.

Je remercie toute l'équipe du laboratoire de chromatographie, mes amis et toute personne qui a contribué d'une façon ou d'une autre pour réaliser ce travail.

Finalement, un remerciement spécial pour ma famille pour son soutien durant ces années.

DÉDICACE

Je dédie ce travail :

À mon père qui n'est plus. Que Dieu l'accueille dans son vaste Paradis.

À ma mère.

À mes chers frères et sœurs.

À ma femme et mon fils.

À tous mes amis.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

LISTE DES ABRÉVIATIONS :

A_s : facteur d'asymétrie.

CCM : Chromatographie sur Couche Mince.

CE : Capillary Electrophoresis (électrophorèse capillaire).

CEC : Capillary ElectroChromatography (électrochromatographie capillaire).

d : doublet.

dd : doublet de doublets.

ddd : doublet de doublets de doublets.

GC : Gas Chromatographie (chromatographie en phase gazeuse).

HPLC : High Performance Liquid Chromatography (chromatographie en phase liquide à haute performance).

HPTLC : High Performance Thin Layer Chromatography (chromatographie sur couche mince à haute performance).

k' : facteur de rétention.

LLE : Liquide Liquide Extraction (extraction liquide liquide).

N : nombre de plateaux théoriques.

PP : Précipitation des Protéines.

R : résolution.

SFC : Super Fluid Chromatography (chromatographie en phase supercritique).

SPE : Solide Phase Extraction (extraction en phase solide).

TMS : TétraMéthylSilane.

UHPLC : Ultra High Performance Liquid Chromatography (chromatographie en phase liquide à ultra-haute performance).

α : sélectivité.

RRT : Relative Retention Time (temps de rétention relatif)

SOMMAIRE

INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	2
----------------------------	---

I. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. CITICOLINE

I.1.1. GÉNÉRALITÉS	7
I.1.2. PHARMACOCINÉTIQUE	7
I.1.3. POSOLOGIE	7
I.1.4. PROPRIÉTÉS	8
I.1.5. LA CITICOLINE, ÉTAT DE L'ART	9
I.1.6. RÉFÉRENCES	10

I.2. HYDROPHILIE

I.2.1. DÉFINITION	13
I.2.2. COMMENT DÉTERMINER LE CARACTÈRE HYDROPHILE D'UNE SUBSTANCE	13
I.2.3. IMPORTANCE DU CARACTÈRE HYDROPHILE/LIPOPHILE	16
I.2.4. MÉTHODES DE DÉTERMINATION DE logP	16
I.2.4.1. MÉTHODES EXPÉRIMENTALES	16
I.2.4.2. MÉTHODES PAR PRÉDICTION	17
I.2.5. MÉTHODES D'ANALYSE DES COMPOSÉS HYDROPHILES	17
I.2.5.1. LA CHROMATOGRAPHIE	17
I.2.5.1.1. Phase normale (NPLC)	18
I.2.5.1.2. Phase inverse (RPLC)	18
I.2.5.1.3. Chromatographie d'interaction hydrophilique (HILIC)	19
I.2.6. CONCLUSION	21
I.2.7. RÉFÉRENCES	21

I.3. IMPURETÉS DANS LES PRODUITS PHARMACEUTIQUES

I.3.1. INTRODUCTION	27
I.3.2. DÉFINITION D'UNE IMPURETÉ DANS UN MÉDICAMENT	27

SOMMAIRE

I.3.3. CLASSES DES IMPURETES	27
I.3.4. SOURCES DES IMPURETÉS	27
I.3.4.1. PROCESSUS DE FABRICATION	27
I.3.4.2. DÉGRADATION	28
I.3.4.3. INTERACTION CONTENANT-CONTENU	28
I.3.4.4. CONTAMINANTS	28
I.3.5. POURQUOI RECHERCHER LES IMPURETÉS ?	28
I.3.6. CONTRÔLE DES IMPURETÉS (RÈGLEMENTATION)	29
I.3.7. DÉGRADATION FORCÉE	29
I.3.7.1. DÉFINITION	29
I.3.7.2. POURQUOI FAIRE UNE DÉGRADATION FORCÉE ?	30
I.3.7.3. MÉTHODE D'IDENTIFICATION ET DE QUANTIFICATION DES PRODUITS DE DÉGRADATION (DPs)	31
I.3.7.3.1. HPLC/PDA	31
I.3.7.3.2. LC-MS	32
I.3.7.3.2.1. Principe de la technique	32
I.3.7.3.2.2. Source d'ionisation	33
I.3.7.3.2.3. Analyseur	33
I.3.7.3.2.4. Détecteur et système de traitement	34
I.3.7.3.2.5. Résultat	34
I.3.7.3.3. LC-ESI/TOF	34
I.3.7.3.3.1. Ionisation par électro-nébulisation (ESI)	35
I.3.7.3.3.2. Temps de vol	36
I.3.7.3.4. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	37
I.3.7.3.4.1. Principe de la technique	38
I.3.7.3.4.2. RMN ¹ H et ¹³ C	39
I.3.8. RÉFÉRENCES	39

SOMMAIRE

II. PARTIE EXPÉRIMENTALE

APPAREILLAGES, RÉACTIFS ET MÉTHODOLOGIES

II.1. MÉTHODE DE DOSAGE DE ROUTINE	45
II.1.1. APPAREILLAGE	45
II.1.2. RÉACTIFS	45
II.1.3. CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES	45
II.1.4. PRÉPARATION DES SOLUTIONS	46
II.1.4.1. Solvant de dilution	46
II.1.4.2. Phase mobile	46
II.1.4.3. Validation de la méthode	46
II.1.4.3.1. Spécificité... ..	46
II.1.4.3.2. Linéarité de la matière première	46
II.1.4.3.3. Linéarité de la formulation	46
II.1.4.3.4. Fidélité	46
II.1.4.3.5. Dosage du produit fini	46
II.2. DÉGRADATION FORCÉE	47
II.2.1. APPAREILLAGE	47
II.2.2. RÉACTIFS	47
II.2.3. DÉGRADATION DE LA CITICOLINE	47
II.2.3.1. Hydrolyse neutre	47
I.2.3.2. Hydrolyse acide	47
II.2.3.3. Hydrolyse basique	47
II.2.3.4. Dégradation oxydative	47
II.2.3.5. Photodégradation	47
II.2.3.6. Dégradation thermique	47
II.2.4. CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES	47
II.3. IDENTIFICATION DES PRODUITS DE DÉGRADATION	47
II.3.1. LC-MS	47

SOMMAIRE

II.3.1.1. Appareillage	47
II.3.1.2. Réactifs	48
II.3.1.3. Conditions chromatographiques	48
II.3.2. HPLC SEMI-PRÉPARATIVE	48
II.3.2.1. Appareillage	48
II.3.2.2. Réactifs	48
II.3.2.3. Conditions chromatographiques	48
II.3.2.4. Récupération des produits de dégradation	49
II.3.3. VALIDATION DE LA MÉTHODE (CITICOLINE EN PRÉSENCE DE SES PRODUITS DE DÉGRADATION)	49
II.3.3.1. Spécificité	49
II.3.3.2. Linéarité	49
II.3.3.3. Fidélité	49
II.3.4. RMN	49
II.3.4.1. Appareillage	49
II.3.4.2. Réactifs	49
II.3.4.3. Préparation des solutions	49

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

III.1. IDENTIFICATION DES PRODUITS DE DÉGRADATION

III.1.1. NOMBRE DE COMPOSÉS DE DÉGRADATION	52
III.1.2. SPÉCIFICITÉ	59
III.1.3. CONCLUSION	60
III.1.4. RÉFÉRENCES	60

III.2. STRUCTURES DES PRODUITS DE DÉGRADATION

III.2.1. ANALYSE PAR SPECTROPHOTOMÉTRIE UV	63
III.2.1.1. CITICOLINE	63
III.2.1.2. PRODUIT DE DÉGRADATION A (DPA)	65
III.2.1.3. PRODUIT DE DÉGRADATION B (DPB)	65

SOMMAIRE

III.2.1.4. PRODUIT DE DÉGRADATION C (DPC)	67
III.2.2. LC-ESI-MS/TOF	67
III.2.2.1. CITICOLINE	67
III.2.2.2. DPA	69
III.2.2.3. DPB	70
III.2.2.4. DPC	71
III.2.3. RMN ¹ H et ¹³ C	73
III.2.3.1. CHROMATOGRAPHIE SEMI-PRÉPARATIVE	73
III.2.3.2. RMN ¹ H ET ¹³ C DE LA CITICOLINE	73
III.2.3.3. RMN ¹ H ET ¹³ C DU DPA	75
III.2.3.4. RMN ¹ H ET ¹³ C DU DPB	77
III.2.3.5. RMN ¹ H ET ¹³ C DU DPC	79
III.2.4. CONCLUSION	80
III.2.5. RÉFÉRENCES	81
III.3. MÉCANISMES RÉACTIONNELS DE FORMATION DES DPs	
III.3.1. MÉCANISMES DE FORMATION DU DPA	86
III.3.1.1. MÉCANISME DE FORMATION DU DPA EN MILIEU NEUTRE	86
III.3.1.1.1. Mécanisme réactionnel (M1)	87
III.3.1.1.2. Mécanisme réactionnel (M2)	88
III.3.1.1.3. Mécanisme réactionnel (M3)	88
III.3.1.2. MÉCANISME DE FORMATION DU DPA EN MILIEU ACIDE	89
III.3.1.3. MÉCANISME DE FORMATION DU DPA PAR PHOTOLYSE	91
III.3.2. MÉCANISME DE FORMATION DU DPB	91
III.3.3. MÉCANISME DE FORMATION DE DPC	92
III.3.4. RÉFÉRENCES	92
III.4. VALIDATION DE LA MÉTHODE CHROMATOGRAPHIQUE	
III.4.1. VALIDATION	95
III.4.2. VALIDATION DE LA MÉTHODE DE DOSAGE DE ROUTINE	95

SOMMAIRE

III.4.2.1. SPÉCIFICITÉ	95
III.4.2.2. LINÉARITÉ	95
III.4.2.3. FIDÉLITÉ	98
III.4.2.4. EXACTITUDE	98
III.4.2.5. LIMITE DE DÉTECTION (LOD) ET LIMITE DE QUANTIFICATION (LOQ)	98
III.4.2.6. STABILITÉ DES SOLUTIONS	98
III.4.2.7. DOSAGE DU PRODUIT FINI	98
III.4.3. VALIDATION DE LA MÉTHODE DE DÉGRADATION	99
III.4.3.1. SPÉCIFICITÉ	99
III.4.3.2. LINÉARITÉ, FIDÉLITÉ, EXACTITUDE, LOD ET LOQ	99
III.4.4. CONCLUSION	101
III.4.5. RÉFÉRENCES	101

CONCLUSION GÉNÉRALE

CONCLUSION GÉNÉRALE	103
---------------------------	-----

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE :

Une des missions des organismes de la santé est de développer et d'encourager l'établissement de normes internationales pour les produits pharmaceutiques. Une de leurs principales préoccupations est la qualité de ces derniers.

Les protocoles de contrôle analytique des matières premières figurent dans les différentes pharmacopées sous forme de monographies où sont indiqués plusieurs tests faisant appel à différentes méthodes analytiques. Un des essais essentiel est celui de l'analyse qualitative et quantitative des substances apparentées qui sont des résidus de produits utilisés lors de la synthèse de la substance et des impuretés liées à sa stabilité.

Pour générer ces impuretés artificiellement, une procédure règlementée par les instances du médicament appelée méthode indicatrice de stabilité existe.

De part sa capacité à affecter l'efficacité du médicament, la stabilité chimique des molécules pharmaceutiques reste une préoccupation majeure. En effet, elle contribue au choix de la formulation du médicament, à son conditionnement et à sa stabilité.

L'instabilité est principalement due à des réactions chimiques survenant de manière spontanée ou retardée mettant essentiellement en jeu des phénomènes d'hydrolyse et d'oxydoréduction.

La dégradation forcée est un processus qui implique l'attaque des substances médicamenteuses dans des conditions plus sévères que celle utilisées dans les essais de stabilité.

Elle produit en général plus de molécules que celles observées dans les études de stabilité. Pour la majeure partie des substances biologiquement actives, les produits de dégradation primaire sont ceux susceptibles d'apparaître lors des études de stabilité.

Les directives de l'ICH (International Conference on Harmonization) stipulent que les essais de contraintes sont destinés à identifier les produits de dégradation probables.

Les tests en conditions de stress sur les substances actives permettent de recueillir les premières informations sur le profil de stabilité de la substance active. Les résultats obtenus sont utilisés lors du développement galénique et de la validation des méthodes analytiques.

Une méthode « indicatrice de stabilité » (stability indicating method) est une procédure analytique capable de distinguer le principe actif à analyser de ses produits de dégradation.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La méthode doit être :

- Suffisamment sensible pour détecter les impuretés qui se trouvent à l'état de traces,
- Hautement résolutive pour distinguer des produits de structures proches.

Le choix des techniques d'analyse s'orientera vers des méthodes séparatives permettant de différencier les constituants d'un mélange. Actuellement, la majeure partie des méthodes indicatrices de stabilité se font par chromatographie en phase liquide en mode inverse. Cette technique, avec ses développements permet d'analyser des mélanges complexes.

L'identification des produits de dégradation reste un challenge et nécessite l'utilisation de techniques plus performantes (couplage LC/MS et RMN).

Réglementairement, la mise en œuvre de la méthode de dosage choisie passe par des étapes plus ou moins longues de développement et de validation analytiques.

Dans ce travail, nous nous proposons de développer une méthode indicatrice de stabilité de la Citicoline par chromatographie en phase liquide en mode HILIC (hydrophilic interaction liquid chromatography).

La citicoline est une molécule organique complexe qui stimule la synthèse des phospholipides impliqués dans la réparation des membranes cellulaires. Plusieurs travaux traitent des différentes indications de la citicoline.

Il s'agit d'un composé hydrosoluble. Cette molécule ne présentera aucune rétention en mode inverse, et risque de subir une adsorption irréversible en mode normal. Il est conseillé dans ce cas d'utiliser la HPLC en mode HILIC, technique utilisant une phase stationnaire polaire et une phase mobile polaire.

Cette étude concernera l'hydrolyse (neutre, acide et basique), l'action de l'eau oxygénée et la lumière ultraviolette sur la citicoline.

La première partie sera consacrée aux généralités. Quelques notions sur l'hydrophilie, des informations sur les impuretés ainsi que les différentes techniques utilisées pour mener à bien ce travail seront présentées.

La deuxième partie sera consacrée à la partie expérimentale.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Nous exposerons dans le troisième chapitre les résultats de ce travail qui nous permettront d'une part :

- De mettre en évidence des différents produits de dégradation à partir de l'utilisation de l'HPLC comportant un détecteur à barrette de diodes.
- La proposition de leur structure après exploitation de leurs spectres de masse obtenus par LC/MS-TOF.
- La confirmation de ces structures grâce à la RMN ^1H et ^{13}C après une HPLC semi préparative.
- Proposer les mécanismes réactionnels de formation de chaque produit de dégradation.

Et d'autre part, de réaliser l'analyse du produit fini, après validation de la technique proposée.

Enfin, la conclusion générale sera donnée dans le dernier chapitre.



PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

1.1
CITICOLINE

I.1. CITICOLINE :

I.1.1. GÉNÉRALITÉS :

La citicoline (CIT, figure I.1.1) est un nucléotide composé d'une base nucléique pyrimidique (la cytosine) liée à un glucide (le ribofurranose). Ces deux molécules forment la cytidine par une liaison osidique. En position 5' se trouve un pyrophosphate (diphosphate) qui porte la choline.

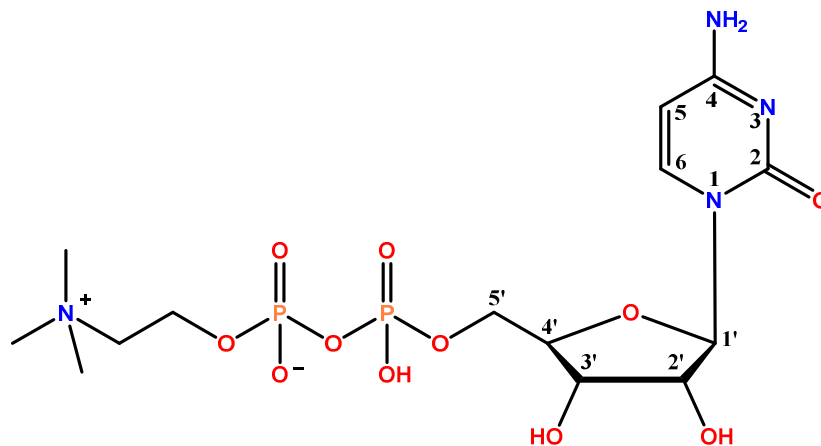


Figure I.1.1 : Structure de la citicoline

C'est un agent psychostimulant/nootropique et un neuroprotecteur [1-4]. Des études suggèrent que les suppléments de la citicoline augmentent les densités des récepteurs de la dopamine [5]. C'est aussi une source exogène de la synthèse de l'acétylcholine, un neurotransmetteur clé avec un rôle important dans le métabolisme cellulaire [4,6] et dans la biosynthèse de la lécithine [4,7].

Elle est administrée dans le traitement des troubles cérébrovasculaires (y compris ischémie cérébrale), la maladie de Parkinson, l'Alzheimer et le traumatisme crânien [4,7,8].

I.1.2. PHARMACOCINÉTIQUE :

La citicoline est un composé hydrosoluble avec une biodisponibilité supérieure à 90%. Elle est métabolisée dans le foie. Les études pharmacocinétiques utilisant le ¹⁴C ont montré que l'élimination se fait principalement par voie respiratoire et urinaire. Les périodes biologiques (temps de demi-vie) sont respectivement de 56 heures et 71 heures [4,7,9].

I.1.3. POSOLOGIE :

Elle est administrée par injection intraveineuse ou intramusculaire par dose pouvant atteindre le gramme par jour ou par voie orale en doses divisées de 200 à 600 mg par jour [7].

I.1.4. PROPRIÉTÉS :

Nous donnons dans le tableau suivant quelques propriétés de la citicoline :

Tableau I.1.1 : Quelques propriétés de la citicoline [10-14]

Nom systématique*	2-(((((((2R,3R,4S,5R)-5-(4-amino-2-oxopyrimidin-1(2H)-yl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)méthoxy)(hydroxy)phosphoryl)oxy)oxidophosphoryl)oxy)-N,N,N-triméthyléthan-1-aminium
Synonyme	Cytidine DiPhosphate Choline (CDP-Choline)
Formule chimique	C ₁₄ H ₂₆ N ₄ O ₁₁ P ₂
CAS	987-78-0
PubChem CID	11583971
InChI	InChI=1S/C14H26N4O11P2/c1-18(2,3)6-7-26-30(22,23)29-31(24,25)27-8-9-11(19)12(20)13(28-9)17-5-4-10(15)16-14(17)21/h4-5,9,11-13,19-20H,6-8H2,1-3H3,(H3-,15,16,21,22,23,24,25)/t9-,11-,12-,13-/m1/s1
InChI Key	RZZPDXZPRHQOCG-OJAKKHQRSA-N
FDA Substance Registration System (UNII)	536BQ2JVC7
Masse molaire	488,3265 g/mol
pKa	4.4
Solubilité	Eau : 100 mg/ml Ethanol : pratiquement insoluble Acétone : pratiquement insoluble Chloroforme : pratiquement insoluble
α_D^{25}	+19.0° (C = 0.86 M dans H ₂ O)
LogP	- 6.94
DL50	Souris : 4600 ± 335 mg/kg par voie intraveineuse Rats : 4150 ± 370 mg/kg par voie intraveineuse 8 g/kg par voie orale pour les deux

* à partir de ChemDraw Professional Version 16.0.0.82

L1.5. CITICOLINE, ÉTAT DE L'ART :

L'évolution de la productivité scientifique a nécessité l'utilisation de la bibliométrie pour une mise à jour des travaux publiés dans un cadre précis. Les bases de données et les moteurs de recherche facilitent la tâche aux scientifiques en leur donnant des résultats ciblés [15,16].

Une recherche bibliographique en utilisant les bases de données *Web of Science*, *Scopus* et les moteurs de recherche spécialisés *FirstSearch*, *PubMed* et non spécialisés *Google Scholar* et *Google* sur les méthodes chromatographiques développées pour l'analyse et la séparation de la citicoline dans les préparations pharmaceutiques et le suivi de sa dégradation forcée a été réalisée. Elle consiste à rechercher dans la rubrique "Title" les expressions suivantes :

- 1^{ère} recherche : C'est la recherche des expressions suivantes : "*analysis of citicoline by HPLC*" ou "*determination of citicoline by liquid chromatography*".
- 2^{ème} recherche : C'est la recherche des expressions suivantes : "*hydrophilic interaction chromatography of citicoline*" ou "*HILIC of citicoline*".
- 3^{ème} recherche : C'est la recherche des expressions suivantes : "*stability indicating liquid chromatography of citicoline*" ou "*degradation of citicoline*".

Ces recherches ont été effectuées au début de notre travail et répétées périodiquement jusqu'à juillet 2017.

Les résultats de la première recherche ont abouti à deux publications [17,18] dans des journaux indexés dans Scopus ou Web of Science et les autres sont dans des journaux en *open acces* [19-25].

Dans ces articles, la chromatographie liquide en phase inverse a été utilisée comme technique de dosage. Une faible rétention (entre 1.8 et 3.5 min) est obtenue avec une phase mobile composée d'un très grand pourcentage en partie aqueuse (entre 90 et 100%). Pour augmenter la rétention, dans la pluparts des articles, une paire d'ions (tétrabutylammonium) est utilisée.

Dans la deuxième recherche, il n'y a aucune référence sur la citicoline.

Dans la troisième, la pluparts des résultats sont publiés dans des journaux en open acces [26-31] sauf deux publications [17,18].

L'état de l'art de la citicoline montre l'absence :

- D'une méthode chromatographique adéquate pour l'analyse et la séparation de la citicoline dans les préparations pharmaceutiques.

- D'une identification complète de ses produits de dégradation lors d'une méthode indicatrice de stabilité (*stability indicating method*). Des études du pourcentage de dégradation ou de la présence ou non d'une dégradation sont proposées.

I.1.6. RÉFÉRENCES :

- [1] J.J. Secades, G. Frontera, *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 17B (1995) 1.
- [2] M. Fioravanti, M. Yanagi, *Cochrane Database Syst. Rev.* 2 (2005) CD000269.
- [3] O. Hurtado, I. Lizasoain, M.Á. Moro, *Stroke* 42 (2011) S33.
- [4] G.B. Weiss, *Life Sci.* 56 (1995) 637.
- [5] R. Giménez, J. Raïch, J. Aguilar, *Br. J. Pharmacol.* 104 (1991) 575.
- [6] J.J. Secades, J.L. Lorenzo, *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 28B (2006) 1.
- [7] S.C Sweetman, *Martindale : The Complete Drug Reference*, 36th Ed., Pharmaceutical Press, 2009, China.
- [8] R. Eberhardt, G. Birbamer, F. Gerstenbrand, E. Rainer, H. Traegner, *Clin. Ther.* 12 (1990) 489.
- [9] R. Canant, A.G. Schauss, *Alter. Med. Rev.* 9 (2004) 17.
- [10] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11583971#section=Names-and-Identifiers>, consulté le 07/07/17.
- [11] <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.13207.html>, consulté le 07/07/17.
- [12] <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/unii/536BQ2JVC7>, consulté le 07/07/17.
- [13] <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB01413>, consulté le 07/07/17.
- [14] M.J. O'Neil, *The Merck Index*, 14th Ed., Merck and Co Ink., 2006, USA.
- [15] P. Jacso, *Curr. Sci.* 89 (2005) 1537.
- [16] L.I. Meho, K. Yang, *J. Am. Soc. Inf. Sci. Technol.* 58 (2007) 2105.
- [17] M. Acharya, J. Ak, N. Garud, *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 9:2 (2016) 292
- [18] O.A. Mahmoud, M.A. Hegazy, H. Salem, A.A. Moustafa, *J. Planar Chromatogr. - Mod. TLC* 28 (2015) 241.
- [19] H.K. Maradiya, V.H. Pansara, *Indian J. Pharm. Sci.* 75 (2013) 238.
- [20] S. Bandaiya, A. Argal, *Int. J. Pharm. Chem.* 2 (2012) 85.
- [21] O. Sharma, T. Chand, *Int. J. Res. Pharm. Biomed. Sci.* 4 (2013) 550.
- [22] S.M. Sandhya, G. Jyothisree, G. Babu, *Int. J. Pharm. Res. Rev.* 3 (2014) 20.

I. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1 : Cíticolíne

- [23] S.S. Panda, B.V.V.R. Kumar, G. Mohanta, J. Panda, *Int. J. Pharm. Sci. Nanotech.* 6 (2013) 1952.
- [24] S.K. Bindaiya, K. Sahu, M. Bhaisare, C. Karthikeyan, N.S.H.N. Moorthy, F.F. Mehta, P. Trivedi, *Lat. Am. J. Pharm.* 30 (2011) 794.
- [25] Z. Zheng, Y. Chen, Y. DU, *Chin. J. New Drugs* 12 (2003) 1022.
- [26] V.R. Patel, A.M. Prajapati, *Inventi Rapid - Pharm Analysis & Quality Assurance*, July-September (2013) 894.
- [27] S. Bindaiya, A. Argal, *Pharm. Sin.* 4 (2013) 109.
- [28] J.A. Patel, B. Panigrahi, C.N. Patel, B. Ramalingan, *Chron. Young Sci.* 2 (2011) 150.
- [29] S.O. Uttarwar, R.T. Jadhav, C.G. Bonde, *Int. J. PharmTech Res.* 2 (2010) 2482.
- [30] S.B. Bari, G.O. Sugandhi, A.J. Mhaske, J.B. Gawad, *Pharm. Lett.* 7 (2015) 254.
- [31] R.B.Ganduri, J.R. Peddareddigari, N.R. Dasari, R.K. Saiempu, *Int. J. PharmTech Res.* 2 (2010) 427.

12
L'HYDROPHILIE

I.2. HYDROPHILIE

I.2.1. DÉFINITION :

Le mot hydrophile est composé de *hydro* (eau) et *phile* (aimer). Hydrophile veut dire aimer (avoir une affinité pour) l'eau, contrairement à hydrophobe (*phobe* : peur) qui veut dire peur de l'eau. Un composé hydrophile est une substance qui possède une affinité pour l'eau.

I.2.2. COMMENT DÉTERMINER LE CARACTÈRE HYDROPHILE D'UNE SUBSTANCE :

L'hydrophilie d'une substance est déterminée par le calcul du rapport de ses concentrations à l'équilibre entre une phase organique et une phase aqueuse dans un système hétérogène. Le système biphasique le plus couramment utilisé est le n-octanol/eau, mais d'autres solvants organiques comme le chloroforme, le cyclohexane et le dipelargonate de propylène glycol peuvent être utilisés. Le système alcane/eau est considéré par certains auteurs comme le seul système pouvant être utilisé avec succès en plus du standard n-octanol/eau pour prédire les coefficients d'absorption, de distribution, de métabolisme, d'excrétion et de toxicité (ADMET) [1-3].

Ce rapport est appelé le coefficient de partage P et le caractère hydrophile est donné par le $\log P_{ow}$ (octanol-water partitioning coefficient, le coefficient de partage octanol-eau) ou tout simplement $\log P$. L'expression du coefficient de partage d'une substance (S) est donnée par la formule suivante :

$$P = \frac{\text{concentration du composé dans la phase organique}}{\text{concentration du composé dans la phase aqueuse}} = \frac{[S]_{org}}{[S]_{aq}}$$

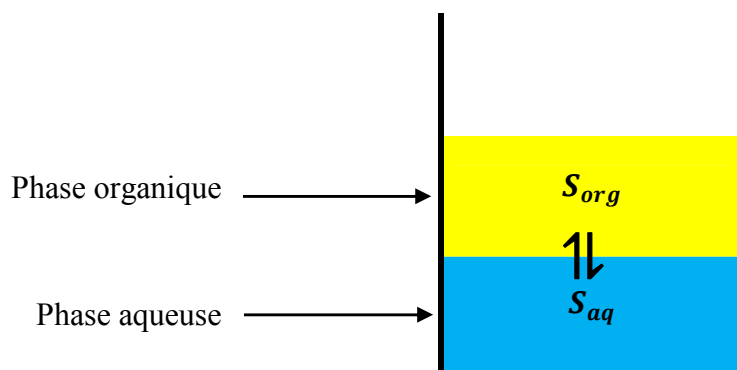


Figure I.2.1 : Partage d'un composé entre deux phases immiscibles

1. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

2 : Hydrophilie

Plus la concentration du composé est élevée dans la phase aqueuse, plus le coefficient de partage est petit. Dans ce cas le composé est hydrophile. Dans le cas contraire, il aura un caractère hydrophobe ou lipophile avec **logP** positif. Nous donnons dans la figure suivante la répartition du caractère hydrophile/hydrophobe selon logP :

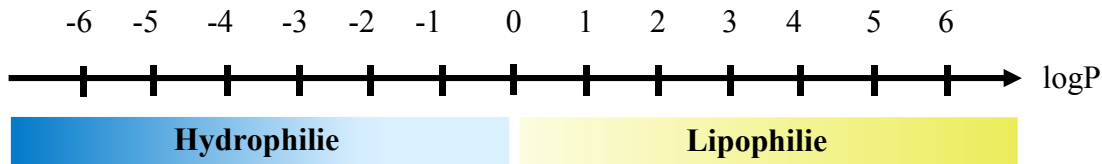
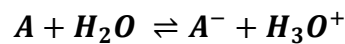


Figure I.2.2 : Variation du caractère hydrophile/lipophile en fonction du logP

En général, **P** tend à être important pour les composés à structure non polaire étendue comme les hydrocarbures à longue chaîne ou plusieurs cycles et petit pour les composés à groupes fortement polaires.

Le **logP** est calculé lorsque la molécule est sous une forme non ionisée (neutre). Cependant, la majorité des médicaments connus et en particulier ceux possédant un caractère hydrophile contiennent des groupes ionisables et se retrouvent chargés à un pH donné.

En solution aqueuse, un acide faible est dissocié selon la réaction suivante :



Cette réaction est caractérisée par une constante d'acidité notée **K_a** :

$$K_a = \frac{[A^-]_{aq} * [H_3O^+]_{aq}}{[A]_{aq}}$$

$$pK_a = -\log K_a$$

Nous pouvons déduire les zones de prédominance de chaque espèce en fonction du pH :

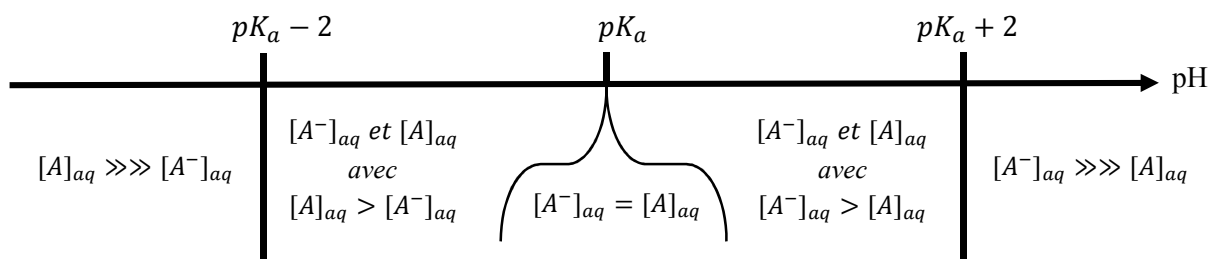
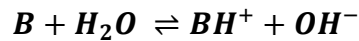


Figure I.2.3 : Diagramme de prédominance d'un acide faible

De la même façon, une base faible est partiellement dissociée en solution aqueuse selon la réaction suivante :



Cette réaction est caractérisée par une constante de basicité notée K_b :

$$K_b = \frac{[BH^+]_{aq} * [OH^-]_{aq}}{[B]_{aq}}$$

$$pK_b = -\log K_b$$

$$pK_a + pK_b = 14$$

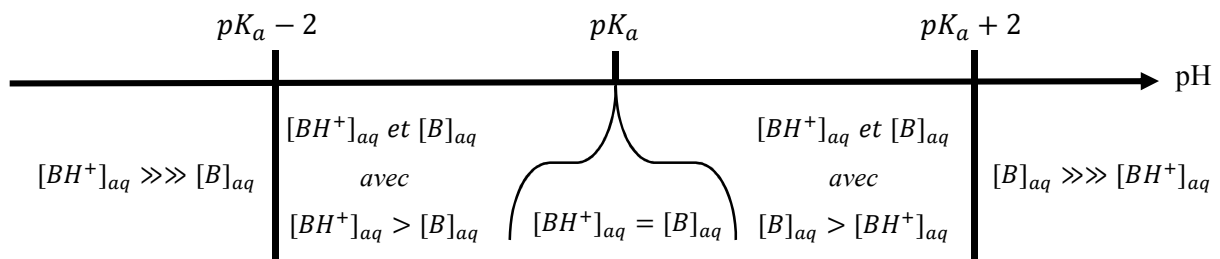


Figure I.2.4 : Diagramme de prédominance d'une base faible

Le $\log P$ ne décrit correctement que le coefficient de partage des molécules neutres. Il n'est pas un bon indicateur pour les substances ionisables.

