

N° d'ordre : 12/2015-C/CH

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 CHIMIE

Spécialité : Chimie du Médicament

Par : **DJABROUHOU** Nadia

Thème

---

**Mise au Point de techniques de dosage de l'Etifoxine par chromatographie en phase  
liquide**

---

Soutenue publiquement, le 15 juin 2015, devant le jury composé de :

Mr A.BAALIOUMEUR	Professeur	à l'U.S.T.H.B	Président
Mr M.H.GUERMOUCHE	Professeur	à l'U.S.T.H.B	Directeur de thèse
Mr F.BELARIBI	Professeur	à l'U.S.T.H.B	Examineur
Mme A.HASSANI	Professeur	à l'E.N.S.Kouba	Examinatrice
Mr B.SAIDAT	Maitre de conférence A	à l'U.Laghouat	Examineur

# *Remerciements*

*Tout d'abord, je tiens à remercier dieu qui m'a donné la patience et le courage de terminer ce travail.*

*Ce travail de thèse a été réalisé au laboratoire de Chromatographie (faculté de chimie USTHB) sous la direction scientifique de Monsieur le professeur **M.H.GUERMOUCHE**. Une partie des travaux a été menée à l'Université Paris-Sud, au sein du laboratoire RMN en milieu orienté.*

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et reconnaissance à Monsieur le professeur **M.H.GUERMOUCHE** pour m'avoir suivi avec beaucoup d'intérêt dans ce travail et pour toute la confiance qu'il m'a accordée. Qu'il trouve ici l'expression de mon vif remerciement.*

*Je remercie également Madame **S.GHERMOUCHE**, professeur à l'USTHB, pour sa très grande disponibilité, sa gentillesse, ses précieux conseils ayant contribué à l'aboutissement de ce travail.*

*Monsieur **A.BAALIOUMEUR**, professeur à l'USTHB a bien voulu honorer de sa présence et présider le jury de cette thèse. Qu'il accepte ma reconnaissance et mes sincères remerciements.*

*Monsieur **F.BELARIBI**, professeur à l'USTHB, Madame **A.HASSANI**, professeur à l'ENS KOUBA, Monsieur, **B.SAIDAT** professeur à l'Université de LAGHOUAT, vous m'avez fait l'honneur d'avoir examiné cette thèse, je vous remercie pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail.*

*Je remercie également toutes les personnes du laboratoire qui m'ont apporté leur aide et ont contribué à la réalisation de ce travail. Mes remerciements s'adressent aussi à mes collègues et amis.*

*Enfin, mes vifs remerciements s'adressent à ma famille, source de mon bonheur, et qui m'a particulièrement aidée dans les situations difficiles.*

## Liste des abréviations

**API** : Atmospheric Pressure Ionisation

**APCI** : Atmospheric Pressure Chemical Ionisation

**CV** : coefficient de variation

**DAD** : détecteur à la barrette de diodes

**DCI** : Dénomination Commune International

**DEPT** : Distortionless Enhanced Polarization Transfer

**DP** : produit de dégradation

**ESI** : Electrospray Ionisation

**ETI** : Etifoxine

**FDA** : Food and Drug Administration

**HPLC** : Chromatographie Liquide à Haute Performance

**ICH** : Conférence Internationale sur l'Harmonisation

**IR** : infrarouge

**LC-MS/TOF** : Chromatographie en phase Liquide-Spectrométrie de Masse/Temps de Vol

**LOD** : limite de détection

**LOQ** : limite de quantification

**MS** : Mass Spectrometry

**PhRMA** : Pharmaceutical Research and Manufacturer's Association

**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire

**RSD** : écart type relatif (relative standard deviation)

**UV** : Ultraviolet

## Liste des tableaux

<b>Tableau (1) :</b> Conditions opératoires proposées pour l'étude de dégradation du principe actif.....	11
<b>Tableau (2) :</b> Conditions opératoires proposées pour l'étude de dégradation du produit fini... 11	
<b>Tableau (3) :</b> Conditions chromatographiques.....	31
<b>Tableau (4) :</b> Conditions optimales de la dégradation forcée d'Etifoxine.....	33
<b>Tableau (5) :</b> Préparation de la gamme d'étalonnage de l'etifoxine.....	37
<b>Tableau (6) :</b> Prises d'essai pour l'étude de la précision.....	38
<b>Tableau (7) :</b> Résultats de l'étude de stabilité de la solution d'ETI (n = 5 pour chaque jour et chaque concentratio.....	42
<b>Tableau (8) :</b> Résultats de l'analyse de l'ETI dans les gélules par UV.....	43
<b>Tableau (9) :</b> Quelques exemples des méthodes indicatrices de stabilité pour diverses molécules actives.....	45
<b>Tableau (10) :</b> Valeurs des différents paramètres chromatographiques pour l'ETI pour chaque phase mobile étudiée.....	46
<b>Tableau (11) :</b> Résolution entre deux pics consécutifs (ETI et les DPs) pour chaque phase mobile testée.....	48
<b>Tableau (12) :</b> Paramètres de suitabilité de l'HPLC.....	49
<b>Tableau (13) :</b> Déplacements chimiques de $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ de l'ETI, DPA, DPB, DPC et DPD (voir les structures pour les chiffres et lettres correspondants aux protons et carbones).....	76
<b>Tableau (14) :</b> Données MS de l'ETI, des produits de dégradations A, B, C, D, des fragments des ions majeurs et leurs structures proposées.....	77
<b>Tableau (15) :</b> Paramètres de validation de la méthode proposée pour l'ETI et ses DPs A, B, C et D.....	84
<b>Tableau (16) :</b> Variation du pH.....	85
<b>Tableau (17) :</b> Variation du débit.....	86
<b>Tableau (18) :</b> Variation de la longueur d'onde.....	86

<b>Tableau (19) :</b> Données d'évaluation de l'étude de stabilité de la solution (n =5 pour chaque jour, concentration=50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).....	87
<b>Tableau (20) :</b> Résultats de l'analyse de l'ETI dans les gélules.....	88

## Liste des figures

<b>Figure (1) :</b> Spectres d'absorbance des solutions standard et essai de l'ETI et du placebo.....	41
<b>Figure (2) :</b> Histogramme de différents paramètres chromatographiques de l'ETI avec les phases mobiles testées.....	47
<b>Figure (3) :</b> Histogramme des résolutions entre l'ETI et les DP pour les phases mobiles testées.....	48
<b>Figure (4) :</b> Chromatogramme de la solution du stress oxydatif obtenu avec les conditions Choisies.....	50
<b>Figure (5) :</b> Chromatogramme du blanc.....	51
<b>Figure (6) :</b> Chromatogramme de la solution non dégradée de la matière première.....	52
<b>Figure (7) :</b> Chromatogramme de la solution non dégradé du produit fini.....	52
<b>Figure (8) :</b> Chromatogramme du placebo.....	53
<b>Figure (9) :</b> Chromatogramme du blanc de l'attaque acide de l'ETI.....	54
<b>Figure (10) :</b> Chromatogramme de l'ETI après l'attaque acide.....	54
<b>Figure (11) :</b> Chromatogramme du produit fini après l'attaque acide.....	55
<b>Figure (12) :</b> Chromatogramme du blanc de l'attaque basique de l'ETI.....	56
<b>Figure (13) :</b> Chromatogramme de l'ETI après l'attaque basique.....	56
<b>Figure (14) :</b> Chromatogramme du produit fini après l'attaque basique.....	57
<b>Figure (15) :</b> Chromatogramme du blanc de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> à 3%.....	58
<b>Figure (16) :</b> Chromatogramme du blanc de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> à 30%.....	58
<b>Figure (17) :</b> Chromatogramme de l'ETI après l'attaque par H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> à 3%.....	59
<b>Figure (18) :</b> Chromatogramme de l'ETI après l'attaque de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> à 30%.....	59
<b>Figure (19) :</b> Chromatogramme du produit fini après l'attaque par H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> à 3%.....	60
<b>Figure (20) :</b> Chromatogramme du produit fini après l'attaque par H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> à 30%.....	60
<b>Figure (21) :</b> Chromatogramme du blanc de la dégradation thermique.....	61
<b>Figure (22) :</b> Chromatogramme de l'ETI après la dégradation thermique.....	62
<b>Figure (23) :</b> Chromatogramme du produit fini après la dégradation thermique.....	62

<b>Figure (24) :</b> Chromatogramme de la solution du blanc de la photo-dégradation.....	63
<b>Figure (25) :</b> Chromatogramme de l'ETI après la photo-dégradation.....	64
<b>Figure (26) :</b> Chromatogramme du produit fini après la photo-dégradation.....	64
<b>Figure (27) :</b> Spectre UV de l'ETI et les DPs A, B, C et D.....	65
<b>Figure (28) :</b> Structure et spectre de masse de l'ETI.....	66
<b>Figure (29) :</b> Structures chimiques des deux ions qui apparissent dans le spectre de masse de l'ETI.....	67
<b>Figure (30) :</b> Spectres RMN de l'ETI.....	67
<b>Figure (31) :</b> Structure et spectre de masse de DPA.....	68
<b>Figure (32) :</b> spectres RMN de DPA.....	69
<b>Figure (33) :</b> Structure et spectre de masse de DPB.....	70
<b>Figure (34) :</b> Spectres RMN de DPB.....	71
<b>Figure (35) :</b> Structure et spectre de masse de DPC.....	72
<b>Figure (36) :</b> Spectres RMN de DPC.....	72
<b>Figure (37) :</b> Structure et spectre de masse de DPD.....	74
<b>Figure (38) :</b> Spectres RMN de DPD.....	75
<b>Figure (39) :</b> Schéma de formation de DPA.....	78
<b>Figure (40) :</b> Schéma de formation de DPB.....	78
<b>Figure (41) :</b> Schéma de formation de DPC.....	79
<b>Figure (42) :</b> Schéma de formation de DPD.....	79
<b>Figure (43) :</b> Principales voies de fragmentation de l'ETI.....	80
<b>Figure (44) :</b> voies de fragmentation de l'ETI incluant les structures des 4 DPs et fragments Principaux.....	81
<b>Figure (45) :</b> Chromatogramme du placebo (a) ; de la forme pharmaceutique (b).....	82
<b>Figure (46) :</b> Résultats comparatifs de l'analyse de l'ETI (Produit fini) par UV-Visible et HPLC.....	89

# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>1</b>
<b>CHPITRE I : PARTIE THEORIQUE</b>	
I.1. Méthodologie d'une méthode indicatrice de stabilité.....	3
I.1.1. Etude de la dégradation forcée.....	3
I.1.1.1. Introduction.....	3
I.1.1.2. Historique.....	3
I.1.1.3. Contexte réglementaire.....	5
I.1.2. Intérêt de l'étude de la dégradation forcée.....	5
I.1.2.1. Développement de la méthode d'analyse.....	6
I.1.2.2. Développement du conditionnement.....	6
I.1.2.3. Détermination de la durée de vie et des conditions de stockage.....	6
I.1.2.4. Evaluation de la toxicité.....	6
I.1.2.5. Maîtrise de la formulation.....	7
I.1.2.6. Etude de pharmacocinétique.....	7
I.1.2.7. Impact sur l'environnement.....	7
I.1.3. Stabilité intrinsèque.....	8
I.1.3.1. Conditions de stress.....	8
I.1.3.2. Taux de dégradation.....	12
I.1.3.3. Voies de dégradation d'une substance et les structures de ses produits de Dégradation.....	12
I.2. Développement de la méthode d'analyse.....	13
I.3. Processus de validation d'une méthode d'analyse.....	13
I.3.1. Spécificité.....	14
I.3.2. Linéarité.....	14
I.3.3. Exactitude.....	14
I.3.4. Fidélité.....	14
I.3.5. Limites de détection et de quantification.....	15
I.3.6. Robustesse.....	15
I.3.7. Limite de stabilité.....	15

I.4. Généralité sur l'Etifoxine.....	15
I 4.1. Introduction.....	15
I.4.2. Propriétés physico-chimiques.....	16
I 4.3. Mécanisme d'action.....	17
I.4.4. Pharmaco-cinétique.....	17
I.4.5. Conditions thérapeutiques.....	17
I.5. Techniques d'analyse utilisées.....	18
I.5.1. Spectrophotométrie UV –Visible.....	18
I.5.2. Chromatographie liquide haute performance (HPLC, High Performance Liquid Chromatography).....	18
I.5.2.1. Introduction.....	18
I.5.2.2. Paramètres d'un chromatogramme.....	19
I.5.3. Couplage entre la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse.....	21
I.5.3.1. Introduction.....	21
I.5.3.2.Principe des sources API.....	22
I.5.4. Résonance magnétique nucléaire (RMN).....	24

## **CHPITRE II : PARTIE EXPERIMENTALE**

II.1.Méthode spectroscopique UV développement et validation.....	27
II.1.1. Appareillage et réactifs.....	27
II.1.2. Préparation des solutions.....	27
II.1.2.1. Solutions standards.....	27
II.1.2.2. Solutions essais.....	27
II.1.3. Validation de la méthode spectroscopique.....	28
II.1.3.1. Spécificité.....	28
II.1.3.2. Linéarité.....	28
II.1.3.3. Fidélité.....	28
II.1.3.4. Exactitude.....	28
II.1.3.5. Stabilité des solutions.....	29
II. 2.Méthode indicatrice de stabilité développement et validation.....	29
II.2.1. Méthode chromatographique.....	29

II.2.2. Conditions chromatographiques.....	30
II.2.2.1.Choix de la méthode d'analyse.....	30
II.2.2.2.Grandeurs chromatographiques expérimentales.....	32
II.2.3.Mise au point de la méthode analytique.....	32
II.2.4 Etudes de la dégradation forcée.....	32
II.2.4.1. Conditions de dégradation.....	33
II.2.4.1.1. Dégradation en milieu acide.....	33
II.2.4.1.2. Dégradation en milieu basique.....	33
II.2.4.1.3. Dégradation par oxydation.....	34
II.2.4.1.4. Dégradation thermique.....	34
II.2.4.1.5. Photo-dégradation.....	34
II.2.4.2. Techniques d'analyse utilisées.....	34
II.2.4.2.1. Chromatographie liquide à haute performance semi-préparative.....	34
II.2.4.2.2. L'extraction liquide-liquide.....	34
II.2.4.2.3. Spectrométrie de masse LC-MS/TOF.....	35
II.2.4.2.4. Résonance magnétique nucléaire (RMN- <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C).....	35
II.3.Validation de la méthode chromatographique.....	35
II.3.1. Spécificité.....	36
II.3.2. Limite de détection (LOD) et de quantification (LOQ).....	36
II.3.3. Linéarité.....	35
II.3.4. Fidélité.....	37
II.3.5. Exactitude.....	38
II.3.6. Robustesse.....	38
II.3.7. Stabilité de la solution.....	39
II.3.8. Analyse des préparations pharmaceutiques.....	39

## **CHPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION**

III.1.Développement et validation d'une méthode spectroscopique UV de l'étifoxine.....	40
III.1.1. Introduction.....	40
III.1.2.Validation de la méthode UV.....	40
III.1.3. Analyse des formes pharmaceutiques.....	42

III.2.Développement et validation d'une méthode indicatrice de stabilité de l'étifoxine.....	44
III.2.1.Introduction.....	44
III.2.2.Détermination des conditions optimales chromatographiques.....	46
III.2.3. Etudes de la dégradation forcée.....	50
III.2.3.1.Résultats de l'analyse chromatographique des échantillons non dégradés.....	51
III.2.3.2. Résultats de la dégradation forcée.....	53
III.2.4. Résultats en LC-MS/TOF ; RMN- <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C.....	66
III.2.4.1. Résultats en LC-MS/TOF ; RMN- <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C de l'ETI.....	66
III.2.4.2. Résultats en LC-MS/TOF ; RMN- <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du produit de dégradation A (DPA).....	68
III.2.4.3. Résultats en LC-MS/TOF ; RMN- <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du produit de dégradation B (DPB).....	70
III.2.4.4. Résultats en LC-MS/TOF ; RMN- <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du produit de dégradation C (DPC).....	71
III.2.4.5. Résultats en LC-MS/TOF ; RMN- <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du produit de dégradation D (DPD).....	73
III.2.5.Principales voies de dégradation de l'ETI.....	78
III.2.6. Validation de la méthode.....	81
III.2.6.1. Spécificité.....	81
III.2.6.2. Linéarité.....	83
III.2.6.3. Linéarité en présence d'excipients.....	83
III.2.6.4. Limite de détection (LOD), limite de quantification(LOQ).....	83
III.2.6.5. Fidélité.....	84
III.2.6.6. Exactitude.....	85
III.2.6.7. Robustesse.....	85
III.2.6.8. Stabilité de la solution.....	87
III.2.6.9. Analyse des préparations pharmaceutiques.....	87
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>90</b>
<b>REFERENCES</b>	

# **INTRODUCTION**

## **GENERALE**

La chromatographie en phase liquide (HPLC) a modifié de façon prononcée la manière d'analyser les principes actifs dans les médicaments. Son impact est considérable dans ce domaine. Si on prend l'exemple de la pharmacopée Américaine où près de 2500 médicaments sont répertoriés, l'HPLC intervient 2054 fois ce qui représente 82.2% des analyses (statistiques faites sur l'édition 2013). Son avantage certain s'exprime dans sa propriété séparative et sa possibilité d'analyser quantitativement plusieurs constituants dans la même solution. Cependant l'analyse qualitative reste son point faible. Pour parer à cette faiblesse, la spectrométrie de masse (plus récemment en tandem) a été couplée avec succès ; l'HPLC préparative a permis d'élargir la recherche de la qualité à la RMN.

Il faut remarquer que dans l'industrie pharmaceutique, un département de stabilité existe dans chaque unité de production. Son rôle essentiel est de surveiller la dégradation des principes actifs dans les produits finis fabriqués en fonction du temps, du degré d'humidité et de la température. Cette opération dure généralement entre un et deux ans. La mise au point d'une méthode indicatrice de stabilité permet de répondre beaucoup plus rapidement (de 2 à 10 jours) aux soucis du producteur de médicaments.

Le but de ce travail est de mettre en œuvre une méthode indicatrice de stabilité de l'Étifoquine par HPLC en respectant les directives publiées dans ce domaine par la conférence internationale sur l'harmonisation (ICH). Pour cela l'Étifoquine sous forme de matière première et de produit fini sera soumise à différents stress. Il s'agira d'étudier l'effet de :

- L'hydrolyse acide ou basique
- L'oxydation par l'eau oxygénée
- La photolyse sous lumière ultra-violette
- La chaleur

Pour chaque effet il faudra mettre en évidence les produits de dégradation (DPs) générés. Pour cela, il est nécessaire de :

- mettre au point l'analyse par HPLC de l'ETI et de ses DPs. Il ne faudra pas perdre de vue que le tampon utilisé dans la phase mobile doit être volatile pour pouvoir être transposé en spectrométrie de masse où la volatilité est exigée.

- Appliquer la méthode HPLC mise au point en spectroscopie de masse couplée en tandem (chromatographie en phase liquide/spectrométrie de masse-temps de vol appelée LC-MS/TOF par les Anglo-saxons) pour proposer les structures des DP<sub>s</sub> obtenus. Une confirmation des propositions de structures par la RMN du proton et du C<sub>13</sub> sera nécessaire.
- proposer un schéma de fragmentation de l'ETI.

Ce travail serait incomplet si la validation de la méthode proposée n'est pas réalisée, cette opération sera effectuée conformément aux directives de l'ICH.

On terminera le travail par l'analyse de l'ETI dans le produit fini par HPLC avec les calculs statistiques d'usage.

En vertu de ce qui a été dit précédemment, la rédaction de ce mémoire comportera 3 parties ;

Le premier chapitre sera consacré à une rétrospective des différents travaux ayant trait à la méthodologie d'une méthode indicatrice de stabilité et de sa mise en œuvre dans le cas d'exemples précis relevés dans la littérature. Dans ce même chapitre, les principes des techniques analytiques employées seront brièvement décrits (spectroscopie UV-Visible, HPLC, LC/MS-TOF, RMN).

La partie expérimentale sera exposée dans le 2<sup>ème</sup> chapitre avec les techniques de dégradation forcée employées, le développement de la méthode HPLC, le protocole de caractérisation des structures par HPLC/MS-TOF ; l'expérimentation en RMN du proton et du carbone 13. Le protocole expérimental de la mise en œuvre de la validation analytique sera présenté ainsi que la méthodologie de l'analyse quantitative du produit fini.

Le troisième chapitre sera consacré aux résultats : en UV-visible, HPLC, LC/MS-TOF et RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C. L'interprétation des résultats permettra de mettre en évidence les structures chimiques des différents DP<sub>s</sub> obtenus avec les différents stress. La validation de la méthode analytique permettra d'effectuer l'analyse quantitative de l'ETI en présence de ses DP<sub>s</sub> dans le produit fini.

# **PARTIE THEORIQUE**

## **I.1. Méthodologie d'une méthode indicatrice de stabilité**

### **I.1.1. Etude de la dégradation forcée**

#### **I.1.1.1. Introduction**

Les tests de stress ont toujours été reconnus comme étant une partie essentielle du processus du développement pharmaceutique. C'est l'outil majeur à utiliser dans le but de prévoir les problèmes de stabilité et d'identifier les produits et les schémas de dégradation.

[1]

Grace aux efforts de la conférence internationale sur l'harmonisation (ICH), des exigences réglementaires de plus en plus poussées en ce qui concerne la stabilité et l'identification des impuretés à des taux minimales ont été instaurées. [2, 3, 4]

L'étude de la dégradation forcée consiste à imposer au produit certaines conditions de stress plus drastiques que celles employées lors des études de stabilité à long terme ou accélérées, telles que la température, la lumière et l'oxydation, etc.

L'objectif de l'étude de la dégradation forcée est d'obtenir le maximum de dégradation en générant des impuretés potentielles, sans toutefois entraîner les processus de dégradation secondaire [5].

#### **I.1.1.2. Historique**

En industrie pharmaceutique, les termes "test de stress" et "test de stabilité accéléré" sont souvent utilisés dans la stabilité du médicament et la prévision de sa durée de vie. [6]

*Kennon et al.* [7] ont montré l'effet de la température élevée (jusqu'à 85° C) sur les taux de dégradation de produits pharmaceutiques ce qui permet de prévoir la durée de vie du produit.

Puis, *Yang* [8] et *Witthaus* [9] et leurs collaborateurs ont démontré que 3 mois à 40°C et 75% d'humidité relative est l'équivalent de 24 mois à température ambiante. Ces conditions ont été alors adoptées par la FDA (Food and Drug Administration) des USA.

Connu historiquement sous le nom de « rule of thumb », le travail de *Carstensen* [6] montre que 5 semaines de stockage à 42°C sont équivalentes à 2 ans de conservation à température ambiante.

*Singh et Bakshi* [10] ont montré que les conditions de stress acide et basique peuvent être variables engendrant des taux de dégradation également variables.

Ainsi, *ces mêmes auteurs* ont remarqué qu'il existe une variation considérable en ce qui concerne les conditions de stress. En effet, il est indispensable de fixer la durée de l'exposition, le taux de dégradation et la température suffisante pour mettre fin à l'exposition au stress. Ils ont constaté également que les conditions du test de stress varient considérablement d'un composé à un autre.

En 2000, *Bakshi* [11] décrit un système de classification des composés selon leur sensibilité aux conditions de stress (Extrêmement labile, très labile, labile, stable).

En 2001, *Alsante et al.* [12] ont suggéré la définition des limites des conditions de stress. A titre d'exemple, il est proposé d'utiliser une solution d'acide chlorhydrique HCl 1N et basique de NaOH 1N pour une exposition d'une semaine au maximum à température ambiante.

En 2002, l'association des fabricants et de recherche pharmaceutique PhRMA (Pharmaceutical Research and Manufacturer's Association) précise les différents types de stress qui devraient être effectués sur les médicaments lors de l'étude de la dégradation forcée [13].

En 2007, *Karen M. Alsante et al* fournissent un guide pour la planification des études de tests de stress pendant le développement pharmaceutique, les conditions à tester, les outils à utiliser pour une meilleure exploitation des résultats. [14]

Des publications récentes des études de dégradation forcée révèlent qu'il existe une énorme variété dans les conditions employées, par conséquent, la dégradation forcée n'a pas un protocole général et bien précis pour sa réalisation. [15]

### **I.1.1.3. Contexte réglementaire**

Dans les guidelines de l'ICH, il y a très peu d'informations sur la stratégie et les principes pour conduire des études de dégradation forcée à l'exception de la photo-stabilité qui est décrite avec précision. Différentes lignes directrices reprennent la notion des tests de stress (selon la nouvelle codification ICH): [16]

- [ICH-Q1A(R2)] : Essais de stabilité de nouveaux produits et substances médicamenteux. [17]

- [ICH-Q1C] : Essais de stabilité: exigences relatives aux nouvelles formes posologiques. [18]

- [ICH-Q1B]: Essais de stabilité: essais de photo-stabilité des nouveaux produits et substances médicamenteux. [19]

- [ICH-Q3B(R2)] : Présence d'impuretés dans les nouveaux produits. [3]

- [ICH-Q3A(R2)] : Présence d'impuretés dans les nouvelles substances médicamenteuse. [4]

- [ICH-Q2(R1)] : Validation des procédures d'analyse : Texte et méthodologie. [20]

- [ICH-Q6A] : Spécifications: Méthodes analytiques et critères d'approbation pour les nouvelles substances médicamenteuses et les nouveaux produits : substances chimiques. [21]

### **I.1.2. Intérêt de l'étude de la dégradation forcée**

L'étude de la dégradation forcée d'une molécule active constitue le principal outil utilisé pour prévoir les problèmes relatifs à sa stabilité.

L'évaluation de la stabilité d'une molécule nécessite le développement d'une méthode analytique appropriée (sélective et sensible).

En effet, la stabilité de la molécule active peut avoir une influence sur différents paramètres lors de la formulation du médicament. Il est donc important d'avoir recours à ces études pour une optimisation de la formulation galénique. Par ailleurs, les données

relatives à la stabilité permettent de préciser la nature du conditionnement qu'il convient d'utiliser et de déterminer les conditions de stockage appropriées et la durée de vie.

Les études de dégradation forcée permettent également de prévoir le devenir du médicament au niveau de l'organisme (données de la pharmacocinétique) mais aussi dans l'environnement. En outre, ces études permettent aussi l'évaluation de la toxicité de la molécule.

### **I.1.2.1. Développement de la méthode d'analyse**

L'évaluation de la stabilité d'un composé nécessite une méthode analytique appropriée. Pour développer une méthode permettant la détection des produits de dégradation potentiels, il faut avoir recours aux études de dégradation forcée.

### **I.1.2.2. Développement du conditionnement**

Les informations acquises à partir de l'étude de la dégradation forcée seront utilisées pour le choix d'un conditionnement approprié. Elles permettent de déterminer la sensibilité du composé à l'hydrolyse, l'oxydation, la chaleur et la lumière.

A titre d'exemple, si un composé est sensible à l'hydrolyse, l'emballage doit être conçu de telle sorte qu'il protège la transmission de la vapeur d'eau de l'extérieur vers l'intérieur du conditionnement et qu'il assure une stabilité durant le stockage à long terme.

### **I.1.2.3. Détermination de la durée de vie et des conditions de stockage**

La détermination des conditions de stockage appropriées pour la matière première ou le produit fini nécessite une connaissance des conditions qui induisent la dégradation. La plupart de ces renseignements sont obtenus à partir des études de dégradation forcée combinées aux études de stabilité en temps accéléré. La prévision d'une durée de vie exacte est toutefois la mieux réalisée avec les données des études de stabilité à long terme.

### **I.1.2.4. Evaluation de la toxicité**

Si les études du test de stress indiquent la formation de composés toxiques connus, des mesures doivent être prises dès le début pour éviter la formation de ces composés

toxiques et pour développer une méthode analytique sensible pour les détecter et les quantifier d'une manière exacte.

Les études du test de stress peuvent également faciliter la génération et la séparation des produits de dégradation pour l'évaluation toxicologique, puisque la préparation synthétique est presque irréalisable.

#### **I.1.2.5. Maîtrise de la formulation**

La dégradation peut se produire également lors de la fabrication. La connaissance des conditions qui conduisent à la dégradation de la substance active peut aider à la conception des contrôles appropriés et des conditions convenables durant la fabrication ; Par exemple, si le composé est sensible à la dégradation à un pH acide et la fabrication nécessite un pH bas, l'utilisation d'un milieu acide sera évitée ou contrôlée plus attentivement pour minimiser la dégradation, tout en observant la dégradation durant la formulation. Et si la substance s'oxyde facilement, il est impératif d'utiliser un gaz inerte lors de la fabrication.

#### **I.1.2.6. Etude de la pharmacocinétique**

Avant sa commercialisation, le devenir du médicament dans l'organisme (la pharmacocinétique) fait l'objet de plusieurs études englobant les étapes d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'élimination.

Ces études fournissent l'identification des principaux métabolites, ce qui est difficile *in vivo*.

Dans ce cas, il est généralement plus facile de générer une grande quantité des produits de dégradation grâce au test de stress plutôt que de l'isoler *in vivo*, puisque ces derniers sont considérés comme des métabolites.

#### **I.1.2.7. Impact sur l'environnement**

L'étude de la dégradation forcée d'une substance active permet de prévoir le devenir du médicament qui la contient dans l'environnement. En effet, l'information obtenue à partir du test de stress peut être utilisée pour la conception et l'interprétation de l'étude du médicament dans l'environnement.

D'après cette étude, il est évident que la dégradation du médicament dans l'environnement est souvent similaire à la dégradation observée durant les études du test de stress. [15]

### **I.1.3. Stabilité intrinsèque**

Concevoir une étude de dégradation forcée d'une molécule c'est aussi rechercher les caractéristiques de sa stabilité intrinsèque. Le terme de « stabilité intrinsèque » est lié à 4 facteurs :

- Les conditions de stress engendrant la dégradation ;
- Les taux de dégradation ;
- Les structures des produits de dégradation majeurs ;
- Les voies de dégradation de la molécule.

#### **I.1.3.1. Conditions de stress**

Le test de stress est une prévision de ce qu'il peut arriver sous les conditions de stockage. En effet, les produits de dégradation formés sous les conditions de stress sont des impuretés potentielles qui peuvent se former au cours du transport ou du stockage à long terme.

Par ailleurs, dans le cadre de la mise au point de la validation des méthodes de recherche et de dosage des impuretés, il est souhaitable d'atteindre une dégradation correspondant à une perte de l'ordre de 5 à 30% du principe actif. Ce pourcentage va dépendre du nombre de pics détectés et au coefficient d'extinction des impuretés générées. Les conditions proposées seront alors ajustées dans ce but. [22]

C'est la raison pour laquelle le test de stress devrait inclure les conditions qui provoquent spécialement plusieurs mécanismes de dégradation : dégradations hydrolytique, oxydative, thermique, et photolytique. [23]

##### **I.1.3.1.1. Dégradation hydrolytique**

Les réactions d'hydrolyse sont généralement catalysées par l'acide ou la base. Ceci est particulièrement important lorsque le composé testé présente un groupement fonctionnel

ionisable, lui permettant d'exister sous différents états d'ionisation. Cependant, le test de stress par hydrolyse doit s'effectuer sur un seul état de protonation du composé à tester, Il est tout de même inutile d'utiliser des milieux plus acides ou plus basiques car cela va accélérer l'effet catalyseur de la solution utilisée et augmenter le risque d'induire des voies de dégradation irréalistes.[24]

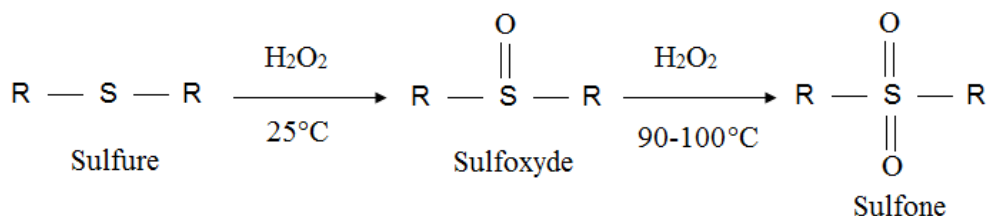
### I.1.3.1.2. dégradation oxydante

L'oxydation par le peroxyde est très répandue dans le développement pharmaceutique. Les réactions les plus communes des composés organiques sont les attaques nucliophiliques de l'amine et des sulfures pour donner des N-oxydes (Equation 1) et sulfoxydes ou sulfones (Equation 2), respectivement, et une lente attaque de la double liaison carbone-carbone pour donner un époxyde (Equation 3) [25]. Ces réactions sont ioniques et ne fournissent pas des radicaux libres. Ce type d'oxydation donne souvent des impuretés de dégradation qui peuvent être mineures dans la dégradation à long terme. [26]

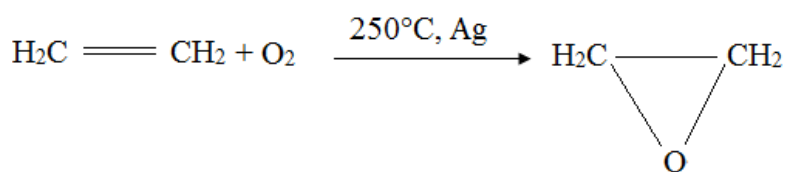
#### Equation (1)



#### Equation (2)



#### Equation (3)



### **I.1.3.1.3. Dégradation thermique**

Le mot « thermique » est utilisé pour décrire des réactions qui sont guidées par la chaleur. La dégradation thermolytique ou pyrolyse correspond à l'exposition à une température élevée, ce qui va provoquer la rupture des liaisons. Son mécanisme peut être considéré comme, hydrolyse, déshydratation, isomérisation, épimérisation, décarboxylation, réarrangement ou quelques types de réactions de polymérisation. [15]

La loi d'Arrhenius, énoncée par *Svante August Arrhenius* en 1889, a été utilisée dans le domaine de l'industrie pharmaceutique afin de prévoir le taux de dégradation d'un composé à l'état solide. La relation d'Arrhenius est probablement la plus couramment utilisée pour évaluer l'expression de la relation entre les taux des réactions et la température et pour donner l'ordre de la réaction :

$$K = A \cdot e^{-E_a/RT}$$

### **I.1.3.1.4. Dégradation photolytique**

La dégradation par la lumière résulte de l'exposition à la lumière UV-visible à des longueurs d'ondes situées entre 200 et 800 nm. Le taux de dégradation dépend directement de la quantité du rayonnement incident et de la quantité du rayonnement absorbée par le composé.

Une variété de sources de lumière a été utilisée, en respectant à la fois la longueur d'onde et l'intensité des lampes germicides (presque monochromatique, 254 nm) à la lumière solaire (émission de l'extension de proche-UV à l'IR). D'un point de vue scientifique, tout choix de la source de lumière est correct à condition que la lumière émise soit réellement absorbée.

### **I.1.3.1.5. Conditions opératoires**

Les conditions opératoires pour la dégradation des principes actifs ainsi que pour les produits finis sont résumées dans les tableaux suivants (tableau (1) et tableau (2)). [22]

Stress	Conditions	Conditionnement	Condition maximale de stress
Hydrolyse	-Acide : HCl 0.1 à 1M -Basique : NaOH 0.1 à 1M -Température ambiante -Abri lumière	Contenant étanche et inerte	1-7 jours
Oxydatif	-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : 0.3 à 3% ou autre agent oxydant -Température ambiante -Abri lumière	Contenant étanche et inerte	24h-7 jours
Chaleur	Température à 70°C	Contenant verre hermétiquement fermé	12 jours 80°C
Photo-lytique	1750 watt.h/m <sup>2</sup> et pas moins de 200 watt.h/m <sup>2</sup>	Contenant inerte et transparent aux UV	-

**Tableau (1) : Conditions opératoires proposées pour l'étude de dégradation du principe actif**

Stress	Conditions	Conditionnement	Condition maximale de stress
Chaleur	- Au minimum 10°C au dessus de la condition accélérée ICH - Abri lumière	Conditionnement primaire et/ou contenant inerte fermé	4 semaines à 60°C (ou 12 jours 80°C)
Chaleur+Humidité	- Au minimum 75% HR température : conditions retenues pour le stress chaleur -Abri lumière	Contenant ouvert	4 semaines à 60°C (ou 12 jours 80°C) Haut niveau d'humidité
Photolytique	Décrites dans ICH Q1B	Contenant inerte transparent aux UV	1.2 million de lux.h et pas moins de 200 Watt.h/m <sup>2</sup>

**Tableau (2) : Conditions opératoires proposées pour l'étude de dégradation du produit fini**

### **I.1.3.2. Taux de dégradation**

Le taux apparent de dégradation définit la stabilité intrinsèque du médicament. En effet, il peut être utile dans la conception et la formulation d'un médicament beaucoup plus stable. Par exemple : certains composés font preuve d'instabilité sous des conditions basiques, engendrée par des excipients, qui peuvent causer un microenvironnement alcalin dans la formulation. Ces données incitent à éviter l'utilisation de ces excipients ou de le faire avec précaution, ce qui permet de maximiser la stabilité afin de parvenir à une durée de vie acceptable.

La cinétique de la dégradation obtenue à partir des valeurs du taux de dégradation de chaque exposition à la même condition de stress, révèle l'ordre de la réaction. Et en se référant aux voies de décomposition, il sera simple de différencier les produits de dégradation primaires de celle qui sont secondaires. [27]

Le calcul du taux de dégradation se fait selon l'équation suivante :

$$\frac{A-B}{A} \times 100$$

A : Aire du principe actif dans l'échantillon non dégradé.

B : Aire du principe actif dans l'échantillon dégradé.

Le taux de dégradation ne doit pas dépasser les 30%.

### **I.1.3.3. voies de dégradation d'une substance et les structures de ses produits de dégradation**

La connaissance de la structure des produits de dégradation majeurs d'un composé est une condition préalable pour comprendre les voies de dégradation, ce qui est important pour l'évaluation des sites de la molécule qui sont sensibles à cette décomposition sous les différentes conditions.

Une telle information est essentielle pour déterminer les caractéristiques de stabilité intrinsèque de la substance médicamenteuse et pour concevoir une stratégie appropriée de contrôle de dégradation. Autrement dit, ces données sont intéressantes afin de développer une formulation stable, de créer une méthodologie analytique convenable, et d'exiger des conditions d'emballage et de stockage appropriées. [28,29]

L'étape critique de l'étude de la dégradation forcée est de trouver les produits de dégradations majeurs, puis de les identifier par HPLC couplée à la spectrométrie de masse et la RMN [23].

## **I.2. Développement de la méthode d'analyse**

La stratégie de développement d'une méthode indicatrice de la stabilité commence par un "screening" d'une méthode capable de séparer et de détecter un large éventail des produits de dégradation. Toutefois, il est impossible de développer une méthode indicative de la stabilité d'un nouveau médicament d'une manière idéale dès le début. Dans ce cas, la réalisation du test de stress est beaucoup plus importante surtout lorsque les produits de dégradation potentiels sont inconnus.

Dans la pratique pharmaceutique actuelle, la méthode analytique la plus utilisée est la méthode HPLC liée à un détecteur à la barrette de diodes (DAD). [30]

Pour développer une méthode indicative de stabilité d'un composé et optimiser la séparation des différents pics, il est nécessaire de choisir des échantillons appropriés à ce processus soit en préparant des échantillons partiellement dégradés ou en utilisant des échantillons dopés avec des impuretés de la substance concernée. De toute façon, la meilleure manière de développer une méthode spécifique à la substance médicamenteuse et ses impuretés consiste à utiliser ces deux méthodes à la fois.

Les informations recueillies à partir du test de stress de la substance médicamenteuse sont utilisées comme guide dans la formulation du produit fini. La compatibilité principe actif -excipient peut être étudiée pour déterminer la présence ou l'absence d'interactions significatives entre les excipients et le principe actif. Une fois la méthode d'analyse est développée, les études du test de stress peuvent être effectuées sur la formulation, et les résultats obtenus seront comparés à ceux de la substance médicamenteuse seule. [15]

## **I.3. Processus de validation d'une méthode d'analyse**

L'objectif principal de la validation est d'établir la sélectivité et la spécificité de la méthode, ainsi que la détermination de nombreux paramètres comme la spécificité, la linéarité, la précision, l'exactitude, la robustesse, les limites de détection et de quantification.

### **I.3.1. Spécificité**

La spécificité d'une méthode est sa capacité à détecter sans équivoque l'analyte en présence d'autres composants comme les impuretés, les excipients ou les DP.

### **I.3.2. Linéarité**

La linéarité d'une méthode est sa capacité, dans un intervalle donné, à fournir des résultats directement proportionnels à la concentration de l'analyte dans l'échantillon. Elle passe la plupart du temps par la détermination de l'équation du type  $y = ax + b$ , associée à un coefficient de corrélation  $R^2$  devant être environ égal à 1. Cette droite est déterminée par régression linéaire ou par la méthode des moindres-carrés.

### **I.3.3. Exactitude**

L'exactitude (*accuracy*) représente l'étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et la valeur vraie de référence.

### **I.3.4. Fidélité**

La fidélité, aussi appelée *precision*, est l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures répétées d'un même objet, dans des conditions spécifiées. Elle comprend trois niveaux : la répétabilité, la précision intermédiaire et la reproductibilité, exprimées comme la variance, la déviation standard ou le coefficient de variation (CV) d'une série de mesures. [31, 32]

- Répétabilité ou précision intra-jour : elle représente l'étroitesse de l'accord entre les résultats d'analyses indépendantes, obtenus avec la méthode considérée sur un même produit, dans le même laboratoire, avec le même opérateur utilisant le même matériel, dans un court intervalle de temps. Elle s'apprécie par la moyenne, l'écart-type de répétabilité et le CV intra-série.
- Précision Intermédiaire : représente les variations au sein d'un laboratoire. Elle s'apprécie par la moyenne, l'écart-type de reproductibilité et le CV inter-jour.
- Reproductibilité ou précision inter-essai : elle exprime la fidélité entre différents laboratoires.

### **I.3.5. Limites de détection et de quantification**

La limite de détection est propre à chaque procédure et correspond à la plus faible quantité (concentration) d'analyte dans un échantillon pouvant être détectée mais pas nécessairement quantifiée.

La limite de quantification est propre à chaque procédure et correspond à la plus faible quantité (concentration) d'analyte dans un échantillon pouvant être déterminée quantitativement avec exactitude et précision. Elle est particulièrement utilisée pour déterminer la teneur des composés présents en faible concentration comme les PD et les autres impuretés.

### **I.3.6. Robustesse**

La robustesse de la méthode est sa capacité à ne pas être affectée par des variations faibles et délibérées de certains paramètres de la méthode.

### **I.3.7. Limite de stabilité**

La limite de stabilité est souvent fixée à 90% de la concentration initiale. Cependant, les anticancéreux sont des médicaments dont l'efficacité dépend de la dose réellement administrée au patient et pouvant présenter une très forte toxicité. Les ICH ainsi que la conférence de consensus européenne recommandent de considérer une variation de 5% par rapport à la valeur initiale comme un changement significatif et donc de fixer la limite à 95% de la concentration initiale, sauf exception justifiée. [31, 33]

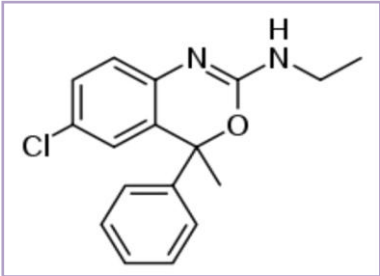
## **I.4. Généralité sur l'Étifoxine**

### **I.4.1. Introduction**

L'étifoxine (ETI), est désignée chimiquement comme le 6-chloro-N-ethyl-4-methyl-4-phenyl-4H-benzo[d][1,3]oxazine-2-amine. Elle est utilisée comme anxiolytique et anticonvulsivant [34]. Elle a des effets similaires à des benzodiazépines avec des effets secondaires différents [35,36]. Plusieurs études ont été menées ces dernières années sur son action biologique et pharmacologique. Cependant, très peu de travaux de recherche se sont attaqués au problème de l'analyse quantitative de l'ETI. Le document unique (en chinois)

sur l'analyse de l'ETI dans les produits pharmaceutiques décrit une méthode non validée qui combine une colonne Agilent TC-C18 avec la phase mobile constituée avec du méthanol-eau (70 :30, v/v) [37]. Un autre travail général sur la procédure de caractérisation des métabolites de médicaments chez l'homme cite brièvement le cas de l'ETI [38]. Depuis quelques années, il est fortement recommandé que toute méthode de développement en HPLC de molécules actives devrait inclure une bonne séparation des pics entre le principe actif et ses produits de dégradation résultant de l'action de différents stress et méthodologie officielle existe [39]. Aussi, il nous a semblé impératif de développer une procédure rapide et simple pour l'analyse de l'ETI par HPLC et que la méthode utilisée à cet effet soit indicatrice de stabilité.

#### I.4.2. Propriétés physico-chimiques

<b>Dénomination commune international(DCI)</b>	Étifoquine
<b>Classe thérapeutique</b>	Anxiolytique
<b>Classe chimique</b>	Benzoxazine
<b>Dénomination chimique</b>	6-chloro-N-ethyl-4-methyl-4-phenyl- 4H-benzo[d] [1,3] oxazine-2-amine
<b>Formule brute</b>	$C_{17}H_{17}ClN_2O$
<b>Formule moléculaire</b>	
<b>Poids moléculaire</b>	$300,783 \pm 0,017 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ C 67,88 %, H 5,7 %, Cl 11,79 %, N 9,31 %, O 5,32 %
<b>Caractères</b>	Aspect: poudre blanche Solubilité: soluble dans le méthanol et l'acétonitrile

### **I.4.3. Mécanisme d'action**

Contrairement aux benzodiazépines, la spécificité du mécanisme d'action de l'étifoxine, en agissant sur un site cible différent de benzodiazépines, même si l'effet physiologique qui est produit est similaire à celui des benzodiazépines [40]. C'est par cette différence dans les moyens de liaison que l'étifoxine peut être utilisé aux côtés de benzodiazépines à potentialiser leurs effets, sans concurrence pour les sites de liaison [41]. Cela signifie aussi que les effets de l'étifoxine ne sont pas renversés par le Flumazénil antagoniste des benzodiazépines.

### **I.4.4. Pharmacocinétique**

Le chlorhydrate d'étifoxine est bien absorbé par voie orale, il ne se fixe pas aux éléments figurés du sang, la concentration plasmatique décroît lentement en trois phases et il s'élimine principalement par voie urinaire. Il passe dans le placenta.

- La biodisponibilité 90%.
- Demi-vie : se situe entre 2 à 6 heures (étifoxine) et de 20 à 30 heures (métabolite actif). [42]
- Le métabolisme est hépatique pas d'interaction avec le cytochrome p 450. [43]
- L'excrétion est rénale. [43]
- Absorption : résorbé à 90% par le tractus gastro-intestinal.

### **I.4.5. Conditions thérapeutiques**

Ce médicament ne doit pas être utilisé dans les cas d'insuffisance hépatique ou rénale graves myasthénie. Compte tenu des données disponibles, il est préférable par mesure de prudence d'éviter d'utiliser l'étifoxine au cours de la grossesse quel qu'en soit le terme.

En effet les données animales sont rassurantes mais les données cliniques sont insuffisantes. Il n'est pas adapté au traitement des états dépressifs. Il peut induire une somnolence, parfois intense chez certaines personnes. Cette somnolence peut être augmentée par la prise d'alcool ou d'autres médicaments sédatifs. La conduite et l'utilisation de machines dangereuses sont déconseillées, surtout dans les heures qui suivent la prise du médicament. En raison de la présence de lactose, ce médicament est contre-indiqué en cas

de galactosémie congénitale, de syndrome de mal absorption du glucose et du galactose ou de déficit en lactase. Il est administré par voie orale.

## **I.5. Techniques d'analyse utilisées**

### **I.5.1. Spectrophotométrie UV –Visible**

#### **Principe**

La spectrophotométrie UV/Visible repose sur l'interaction du rayonnement électromagnétique et de la matière dans le domaine s'étendant entre 180 et 400 nm.

L'absorbance des composés dans le proche UV et le visible est exploitée en analyse quantitative par application de la loi de Beer Lambert.

Une source de lumière est rendue monochromatique à travers un système dispersant (prisme) ou un système diffractant (réseau). Le faisceau est dédoublé. Un faisceau traverse la cuve et l'autre sert de référence (passe à travers une cuve de solvant). Un photomultiplicateur enregistre le spectre de transmission  $T = I / I_0$  puis traite l'information de façon à donner l'absorption. Le spectre est ensuite affiché et traité par un ordinateur qui détermine les différentes longueurs d'onde d'absorption maximale ainsi que les absorptions correspondantes.

### **I.5.2. Chromatographie liquide haute performance (HPLC, High Performance Liquid Chromatography)**

#### **I.5.2.1. Introduction**

D'une manière générale, l'HPLC, qui fait intervenir une phase stationnaire constituée d'un support de particules fines, greffé de motifs organiques variés (très souvent des hydrocarbures en C8 ou C18), et une phase mobile liquide, demeure la technique la plus utilisée car elle présente de nombreux avantages tels que sa simplicité de mise en œuvre, sa reproductibilité, une gamme étendue de phases stationnaires commercialement disponibles permettant de moduler les interactions avec le soluté, et ses diverses possibilités de couplages avec d'autres techniques chromatographiques et/ou des systèmes de détection.

Parmi les différents systèmes de détection pouvant être couplés avec l'HPLC, les systèmes de détection les plus communément utilisés sont les détections par absorption dans l'ultraviolet-visible (UV-vis), fluorescence, diffusion, électrochimie, spectrométrie de masse (MS, Mass Spectrometry) . Outre ces avantages, cette technique peut être utilisée selon plusieurs modes de séparation en fonction des caractéristiques physico-chimiques des analytes à séparer dont le mode dit phase normale (NP, Normal Phase) dans lequel la phase stationnaire est polaire et la phase mobile est apolaire, et le mode dit phase inverse (RP, Reversed Phase) .

### I.5.2.2. Paramètres d'un chromatogramme

#### - Efficacité

L'efficacité de la colonne exprime la finesse des pics des composés sortant de la colonne. Elle s'exprime en nombre de plateaux théoriques N, chiffre calculé selon l'équation :

$$N = 16(\text{tr} / w)^2 = 5,54 (\text{tr} / w_{1/2})^2$$

Avec :

tr : temps de rétention

w : largeur du pic a la base

$w_{1/2}$ : largeur du pic a mi-hauteur

#### - Facteur de symétrie (ou traînée de pic)

Dans des conditions thermodynamiques optimales, les pics devraient être des gaussiens symétriques. En pratique, ce n'est pas souvent le cas. On calcule le facteur de symétrie par le rapport a/b des demi-largeurs à 10 % de la hauteur totale du pic. En principe, a/b doit être compris entre 0,85 et 1,2.

- **Facteur de capacité**

Chaque composé élué sort avec un temps de rétention  $t_r$  représentant le temps séparant l'injection du produit et la sortie du composé.

Le facteur de capacité est une mesure du temps de rétention d'un composé corrigé par le temps d'élution d'un composé non retenu :

$$k' = (t_r - t_0) / t_0$$

Avec :

$t_r$  : temps de rétention du composé mesuré à partir de l'injection

$t_0$  : temps de rétention du composé non retenu

Les valeurs idéales de  $k'$  sont comprises entre 1 et 10.

- **Sélectivité**

La sélectivité  $\alpha$  mesure l'aptitude d'un système chromatographique à séparer les composés injectés. Elle est égale à l'équation :

$$\alpha = k'_2 / k'_1$$

$k'_1$  et  $k'_2$  : facteurs de capacité des 2 solutés à séparer.

Les valeurs de  $\alpha$  sont en général comprises entre 1,05 et 2.

- **Résolution**

La résolution  $R$  permet d'apprécier l'efficacité de la séparation des composés.

On calcule la résolution par le rapport suivant :

$$R = 2 (t_{r2} - t_{r1}) / (w_1 + w_2)$$

$t_{r1}$  et  $t_{r2}$  : temps de rétention des 2 solutés à séparer

$w_1$  et  $w_2$  : largeur des pics à la base des 2 solutés à séparer

La séparation des composés est complète lorsque la résolution est supérieure ou égale à 1.

Les différentes grandeurs chromatographiques sont liées entre elles, comme l'indique la relation suivante :

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N} [(\alpha - 1) / \alpha] [k' / (1 + k')]$$

### I.5.3. Couplage entre la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse

#### I.5.3.1. Introduction

La spectrométrie de masse est une technique structurale incontournable pour l'étude des composés organiques. Plusieurs raisons expliquent son succès actuel :

- la grande sensibilité et sélectivité de ce « détecteur universel »
- la facilité de couplage avec les techniques d'analyses séparatives.
- les possibilités de cette technique sont étendues offrant de nombreux champs d'investigation
- spectrométrie de masse des milieux organiques (CG-SM, CL-SM...);
- spectrométrie de masse élémentaire (ICP- SM...);
- spectrométrie de masse isotopique.

L'appareil polyvalent n'existe pas en couplage CL/ SM, et le marché s'oriente de plus en plus vers des appareils dédiés à des applications bien précises. Rappelons, que quelle que soit la technologie, les informations obtenues par spectrométrie de masse sont les suivantes :

- la masse moléculaire du composé (ion moléculaire) ;
- la masse de fragments moléculaires;
- la formule brute du composé, si l'appareil permet la mesure à la troisième décimale de la masse.

La chromatographie liquide, technique d'analyse séparative, relativement universelle, permet de séparer des mélanges complexes avec une excellente résolution. Couplée à la spectrométrie de masse, l'outil devient précieux car les composants du mélange peuvent être caractérisés directement et quantifiés sélectivement et spécifiquement. Ceci avec une préparation simplifiée de l'échantillon, quelle que soit la famille chimique de la molécule. Le couplage CL/SM s'impose comme un outil essentiel pour de nombreux domaines où les techniques analytiques jouent un rôle fondamental : analyse environnementale, dépistage de stupéfiants, recherche chimique et pharmaceutique, médecine, biotechnologie (avec notamment la protéomique).

### **I.5.3.2.Principe des sources API**

Dans une source API (atmospheric pressure ionisation), il faut distinguer la source qui génère l'ionisation des molécules et l'interface qui permet le transfert des ions de la zone à pression atmosphérique à l'analyseur fonctionnant sous vide secondaire.

#### **I.5.3.2.1. Production des ions**

Les deux systèmes les plus importants pour générer les ions dans une source API sont : l'ESI (electrospray) l'APCI (atmospheric pressure chemical ionisation)

##### **- L'électrospray**

Cette technique d'ionisation, de loin la plus utilisée en couplage CL/SM, permet de produire des ions à partir d'un composé en solution. La solution est introduite par un capillaire dans un champ électrique de quelques kV. Sous l'effet de ce champ, des gouttelettes chargées sont émises. À mesure que la taille des gouttelettes diminue avec l'évaporation de la solution, la tension des charges superficielles augmente jusqu'au moment où la goutte explose. Il y a alors transfert de charge vers le soluté. Les ions générés sont accélérés vers l'analyseur, les molécules neutres sont éliminées. Cette source ne fonctionne correctement qu'à des débits très faibles, de l'ordre de quelques nl/min.

##### **- APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation)**

Pour l'utilisateur, la source APCI apparaît comme très proche de la source Electrospray dans son utilisation pour le couplage CL/ SM . L'APCI n'est qu'un cas particulier du phénomène appelé ionisation chimique. À la différence de l'ESI, il faut au préalable que la molécule passe en phase gazeuse. La plupart du temps l'ionisation est obtenue par réaction chimique avec les molécules  $H_3O^+$  générées dans la source. Cette technique est complémentaire de l'ESI car elle permet l'ionisation des molécules moyennement polaires et permet de réaliser des couplages CL/SM avec les éluants apolaires utilisés en CL en phase normale. Elle est limitée à des molécules ne dépassant pas 1 500-2 000 Da.

### **I.5.3.2.2. Interface**

L'interface permet le transfert des ions de la source opérant à pression atmosphérique à l'analyseur opérant à des pressions de l'ordre de  $10^{-5}$  Torr, le but étant d'éliminer le maximum de molécules neutres avant l'analyseur.

### **I.5.3.2.3. Analyseurs**

L'analyseur permet de séparer les ions en fonction du rapport masse/charge ( $m/z$ ) et de mesurer ce rapport. Plusieurs critères permettent de différencier les analyseurs, les plus importants sont la résolution, la technique de dissociation des ions et, bien évidemment, la géométrie intrinsèque à chaque type d'analyseurs (analyseur quadripolaire, analyseur temps de vol, analyseur trappe d'ions, analyseurs cyclotronique).

#### **- L'analyseur quadripolaire**

Cet analyseur est encore largement utilisé pour le couplage CL/SM. La plupart des détecteurs d'entrée de gamme utilisent cette technologie, la moins coûteuse et la plus facile à mettre en œuvre dans des laboratoires de non-spécialistes. Avec les analyseurs triple quadripôle utilisant cette technologie en mode hybride, il est possible d'accéder aux techniques SM/SM.

Rappelons que l'analyseur quadripolaire est le seul à permettre deux modes d'acquisition, le mode balayage et le mode filtrage sélectif. Le mode balayage que l'on retrouve sur tous les types d'analyseurs permet d'obtenir un spectre de masse sur une gamme  $m/z$  prédéfinie. La sensibilité est liée à la vitesse de balayage. La tendance des derniers développements est d'augmenter la vitesse de balayage afin de s'adapter aux techniques de chromatographie rapide sans perte de sensibilité.

#### **- L'analyseur temps de vol (TOF)**

Cet analyseur connu depuis longtemps pour sa sensibilité revient en force dans le couplage CL/SM car sa résolution de l'ordre de 5 000 à 20 000 et son excellente stabilité permettent la mesure de masse exacte à des sensibilités inégalées. Ces instruments, performants et fiables, sont souvent automatisés pour répondre aux besoins de l'analyse à haut débit. Une autre particularité de cet analyseur est sa rapidité de balayage au moins dix

fois supérieure à celle d'un quadripôle. Avec les hybrides quadripôle/TOF, on accède à la mesure de masse exacte en mode SM/SM. Ces appareils sont également très fiables pour des applications de dosages.

### - L'analyseur trappe d'ions

Cette technologie est récente et déjà les trappes d'ions ont trouvé leurs domaines d'application. Leur sensibilité est comparable au TOF. Pour le structuraliste ou le biologiste, ces appareils permettent de décomposer les schémas de fragmentations. L'utilisation en analyse quantitative et en mode haute résolution est beaucoup explorée par les constructeurs pour proposer une technologie très complète dans le futur.

## I.5.4. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

### -Principe

Certains noyaux sont comparables à de petits aimants, qui soumis à un champ magnétique intense peuvent sous l'action d'un champ de radio fréquence (RF) convenable, absorber une certaine quantité d'énergie : c'est le phénomène de résonance. Il se traduit par le passage des noyaux d'un état énergétique favorable à un état énergétique défavorable.

Tous les noyaux ne présentent pas de résonance :

1- Les noyaux sensibles au champ magnétique externe qui possèdent un spin nucléaire  $I$  égal à  $\frac{1}{2}$  comme le proton  $^1\text{H}$ , le carbone  $^{13}\text{C}$ , le phosphore  $^{31}\text{P}$ , l'azote  $^{15}\text{N}$  ou le fluor  $^{19}\text{F}$ . Ils ont une circulation de charge sphérique, et possèdent deux moments magnétiques.

2- Les noyaux à spin  $I$  supérieur à  $\frac{1}{2}$  : le deutérium  $^2\text{H}$ , l'azote  $^{14}\text{N}$ , l'oxygène  $^{17}\text{O}$  ou encore le soufre  $^{33}\text{S}$  ont une circulation de charge non sphérique et possèdent un moment quadripolaire nucléaire. Tous ces noyaux sont capables de résonner mais dans des conditions différentes.

3- Les noyaux non sensibles possèdent tous un nombre de masse et un nombre atomique pairs. La parité de ces deux valeurs entraîne un moment magnétique nucléaire unique. Les noyaux de carbone  $^{12}\text{C}$  ou d'oxygène  $^{16}\text{O}$  possèdent un spin  $I$  égal à 0.

La RMN en tant que méthode analytique concerne essentiellement les noyaux avec un nombre de spin = 1/2 ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ ). Cette méthode permet, à condition de disposer d'une substance parfaitement pure et en quantité suffisante, d'aboutir à la détermination complète des structures avec en particulier la stéréochimie des liaisons entre atomes. Il est possible d'utiliser la RMN du proton (1H-RMN), celle du carbone ( $^{13}\text{C}$ -RMN) ou celle du phosphore ( $^{31}\text{P}$ -RMN).

La faible abondance du  $^{13}\text{C}$  dans la nature (1% environ) fait que la RMN du carbone est peu sensible. La RMN du proton analyse les composés dissous dans un solvant deutéré (les signaux du solvant n'interfèrent pas avec ceux de la molécule à étudier).