Dans ce cas-là, nous définissons le rapport de distribution D qui tient compte de toutes les formes en présence. Le $\log D$ est un meilleur descripteur de l'hydrophilie d'une molécule. Celui-ci peut être déterminé d'une manière similaire à $\log P$ mais au lieu d'utiliser de l'eau, la phase aqueuse est ajustée à un pH spécifique en utilisant un tampon. Sa formule est donnée par l'expression suivante :

$$D = \frac{\sum \text{concentration de toutes les espèces dans la phase organique}}{\sum \text{concentration de toutes les espèces dans la phase aqueuse}}$$

Les espèces chargées ont plus d'affinité pour la phase aqueuse donc nous négligeons les formes ioniques dans la phase organique. L'expression du rapport de distribution D en fonction des concentrations des espèces en solution est :

$$D = \frac{[S]_{org}}{[S]_{aq} + [S^\pm]_{aq}}$$

La relation entre $\log P$ et $\log D$ est donnée dans les expressions ci-dessous :

Pour les composés acides :

$$\log D = \log P + \log \frac{1}{1 + 10^{pH - pK_a}}$$

Si le $pH - pK_a \geq 2$, le composé se trouve majoritairement dans sa forme ionisée (la forme A^- prédomine), nous obtenons la formule approximative suivante :

$$\log D = \log P + pK_a - pH$$

Pour les composés basiques :

$$\log D = \log P + \log \frac{1}{1 + 10^{pK_a - pH}}$$

Si le $pH - pK_a \leq 2$, le composé se trouve majoritairement dans sa forme ionisée (la forme BH^+ prédomine), nous obtenons la formule approximative suivante :

$$\log D = \log P - pK_a + pH$$

Pour les composés non ionisés :

$$\log D = \log P$$

Pour les composés multichargés, l'expression est plus complexe car il faut tenir compte des différentes formes d'ionisation [4].

I.2.3. IMPORTANCE DU CARACTÈRE HYDROPHILE/LIPOPHILE :

Le coefficient de partage octanol-eau est un paramètre largement utilisé pour corrélérer les effets biologiques des substances organiques. Il fournit une mesure de la nature hydrophile vs. hydrophobe d'un composé, ce qui est une considération importante dans l'évaluation de la toxicité potentielle. Il sert aussi à établir les relations structure-activité (SAR) et prédire les propriétés pharmacocinétiques. La différence entre le coefficient de partage dans le système n-octanol/eau et alcane/eau ($\log P_{oct-alc}$) a été largement utilisée pour révéler des liaisons hydrogène inter- ou intramoléculaires ou pour prédire la perméation du médicament à travers les membranes [5-9].

I.2.4. MÉTHODES DE DÉTERMINATION DE $\log P$:

Plusieurs méthodes sont données dans la littérature pour l'évaluation de P. nous les divisons en deux catégories :

I.2.4.1. MÉTHODES EXPÉRIMENTALES :

- Méthode du flacon agité (Shake-flask).
- Méthodes chromatographiques [10-16].

I.2.4.2. MÉTHODES PAR PRÉDICTION :

Ce sont des méthodes théoriques basées sur certaines approches (*équation d'Abraham, équation de Hansch et Leo, méthode de Rekker, la méthode des lipophilies atomiques, potentiel de lipophilie moléculaire (PLM), modèle de site d'interaction de référence tridimensionnel, méthode de fonction de base radiale - moindres carrés partiels*) et en utilisant l'outil informatique, elle sont programmées dans des logiciels ou sur des sites et il suffit de dessiner la molécule pour obtenir la valeur [17-20].

Nous donnons quelques logiciels et sites internet :

- ACD/ChemSketch de ACD/Labs.
- ChemDraw de PerkinElmer.
- <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>.
- <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/cLogP.html>.
- <https://disco.chemaxon.com/apps/demos/logd/>.
- <http://146.107.217.178/lab/alogps/start.html>.

Pour plus de détail voir la référence [21].

I.2.5. MÉTHODES D'ANALYSE DES COMPOSÉS HYDROPHILES :

Les méthodes d'analyses directes telles que les dosages titrimétriques (acide-base, oxydo-réduction, complexométrie, précipitation) ou l'UV-Visible peuvent être utiles dans les deux cas suivants :

- La technique est spécifique.
- Le produit se trouve à l'état pur.

Dans le domaine pharmaceutique où la substance active est présente dans une matrice (impuretés de synthèse, produits de dégradation, placebo), il y a toujours un risque d'interférence lors de l'utilisation des méthodes de dosage directes. Les méthodes séparatives (la chromatographie et l'électrophorèse) sont le meilleur choix pour résoudre ce problème.

I.2.5.1. CHROMATOGRAPHIE :

La chromatographie est une méthode physico-chimique de séparation basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases. L'une d'elles, la phase stationnaire, est constituée par un lit de matériau fixe où s'infiltrer la deuxième phase qui est la phase mobile.

Chaque constituant adopte une vitesse de migration qui lui est propre en fonction de sa solubilité dans la phase mobile et/ou de son affinité pour la phase stationnaire qui tend à le retenir [22,23]. Si nous classifions les différentes techniques chromatographiques en fonction de l'état physique de la phase mobile, la chromatographie en phase gazeuse (CPG) ne peut être utilisée pour les composés hydrophiles qui sont solubles dans l'eau, thermiquement instables et non volatils, propriétés importantes pour cette technique. Une possibilité pour pouvoir les faire passer en CPG est de diminuer leur hydrophilie en transformant les fonctions polaires en fonctions apolaires. Cette transformation appelée la dérivation, est une réaction chimique qui doit être rapide, micro-quantitative et spécifique pour répondre aux exigences du domaine analytique.

La chromatographie en phase supercritique utilise une phase mobile constituée généralement de dioxyde de carbone (CO₂) pressurisé et chauffé au-delà de son point critique. L'ajout d'un autre modificateur comme le méthanol, l'isopropanol, les amines à courte chaîne, les acides carboxyliques augmente la polarité de la phase. Cette technique est utilisée pour l'analyse des molécules polaires [24-27].

Le troisième mode, celui qui utilise une phase mobile liquide peut être subdivisé en fonction du caractère polaire ou apolaire des phases stationnaire et mobile en :

I.2.5.1.1. Phase normale (NPLC) :

Dans ce mode, la nature polaire de la phase stationnaire assure l'interaction avec le soluté par rétention mais le caractère apolaire de la phase mobile rend l'élution difficile. Cette technique présente plusieurs inconvénients :

- L'adsorption irréversible.
- L'insolubilité des composés hydrophiles dans les solvants apolaires.
- L'emploi d'une quantité assez importante de solvants considérés comme toxiques.
- L'incompatibilité avec la spectrométrie de masse (MS) car l'ionisation des molécules avec ces solvants n'est pas aussi performante qu'avec des solvants plus polaires.

I.2.5.1.2. Phase inverse (RPLC) :

Les composés polaires ne présentent pas d'interactions suffisantes pour entraîner une rétention sur des colonnes chromatographiques constituées de phases stationnaires apolaires. Ainsi, les composés polaires sont coélus avec le solvant. Dans certains cas, la dérivation est pratiquée pour obtenir une rétention suffisante sur la colonne chromatographique.

Nous pouvons aussi jouer sur le pH de la phase mobile pour augmenter la rétention des composés ionisables (ils seront retenus par la phase stationnaire sous leur forme neutre) en veillant à la compatibilité de la phase stationnaire avec les conditions retenues.

L'addition dans la phase mobile d'un agent ionique de charge opposée à celle des substances à analyser comme les alkylsulfonates pour les solutés chargés positivement en solution et les alkylammoniums pour les solutés chargés négativement en solution peut modifier la rétention.

I.2.5.1.3. Chromatographie d'interaction hydrophilique (HILIC) :

En 1990, A.J. Alpert propose une autre méthode pour séparer les molécules hydrophiles en utilisant une phase stationnaire polaire éluee par une phase mobile hydro-organique : *la chromatographie d'interaction hydrophilique* [28]. Le mode *HILIC* est une technique de choix pour l'analyse de composés hydrophiles non retenus en RPLC, avec en plus l'avantage d'être compatible avec la spectrométrie de masse. L'utilisation d'une phase stationnaire polaire favorise l'interaction avec le soluté, cela empêche une élution trop rapide [29-34]. La phase mobile composée d'une partie aqueuse (de l'eau pure ou modifiée par des acides, bases, sels et tampons) [35-41] et une phase organique hydrosoluble majoritaire (plus de 50% V/V) entraîne le composé de la colonne [42-50]. Le solvant organique est le solvant de plus faible force d'élution, donc si nous augmentons sa proportion, la rétention augmente. La force d'élution de la phase mobile est directement proportionnelle à la fraction de la partie aqueuse.

Plusieurs auteurs ont décrit le mécanisme de séparation de cette technique. Selon Alpert, il y a partage du composé entre la phase mobile et la fine couche d'eau immobilisée sur la surface de la phase stationnaire [28,42]. C'est le mécanisme prédominant mais d'autres mécanismes ont été proposés par la littérature comme l'échange d'ions [51,52], la liaison hydrogène [42] et d'autres [39,53-55].

Nous donnons dans la figure suivante un schéma représentatif des principaux mécanismes de séparation en mode HILIC.

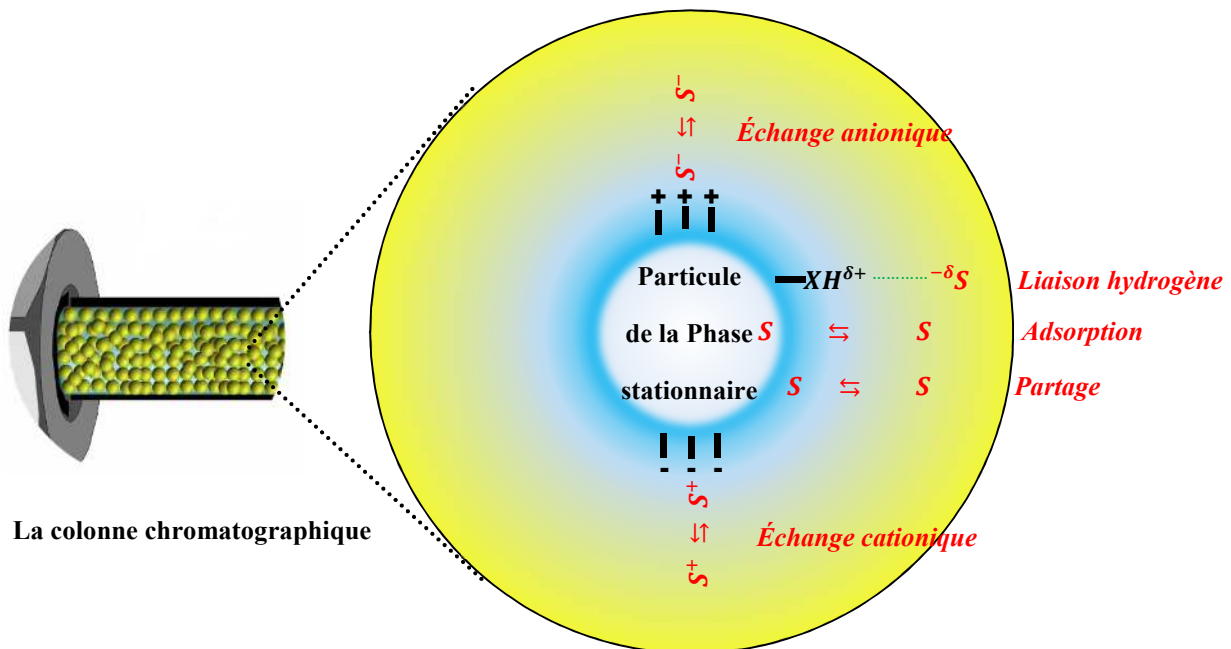


Figure I.2.5 : Schéma représentatif des principaux mécanismes de séparation en mode HILIC

Depuis ses premières applications en 1990, le nombre de publications utilisant cette technique a augmenté dans les différents domaines [56-84]. Ceci est à relier aux différents avantages qu'elle présente :

- Une bonne rétention des composés polaires.
- Une grande résolution entre les composés hydrophiles et hydrophobes.
- Une faible viscosité de la phase mobile due à la grande quantité en solvant organique ce qui se traduit par une faible pression permettant ainsi l'utilisation de débits plus élevés.
- Les solvants d'éluion en SPE, PP et LLE ont une force d'éluion plus faible que la phase mobile de la HILIC, les extraits sont directement injectés sans le passage par l'évaporation et la reconstitution, ce qui fait gagner beaucoup de temps (plus de 50%) et éviter la perte de masse.
- Une phase mobile volatile compatible avec les détecteurs basés sur le principe d'évaporation de la phase mobile.
- Une phase mobile plus appropriée pour les sources d'ionisation en spectrométrie de masse.

Dans l'histogramme suivant, nous représentons le nombre de publications (articles scientifiques) obtenues en effectuant une recherche du mot "*HILIC*" ou "*hydrophilic interaction chromatography*" dans la rubrique "Title" dans Web of Science (V5.24) et Scopus (date d'accès 03/06/17).

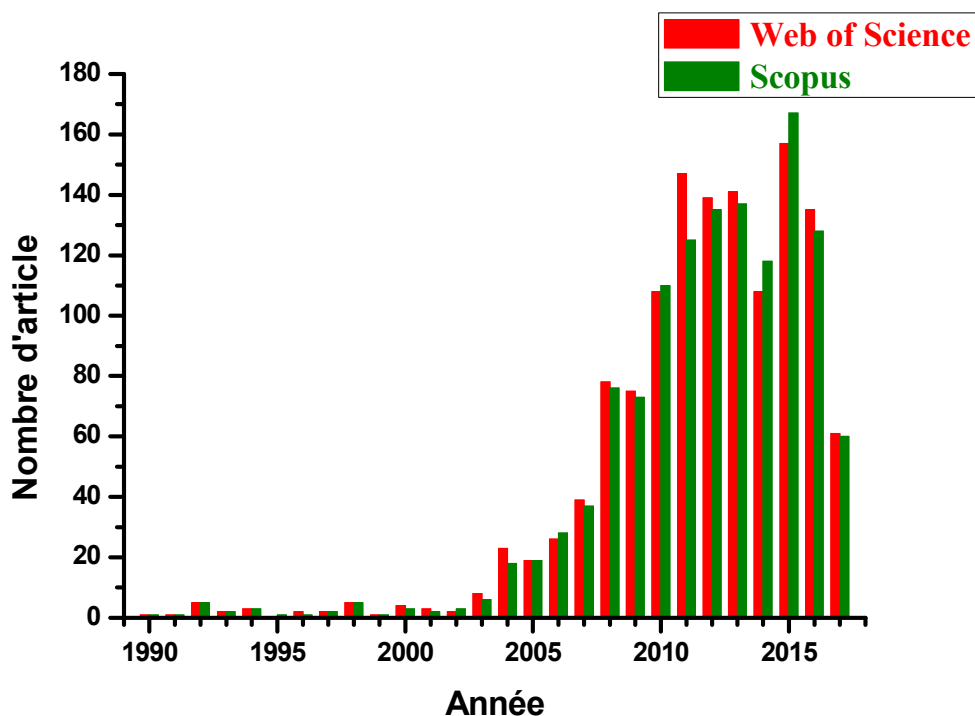


Figure I.2.6 : Résultats de la recherche dans Web of Science et Scopus

La figure montre que le nombre d'articles scientifiques utilisant la chromatographie d'interaction hydrophile a augmenté considérablement à partir de 2008 indiquant que la technique a eu un grand succès dans le domaine de la chromatographie en phase liquide.

I.2.6. CONCLUSION :

Le caractère hydrophile de la citocoline caractérisée par un logP négatif et les avantages de la chromatographie d'interaction hydrophile font de cette technique une méthode de choix pour l'analyse et la séparation de cette molécule.

I.2.7. RÉFÉRENCES :

- [1] G. Caron, G. Ermondi, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 3269.
- [2] A. Toulmin, J.M. Wood, P.W. Kenny, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 3720.

- [3] R. Mannhold, *Molecular Drug Properties : Measurement and Prediction*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008, the Federal Republic of Germany.
- [4] M. Reinhard, A. Drrefahl, *Handbook for Estimating Physicochemical Properties of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, Inc., 1999, USA.
- [5] W. M. Haynes, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, Taylor & Francis Group, 2014, USA.
- [6] M.H. Abraham, H.S. Chadha, G.S. Whiting, R.C. Mitchell, *J. Pharm. Sci.* 83 (1994) 1085.
- [7] A. Pagliara, M. Reist, S. Geinoz, P.A. Carrupt, B. Testa, *J. Pharm. Pharmacol.* 51 (1999) 1339.
- [8] N. el Tayar, R.S. Tsai, B. Testa, P.A. Carrupt, C. Hansch, A. Leo, *J. Pharm. Sci.* 80 (1991) 744.
- [9] V. Pliška, B. Testa, H. van de Waterbeemd, *Lipophilicity in Drug Action and Toxicology*, VCH Publishers, Inc., 1996, Federal Republic of Germany.
- [10] Ligne Directrice de l'OCDE pour les Essais de Produits Chimiques, *123 : Coefficient de Partage (1-Octanol/Eau) : Méthode du Brassage Lent*, adoptée 23 mars 2006, http://www.oecd-ilibrary.org/fr/environment/essai-n-123-coefficient-de-partage-1-octanol-eau-methode-du-brassage-lent_9789264015869-fr;jsessionid=tx2mumfw1xte.x-oecd-live-02, consulté le 20/12/2016.
- [11] Ligne Directrice de l'OCDE pour les Essais de Produits Chimiques, *107 : Coefficient de Partage (n-Octanol/Eau) : Méthode par Agitation en Flacon*, adoptée 27.07.95, http://www.oecd-ilibrary.org/fr/environment/essai-n-107-coefficient-de-partage-n-octanol-eau-methode-par-agitation-en-flacon_9789264069633-fr;jsessionid=tx2mumfw1xte.x-oecd-live-02, consulté le 20/12/2016.
- [12] B.T. Bowman, W.W. Sans, *J. Environ. Sci. Health B* 18 (1983) 667.
- [13] Ligne Directrice de l'OCDE pour les Essais de Produits Chimiques, *117 : Coefficient de Partage (n-Octanol/Eau), Méthode HPLC (Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance)*, adoptée 13 avril 2004, http://www.oecd-ilibrary.org/fr/environment/essai-n-117-coefficient-de-partage-n-octanol-eau-methode-hplc_9789264069831-fr;jsessionid=tx2mumfw1xte.x-oecd-live-02, consulté le 20/12/2016.
- [14] B. Bard, P-A. Carrupt, S. Martel, *J. Chromatogr. A* 1260 (2012) 164.

- [15] S.Y. Han, J.Q. Qiao, Y.Y. Zhang, L.L. Yang, H.Z. Lian, X. Ge, H.Y. Chen, *Chemosphere* 83 (2011) 131.
- [16] S. Griffin, S.G. Wyllie, J. Markham, *J. Chromatogr. A* 864 (1999) 221.
- [17] J. Sangster, *J. Phys. Chem. Ref. Data* 18 (1989) 1111.
- [18] W.J. Huang, N. Blinov, A. Kovalenko, *J. Phys. Chem. B* 119 (2015) 5588.
- [19] T. Pieńko, M. Grudzień, P.P. Taciak, A.P. Mazurek, *J. Mol. Graph. Model.* 63 (2016) 15.
- [20] N. Goudarzi, M. Goodarzi, *J. Braz. Chem. Soc.* 21 (2010) 1776.
- [21] J. Sangster, *Octanol-Water Partition Coefficients : Fundamentals and Physical Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, 1997, England.
- [22] Y. Kazakevich, R. Lobrutto, *HPLC for Pharmaceutical Scientists*, John Wiley & Sons Inc., 2007, USA.
- [23] R.L. Wixom, C.W. Gehrke, *Chromatography : A Science of Discovery*, John Wiley & Sons Inc., 2010, USA.
- [24] T.A. Berger, *J. Chromatogr. A* 785 (1997) 3.
- [25] P. S. Mukherjee, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 464.
- [26] P.S. Mukherjee, S.E. Cook, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1287.
- [27] C. West, *Chromatography Today*, May/June (2013) 22.
- [28] A.J. Alpert, *J. Chromatogr.* 499 (1990) 177.
- [29] S. Van Dorpe, V. Vergote, A. Pezeshki, C. Burvenich, K. Peremans, B. De Spiegeleer, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 728.
- [30] B.A. Olsen, *J. Chromatogr. A* 913 (2001) 113.
- [31] B.W. Pack, D.S. Risley, *J. Chromatogr. A* 1073 (2005) 269.
- [32] D.V. McCalley, *J. Chromatogr. A* 1193 (2008) 85.
- [33] Z. Guo, A. Lei, Y. Zhang, Q. Xu, X. Xue, F. Zhang, X. Liang, *Chem. Commun.* 24 (2007) 2491.
- [34] C. McClintic, D.M. Remick, J.A. Peterson, D.S. Risley, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 26 (2003) 3093.
- [35] M.S. Ali, M. Ghori, S. Rafiuddin, A.R. Khatri, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 158.
- [36] F. Al-Rimawi, *Saudi Pharm. J.* 18 (2010) 103.

- [37] M. Pelzer, T. Addison, W. Li, X. Jiang, N. Weng, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 25 (2002) 1019.
- [38] Z.S. Wilson, N. Weng, *J. Chromatogr. B* 825 (2005) 186.
- [39] A.J. Alpert, *Anal. Chem.* 80 (2008) 62.
- [40] Y. Hsieh, C.J.G. Duncan, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 573.
- [41] Y. Guo, S. Gaiki, *J. Chromatogr. A* 1074 (2005) 71.
- [42] P. Hemström, K. Irgum, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1784.
- [43] M. de Person, A. Hazotte, C. Elfakir, M. Lafosse, *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 174.
- [44] L. Matysová, L. Havliková, R. Hájková, A. Krivda, P. Solich, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 50 (2009) 23.
- [45] G. Jin, Z. Guo, F. Zhang, X. Xue, Y. Jin, X. Liang, *Talanta* 76 (2008) 522.
- [46] K.J. Fountain, J. Xu, D.M. Diehl, D. Mourrison, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 740.
- [47] F.M. Rabel, A.G. Caputo, E.T. Butts, *J. Chromatogr.* 126 (1976) 731.
- [48] M. Liu, J. Ostovic, E.X. Chen, N. Cauchon, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2362.
- [49] P. Hemström, Y. Nygren, E. Björn, K. Irgum, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 599.
- [50] P. Zuccaro, R. Ricciarello, S. Pichini, R. Pacifici, I. Altieri, M. Pellegrini, G. D'Ascenzo, *J. Anal. Toxicol.* 21 (1997) 268.
- [51] S. Vikingsson, R. Kronstrand, M. Josefsson, *J. Chromatogr. A* 1187 (2008) 46.
- [52] B.A. Olsen, *J. Chromatogr. A* 913 (2001) 113.
- [53] T. Yoshida, *J. Biochem. Biophys. Meth.* 60 (2004) 265.
- [54] A. Berthod, S.S.C. Chang, J.P.S. Kullman, D.W. Armstrong, *Talanta* 47 (1998) 1001.
- [55] U. Lewandrowski, K. Lohrig, R.P. Zahedi, D. Wolters, A. Sickmann, *Clin. Proteomics* 4 (2008) 25.
- [56] S.D. Garbis, A. Melse-Boonstra, C.E. West, R.B. van Breemen, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5358.
- [57] J.H. Beumer, E. Joseph, M.J. Egorin, J.M. Covey, J.L. Eiseman, *J. Chromatogr. B* 831 (2006) 147.
- [58] R. Pisano, M. Breda, S. Grassi, C.A. James, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38 (2005) 738.
- [59] L. Kavalova, C.S. Mc Ardell, J. Hollender, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1100.
- [60] H-L. Koh, A-J. Lan, E.C-Y. Chan, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 1237.

- [61] N.N. Aronson, B.A. Halloran, M.F. Alexyev, L. Amable, J.D. Madura, L. Pasupulati, C. Worth, P. Van Roey, *Biochem. J.* 376 (2003) 87.
- [62] J.K. Troyer, K.K. Stephenson, J.W. Fahey, *J. Chromatogr. A* 919 (2001) 299.
- [63] J.A. Beutler, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 20 (1997) 2415.
- [64] G. Karlsson, S. Winge, H. Sandberg, *J. Chromatogr. A* 1092 (2005) 246.
- [65] J. Zhou, J. Zhao, X. Xue, J. Zhang, F. Chen, Y. Li, L. Wu, C. Li, J. Mi, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 4164.
- [66] Y. Yang, R.I. Boysen, M.T.W. Hearn, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5518.
- [67] A.E. Karatapanis, Y.C. Fiamegos, C.D. Stalikas, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 909.
- [68] N.S. Quiming, N.L. Denola, Y. Saito, A.P. Catabay, K. Jinno, *Chromatographia* 67 (2008) 507.
- [69] A. Tai, E. Gohda, *J. Chromatogr. B* 853 (2007) 214.
- [70] H. Tanaka, X. Zhou, O. Masayoshi, *J. Chromatogr. A* 987 (2003) 119.
- [71] D.W. Armstrong, H.L. Jin, *J. Chromatogr.* 462 (1989) 219.
- [72] C.T. Mant, R.S. Hodges, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1573.
- [73] M. Liu, E.X. Chen, R. Ji, D. Semin, *J. Chromatogr. A* 1188 (2008) 255.
- [74] J. Lin, J. Lin, X. Lin, Z. Xie, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 801.
- [75] T. Kimura, K. Nakagawa, Y. Saito, K. Yamagishi, M. Suzuki, K. Yamaki, H. Shinmoto, T. Miyazawa, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 1415.
- [76] P. Jenö, P.E. Scherer, U. Manningkrieg, M. Horst, *Anal. Biochem.* 215 (1993) 292.
- [77] M.J. Farré, S. Brosillon, X. Domènech, J. Peral, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 189 (2007) 364.
- [78] T. Sano, H. Takagi, K. Nagano, M. Nishikawa, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4344.
- [79] R. Li, Y. Zhang, C.C. Lee, R. Lu, Y. Huang, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1799.
- [80] B. Zywicki, G. Catchpole, J. Draper, O. Fiehn, *Anal. Biochem.* 336 (2005) 178.
- [81] L. Chen, H. Chen, M. Chen, Z. Zhou, A. Ma, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 3736.
- [82] N. Lindegårdh, T. Singtoroj, A. Annerberg, N.J. White, N.P.J. Day, *Therap. Drug Monit.* 27 (2005) 503.
- [83] T.F. Lane, M.L. Iruela-Arispe, R.S. Johnson, E.H. Sage, *J. Cell. Biol.* 125 (1994) 929.
- [84] J. Hmelnickis, O. Pugovičs, H. Kažoka, A. Viksna, I. Susinskis, K. Kokums, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 649.

A large, stylized number '13' is rendered in a dark, textured, hand-drawn style. The number '1' is a simple vertical bar, while the '3' is more complex, with a curved top and a loop. The text is centered within and around the number.

IMPURETÉS
DANS
LES PRODUITS
PHARMACEUTIQUES

I.3. IMPURETÉS DANS LES PRODUITS PHARMACEUTIQUES

I.3.1. INTRODUCTION :

Depuis des millénaires, les plantes sont utilisées comme médicaments. À titre d'exemple, les égyptiens antiques utilisaient l'écorce de saule, à l'origine de l'aspirine, pour soulager fièvre et douleurs. L'isolement des premiers principes actifs d'origine végétale dont la morphine et, la synthèse totale de molécules médicamenteuses simples comme l'aspirine datent de la fin du XIX^e siècle. La chimie du XX^e siècle conduisit à la découverte de grandes classes de médicaments : sulfamides, antidépresseurs, neuroleptiques...

Depuis, nous assistons à une diversification des sources des composés à effet thérapeutique de plus en plus importantes (plantes cultivées et sauvages, organismes microbiens ou marins, animaux, synthèse chimique...).

Durant le processus de fabrication, et quelle que soit la méthode choisie (synthèse, extraction, culture cellulaire ou fermentation), de purification ou de stockage, d'autres composés autre que la substance active peuvent apparaître.

I.3.2. DÉFINITION D'UNE IMPURETÉ DANS UN MÉDICAMENT :

L'impureté est toute molécule autre que l'ingrédient pharmaceutique actif (API) qui résiste aux étapes de synthèse, de purification ou de stockage du médicament.

I.3.3. CLASSES DES IMPURETES :

Nous pouvons classer les impuretés en trois catégories :

- Impuretés organiques ou substances apparentées.
- Impuretés inorganiques.
- Les solvants résiduels : aussi connus sous le nom impuretés organiques volatiles (OVIs).

I.3.4. SOURCES DES IMPURETÉS :

I.3.4.1. PROCESSUS DE FABRICATION :

Toutes les substances indésirables qui se forment durant le processus de fabrication de la molécule cible (synthèse, extraction, purification, fermentation, etc...) et ne sont pas éliminées sont considérées comme impuretés.

1. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

3. Impuretés dans les produits pharmaceutiques

I.3.4.2. DÉGRADATION :

Les produits survenant durant le stockage du médicament sont considérés comme des impuretés.

I.3.4.3. INTERACTION CONTENANT-CONTENU :

La possibilité d'une réaction des composés du médicament avec l'article de conditionnement primaire, les tuyaux ou les cuves de fabrication et de stockage ne peut pas être exclue.

I.3.4.4. CONTAMINANTS :

Les contaminants sont des composés inattendus falsifiant l'ingrédient pharmaceutique actif, par exemple : l'opérateur (corps, vêtements, souffle, cheveux...). Cela nécessite des bonnes pratiques de fabrication. D'autres contaminants pourraient être, des pulvérisants pour améliorer l'environnement dans l'usine de fabrication ou des déjections accidentelles de peinture provenant des murs. Des désinfectants peuvent être présents [1,2].

I.3.5. POURQUOI RECHERCHER LES IMPURETÉS ? :

Théoriquement, toutes les impuretés doivent être éliminées. Pratiquement c'est irréalisable parce l'opération serait difficile et nécessiterait beaucoup de frais. Par contre, nous pouvons les quantifier.

La toxicité des impuretés peut être dangereuse. Les effets secondaires pourraient être remarqués immédiatement ou sur une période d'utilisation prolongée du médicament.