Le déplacement chimique  $\delta$  décrit la dépendance des niveaux d'énergie magnétique du noyau avec l'environnement électronique de la molécule. Il caractérise un type de proton donné d'une espèce chimique donnée. Il est indépendant du champ magnétique. Plus le proton est placé dans un environnement attracteur d'électrons, plus il est déblindé et plus son déplacement chimique est élevé. Des protons chimiquement équivalents ont même  $\delta$  et sont dits isochrones. Dans un spectre, l'axe des déplacements chimiques est orienté vers la gauche. La grandeur portée en ordonnée est proportionnelle à l'intensité du courant électrique généré par la résonance. L'aire du signal (donnée par intégration) est proportionnelle aux nombres de protons isochrones responsables de ce signal. Le **déplacement chimique** permet de déterminer la position relative des fréquences d'absorption. La référence utilisée est le tétraméthylsilane (TMS) car il présente une constante d'écran élevée, il est volatil, soluble dans les solvants organiques, il est inerte chimiquement et utilisé en petite quantité. Si le signal est émis près du TMS on parle de champ fort : il y a blindage. Si le signal est émis loin du TMS (champ faible) il y a déblindage.

La spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  fournit des données sur la disposition des atomes d'hydrogène dans une molécule. La spectroscopie RMN  $^{13}\text{C}$  nous renseigne sur le squelette carboné. Par ailleurs, la différence d'énergie entre les états de spin de haut et de bas niveau du  $^{13}\text{C}$  est très petite.

Pour ces deux raisons, les spectromètres RMN  $^{13}\text{C}$  doivent être extrêmement sensibles. Heureusement, les spectromètres RMN-TF (à transformée de Fourier) à haut champ d'aujourd'hui sont assez puissants et sensibles ; c'est pourquoi la spectroscopie RMN  $^{13}\text{C}$  est devenue une technique courante.

Avec les nouveaux développements de la RMN du  $^{13}\text{C}$  et en particulier la RMN multi-impulsionnelle, il est possible d'obtenir des spectres "DEPT" (« Distortionless Enhanced Polarization Transfer ») qui permettent de différencier, les 4 types de carbones C, CH, CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub>.

**PARTIE**  
**EXPERIMENTALE**

## **II.1.Méthode spectroscopique UV développement et validation**

### **II.1.1. Appareillage et réactifs**

- L'appareil UV–Visible Spectrophotometer 2201 (Systronics) utilisant des cellules en quartz de 1 cm (Systronics) a été employé pour développer la méthode de dosage.
- Le « Systronics software » a été utilisé pour la mesure des absorbances qui ont été mesurées à 254 nm.
- Signalons que le méthanol (qualité UV) a été employé pour la préparation des solutions standards et solutions essais.

### **II.1.2. Préparation des solutions**

#### **II.1.2.1. Solutions standards**

Une quantité voisine de 50 mg d'ETI est pesée dans une fiole de 50 mL. Après une dissolution dans 40 mL de méthanol, on ajuste au trait de jauge avec le même solvant pour donner la solution primaire stock à  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . A partir de cette solution une dilution est effectuée pour obtenir  $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

#### **II.1.2.2. Solutions essais**

20 gélules sont vidées et leur contenu pesé. Après broyage, une quantité de poudre équivalente au poids moyen contenu dans une gélule est pesée (équivalente à 50 mg ETI). Elle est transférée dans une fiole de 50 mL. 40 mL de méthanol sont ajoutés ; la solution est agitée magnétiquement pendant 15 min, « sonifiée » pendant 10 min et complétée au trait par le méthanol. La solution est filtrée sur un filtre Millipore de  $0.45 \mu\text{m}$ . Elle est ensuite diluée au 1/50 avec le méthanol pour obtenir finalement la solution essai à analyser. Le méthanol a été utilisé comme blanc dans les mesures par spectroscopie UV.

### **II.1.3. Validation de la méthode spectroscopique**

La validation d'une méthode analytique joue un rôle majeur dans la découverte, le développement et la fabrication des produits pharmaceutiques.

La méthode spectroscopique UV a été validée en déterminant les paramètres définis par les lignes directrices de l'ICH [58], il s'agit de la spécificité, linéarité, fidélité et exactitude.

#### **II.1.3.1. Spécificité**

La spécificité a été évaluée en comparant les spectres des solutions standard, essai et du placebo contenant les excipients constituant la matrice de la gélule.

#### **II.1.3.2. Linéarité**

Pour tester la linéarité, un graphe représentant l'absorbance de cinq solutions standards dans l'intervalle (10-30  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) a été tracé. Signalons que chaque préparation a été mesurée trois fois. La linéarité a été évaluée par une régression utilisant la méthode des moindres carrés.

#### **II.1.3.3. Fidélité**

La fidélité a été évaluée en déterminant la répétabilité et la fidélité intermédiaire. Les absorbances de six solutions essais fraîches (niveau 100%, 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) ont été mesurées trois fois chacune pour mettre en évidence la répétabilité. La fidélité intermédiaire a été calculée à partir des mesures obtenues de six solutions standards indépendantes (niveau 100%, 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), analysées trois fois chacune par deux manipulateurs différents pendant trois jours successifs. La répétabilité et la fidélité intermédiaire sont évaluées à partir des coefficients de variation obtenus (RSD).

#### **II.1.3.4. Exactitude**

L'exactitude a été établie pour des niveaux de concentration à 50 %, 100 % et 150 % (trois solutions pour chacun des pourcentages), équivalents respectivement à 10, 20 et 30

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ , où une quantité connue du principe actif est ajoutée à une quantité de placebo. L'exactitude est estimée par le rendement en ETI exprimé en %.

### **II.1.3.5. Stabilité des solutions**

Des échantillons de contrôle ont été préparés à bas, moyen et haut niveau de concentration en ETI (10, 20 and 30  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). La stabilité a été réalisée en mesurant les absorbances de ces solutions à température ambiante et à 4°C. Les mesures ont été réalisées cinq fois. Le temps de stabilité est atteint quand la concentration en ETI devient égale à 97.5 % de la valeur déclarée.

## **II. 2.Méthode indicatrice de stabilité développement et validation**

### **II.2.1. Méthode chromatographique**

#### **II.2.1.1.Appareillage et réactifs**

##### **- Appareillage**

Dans cette étude, les séparations chromatographiques ont été réalisées en phase inverse sur un chromatographe en phase liquide à haute performance (HPLC) Waters composé de :

- Pompe quaternaire Waters 600E.
- Détecteur à barrette de diodes modèle 996 Waters (Photodiode Array Detector PDA).
- Injecteur de type Rhéodyne 7725i muni d'une boucle de 20  $\mu\text{l}$ .
- Dégazeur en ligne Supelco.
- Colonne KROMASIL C18 (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) de AKZO Nobel (Suède).

Ce système est relié à une unité d'acquisition et de traitement des données à l'aide du logiciel d'analyse Empower Pro build 1154 (Waters).

##### **➤ Autres appareillages**

- pH-mètre (HANNA pH 211).
- Ultrasons Branson 2510 (Branson Ultrasonics, USA).
- Balance Kern ABS (Kern).

- Filtres Millipore 0.45 µm.
- Etuve
- Agitateur : (Tacussel électronique).

### - **Principe actif, réactifs et solvants**

Le chlorhydrate d'etifoxine (99,3%) est bien fourni par le Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques (Alger, Algérie). Ainsi que les excipients utilisés (Lactose monohydraté, Talc, Cellulose microcristalline, Silice colloïdale anhydre et le Stéarate de magnésium).

Tous les réactifs utilisés sont de qualité analytique ou pour chromatographie :

- Eau ultra-pure obtenue par le système Direct-Q 3 (Millipore).
- Formiate d'ammonium (Prolabo France).
- Méthanol (Sigma Aldrich, USA).
- Acétonitrile (Sigma Aldrich, USA).
- Acide formique (Sigma Aldrich, USA).
- Acide chlorhydrique.
- Hydroxyde de sodium.
- Peroxyde d'hydrogène.

## **II.2.2. Conditions chromatographiques**

### **II.2.2.1. Choix de la méthode d'analyse**

Plusieurs phases mobiles ont été testées pour obtenir une bonne résolution entre l'ETI et ses produits de dégradation. Elles sont constituées de différents mélanges avec différents pH. Le formiate d'ammonium a un pKa de 3,8 et sa gamme de tampon (pKa ± 1 unité) est de 2,8 et 4,8. Par conséquent, les phases mobiles sont constituées de méthanol (composition volumétrique varie de 65 à 75%) et de tampon formiate de 0,02 M (pH de 3 à 4). L'utilisation de méthanol était importante pour accroître le facteur de rétention et d'obtenir une meilleure résolution entre l'ETI et ses PDs. La phase mobile appropriée doit contrôler la sélectivité et de réaliser des séparations reproductibles avec une forme de pic acceptable.

La phase mobile est préparée quotidiennement et filtrée à travers un filtre Millipore 0.45  $\mu\text{m}$  et elle subit une phase de dégazage pendant 30 minutes avant l'utilisation. Les conditions chromatographiques optimales seront déterminées et appliquées pour valider notre méthode. La démarche expérimentale est résumée dans le tableau (3).

<b>Conditions chromatographiques</b>	
<b>Colonne</b>	Colonne HPLC type Kromasil C <sub>18</sub> de dimension (250*4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$ )
<b>Phase mobile</b>	Mélange tampon (différents pH)/méthanol (différentes compositions)
<b>Longueur d'onde</b>	254 nm
<b>Débit</b>	1mL.min <sup>-1</sup>
<b>Volume injecté</b>	20 $\mu\text{l}$

**Tableau (3) : Conditions chromatographiques.**

L'analyse est réalisée en régime isocratique, avant chaque séance d'analyse, la colonne est équilibrée pendant 30 minutes avec la phase mobile. Puis, un test de contrôle de la ligne de base est effectué. De même, un contrôle de la pression dans la colonne est effectué pour s'assurer d'être dans les mêmes conditions pour chaque série d'analyse. Après chaque séance d'analyse, la colonne est reconditionnée sous acétonitrile.

### II.2.2.2. Grandeurs chromatographiques expérimentales

Quatre phases mobiles sont testées sous un débit fixé à  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Les injections sont effectuées en trois mesures et les grandeurs chromatographiques (temps de rétention, nombre de plateaux, facteur de trainée et la résolution entre ETI et les PDs) sont mesurées pour chaque phase mobile.

Les performances d'une colonne sont exprimées en fonction de deux paramètres principaux :

- le nombre de plateaux théorique («efficacité» de la colonne) qui exprime la finesse des pics des composés sortant des colonnes.
- la sélectivité qui est l'aptitude du système utilisé à distinguer, donc à séparer les composés injectés.

Pour qu'une séparation soit efficace il faut optimiser simultanément les deux paramètres précédents.

### II.2.3. Mise au point de la méthode analytique

#### ➤ Préparation des solutions

#### ❖ Préparation du tampon

Nous avons pesé 1.261 g de **formiate d'ammonium** dans une fiole jaugée de 1L et complété avec de l'eau pure pour avoir une solution finale de 20 mM.

Quelques gouttes ont été ajoutées d'acide formique pour obtenir le pH approprié.

#### ❖ Solution standard

Nous avons dissous 0,100 g d'etifoxine, dans une fiole jaugée de 100 mL, et complété avec le méthanol

### II.2. Etudes de la dégradation forcée

La stabilité d'ETI est réalisée sous l'action de différentes conditions de stress adéquates d'hydrolyse, oxydation et température qui sont instruites comme mentionné à la Conférence internationale sur l'harmonisation. Dans chaque cas, le temps de stress est maintenu suffisamment longtemps pour atteindre au moins 20% la dégradation de la quantité initiale d'ETI. Les expériences de stress sont faites avec une solution initiale contenant ETI à  $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  dans le méthanol est maintenue à une température de  $70^\circ\text{C}$  à

l'exception de la dégradation thermique et la photolyse. Les conditions de stress optimisées sont présentées dans le tableau (4).

Type de dégradation	Conditions expérimentales	Solution mère d'ETI	Temps d'exposition (h)
Milieu acide	1 mL de HCL 2M	1ml d'ETI 2 mg.mL <sup>-1</sup>	70
Milieu basique	1mL de NaOH 2M	1ml d'ETI 2 mg.mL <sup>-1</sup>	120
Oxydation	1mL de 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1ml d'ETI 2 mg.mL <sup>-1</sup>	60
	1mL de 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1ml d'ETI 2 mg.mL <sup>-1</sup>	45
Thermique	Chauffage à 80 °C	ETI pure	4
Photolyse	Lampe à mercure haute pression à 50W, 2000 lm	ETI 1 mg.mL <sup>-1</sup>	24

**Tableau (4) : Conditions optimales de la dégradation forcée d'Etifoxine**

Les mêmes procédures de la dégradation forcée ont été appliquées sur la solution de la matière première et la solution du produit fini de l'ETI.

## II.2.1. Conditions de dégradation

### II.2.1.1. Dégradation en milieu acide

La dégradation de l'etifoxine par l'acide chlorhydrique (HCl) pendant 70 heures a été étudiée. Un millilitre de la solution d'ETI à 2 mg.mL<sup>-1</sup> était mélangé à 1 mL de HCl 2M. Après un temps de contact adéquat 20% de la concentration initiale d'ETI est dégradée.

### II.2.1.2. Dégradation en milieu basique

La dégradation alcaline a été effectuée en mélangeant 1 mL de la solution initiale d'ETI et 1 mL de NaOH 2M, 120 h sont nécessaires pour obtenir 20% de dégradation.

### **II.2.1.3. Dégradation par oxydation**

20% de la dégradation par oxydation est obtenue par exposition de 1 mL de la solution initiale à 1 mL de 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 60 h et 45h respectivement.

### **II.2.1.4. Dégradation thermique**

La dégradation par la chaleur a été réalisée par la soumission de l'ETI pure dans une étuve à 80°C. Vingt pour cent de la dégradation est obtenue après 4h de chauffage.

### **II.2.1.5. Photo-dégradation**

Notre échantillon a été soumis aux rayonnements de la lampe au mercure à haute pression de 50 W avec un flux lumineux de 2000lm. La dégradation de 20% de la quantité initiale d'ETI à 1mg/ml est obtenue après 24h d'exposition à la lumière.

## **II.2.2. Techniques de préparation et d'analyse utilisées**

### **II.2.2.1. Chromatographie liquide à haute performance semi-préparative**

Les produits de dégradation obtenus par la soumission d'ETI à différentes conditions de stress ont été isolés pour chaque échantillon par chromatographie semi-préparative en utilisant une colonne Kromasil C18 (250\*10mm, 5 µm) avec la même phase mobile sélectionné après la détermination des conditions chromatographiques optimales. Le volume de la boucle d'injection est de 200 µl. Les éluants de la colonne sont suivis par un détecteur à barrette de diodes à une longueur d'onde de 254 nm.

### **II.2.2.2. L'extraction liquide-liquide**

Quatre solutions recueillies après la séparation par l'HPLC semi préparative contenant du PDA, PDB, PDC et PDD. Une extraction liquide-liquide à été appliqué pour chaque solution afin de purifier les PDs. Le procédé consiste à introduire dans une ampoule à décanté un volume de 50 mL de la solution avec 20 mL de chloroforme, après une agitation vigoureuse la phase organique a été récupérée dans un erlenmeyer ensuite une évaporation à sec a été effectuée.

Le résidu de chaque solution constitué d'un seul PD est récupéré et utilisé pour les essais de validation et les expériences de RMN.

### II.2.2.3. Spectrométrie de masse LC-MS/TOF

Pour les expériences LC-MS/TOF, un système HPLC Ultimate 3000 (Dionex, USA) couplé à un Micro Tof Q II (Bruker Daltonics, Allemagne) est utilisé. La Chromatographie est effectuée dans les mêmes conditions sélectionnées dans la méthode d'analyse choisie. Les paramètres LC-MS/TOF utilisés demeurent constants pour l'ensemble des composés et durant la globalité de l'analyse: source d'ionisation: électrospray (ESI); polarité d'ionisation: positive; Plaque d'extrémité de tension de décalage: -500 V; tension capillaire: 4000 V; pression du gaz de nébulisation: 69,6 psi; gaz sec: 12,0 L.min<sup>-1</sup>; chauffage sec: 300°C; collision cellule RF: 150,0 Vpp; scanner commence à 50 m/z; fin de balayage à 600 m/z. Les données sont collectées sur le logiciel Compass (Bruker Daltonics, Allemagne).

Afin de s'assurer du bon déroulement de l'acquisition, les solutions résultantes des différentes conditions de stress sont diluées 50 fois avec la phase mobile, filtrées à travers un filtre à seringue 25 mm Millex-HV (taille des pores de membrane 0,25 µm).

### II.2.2.4. Résonance magnétique nucléaire (RMN-<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C)

Les spectres RMN du proton et du carbone ont été enregistrés sur un appareil Bruker 400 MHz. Les déplacements chimiques sont donnés en ppm (δ) par rapport au tétraméthylsilane (TMS) pris comme référence interne. L'analyse a été faite dans le chloroforme deutéré CDCl<sub>3</sub> pris comme solvant pour ETI et les PDs.

## II.3. Validation de la méthode chromatographique

Pour valider la méthode d'analyse mise au point précédemment, plusieurs étapes ont été effectuées pour permettre la vérification de la linéarité, l'exactitude, la précision et la spécificité de la méthode. Elle consiste à dégrader intentionnellement la molécule afin de vérifier que la séparation des produits de dégradation et de la molécule intacte est suffisante. Et permet de déterminer si la méthode est "indicatrice de stabilité".

### II.3.1. Spécificité

La spécificité a pour objectif de démontrer qu'aucun produit n'interfère avec l'ETI. Elle a été effectuée vis-à-vis des produits de dégradations (nommés PDA, PDB, PDC, PDD) et vis-à-vis des excipients présent dans les gélules (Lactose monohydraté, Talc, Cellulose microcristalline, Silice colloïdale anhydre et le Stéarate de magnésium). Une solution placebo a été préparée à partir d'un mélange des excipients sans le principe actif (ETI) en respectant leur composition en poids dans les capsules commerciales. Cette solution a été mélangée avec une solution d'échantillon d'un stress oxydatif pour améliorer la spécificité parce que l'action du peroxyde d'hydrogène sur ETI génère les quatre PDs.

### II.3.2. Limite de détection (LOD) et de quantification (LOQ)

La limite de détection et de quantification d'ETI et ses quatre PDs ont été déterminés par une approche basée sur le rapport signal/bruit à 3 et 10, respectivement après un enregistrement du bruit de fond de la phase mobile.

### II.3.3. Linéarité

L'étude de la linéarité a été réalisée avec la méthode d'étalonnage externe pour l'ETI et ses PDs. La gamme d'étalonnage est constituée de 5 concentrations croissantes réparties sur l'intervalle d'étude [50% à 150%]. Trois échantillons ont été prélevés et injectés de 20  $\mu\text{l}$  pour chaque concentration. La stabilité de l'etifoxine a été étudiée à une concentration théorique de 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . La gamme d'étalonnage de l'etifoxine comprend des échantillons dosés à 10, 15, 20, 25 et 30  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Ces solutions sont indépendantes elles sont réalisés à partir d'une solution mère d'etifoxine dans le méthanol d'une concentration de 1  $\text{mg.mL}^{-1}$ . Puis cette solution a été diluée extemporanément avec le méthanol de manière à obtenir les différentes concentrations de la gamme d'étalonnage, les dilutions sont précisées dans le tableau (5).

	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5
% d'ETI	50	75	100	125	150
Solution d'ETI 1mg.mL <sup>-1</sup> dans le méthanol (mL)	0.5	0.75	1	1.25	1.5
Méthanol qsp (mL)	50	50	50	50	50
Concentration du standard (µg.mL <sup>-1</sup> )	10	15	20	25	30

**Tableau (5) : Préparation de la gamme d'étalonnage de l'etifoxine**

Afin de mesurer l'influence éventuelle des PDs sur la méthode de dosage, la linéarité a été examinée pour chaque DP sur l'intervalle de 0,5 à 4 µg.mL<sup>-1</sup> (4 µg.mL<sup>-1</sup> correspond à 20% de la dégradation d'ETI). Toutes les solutions ont été filtrées à travers un filtre à seringue 25 mm Millex-HV (taille des pores de membrane 0,45 µm). La surface du pic d'ETI et les PDs sont mesurées. Une courbe d'étalonnage est obtenue à partir des moindres carrés de la régression linéaire de la surface du pic identifié.

### II.3.4. Fidélité

La précision a été évaluée par le calcul de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire (reproductibilité). Pour effectuer la répétabilité six échantillons identiques à une concentration de 100% ont été fraîchement préparés et mesurés le même jour trois fois de suite pour chaque solution. La fidélité intermédiaire a été évaluée par l'analyse de six réplicats. Pour chaque série de données, deux analystes indépendants ont procédé à l'analyse de trois séries de réplicats chacun à trois journées différentes. La concentration à 100% est 20 µg.mL<sup>-1</sup> pour ETI et 4 µg.mL<sup>-1</sup> pour chaque produit de dégradation.

### II.3.5. Exactitude

L'exactitude a été évaluée par la préparation des échantillons surchargés en excipients (placébo) avec des concentrations différentes de principe actif (ETI), dans la gamme de concentration (50%, 100% et 150%) de la teneur d'ETI (la concentration à 100% est  $1\text{mg.mL}^{-1}$ ). Pour chaque concentration, nous avons préparé trois essais. Puis ces solutions ont été diluées 50 fois avec le méthanol pour avoir la concentration théorique d'ETI (la concentration à 100% est  $20\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). L'exactitude a été estimée par rapport à l'ETI ou le produit de dégradation dont le coefficient de variation (CV) des facteurs de réponses est inférieur à 2%. Le protocole suivi lors de la préparation de ces solutions est décrit dans le tableau (6) suivant :

Nombre d'essais	Nombre de séries	% Théorique d'ETI	Masse d'ETI en mg dans le méthanol (50 mL)	Masse de Placebo en mg	Concentration d'ETI ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) diluée 50 fois
1	1	50	25	154.2	10
2					
3					
4	2	100	50		20
5					
6					
7	3	150	75		30
8					
9					

Tableau (6) : Prises d'essai pour l'étude de la précision

### II.3.6. Robustesse

Nous avons vérifié la fidélité et l'exactitude après modification du pH de la phase mobile, le débit et la longueur d'onde d'absorption du principe actif.

- pH : 2,9 ; 3 et 3,1.
- La longueur d'onde ( $\lambda$  nm): 252 ; 254 et 256 nm.
- Le débit : 0,9 ; 1 et 1,1.

### **II.3.7. Stabilité de la solution**

Des échantillons de contrôle de qualité sont préparés à des concentrations faibles, moyennes et élevées de l'ETI (16, 20 et 24  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Les essais de stabilité sont effectués avec des échantillons de contrôle à basse, moyenne et haute qualité afin d'évaluer la stabilité de la solution de l'ETI à la température ambiante et à 4 ° C. Les mesures sont effectuées dans cinq répétitions. Le temps de stabilité est estimé lorsque la concentration atteint 97,5% de la valeur revendiquée.

### **II.3.8. Analyse des préparations pharmaceutiques**

Une solution étalon à 100% à été préparée, et elle a été injectée cinq fois. Par ailleurs, cinq solutions essais ont été préparées selon le procédé décrit dans la fidélité, et chaque solution à été injectée trois fois.

# **RESULTATS ET DISCUSSION**

### **III.1. Développement et validation d'une méthode d'analyse de l'Etifoxine par spectroscopie UV :**

#### **III.1.1. Introduction**

L'Etifoxine (ETI) est utilisée comme un médicament anxiolytique et anticonvulsivant avec des effets similaires aux benzodiazépines. Bien que diverses études sur l'action biologique et pharmacologique de l'ETI ont été signalées au cours des dernières années, aucune information n'est disponible sur l'analyse quantitative de l'ETI et aucune méthode UV n'a été rapportée. Par conséquent, pour la routine en contrôle de qualité de formulations pharmaceutiques contenant l'ETI, la nécessité d'une méthode rapide, sélective et peu coûteuse est évidente. Il s'agit là de l'objet de cette partie de notre travail.

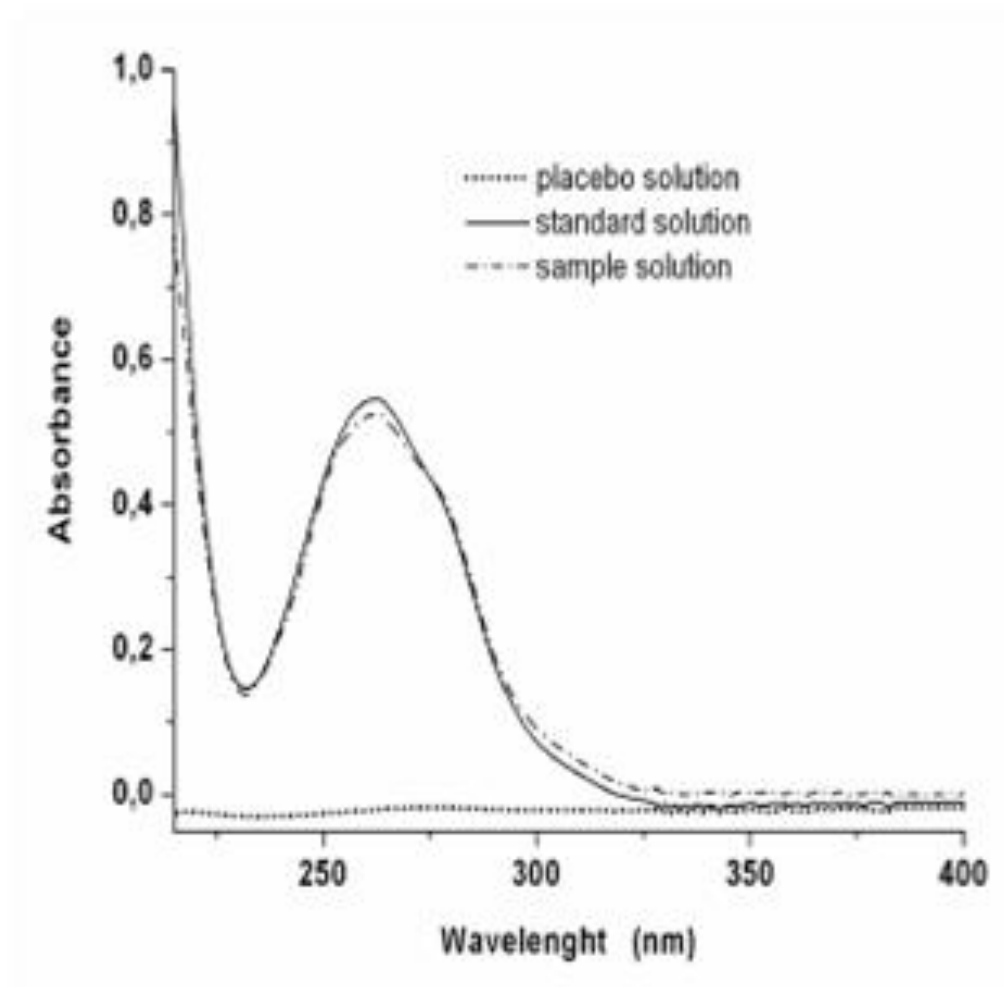
#### **III.1.2. Validation de la méthode UV**

La validation de la méthode spectroscopique proposée est spécifique pour l'analyse de l'ETI dans les gélules. Aucune interférence de la matrice n'a été observée quand on compare les spectres des solutions standards, essai et placebo (voir figure 1). Le spectre d'absorption de l'ETI montre un maximum à 262 nm ; cette longueur d'onde a été utilisée pour toutes les mesures d'absorbances.

La courbe de linéarité a été établie dans le domaine (10-30  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Son équation est: (ordonnée à l'origine =  $-0,0725 \pm 0,00366$ , pente =  $0,00438 \pm 3,41315.10^{-5}$ , coefficient de corrélation = 0.996, valeur de  $t = 0.131$  (test de Student).

La répétabilité et la fidélité intermédiaire obtenues exprimées par leur coefficient de variation sont respectivement égales à 0.85% et 0.98%, démontrant ainsi que la méthode est fidèle.

La moyenne du taux de recouvrement (en %) trouvé pour l'ETI est de  $100.03 \pm 0.77\%$  (critère d'acceptation;  $100 \pm 2\%$ ). Ce résultat prouve la bonne exactitude de la méthode UV proposée.



**Figure (1) : Spectres d'absorbance des solutions standard et essai de l'ETI et du placebo**

D'un autre côté, il est apparu que la solution d'ETI est stable pendant 48 heures à température ambiante et 3 jours à 4°C. Les résultats figurent dans le tableau (7).

ETI ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	T 4 °C		T 25 °C	
	CV %	RSD %	CV %	RSD %
10	99.66	0.70	99.18	0.93
	98.71	0.63	98.32	0.63
	97.91	0.25	93.45	0.98
	95.86	0.76	92.88	0.89
	92.33	0.22	93.77	0.97
20	99.54	0.44	99.44	0.89
	98.67	0.91	99.09	1.11
	98.11	0.47	95.37	1.03
	94.63	0.85	93.44	0.76
	93.27	0.66	92.87	0.95
30	99.44	1.08	99.81	0.44
	99.11	0.89	98.33	0.63
	98.89	0.86	95.22	0.98
	95.93	0.93	94.01	0.75
	93.87	1.07	93.21	0.54

Tableau (7) : résultats de l'étude de stabilité de la solution d'ETI (n = 5 pour chaque jour et chaque concentration)

### III.1.3. Analyse des formes pharmaceutiques

Les résultats expérimentaux de l'ETI dans les gélules ont montré l'absence d'interférences dues aux excipients. Tous les résultats quantitatifs effectués sur le produit fini sont consignés dans le tableau (8).

Quantité par gélule (mg)	Nombre d'analyses	Quantité trouvée	RSD (%)
50	5	50,51	0,40
50	5	49,12	0,22
50	5	49,26	0,79
50	5	49,22	0,42
50	5	49,09	0,23
50	5	49,58	0,81
50	5	50,62	1,10
50	5	49,41	0,75
50	5	50,03	0,48
50	5	49,36	0,34
50	5	50,06	0,45
50	5	50,42	0,93
50	5	49,05	0,90
50	5	49,12	1,30
50	5	49,75	0,60

**Tableau (8) : Résultats de l'analyse de l'ETI dans les gélules par UV**

Une méthode UV a été développée pour déterminer l'ETI dans les gélules. Cette méthode est simple, rapide, linéaire, fidèle et exacte. Elle peut être utilisée en routine en contrôle de qualité.

## **III.2.Développement et validation d'une méthode HPLC indicatrice de stabilité de l'étifoxine [44]**

### **III.2.1.Introduction**

L'objectif des études de stabilité est de découvrir comment un produit pharmaceutique ou une substance active change dans des conditions données (température, humidité de l'air, lumière, hydrolyse acide, basique, oxydation) pendant une période déterminée. Les résultats détermineront entre autres la durée de vie et les conditions de stockage recommandées d'une substance active ou d'un médicament.

Avec les lignes directrices de la Conférence Internationale sur l'harmonisation (ICH), la mise en place de méthode d'analyse indiquant la stabilité (MAIS) est exigée. Ces lignes directrices explicites exigent une conduite des études de dégradation forcée sous différentes conditions, comme l'action de l'hydrolyse acide, basique, la photolyse, l'oxydation, chaleur sèche, etc.

D'un autre côté, la méthode d'analyse choisie doit montrer la séparation du principe actif et des produits issus de sa synthèse. Le procédé devrait permettre aussi l'analyse des différents produits de dégradation. Mais, si les exigences sont nettes, la méthodologie n'est pas proposée dans la réglementation. Une recherche dans la littérature s'est avérée nécessaire, elle a permis de réunir plusieurs publications décrivant des méthodes indicatrices de stabilité pour diverses molécules actives. Le tableau (9) montre quelques exemples d'études relativement anciennes.

L'apparition récente des méthodes couplées a permis d'étendre les recherches pour une meilleure caractérisation des produits de dégradation. Ainsi, Ramisetti et Coll. proposent l'identification des impuretés de la Locasamide issues de différents stress par LC-MS et ESI-Q-TOF-MS/MS. Dans ce même travail, une méthode RP-HPLC indicatrice de stabilité validée pour cette molécule [45] est présentée. Le développement et la validation d'une technique indicatrice de stabilité de la doxofylline par RP-HPLC: ESI-MS/MS avec la caractérisation des produits de dégradation et des impuretés relatives au processus par  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  RMN sont proposés par Rao et al [46]. La même équipe a mis en évidence les impuretés relatives au darunavir (Anti-HIV récent) par LC-MS/MS. [47]

Wu et al. utilisent les couplages LC/TOF-MS et LC-MS/MS pour étudier la cinétique de dégradation du cabozantinib [48]. Et encore plus récemment, nous citons trois travaux relatifs au lurasidone [49], cilazapril [50] et l'ezetimibe [51] où 11 impuretés ont été mises en évidence.

Tout ceci pour montrer que les études relatives aux méthodes indicatrices de stabilité sont d'actualité.

Stress	Drogue	Méthodologie
Acide	Dycloninehydrochloride [52] Flunarizinedihydrochloride [53] Lisinopril [54] Norfloxacin [55] LisinoprilDerivative [56]	HPLC HPLC UV spectrophotometry UV spectrophotometry UV spectrophotometry
Basique	Allantoin [57] Meperidine hydrochloride [58] Metronidazole [59] Benazepril hydrochloride [60] Carbachol [61]	HPLC HPLC HPLC UV spectrophotometry IR spectrophotometry
Neutre	Physostigmine salicylate [62]	HPLC
Oxydation	Nortriptyline hydrochloride [63]	UV spectrophotometry
Lumière	Atenolol [64] Danazol [65] Trifluoperazine hydrochloride [66] Nifedipine [67] Ranitidine hydrochloride [68] Piroxicam [69]	HPLC HPLC HPLC HPTLC Spectrodensitometric TLC HPLC, HPTLC, CE

**Tableau (9) : quelques exemples des méthodes indicatrices de stabilité pour diverses molécules actives**

### III.2.2. Détermination des conditions optimales chromatographiques

Comme il a été indiqué dans la partie expérimentale, les conditions optimales d'analyse ont été recherchées en modifiant :

- ❖ Le pH de la phase mobile (3; 3,5; 4).
- ❖ La Composition de la phase mobile de 65 à 75% de méthanol.

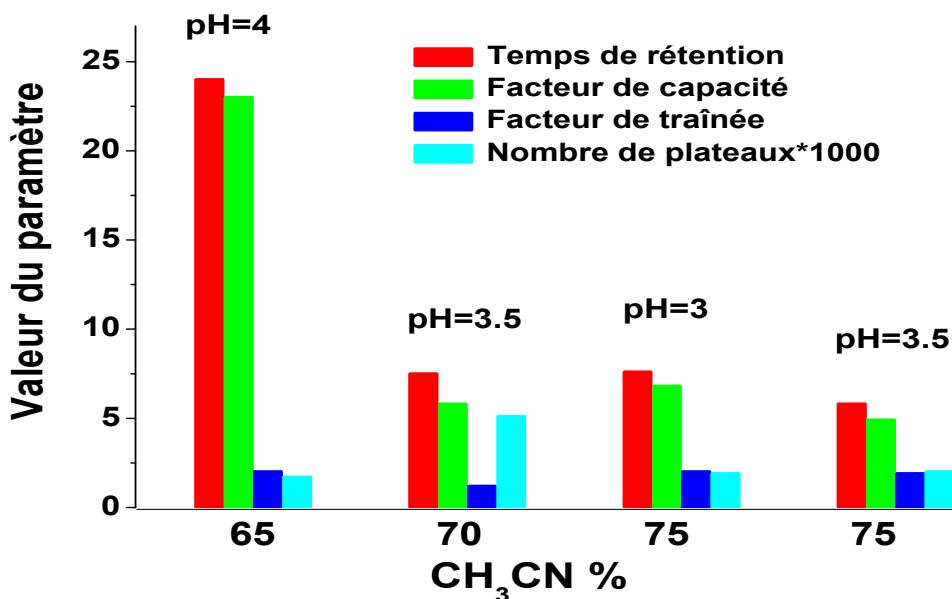
Pour sélectionner les conditions optimales chromatographiques, le premier paramètre qui a été étudié est le nombre de plateaux théoriques ; le facteur de traînée du pic de l'ETI comme second paramètre.

Les résultats obtenus pour les différents paramètres chromatographiques sont résumés dans le tableau (10). Il apparaît que l'efficacité de la colonne (N= 5081) est maximale pour 70% méthanol, et 30% tampon formiate 0,02M (pH= 3). Cette même phase mobile donne le facteur de traînée le plus proche de 1(1,06) compris entre (0,85 et 1,2), le pic est donc bien symétrique. De plus le temps de rétention comme le facteur de rétention ont des valeurs acceptables ( $t_r = 7,5$  min et  $k = 5,8$ ).

Phase mobile			Temps de rétention (tr)	Facteur de capacité (K')	Facteur de traînée	Nombre de plateaux (N) *1000
Tampon phosphate %	pH	Méthanol %				
35	4	65	24	23	2	1.7
30	3	70	7,5	6.1	1.06	5,1
25	3	75	7,6	6.8	2	1.9
25	3,5	75	5.8	4.9	1.9	2

**Tableau (10) : les valeurs des différents paramètres chromatographiques pour l'ETI pour chaque phase mobile étudiée**

La figure (2) illustre sous la forme d'un histogramme la variation des différents paramètres Temps de rétention ( $t_r$ ), facteur de capacité ( $k'$ ), nombre de plateaux ( $N$ ) et le facteur de traînée.



**Figure (2) : Histogramme de différents paramètres chromatographiques de l'ETI avec les phases mobiles testées**

La meilleure résolution entre DPC et l'ETI a été obtenue par la phase mobile (1) mais le temps de rétention de DPA dépasse 43 min. Nous avons constaté que les meilleures valeurs des résolutions entre DPC et ETI, ETI et DPD, DPD et DPB, DPB et DPA sont obtenues avec la phase mobile (2), avec un temps de rétention acceptable de DPA. L'ordre d'élution des différents produits est le même avec toutes les phases mobiles : DPC, ETI, DPD, DPB et enfin DPA. d'environ 22 min. Les valeurs des résolutions entre les différents produits (ETI et DPs) sont données dans le tableau (11).

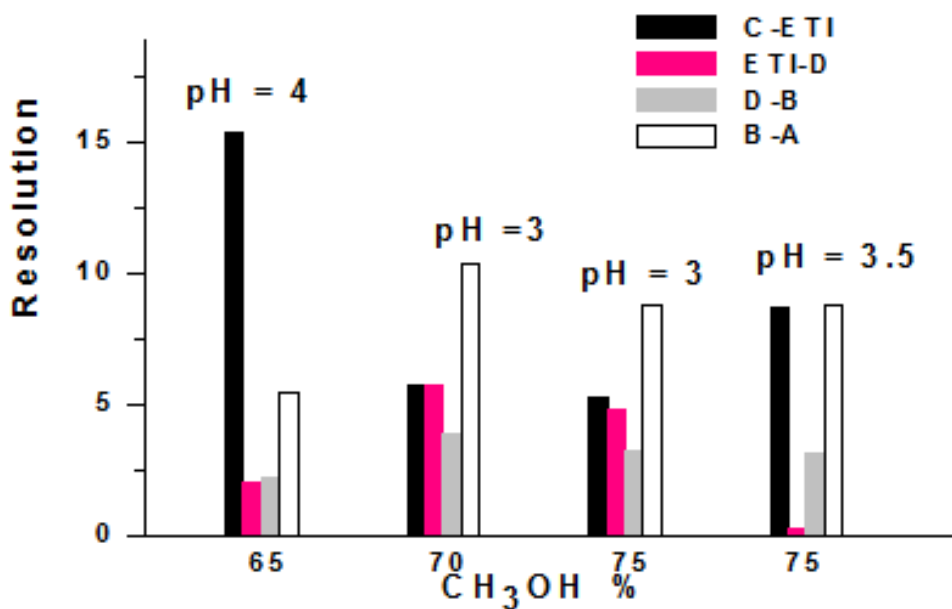


Figure (3) : Histogramme des résolutions entre l'ETI et les DP pour les phases mobiles testées

	C-ETI	ETI-D	D-B	B-A
Phase mobile (1)	15,4	2,03	2,2	5,5
Phase mobile (2)	5,77	5,7	3,9	10,4
Phase mobile (3)	5,3	4,8	3,2	8,77
Phase mobile (4)	8,68	0,3	3,1	8,81

Tableau (11) : Résolution entre deux pics consécutifs (ETI et les DP) pour chaque phase mobile testée

Une synthèse de ces résultats nous permet de sélectionner la phase mobile qui est constituée d'une solution de tampon formiate (0,02M), de pH=3 et contenant 70% de méthanol (phase mobile 2). Dans ces conditions, il est à noter que :

- Les paramètres de suitability trouvés notamment le nombre de plateaux, le facteur de traînée, le temps de rétention et le facteur de capacité sont conformes aux lignes directrices de la FDA (Food and Drug Administration) relatives à la validation des méthodes chromatographiques [25]. Les exigences réglementaires sont consignées dans le tableau (12).
- La séparation de l'ETI et de ses quatre produits de dégradation est illustrée dans la figure (4).

<b>Paramètre</b>	<b>Recommandation</b>
<b>Facteur de capacité</b>	>2.0
<b>Résolution</b>	>2 entre le pic du principe actif et l'interférence potentielle
<b>Facteur de traînée T</b>	T de < / = 2
<b>Nombre de plateaux théoriques (N)</b>	>2000

**Tableau (12) : Paramètres de suitability de l'HPLC (exigences de l'USP et de la FDA).**

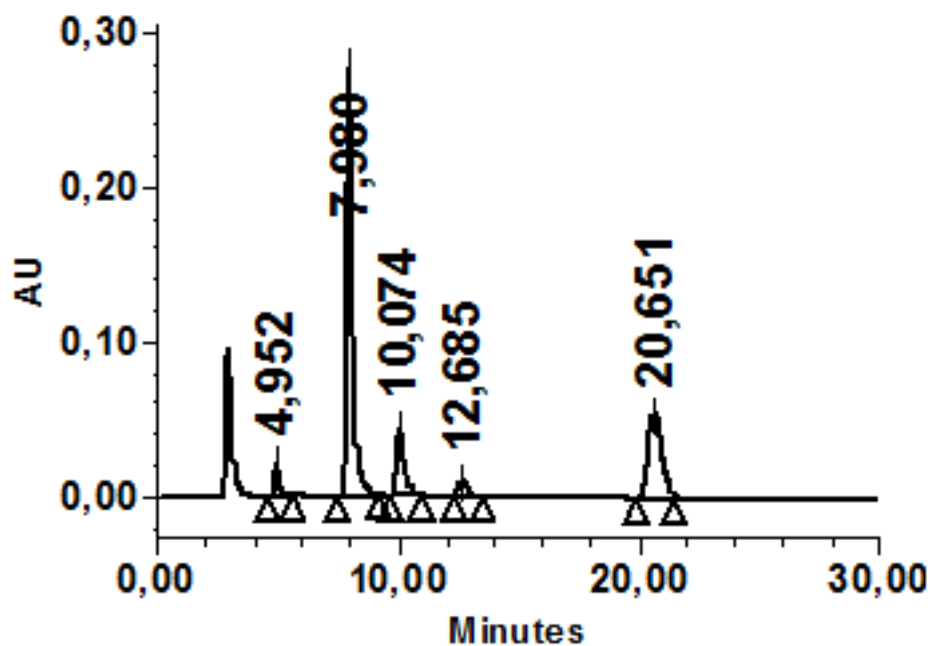


Figure (4): chromatogramme de la solution du stress oxydatif obtenu avec les conditions choisies

### III.2.3. Etudes de la dégradation forcée

La dégradation forcée est un processus qui implique la dégradation des produits pharmaceutiques et des substances médicamenteuses dans des conditions plus sévères que les conditions accélérées. Elle génère ainsi des produits de dégradation qui peuvent être considérés pour déterminer la stabilité de la molécule. La ligne directrice ICH indique que les tests de stress sont destinés à identifier les produits de dégradation probables. Mais ces lignes directrices sont très générales et ne fournissent pas de détails sur l'approche pratique de ces tests de contrainte. Bien que les études de dégradation forcée constituent une exigence réglementaire et une nécessité scientifique au cours du développement de médicaments, elles ne sont pas considérées comme une exigence pour le programme de stabilité formelle.

### III.2.3.1. Résultats de l'analyse chromatographique des échantillons non dégradés

Les chromatogrammes du blanc, de la matière première, du placebo et du produit fini sont présentés ci-dessous :

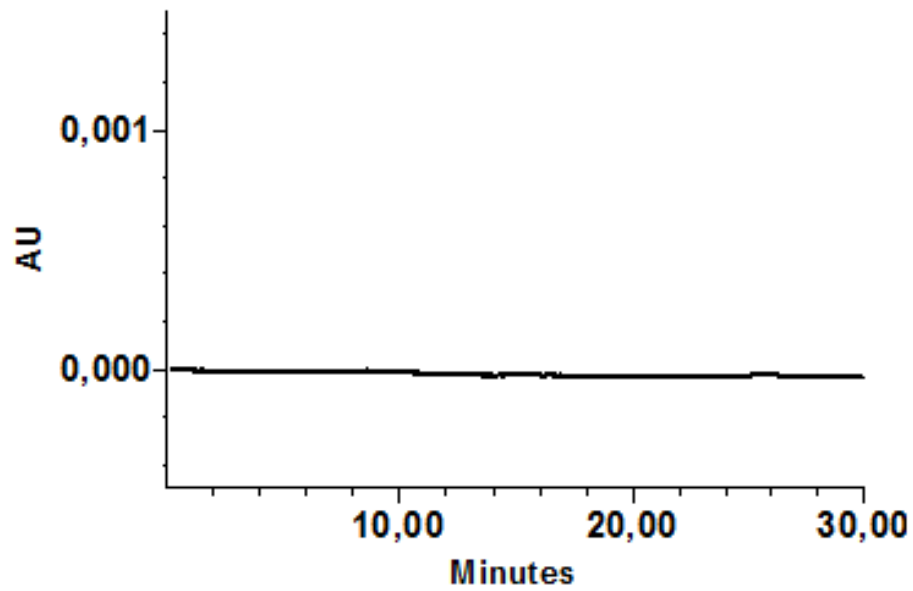


Figure (5): Chromatogramme du blanc

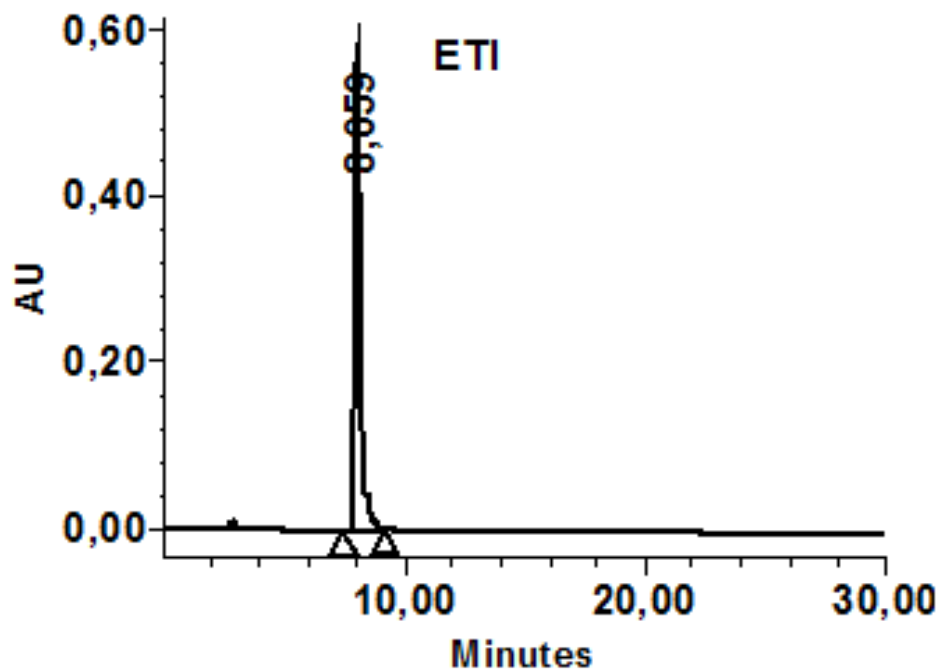


Figure (6) : Chromatogramme de la solution non dégradée de la matière première

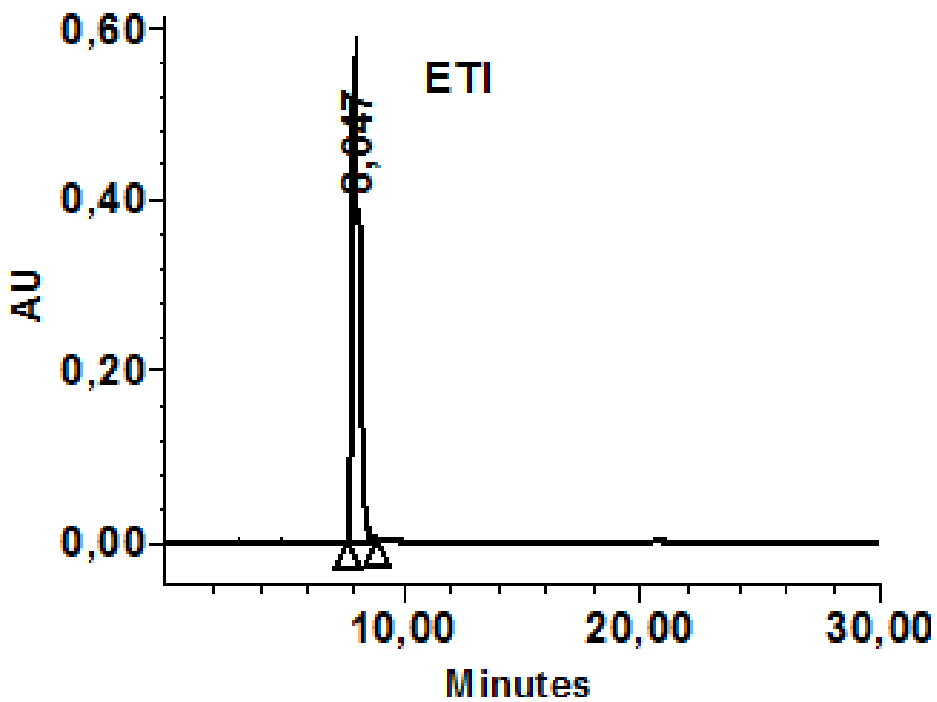
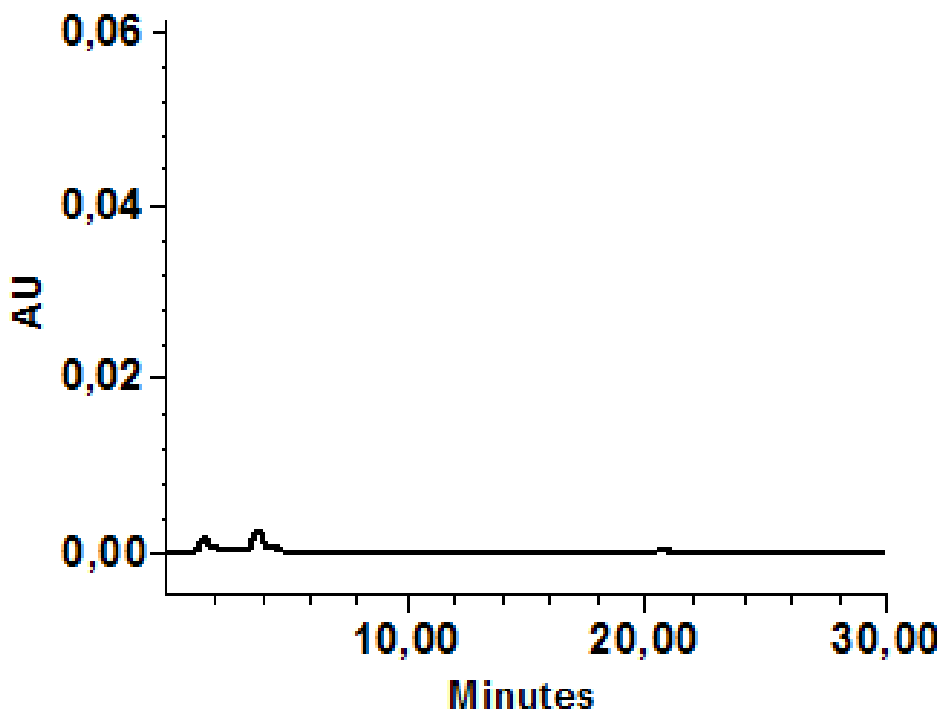


Figure (7): Chromatogramme de la solution non dégradé du produit fini



**Figure (8): Chromatogramme du placebo**

Les résultats des chromatogrammes de la matière première non dégradée et du produit fini non dégradé, vont nous servir pour le calcul des différents taux de dégradation pour les différentes conditions de stress.

### **III.2.3.2. Résultats de la dégradation forcée**

#### **III.2.3.2.1. Dégradation en milieu acide**

Selon les conditions décrites dans la partie expérimentale (II.2.1), en milieu acide, 20% de l'ETI sont dégradés après environ 70h et 72h pour la matière première et le produit fini respectivement. Les chromatogrammes Correspondants sont représentés dans la figure (10) et (11) respectivement ; la figure (9) correspond à la solution du blanc. Initialement, le produit A existe dans la matière première à un taux de 0,28%. Après l'hydrolyse acide, au bout de 70h, ce taux passe à 11,28%. D'autre part, nous constatons un autre pic avec un temps de rétention de 13 minutes et un taux de 0,19%. On le notera DPB. Le stress acide conduit donc à 2 produits, DPA et DPB avec des temps de rétention de 21 et 13 minutes

respectivement. Les mêmes produits sont obtenus lors de la dégradation acide du produit fini comme le montre le chromatogramme (11).

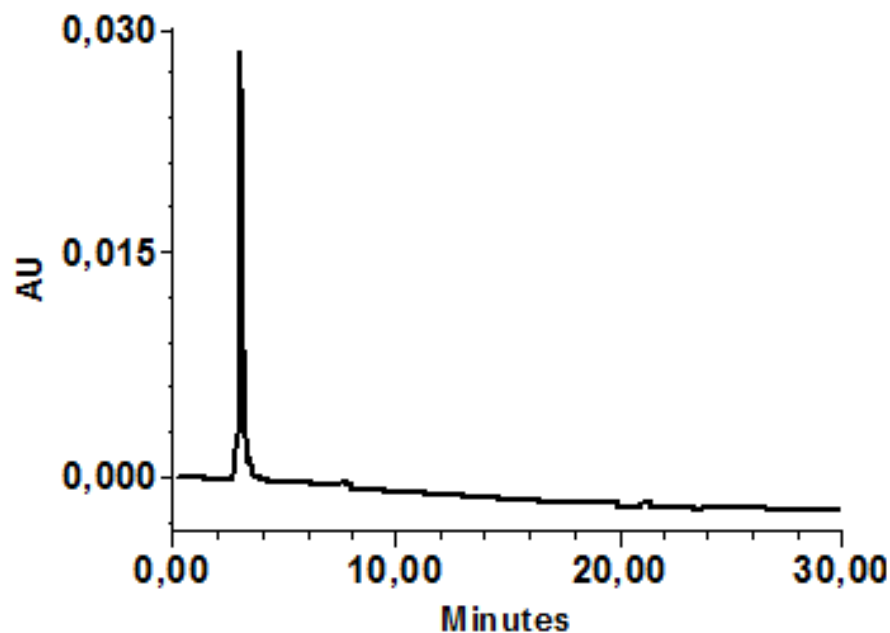


Figure (9) : Chromatogramme du blanc de l'attaque acide de l'ETI

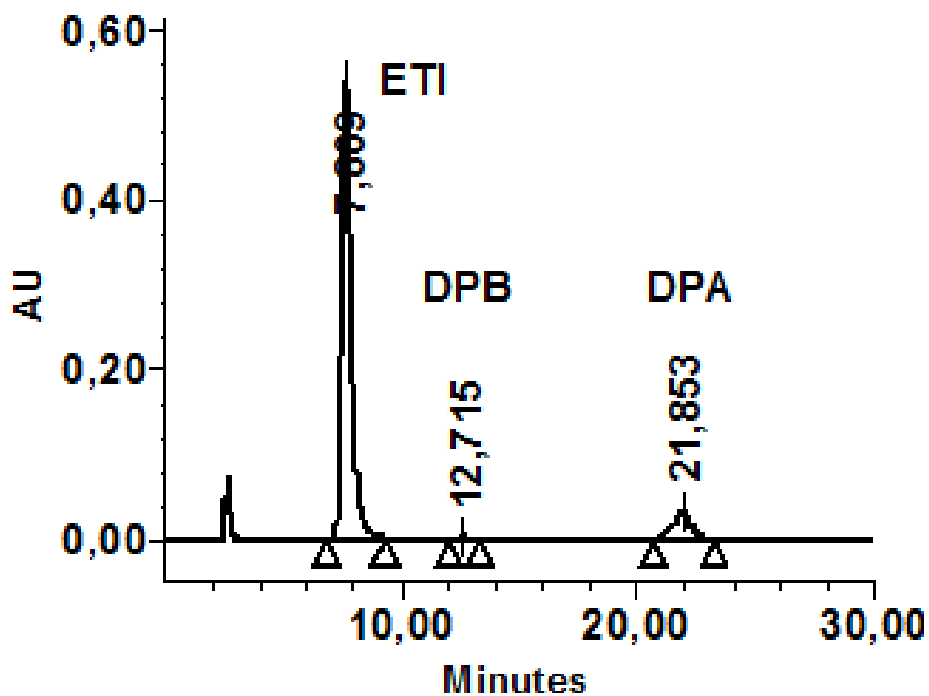


Figure (10) : Chromatogramme de l'ETI après l'attaque acide

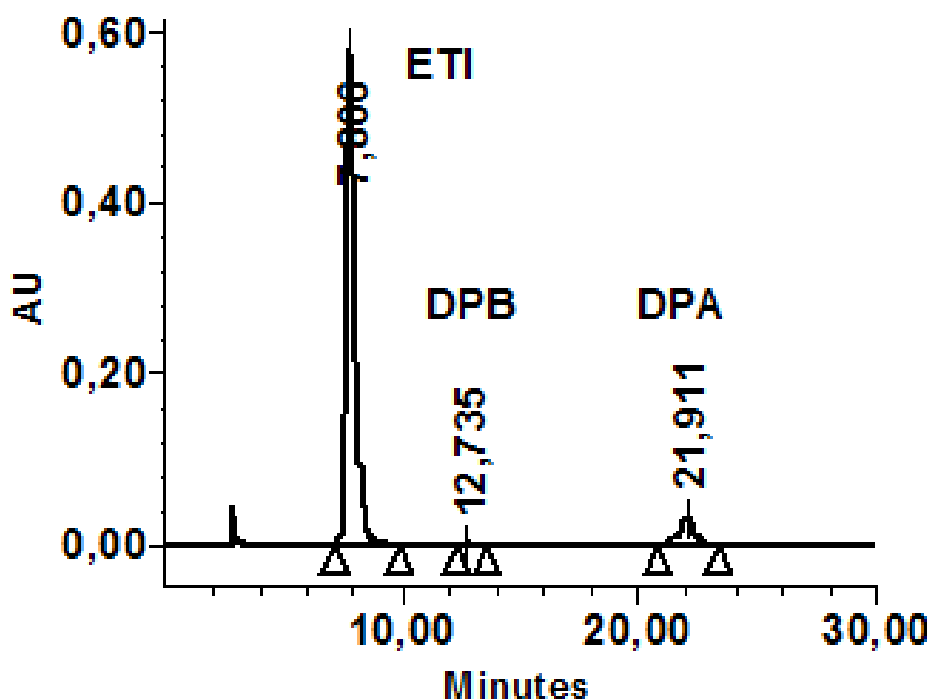


Figure (11) : Chromatogramme du produit fini après l'attaque acide

### III.2.3.2.2. Dégradation en milieu basique

En milieu basique, il apparaît que la dégradation de l'ETI est plus lente que celle du milieu acide. En solution basique, avec les conditions décrites dans la partie expérimentale, 20% de la dégradation de l'ETI sont atteints après 120h de stress pour les deux solutions correspondant à la matière première et au produit fini.

L'attaque basique engendre la formation de trois impuretés. Deux d'entre elle ont les mêmes temps de rétention que DPA et DPB obtenus sous l'attaque acide. Le troisième DP appelé DPC a un temps de rétention de 4 min.

Le chromatogramme correspondant à la solution du blanc est représenté dans la figure (12). Les figures (13 et 14) illustrent les chromatogrammes obtenus lors de l'hydrolyse basique de la matière première et du produit fini de l'ETI respectivement.