L'importance donnée à la recherche des impuretés des produits pharmaceutiques est liée à des considérations de sécurité. Il existe plusieurs exemples où ces composés ont été la cause d'effets secondaires importants :

- Un produit de dégradation de la tétracycline, l'épitétracycline anhydre, provoque le syndrome de Fanconi conduisant à une insuffisance rénale [3,4].
- Des allergies des produits de polymérisation des aminopénicillines ont été observées [5,6].
- La présence de sulfate de chondroïtine sursulfaté dans les échantillons d'héparine a provoqué des réactions allergiques et plus de 100 décès [7-9].

1. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

3. Impuretés dans les produits pharmaceutiques

- Certaines impuretés présentent des effets génotoxique. Ces molécules peuvent provoquer des mutations génétiques, des ruptures et/ou des réarrangements chromosomiques conduisant à des risques significatifs de cancérogénicité ou d'autres effets toxiques [10].

En 2007, plusieurs lots de viracept (mesylate de néflinavir, un médicament contre le VIH) ont été retirés du marché en raison des taux élevés de mésylate d'éthyle, un agent d'alkylation qui peut se lier de manière covalente à l'ADN et favoriser le risque de cancer [11].

I.3.6. CONTRÔLE DES IMPURETÉS (RÈGLEMENTATION) :

Les conditions réactionnelles tout le long du processus de fabrication de la matière première sont ajustées pour réduire les quantités des sous-produits au cours de chaque étape de la réaction. D'autres options pour réduire ces impuretés sont l'introduction d'étapes supplémentaires de purification intermédiaire ou finale pour répondre aux spécifications du produit, aux bonnes pratiques de fabrication ou à d'autres exigences de qualité.

Pour cela, les autorités officiels tels que l'organisation mondiale de la sante (**WHO** : World Health Organisation), le conseil international d'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain (**ICH** : International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use), l'agence européenne des médicaments (**EMA** : European Medicines Agency), l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (**FDA** : Food and Drug Administration), la pharmacopée européenne (**EP** : European Pharmacopeia), la pharmacopée américaine (**USP** : Unitate State Phamacopeia), la pharmacopée britannique (**BP** : British Pharmacopeia), la pharmacopée japonaise (**JP** : Japanese Pharmacopeia)... ont établi des guides et des normes afin de répondre aux exigences des fabricants, des patients et de l'environnement [12-19].

I.3.7. DÉGRADATION FORCÉE :

I.3.7.1. DÉFINITION :

La dégradation forcée est l'exposition d'échantillons représentatifs d'un principe actif et/ou un médicament aux conditions de stress appropriées de la lumière, de la chaleur, de l'humidité, de l'hydrolyse et de l'oxydation [2].

1. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

3. Impuretés dans les produits pharmaceutiques

I.3.7.2. POURQUOI FAIRE UNE DÉGRADATION FORCÉE ?

Les expériences de la dégradation forcée jouent un rôle important dans le processus de développement d'un médicament. Les résultats des études de dégradation forcée facilitent le choix des composants de la formulation du médicament, sa forme galénique, la sélection des conditions de stockage et d'emballage.

Les échantillons dégradés seraient des échantillons de stabilité en temps réel qui contiennent tous les produits de dégradation et non pas seulement ceux obtenus dans des conditions normales de stockage. Il n'est pas réaliste d'attendre toute la durée nécessaire d'une stabilité en temps réel (2 ans ou plus) pour la mise du médicament sur le marché.

Les travaux de Yang [20] et ses collaborateurs ont montré qu'une exposition du principe actif à des conditions de température et d'humidité relativement élevées pour une durée de 5 à 12 semaines est équivalente à des conditions de stockage à température ambiante pendant 24 mois.

La chimie pharmaceutique utilise les résultats des études de dégradation forcée qui en plus du gain du temps, présentent des avantages dans les études pharmacocinétiques, environnementales, analytiques et toxicologiques [21-23].

Plusieurs études sont à l'origine des réglementations et méthodes établies pour spécifier les différentes conditions de dégradation forcée publiées par l'ICH (Q1A(R2) : Stability Testing of New Drug Substances and Product ; Q1B : Stability Testing : Photostability Testing of New Drug Substances and Product ; Q1E : Evaluation of Stability Data ; Q3A(R2) : Impurities in New Drug Substances ; Q3B(R2) : Impurities in New Drug Products ; Q5C : Stability Testing of Biotechnological/Biological Products ; Q6A : Specification : New Chemical Drug Substances and Products), la FDA (Guidance for Industries), l'EMA (Note for Guidance on In-Use Stability Testing of Human Medicinal Products, Guideline on the Chemistry of New Active Substances) et l'USP (1086 : Impurities in Official Articles, 1150 : Pharmaceutical stability, 1191 : Stability Consideration in Dispensing Practice) [24-26].

1. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

3. Impuretés dans les produits pharmaceutiques

I.3.7.3. MÉTHODE D'IDENTIFICATION ET DE QUANTIFICATION DES PRODUITS DE DÉGRADATION (DPs) :

L'approche conventionnelle d'identification et d'élucidation de la structure des DPs inconnus implique principalement la séparation. Les DPs sont d'abord séparés par HPLC, UHPLC, CCM, HPTLC, GC, CE, SFC, CEC ou toute autre technique de séparation pertinente. Les composés sont généralement détectés par spectrophotométrie UV-Vis. D'autres détecteurs sont utilisés comme la fluorescence, ELSD (ELSD : Evaporative Light Scattering Detector, le Détecteur Évaporateur à Diffusion de Lumière DEDL), CAD ou Corona (CAD : Charged Aerosol Detector, détecteur d'aérosols chargés,), NCD (NCD : Nitrogen Chemiluminescence Detector, détecteur à chimiluminescence d'azote,). Lors du développement d'une méthode de séparation des DPs, il est habituel d'utiliser un détecteur UV/PDA (PDA : Photo Diode Array, détecteurs à barrette de diodes DAD) qui fournit en plus une indication sur la pureté de chaque pic.

I.3.7.3.1. HPLC/PDA :

Les méthodes chromatographiques sont les techniques les plus utilisées dans les études de dégradation. L'instabilité thermique des molécules biologiquement actives et la présence dans leur structure de groupements chromophores font de l'HPLC la technique de choix. Les différents modes de la chromatographie en phase liquide par leur puissance ont pris l'avantage pour répondre aux exigences posées. L'UV-Vis est le détecteur le plus utilisé dans ce domaine puisque la plupart des principes actifs ont un groupement chromophore. L'introduction de détecteurs à barrette de diodes, l'évolution parallèle des technologies informatiques associées et les logiciels d'exploitation des données ont permis d'étendre le champ du domaine de l'analyse chimique.

Ces instruments ont l'avantage de donner des informations sur le pic dans un intervalle de longueur d'onde à un moment donné : le spectre d'absorption. Les composés sont identifiés à partir de leur temps de rétention ou temps de rétention relatif. Ainsi, un léger écart dans le temps de rétention peut rendre leur identification difficiles. Dans un tel cas, le PDA peut être utilisé pour identifier les constituants par comparaison de leurs spectres d'absorption.

La coélution de deux ou plusieurs molécules est le problème majeur de l'interprétation des résultats chromatographiques.

1. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

3. Impuretés dans les produits pharmaceutiques

Le spectre UV obtenu est un spectre total qui ne différencie pas entre les molécules coéluées. Dans ce cas-là, l'identification spectrale est insuffisante et elle nécessite une autre étape : la vérification de la pureté des pics obtenus (*Peak purity*). Ceci peut être réalisé en comparant le spectre UV à différentes positions du pic et/ou établir des spectres dérivés du spectre d'absorption [21-25,27-29].

I.3.7.3.2. LC-MS :

L'utilisation d'un détecteur UV-Vis à barrette de diodes permet de confirmer la présence des impuretés et produits de dégradation si ces substances ont des chromophores. Dans le cas contraire où les molécules sont transparentes dans cette zone du spectre électromagnétique, l'utilisation d'autres détecteurs qui ont la propriété d'être universels comme l'indice de réfraction ou l'ELSD est limitée par leur faible sensibilité. En plus, si la structure est inconnue, ces appareils n'ont pas la propriété d'élucidation de la structure. Pour cela, un détecteur possédant une grande sensibilité et la propriété de donner des informations structurales est recommandé.

Les couplages de la chromatographie avec la spectrométrie de masse ont permis de résoudre des problèmes analytiques complexes. La spectrométrie de masse peut en plus des informations données par les techniques chromatographiques, renseigner sur la masse moléculaire et la structure des substances, et de part la sensibilité de ce détecteur résoudre beaucoup de problèmes dans le domaine quantitatif. De ce fait, les méthodes de couplage sont indispensables pour l'identification des produits de dégradation [21-25,28,30-32].

I.3.7.3.2.1. Principe de la technique :

L'utilisation de cette technique remonte au début du XX^e siècle. En 1886, Goldstein découvre les ions positifs. Les travaux de J.J Thomson en 1912 aboutissent aux premiers spectres de masse de gaz (N₂, O₂, CO...), suivis de la mise en évidence d'ions négatifs et d'ions avec plusieurs charges.

Un spectromètre de masse permet de caractériser des analytes par la mesure des rapports masse sur charge (m/z) des molécules ionisées et de leurs fragments.

Un spectromètre de masse contient obligatoirement les trois parties :

- Une source.

1. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

3. Impuretés dans les produits pharmaceutiques

- Un ou plusieurs analyseurs.
- Un détecteur.

L'ionisation est réalisée au niveau de la source, la séparation au niveau de l'analyseur et enfin les différents ions seront détectés.

I.3.7.3.2.2. Source d'ionisation :

L'échantillon peut être introduit directement dans la source, sous forme liquide (infusion directe) ou solide (canne d'introduction directe, dépôt sur plaque ...) ou encore par l'association avec une méthode séparative (chromatographie ou électrophorèse capillaire).

Le rôle de la source est de vaporiser les molécules et de les ioniser. Il en existe plusieurs, elles sont classées en sources dures et en sources douces. Le choix se fait en fonction du résultat recherché et des molécules analysées. Les principales sources d'ionisation sont les suivantes :

- L'ionisation électronique (EI).
- L'ionisation chimique (CI).
- Le bombardement par atomes rapides (FAB), par atomes métastables (MAB) ou par ions (SIMS, LSIMS).
- Plasma à couplage inductif (ICP).
- L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI).
- La photo-ionisation à pression atmosphérique (APPI).
- L'électronébulisation ou électrospray (ESI).
- L'ionisation-désorption laser assistée par matrice (MALDI), activée par une surface (SELDI) ou sur silicium (DIOS).

I.3.7.3.2.3. Analyseur :

Il permet de séparer les ions en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Il existe des analyseurs à basse résolution : le quadripôle (Q), le piège à ions 3D (IT) ou linéaire (LIT), et des analyseurs à haute résolution qui permettent de mesurer la masse exacte des analytes : le secteur magnétique couplé à un secteur électrique (M), le temps de vol (TOF), la résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FTICR) et l'Orbitrap.

Les principales caractéristiques d'un analyseur sont :

- La précision en masse : Elle exprime la justesse des rapports m/z mesurés.

1. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

3. Impuretés dans les produits pharmaceutiques

- La résolution : Elle est définie par $m/\Delta m$, avec m la masse de la molécule et Δm la largeur du pic à mi-hauteur.
- La vitesse d'analyse ou vitesse de balayage dans le cas du quadripôle : Elle correspond au domaine de masse mesuré par unité de temps.
- La limite en masse : Ce sont les valeurs minimale et maximale des rapports m/z qui peuvent être analysés.

Les analyseurs fonctionnent sous vide poussé pour permettre aux ions formés d'arriver au détecteur.

I.3.7.3.2.4. Détecteur et système de traitement :

Le détecteur transforme les ions en signal électrique. Plus les ions sont nombreux, plus le courant est important. De plus, il amplifie le signal obtenu pour qu'il puisse être traité informatiquement. Les principaux détecteurs sont :

- Les multiplicateur d'électrons.
- Les détecteurs à microcanaux.
- Les multiplicateur de photons.

I.3.7.3.2.5. Résultat :

Le résultat obtenu est un spectre de masse, l'intensité du signal ou l'abondance en ordonné et le rapport masse sur charge en abscisse. Les ions observés par spectrométrie de masse dépendent de la source utilisée.

Selon le potentiel d'ionisation, nous pouvons classer les ions formés en :

- Ions stables : Qui ne se décomposent pas et forment l'ion moléculaire.
- Ions instables : Qui se décomposent rapidement pour donner des fragments.
- Ions métastables : Ils ne se décomposent pas dans la source mais peuvent l'être en chemin vers le détecteur [33-35].

I.3.7.3.3. LC-ESI/TOF :

Nous avons vu dans le chapitre des méthodes de séparation des molécules hydrophiles que la technique de choix est une méthode chromatographique en phase liquide (HILIC). À partir de ça, nous devons choisir un système de couplage compatible.

1. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

3. Impuretés dans les produits pharmaceutiques

Nous donnons dans le tableau suivant les différentes compatibilités entre les différentes parties d'un couplage LC/MS.

Tableau I.3.1 : Compatibilité entre la source d'ionisation, l'analyseur, l'HPLC et la polarité du composé

Polarité de la molécule	Source d'ionisation	Limite du débit	Limite de masse	Analyseur
Elevée	ESI	30 nl/min – 1 ml/min	≤ 200 kDa	Q, M, TOF
Moyenne	APCI, APPI	0.2 - 2 ml/min	≤ 1 kDa	Q, M
	FAB	1 - 10 μ l/min	≤ 10 kDa	Q, M

D'après le tableau précédent, la source d'ionisation préconisée pour les composés polaires est l'ESI. Les analyseurs compatibles sont le quadripôle, le secteur magnétique et le TOF.

Nous donnons dans le tableau suivant quelques caractéristiques des analyseurs compatibles avec la source d'ionisation ESI.

Tableau I.3.2 : Quelques caractéristiques des analyseurs quadripôle (Q), secteur magnétique (M) et le temps de vol (TOF)

Analyseur	Résolution de l'analyseur	Précision de la masse	Sensibilité	Vitesse d'analyse	Limite de masse
Q	Faible-moyenne	Faible	Elevée	Moyenne	Faible
M	Très élevée	Très élevée	Elevée	Faible	Moyenne
TOF	Elevée	Elevée	Elevée	Elevée	Elevée

Pour mener à bien l'identification des produits de dégradation, nous avons utilisé un couplage LC/MS avec une source ESI et un analyseur TOF [35-39].

I.3.7.3.3.1. Ionisation par électro-nébulisation (ESI) :

Yamashita et Fenn en 1984 ont décrit le couplage entre une source ESI et un spectromètre de masse. En 2002, Fenn obtient le prix Nobel de chimie sur le développement des méthodes d'ionisation douces pour les macromolécules biologiques.

1. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

3. Impuretés dans les produits pharmaceutiques

L'ionisation par électro-nébulisation ou l'électrospray est une technique d'ionisation à pression atmosphérique. L'ESI est conseillée pour l'analyse des molécules polaires. Elle est principalement composée de la sonde ESI et de l'interface API (Atmospheric Pressure Ionisation).

La formation des ions désolvatés se produit en 3 étapes :

1. Production de gouttelettes chargées grâce à l'application d'un potentiel électrique de l'ordre de quelques milliers de volts.
2. Formation de gouttelettes filles qui possèdent une densité de charge supérieure à celle de la gouttelette mère.
3. Emission d'ions désolvatés en phase gazeuse. Le processus de formation des ions en phase gazeuse n'est pas encore élucidé, plusieurs théories existent.

Les ions ainsi formés sont transférés vers l'analyseur par l'intermédiaire de l'interface API.

Cette technique d'ionisation douce ne donne pas de spectre de masse très fragmenté. Si la structure de la molécule est inconnue, nous provoquons la fragmentation en augmentant le potentiel de la source.

L'ESI présente des avantages et des inconvénients :

- Analytes introduits en solution, ce qui favorise le couplage avec la chromatographie liquide ou l'électrophorèse capillaire.
- Une source d'ionisation recommandée pour les composés polaires et ioniques.
- Ionisation très douce, ce qui permet de conserver des molécules intactes.
- Bonne sensibilité.
- Possibilité de former des ions multichargés, ce qui permet l'analyse de molécules de très haute masse moléculaire.
- Le principal inconvénient d'une source ESI est lié à la présence d'autres composés et plus particulièrement de sels [33-51].

I.3.7.3.3.2. Temps de vol :

Un analyseur à temps de vol est également appelé «*Time-Of-Flight*» ou «*TOF*». Stephens présenta le concept dans les proceedings de la société américaine de physique et le premier instrument commercialisé a été fabriqué par la société Bendix en 1958.

1. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

3. Impuretés dans les produits pharmaceutiques

Son principe est simple, il repose sur les différences de vitesse de vol des ions dans un tube. Au départ tous les ions reçoivent la même quantité d'énergie cinétique par l'application d'une différence de potentiel qui les pousse vers le détecteur sans l'application d'un champ électrique ni magnétique sur le parcours. Hors les ions n'ont pas les mêmes rapports masse sur charge (m/z), ce qui entraîne une différence d'accélération et une différence de temps d'arrivée au détecteur. Le temps de vol des ions permet de mesurer le rapport m/z de chacun selon l'équation suivante :

$$\frac{m}{z} = \frac{2eV}{L^2} t^2$$

Avec :

m : La masse de l'ion

z : Le nombre de charge

e : La charge élémentaire

V : Le potentiel

L : Distance de vol

t : Temps de vol

Cette équation montre que le rapport masse sur charge est proportionnelle au carré du temps de vol. Plus l'ion est léger, plus le temps nécessaire pour arriver au détecteur est court [33-37].

Pour un parcours linéaire, la résolution de l'appareil dépend de la longueur du tube de vol, plus celui-ci est long, meilleure est la résolution. Hors, le tube ne peut pas être allongé de façon exagérée (1 à 3 mètre en pratique). Deux méthodes pour améliorer les performances [33-35, 52-60] :

- La première est l'extraction retardée (Delayed extraction).
- La deuxième est le réflectron ou le miroir électrostatique.

I.3.7.3.4. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) :

La puissance du couplage LC-MS équipé d'une source d'ionisation douce et d'un analyseur de haute résolution permet de donner la masse moléculaire d'une substance à condition que les paramètres chromatographiques, en particulier la séparation représentée par la résolution entre les différents constituants du mélange, soient optimisés.

1. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

3. Impuretés dans les produits pharmaceutiques

En jouant sur les potentiels d'ionisation nous pouvons revenir à la structure de la molécule en regroupant les différents fragments obtenus.

La structure proposée à partir de la spectrométrie de masse n'est pas toujours précise surtout dans le cas des isomères et des stéréo-isomères où la distinction est impossible. Pour cela, la structure doit être vérifiée par une autre technique comme la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Le point fort de cette technique est d'apporter des informations précises et individuelles sur un grand nombre de noyaux et de donner leurs environnements qui peut servir à identifier les liaisons entre les groupements, sans besoin d'avoir un étalon du composé inconnu [28,29,61,62].

1.3.7.3.4.1. Principe de la technique :

Les travaux du physicien I. Rabi sur le moment magnétique du noyau (prix Nobel de physique en 1944) sont à l'origine de la RMN. Richard Ernst a obtenu le prix Nobel de chimie en 1991 pour la mise au point de la spectroscopie RMN impulsionnelle. Dans le domaine de la biochimie, le prix Nobel 2002 a été attribué à K. Wüthrich pour ses travaux concernant la structure tridimensionnelle des macromolécules.

La RMN est une technique qui met en jeu l'interaction de radiations électromagnétiques avec un ensemble de noyaux placés dans un champ magnétique (B_0) intense et uniforme.

En l'absence de champ magnétique externe, les moments de spin des noyaux d'un échantillon sont distribués uniformément (ils pointent dans n'importe quelle direction). Le moment magnétique total d'un échantillon est donc nul. En présence du champ, le spin tourne autour de l'axe de B_0 à une vitesse angulaire ω_0 . Ils prennent par rapport à celui-ci certaines orientations bien définies auxquelles correspondent des niveaux d'énergie distincts. Une résonance nucléaire est la transition entre ces états, par absorption ou émission d'énergie.

Les noyaux qui peuvent résonner sont ceux dont le moment de spin est non nul, c'est-à-dire ($I \neq 0$) comme ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P ...etc.

Un spectromètre RMN est composé entre autre d'un aimant et une source de radiofréquence. Les résultats obtenus sont un spectre se présentant sous forme d'un ensemble de pics dont un est un signal caractérisant un noyau.

1. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

3. Impuretés dans les produits pharmaceutiques

La différence dans les champs crée par les environnements sur le même type de noyau conduit à des fréquences de résonance différente.

La position d'un signal dans un spectre RMN est décrite par sa distance d'un autre signal de résonance arbitrairement pris comme référence. Cette distance est appelée déplacement chimique (δ) et est exprimée en parties par million (ppm). Elle caractérise le type de noyau en fonction de son environnement nucléaire et électronique dans la molécule. Le couplage entre deux noyaux peut être décrit en termes de constante de couplage spin-spin (J en hertz) qui est la séparation entre les pics individuels du multiplet. Lorsque deux noyaux interagissent et provoquent un fractionnement réciproque, les constantes de couplage mesurées dans les deux multiplets résultantes sont égales. De plus, J est indépendant de la force du champ magnétique.

I.3.7.3.4.2. RMN ^1H et ^{13}C :

Nous avons utilisé, pour mener à bien notre travail, la RMN du proton (^1H) qui donne des informations sur la répartition des atomes d'hydrogène dans la molécule et la RMN du carbone (^{13}C) qui nous informe sur l'enchaînement de la chaîne carbonée et l'état d'hybridation des atomes de carbones.

Avec les nouveaux développements de la RMN du ^{13}C et en particulier la RMN multi-impulsionnelle, il est possible d'obtenir des spectres qui permettent de différencier les quatre types de carbones : quaternaire ($>\text{C}<$), tertiaire ($>\text{CH}-$), secondaire ($>\text{CH}_2$) et primaire ($-\text{CH}_3$). Nous citons le mode DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) et APT (Attached Proton Test) [63-66].

I.3.8. RÉFÉRENCES :

- [1] R.J. Smith, M.L. Webb, *Analysis of Drug Impurities*, Blackwell Publishing, 2007, UK.
- [2] S. Ahuja, K.M. Alsante, *Handbook of isolation and characterization of impurities in pharmaceuticals*, Academic Press, 2003, USA.
- [3] M.B. Lowe, D. Obst, E. Tapp, *Arch. Pathol.* 81(1966) 362.
- [4] J.M. Gross, *Ann. Intern. Med.* 58 (1963) 523.
- [5] P. Betto, L. Turchetto, L. Longinotti, *Ann. Ist. Super. Sanita* 25 (1989) 315.
- [6] A. Romano, M.J. Torres, J. Fernandez, J.M. Vega, C. Mayorga, J. Garcia, M. Blanca, *Clin. Exp. Allergy* 27 (1997) 1425.

I. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

3. Impuretés dans les produits pharmaceutiques

- [7] A.W. McMahon, R.G. Pratt, T.A. Hammad, S. Kozlowski, E. Zhou, S. Lu, C.G. Kulick, T. Mallick, G.D. Pan, *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* 19 (2010) 921.
- [8] M. Guerrini, D. Beccati, Z. Shriver, A. Naggi, K. Viswanathan, A. Bisio, I. Capila, J.C. Lansing, S. Guglieri, B. Fraser, A. Al-Hakim, N.S. Gunay, Z. Zhang, L. Robinson, L. Buhse, M. Nasr, J. Woodcock, R. Langer, G. Venkataraman, R.J. Linhardt, B. Casu, G. Torri, R. Sasisekharan, *Nat. Biotechnol.* 26 (2008) 669.
- [9] E.K. Chess, S. Bairstow, S. Donovan, K. Havel, P. Hu, R.J. Johnson, S. Lee, J. McKee, R. Miller, E. Moore, M. Nordhaus, J. Ray, C. Szabo, T. Wielgos, *Handb. Exp. Pharmacol.* 207 (2012) 99.
- [10] L. Müller, R.J. Mauthe, C.M. Riley, M.M. Andino, D. De Antonis, C. Beels, J. DeGeorge, A.G.M. De Knaep, D. Ellison, J.A. Fagerland, R. Frank, B. Fritschel, S. Galloway, E. Harpur, C.D.N. Humfrey, A.S. Jacks, N. Jagota, J. Mackinnon, G. Mohan, D.K. Ness, M.R. O'Donovan, M.D. Smith, G. Vudathala, L. Yotti, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 44 (2006) 198.
- [11] W.K. Lutz, *Toxicol. Lett.* 190 (2009) 239.
- [12] WHO, *Guideline on Submission of Documentation for a Multisource (Generic) Finished Pharmaceutical Product : Quality Part*, WHO Technical Report Series No. 986, annexe 6, 317, 2014, <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21470en/s21470en.pdf>, consulté le 12/06/2017.
- [13] ICH, *The Common Technical Document for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use : Quality – M4Q(R1)*, http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/CTD/M4_R1_Quality/M4Q_R1.pdf, consulté le 10/01/17.
- [14] ICH, *Quality Guidelines, (Q1A-Q1F : Stability, Q3A-Q3D : Impurities)*, <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>, consulté le 10/01/17.
- [15] The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Evaluation of Medicines for Human Use, Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP), *Guideline on the Chemistry of New Active Substances*, (CPMP/QWP/130/96, Rev 1), 17 December 2003, London, http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002815.pdf, consulté le 10/01/17.

I. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

3. Impuretés dans les produits pharmaceutiques

- [16] U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), *Guidance for Industry ANDAs : Impurities in Drug Substances*, revision 1, June 2009, USA, <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm172002.pdf>, consulté le 16/07/2017.
- [17] Santé Canada, *Ébauche Ligne Directrice à l'Intention de l'Industrie : Impuretés dans les Substances et Produits Médicamenteux Existants*, référence 05-119427-760, 06/09/2005, https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/migration/hc-sc/dhp-mps/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/prodpharma/impur_exist_dru_med-fra.pdf, consulté le 10/01/17.
- [18] Santé Canada, *Ligne Directrice à l'Intention de l'Industrie : Essais de Stabilité de Substances et Produits Médicamenteux Existants*, référence: 03-111093-252, 10/06/2003, https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/migration/hc-sc/dhp-mps/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/prodpharma/stabt_stabe-fra.pdf, consulté le 10/01/17.
- [19] Australian Government, Department of Health and Ageing, Therapeutic Goods Administration, *Guidance 18 : Impurities in Drug Substances and Drug Products*, V1.0, August 2013, <https://www.tga.gov.au/sites/default/files/pm-argpm-guidance-18.pdf>, consulté le 10/01/2017.
- [20] W-H. Yang, S.B. Roy, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 6 (1980) 591.
- [21] J.T. Carstensen, C.T. Rhodes, *Drug Stability : Principles and Practices*, 3rd Ed., Marcel Dekker, Inc., 2000, USA.
- [22] K. Huynh-Ba, *Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development : Regulations, Methodologies and Best Practices*, Springer, 2009, USA.
- [23] S.W. Baertschi, K.M. Alsante, R.A. Reed, *Pharmaceutical Stress Testing : Predicting Drug Degradation*, 2nd Ed., Informa Healthcare, 2011, UK.
- [24] M. Bakshi, S. Singh, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 6 (2002) 1011.
- [25] S. Ahuja, S. Scypinski, *Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis*, Academic Press, 2001, USA.
- [26] K.M. Alsante, A. Ando, R. Brown, J. Ensing, T.D. Hatajik, W. Kong, Y. Tsuda, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 29.
- [27] K. Pilaniya, H.K. Chandrawanshi, U. Pilaniya, P. Manchandani, P. Jain, N. Singh, *J. Adv. Pharm. Tech. Res.* 1 (2010) 302.

I. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

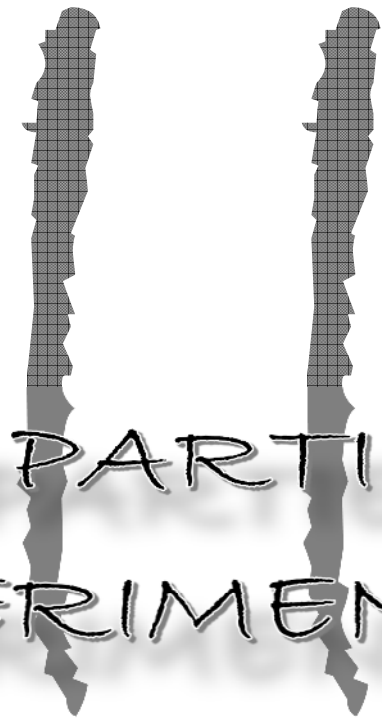
3. Impuretés dans les produits pharmaceutiques

- [28] S. Singh, T. Handa, M. Narayanam, A. Sahu, M. Junwal, R.P. Shah, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 69 (2012) 148.
- [29] S. Zaza, S.M. Lucini, F. Sciascia, V. Ferrone, R. Cifelli, G. Carlucci, M. Locatelli, *Instrum. Sci. Tech.* 43 (2015) 182.
- [30] M.S. Lee, *LC/MS Applications in Drug Development*, John Wiley & Sons, Inc., 2002, USA.
- [31] W.A. Korfmacher, *Mass spectrometry for Drug Discovery and Drug Development*, John Wiley & Sons, Inc., 2013, USA.
- [32] C. Pan, F. Liu, Q. Ji, W. Wang, D. Drinkwater, R. Vivilecchia, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006) 581.
- [33] E. de Hoffmann, V. Stroobant, *Mass spectrometry : Principles and Applications*, 3rd Ed., John Wiley & Sons, Ltd., 2007, England.
- [34] A.I. Mallet, S. Down, *Dictionary of Mass Spectrometry*, John Wiley & Sons, Ltd., 2009, UK.
- [35] R. Ekman, J. Silbering, A. Westman-Brinkmalm, A. Kraj, *Mass Spectrometry : Instrumentation, Interpretation and Application*, John Wiley & Sons, Inc., 2009, USA.
- [36] R.E. Ardrey, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry : An Introduction*, John Wiley & Sons, Ltd., 2003, England.
- [37] A.E. Ashcroft, *Ionization Methods in Organic Mass Spectrometry*, the Royal Society of Chemistry, 1997, UK.
- [38] A.P. Snyder, *Biochemical and Biotechnological Applications of Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, the American Chemical Society, 1995, USA.
- [39] M.C. McMaster, *LC/MS : A Practical User's Guide*, John Wiley & Sons, Inc., 2005, USA.
- [40] M. Yamashita, J.B. Fenn, *J. Phys. Chem.* 88 (1984) 4451.
- [41] M. Yamashita, J.B. Fenn, *J. Phys. Chem.* 88 (1984) 4671.
- [42] M. Mann, *Org. Mass Spectrom.* 25 (1990) 575.
- [43] G.R. Agnes, G. Horlick, *Appl. Spectrosc.* 48 (1994) 649.
- [44] A. Gomez, K. Tang, *Phys. Fluids* 6 (1994) 404.
- [45] J.V. Iribarne, B.A. Thomson, *J. Chem. Phys.* 64 (1976) 2287.
- [46] M. Dole, L.L. Mack, R.L. Hines, R.C. Mobley, L.D. Ferguson, M.B. Alice, *J. Chem. Phys.* 49 (1968) 2240.

I. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

3. Impuretés dans les produits pharmaceutiques

- [47] L.L. Mack, P. Kralik, A. Rheude, M. Dole, *J. Chem. Phys.* 52 (1970) 4977.
- [48] A. El-Aneed, A. Cohen, J. Banoub, *Appl. Spectrosc. Rev.* 44 (2009) 210.
- [49] N.B. Cesh, C.G. Enke, *Mass Spectrom. Rev.* 20 (2001) 362.
- [50] J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse, *Science* 246 (1989) 64.
- [51] T.C. Rohner, N. Lion, H.H. Girault, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6 (2004) 3056.
- [52] J.H. Gross, *Mass Spectrometry : A Textbook*, 2nd Ed. Springer, 2011, Germany.
- [53] G. Siuzdak, *A History of Mass Spectrometry*, Scripps Center for Metabolomics and Mass Spectrometry, https://masspec.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=msHistory#, consulté le 20/02/2017.
- [54] M.J. Guilhaus, *J. Mass Spectrom.* 30 (1995) 1519.
- [55] A. Uphoff, J. Grotemeyer, *Eur. J. Mass Spectrom.* 9 (2003) 151.
- [56] M.L. Vestal, P. Juhasz, S.A. Martin, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 9 (1995) 1044.
- [57] W.C. Wiley, I.H. McLaren, *Rev. Sci. Instrum.* 26 (1955) 1150.
- [58] B.A. Mamyrin, V.I. Karataev, D.V. Schmikk, V.A. Zagulin, *Sov. Phys. -JEPT* 37 (1973) 45.
- [59] E. V. Moskovets, *Appl. Phys. B* 53 (1991) 253.
- [60] I. Ferrer, E.M. Thurman, *Liquid Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry : Principles, Tools, and Applications for Accurate Mass Analysis*, John Wiley & Sons, Inc., 2009, USA.
- [61] S. Görög, *Identification and Determination of Impurities in Drugs*, 1st Ed., Elsevier Science B.V., 2000, the Netherlands.
- [62] R.M. Maggio, N.L. Calvo, S.E. Vignaduzzo, T.S. Kaufman, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 101 (2014) 102.
- [63] United States Pharmacopeial Convention, United States Pharmacopeia and National Formulary, *USP30–NF25, 2007, USA*.
- [64] Conseil de l'Europe, la Direction de la Qualité du Médicament & Soins de Santé, *Pharmacopée Européenne*, 6.0 Ed., 2007, la France.
- [65] T.N. Mitchell, B. Costisella, *NMR – From Spectra to Structures : An Experimental Approach*, 2nd Ed., Springer-Verlag, 2007, Germany.
- [66] N.E. Jacobsen, *NMR Spectroscopy Explained : Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology*, John Wiley & Sons Inc., 2007, USA.



PARTIE
EXPERIMENTALE

II. PARTIE EXPÉRIMENTALE

Appareillages, réactifs et méthodologies

II. APPAREILLAGES, RÉACTIFS ET MÉTHODOLOGIES

II.1. MÉTHODE DE DOSAGE DE ROUTINE :

II.1.1. APPAREILLAGE :

Le système chromatographique est composé d'une pompe quaternaire 600E Controller (Waters, USA), un dégazeur en ligne Supelco Mobile Phase Degassing System (Supelco, USA), un injecteur Rheodyne 7725i (Rheodyne, USA) muni d'une boucle de 20 μ L et un détecteur à barrette de diode PDA996 (Waters, USA). La colonne utilisée est une Atlantis HILIC Silica 4.6 mm X 50 mm, 3 μ m (Waters, USA). Elle a été thermostatée dans un four Waters Temperature Control Module (Waters, USA). Les chromatogrammes sont enregistrés sur un ordinateur en utilisant un logiciel Empower Pro build 2154 (Waters, USA). Les mesures de pH ont été réalisées avec un pH-mètre HANNA pH 211 (HANNA instruments, Italie) et les pesées sur une balance Kern ABS (Kern, Allemagne). Un ultrason Branson (Branson Ultrasonics, USA) a été utilisé pour le dégazage de la phase mobile.

II.1.2. RÉACTIFS :

L'eau ultrapure (18 M Ω .cm) est obtenue d'un système Direct-Q3 (Millipore, USA), l'acide formique (min 98%), le formiate d'ammonium (\geq 99%), l'ammoniaque (32%) de Prolabo (VWR, France). La citicoline sodique (\geq 99.0%), le sorbitol non cristallisable (70.0%), le glycérol (85.0%), l'acide citrique (99.8%), la saccharine sodique (99.9%), le sorbate de potassium (100.3%), le parahydroxybenzote de méthyle (101.0%), le parahydroxybenzote de propyle (100.9%), le citrate de sodium (99.7%) et l'acétonitrile (HPLC grade) de Sigma Aldrich (Sigma Aldrich, USA). Somazina solution buvable (Citicoline 100 mg/mL) a été achetée d'une pharmacie locale.

II.1.3. CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES :

Colonne : Atlantis HILIC Silica 4.6 mm X 50 mm, 3 μ m

Phase mobile : 70/30 V/V acétonitrile/tampon

Débit : 0.5 ml/min

Détection : UV à 270 nm

Température : 30°C

Volume injecté : 20 μ L

II. PARTIE EXPÉRIMENTALE

Appareillages, réactifs et méthodologies

II.1.4. PRÉPARATION DES SOLUTIONS :

II.1.4.1. Solvant de dilution :

Le solvant de dilution est composé d'un mélange d'acétonitrile et d'eau dans les proportions 70/30 V/V respectivement.

II.1.4.2. Phase mobile :

La phase mobile est composée d'un mélange volume à volume de 70% d'acétonitrile et 30% de tampon composé d'une solution à 20 mM d'acide formique ajustée à pH = 3 par l'ammoniaque. La phase mobile a été dégazifiée et filtrée à travers une membrane de 0,45 µm.

II.1.4.3. Validation de la méthode :

II.1.4.3.1. Spécificité :

La solution du placebo est composée de tous les excipients dans les quantités suivantes : sorbitol non cristallisable 20 g, glycérol 5 g, acide citrique 0.1 g, saccharine sodique 0.02 g, sorbate de potassium 0.14 g, parahydroxybenzote de méthyle 0.16 g, parahydroxybenzote de propyle 0.04 g, citrate de sodium 0.6 g. Ces constituants sont dissouts dans l'eau purifiée dont le volume total est de 100 ml. La solution de la citicoline est préparée dans le solvant de dilution.

II.1.4.3.2. Linéarité de la matière première :

100 ml de chaque solution (100, 150, 200, 250 et 300 µg/ml) ont été préparés dans le solvant de dilution en dissolvant la quantité nécessaire de la citicoline.

II.1.4.3.3. Linéarité de la formulation :

Cinq formulations de 10 ml ont été préparées en ajoutant la quantité nécessaire du principe actif au placebo pour avoir les concentrations de 50, 75, 100, 125 et 150 mg/ml.

2.5 ml de chaque solution sont prélevés et dilués à 25 ml suivi d'une autre dilution de 2 ml dans 100 ml par le même solvant. Les concentrations de ces dernières solutions sont dans la gamme 100-300 µg/ml.

II.1.4.3.4. Fidélité :

Trois solutions ont été préparées par deux manipulateurs en deux jours successifs, la concentration finale en citicoline 200 µg/ml est obtenue par une dilution de 10 fois du médicament (2.5 ml dans 25 ml) suivie par une autre dilution de 50 fois (2 ml dans 100 ml).

II.1.4.3.5. Dosage du produit fini :

La solution étalon est préparée en dissolvant 20 mg de citicoline dans 100 ml de diluant. La solution essai est préparée selon la méthode décrite dans la fidélité.

II. PARTIE EXPÉRIMENTALE

Appareillages, réactifs et méthodologies

II.2. DÉGRADATION FORCÉE :

II.2.1. APPAREILLAGE :

En plus de l'appareillage cité dans II.1.1, on rajoute une étuve UM100, un bain marie WB Waterbath (Mettler, Allemagne) et une lampe mercure à haute pression 50W, 2000 lm (OSRAM, Allemagne).

II.2.2. RÉACTIFS :

En plus des réactifs utilisés dans la partie II.1.2 on rajoute NaOH ($\geq 98\%$), HCl (37%) et l'eau oxygénée 30% (Sigma Aldrich, USA).

II.2.3. DÉGRADATION DE LA CITICOLINE :

II.2.3.1. Hydrolyse neutre :

Une solution de citicoline à 1 mg/ml est préparée dans l'eau et chauffée à 60°C.

II.2.3.2. Hydrolyse acide :

La dégradation acide est réalisée en mélangeant 1 ml d'une solution de citicoline à 2 mg/ml avec 1 ml d'une solution d'acide chlorhydrique 0.1 M. Le mélange est chauffé à 60°C.

II.2.3.3. Hydrolyse basique :

La dégradation basique est réalisée en mélangeant 1 ml d'une solution de citicoline à 2 mg/ml avec 1 ml d'une solution de soude 0.1 M. Le mélange est chauffé à 60°C.

II.2.3.4. Dégradation oxydative :

La dégradation oxydative est réalisée en mélangeant 1 ml d'une solution de citicoline à 2 mg/ml avec 1 ml d'une solution de l'eau oxygénée 3% et 30%. Le mélange est chauffé à 60°C.

II.2.3.5. Photodégradation :

La photolyse est réalisée en exposant une solution de citicoline à 1 mg/ml aux radiations UV à 25°C.

II.2.3.6. Dégradation thermique :

La poudre est chauffée à 80°C.

II.2.4. CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES :

Les solutions de dégradation ont été analysées par la même technique de dosage de routine. Pour la dégradation oxydative, une longueur d'onde de 300 nm est utilisée.

II.3. IDENTIFICATION DES PRODUITS DE DÉGRADATION :

II.3.1. LC-MS :

II.3.1.1. Appareillage :

II. PARTIE EXPÉRIMENTALE

Appareillages, réactifs et méthodologies

Un chromatographe Ultimate 3000 (Dionex, USA) couplé à un analyseur MicroTof Q II (Brüker Daltonics, Germany).

II.3.1.2. Réactifs :

Les mêmes produits chimiques que ceux cités en II.1.2.

II.3.1.3. Conditions chromatographiques :

Les solutions de dégradation ont été filtrées, diluées 50 fois et analysées dans les mêmes conditions chromatographiques avec un détecteur spectromètre de masse :

Source d'ionisation :

Type de source : ESI

Paramètres de la source :

Polarité : Positive

Voltage du capillaire : 4000 V

Gaz nébuliseur : Azote

Pression du gaz : $4.7 \cdot 10^5$ Pa

Gaz de séchage : Azote

Température du gaz de séchage : 300 °C

Débit : 12.0 L/min

Analyseur :

Type d'analyseur : Temps de vol (TOF)

Cellule de collision : RF 150.0 Vpp

Gamme de m/z : de 50 à 800 Da

II.3.2. HPLC SEMI-PRÉPARATIVE :

II.3.2.1. Appareillage :

Le même système chromatographique est utilisé sauf que la colonne est une μ Bondapak C18 7.8 X 300 mm, 10 μ m (Waters, USA).

II.3.2.2. Réactifs :

L'eau ultrapure (18 M Ω .cm) est obtenue d'un système Direct-Q3 (Millipore, USA) et le méthanol (HPLC grade) de Sigma Aldrich (USA).

II.3.2.3. Conditions chromatographiques :

Colonne : μ Bondapak C18 7.8 X 300 mm, 10 μ m

Phase mobile : 90/10 V/V méthanol/eau

II. PARTIE EXPÉRIMENTALE

Appareillages, réactifs et méthodologies

Débit : 1 ml/min

Détection : 300 nm

Température : 30°C

Volume injecté : 500 µL

II.3.2.4. Récupération des produits de dégradation :

Après plusieurs récupérations, la solution obtenue a été évaporée sous azote assisté par un léger chauffage à 50°C.

II.3.3. VALIDATION DE LA MÉTHODE (CITICOLINE EN PRÉSENCE DE SES PRODUITS DE DÉGRADATION) :

Les conditions chromatographique sont les mêmes que celles utilisées dans la méthode de dosage de routine.

II.3.3.1. Spécificité :

Un mélange composé des solutions de la citicoline et de ses produits de dégradation est préparé dans le solvant de dilution.

II.3.3.2. Linéarité :

10 ml de solution de chaque composé à 10 µg/ml ont été préparés à partir des solutions mères à 500 µg/ml et utilisés pour préparer la gamme d'étalonnage (10 ml) entre 1 et 4 µg/ml.

II.3.3.3. Fidélité :

Deux manipulateurs, dans deux jours successifs et chacun dans un jour, préparent 10 ml de solution de référence comme indiquée dans la linéarité.

II.3.4. RMN :

II.3.4.1. Appareillage :

Un spectromètre Bruker 800 MHz (Bruker, France).

II.3.4.2. Réactifs :

Le TMS (99.9%) et l'eau deutérée (99.8%) sont obtenus de Sigma Aldrich (USA).

II.3.4.3. Préparation des solutions :

Les solutions de la citicoline et de ses produits de dégradation ont été préparées dans l'eau deutérée avec une concentration de 1 mg/ml.



RÉSULTATS
ET
DISCUSSION



IDENTIFICATION DES
PRODUITS DE
DÉGRADATION

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Identification des produits de dégradation

III.1. IDENTIFICATION DES PRODUITS DE DÉGRADATION :

Les études de stabilité constituent un élément clé lors du développement et de l'approbation de nouvelles substances pharmaceutiques. Dans cette étude, les influences de la température, de la lumière, du pH et des agents oxydants sur la substance active (étude de dégradation forcée) sont étudiées.

Ces tests permettent de recueillir les premières informations sur le profil de stabilité de la substance active. Les résultats de chaque stress sont analysés par une technique séparative. L'identification de chaque produit de dégradation nécessite l'utilisation de techniques performantes. Les résultats obtenus sont synthétisés dans un profil de stabilité de la substance active puis sont utilisés lors du développement galénique.

III.1.1. NOMBRE DE COMPOSÉS DE DÉGRADATION :

En exposant la citicoline aux différentes conditions de dégradation forcée, nous avons remarqué l'apparition d'un seul pic dans le chromatogramme de chaque stress à la longueur d'onde de 270 nm (à 300 nm pour l'oxydation).

- Les attaques neutre, acide et photolytique donnent un composé ayant un temps de rétention de 3.84 min.
- L'hydrolyse basique conduit à un produit de dégradation avec un temps de rétention de 8.93 min.
- L'oxydation génère un produit élué en 8.30 min.

Les chromatogrammes sont regroupés dans la figure suivante :

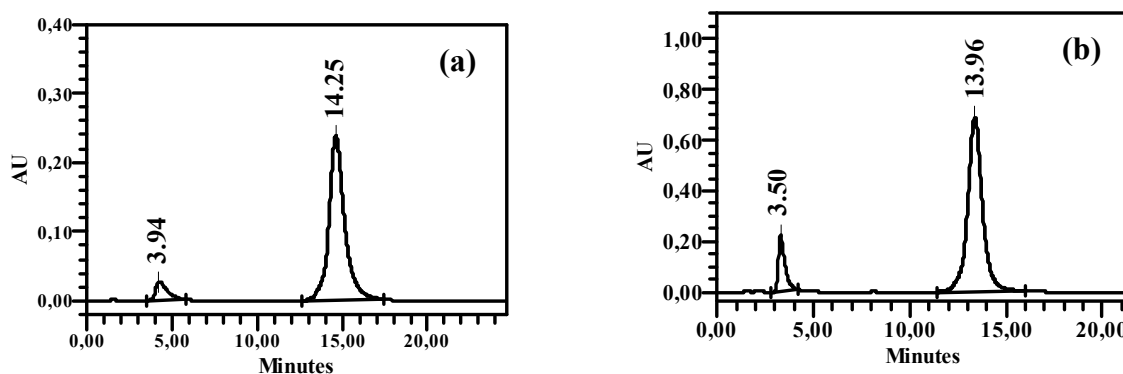


Figure III.1.1 : Chromatogrammes des solutions dégradées, (a) photolyse ; (b) hydrolyse acide

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Identification des produits de dégradation

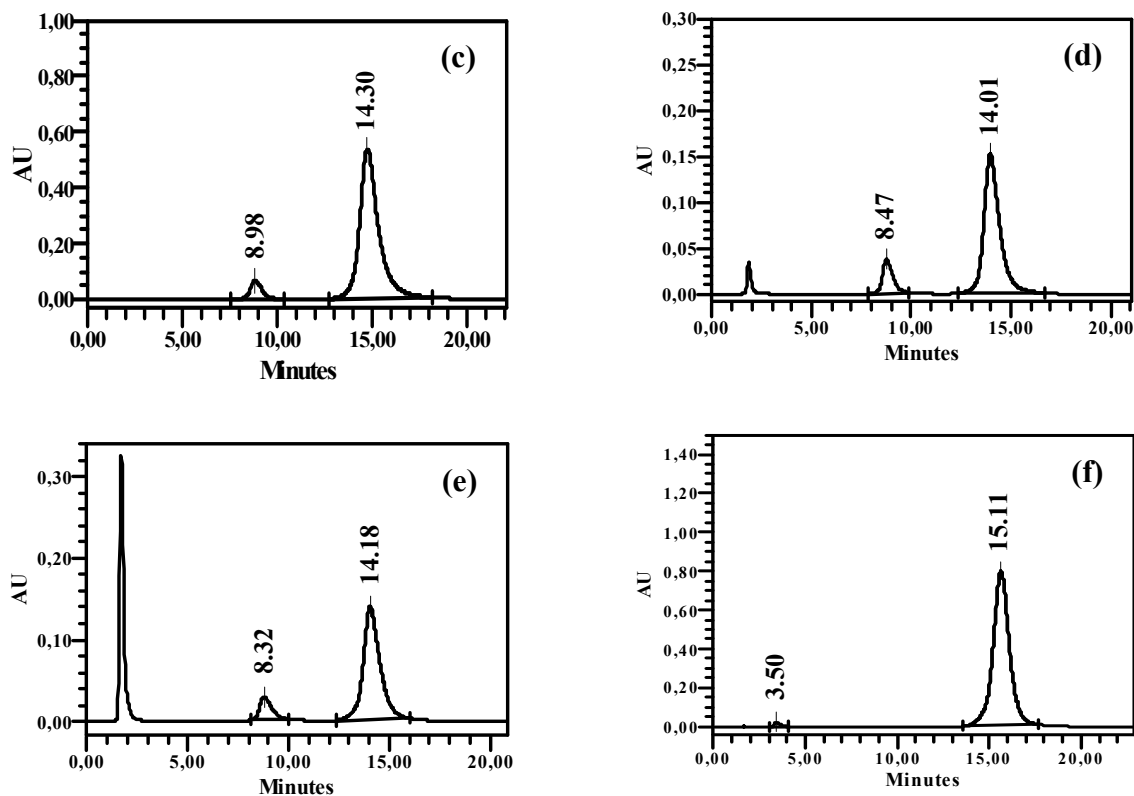


Figure III.1.1 (suite) : Chromatogrammes des solutions dégradées, (c) hydrolyse basique ; (d) 3% H₂O₂ ; (e) 30% H₂O₂ ; (f) hydrolyse neutre

L'existence d'un seul pic autre que celui du principe actif dans chaque chromatogramme n'exclut pas deux problèmes :

- La présence d'autres composés qui n'absorbent pas à cette longueur d'onde.
- La coélution de plusieurs composés.

Pour vérifier l'absence d'autres pics, un balayage de la longueur d'onde entre 200 et 400 nm a été effectué. Les chromatogrammes 3D obtenus sont représentés dans les figures suivantes :

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Identification des produits de dégradation

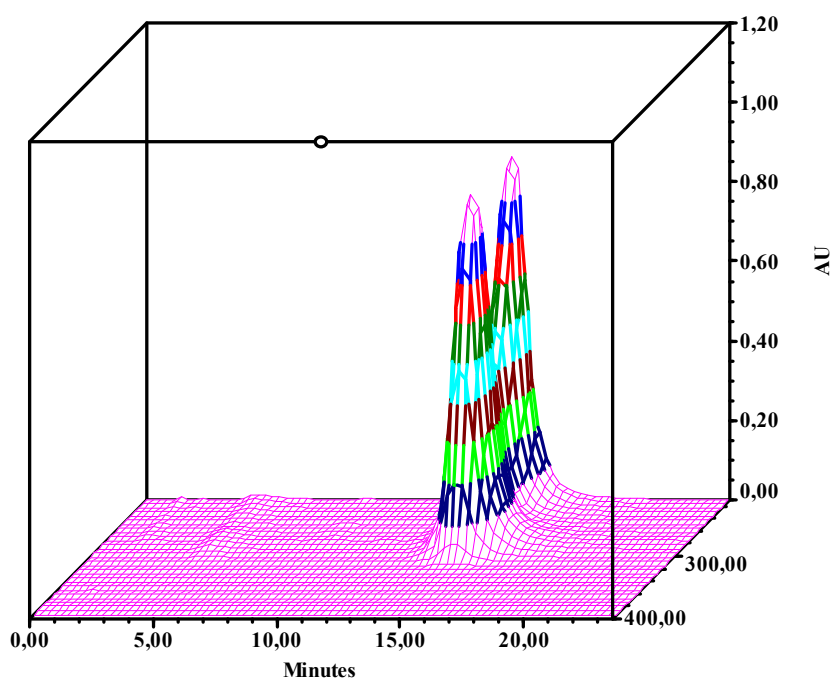


Figure III.1.2 : Chromatogramme 3D de la photolyse

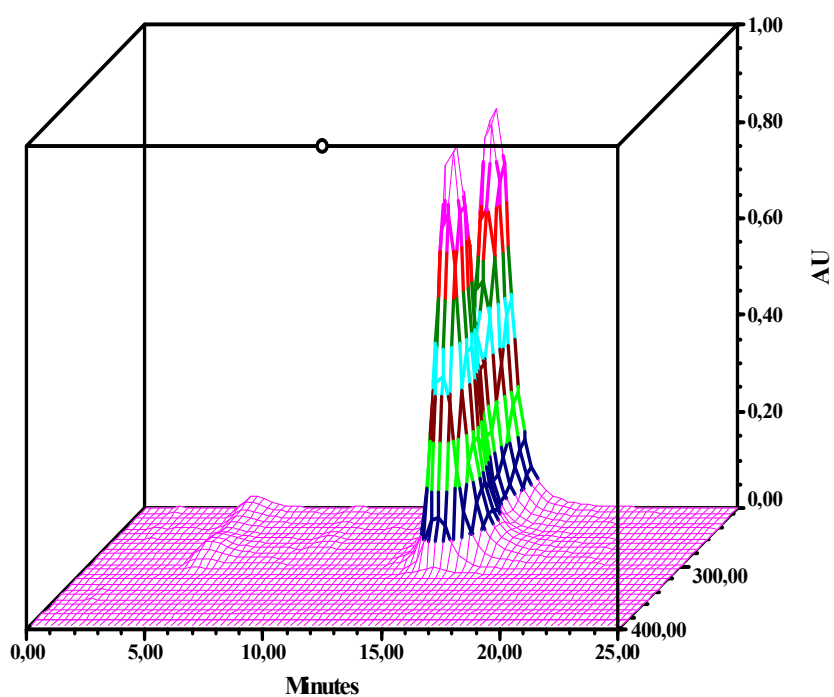


Figure III.1.3 : Chromatogramme 3D de l'hydrolyse acide

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Identification des produits de dégradation

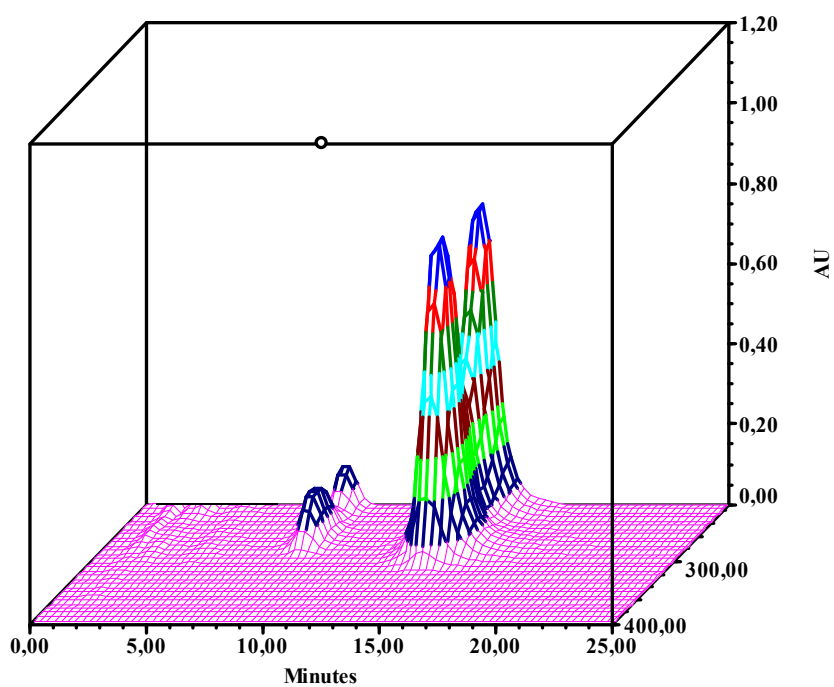


Figure III.1.4 : Chromatogramme 3D de l'hydrolyse basique

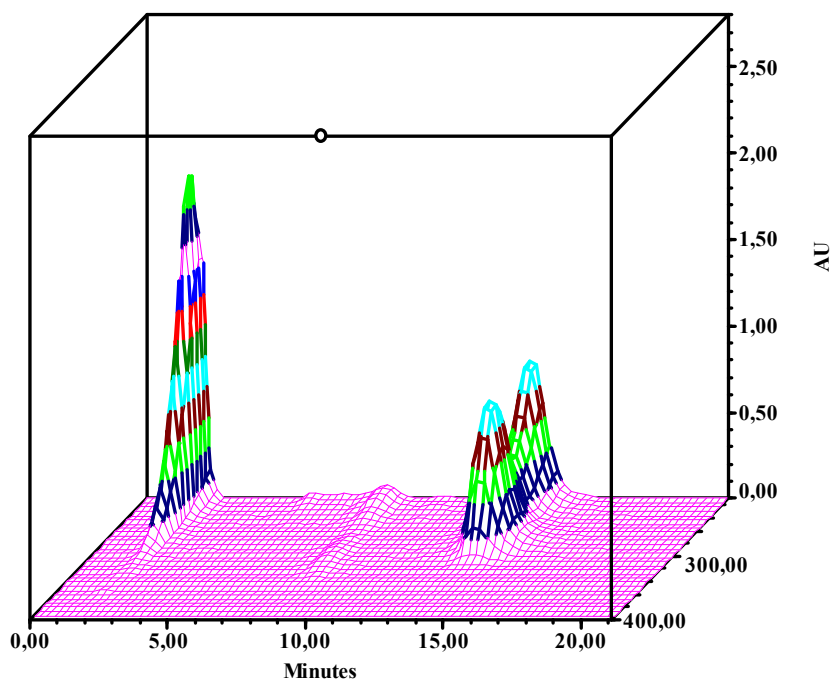


Figure III.1.5 : Chromatogramme 3D de l'oxydation à 3%

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Identification des produits de dégradation

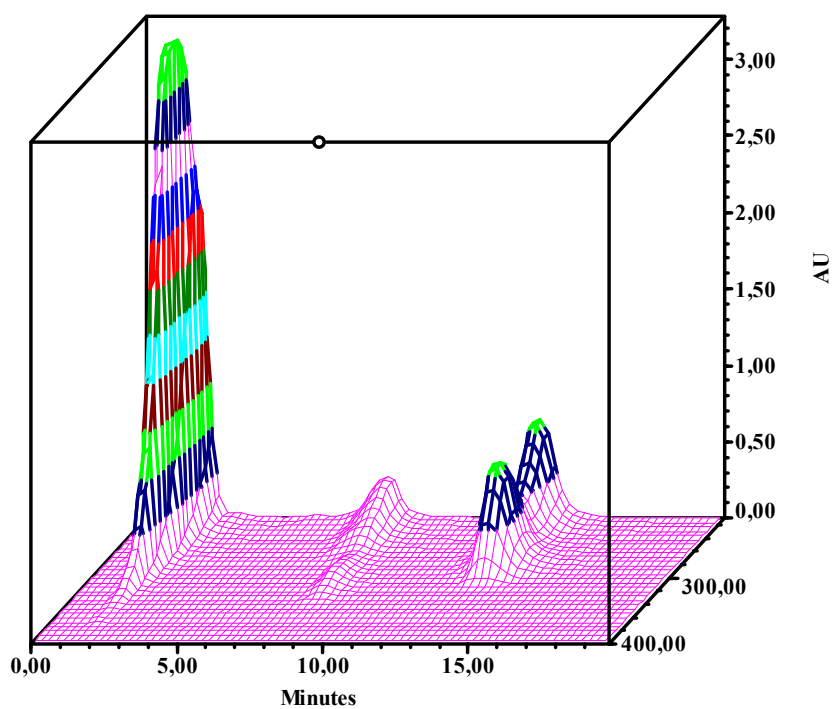


Figure III.1.6 : Chromatogramme 3D de l'oxydation à 30%

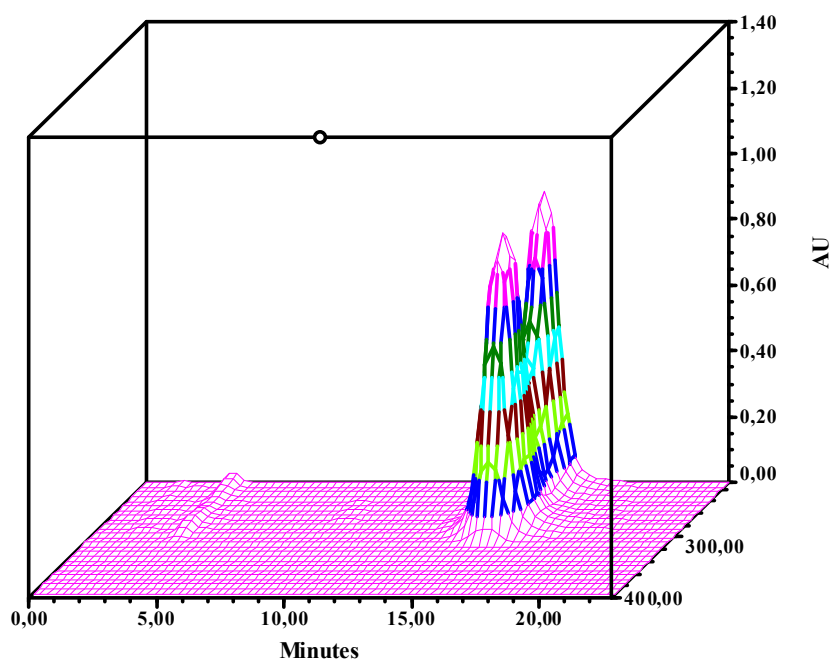


Figure III.1.7 : Chromatogramme 3D de l'hydrolyse neutre

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Identification des produits de dégradation

Les figures montrent l'absence d'autres pics autres que ceux de la citicoline et son produit de dégradation. Dans le cas de la dégradation oxydative, le pic à 2 min correspond au stabilisant de l'eau oxygénée, cela a été confirmé par l'injection d'un blanc (eau oxygénée utilisée pour l'attaque).

Pour vérifier qu'il n'y a pas de coélution (chaque pic correspond à un seul composé) nous avons effectué le test de pureté ou d'homogénéité du pic qui consiste à déterminer l'angle de pureté (Purity Angle) et la pureté du seuil (Purity Threshold). Les résultats sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau III.1.1 : Résultats de la pureté des pics

	Type de dégradation	Purity Angle	Purity Threshold
Citicoline (pic à 14.25 min)	Photolyse	0,105	0,272
	Acide	0,045	0,254
	Basique	14,318	59,764
	Oxydation 3%	0,051	0,251
	Oxydation 30%	0.068	0.250
	Hydrolyse neutre	0.376	1.009
	Pic à 3.84 min	Photolyse	1,489
Acide		0,165	0,334
Hydrolyse neutre		0.257	0.987
Pic à 8.93 min	Basique	61,022	90,000
Pic à 8.30 min	Oxydation 3%	0,479	10,320
	Oxydation 30%	0.520	16.141

Pour qu'un pic soit pur il faut que l'angle de pureté soit inférieur à la pureté du seuil. Les valeurs du tableau confirment l'homogénéité de chaque pic. Cela est traduit par des spectres d'absorption identiques à différentes positions du pic (*Spectrum index*): début, points d'inflexion (monté et descente), maximum et fin du pic (figure III.1.8 à 11) [1-12].

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Identification des produits de dégradation

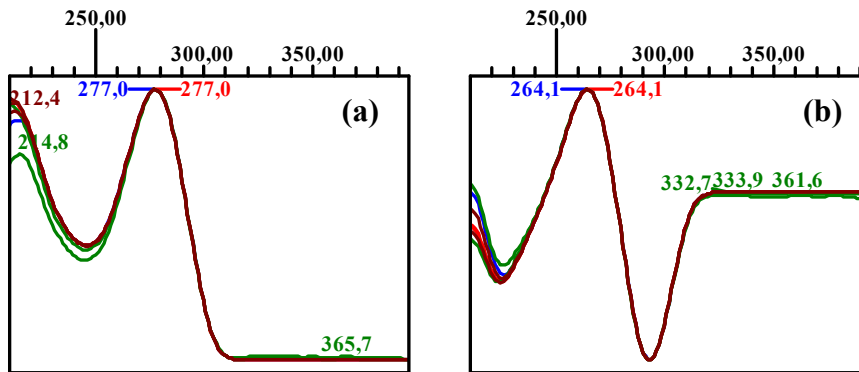


Figure III.1.8 : (a) Spectrum index et (b) sa 1^{ère} dérivée de la citicoline

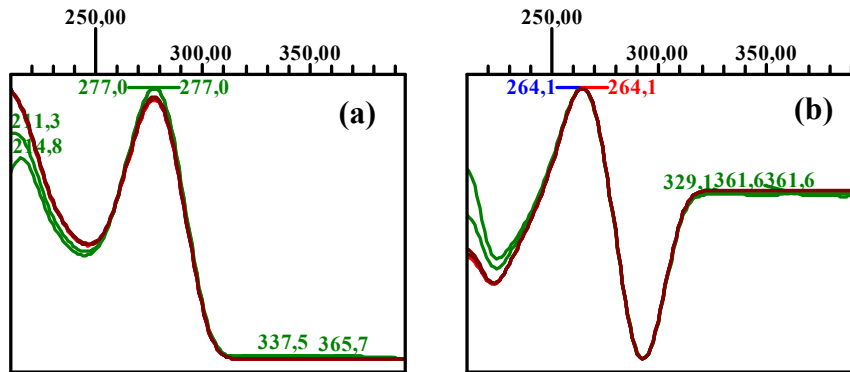


Figure III.1.9 : (a) Spectrum index et (b) sa 1^{ère} dérivée du pic à 3.84 min

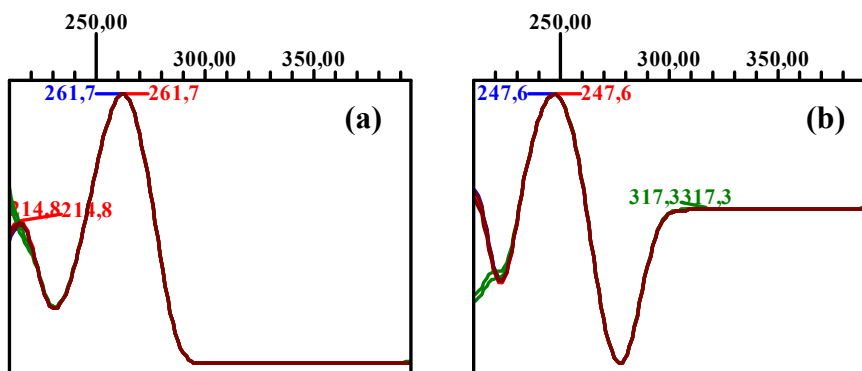


Figure III.1.10 : (a) Spectrum index et (b) sa 1^{ère} dérivée du pic à 8.93 min

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Identification des produits de dégradation

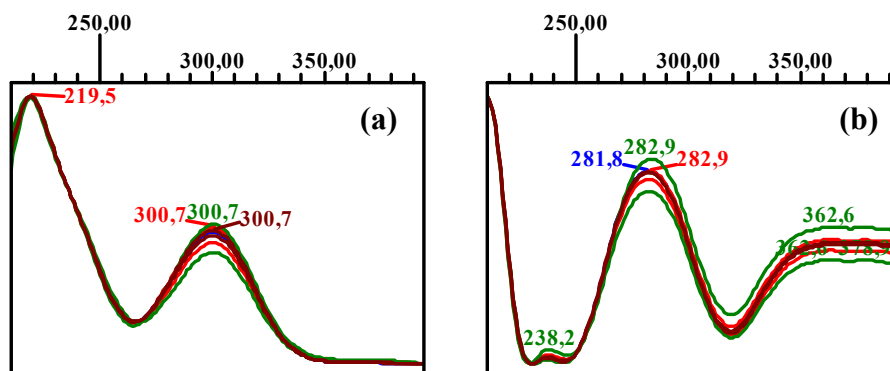


Figure III.1.11 : (a) Spectrum index et (b) sa 1^{ère} dérivée du pic à 8.30 min

Les figures montrent que les spectres d'absorption de chaque composé (spectrum index et les dérivés) obtenus à différentes positions du pic sont superposables indiquant une homogénéité du pic.

Nous avons attribué le nom de **DPA** au produit ayant un temps de rétention de 3.84 min, **DPB** à celui élué à 8.93 min et enfin **DPC** au dernier à 8.30 min.

III.1.2. LA SPÉCIFICITÉ :

Une solution contenant la citicoline avec ses produits de dégradation a été injectée afin de vérifier l'absence d'interférence. Le chromatogramme obtenu est représenté dans la figure suivante :

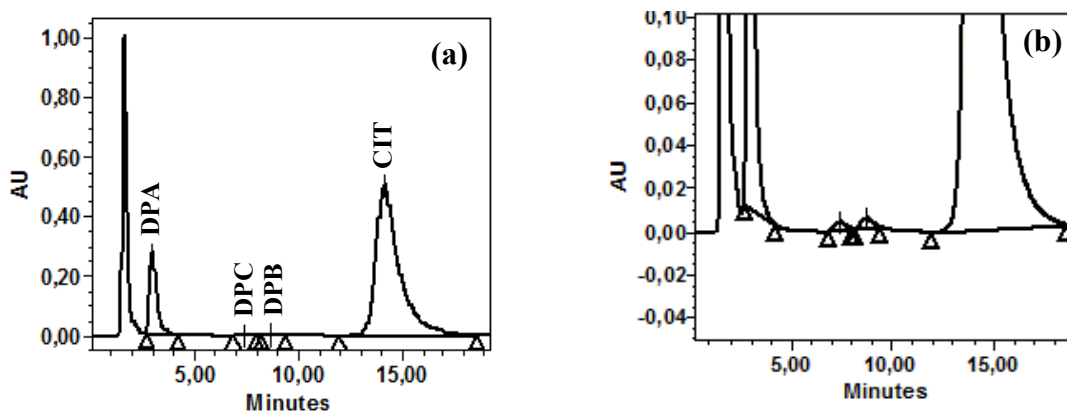


Figure III.1.12 : (a) Chromatogramme de la citicoline en présence de ses produits de dégradation et (b) zoom sur le chromatogramme

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Identification des produits de dégradation

Les résultats des paramètres chromatographiques sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

Tableau III.1.2 : Paramètres chromatographiques :

Composé	DPA	DPC	DPB	CIT	Norme
Temps de rétention (min)	3.84	8.30	8.93	14.25	NA
Temps de rétention relative (par rapport à CIT)	0.27	0.58	0.63	1.00	NA
k'	4.48	10.83	11.76	20.71	≥ 2
R		5.49	1.68	3.57	≥ 1.5
α		2.42	1.08	1.76	≥ 1.2
N	2801	2683	2904	2790	≥ 2000
As	1.29	1.42	1.47	1.24	0.80 - 1.20

Le paramètre qui permet de confirmer l'absence d'interférence entre les différents produits de dégradation de la citicoline et en particulier le DPB et DPC est la résolution. Les valeurs obtenues sont toutes supérieures à 1.5 ce qui montre que le deuxième pic commence lorsque le premier revient à la ligne de base, donc la méthode est spécifique. Les conditions opératoires utilisées permettent une bonne séparation des quatre produits.

III.1.3. CONCLUSION :

Dans la dégradation forcée de la citicoline, nous avons identifié la présence de trois produits, chaque test ayant donné un seul composé. Le DPA correspond au composé obtenu dans le cas de l'hydrolyse neutre, acide et par photolyse, le DPB au composé obtenu dans la dégradation basique et DPC pour celui obtenu par oxydation

III.1.4. RÉFÉRENCES :

[1] ICH, *Q2(R1) : Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology*, Novembre 2005,

http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf, consulté le 17/07/2017.

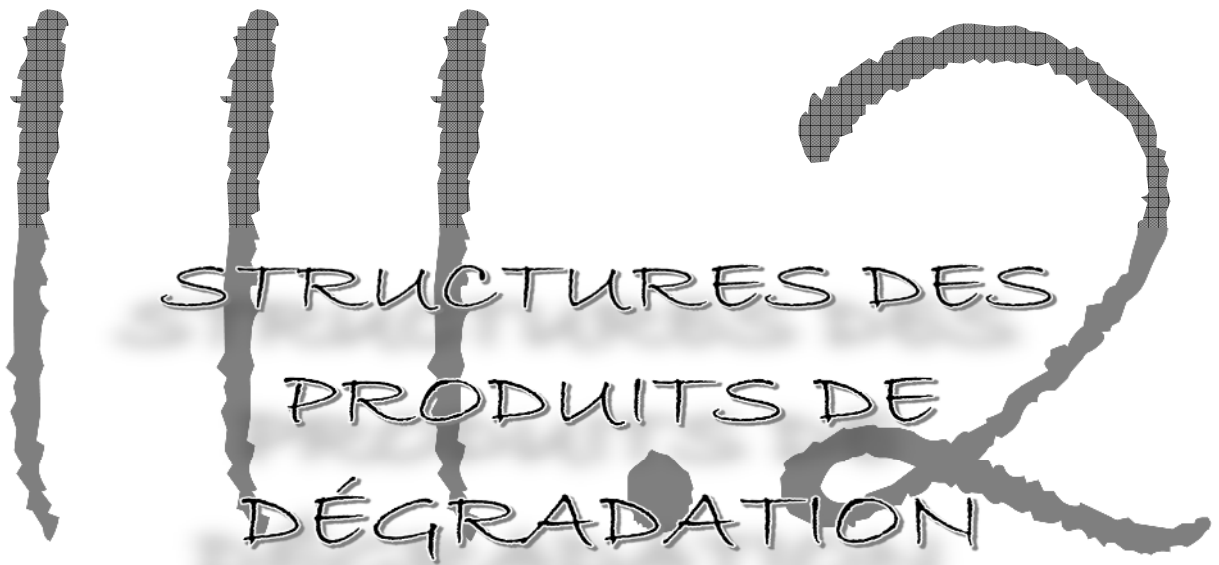
[2] H.R. Keller, D.L. Massart, *Anal. Chim. Acta* 246 (1991) 379.

[3] H.R. Keller, D.L. Massart, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 12 (1992) 209.

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Identification des produits de dégradation

- [4] I.N. Papadoyannis, H.G. Gika, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 27 (2004) 1083.
- [5] H. Fabre, A. Le Bris, M.D. Blanchin, *J. Chromatogr. A* 697 (1995) 81.
- [6] R. Sistla, V.S.S.K. Tata, Y.V. Kashyap, D. Chandrasekar, P.V. Diwan, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39 (2005) 517.
- [7] K.A. Shaikh, S.D. Patil, A.B. Devkhile, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 1481.
- [8] Waters, *Empower PDA Software, Getting Started Guide*, Waters Corporation, 2002, USA.
- [9] J.T. Carstensen, C.T. Rhodes, *Drug Stability : Principles and Practices*, 3rd Ed., Marcel Dekker, Inc., 2000, USA.
- [10] K. Huynh-Ba, *Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development : Regulations, Methodologies and Best Practices*, Springer, 2009, USA.
- [11] S.W. Baertschi, K.M. Alsante, R.A. Reed, *Pharmaceutical Stress Testing : Predicting Drug Degradation*, 2nd Ed., Informa Healthcare, 2011, UK.
- [12] C.F. Poole, *The Essence of Chromatography*, 1st Ed., Elsevier Science B.Y., 2003, the Netherlands.

A large, stylized number '1112' is rendered in a grey, textured, hand-drawn style. The first three '1's are vertical, and the '2' is a large, curved shape that loops back to the right. The text 'STRUCTURES DES PRODUITS DE DÉGRADATION' is centered within the '1112' graphic.

STRUCTURES DES
PRODUITS DE
DÉGRADATION

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2. Structures des produits de dégradation

III.2. STRUCTURES DES PRODUITS DE DÉGRADATION

L'identification des produits de dégradation est l'étape ultime de cette étude. Nous avons montré dans la première partie de ce chapitre « résultats et discussion » la présence de trois produits de dégradation nommés DPA, DPB et DPC à la suite de différents stress. Le premier est obtenu dans le cas de l'hydrolyse neutre et acide et par photolyse. Le second est le résultat de l'hydrolyse basique et le dernier résulte de l'oxydation de la citicoline.

Dans cette seconde partie, nous allons essayer de déterminer la structure de chaque composé en utilisant différentes techniques d'analyse.

III.2.1. ANALYSE PAR SPECTROPHOTOMÉTRIE UV :

L'analyse spectrophotométrique dans l'ultraviolet ne donne pas la structure détaillée des produits de dégradation mais elle peut en fournir des renseignements par comparaison avec la molécule de départ.

III.2.1.1. CITICOLINE :

La citicoline (figure I.1, page 5) dont le spectre UV est représenté dans la figure ci-dessous, présente un maximum d'absorption à 277.0 nm.

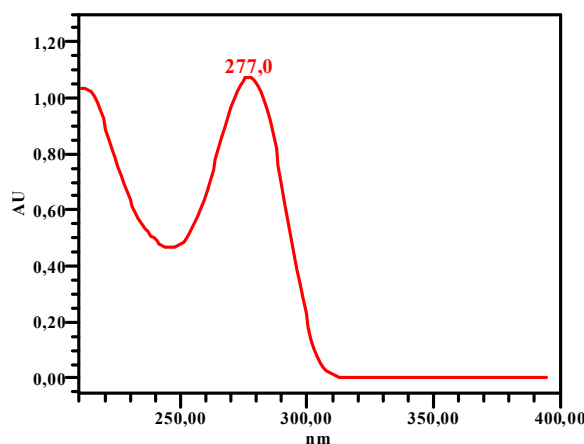


Figure III.2.1 : Spectre UV de la citicoline

D'après les propriétés d'absorption des rayonnements UV et les spectres représentés dans les figures ci-dessous, la seule partie de la citicoline qui absorbe à cette longueur d'onde est la cytosine. Les autres parties de la molécule sont transparentes [1-10].

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2. Structures des produits de dégradation

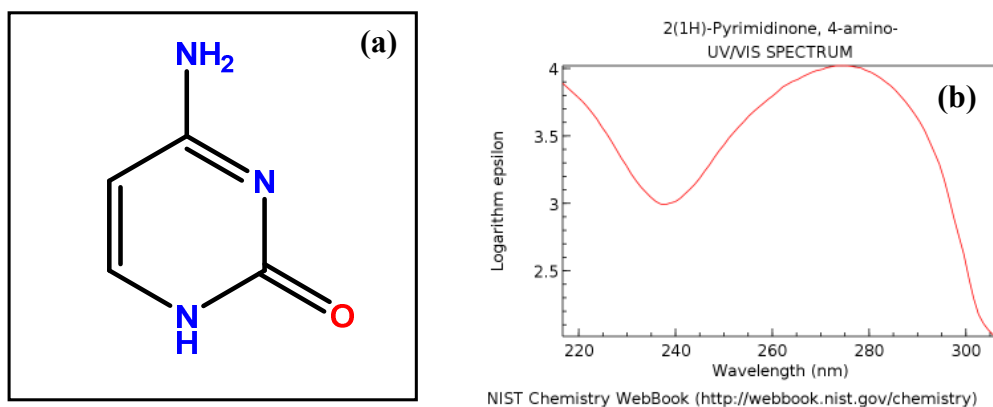


Figure III.2.2 : (a) Structure et (b) spectre UV de la cytosine [9]

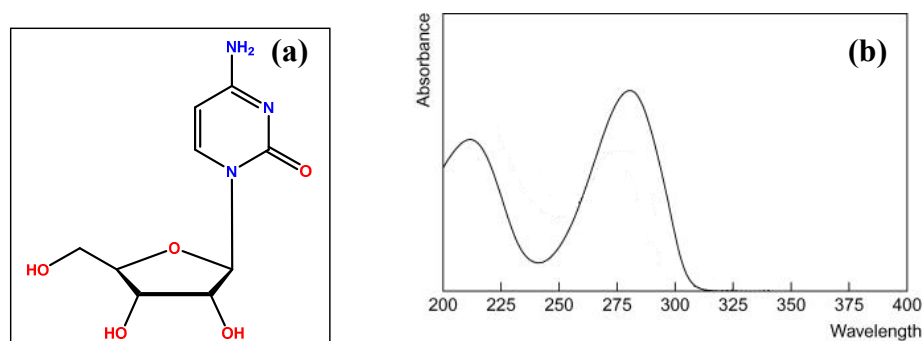


Figure III.2.3 : (a) Structure et (b) spectre UV de la cytidine [10]

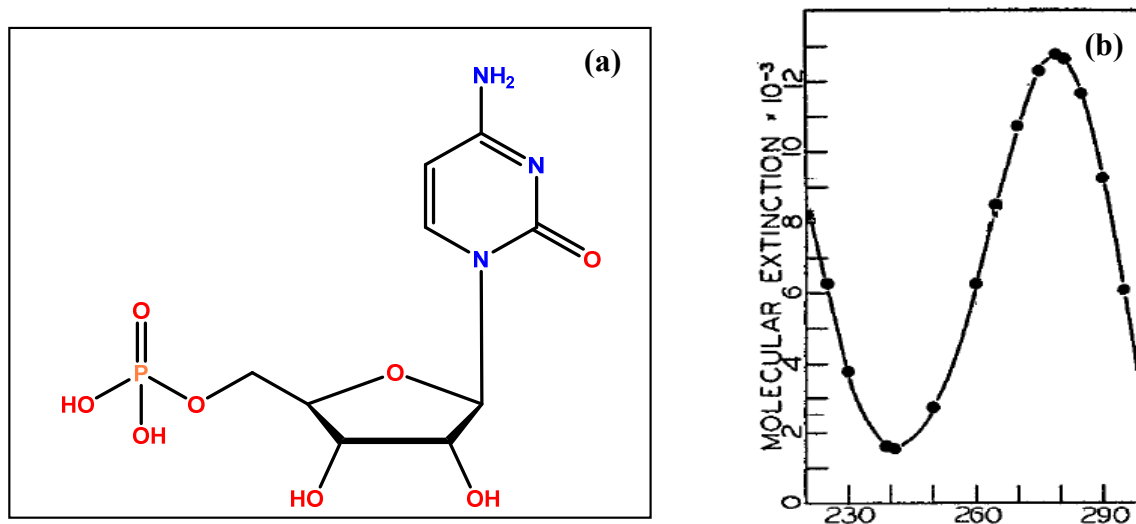


Figure III.2.4 : (a) Structure et (b) spectre UV de la cytidine 5'-monophosphate (acide cytidylique) [7]

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2. Structures des produits de dégradation

III.2.1.2. PRODUIT DE DÉGRADATION A (DPA) :

Le produit de dégradation A, obtenu après hydrolyse neutre, acide et par photolyse présente un maximum à 277.0 nm comme le montre la figure suivante. Son spectre est superposable à celui de la molécule mère indiquant que la dégradation n'a pas touché l'hétérocycle azoté mais le reste de la molécule. Des modifications telles que l'alkylation/désalkylation et la phosphorylation/déphosphorylation entraîneront un changement important dans le temps de rétention en HPLC en mode HILIC mais n'affecteront pas le spectre UV. Le temps de rétention relatif de DPA (RRT par rapport à la citicoline = 0.27) indique que la citicoline a perdu plusieurs groupements polaires de la partie transparente [4-8,11,12].

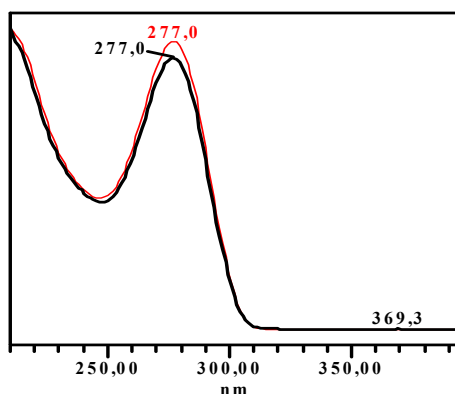


Figure III.2.5 : Spectres UV de la citicoline (en rouge) et de DPA (en noir)

III.2.1.3. PRODUIT DE DÉGRADATION B (DPB) :

Le produit de dégradation B, obtenu avec l'hydrolyse basique et dont le spectre UV est représenté dans la figure suivante présente un maximum à 261.7 nm. Le changement de λ_{\max} par rapport à la CIT indique que la cytosine (partie portant les chromophores) a été modifiée.

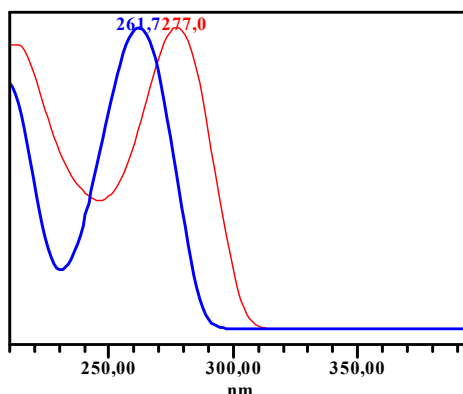


Figure III.2.6 : Spectres UV de la citicoline (en rouge) et de DPB (en bleu)

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2. Structures des produits de dégradation

D'après la littérature, la cytosine est sensible à l'attaque basique et elle est transformée en uracile (voir la partie III.3.2). Nous avons donc comparé dans un premier temps le spectre UV de DPB avec celui de l'uracile (figure III.2.7), de l'uridine (figure III.2.8) et de l'uridine 5'-monophosphate (III.2.9) et nous avons trouvé une similarité [3,5,7,8,11-15].

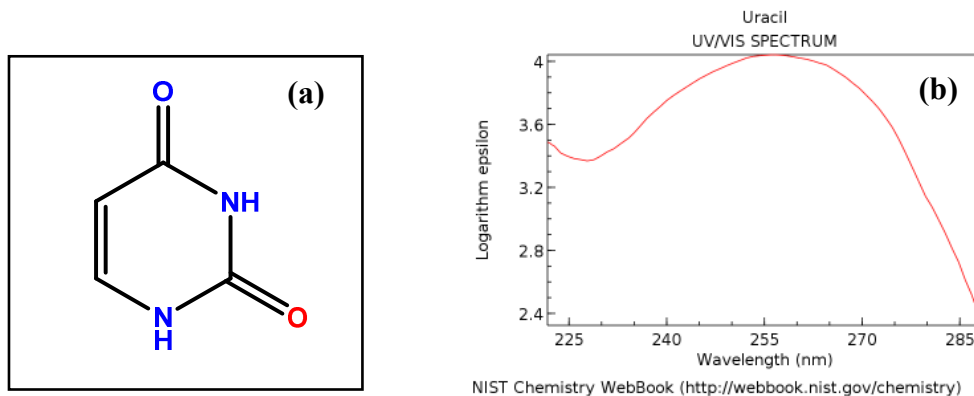


Figure III.2.7 : (a) Structure et (b) spectre UV de l'uracile [13]

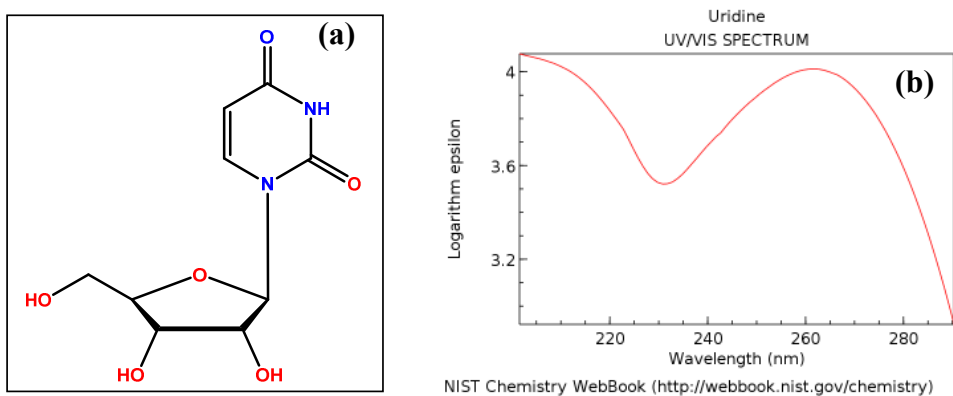


Figure III.2.8 : (a) Structure et (b) spectre UV de l'uridine [14]

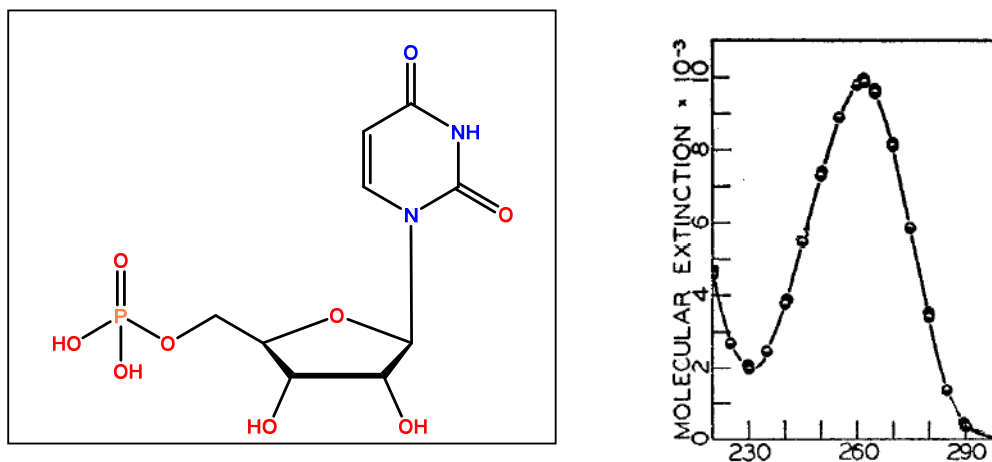


Figure III.2.9 : (a) Structure et (b) spectre UV de l'uridine 5'-monophosphate (acide uridylique) [7]

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2. Structures des produits de dégradation

III.2.1.4. PRODUIT DE DÉGRADATION C (DPC) :

Le produit de dégradation C résulte d'une attaque oxydative et dont le spectre UV est donné sur la figure suivante présente un maximum à 299.5 nm indiquant que la dégradation a modifié le chromophore de la citicoline d'une façon différente de celle qui a conduit à DPB.

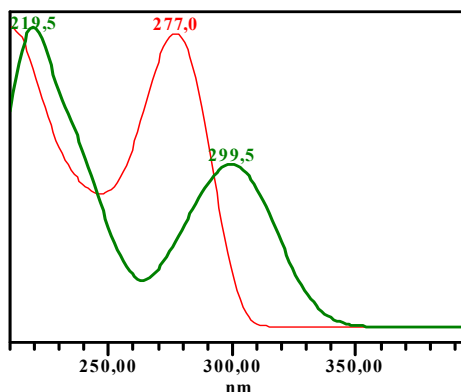


Figure III.2.10 : Spectres UV de la citicoline (en rouge) et DPC (en vert)

III.2.2. LC-ESI-MS/TOF :

L'utilisation de la spectrométrie de masse avec une source d'ionisation douce ESI et un analyseur de haute résolution TOF génère des ions pseudo-moléculaires $[M+H]^+$ qui servent à déduire la masse de chaque composé. Le spectre obtenu contient peu de fragments ce qui permet de les rassembler pour reconstituer la molécule.

III.2.2.1. CITICOLINE :

Le spectre de masse de la citicoline est représenté dans la figure III.2.11 :

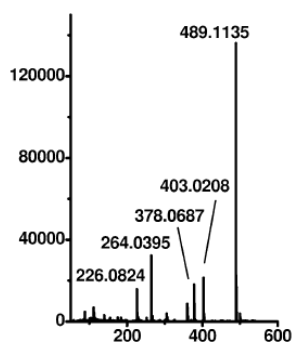


Figure III.2.11 : Spectre de masse de la citicoline

La citicoline avec une masse exacte de 488.1057 Da donne en mode positif un pic à $m/z = 489.1135$ Da correspondant à l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$.

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2. Structures des produits de dégradation

La fragmentation de la CIT donne les ions aux différentes valeurs de m/z 403.0208, 378.0687, 264.0395 et 226.0824 Da. Les meilleures formules proposées sont $C_9H_{15}N_3O_{11}P_2^{++}$, $C_{10}H_{22}NO_{10}P_2^+$, $C_5H_{16}NO_7P_2^+$ et $C_9H_{12}N_3O_4^+$ respectivement [16-18].

La figure III.2.12 représente une proposition des chemins de fragmentation de la citicoline [19,20] :

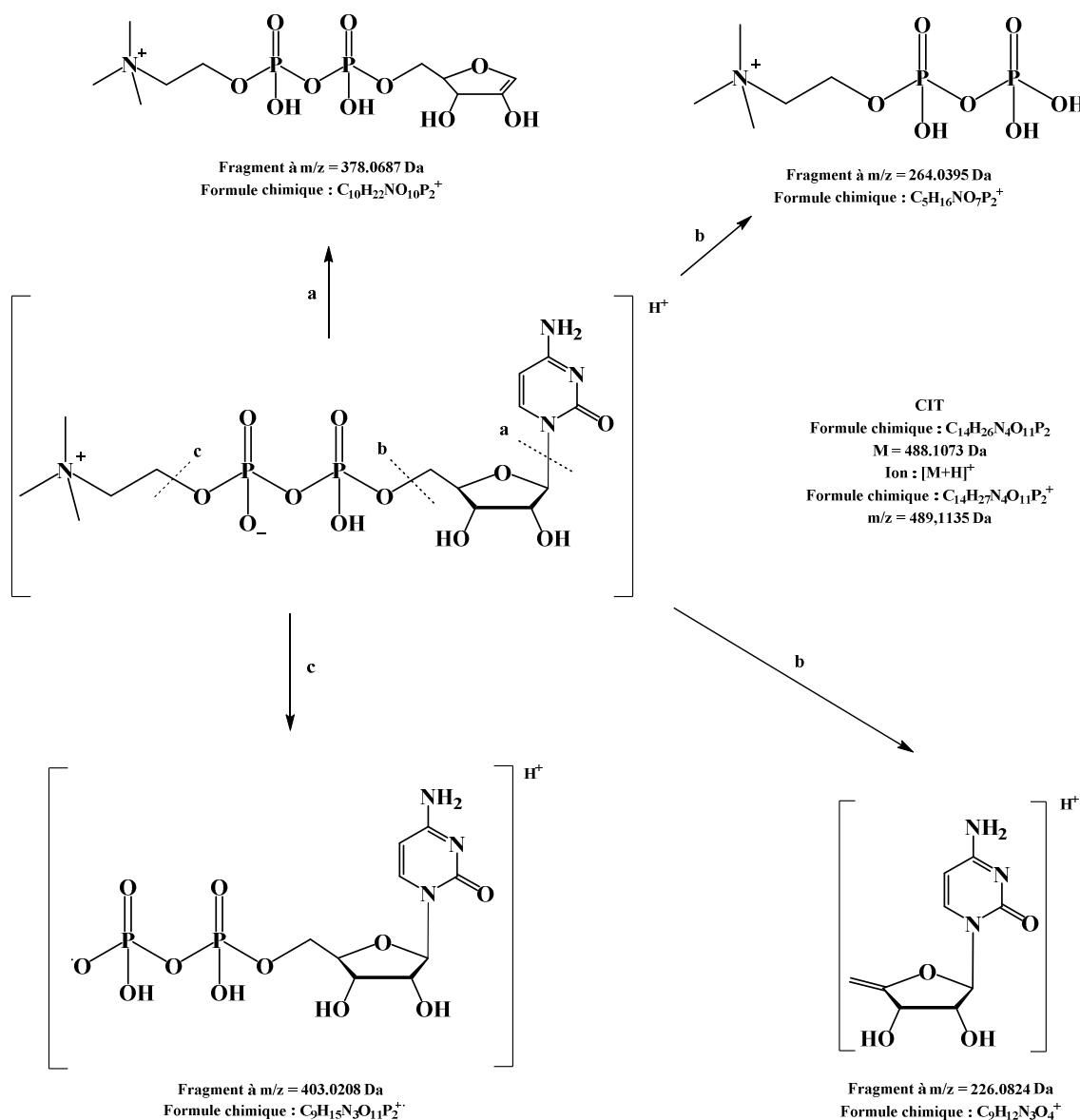


Figure III.2.12 : Proposition des chemins de fragmentation de la citicoline

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2. Structures des produits de dégradation

III.2.2.2. DPA :

Le spectre de masse du produit des contraintes neutre, acide et photolytique produisant le DPA présente un ion pseudo-moléculaire $[M + H]^+$ à $m/z = 324.0609$ Da, donc la masse exacte de ce composé est de 323.0531 Da. Nous observons aussi un fragment à $m/z = 226.0890$ Da, ion qui existe aussi dans le spectre de la citicoline. Sa formule la plus probable proposée est $C_9H_{12}N_3O_4^+$. La différence de masse entre les deux pics 97,9719 Da correspond à la perte d'un phosphate H_3PO_4 .