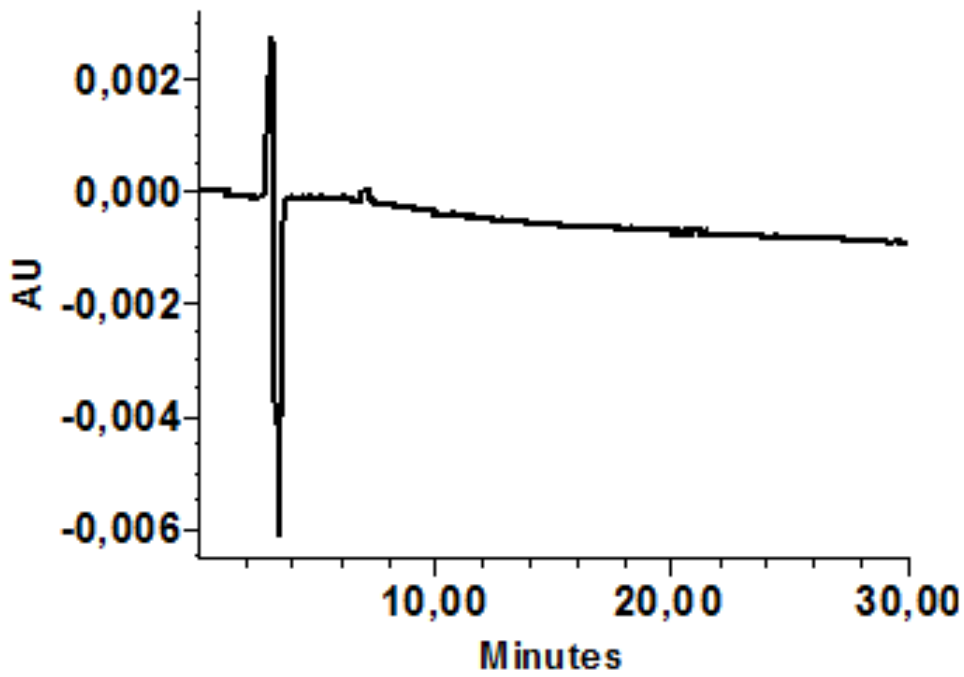


Figure (12) : chromatogramme du blanc de l'attaque basique de l'ETI

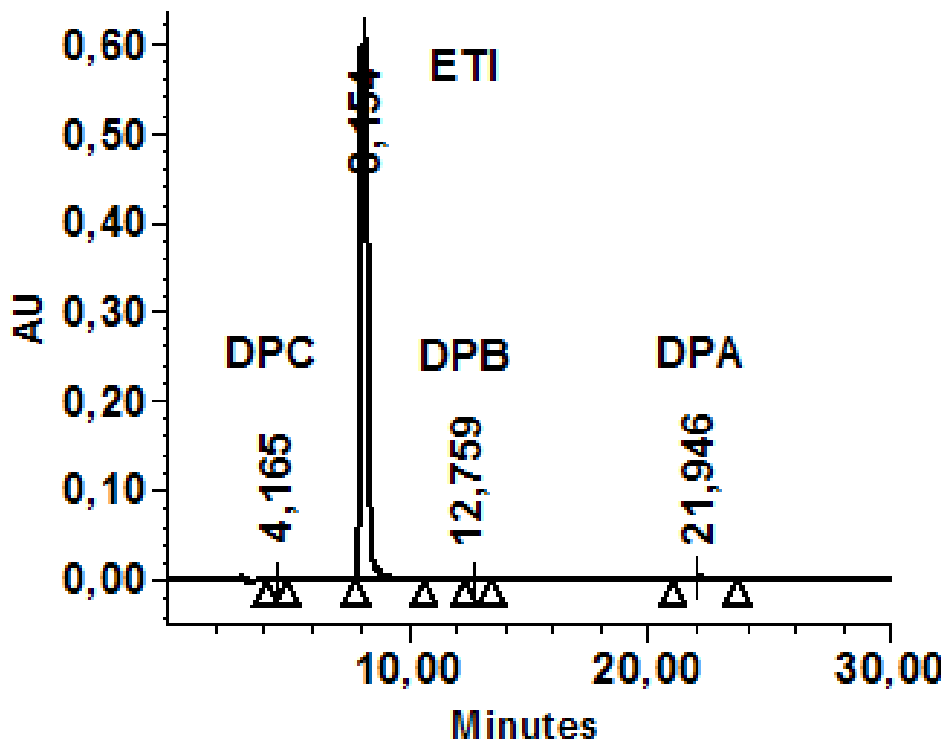


Figure (13) : Chromatogramme de l'ETI après l'attaque basique

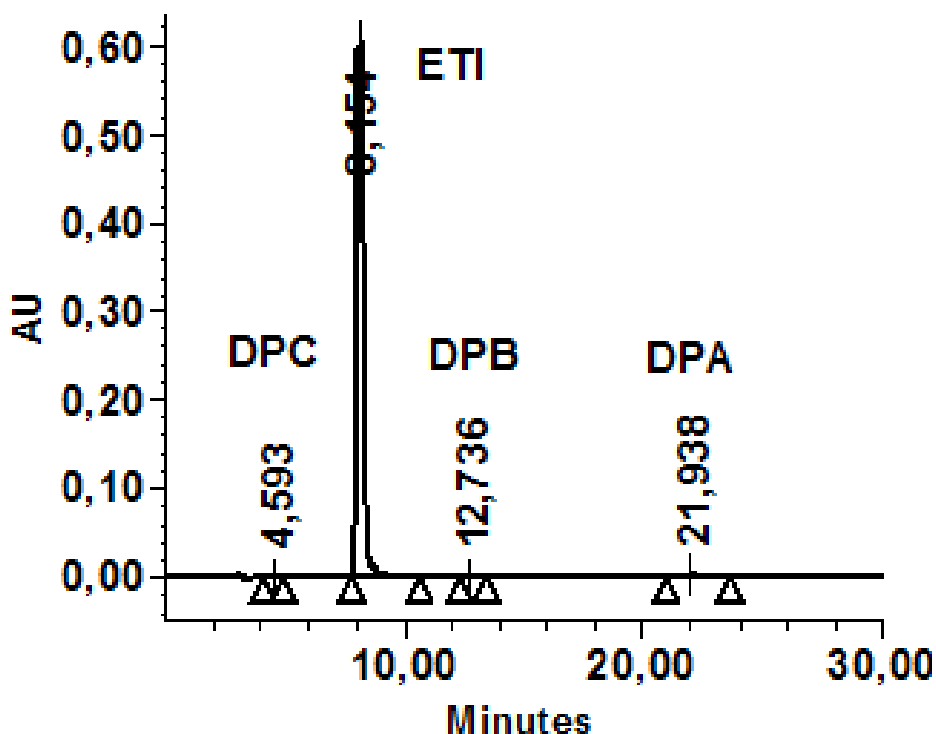


Figure (14) : Chromatogramme du produit fini après l'attaque basique

### III.2.3.2.3. Dégradation par oxydation

Il apparaît que la dégradation de l'ETI est plus rapide avec les solutions de peroxyde d'hydrogène par rapport aux milieux acide et basique. Pour les deux solutions de l'ETI, 60h et 62h respectivement d'exposition sont suffisantes pour obtenir 20% de dégradation avec  $H_2O_2$  à 3%, ces durées décroissent à 45h et 46h avec  $H_2O_2$  à 30%.

Le peroxyde d'hydrogène conduit aux quatre DP préalablement cités dans le choix des conditions optimales d'analyse. Trois d'entre eux ont déjà été mis en évidence lors des attaques acide et basique : DPA, DPB et DPC. Le nouveau produit de dégradation appelé DPD a un temps de rétention de 10min.

Les chromatogrammes du blanc des solutions de  $H_2O_2$  à 3% et 30% sont représentés dans les figures (15 et 16) respectivement. Les figures (17 et 18; 19 et 20) illustrent les chromatogrammes obtenus lors de l'élution de la matière première et du produit fini après action de  $H_2O_2$  à 3% et 30%. Ils mettent en évidence les quatre produits (DPA, DPB, DPC et DPD).

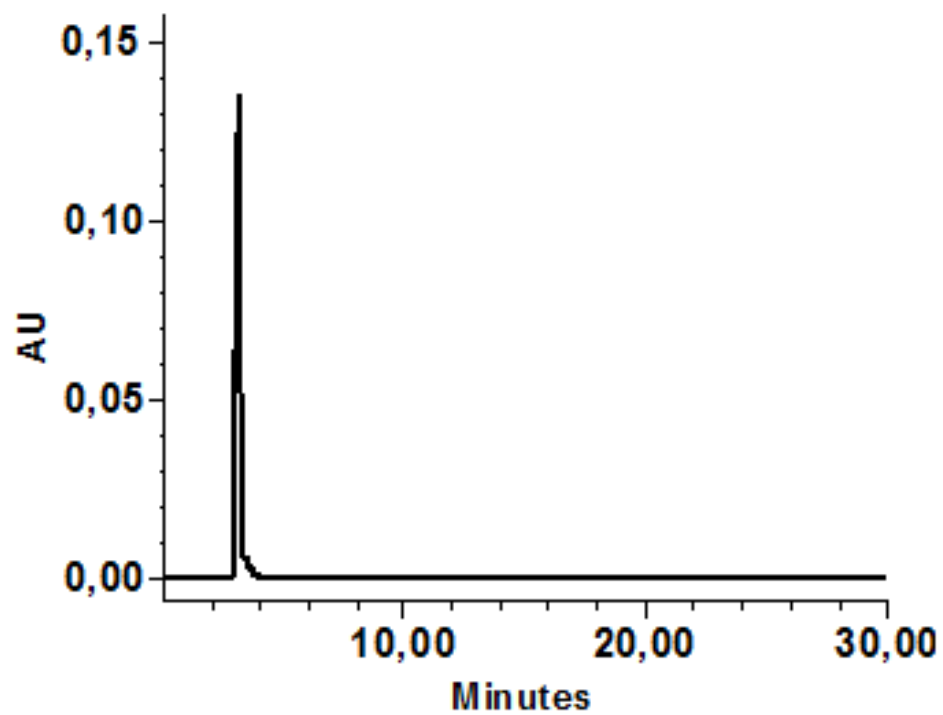


Figure (15) : Chromatogramme du blanc de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 3%

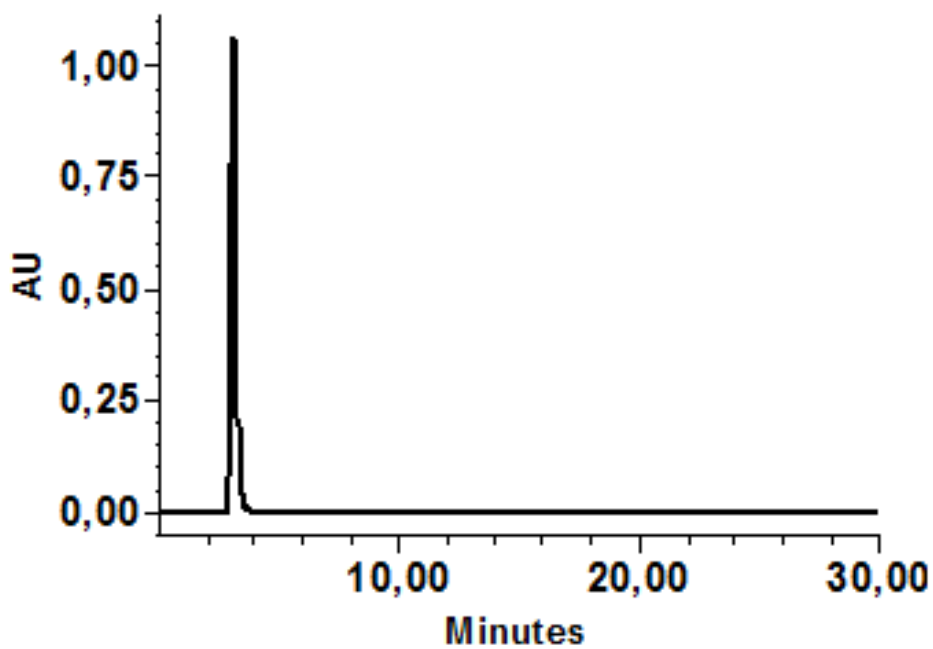


Figure (16) : Chromatogramme du blanc de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30%

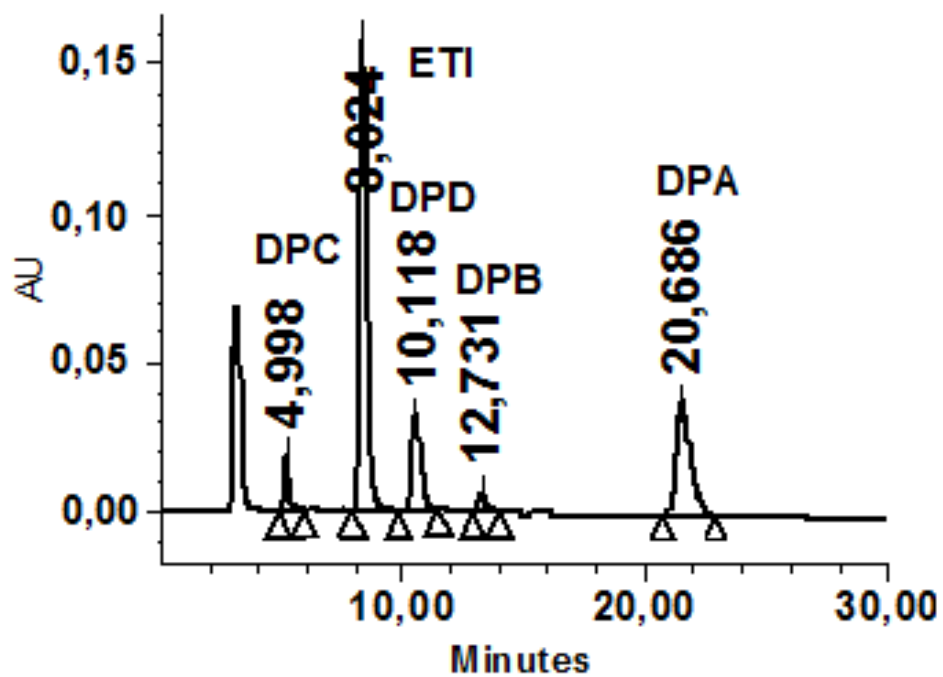


Figure (17) : Chromatogramme de l'ETI après l'attaque par  $H_2O_2$  à 3%

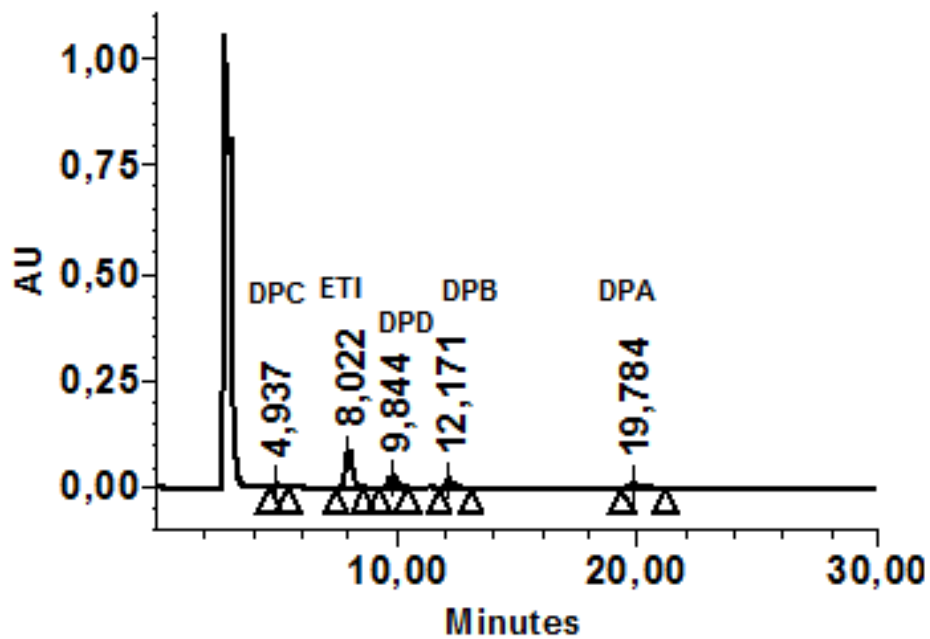


Figure (18) : Chromatogramme de l'ETI après l'attaque de  $H_2O_2$  à 30%

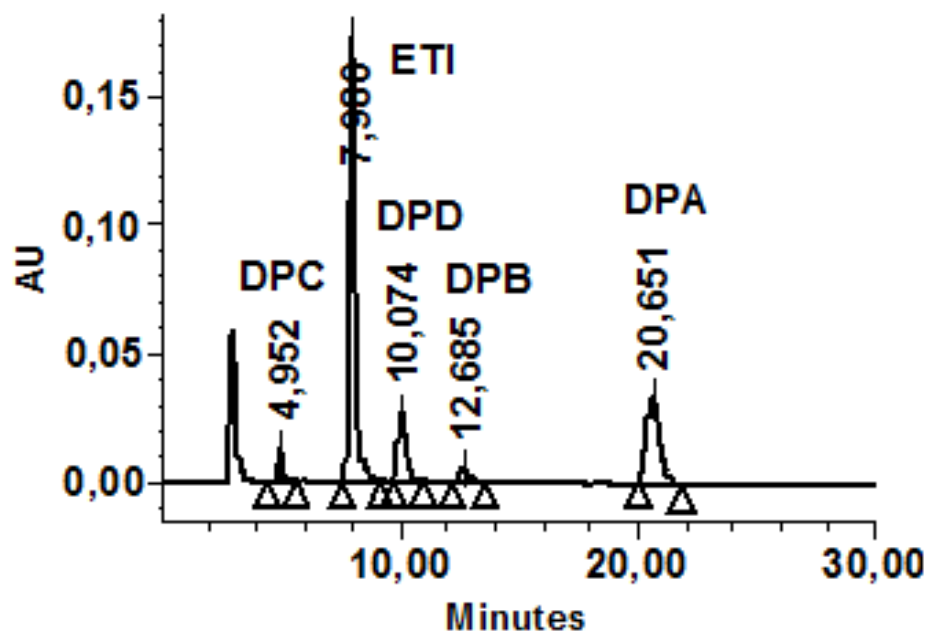


Figure (19) : Chromatogramme du produit fini après l'attaque par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 3%

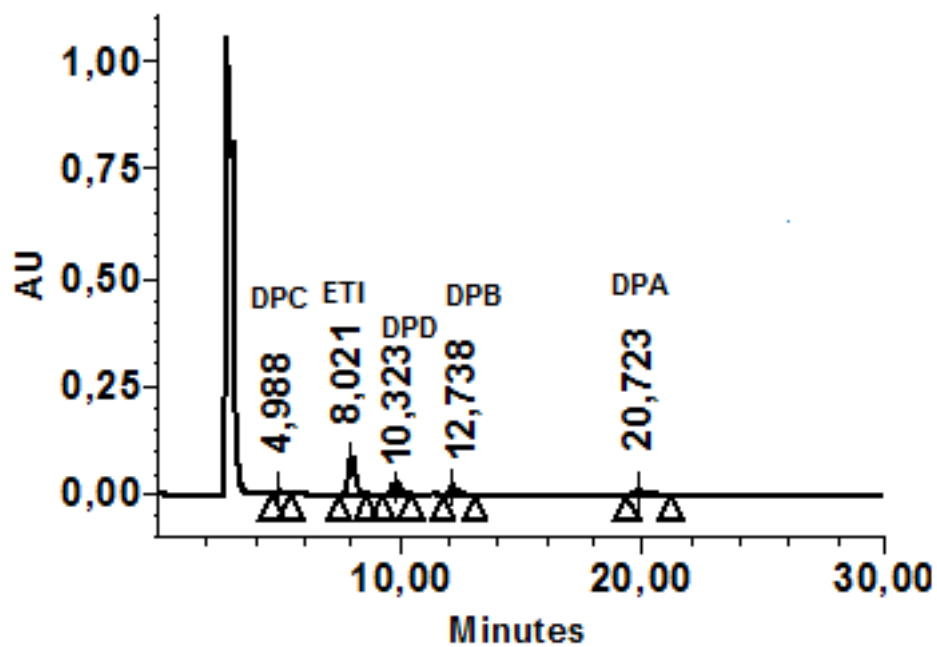


Figure (20) : Chromatogramme du produit fini après l'attaque par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30%

### III.2.3.2.4. Dégradation thermique

La température dégrade rapidement l'ETI. Deux heures de chauffage à 80°C suffisent pour obtenir 20% de dégradation avec la formation d'un seul DP ayant le même temps de rétention que DPA comme le montre les chromatogrammes représentés sur les figures (22 et 23) relatifs à l'élution de la matière première et du produit fini après chauffage à 80°C ; la figure (21) représente le chromatogramme de la solution du blanc.

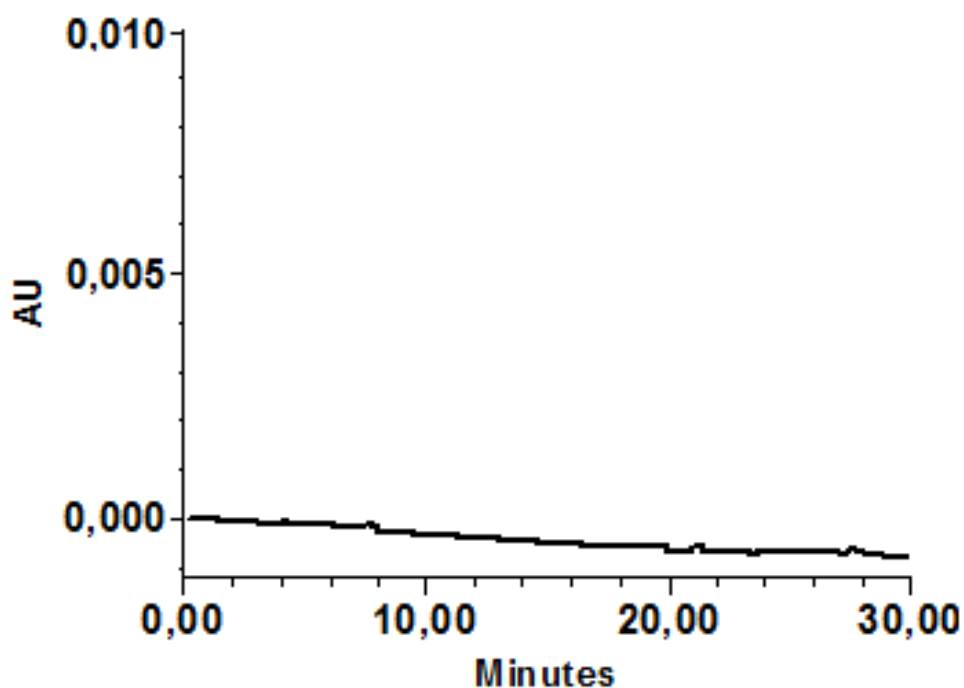


Figure (21) : Chromatogramme du blanc de la dégradation thermique

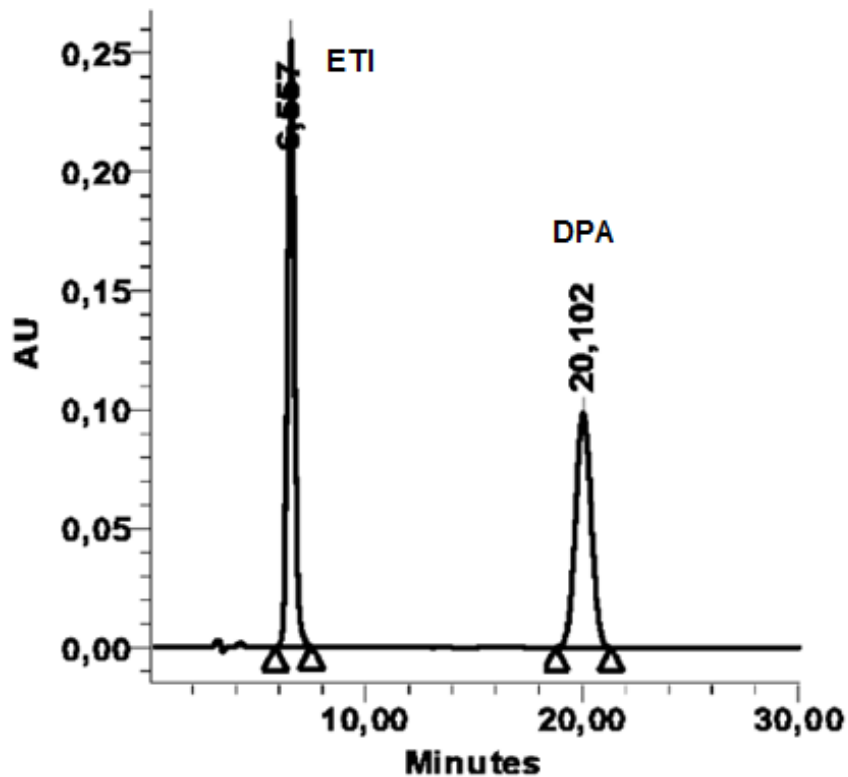


Figure (22) : Chromatogramme de l'ETI après la dégradation thermique

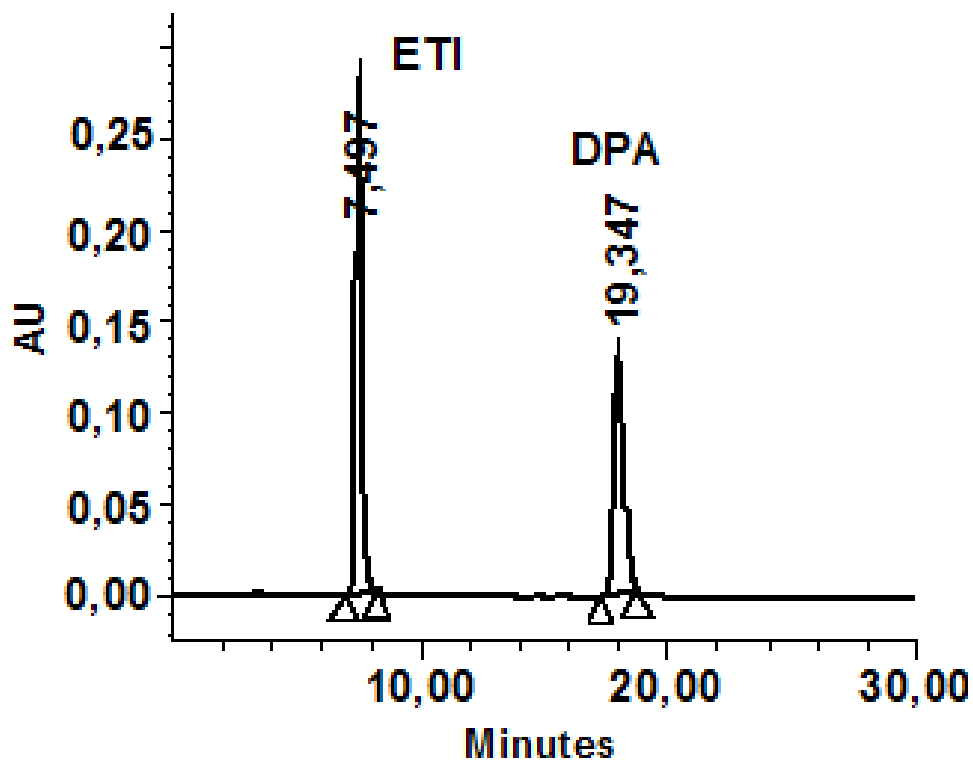


Figure (23) : Chromatogramme du produit fini après la dégradation thermique

### III.2.3.2.5. Photo-dégradation

Par rapport aux autres conditions de stress, le rayonnement UV sur l'ETI dégrade plus rapidement l'ETI que l'effet du milieu acide ou basique. 20% de la dégradation de l'ETI ont été obtenus après 24h, pour la matière première et le produit fini de l'ETI.

La dégradation photo-lytique engendre deux produits de dégradation qui ont le même temps de rétention que DPA et DPB.

La figure (24) présente le chromatogramme de la solution du blanc. Les chromatogrammes correspondants à la solution de la matière première et la solution du produit fini de l'ETI de cette dégradation sont représentés dans les figures (25 et 26) respectivement.