En se basant sur les spectres UV et de masse de la CIT et de DPA, La formule la plus probable de DPA serait $C_9H_{14}N_3O_8P$ [21].

Cette molécule possède le même spectre d'absorption que la citicoline confirmant la présence de la base cytosine (voir la partie III.2.1.2) et la perte de plusieurs groupements polaires comme la choline et le phosphate explique la diminution considérable du temps de rétention.

Le spectre de masse de DPA avec la proposition de sa structure et le chemin de fragmentation sont représentés dans les figures suivantes :

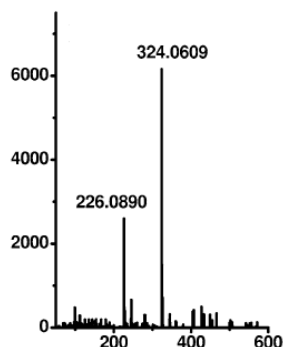


Figure III.2.13 : Spectre de masse de DPA

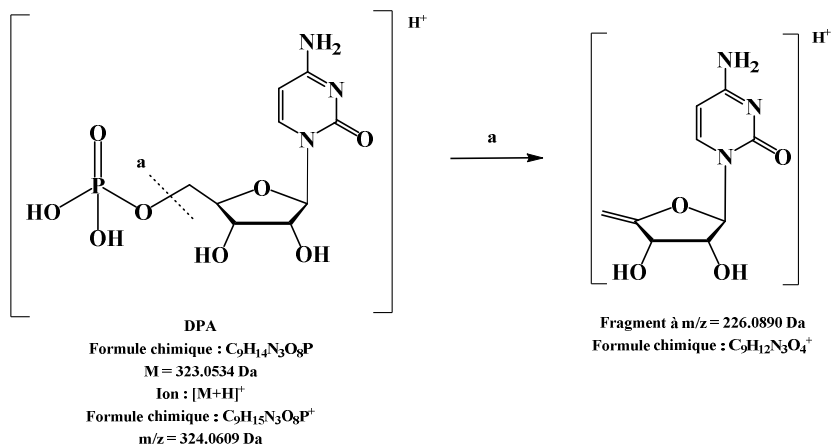


Figure III.2.14 : Structure et chemin de fragmentation du DPA

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2. Structures des produits de dégradation

III.2.2.3. DPB :

Le stress basique de la CIT a donné le DPB, son spectre de masse (figure III.2.15) montre un ion pseudo-moléculaire $[M + H]^+$ à $m/z = 490.1006$ Da. Sa masse est de 489,0928 Da. Le spectre contient les pics à $m/z = 404.0030$, 378.0648, 264.0352 et 227.0896 Da.

La comparaison des spectres de masse de la CIT et de DPB nous permet de faire les constatations suivantes :

- i) Certains des fragments de DPB ont la même masse que ceux trouvés avec la CIT (264 Da et 378 Da). Ils seront dans la partie commune des 2 molécules.
- ii) Le composé DPB contient dans sa structure toute la partie transparente de la citicoline (le fragment à 378.0648 Da).
- iii) La différence entre les poids moléculaire de la CIT et DPB est de un Da. Cela confirme le résultat de l'UV indiquant une différence au niveau de l'hétérocycle azoté.
- iv) D'autres fragments de DPB diffèrent d'un Da dans leur masse par rapport à ceux de la CIT [(226.0824 Da et 403.0208 Da) dans la CIT et (227.0896 Da et 404.0030 Da) dans DPB]. Il s'agit des fragments contenant les chromophores. Les formules proposées pour les fragments de DPB sont $C_9H_{11}N_2O_5^+$ et $C_9H_{14}N_2O_{12}P_2^{+}$ respectivement [16-18].
- v) La masse du chromophore du DPB est de 112.0355 Da, celle de la citicoline est 111.0355 Da. selon la règle de l'azote en spectrométrie de masse, une masse paire indique l'absence ou la présence d'un nombre pair d'atome d'azote. Si la masse est impaire, cela veut dire un nombre impair d'atome d'azote.

Dans la citicoline, la cytosine (111.0355 Da) possède 3 atomes d'azote. Dans DPB, la masse est paire, donc nous devons avoir un nombre pair d'atomes d'azote.

En tenant compte de tous ces points, la formule la plus probable de DPB est $C_{14}H_{25}N_3O_{12}P_2$, appelée uridine 5'-diphosphate choline [22].

Nous donnons dans les figures ci-dessous le spectre de masse de DPB, la proposition de sa structure avec les chemins de fragmentation :

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2. Structures des produits de dégradation

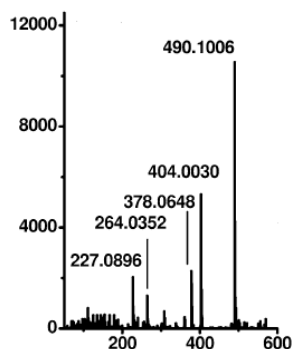


Figure III.2.15 : Spectre de masse de DPB

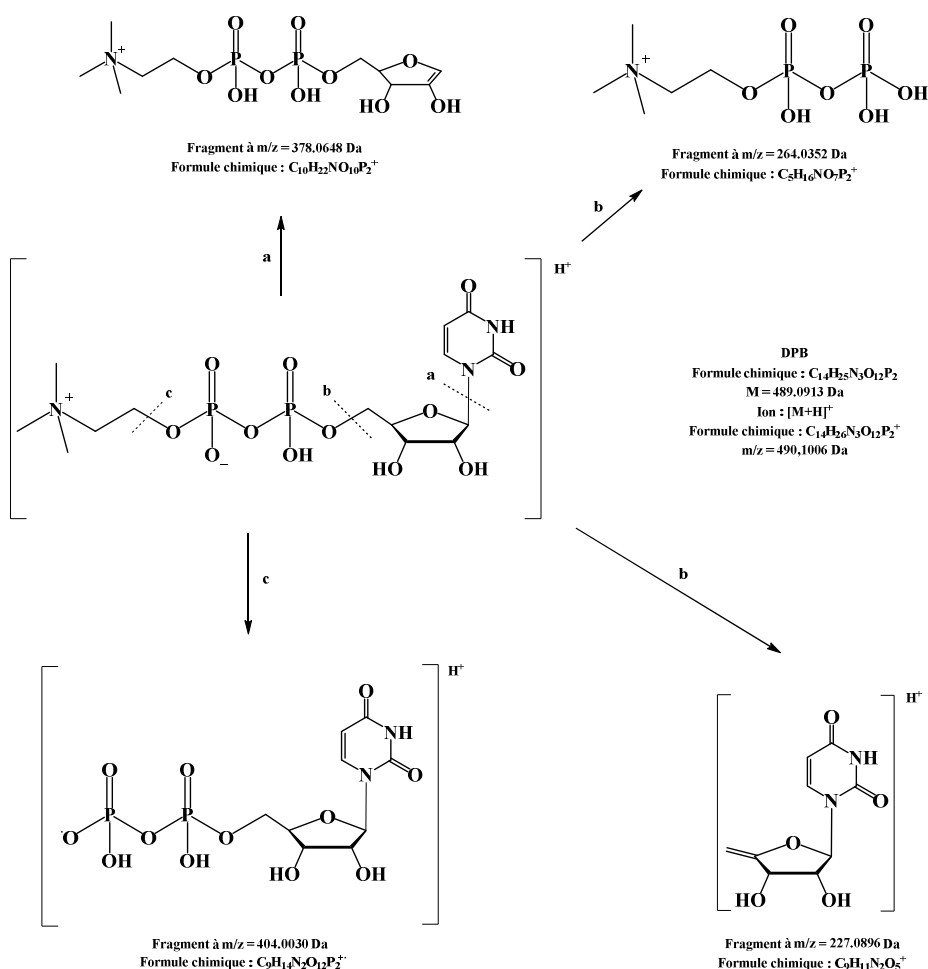


Figure III.2.16 : Structure et chemins de fragmentation du DPB

III.2.2.4. DPC :

Le spectre de masse du troisième produit de dégradation DPC présente un pic à $m/z = 376.0531$ Da correspondant à l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$, sa masse est de 375.0453 Da.

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2. Structures des produits de dégradation

Le spectre de masse présente d'autres pics à $m/z = 290.0506$ et 264.0385 Da. Ce dernier est un fragment commun avec la molécule de départ indiquant la présence de cette partie dans la structure de DPC. Donc ce composé contient dans sa structure la choline avec le diphosphate plus une autre partie différente de celle de la citicoline et du DPB résultant de l'oxydation de la cytidine.

La structure proposée pour l'autre fragment est $C_5H_6O_{10}P_2^{+}$ [16-18].

D'après le spectre UV et la différence de masse entre le fragment et le pic pseudo-moléculaire et la règle de l'azote en spectrométrie de masse, nous ne pouvons pas trouver le ribose et la cytosine en même temps dans la structure de DPC. Cela permet de dire qu'il est plus probable de trouver le glucide modifiée dans la structure de DPC et qu'elle soit plus proche du fragment à 378.0648 Da obtenu dans la citicoline et DPB.

D'après Pfitzner et Moffatt [23-27] (voir la partie III.3.3), l'oxydation a lieu dans les alcools secondaires du ribose en formant une dicétone avec la perte de la base nucléique.

Les figures III.2.17 et III.2.18 représentent le spectre de masse, la structure proposée et les chemins de fragmentation de DPC respectivement.

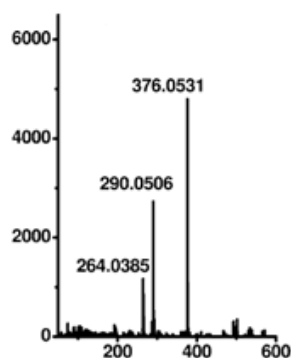


Figure III.2.17 : Spectre de masse de DPC

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2. Structures des produits de dégradation

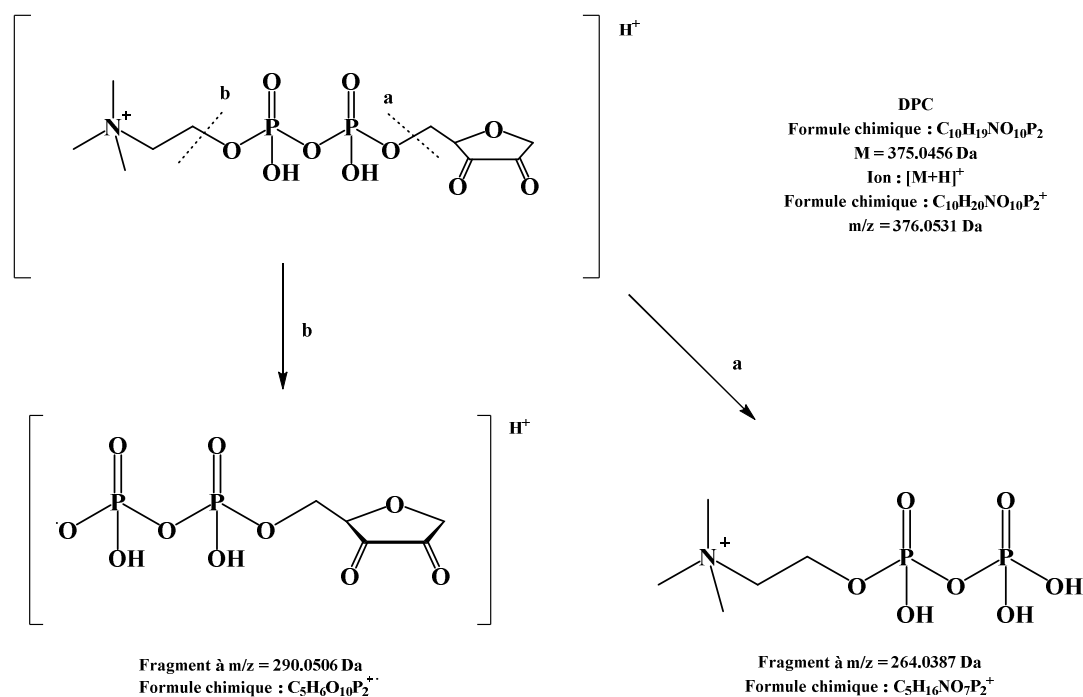


Figure III.2.18 : Structure et chemins de fragmentation de DPC

III.2.3. RMN 1H et ^{13}C :

Nous avons proposé les structures des DPs dans la partie précédente mais cette proposition nécessite une confirmation. Pour cela nous avons utilisé la résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone pour affirmer le squelette de ces molécules.

III.2.3.1. CHROMATOGRAPHIE SEMI-PRÉPARATIVE :

Afin de confirmer les structures des produits de dégradation, chaque composé a été récupéré par chromatographie en phase liquide semi-préparative. La solution récupérée est ensuite concentrée par un flux d'azote et réinjectée pour vérifier qu'elle ne contienne qu'un seul composé. L'évaporation du solvant assistée par un léger chauffage à 50°C pour accélérer l'étape jusqu'à l'obtention d'un résidu est réalisée.

III.2.3.2. RMN 1H ET ^{13}C DE LA CITICOLINE :

La figure III.2.19 représente l'attribution des positions des protons et des carbones pour la citicoline.

Les résultats de la RMN 1H et ^{13}C sont données dans la figure III.2.20 et le tableau III.2.1.

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2. Structures des produits de dégradation

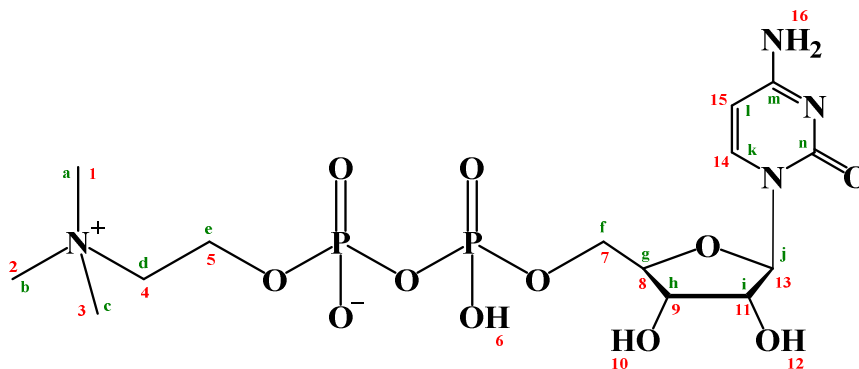


Figure III.2.19 : Attribution des positions des protons (en numéros) et des carbones (en lettres) pour la citicoline

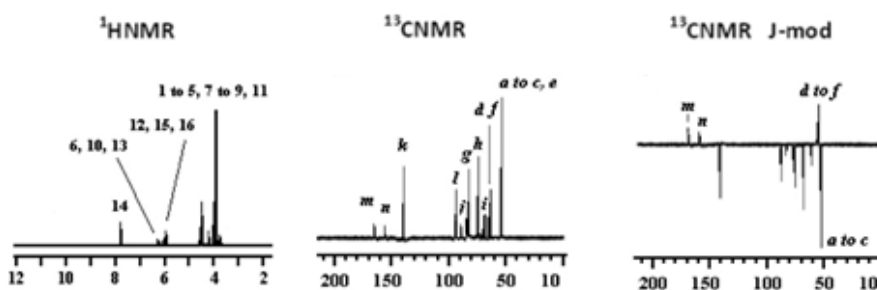


Figure III.2.20 : Spectres RMN ^1H , RMN ^{13}C et APT de la citicoline

Tableau III.2.1 : Résultats numérique de la RMN de la citicoline

Proton	Nombre de proton	Multiplicité	δ (ppm)	Carbone	δ (ppm)	APT	
1, 2, 3	9	s	3.18 – 3.24	a, b, c	54.08	CH ₃	–
4	2	t	3.68 – 3.72	d	64.97	CH ₂	+
5	2	t	4.35 – 4.41	e	59.97	CH ₂	+
6	1	s	6.17				
7	2	dd	4.16 – 4.29	f	66.07	CH ₂	+
8	1	ddd	4.07 – 4.29	g	82.65	CH	–
9	1	dd	4.32 – 4.35	h	74.22	CH	–
10	1	s	6.07				
11	1	dd	4.32 – 4.35	i	67.44	CH	–
12	1	s	5.96				
13	1	d	6.09 – 6.11	j	89.42	CH	–
14	1	d	7.91 – 7.95	k	147.80	CH	–
15	1	d	5.95 – 6.12	l	99.62	CH	–
16	2	s	5.97				
				m	166.28	C	+
				n	154.08	C	+

+ : Vers le haut ; – : Vert le bas

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2. Structures des produits de dégradation

La citicoline donne 14 signaux en RMN ^1H . Les neuf protons portés par les trois méthyles des positions **1**, **2** et **3** sont équivalents et donnent un singulet. En position **4** et **5**, chaque groupement CH_2 donne un triplet. Ceux de la position **5** sont à côté d'un atome d'oxygène possédant un effet attracteur, ils sont déblindés et ont des déplacements chimiques plus élevés. En positions **7**, les deux protons du CH_2 sont à côté d'un carbone asymétrique donc ils résonnent par un dd. Les carbones asymétriques des positions **8**, **9**, **11** et **13** donnent ddd, dd, dd et d respectivement. La présence de plusieurs groupements attracteurs au voisinage de la position **13** conduit à un déblindage et un déplacement plus élevé. L'environnement presque similaire autour des protons en positions **5**, **7**, **8**, **9** et **11** conduit à des déplacements chimiques très proches ce qui donne un massif. Les protons des positions **14** et **15** appartiennent au système aromatique, donc ils résonnent par un doublet dans la zone 6 – 10 ppm. À cause du système conjugué, la position **14** possède un certain déficit en charge donc un déplacement plus important.

Pour la RMN ^{13}C , les carbones aliphatiques **a**, **b**, **c**, **d**, **e**, **f**, **g**, **h**, **i**, et **j** sont liés à des hétéroatomes et ils résonnent dans la zone 30 – 90 ppm. Plus l'effet attracteur est important plus le déplacement est élevé. Les carbones **k** et **l** résonnent dans la zone des aromatiques. Comme pour la RMN du proton, le carbone en position **k** est plus déblindé. L'imine **m** résonne vers les 160 ppm et la cétone **n** vers les 150 ppm.

Le mode APT a donné les carbones secondaires (**d**, **e** et **f**) et quaternaires (**m** et **n**) vers le haut tandis que les primaires (**a**, **b** et **c**) et les tertiaires (**g**, **h**, **i**, **j**, **k** et **l**) sont vers le bas [28-35].

III.2.3.3. RMN ^1H ET ^{13}C DU DPA :

Les spectres UV et de masse de l'impureté A nous ont permis de proposer une structure pour le DPA. Les résultats de la RMN (spectres et déplacements chimiques) de ce produit sont donnés ci-dessous.

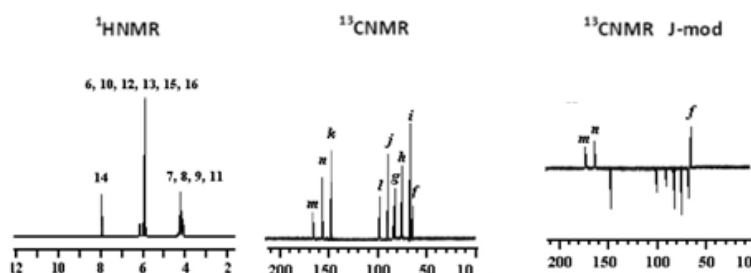


Figure III.2.21 : Spectres RMN ^1H , RMN ^{13}C et APT du DPA

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2. Structures des produits de dégradation

Tableau III.2.2 : Résultats numérique de la RMN de DPA

Proton	Nombre de proton	Multiplicité	δ (ppm)	Carbone	δ (ppm)	APT	
6	1	s	5.90				
7	2	dd	3.98 – 4.28	f	65.90	CH ₂	+
8	1	ddd	4.21 – 4.26	g	83.02	CH	-
9	1	dd	4.34 – 4.41	h	74.56	CH	-
10	1	s	5.93				
11	1	dd	4.31 – 4.36	i	67.88	CH	-
12	1	s	5.95				
13	1	d	6.04 – 6.09	j	89.91	CH	-
14	1	d	7.93 – 8.09	k	146.79	CH	-
15	1	d	6.01 – 6.11	l	99.44	CH	-
16	1	s	6.07				
				m	167.01	C	+
				n	154.08	C	+

+ : Vers le haut ; - : Vert le bas

Si notre proposition est correcte, la différence entre les spectres RMN de la citicoline et de DPA se situerait au niveau des protons (1,2,3,4 et 5) et des carbones (a, b, c, d et e).

Nous constatons la présence des tous les signaux de la citicoline des positions **6** à **16** et **f** à **n** dans les mêmes zones du spectre. Dans le côté haut du spectre APT, nous confirmons la présence d'un seul signal correspond au carbone secondaire (**f**) car les quaternaires (**m** et **n**) résonnent plus loin. En bas, nous remarquons une similarité avec la citicoline sauf l'absence du signal des méthyles. Cela confirme notre proposition de la structure de DPA avec une formule $C_9H_{14}N_3O_8P$. La figure III.2.22 représente la structure de DPA avec l'attribution des positions des protons et carbones.

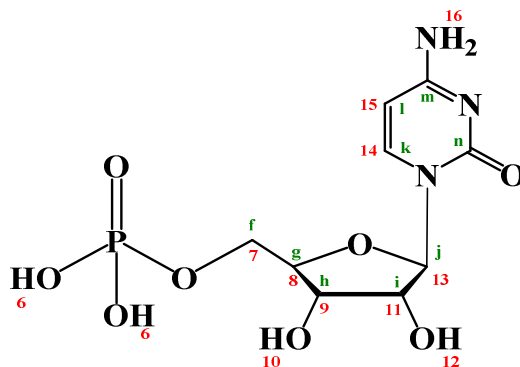


Figure III.2.22 : Structure de DPA avec attribution des positions des protons (en numéros) et des carbones (en lettres)

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2. Structures des produits de dégradation

Le nom systématique de DPA est (2R, 3R, 4S, 5R) 5-(4-amino -2- oxopyrimidin-1-yl)-3,4-dihydroxyoxolan-2-yl] méthyl dihydrogénophosphate connu par la cytidine 5'-phosphate ou l'acide cytidylique [29-31,36-38].

III.2.3.4. RMN ^1H ET ^{13}C DU DPB :

Les spectres UV et de masse nous ont permis de proposer une structure pour le DPB. Nous en avons conclu que la différence avec la citicoline se situait au niveau de l'hétérocycle azoté. Les résultats de la RMN (figures et déplacements chimiques) nous permettent de faire les constatations suivantes :

- La comparaison des structures de la CIT et DPB proposée suggère la disparition du proton 16 et l'apparition du proton 17 dans DPB.
- Le spectre RMN ^1H de DPB montre :
 - ✓ Le signal à 11,23 ppm caractérise le proton 17 de l'amide.
 - ✓ Le proton 16 n'existe pas.
 - ✓ Les protons de 1 à 13 ont le même environnement, donc des déplacements voisins.
 - ✓ La présence du carbonyle en position **m** dans DPB avec un effet mésomère attracteur déplace le proton de la position 15 vers les champs faible, donc il sera plus déblindé.
 - ✓ Le proton de la position 14 est plus déblindé dans la citicoline à cause de l'effet attracteur de l'azote, par contre, il est dans un système donneur dans le DPB.

L'examen des spectres RMN ^{13}C de la CIT et DPB (y compris l'option APT) ne révèle aucune différence remarquable [11,29-31,39-47].

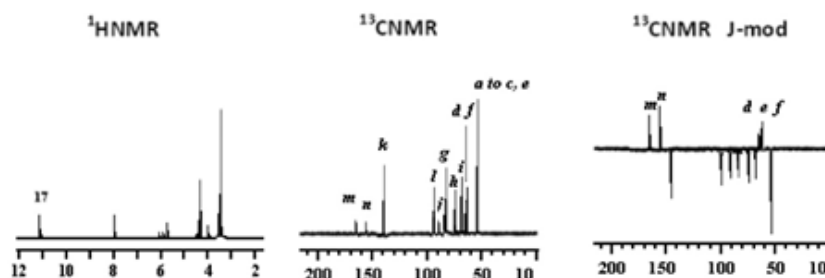


Figure III.2.23 : Spectres RMN ^1H , RMN ^{13}C et APT du DPB

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2. Structures des produits de dégradation

Tableau III.2.3 : Résultats numérique de la RMN de DPB

Proton	Nombre de proton	Multiplicité	δ (ppm)	Carbone	δ (ppm)	APT	
1, 2, 3	9	s	3.23 – 3.76	a, b, c	54.55	CH ₃	–
4	2	t	3.40 – 3.79	d	64.88	CH ₂	+
5	2	t	4.03 – 4.80	e	60.15	CH ₂	+
6	1	s	6.11				
7	2	dd	4.20 – 4.23	f	66.02	CH ₂	+
8	1	ddd	4.25 – 4.28	g	83.54	CH	–
9	1	dd	4.41 – 4.44	h	73.98	CH	–
10	1	s	6.15				
11	1	dd	4.37 – 4.45	i	68.04	CH	–
12	1	s	5.95 – 6.01				
13	1	d	5.88 – 5.92	j	88.56	CH	–
14	1	d	5.90 – 6.11	k	147.77	CH	–
15	1	d	8.01 – 8.11	l	99.05	CH	–
16							
17	1	s	11.23	m	163.20	C	+
				n	154.08	C	+

+ : Vers le haut ; – : Vert le bas

La figure suivante représente la structure de DPB avec l'attribution des positions des protons et carbones.

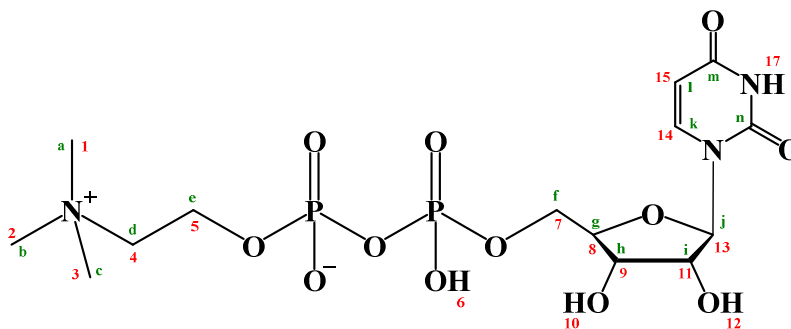


Figure III.2.24 : Structure de DPB avec attribution des positions des protons (en numéros) et des carbones (en lettres)

La formule chimique du DPB est $C_{14}H_{25}N_3O_{12}P_2$ et il est connu sous le nom d'uridine diphosphate choline. Sa dénomination chimique est le 2-(((((((2R,3R,4S,5R)-5-(2,4-dioxo-3,4 dihydropyrimidin-1(2H)-yl) -3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl) méthoxy) (hydroxy) phosphoryl) oxy)oxidophosphoryl)oxy) -N,N,N-triméthyléthan-1-aminium.

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2. Structures des produits de dégradation

III.2.3.5. RMN ^1H ET ^{13}C DU DPC :

Dans la proposition de structure du DPC à partir des spectres UV et de masse, nous notons la présence de la choline et du diphosphate. Les résultats de la RMN sont donnés dans la figure III.2.25 et le tableau III.2.4.

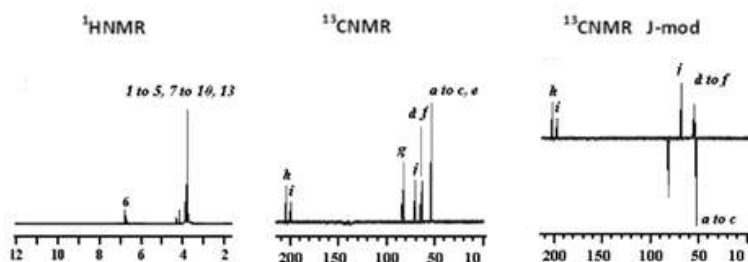


Figure III.2.25 : Spectres RMN ^1H , RMN ^{13}C et APT du DPC

Tableau III.2.4 : Résultats numérique de la RMN de DPC

Proton	Nombre de proton	Multiplicité	δ (ppm)	Carbone	δ (ppm)	APT	
1, 2, 3	9	s	3.23 – 3.76	a, b, c	54.54	CH ₃	–
4	2	t	3.66 – 3.74	d	64.69	CH ₂	+
5	2	t	4.41 – 4.45	e	60.11	CH ₂	+
6	1	s	6.10				
7	2	dd	4.28 – 4.36	f	66.61	CH ₂	+
8	1	dd	4.32 – 4.96	g	82.78	CH	–
				h	205.33	C	+
				i	200.13	C	+
13	2	d	3.85 – 3.97	j	71.22	CH ₂	+

+ : Vers le haut ; – : Vert le bas

En comparant la formule de la CIT et celle de DPC proposée, et les spectres RMN des 2 produits, nous constatons que :

- Le déplacement chimique du proton 13 qui était de 6,04 ppm dans la CIT se retrouve à 3,85 ppm dans DPC.
- Les protons 9, 10, 11 et 12 n'existent pas dans DPC. Ceci s'explique par la transformation du tétrahydrofurane-3,4-diol en furane-3,4 (2H, 5H)-dione.
- Les protons identiques sont ceux des positions 1 à 8.

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2. Structures des produits de dégradation

- Les RMN ^{13}C de DPC et de la CIT ont confirmé l'apparition du cycle furane-3,4 (2H, 5H) -dione. Les déplacements chimiques des carbones notés **h**, **i** et **j** sont à 74.22, 67.44, 89.42 ppm dans la CIT et se retrouvent à 205.33, 200.13 et 71.22 ppm dans le DPC. Ce sont les 2 carbonyles (**h** et **i**) qui expliquent l'absorbance aux environs de 300 nm de DPC.
- En mode APT, les carbones **h**, **i** et **j** sont des carbones primaires CH (vers le bas) dans CIT et différents dans DPC (vers le haut, carbone quaternaire pour **h** et **i** et CH_2 pour **j**).

Ces résultats confirment que la structure proposée pour DPC est correcte [24,29,30].

Nous donnons la structure de DPC avec l'attribution des positions des protons et carbones dans la figure ci-dessous.

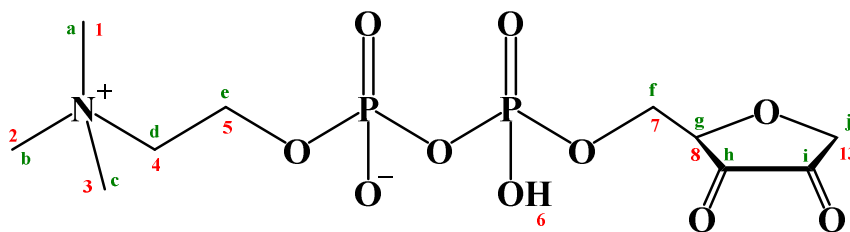


Figure III.2.26 : Structure de DPC avec attribution des positions des protons (en numéros) et des carbones (en lettres)

La formule chimique du troisième produit de dégradation DPC est $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{NO}_{10}\text{P}_2$ et son nom systématique est 2-((((((R)-3,4-dioxotetrahydrofuran-2-yl)méthoxy)(hydroxy)phosphoryl)oxy)oxidophosphoryl)oxy)-N,N,N-triméthyléthan-1-aminium.

III.2.4. CONCLUSION :

La combinaison de la spectroscopie UV, la spectrométrie de masse et la RMN nous a permis d'attribuer à chaque produit de dégradation sa formule chimique :

- DPA est obtenu dans le cas de l'hydrolyse neutre et acide et par photolyse.
- DPB est le résultat de l'hydrolyse basique.
- DPC résulte de l'oxydation de la citocoline.

Nous donnons dans le tableau suivant quelques informations sur la citocoline et ses produits de dégradation :

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2. Structures des produits de dégradation

Tableau III.2.5 : Quelques informations sur la citicoline et ses produits de dégradation :

Composé	Formule chimique	M (g/mol) ⁽¹⁾	logP ⁽²⁾	LogD (pH=3) ⁽²⁾
CIT	C ₁₄ H ₂₆ N ₄ O ₁₁ P ₂	488.3265	- 7.11	- 5.29
DPA	C ₉ H ₁₄ N ₃ O ₈ P	323.1978	-2.92	- 4.61
DPB	C ₁₄ H ₂₅ N ₃ O ₁₂ P ₂	489.3105	- 6.73	- 4.91
DPC	C ₁₀ H ₁₉ NO ₁₀ P ₂	375.2065	- 4.87	- 3.05

(1) À partir de ChemDraw Professional Version 16.0.0.82.

(2) À partir de ChemAxon, <https://chemicalize.com/#/calculation>, consulté le 03/02/2018.

III.2.5. RÉFÉRENCES :

- [1] K. Hirayama, *Handbook of Ultraviolet and Visible Absorption Spectra of Organic Compounds*, Plenum Press Data Division, 1967, USA.
- [2] A.C. Moffat, M.D. Osselton, B. Widdop, *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material*, 4th Ed., Pharmaceutical Press, 2011, USA.
- [3] T. Mills III, J.C. Roberson, C.C. Matchett, M.J. Simon, M.D. Burns, R.J. Ollis, *Instrumental Data for Drug Analysis, Volume 1*, 3rd Ed., CRC Press, 2006, USA.
- [4] A. Tajti, G. Fogarasi, P.G. Szalay, *Chem. Phys. Chem.* 10 (2009) 1603.
- [5] J.J. Fox, L.F. Cavalieri, N. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* 75 (1953) 4315.
- [6] M.M. Stimson, M.A. Reuter, *J. Am. Chem. Soc.* 67 (1945) 2191.
- [7] J. McT. Ploeser, H.S. Loring, *J. Biol. Chem.* 178 (1949) 431.
- [8] D. Voet, W.B. Gratzer, R.A. COX, P. DOTY, *Biopolymers* 1 (1963) 193.
- [9] NIST, *WebBook de Chimie NIST*, SRD 69, Cytosine, <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C71307&Units=SI&Mask=400#UV-Vis-Spec>, consulté le 20/10/2017.
- [10] NIST, *WebBook de Chimie NIST*, SRD 69, Cytidine, <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C65463&Units=SI&Mask=400#UV-Vis-Spec>, consulté le 20/10/2017.

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2. Structures des produits de dégradation

- [11] C.W. Gehrke, K.C.T. Kuo, *Chromatography and Modification of Nucleosides Part A : Analytical Methods for Major and Modified Nucleosides HPLC, GC, MS, NMR, UV and FT-IR*, Elsevier Science Publishers B.V, 1990, The Netherlands.
- [12] H-W. Dibbern, R.M. Müller, E. Wirbitzki, *UV and IR Spectra of Pharmaceutical Substances and IR Spectra of Pharmaceutical and Cosmetic Excipients*, Editio Cantor Verlag, 2002, Germany.
- [13] NIST, *WebBook de Chimie NIST*, SRD 69, Uracile, <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C66228&Units=SI&Mask=400#UV-Vis-Spec>, consulté le 20/10/2017.
- [14] NIST, *WebBook de Chimie NIST*, SRD 69, Uridine, <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C58968&Units=SI&Mask=400#UV-Vis-Spec>, consulté le 20/10/2017.
- [15] Robert L. Sinsheimer, *Radiat. Res.* 1 (1954) 505.
- [16] C. Seto, J.S. Grossert, D.S. Waddell, J.M. Curtis, R.K. Boyd, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 21 (2001) 571.
- [17] J.G. Kang, L.A. Hick, W.E. Price, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 857.
- [18] A. Galezowska, M.W. Harrison, J.M. Herniman, C-K. Skylaris, G.J. Langley, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27 (2013) 964.
- [19] MoNA, *MassBank of North America (MoNA)*, Spectrum PR100122 for Cytidine 5'-diphosphocholine, <http://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/display/PR100122>, consulté 29/09/2017.
- [20] The Metabolomics Innovation Centre (TMIC), *The Human Metabolome Database (HMDB)*, Citicoline, HMDB0001413, http://www.hmdb.ca/spectra/ms_ms/5287, consulté le 29/09/2017.
- [21] The Metabolomics Innovation Centre (TMIC), *The Human Metabolome Database (HMDB)*, Cytidine monophosphate, HMDB0000095, http://www.hmdb.ca/spectra/ms_ms/179694, consulté le 24/10/2017.
- [22] The Metabolomics Innovation Centre (TMIC), *The Human Metabolome Database (HMDB)*, Uridine 5'-diphosphate, HMDB0000295, http://www.hmdb.ca/spectra/ms_ms/179256, consulté le 24/10/2017.

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

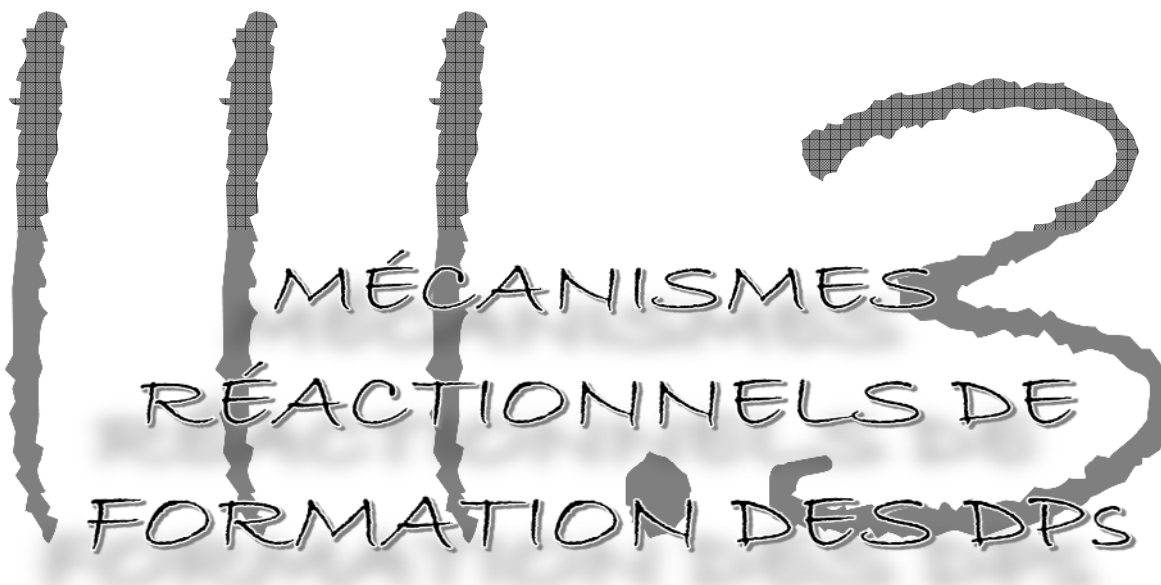
2. Structures des produits de dégradation

- [23] L.B Townsend, *Chemistry of Nucleosides and Nucleotides, Volume 1*, Plenum Press, 1988, USA.
- [24] C.J. Burrows, J.G. Muller, *Chem. Rev.* 98 (1998) 1109.
- [25] K.E. Pfitzner, J.G. Moffatt, *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963) 3027.
- [26] K.E. Pfitzner, J.G. Moffatt. *J. Am. Chem. Soc.* 87 (1965) 5661.
- [27] L.R. Subbaraman, J. Subbaraman, E.J. Behrman, *J. Org. Chem.* 36 (1971) 1256.
- [28] E. Pretsch, P. Bühlmann, M. Badertscher, *Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data*, 4th Ed., Springer-Verlag, 2009, Germany.
- [29] C.A.G. Haasnoot, F.A.A.M. de Leeuw, H.P.M. de Leeuw, C. Altona, *Org. Magn. Resonance* 15 (1981) 43.
- [30] A.I. Kishore, M.R. Mayer, J.H. Prestegard, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) e164.
- [31] W. Guschlbauer, K. Jankowski, *Nucleic Acids Res.* 8 (1980) 1421.
- [32] The Metabolomics Innovation Centre (TMIC), *The Human Metabolome Database (HMDB)*, citicoline, HMDB0001413, http://www.hmdb.ca/spectra/nmr_one_d/1702#spectrum, http://www.hmdb.ca/spectra/nmr_two_d/1643, consultés le 24/10/2017.
- [33] The Worldwide Protein Data Bank (wwPDB), *Biological Magnetic Resonance Data Bank*, CDP, bmse000272, http://bmrw.wisc.edu/metabolomics/mol_summary/show_data.php?id=bmse000272&whichTab=1, consultés le 24/10/2017.
- [34] The Metabolomics Innovation Centre (TMIC), *The Human Metabolome Database (HMDB)*, Phosphorylcholine, HMDB0001565, http://www.hmdb.ca/spectra/nmr_one_d/1733, http://www.hmdb.ca/spectra/nmr_two_d/1674, consulté le 14/10/2017.
- [35] Bio-Rad, *SpectraBase*, Choline, 8APxsNbVuOH, <https://spectrabase.com/compound/8APxsNbVuOH>, consulté le 24/10/2017.
- [36] Bio-Rad, *SpectraBase*, Cytidine 5'-monophosphate, AJP2inClfii, <https://spectrabase.com/compound/AJP2inClfii>, consulté le 24/10/2017.
- [37] The Metabolomics Innovation Centre (TMIC), *The Human Metabolome Database (HMDB)*, Cytidine monophosphate, HMDB0000095, http://www.hmdb.ca/spectra/nmr_one_d/1081, http://www.hmdb.ca/spectra/nmr_one_d/4886, http://www.hmdb.ca/spectra/nmr_two_d/1139, http://www.hmdb.ca/spectra/nmr_one_d/4887, consultés le 24/10/2017.

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2. Structures des produits de dégradation

- [38] The Worldwide Protein Data Bank (wwPDB), *Biological Magnetic Resonance Data Bank*, Cytidine-5'-monophosphate, bmse000311, http://bmrw.wisc.edu/metabolomics/mol_summary/show_data.php?id=bmse000311, consulté le 14/10/2017.
- [39] F.E. Hruska, D.J. Wood, R.J. Mynott, R.H. Sarma, *FEBS Lett.* 31 (1973) 153
- [40] A. Bagno, F. Rastrelli, G. Saielli, *Magn. Reson. Chem.* 46 (2008) 518
- [41] H.H. Mantsch, I.C.P. Smith, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46 (1972) 808
- [42] H. Remin, D. Shugar, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48 (1972) 636.
- [43] R.U. Lemieux, T.L. Nagabhushan, B. Paul, *Can. J. Chem.* 50 (1972) 773.
- [44] Bio-Rad, *SpectraBase*, Uridine 5'-diphosphate, euqmm81JY5, <https://spectrabase.com/compound/euqmm81JY5>, consulté le 24/10/2017.
- [45] The Metabolomics Innovation Centre (TMIC), *The Human Metabolome Database (HMDB)*, Uridine 5'-diphosphate, HMDB0000295, http://www.hmdb.ca/spectra/nmr_one_d/1318, http://www.hmdb.ca/spectra/nmr_one_d/4834, http://www.hmdb.ca/spectra/nmr_one_d/4835, http://www.hmdb.ca/spectra/nmr_two_d/1260, consultés le 24/10/2017.
- [46] The Worldwide Protein Data Bank (wwPDB), *Biological Magnetic Resonance Data Bank*, UDP, bmse000266, http://bmrw.wisc.edu/metabolomics/mol_summary/show_data.php?id=bmse000266&whichTab=1, consulté le 24/10/2017.
- [47] The Metabolomics Innovation Centre (TMIC), *The Human Metabolome Database (HMDB)*, Uridine 5'-monophosphate, HMDB0000288, http://www.hmdb.ca/spectra/nmr_one_d/4745, http://www.hmdb.ca/spectra/nmr_two_d/1256, http://www.hmdb.ca/spectra/nmr_one_d/4744, http://www.hmdb.ca/spectra/nmr_one_d/1313, consultés le 24/10/2017.

A large, stylized number '1112' is rendered in a dark, textured, hand-drawn style. The number is positioned in the upper half of the page. The text 'MÉCANISMES RÉACTIONNELS DE FORMATION DES DPS' is overlaid on the number, centered horizontally and spanning across the middle of the '1112' shape.

MÉCANISMES
RÉACTIONNELS DE
FORMATION DES DPS

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3. Mécanismes réactionnels de formation des DPs

III.3. MÉCANISMES RÉACTIONNELS DE FORMATION DES DPs

III.3.1. MÉCANISMES DE FORMATION DU DPA :

III.3.1.1. MÉCANISME DE FORMATION DU DPA EN MILIEU NEUTRE :

Le mécanisme de formation du DPA est une addition nucléophile suivie par une décomposition, similaire à celle effectuée sur un carbonyle. La molécule d'eau (nucléophile) attaque, par les doublets non liants de l'oxygène, le phosphore porteur d'une charge partielle δ^+ (électrophile) de part la polarisation de la liaison phosphore-oxygène vers ce dernier plus électronégatif.

Trois mécanismes ont été proposés pour expliquer cette réaction, les deux premiers (M1 et M2) impliquant l'attaque de l'eau sur les phosphores A et B et le troisième (M3) débute par l'attaque de l'eau sur le carbone 2 de la choline. Ces sites d'attaques ont été confirmés par marquage isotopique (H_2O^{18}) [1-17] et sont représentés dans la figure suivante :

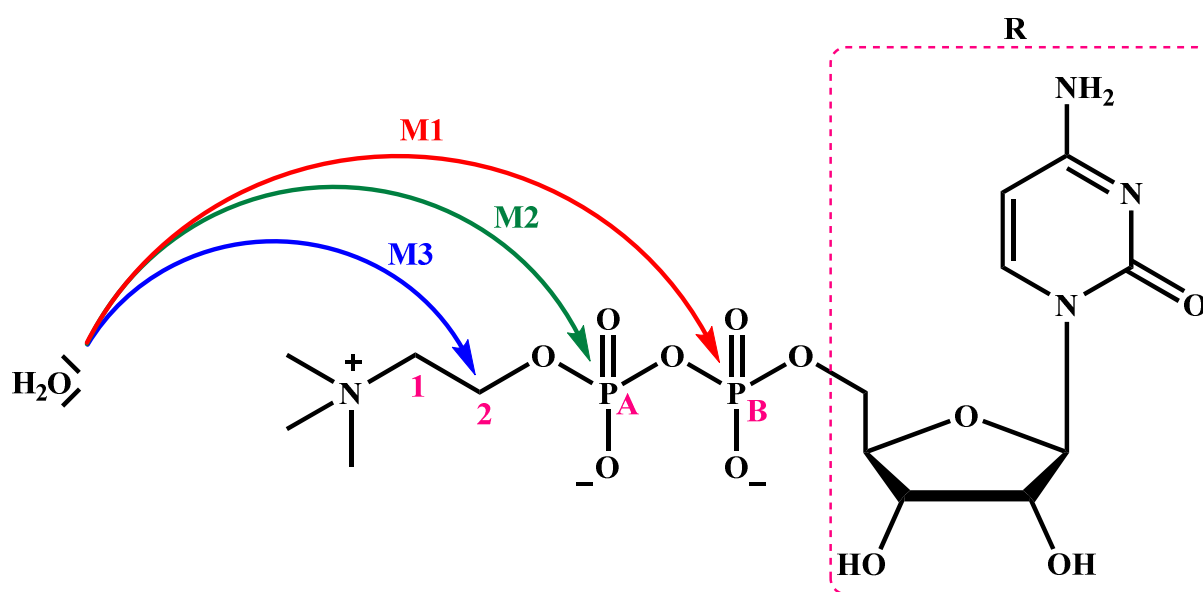


Figure III.3.1 : Les sites d'attaque de la molécule d'eau dans la réaction de l'hydrolyse

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3. Mécanismes réactionnels de formation des DPs

III.3.1.1.1. Mécanisme réactionnel (M1) :

La molécule d'eau attaque le phosphore B (1) qui devient pentavalent avec cinq liaisons simples (2). Dans cet état, le phosphore est hybridé sp^3d et occupe le centre d'un hexaèdre bipyramidal dans lequel le nucléophile et le groupement partant sont alignés et occupent les deux sommets tandis que les autres groupements restants forment la base triangulaire de la bipyramide.

Après un transfert de proton, le phosphore entouré de plusieurs groupements attracteurs (3) devient instable et une réaction d'élimination s'en suit pour former le produit de dégradation A (4).

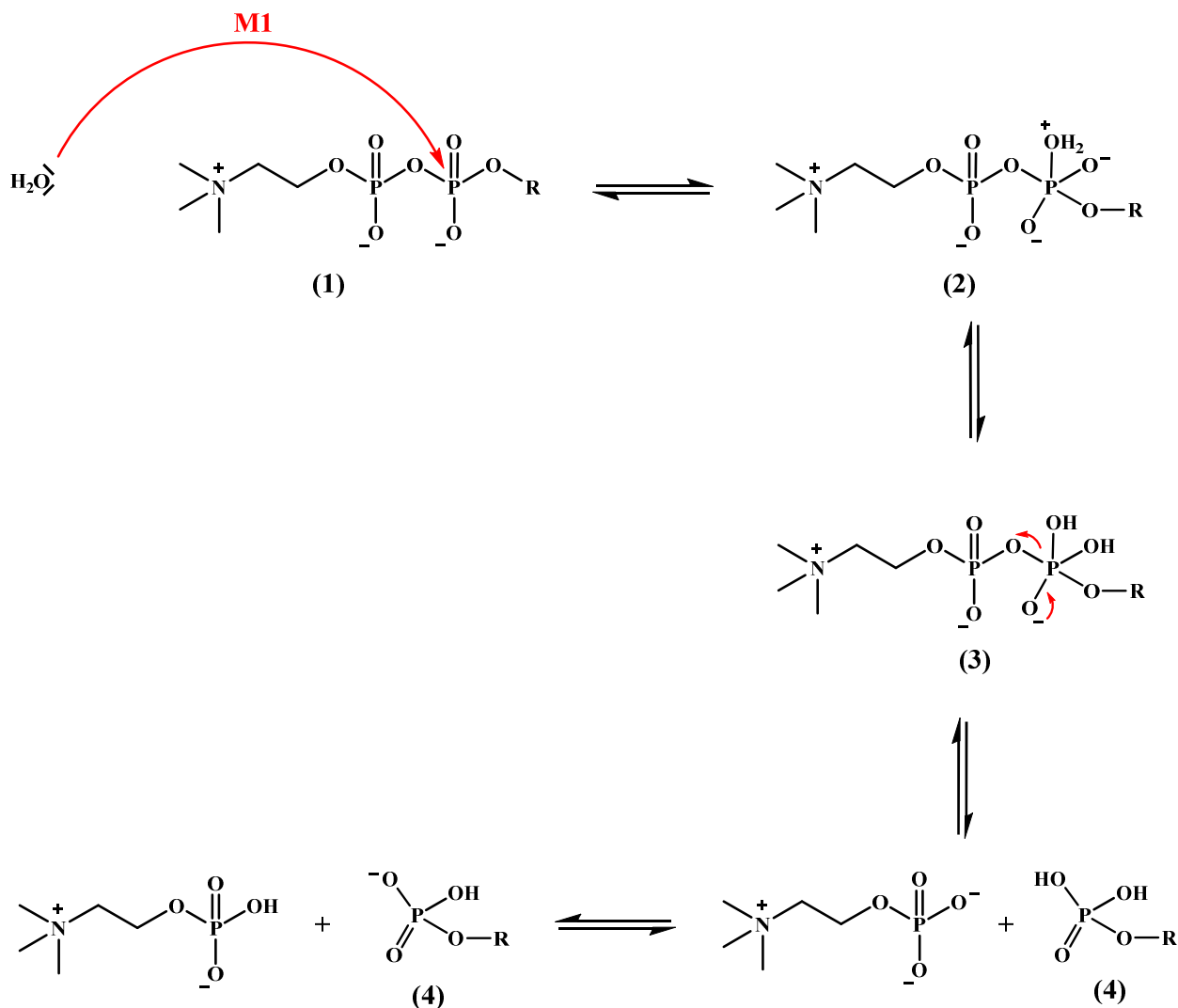


Figure III.3.2 : Mécanisme réactionnel (M1) de formation du DPA

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3. Mécanismes réactionnels de formation des DPs

III.3.1.1.2. Mécanisme réactionnel (M2) :

Le deuxième mécanisme implique l'attaque de la molécule d'eau sur le phosphore A (1). Nous pouvons envisager deux cas, le premier est similaire au mécanisme précédent. Le deuxième donne un diphosphate (4) par le départ de la choline qui s'hydrolyse par la suite pour donner l'acide cytidilique (6).

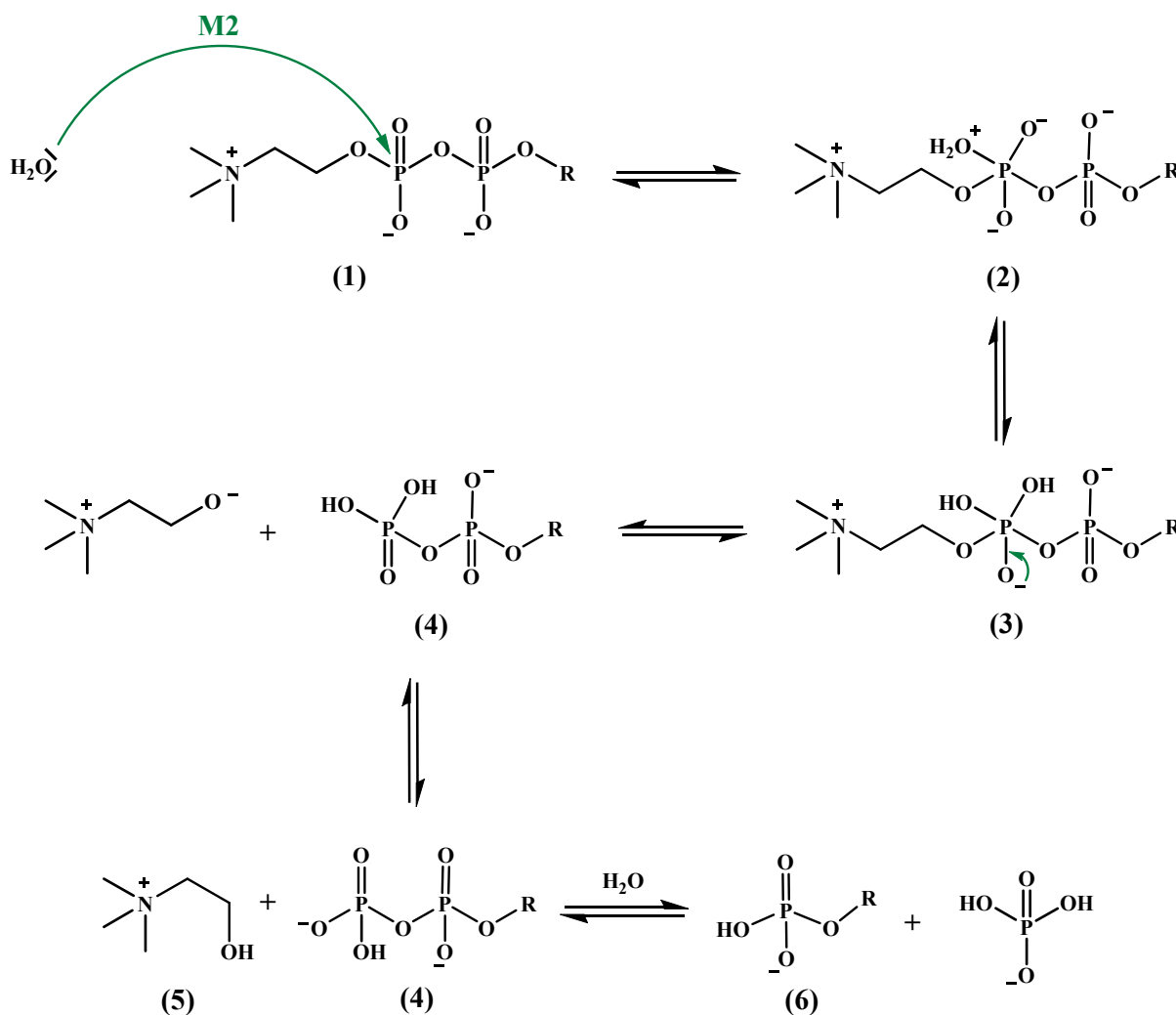


Figure III.3.3 : Mécanisme réactionnel (M2) de formation du DPA

III.3.1.1.3. Mécanisme réactionnel (M3) :

Le troisième mécanisme implique l'attaque de la molécule d'eau sur le carbone 2 de la choline (1) pour former la cytidine diphosphate (2) et la choline (5) obtenue après déprotonation du composé (3). Le composé (4) obtenu après protonation du composé (2) subit une hydrolyse pour donner le DPA (6).

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3. Mécanismes réactionnels de formation des DPs

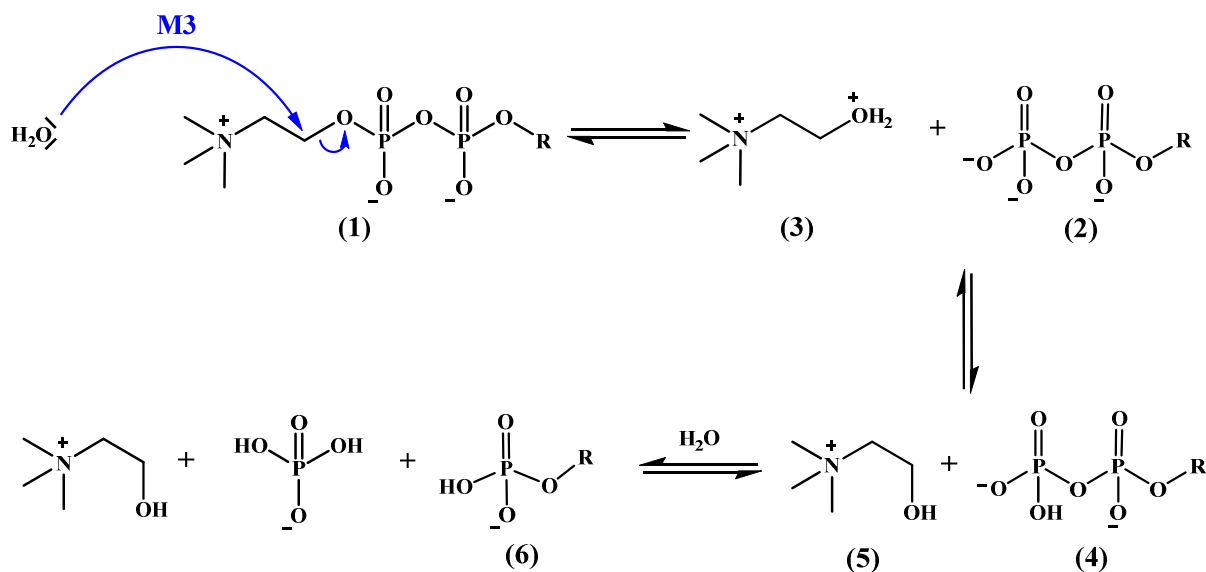


Figure III.3.4 : Mécanisme réactionnel (M3) de formation du DPA

V.R. Patel [18] et J.A. Patel [19] et leurs collaborateurs ont obtenu le même composé.

III.3.1.2. MÉCANISME DE FORMATION DU DPA EN MILIEU ACIDE :

En milieu acide, les protons catalysent la réaction en augmentant la réactivité du phosphoryle. A pH = 1, la forme acide de la citicoline est prédominante (1). La protonation de l'oxygène du phosphoryle B implique la formation d'une charge positive sur l'oxygène (2) qui va donc attirer les deux électrons de la double liaison pour se stabiliser (3). Le phosphore devient plus électrophile et est facilement attaqué par la molécule d'eau (4) et forme le produit de dégradation DPA (5) suite à une attaque nucléophile de l'eau et la rupture de la liaison entre les deux phosphates.

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3. Mécanismes réactionnels de formation des DPs

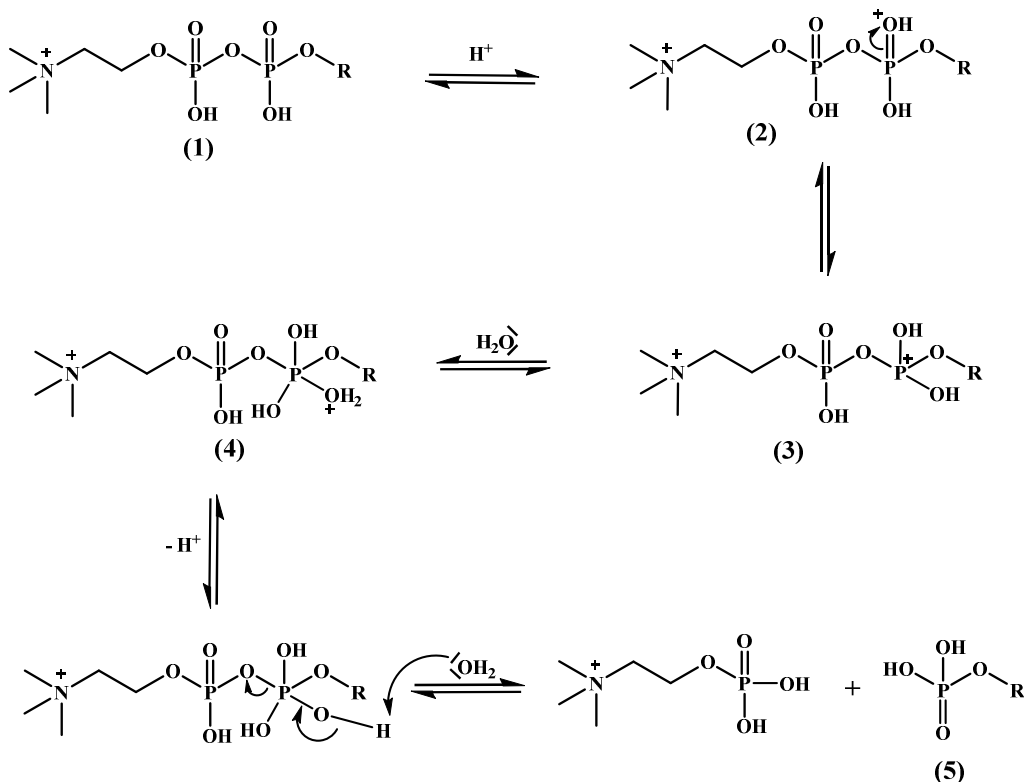


Figure III.3.5 : Mécanisme réactionnel M1 de formation du DPA en milieu acide

Dans le cas où le phosphoryle A est protoné (5), nous pouvons envisager le mécanisme M2. La stabilisation du phosphore par effet mésomère donneur de l'oxygène (6) augmente la réactivité du carbone 2 de la choline ce qui donne le produit DPA selon le mécanisme M3.