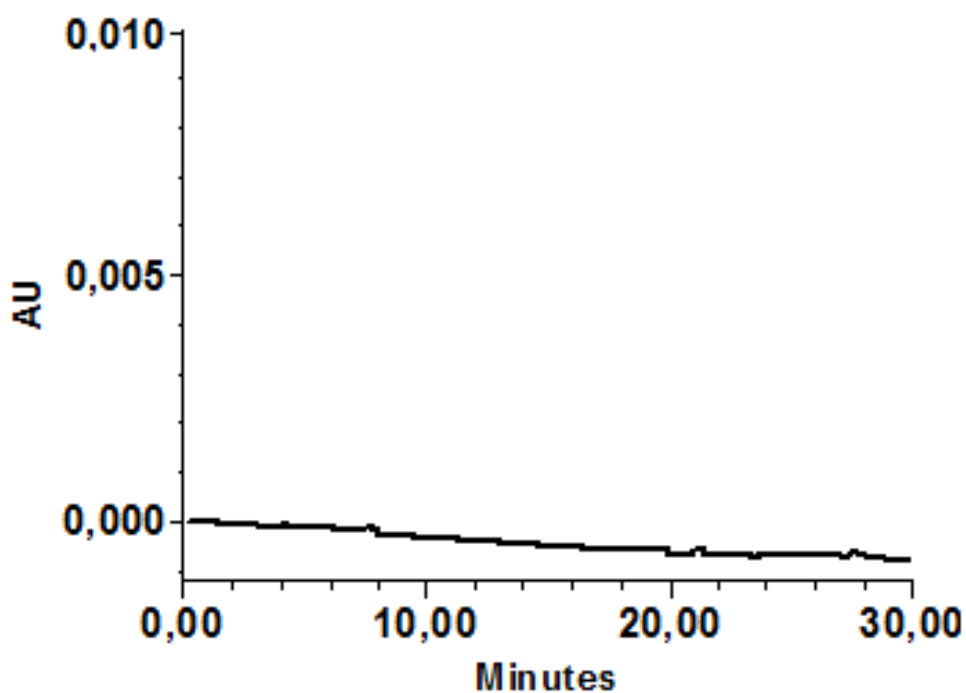


Figure (24) : Chromatogramme de la solution du blanc de la photo-dégradation

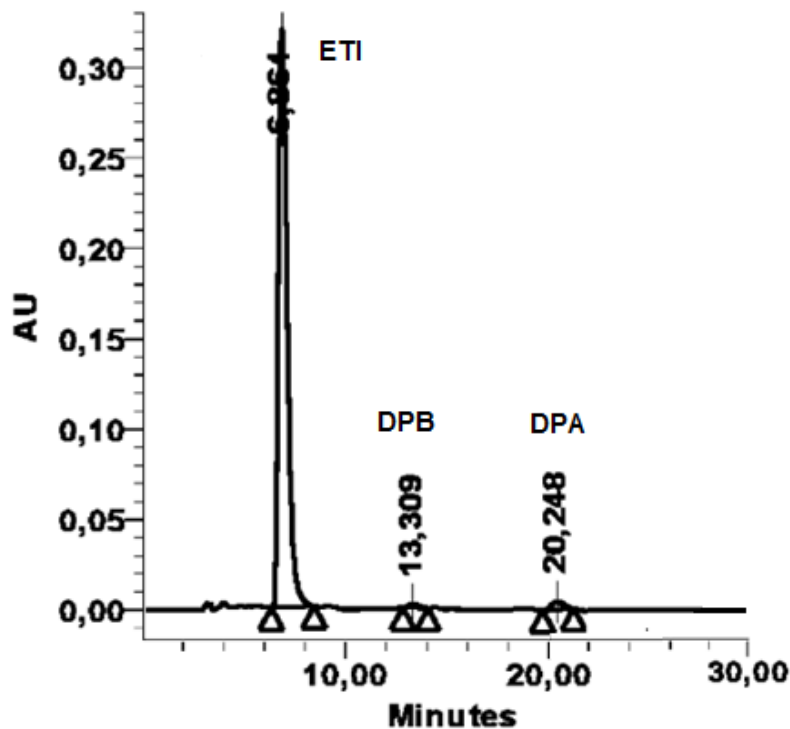


Figure (25) : Chromatogramme de l'ETI après la photo-dégradation

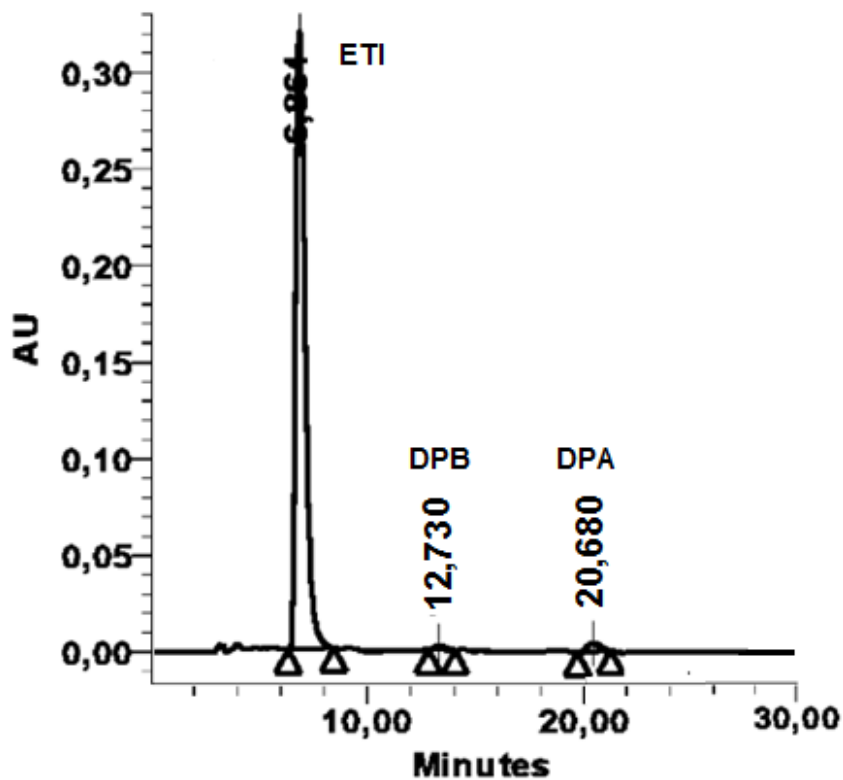


Figure (26) : Chromatogramme du produit fini après la photo-dégradation

### III.2.3.2.6. Spectres UV des DP

La figure (27) présente les spectres UV de DPA, DPB, DPC et DPD enregistrés avec le détecteur PDA. A titre d'exemple, le spectre de DPA, produit de dégradation apparaissant en principe avec toutes les stress devrait avoir le même spectre après chaque attaque et il en est ainsi. Cette démarche a été menée avec les autres impuretés. Les spectres UV de chaque impureté est le même quel que soit le stress. Comme chaque DP a le même temps de rétention et le même spectre UV avec toutes les contraintes, nous pouvons supposer que les structures des DP peuvent être les mêmes.

Cette supposition doit être confirmée par une analyse avec la HPLC couplée à la spectrométrie de masse et par la RMN du proton et du  $^{13}\text{C}$ .

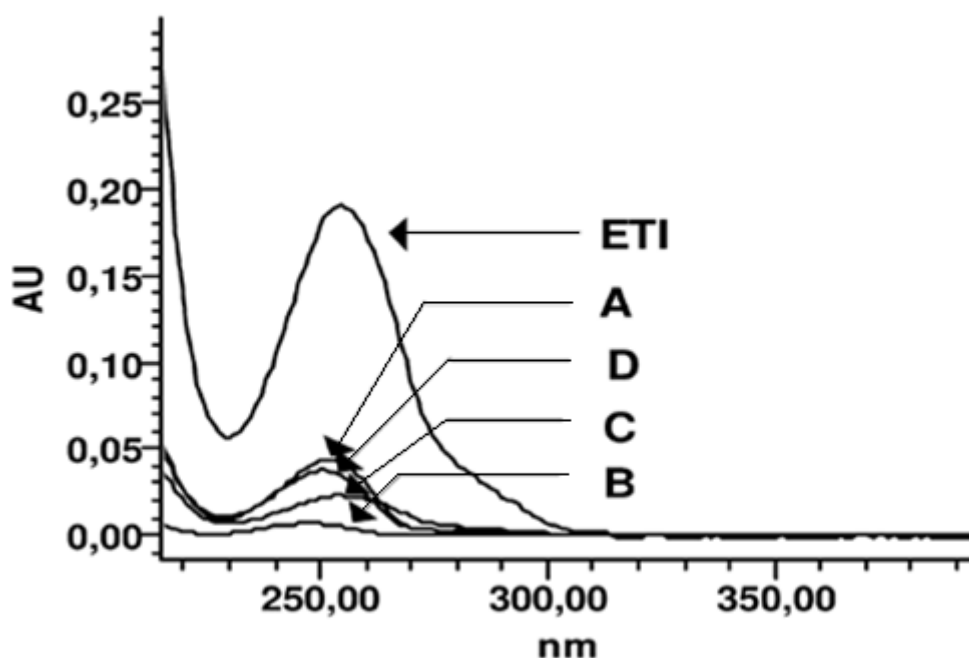


Figure (27) : Spectre UV de l'ETI et les DP A, B, C et D

La figure (27) suggère que la méthode de dosage de l'ETI par spectroscopie ultraviolette développée ne peut être utilisée pour identifier et quantifier l'ETI en présence de ses produits de dégradation. **La méthode UV n'est donc pas une méthode indicatrice de stabilité comparée à la méthode HPLC.**

### III.2.4. Résultats en LC-MS/TOF ; RMN-<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C

#### III.2.4.1. Résultats en LC-MS/TOF ; RMN-<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C de l'ETI

La structure moléculaire de l'ETI où les hydrogènes et les carbones sont identifiés respectivement par les nombres et les lettres est présentée dans la figure (28). Son spectre de masse (fig.28) révèle un ion moléculaire de 301. Cette masse correspond à la formule de l'ETI (C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>2</sub>O) sous sa forme protonée [M+H]<sup>+</sup> à m/z = 301,1121 Da. Sur le chromatogramme correspondant, le pic relatif à ce spectre de masse est élué à environ 7 min ; il s'agit évidemment à l'ETI (voir figure 6).

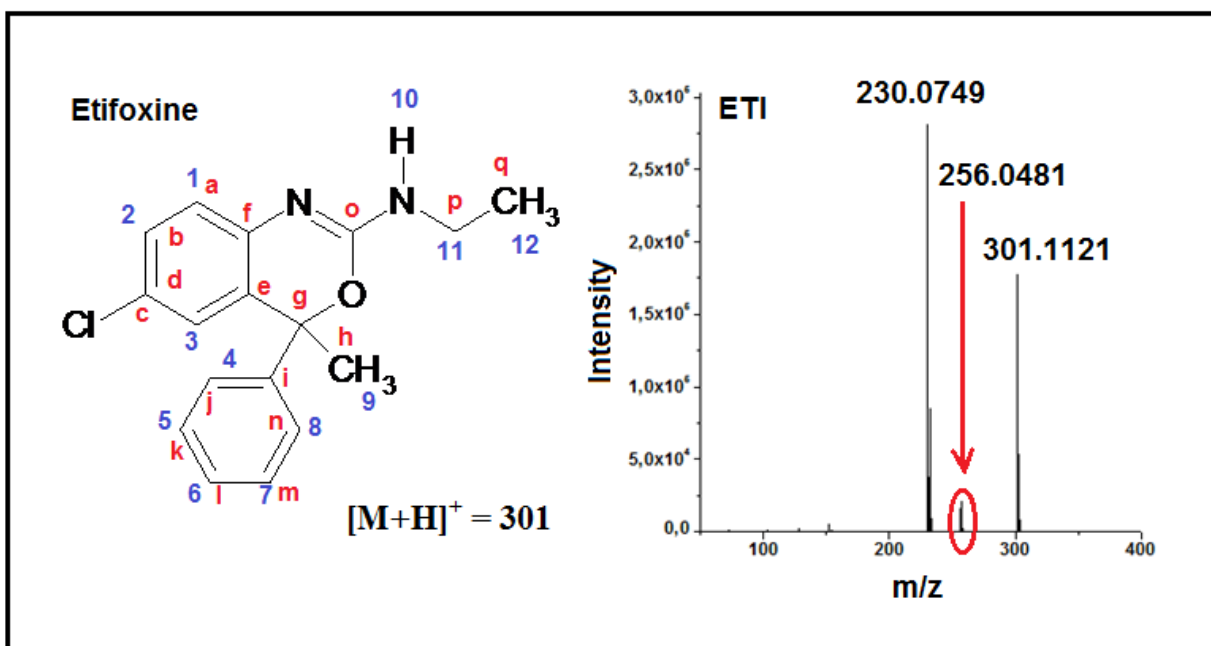


Figure (28) : Structure et spectre de masse de l'ETI

Dans le spectre de masse de l'ETI, deux ions apparaissent à m/z = 256,0481 et 230,0749 Da. Les formules les plus probables de ces ions sont respectivement: C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>NOCl<sup>+</sup> et C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>NCl<sup>+</sup>. Leurs structures chimiques proposées sont données dans la figure (29).

Les spectres RMN-<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C de l'ETI sont donnés dans la figure (30). Les valeurs des déplacements chimiques correspondants sont regroupées dans le tableau (13). Les attributions proposées pour les hydrogènes et les carbones correspondent à la structure de l'ETI avec son cycle oxazine. Un commentaire approprié sera donné lors de la comparaison de ces spectres avec ceux des produits de dégradation.

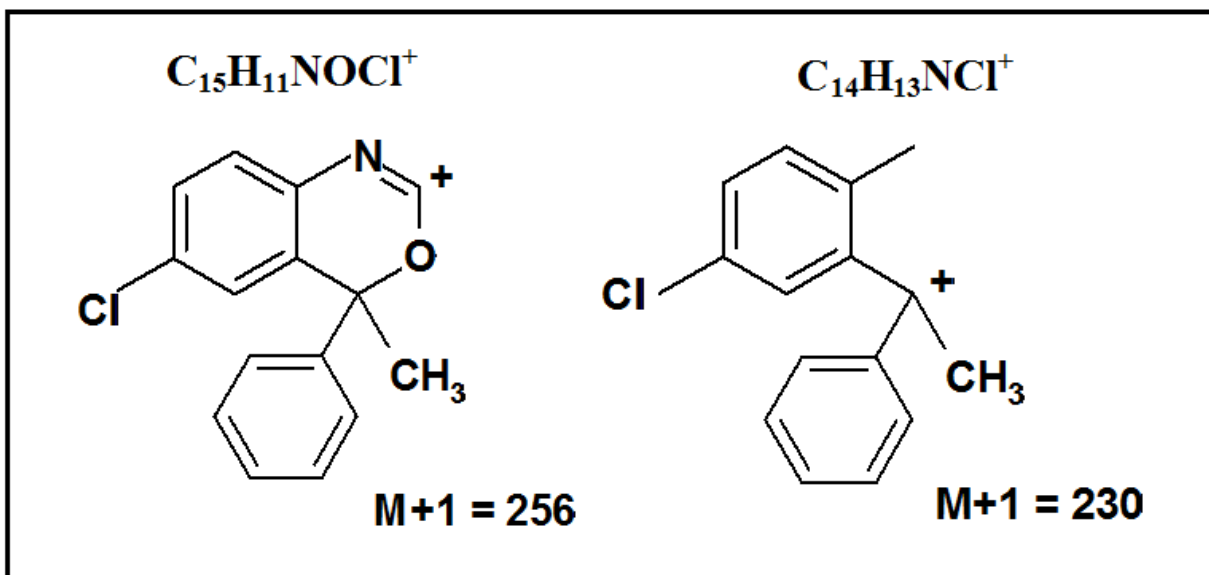


Figure (29) : Structures chimiques des deux ions qui appariassent dans le spectre de masse de l'ETI

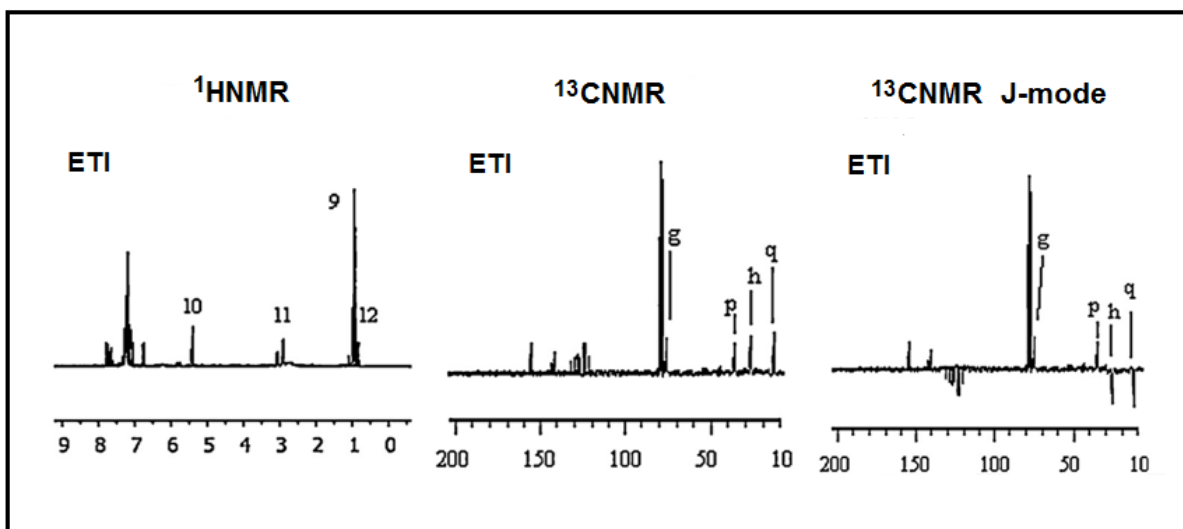
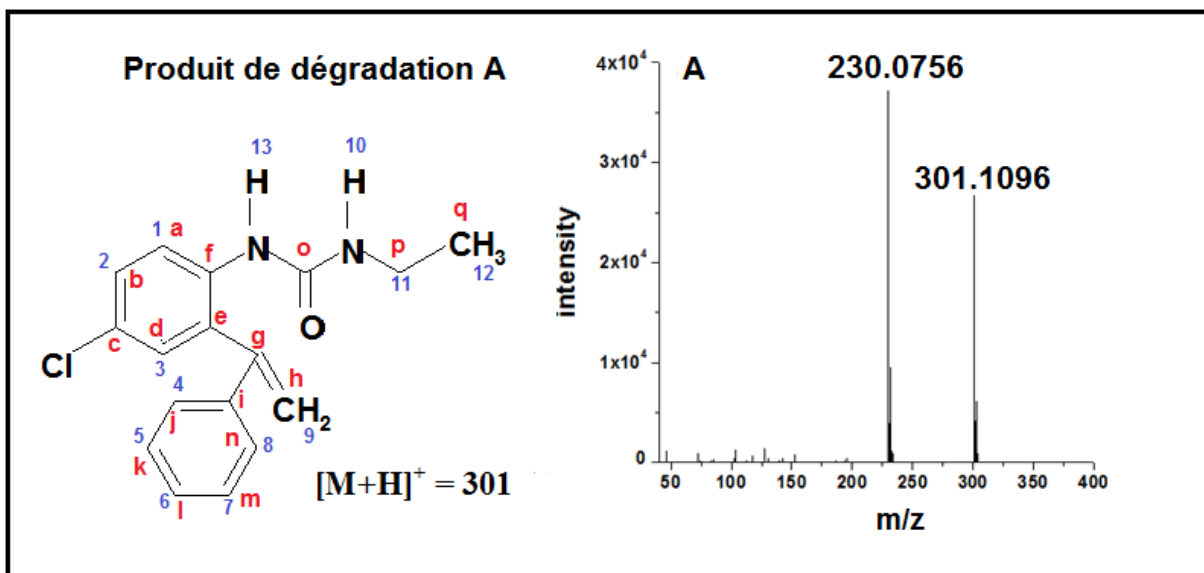


Figure (30) : Spectres RMN de l'ETI

### III.2.4.2. Résultats en LC-MS/TOF ; RMN-<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du produit de dégradation A (DPA)

Le spectre de masse de DPA (tr = 21 min) apparaissant avec tous les stress a un ion pseudo moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z = 301,1096$  Da (voir figure 31). Nous constatons que l'ETI et le DPA ont la même masse moléculaire. En comparant leurs spectres de masse, nous remarquons que le fragment apparaissant au 256,0481 Da n'apparaît pas dans le spectre de DPA. Cette constatation importante suggère que le cycle oxazine-2-amine présent dans l'ETI n'existe pas dans DPA. Ce cycle s'ouvre pour donner DPA avec la formation d'une fonction carbonyle et une liaison éthylénique. Le nom chimique proposé pour DPA est le 1- (5-chloro-2- (3-éthyluréido) phényl)-phényléthylène.



**Figure (31): Structure et spectre de masse de DPA**

L'autre fragment ( $m/z = 230$  Da) est commun à l'ETI et DPA, sa structure a déjà été donnée dans la figure (29).

Dans la figure (32) nous représentons les spectres RMN-<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C de DPA. Dans le tableau (13), nous donnons les déplacements chimiques correspondant aux protons de la figure (31).

Si la structure proposée de DPA est correcte, la différence fondamentale entre DPA et ETI est donnée par les protons numérotés 13 et 9. Le proton 13 n'existe pas dans l'ETI et le proton 9 est un H d'un groupement aliphatique dans l'ETI, éthylénique dans le DPA.

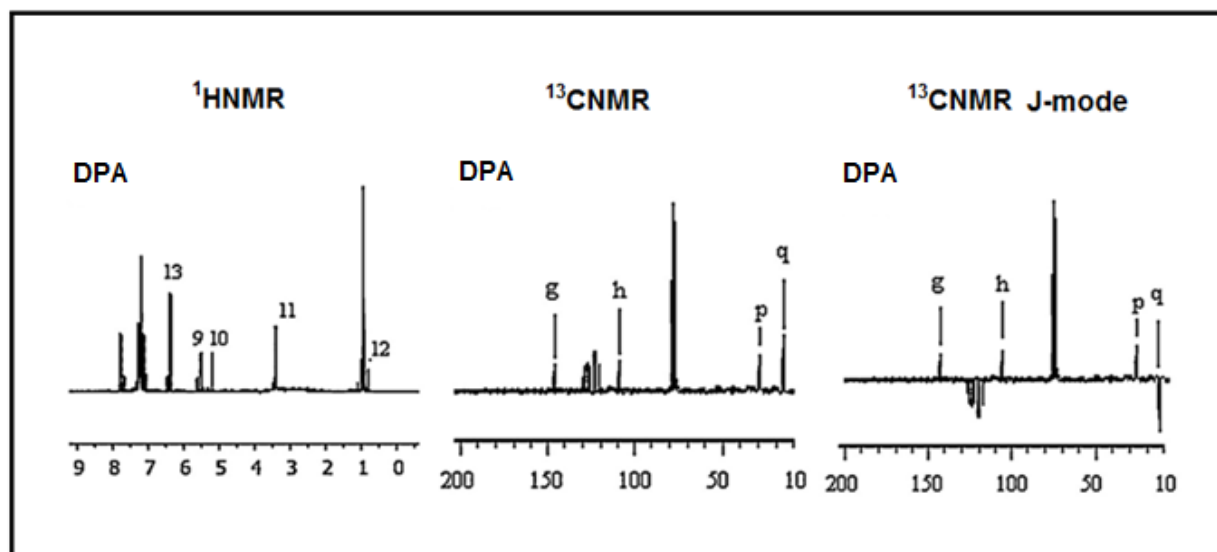


Figure (32) : spectres RMN de DPA

Ces constatations sont confirmées par les résultats de la RMN- $^{13}\text{C}$  de l'ETI et du DPA présentés dans les figures (30) et (32). Les résultats chiffrés sont dans le tableau (13). Leurs spectres RMN- $^{13}\text{C}$  diffèrent principalement par les carbones notés g et h (voir figures 28 et 31 pour les correspondances des lettres affectées aux carbones). Dans l'ETI, g se trouve dans le cycle oxazine de la molécule, h est un atome de carbone primaire. Leurs déplacements chimiques correspondants sont respectivement 77,02 et 27,05 ppm. Dans DPA, les déplacements chimiques de g et h se retrouvent à 145,22 et 110,76 ppm; valeurs caractéristiques des carbones éthyléniques.

De plus, les spectres *DEPT* (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) de l'ETI et du DPA notés J-mode révèle que le carbone h est dirigé vers le haut pour DPA (carbone lié à 2 hydrogènes : groupement  $\text{CH}_2$ ) et vers le bas pour l'ETI (carbone lié 3 hydrogènes : groupement  $\text{CH}_3$ ). Ces résultats confirment la structure proposée pour DPA.

### III.2.4.3. Résultats en LC-MS/TOF ; RMN-<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du produit de dégradation B (DPB)

Le produit de dégradation B apparaît à environ 13 min avec tous les stress à l'exception de la dégradation thermique. Le spectre de masse et la proposition de la structure chimique correspondants sont représentés dans la figure (33), son ion pseudo moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z = 273,0616$  Da; sa formule est  $C_{15}H_{13}ClN_2O$ , avec le nom chimique suivant 6-chloro-4-méthyl-4-phényl-4-3,1-benzoxazine-2-amine.

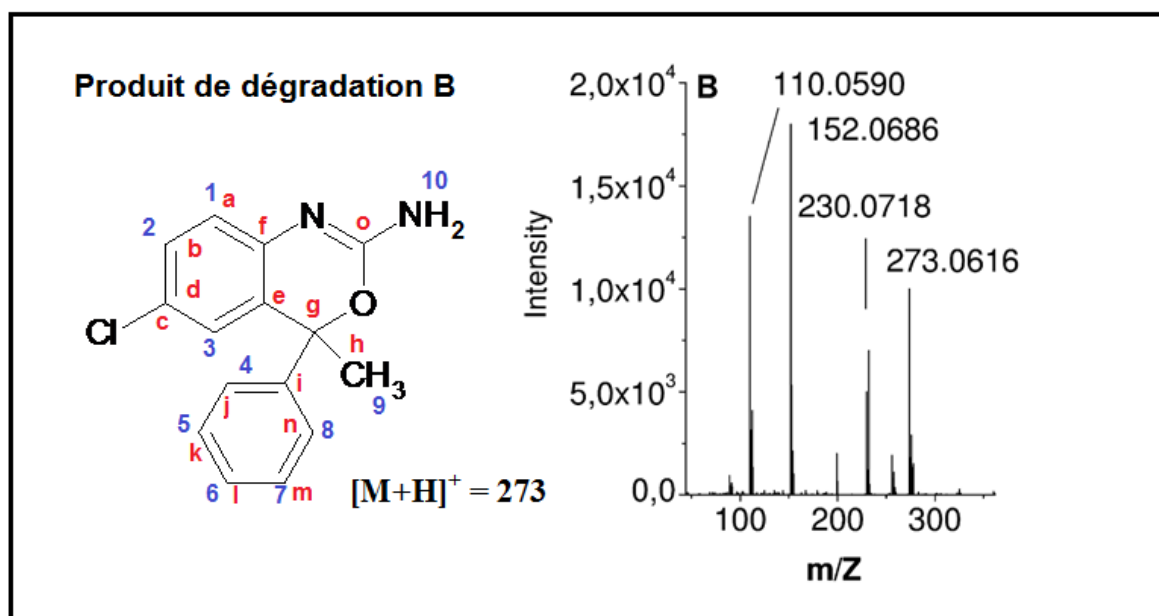


Figure (33): Structure et spectre de masse de DPB

La figure (34) représente le spectre de RMN-<sup>1</sup>H et le tableau (13) les déplacements chimiques des protons correspondants (voir figure 33 pour les nombres affectés aux protons). Tous les déplacements chimiques indiquent la formule structurale proposée du DPB dont les signaux résonnant à 1,16 et 4,96 ppm sont attribués aux protons 9 (dans le groupement alkyle) et 10 (dans le groupement amine) respectivement.

Dans le spectre RMN-<sup>13</sup>C de DPB les carbones caractéristiques sont de nouveau g et h avec des déplacements chimiques similaires trouvés dans l'ETI pour ces mêmes carbones (voir figure 33 pour les lettres correspondant aux carbones) Dans le produit de dégradation B, nous remarquons l'absence des deux carbones p et q, ainsi le cycle oxazine n'est pas ouvert comme dans l'ETI. De plus, le spectre DEPT de DPB montre que le carbone h est dirigé vers le bas (groupe CH<sub>3</sub>). Compte tenu de tous ces résultats, la structure proposée pour DPB est correcte.

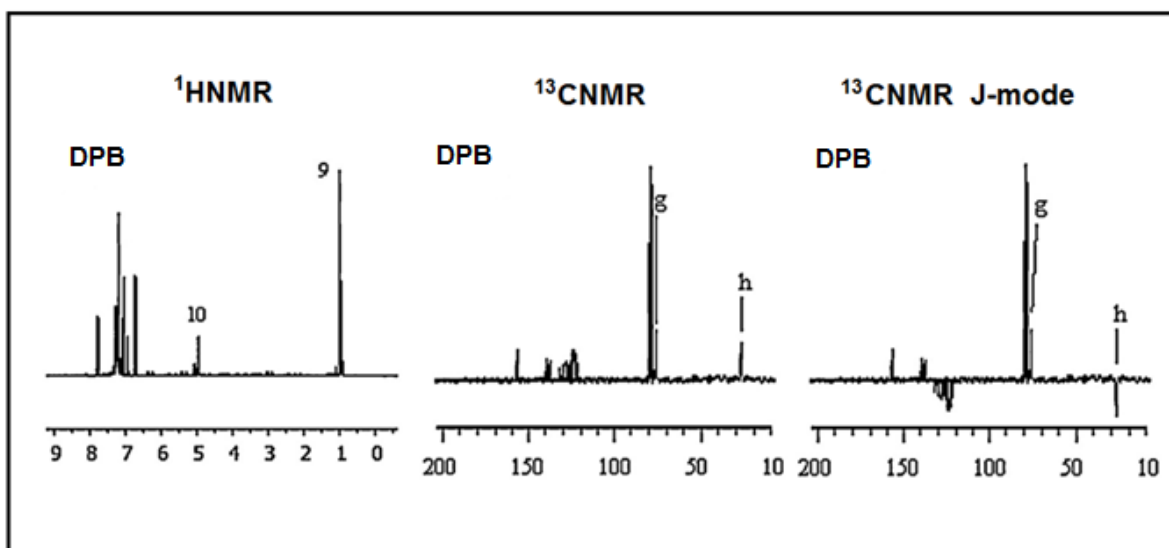


Figure (34) : Spectres RMN de DPB

#### III.2.4.4. Résultats en LC-MS/TOF ; RMN-<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du produit de dégradation C (DPC)

Les dégradations basique et oxydative révèlent le produit de dégradation C avec un temps de rétention de 5 min. La figure (35) montre son spectre de masse. L'ion pseudo moléculaire de C,  $[M+H]^+ = 230,0716$  Da, avec la formule moléculaire C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>ClN nous permettent de proposer la structure de la figure (35) avec le nom chimique :4-chloro-2-(1-phényléthényl) aniline.

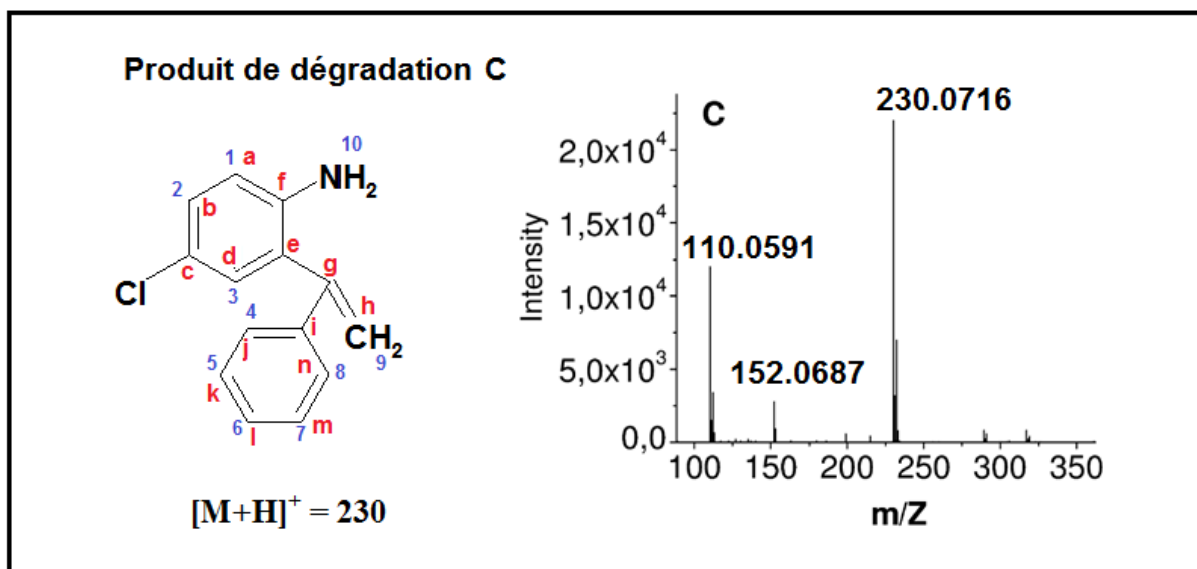


Figure (35): Structure et spectre de masse de DPC

Le spectre RMN-<sup>1</sup>H de DPC représenté sur la figure (36) montre deux protons caractéristiques de numérotation 9 et 10 avec des déplacements chimiques respectifs de 5,25 et 3,44 ppm. La première valeur (5,25 ppm) est spécifique des protons présents dans le groupe CH<sub>2</sub> du carbone h; la seconde (3,44 ppm) caractérise un groupement amine primaire. Ces résultats confirment la formule proposée de DPC et les déplacements chimiques des autres protons sont conformes à cette structure chimique.