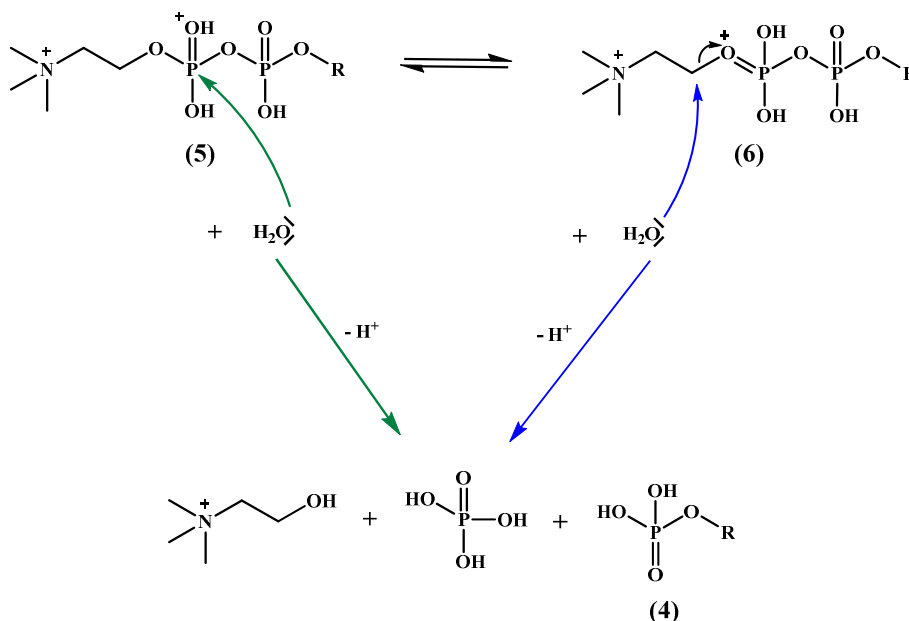


Figure III.3.6 : Mécanismes réactionnels (M2 et M3) de formation du DPA en milieu acide

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3. Mécanismes réactionnels de formation des DPS

Le même produit a été obtenu par V.R. Patel [18] et J.A. Patel [19].

III.3.1.3. MÉCANISME DE FORMATION DU DPA PAR PHOTOLYSE :

Si la citicoline a formé le composé DPA par photolyse, cela indique qu'une réaction d'hydrolyse a lieu et le mécanisme est le même comme décrit dans la partie III.3.1.1 [20].

III.3.2. MÉCANISME DE FORMATION DU DPB :

Le produit de dégradation B est obtenu dans le cas d'une hydrolyse basique et sa formation implique la transformation de la base nucléique cytosine en uracile.

Cette transformation appelée désamination a été étudiée par Shapiro et al. [21] sur les dérivés de la cytosine. C'est une addition nucléophile sur la double liaison C5-C6 de la base pyrimidique. Le nucléophile (1) attaque le carbone en position 6 en raison de sa plus grande réactivité comme décrit dans la littérature [22] pour former le composé (2). Un équilibre de tautomérie transforme l'énamine en imine (3). Cette dernière est attaquée par l'ion hydroxyde et son carbone devient hybridé sp^3 (4). La présence de plusieurs groupements attracteurs portés par ce carbone facilite la réaction d'élimination de l'amine (déamination) pour former une cétone (5). Le carbone C5 porte un hydrogène en alpha d'un carbonyle, donc c'est un hydrogène labile (acide). La présence d'une fonction alcool en bêta du carbonyle favorise une déshydratation et le cycle uracile est ainsi formé (6).

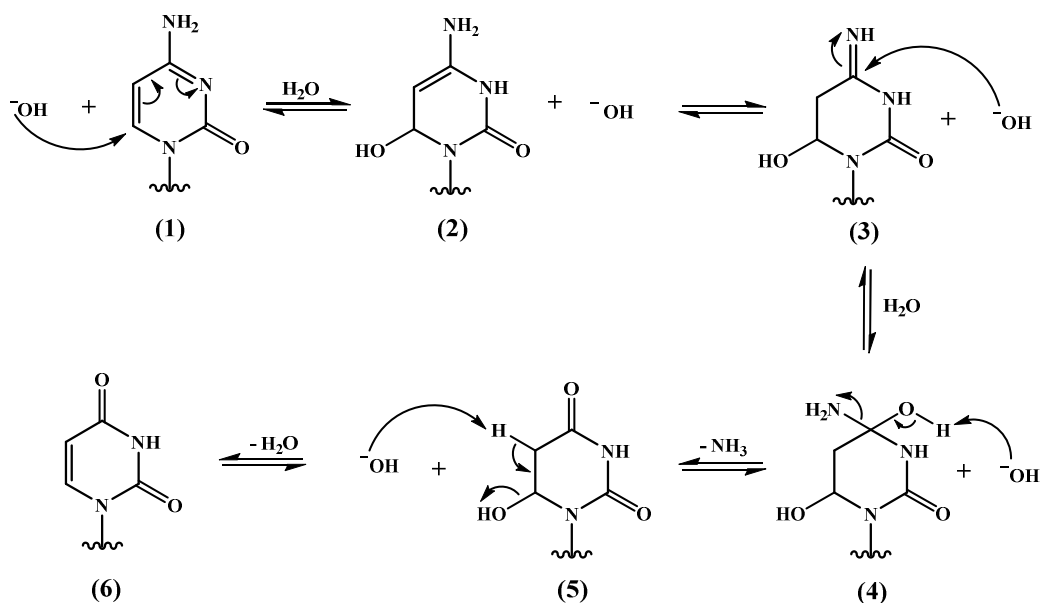


Figure III.3.7 : Mécanisme réactionnel de formation du DPB en milieu basique

O.A. Mahmoud et al. ont trouvé le même composé DPB dans l'attaque basique [23].

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3. Mécanismes réactionnels de formation des DPS

III.3.3. MÉCANISME DE FORMATION DE DPC :

Ce produit est obtenu par le clivage de la liaison glycosidique avec le cycle pyrimidine suivi par une oxydation des alcools secondaires du ribose pour donner une dicétone.

Dans le cas de la dégradation oxydative par le peroxyde d'hydrogène, l'amine et l'alcool sont des fonctions oxydables. Les amines primaires, secondaires et aromatiques sont moins nucléophiles comparativement aux amines tertiaires aliphatiques. Lorsque le doublet non liant de l'azote est conjugué, sa réactivité diminue considérablement.

Le ribose possède des groupements sensibles à l'oxydation : les alcools secondaires. Ces derniers sont oxydés en cétones [22,24]. Pfitzner et Moffatt [25,26] ont préparé le 2'-céto-3'-deoxyuridine par oxydation du 3'-deoxyarabinosyluracile. Cette oxydation est suivie par un clivage de la liaison glycosidique. Nous notons qu'ils ont utilisé un nucléoside avec un 2'-désoxyribose et dans notre cas, les deux positions 2' et 3' du ribose portent une fonction alcool. L'absence d'un autre pic dans le chromatogramme montre que l'hétérocycle azoté a été totalement détruit par l'eau oxygénée pour donner une molécule d'urée, deux molécules d'acide formique et une molécule de formamide [27].

III.3.4. RÉFÉRENCES :

- [1] D.E. Koshland, E. Clarke, *J. Biol. Chem.* 205 (1953) 917.
- [2] J.M. Rainey, M.M. Jones, W.L. Lockhart, *J. Inorg. Nucl. Chem.* 26 (1964) 1415.
- [3] F.H. Westheimer, *Science* 235 (1987) 1173.
- [4] A.A. Baykov, A.S. Shestakov, *Eur. J. Biochem.* 206 (1992) 463.
- [5] J. Visscher, A.W. Schwartz, *Nucleic Acids Res.* 20 (1992) 5749.
- [6] M.E. Colvin, E. Evleth, Y. Akacem, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 4357.
- [7] J. Hong, N. Yoshida, S-H. Chong, C. Lee, S. Ham, F. Hirata, *J. Chem. Theory Comput.* 8 (2012) 2239.
- [8] D. Mistry, N. Powles, *Org. Biomol. Chem.* 11 (2013) 5727.
- [9] C.H. Bamford, C.F.H. Tipper, *Comprehensive Chemical Kinetics, Volume 10 : Ester Formation and Hydrolysis and Related Reactions*, Elsevier Publishing Company, 1972, Netherlands.
- [10] G. Rutherford, A.R. Morgan, *Can. J. Biochem.* 50 (1972) 287.
- [11] G.P. Haight, *Coord. Chem. Rev.* 79 (1987) 293.

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3. Mécanismes réactionnels de formation des DPS

- [12] A.J. Kirby, M. Younas, *J. Chem. Soc. B : Phys. Org.* (1970) 510.
- [13] S.A. Khan, A.J. Kirby, *J. Chem. Soc. B : Phys. Org.* (1970) 1172.
- [14] P.M. Dewick, *Essentials of Organic Chemistry : for Students of Pharmacy, Medicinal Chemistry and Biological Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, 2006, England.
- [15] J.K. Lassila, J.G. Zalatan, D. Herschlag, *Annu. Rev. Biochem.* 80 (2011) 669.
- [16] J.R. Cox, B. Ramsay, *Chem. Rev.* 64 (1964) 317.
- [17] K. Drauz, H. Waldmann, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis : A Comprehensive Handbook*, 2nd Ed., Wiley-VCH Verlag GmbH, 2002, Federal Republic of Germany.
- [18] V.R. Patel, A.M. Prajapati, *Inventi Rapid - Pharm Analysis & Quality Assurance*, July-September (2013) 894.
- [19] J.A. Patel, B. Panigrahi, C.N. Patel, B. Ramalingan, *Chron. Young Sci.* 2 (2011) 150.
- [20] H. Becker, J.C. LeBlanc, H.E. Johns, *Photochem. Photobiol.* 6 (1967) 733.
- [21] R. Shapiro, V. DeFate, M. Welcher, *J. Am. Chem. Soc.* 96 (1974) 906.
- [22] L.B. Townsend, *Chemistry of Nucleosides and Nucleotides, Volume 1*, Plenum Press, 1988, USA.
- [23] O.A. Mahmoud, M.A. Hegazy, H. Salem, A.A. Moustafa, *J. Planar Chromatogr. - Mod. TLC* 28 (2015) 241.
- [24] C.J. Burrows, J.G. Muller, *Chem. Rev.* 98 (1998) 1109.
- [25] K.E. Pfitzner, J.G. Moffatt, *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963) 3027.
- [26] K.E. Pfitzner, J.G. Moffatt, *J. Am. Chem. Soc.* 87 (1965) 5661.
- [27] L.R. Subbaraman, J. Subbaraman, E.J. Behrman, *J. Org. Chem.* 36 (1971) 1256.
- [28] F.T. Liu, N.C. Yang, *Biochemistry* 17 (1978) 4877.
- [29] W. Peng, B.R. Shaw, *Biochemistry* 35 (1996) 10172.
- [30] E. Privat, L.C. Sowers, *Chem. Res. Toxicol.* 9 (1996) 745.
- [31] W.J. de Bruyn, L.F. Salter, *J. Photochem. Photobiol. A : Chem.* 63 (1992) 349.
- [32] H.E. Johns, J.C. LeBlanc, K.B. Freeman, *J. Mol. Biol.* 13 (1965) 849.
- [33] Y. Barak, O. Cohen-Fix, Z. Livneh, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 24174.
- [34] J-L. Ravanat, T. Douki, J. Cadet, *J. Photochem. Photobiol. B : Biol.* 63 (2001) 88.
- [35] K.C. Smith, *Photochem. Photobiol.* 2 (1963) 503.

A large, stylized number '1114' is rendered in a dark, textured, hand-drawn style. The number is positioned behind the text, with the '1's on the left and the '4' on the right.

VALIDATION DE LA
MÉTHODE
CHROMATOGRAPHIQUE

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

4. validation de la méthode chromatographique

III.4. VALIDATION DE LA MÉTHODE CHROMATOGRAPHIQUE

III.4.1. VALIDATION :

La validation permet de confirmer que la méthode analytique est fiable pour l'usage pour lequel elle a été développée [1-3].

III.4.2. VALIDATION DE LA MÉTHODE DE DOSAGE DE ROUTINE :

III.4.2.1. SPÉCIFICITÉ :

Afin de vérifier l'absence des interférents dus aux constituants du placebo avec le principe actif, une solution du placebo et une autre du principe actif ont été injectées et leurs chromatogrammes ont été comparés. Les résultats sont représentés dans la figure III.4.1.

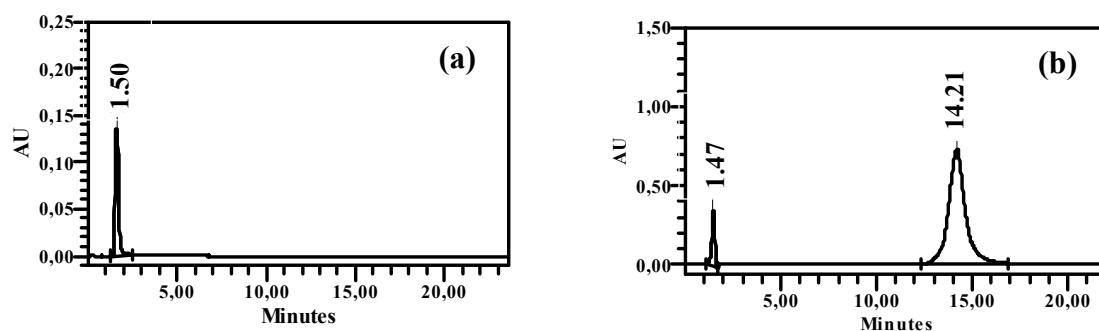


Figure III.4.1 : (a) Chromatogramme du placebo et (b) chromatogramme du principe actif

D'après ces figures, nous constatons qu'il n'y a aucun pic dans le chromatogramme du placebo au même temps que le pic de la citicoline. Cela confirme l'absence d'interférence et indique que la méthode est spécifique.

III.4.2.2. LINÉARITÉ :

Cette étape permet de trouver un domaine de concentration dans lequel la variation de la surface du pic avec la concentration est linéaire, ce qui ramène à dire que $S = k * C$, avec :

S : Surface du pic

k : Facteur de proportionnalité

C : Concentration de la solution

Dans le domaine étudié (100-300 $\mu\text{g/ml}$) qui correspond à l'intervalle 50-150% avec des incréments de 25%, chaque solution a été injectée cinq fois et la courbe représentant les surfaces des pics (S) en fonction des concentrations (C) est représentée dans la figure suivante :

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

4. validation de la méthode chromatographique

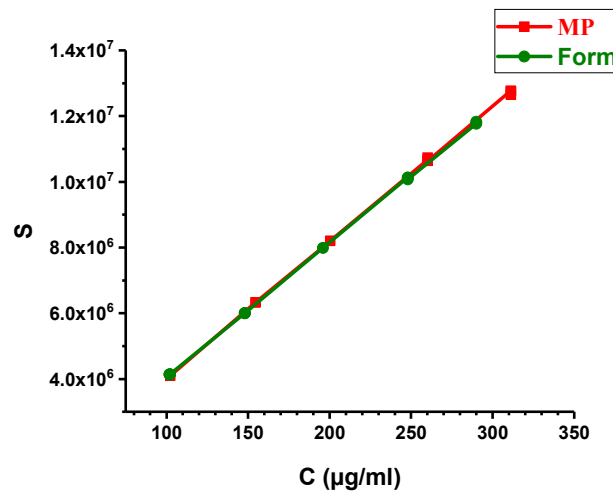


Figure III.4.2 : Courbe de la linéarité de la matière première (MP) et de la formulation (Form)

L'analyse de cette courbe (MP) a montré que le carré du coefficient de corrélation est de **0,9998** indiquant une bonne linéarité.

En répétant la même chose sur une formulation préparée dans le laboratoire (Form), nous avons trouvé une droite ($R^2 = 0.9999$) superposable à la droite précédente indiquant que le placebo n'interfère pas avec le principe actif. Les équations des deux droites sont les suivantes :

Pour la matière première : $S = 41219 * C - 69679$

Pour la formulation : $S = 40778 * C - 19150$

Pour vérifier le modèle (régression linéaire simple), nous avons calculé les valeurs des tests statistiques suivants :

✓ **Test de l'existence d'une pente significative (test de Fisher) :**

Ce test permet de vérifier si la pente est différente de zéro ou non. Dans le cas positif (pente $\neq 0$), il existe une relation (dépendance) entre les deux variables de la courbe (concentration et surface du pic). L'intervalle de confiance ne contient pas le 0.

✓ **Test de validité de la droite de régression (test de Fisher) :**

Ce test permet de dire que l'ajustement de la droite de régression est valide ou non.

✓ **Test sur l'ordonnée à l'origine (test de Student) :**

Ce test vérifie si l'ordonnée à l'origine est significative ($b \neq 0$) ou non significative ($b = 0$). Si l'hypothèse nulle est vraie, l'intervalle de confiance contient le 0.

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

4. validation de la méthode chromatographique

✓ **Test d'homogénéité des variances (test de Cochran) :**

Ce test sert à vérifier l'homogénéité des variances.

Les tableaux suivants regroupent les résultats des tests statistiques :

Tableau III.4.1 : Tests de Fisher, Student et Cochran

Test l'existence d'une pente			
$F_{théorique} 5\%$ $F(0.95,1,13)$	$F_{calculé}$	Condition	Conclusion
4.67	MP : 73137.43	$F_{calculé} > F_{théorique}$	Existence d'une pente significative différente de 0 au risque de 5%
	Form : 217305.37		
Test de validité de la droite de régression			
$F_{théorique} 5\%$ $F(0.95,3,10)$	$F_{calculé}$	Condition	Conclusion
3.71	MP : 3.71	$F_{calculé} < F_{théorique}$	l'ajustement de la droite de régression est valide au risque de 5%
	Form : 2.33		
Test sur l'ordonnée à l'origine			
$t_{théorique} 5\%$ $t(0.95,13)$	$t_{calculé}$	Condition	Conclusion
2.16	MP : 2.09	$t_{calculé} < t_{théorique}$	L'ordonnée à l'origine n'est pas significative pour un risque de 5%
	Form : 1.05		
Test d'homogénéité des variances			
$C_{théorique} 5\%$ $C(0.95,5,2)$	$C_{calculé}$	Condition	Conclusion
0.68	MP : 0.61	$C_{calculé} < C_{théorique}$	Les variances sont homogènes au risque de 5%
	Form : 0.55		

Tableau III.4.2 : Intervalles de confiance

	Pente	Intervalle de confiance	Ordonnée à l'origine	Intervalle de confiance
MP	41219	[40890 – 41548]	-69679	[-141671 – 2312]
Form	40778	[40589 – 40967]	-19150	[-58459 – 20158]

D'après ces deux tableaux, nous constatons que les valeurs obtenues sont dans les normes, ce qui indique que le modèle est satisfaisant.

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

4. validation de la méthode chromatographique

III.4.2.3. FIDÉLITÉ :

La fidélité permet de dire si une méthode analytique peut être utilisée par n'importe quel analyste, à n'importe quel jour et à n'importe quel endroit par n'importe quel instrument avec des erreurs de manipulation très faibles, ce qui permet d'universaliser la méthode.

Le principe est basé sur le calcul des coefficients de variation RSDs entre deux manipulateurs dans deux jours successifs.

Les résultats sont donnés dans le tableau suivant :

Tableau III.4.3 : Résultats de la fidélité

RSD intra jour	1.96%
RSD inter jour	1.16%
RSD totale	1.58%

D'après le tableau, les erreurs expérimentales sont faibles (RSDs < 2%) indiquant que la méthode est fidèle.

III.4.2.4. EXACTITUDE :

Une méthode peut être fidèle, les valeurs sont très proches l'une de l'autre, mais sont-elles exactes ? Nous devons les comparer avec une valeur de référence, c'est le test de l'exactitude.

Le résultat obtenu est 99.90 ± 0.80 % montre que la méthode développée est exacte.

III.4.2.5. LIMITE DE DÉTECTION (LOD) ET LIMITE DE QUANTIFICATION (LOQ) :

Les résultats sont basés sur les relations suivantes :

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

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

Des valeurs de 0.03 µg/ml pour LOD et 0.11 µg/ml pour LOQ ont été obtenues.

III.4.2.6. STABILITÉ DES SOLUTIONS :

Les solutions ont montré une stabilité de 8 jours à 4°C et à température ambiante.

III.4.2.7. DOSAGE DU PRODUIT FINI :

La méthode validée a été utilisée pour doser la citicoline dans une préparation pharmaceutique.

Le tableau suivant donne les résultats de l'analyse :

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

4. validation de la méthode chromatographique

Tableau III.4.4 : Résultats de dosage de la citicoline dans une préparation pharmaceutique

	Analyse 1 (mg/ml)	Analyse 2 (mg/ml)	Analyse 3 (mg/ml)	Moyenne (mg/ml)	RSD (%)
Echantillon 1	101.05	100.99	101.14	101.06	0.07
Echantillon 2	101.06	101.28	101.32	101.22	0.14
Echantillon 3	97.36	96.95	96.39	96.90	0.49
Echantillon 4	99.41	99.89	99.98	99.76	0.31
Echantillon 5	101.37	100.63	101.18	101.06	0.38

La valeur moyenne est de 100.00 ± 1.83 mg/ml appartient au domaine [95.00 – 105.00] mg/ml, donc le produit est conforme.

III.4.3. VALIDATION DE LA MÉTHODE DE DÉGRADATION :

III.4.3.1. SPÉCIFICITÉ :

Nous avons démontré dans la partie III.1.2 que la méthode est spécifique.

III.4.3.2. LINÉARITÉ, FIDÉLITÉ, EXACTITUDE, LOD ET LOQ :

Le tableau suivant regroupe les résultats de la linéarité, la fidélité, l'exactitude, LOD et LOQ :

Tableau III.4.5 : Résultat de la linéarité, la fidélité, l'exactitude, LOD et LOQ

Composé		DPA	DPB	DPC
Test				
Linéarité	C ($\mu\text{g/ml}$)	1.00 – 4.00		
	Equation de la droite	$93966 * C + 99$	$386497 * C + 12$	$94057 * C + 160$
	R ²	0.9999	0,9999	0.9999
Fidélité (RSD %)	Intra jour	1.88	2.11	1.99
	Inter jour	2.27	1.98	1.77
Exactitude (%)		99.10 ± 0.90	99.40 ± 1.04	99.00 ± 0.64
LOD ($\mu\text{g/ml}$)*		0.23	0.08	0.17
LOQ ($\mu\text{g/ml}$)*		0.76	0.28	0.57

* : LOD et LOQ sont calculés à 270 nm pour DPA et DPB et à 300 nm pour DPC.

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

4. validation de la méthode chromatographique

Le tableau ci-dessus montre de bons résultats pour les trois composés avec des valeurs un peu élevées de la fidélité intermédiaire (inter jour : 2.27%) pour DPA et de la répétabilité (intra jour : 2.11%) pour DPB. L'explication donnée est la faible quantité d'impuretés récupérées.

Nous donnons dans le tableau suivant les résultats des tests statistiques pour les courbes de linéarité de DPA, DPB et DPC.

Tableau III.4.6 : Résultats des tests statistiques

Test l'existence d'une pente			
$F_{théorique} 5\%$ F(0.95,1,13)	$F_{calculé}$	Condition	Conclusion
4.67	DPA : 2806755.22	$F_{calculé} > F_{théorique}$	La relation entre la concentration et la surface du pic est significative au risque de 5%
	DPB : 47517594.26		
	DPC : 1082737.85		
Test de validité de la droite de régression			
$F_{théorique} 5\%$ F(0.95,3,10)	$F_{calculé}$	Condition	Conclusion
3.71	DPA : 0.99	$F_{calculé} < F_{théorique}$	L'ajustement de la droite de régression est valide au risque de 5%
	DPB : 0.98		
	DPC : 4.24		
Test sur l'ordonné à l'origine			
$t_{théorique} 5\%$ t(0.95,13)	$t_{calculé}$	Condition	Conclusion
2.16	DPA : 0.08	$t_{calculé} < t_{théorique}$	L'ordonnée à l'origine n'est pas significative pour un risque de 5%
	DPB : 0.17		
	DPC : 0.72		
Test d'homogénéité des variances			
$C_{théorique} 5\%$ C(0.95,5,2)	$C_{calculé}$	Condition	Conclusion
0.68	DPA : 0.61	$C_{calculé} < C_{théorique}$	Les variances sont homogènes au risque de 5%
	DPB : 0.60		
	DPC : 0.61		

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

4. validation de la méthode chromatographique

Tableau III.4.7 : Intervalles de confiance

	Pente	Intervalle de confiance	Ordonnée à l'origine	Intervalle de confiance
DPA	93996	[93875 – 94117]	99	[-198 – 396]
DPB	386497	[386375 – 386618]	12	[-285 – 308]
DPC	94057	[93862 – 94252]	160	[318 – 638]

III.4.4. CONCLUSION :

Nous avons mis au point une méthode indicatrice de stabilité de la Citicoline par chromatographie en phase liquide en mode HILIC.

La technique développée a été validée selon les critères décrits par l'ICH. Les résultats obtenus sont satisfaisants en termes de spécificité, linéarité, fidélité, exactitude, LOD et LOQ.

III.4.5. RÉFÉRENCES :

[1] ICH, *Q2(R1) : Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology*, Novembre 2005,

http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf, consulté le 17/07/2017.

[2] J. Ermer, J.H.McB. Miller, *Method Validation in Pharmaceutical Analysis : A Guide to Best Practice*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005, the Federal Republic of Germany.

[3] C. Burgess, *Valid Analytical Methods & Procedures*, the Royal Society of Chemistry, 2000, UK.

CONCLUSION GÉNÉRALE

CONCLUSION GÉNÉRALE

CONCLUSION GÉNÉRALE :

Nous avons proposé dans ce travail la mise au point d'une méthode indicatrice de stabilité de la Citicoline en présence de ses produits de dégradation.

En raison de la forte hydrophilie de la Citicoline, la HPLC en mode HILIC est utilisée avec une colonne Atlantis HILIC Silica et un détecteur à barrette de diodes. Pour des raisons de compatibilité avec la spectrométrie de masse, la phase mobile utilisée est composée de 70% (V/V) d'acétonitrile et 30% (V/V) de 20 mM d'acide formique ajusté à pH=3 par l'ammoniaque.

La Citicoline a été soumise à différents stress :

- Les attaques neutre, acide et photolytique donnent un composé ayant un temps de rétention de 3.84 min.
- L'hydrolyse basique conduit à un produit de dégradation avec un temps de rétention de 8.93 min.
- L'oxydation génère un produit élué en 8.30 min.

Pour vérifier qu'il n'y a pas eu de coélution ou de non détection de produits, nous avons réalisé les spectres 3D et les tests de pureté des pics.

La méthode proposée permet une bonne séparation entre la CIT et les produits de dégradation. Pour l'identification des produits de dégradation (DPs), nous avons utilisé les résultats de la HPLC/PDA, la LC/MS-TOF et la RMN ^1H et ^{13}C .

- ❖ La comparaison des spectres UV des DPs avec celui de la CIT nous a permis de faire les remarques suivantes :
 - Le spectre du produit DPA est parfaitement superposable avec celui de la CIT, ce qui prouve que les hydrolyses acide, neutre et la photolyse n'ont pas modifié la partie portant les chromophores.
 - Le temps de rétention de DPA est plus faible que celui de la CIT montrant que le DPA a perdu plusieurs groupements polaires de la partie transparente
 - Le spectre du DPB est différent de celui de la CIT ($\lambda_{\text{max}}(\text{CIT})=277.0 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{max}}(\text{DPB})=261.7 \text{ nm}$) indiquant que la partie portant les chromophores a été modifiée.
 - Le produit de dégradation DPC présente un maximum à 299.5 nm indiquant que la dégradation a modifié le chromophore de la citicoline d'une façon différente de celle qui a conduit à DPB.

CONCLUSION GÉNÉRALE

❖ La LC/MS-TOF nous a amené à proposer les structures des DPs :

- Le spectre de masse de DPA présente un ion pseudo-moléculaire $[M + H]^+$ à $m/z = 324.0609$ Da. Sa formule serait $C_9H_{14}N_3O_8P$, connu sous le nom d'acide cytidylique ou cytidine-5'-monophosphate.

Cette molécule possède le même spectre d'absorption que la citicoline confirmant la présence de la base cytosine et la perte de plusieurs groupements polaires comme la choline et le phosphate qui explique la diminution considérable du temps de rétention.

- Le spectre de masse de DPB présente un ion pseudo-moléculaire $[M + H]^+$ à $m/z = 490.1006$ Da.

Certains des fragments de DPB ont la même masse que ceux trouvés avec la CIT.

La différence entre les poids moléculaire de la CIT et DPB est de un Da. Cela confirme le résultat de l'UV indiquant une différence au niveau de l'hétérocycle azote.

Nous avons proposé pour le DPB la formule $C_{14}H_{25}N_3O_{12}P_2$, appelée uridine diphosphate choline.

- Le spectre de masse du produit de dégradation DPC présente un pic à $m/z = 376.0531$ Da correspondant à l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$.

Le spectre de masse présente un autre pic à $m/z = 264.0385$ Da. Celui-ci est un fragment commun avec la molécule de départ indiquant la présence de cette partie dans la structure de DPC.

En nous basant sur la littérature, nous avons conclu que l'oxydation a eu lieu au niveau des alcools secondaires du ribose pour former une dicétone. La formule proposée pour DPC est $C_{10}H_{19}NO_{10}P_2$.

Tous ces résultats nous ont permis de proposer les chemins de fragmentation de la citicoline et de ses produits de dégradation.

❖ Nous avons utilisé après une chromatographie semi-préparative pour isoler les DPs la RMN 1H et ^{13}C . L'exploitation des spectres RMN a permis de confirmer toutes les structures proposées.

CONCLUSION GÉNÉRALE

- Dans la structure de DPA proposée, les protons numérotés de 1 à 5 ont donné la différence fondamentale entre DPA et CIT. Ces protons n'existent pas dans DPA.
- L'examen des spectres RMN ^{13}C de la CIT et de DPB (y compris l'option APT) ne révèle aucune différence remarquable.
- De plus, l'apparition du cycle furane-3,4 (2H, 5H)-dione dans DPC a été confirmée par RMN ^{13}C .

Les mécanismes réactionnels de formation de chaque produit de dégradation ont été proposés. La méthode indicatrice de stabilité a été validée et appliquée avec succès au dosage du produit fini.