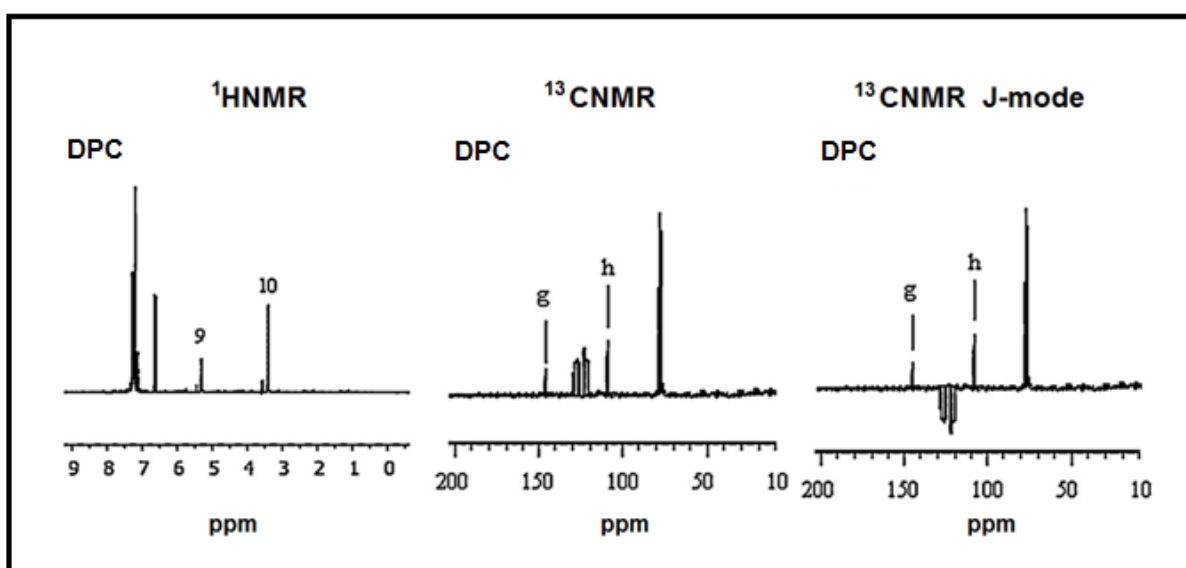


Figure (36) : Spectres RMN de DPC

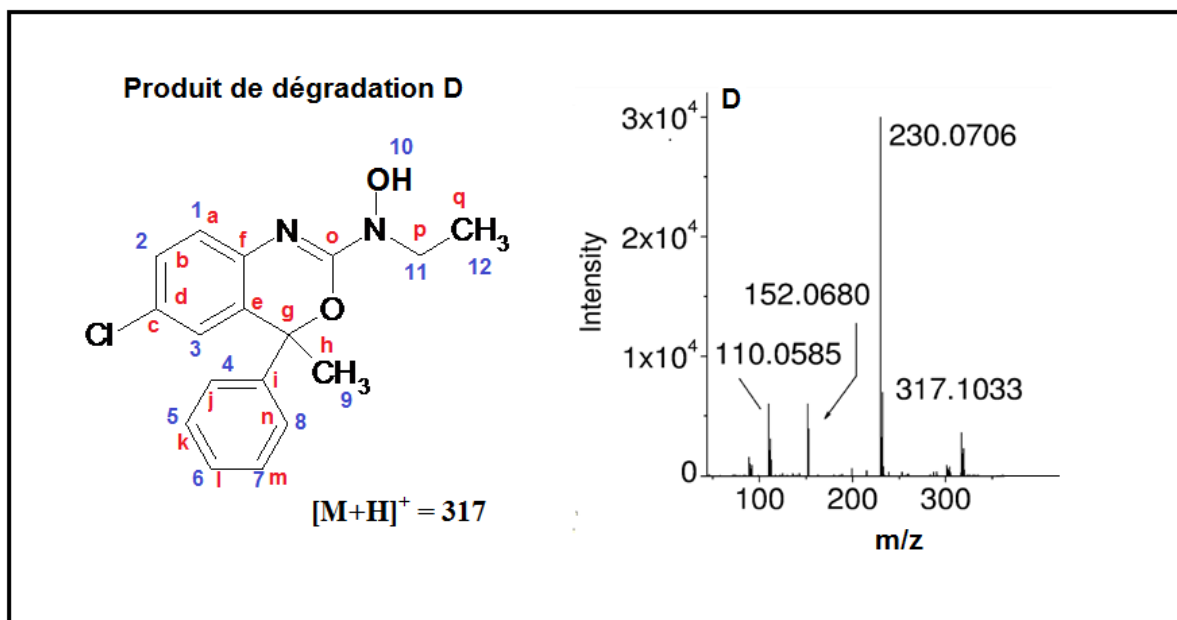
Le spectre RMN-<sup>13</sup>C de DPC (voir figure 36), nous permet de constater que les déplacements chimiques des carbones g et h sont proches de ceux trouvés pour DPA, ils sont caractéristiques des atomes de carbones éthyléniques obtenus après l'ouverture du cycle de l'oxazine. Dans ce cas, le spectre *DEPT* montre que le carbone h de DPC est dirigée vers le haut (groupe CH<sub>2</sub>).

Compte tenu de la structure proposée, DPC provient probablement aussi de la dégradation de DPA.

#### **III.2.4.5. Résultats en LC-MS/TOF ; RMN-<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du produit de dégradation D (DPD)**

Le DPD résulte de l'action oxydative seulement. Le [M+H]<sup>+</sup> à m/z =317,1033 Da (figure 37) correspond à [M+H]<sup>+</sup> de l'ETI (301) + (masse d'un atome d'oxygène 16). Ainsi, la structure proposée de DPD correspond à la fixation d'un atome d'oxygène par l'ETI sur l'azote pendant l'action de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Son nom moléculaire proposé est 6-chloro-N-éthyl-N-hydroxy-4-méthyl-4-phényl-4H-3,1-benzoxazine-2-amine; sa structure est représentée dans la figure (37).

Dans la structure proposée de DPD, nous remarquons que le groupe NH de l'ETI est converti en groupe NOH. Cette transformation du groupe amine en un groupe hydroxylamine a été décrite pour d'autres composés dans la littérature. [70–74]

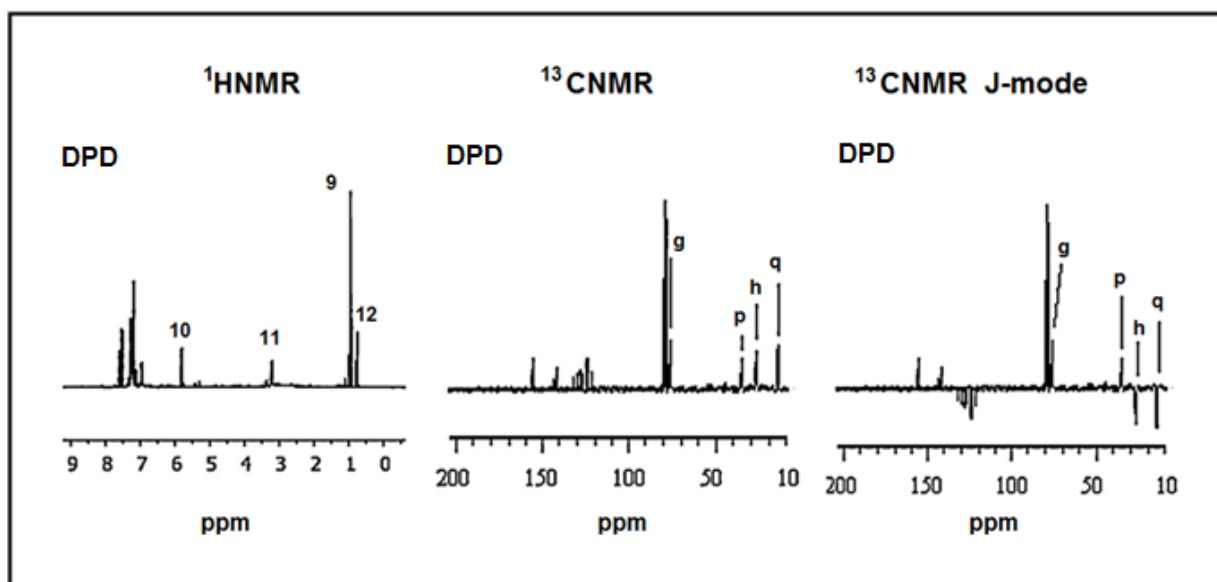


**Figure (37): Structure et spectre de masse de DPD**

Dans le spectre RMN-<sup>1</sup>H de DPD (figure 38 et tableau 13), les déplacements chimiques trouvés permettent de confirmer la structure de DPD proposée notamment le proton 10 (5,74 ppm) fixé sur le substituant NOH.

Pour le produit de dégradation D, nous notons que le proton 10 présente un comportement de blindage par rapport à l'ETI (respectivement 5,74 et 5,32 ppm). Dans les composés de 1,3-oxazine-2-amine, l'atome d'hydrogène porté par le groupe amino est non acide en raison de la stabilité de la base conjuguée renforcée par la délocalisation de la charge négative. Le pKa des acides et des dérivés d'hydroxylamine sont similaires, ce qui induit des déplacements chimiques voisins dans le spectre RMN pour ces deux différents hydrogènes.

La comparaison des spectres RMN-<sup>13</sup>C de DPD et ETI (voir figure 38 et 30) ne montre pas de différences remarquables même pour les carbones o et p qui entourent le NOH. Le spectre *DEPT* de DPD montre que le carbone h est dirigé vers le bas (groupe CH<sub>3</sub>).



**Figure (38): Spectres RMN de DPD**

Le tableau (14) reprend toutes les données et donne la structure des principaux fragments trouvés dans les spectres de l'ETI et DPA, DPB, DPC et DPD; les erreurs relatives entre la masse trouvée et calculée de l'ETI, les DPs et les fragments.

Les produits de dégradation de l'ETI obtenus sous différentes actions de stress sont séparés par HPLC, identifiés par LC-MS /TOF, et la spectroscopie RMN- $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ . Compte tenu de toutes ces données, la voie de dégradation de l'ETI est proposée dans la figure (44) avec les structures des quatre DPs trouvés et les fragments principaux figurant dans leurs spectres de masse.

Résultats de RMN- <sup>1</sup> H										
N° du H		1	2	3	4	5	6	7		
δ (ppm)	ETI	6.78	7.31	7.76	7.09	7.09	7.09	7.09		
	PDA	7.33	7.33	7.71	7.17	7.17	7.17	7.17		
	PDB	6.64	7.28	7.30	7.14	7.14	7.14	7.14		
	PDC	6.92	7.31	7.36	7.15	7.15	7.15	7.15		
	PDD	6.92	7.40	7.54	7.22	7.22	7.22	7.22		
N° du H		8	9	9'	10	11	12	13		
δ (ppm)	ETI	7.09	1.01		5.32	2.94	0.93			
	PDA	7.17	5.45	5.29	5.19	3.42	0.81	6.43		
	PDB	7.14	1.16		4.96					
	PDC	7.15	5.25	5.25	3.44					
	PDD	7.22	1.19		5.74	3.20	0.78			
Résultats de RMN- <sup>13</sup> C										
Lettre du C		a	b	c	d	e	f	g	h	i
δ (ppm)	ETI	123.65	126.42	127.16	128.98	122.84	143.50	77.02	27.05	140.50
	PDA	123.34	126.11	123.22	128.66	127.91	142.77	145.22	110.76	142.01
	PDB	121.99	126.97	123.79	129.11	128.34	143.11	77.48	27.11	142.31
	PDC	122.37	127.08	122.92	128.6	128.41	143.75	144.98	111.39	141.49
	PDD	123.37	127.94	124.02	128.77	128.11	143.47	78.03	27.39	141.33
Lettres de C		j	k	l	m	n	o	p	q	
δ (ppm)	ETI	128.98	126.49	126.66	126.49	128.71	156.69	36.94	14.76	
	PDA	129.12	126.33	127.03	126.33	128.44	150.76	30.04	14.12	
	PDB	129.06	126.22	126.83	126.22	129.06	157.01			
	PDC	129.14	126.39	126.93	126.39	128.98				
	PDD	128.81	126.11	126.88	126.59	128.44	156.96	37.01	13.89	

**Tableau (13) : Déplacements chimiques de <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C de l'ETI, DPA, DPB, DPC et DPD (voir les structures pour les chiffres et lettres correspondants aux protons et carbone)**

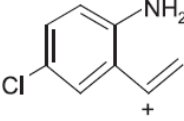
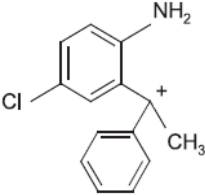
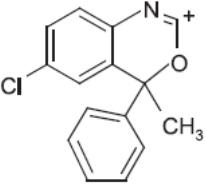
Nom	Masse observée [M + 1]	Formule proposée	Masse calculée [M + 1]	Structure proposée	Erreur Relative *100
Etifoxine	301.1121	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>2</sub> O	301.1108	Voir figure 8	4.3175E-4
A	301.1096	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>2</sub> O	301.1108	Voir figure 11	-3.9852E-4
B	273.0616	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>2</sub> O	273.0716	Voir figure 13	-0.0037
C	230.0716	C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> ClN	230.0736	Voir figure 15	-8.6929E-4
D	317.1033	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	317.1057	Voir figure 17	-7.5685E-4
Fragment	Masse observée m/z	Formule proposée	Masse calculée m/z	Structure proposée	Erreur Relative *100
152	152.0687	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> ClN <sup>+</sup>	152.0267		0.0276
230	230.0749	C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> ClN <sup>+</sup>	230.0736		5.6503E-4
256	256.0481	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> NOCl <sup>+</sup>	256.0607		-0.0049

Tableau (14) : Données MS de l'ETI, des produits de dégradations A, B, C, D, des fragments, des ions majeurs et leurs structures proposées

### III.2.5. Principales voies de dégradation de l'ETI

Comme nous l'avons indiqué dans la partie (III.2.4.2) le cycle oxazine s'ouvre dans le cas de formation de l'impureté A. Ce DPA résulte de toutes les dégradations de stress et intensément par la dégradation thermique ( $M = 300$  ;  $t_r = 21$  min environ). Le schéma de l'ouverture de cycle se fait au niveau de l'oxygène avec formation d'une liaison éthylénique et d'un groupement uréique (voire figure 39).

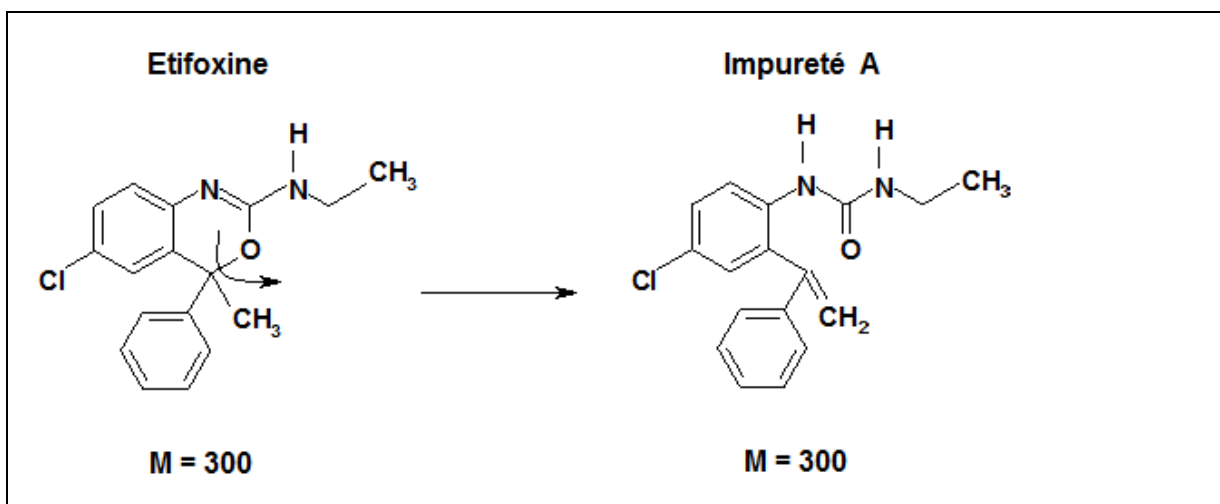


Figure (39) : Schéma de formation de DPA

Sous l'effet des stress acide, basique et oxydatif le cycle oxazine n'est pas ouvert. L'ETI subit une perte de  $\text{C}_2\text{H}_4$  pour donner DPB ( $M = 272$  ;  $t_r = 13$  min environ) selon le schéma représenté dans la figure (40).

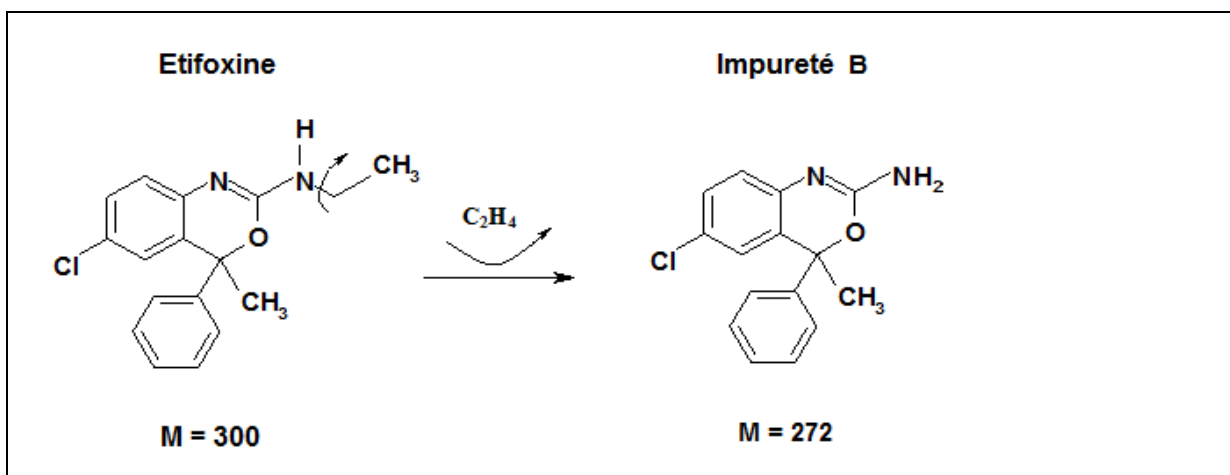


Figure (40) : Schéma de formation de DPB

D'un autre coté, le stress oxydatif et basique de l'ETI conduit à l'impureté C (M= 229 ; tr= 4 min environ), elle correspond à une perte de masse après une ouverture de cycle oxazine. Cette même impureté provient en partie de la dégradation de DPA par la perte de  $C_3H_5NO$ . Le schéma représenté dans la figure (41) montre la formation de l'impureté C :

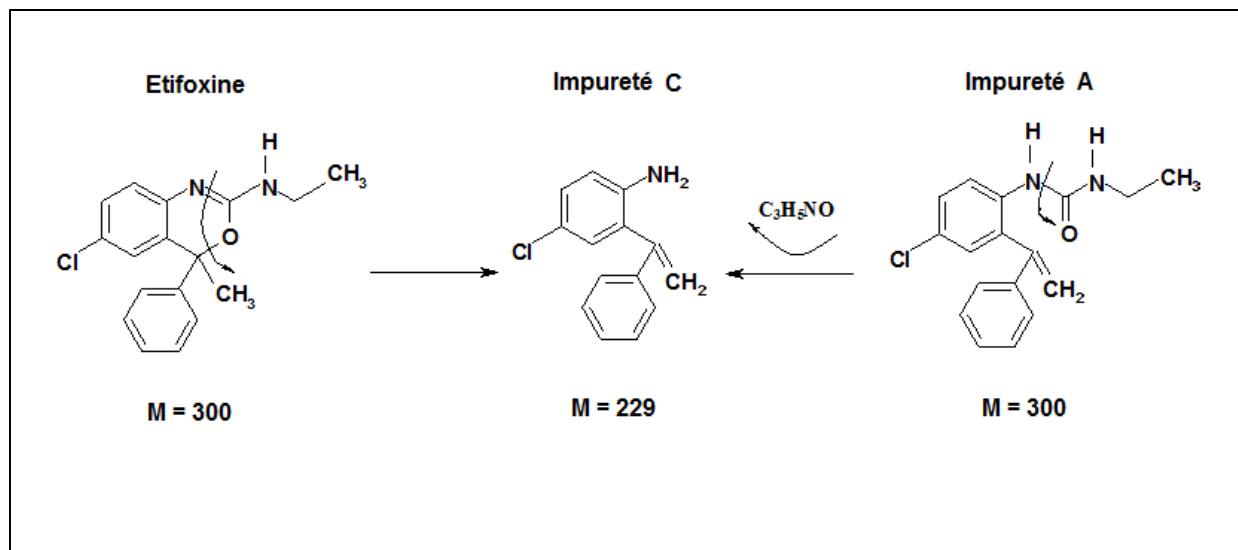


Figure (41) : Schéma de formation de DPC

Seule l'oxydation permet d'avoir DPD par la fixation de l'oxygène sur la fonction amine de l'ETI en donnant une fonction hydroxylamine selon l'explication donnée dans la partie (III.2.4.5) (fig.42).

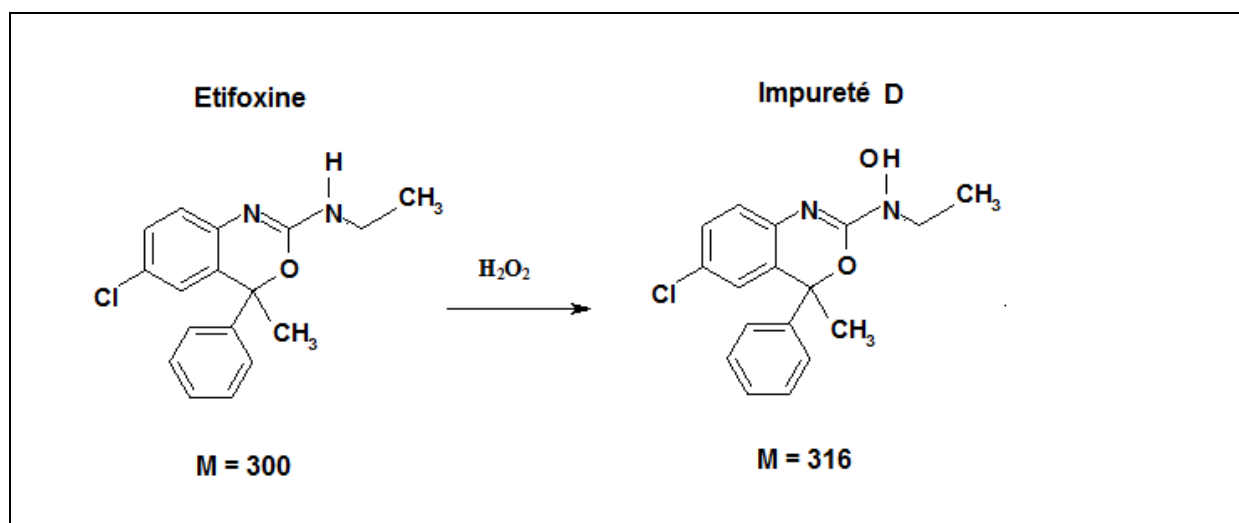


Figure (42) : Schéma de formation de DPD

Finalement, en considérant toutes ces voies de dégradation, il est possible de regrouper tous ces résultats dans une seule figure où toutes les impuretés apparaissent (voir figure 43).

D'un autre côté, il est important de préciser les voies de fragmentation de l'ETI et des différents DPs lors de la spectrométrie de masse (MS/TOF), la figure (44) résume les résultats de toutes les fragmentations liées à l'ETI et les DPs.

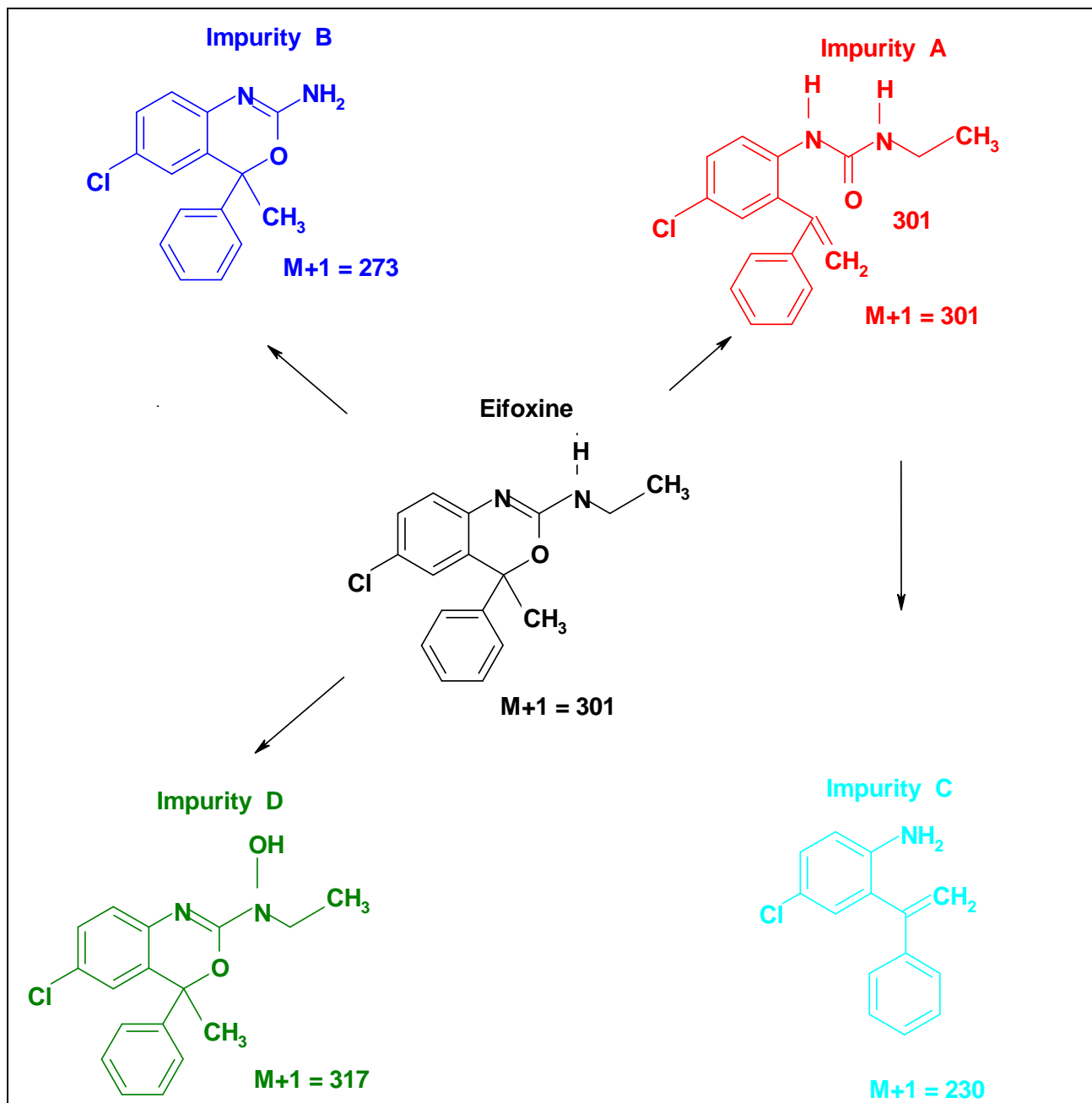
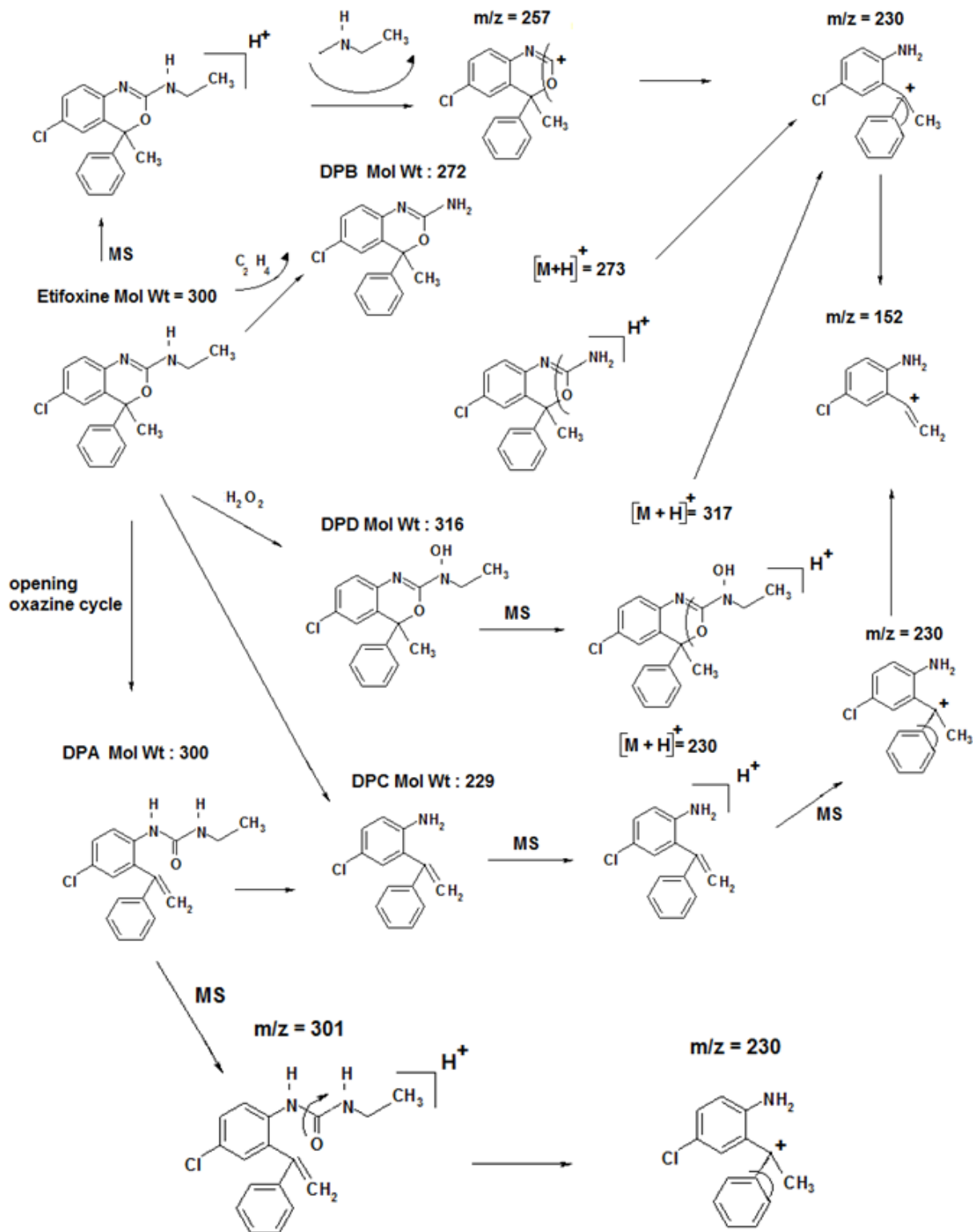


Figure (43): Principales voies de dégradation de l'ETI



Figure(44): Voies de fragmentation de l'ETI incluant les structures des 4 DPs et fragments principaux

### III.2.6. Validation de la méthode

La méthode LC a été validée conformément à l'ICH [75]. Le tableau (15) résume les résultats de la validation.

#### III.2.6.1. Spécificité

La spécificité de la méthode est déterminée en soumettant l'ETI au stress sous différentes conditions (acide, basique, oxydative, thermique et photolytique). En outre, la spécificité de la méthode est établie par la vérification de la non interférence de l'ETI avec les composants du placebo. En utilisant les conditions chromatographiques sélectionnées, tous les DPs issus des stress sont séparés de l'ETI (voir figure 4) aucune interférence n'est observée en présence des excipients. La figure (45) montre les chromatogrammes représentatifs des échantillons obtenus à partir du placebo (45 a) et la forme pharmaceutique (45 b).

La méthode d'analyse est donc spécifique.

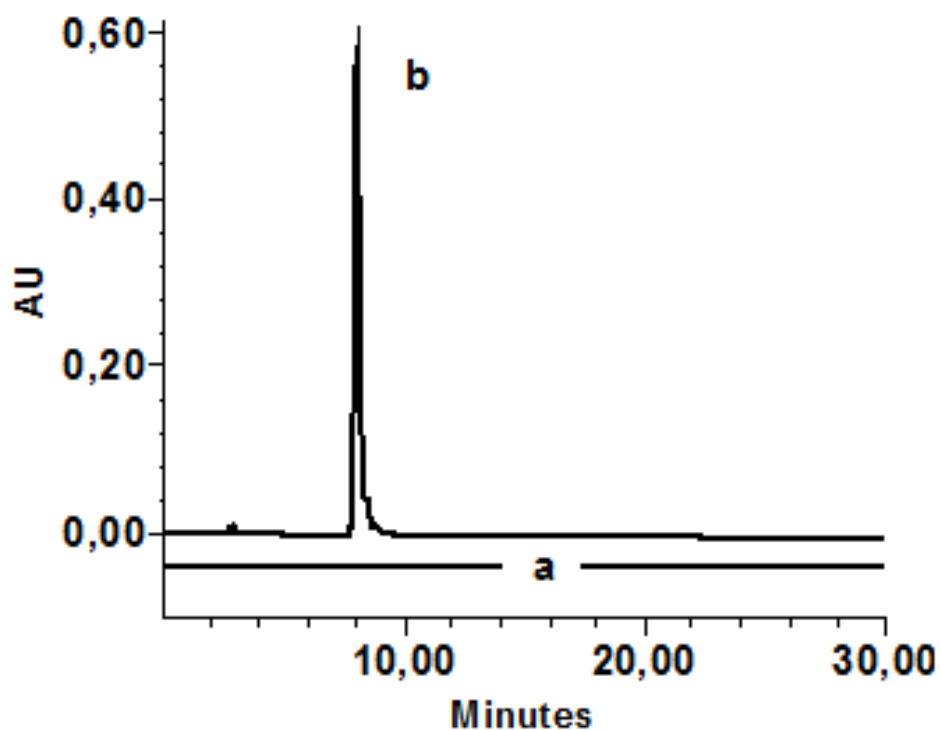


Figure (45): Chromatogramme du placebo (a) ; de la forme pharmaceutique (b)

### III.2.6.2. Linéarité

La linéarité a été réalisée sur l'injection d'une gamme de concentrations comprises entre 10 et 30  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  d'Etifoxine. Dans cet intervalle la réponse pour l'ETI est linéaire. L'équation de la droite donnée dans le tableau (15) montre un coefficient de corrélation ( $r^2 = 0.996$ ), le carré de la somme des résidus obtenus est de 0.0088 ; Les résidus sont distribués autour de la droite de régression sans tendance unidirectionnelle, ceci prouve que l'ordonné à l'origine trouvée n'est pas significativement différente de zéro.

Le test de Student appliqué aux résultats donne une valeur de 1.836 ; il est différent de la valeur théorique, ( $t(0.05 ; 13) = 2.1604$ ). Pour l'intervalle spécifié dans la partie expérimentale (chapitre II, 3.3), les données apparaissant dans le tableau (15), illustrent une bonne linéarité pour les quatre impuretés. Comme indiqué précédemment, toutes les données de la validation figurent dans le tableau (14).

### III.2.6.3. Linéarité en présence d'excipients

L'étude consiste à s'assurer que les conditions analytiques choisies permettent bien de séparer l'étifoxine des excipients. La courbe d'étalonnage obtenue pour l'ETI (%) en présence des excipients est linéaire (ordonné à l'origine =  $163546 \pm 97381$ , pente =  $287740 \pm 6648$ , le coefficient de corrélation = 0,994), dans la gamme spécifiée dans la partie expérimentale. Dans ce cas, l'ordonné à l'origine observée est également pas significativement différent de zéro (résultat trouvé  $t = 1,679$ ).

Les résultats des deux courbes de linéarité permettent une récupération moyenne de l'ETI ( $99,20 \pm 1,70\%$ ) sur la gamme linéaire étudiée. Ce résultat confirme une spécificité quantitative de la méthode.

### III.2.6.4. Limite de détection (LOD), limite de quantification(LOQ)

La limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) de l'ETI et de ses quatre impuretés ont été déterminées par le calcul du rapport signal sur bruit égal à 3 et 10 respectivement. Les valeurs observées de LOD et LOQ pour l'ETI sont 0.03 et 0.09  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  respectivement. Les autres valeurs sont données dans le tableau (15).

### III.2.6.5. Fidélité

Le traitement statistique des résultats relatifs aux échantillons injectés 3 fois permet de déterminer la répétabilité de la méthode sélectionnée. L'écart type relatif (RSD) intra-jour trouvé de l'ETI 0.78 % montre que l'équipement utilisé pour l'étude fonctionne correctement pour la méthode analytique développée. L'écart type relatif (RSD) de la fidélité intermédiaire (inter-jour) trouvé est de 0,24%. Les résultats de la fidélité en termes de répétabilité et de fidélité intermédiaire aussi représentés dans le tableau (15), montrent que la méthode indicatrice de stabilité mise en point est fidèle.

	Paramètres	ETI	A	B	C	D
<b>Linéarité</b>	<b>Pente</b>	289.902	227.702	266.249	218.762	280.981
	<b>Ordonné à l'origine</b>	166.247	153.015	160.987	158.113	164.543
	<b>Coefficient de corrélation</b>	0.996	0.991	0.990	0.992	0.990
<b>Fidélité</b>	<b>(RSD) intra-jour</b>	0.78	1.22	1.88	2.25	1.77
	<b>(RSD) inter-jour</b>	0.24	2.44	2.88	2.76	3.89
<b>Exactitude</b>	<b>Exactitude (%)</b>	99.6	98.4	97.2	95.9	97.1
<b>Limite de détection et de quantification</b>	<b>LOD <math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math></b>	0.03	0.02	0.03	0.02	0.02
	<b>LOQ <math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math></b>	0.09	0.07	0.08	0.07	0.07

Tableau (15) : Paramètres de validation de la méthode proposée pour l'ETI et ses DPs A, B, C et D

### III.2.6.6. Exactitude

L'exactitude de la méthode a été évaluée par la détermination du pourcentage de récupération pour trois concentrations (correspondant à 50, 100 et 150% de la concentration de la solution essai) couvrant la gamme de la méthode. Pour chaque concentration trois séries ont été préparées et injectées où la référence de la quantité théorique de l'ETI dans la gélule est  $99,6 \pm 0,54\%$  ; avec un critère d'acceptation de  $100 \pm 2 \%$ . Les données de l'exactitude pour l'ETI et les quatre produits de dégradations trouvées figurent dans le tableau (15) et montrent que la méthode est exacte.

### III.2.6.7. Robustesse

Comme représenté sur les tableaux (16, 17 et 18), le temps de rétention et la réponse chromatographique de l'ETI ne sont pas affectés de manière significative par de petites modifications des paramètres sélectionnés (variation de la longueur d'onde, le débit et le pH). Ces résultats indiquent que la méthode mise au point est robuste.

#### III.2.6.7.1. Variation du pH

Nous avons fixé le pH à 2.9, 3 et 3.1, sans modification des autres paramètres, et effectué l'analyse. Ce changement montre que les coefficients de variation relatifs aux temps de rétention et la surface restent dans les normes ( $CV \leq 2$ ), les résultats obtenus sont donnés dans le tableau (16) :

pH	Surface %	CV moy (Surf)	tr moy	CV moy (tr)
2.9	99.44	0.58	7.60	0.20
3	98.94	0.19	7.49	0.16
3.1	99.11	0.12	7.35	0.23

Tableau (16) : Variation du pH

### III.2.6.7.2. Variation du débit

Nous avons fixé tous les paramètres sauf le débit que nous avons fait varier de 0.9 à 1.1 mL.min<sup>-1</sup>. Ce changement montre que les coefficients de variation relatifs aux temps de rétention et la surface restent dans les normes ( $CV \leq 2$ ), les résultats obtenus sont montrés dans le tableau (17).

Débit (mL.min <sup>-1</sup> )	Surface %	CV moy (Surf)	tr moy	CV moy (tr)
0.9	99.23	0.68	8.88	0.28
1	100.14	0.49	7.49	0.16
1.1	99.57	0.15	7.34	0.39

Tableau (17) : Variation du débit

### III.2.6.7.3. Variation de la longueur d'onde

Nous avons fixé la longueur d'onde à 252, 254 et 256 (nm) en maintenant les autres paramètres constants. Les résultats sont regroupés dans le tableau (18). Les coefficients de variation relatifs aux temps de rétention et la surface restent dans les normes ( $CV \leq 2$ ).

$\lambda$ (nm)	Surface %	CV moy (Surf)	tr moy	CV moy (tr)
252	98.77	0.63	7.52	0.15
254	99.67	0.25	7.49	0.16
256	99.47	0.79	7.56	0.16

Tableau (18) : Variation de la longueur d'onde

### III.2.6.8. Stabilité de la solution

Selon le protocole établi dans la partie expérimentale, l'étude de la stabilité des solutions préparées est résumée dans le tableau (19). Au vu de la norme retenue par l'ICH (2.5%), il apparaît que la solution est stable pendant 03 jours à 04°C et 02 jours à 25°C ; (La concentration de l'ETI < 97,5%).

T °C	Résultats (%) de l'ETI			
	Temps	16 µg.mL <sup>-1</sup>	20 µg.mL <sup>-1</sup>	24 µg.mL <sup>-1</sup>
4°C	1 jour	99.88 ± 0.50	100.33 ± 0.22	100.88 ± 0.91
	2 jours	100.04 ± 0.71	100.21 ± 0.83	99.66 ± 1.11
	3 jours	98.88 ± 0.88	99.04 ± 0.39	98.87 ± 0.74
	4 jours	96.29 ± 0.47	95.66 ± 0.71	96.88 ± 0.47
	5 jours	93.87 ± 0.63	94.44 ± 0.64	94.37 ± 0.83
25 °C	1 jour	99.95 ± 0.89	100.29 ± 0.53	100.14 ± 1.05
	2 jours	98.53 ± 0.57	99.04 ± 1.02	98.89 ± 0.66
	3 jours	94.16 ± 1.22	96,60 ± 0.35	96.11 ± 0.47
	4 jours	92.77 ± 0.87	93.55 ± 1.22	94.88 ± 1.28

**Tableau (19) : Données d'évaluation de l'étude de stabilité de la solution (n =5 pour chaque jour, concentration=50 µg.mL<sup>-1</sup>)**

### III.2.6.9. Analyse des préparations pharmaceutiques

Quinze analyses des solutions essais de l'ETI sont réalisées, chaque solution est injectée trois fois. Les chromatogrammes de la solution placebo et la solution essai de l'ETI sont représentés sur la figure 45 (a) et (b) respectivement, nous remarquons qu'il n'y a pas d'interférences entre le placebo et le pic de l'ETI. Les résultats quantitatifs sont donnés dans le Tableau (20).

Les résultats obtenus à partir des études de la validation prouvent que la méthode mise au point convient pour la quantification de la solution essai de l'ETI.

Quantité par gélule (mg)	Nombre d'analyses	Quantité trouvée	RSD (%)
50	5	49,81	0.74
50	5	50,05	0.88
50	5	50,2	0.44
50	5	49,9	0.22
50	5	50,07	1.27
50	5	50,88	0.77
50	5	50,97	0.47
50	5	50,51	0.33
50	5	50,68	0.59
50	5	50,48	1.08
50	5	49,57	0.23
50	5	49,86	0.91
50	5	49,71	0.41
50	5	50,03	0.39
50	5	49,67	0.79

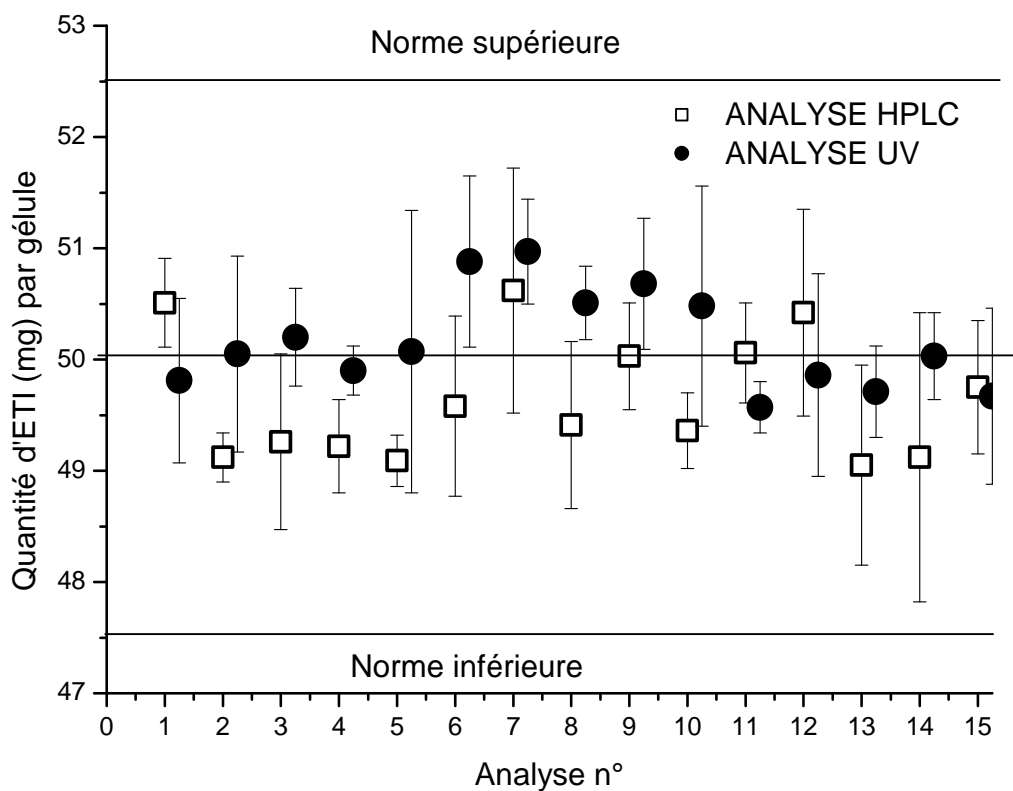
**Tableau (20) : Résultats de l'analyse de l'ETI dans les gélules.**

Il nous a semblé utile de comparer les résultats quantitatifs obtenus sur l'analyse du produit fini en utilisant :

- la spectroscopie UV-Visible d'une part,
- L'HPLC d'autre part.

Les résultats comparatifs sont illustrés dans la figure (46).

Par les 2 méthodes ; les résultats obtenus sont conformes.



**Figure (46) : Résultats comparatifs de l'analyse de l'ETI (Produit fini) par UV-Visible et HPLC**

## Conclusion

Une méthode validée indicatrice de stabilité par HPLC de l'ETI a été établie. Elle se caractérise par sa simplicité et rapidité. Les dégradations obtenues par différents stress ont permis de constater l'apparition de quatre impuretés bien résolues en utilisant la méthode HPLC développée. Leurs structures chimiques ont été établies par LC/MS-TOF et  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  RMN.

# **CONCLUSION GENERALE**

Dans ce travail, nous avons décrit le développement d'une méthode chromatographique liquide haute performance (HPLC) simple, rapide et indicatrice de stabilité (HPLC) pour l'Étifoxine en présence de ses produits de dégradation générés par l'effet de différents stress.

La méthode utilise une colonne Kromasil C18 (250 × 4.6 mm) et une phase mobile isocratique constituée d'un tampon formate pH buffer 0.02 M, pH 3 et méthanol (70/30, v/v), et un détecteur PDA opérant à 254 nm. La méthode a été validée pour sa spécificité, linéarité, sa fidélité, sa sensibilité, son exactitude et sa robustesse. La méthode s'est montrée linéaire sur une gamme de concentration de 10 ng à 30 µg/mL. La limite de détection de l'ETI a été de 0.03 µg/mL et la limite de quantification de à 0.09 µg/mL. La sélectivité a été validée en soumettant La matière active et le produit fini à différentes conditions de dégradation (acide, basique, oxydative, effets de la température et de la lumière ultra-violette). Un certain nombre de produits de dégradation apparaissent en fonction de la contrainte. Nous avons observé une dégradation prononcée de l'ETI sous l'effet de la chaleur avec l'apparition d'un seul produit de dégradation appelé DPA. L'effet du peroxyde d'hydrogène est moins rapide mais il engendre la formation de quatre produits de dégradation (DPA, DPB, DPC et DPD). Le stress basique conduit à la formation de DPA, DPB et DPC. La dégradation acide et la photolyse ont le même effet qualitatif sur l'ETI produisant DPA et DPB.

Les structures des DP sont établies par HPLC couplée à la spectroscopie de masse en tandem LC/MS-TOF. Les mêmes conditions chromatographiques ont été conservées. Le spectre de masse de DPA apparaissant avec tous les stress a un ion pseudo moléculaire  $[M+H]^+$  à  $m/z = 301,1096$  Da ; même masse moléculaire que l'ETI avec fragment supplémentaire à 256,0481 Da. Nous avons conclu que le cycle oxazine-2-amine présent dans l'ETI s'ouvre pour donner le DPA. Le produit de dégradation B apparait avec tous les stress à l'exception de la dégradation thermique ; il comporte, comme la molécule mère, le cycle oxazine. Les dégradations basique et oxydative conduisent au DPC où le cycle oxazine est encore absent. Le DPD est issu exclusivement de l'action du peroxyde d'hydrogène et la fonction amine secondaire de l'ETI est transformée en hydroxylamine.

La nécessité de confirmer ces résultats de structure nous a amené à mettre en œuvre l'HPLC préparative pour recueillir et isoler chacun des DPs et de préciser les structures proposées par résonance magnétique nucléaire du proton et du Carbone 13. Les résultats obtenus par cette technique hautement qualitative nous a permis de conforter et de préciser les structures de tous les DPs.

Compte tenu de tous ces résultats, les chemins de dégradation par les différents stress et les voies de fragmentation par spectrométrie de masse ont été établis.

La méthode indicatrice de stabilité proposée a ensuite été appliquée au dosage du principe actif dans le produit fini. Les résultats obtenus ont été déclarés conformes compte tenu du réglementaire établi dans les référentiels (Pharmacopées, ICH). Elle peut être utilisée en routine dans l'analyse de l'ETI dans les gélules.

Dans ce travail, la méthodologie acquise dans la mise en œuvre d'une méthode indicatrice de stabilité permettra d'explorer la dégradation d'autres molécules biologiquement actives sous différents stress en y incluant les techniques les plus récentes en chromatographie en phase liquide.

# **REFERENCES**

[1] Baertschi SW. Pharmaceutical Stress Testing. 1st ed. Dekker M, ed.: Taylor & Francis Group, LLC; 2005.

[2] International Conference on Harmonisation. Stability testing of new drug substances and products. Q1A(R2); 2003.

[3] International Conference on Harmonisation. Impurities in New Drug Products. Q3B(R2); 2003.

[4] International Conference on Harmonisation. Impurities in New Drug Substances. Q3A(R2); 2002.

[5] C.Ellie, V.Zanzi. Etudes de dégradation forcée au cours du développement pharmaceutique. STP pharma pratique 2007 ; 17(2) : p 89-99.

[6] Carstensen JT, Swarbrick J, Drug Stability Principles and Practices. 1995, 2ème Edition: 127 – 156.

[7] Kennon L. Use of kinetic methods in storage stability studies on drugs and pharmaceuticals. Pharm sci .1964; 53(7):815–818.

[8] Yang WH, Roy SB. Projection of tentative expiry date from one-point accelerated stability testing. Drug Dev Ind Pharm 1980 ; 6 (6) : 591–604.

[9] Witthaus G, Breimer DD, Speiser P. Accelerated Storage Tests: Predictive Value, Topics in Pharmaceutical Sciences. Elsevier, North-Holland Biomedical Press, 1981 : 275–290.

[10] Bakshi M. Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs. Pharma Technol, 2000; 1–14.

- [11] Bakshi M, Singh S. Development of validated stability-indicating assay methods--critical review. *J Pharm Biomed Anal.* 2002 (6):1011-40.
- [12] Alsante KM, Friedmann RC, Hatajik TD, Lohr LL, Sharp TR, Snyder KD, Szczesny EJ. Degradation and impurity analysis for pharmaceutical drug candidates. Academic Press, 2001: 85–172.
- [13] Reynolds DW, Facchine KL, Mullaney JF, Alsante KM, Hatajik TD, Motto MG. Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. *Pharma Technol.* 2002; 26 (2): 48–54.
- [14] Alsante KM, Ando A, Brown R, Ensing J, Hatajik TD. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2007(59): p. 29–37.
- [15] Steven W. Baertschi. *Pharmaceutical Stress Testing Predicting Drug Degradation.* Taylor & Francis Group. (2005) 1-469.
- [16] Breton D, Brezillon C, Buret D, Camarade M, Castel F, Cosledan S, et al. Etudes de dégradation forcée au cours du développement pharmaceutique. *STP Pharma Pratiques.* 2007; 17(2): p. 89-99.
- [17] International Conference on Harmonisation. Stability testing of new drug substances and products. Q1A(R2); 2003.
- [18] International Conference on Harmonisation. Stability testing for new dosage forms. Q1C; 1998.
- [19] International Conference on Harmonisation. Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products. Q1B; 1996.

[20] International Conference on Harmonisation. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Q2 (R1); 1999.

[21] International Conference on Harmonisation. Guidance on Q6A Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances. Q6A; 2000.

[22] C.Ellie.V.Zanzi. Etudes de dégradation forcée au cours du développement pharmaceutique. STP pharma pratique 2007 ; 17 (2) 89-99.

[23] Ahuja S, Alsante KM, eds. Handbook of Isolation and Characterization of Impurities in Pharmaceuticals, Separation Science and Technology. Academic Press, Vol 5 ( 2003) 361-391.

[24] Waterman KC, Adami RC, Antipas AS, Arenson DR, Carrier R, Hong J, Landis MS, Lombardo F, Shah JC, Shalaev E, Smith SW, Wang H. Hydrolysis in pharmaceutical formulations. Pharm Dev Tech 2002; 7 (2): 113–146.

[25] Hart/ Conia. Introduction à la chimie organique, (1993) 177-190.

[26] Turner JO. The acid-catalyzed decomposition of aliphatic hydroperoxides: reactions in the presence of alcohols. Tetrahedron Lett. 14 (1971) 887–890

[27] DW Reynolds et al. Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. Pharmaceutical technology, February 2002.

[28] Impurities in new Drug substances. International Conference on Harmonisation, ICH Q3A(R), 2003.

[29] Impurities in new Drug Product. International Conference on Harmonisation, Q3B(R), 2003.

[30] Snyder LR, Glajch JL, Kirkland JJ. Practical HPLC Method Development. New York: John Wiley and Sons, 1988.

[31] International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Validation of analytical procedures : text and methodology – ICH Q2(R1), Step 4, November 2005.

[32] Feinberg M. Labostat Guide de validation des méthodes d'analyse. Paris, 2009, Lavoisier, 361p

[33] Bardin C, Astier A, Vulto A, Sewell G, Vigneron J, Trittler R, Daouphars M, Paul M, Trojniak M, Pinguet F. Guidelines for the practical stability studies of anticancer drugs : A European consensus conference. Ann Pharm Fr. 2011 ; 69 : 221-231.

[34] H.J. Kruse, H. Kuch, Etifoxine: evaluation of its anticonvulsant profile in mice in comparison with sodium valproate, phenytoin and clobazam, Arzneimittel-Forsch 35 (1985) 133–135.

[35] R. Schlichter, V. Rybalchenko, P. Poisbeau, M. Verleye, J. Gillardin, Modulation of GABAergic synaptic transmission by the non-benzodiazepine anxiolytic etifoxine, Neuropharmacology 39 (2010) 1523–1535.

[36] K.W. Gee, M.B. Tran, B. Minhtam, D.J. Hogenkamp, T.B. Johnstone, R.E. Bagnera, R.F. Yoshimura, J.C. Huang, J.D. Belluzzi, E.R. Whitemore, Limiting activity at  $\alpha_1$ -subunit-containing GABAA receptor subtypes reduces ataxia, J. Pharmacol. Exp. Ther. 332 (2010) 1040–1053.

[37] J. Pang, H. Li, L. Li, Determination of etifoxine hydrochloride in etifoxine hydrochloride capsules, Zhongguo Yaoxue Zazhi (Beijing, China) 43 (2008) 1823–1826.

[38] F.L. Sauvage, N. Picard, F. Saint-Marcoux, J.M. Gaulier, G. Lachâtre, P. Marquet, General unknown screening procedure for the characterization of human drug metabolites in forensic toxicology: applications and constraints, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 3074–3083.

[39] ICH, Impurities in new drug substances, Q3A (R2), in: International Conference on Harmonisation, IFPMA, Geneva, 2006.

[40] Hamon A, Morel A, Hue B, Verleye M, Gillardin JM. The modulatory effects of the anxiolytic etifoxine on GABA (A) receptors are mediated by the beta subunit. *Neuropharmacology*. 2003 Sep; 45(3):293-303.

[41] Kruse HJ, Kuch H. Potentiation of clobazam's anticonvulsant activity by etifoxine, a non-benzodiazepine tranquilizer, in mice. Comparison studies with sodium valproate. *Arzneimittelforschung*. 1986 Sep; 36(9):1320-2.

[42] <http://www.adcock.co.za/Resources/ProductDocs/Stresam%20PI.pdf>. Retrieved 2. 2008-08-30.

[43] D, Rim linger H, Gidenne S, et al. (2003). " [Etifoxine chlorhydrate- induced acute hepatitis]" (in French). *Gastroenterology. Clin. Biol.* 27 (11): 1050–1

[44] N.Djabrouhou, MH Guermouche. Development of a stability-indicating HPLC method of Etifoxine with characterization of degradation products by LC-MS/TOF, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR. *J.Pharm. Biomed. Anal.*, 100 (2014) 11–20.

[45] N.R.Ramisetti, R. Kuntamukkala, S. Lakshetti, P. Sripad. Identification and characterization of stress degradants of lacosamide by LC–MS and ESI-Q-TOF-MS/MS: Development and validation of a stability indicating RP-HPLC method. 95 (2014) 256-264.

- [46] R. N. Rao, C. G. Naidu, K. G. Prasad, B. Santhakumar, S. Saida. Development and validation of a stability indicating assay of doxofylline by RP-HPLC: ESI-MS/MS,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopic characterization of degradation products and process related impurities. 78–79 (2013) 92-99.
- [47] Rao, B. Ramachandra, B. Sravan, S. Khalid. LC–MS/MS structural characterization of stress degradation products including the development of a stability indicating assay of Darunavir: An anti-HIV drug . J. Pharm. Biomed. Anal., 89 (2014) 28-33.
- [48] Wu C, Xu X, Feng C, Shi Y, Liu W, Zhu X, Zhang J. Degradation kinetics study of cabozantinib by a novel stability-indicating LC method and identification of its major degradation products by LC/TOF-MS and LC-MS/MS. J. Pharm. Biomed. Anal., 98 (2014) 356-363.
- [49] M.V.N. K. Talluri, S. Dharavath, P. D. Kalariya, B. Prasanth, R. Sriniva. Structural characterization of alkaline and oxidative stressed degradation products of lurasidone using LC/ESI/QTOF/MS/MS. J. Pharm. Biomed. Anal, 105 (2015) 1-9.
- [50] M. Narayanam, A. Sahu, S. Singh. Use of LC-MS/TOF, LC-MS<sup>n</sup>, NMR and LC-NMR in characterization of stress degradation products: Application to cilazapril. J. Pharm. Biomed. Anal, In Press, Available online 3 April 2015, DOI: 10.1016/j.jpba.2015.03.038.
- [51] Z.Luo, Z. Deng, Y. Liu, G. Wang, W. Yang, C. Hou, M. Tang, R. Yang, H. Zhou. Development and validation of a novel stability-indicating HPLC method for the quantitative determination of eleven related substances in ezetimibe drug substance and drug product. Talanta, 139, 1 July 2015, 67-74.
- [52] H.R. Bhagat, H.N. Bhargava, D.A. Williams. High-performance liquid chromatographic determination of dyclonine hydrochloride in the presence of its degradation products. J. Pharm. Biomed. Anal. 7 (1989) 441-446.

- [53] A.A.M. Wahbi, A.-F.M. El-Walily, E.M. Hassan, F.G. Saliman, A. El-Gendi, Liquid chromatographic determination of flunarizine dihydrochloride in the presence of its degradation product. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13 (1995) 777–784.
- [54] A. El-Gindy, A. Ashour, L. Abdel-Fattah, M.M. Shabana, Spectrophotometric determination of benazepril hydrochloride and hydrochlorothiazide in binary mixture using second derivative, second derivative of the ratio spectra and chemometric methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 913–922.
- [55] S.Z. El Khateeb, S.A. Abdel Razek, M.M. Amer; Stability-indicating methods for the spectrophotometric determination of norfloxacin; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998) 829–840.
- [56] F.A. El-Yazbi, H.H. Abdine, R.A. Shaalan. Spectrophotometric and spectrofluorometric methods for the assay of lisinopril in single and multicomponent pharmaceutical dosage forms ; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19 (1999) 819–827.
- [57] Z.R. Zaidi, F.J. Sena, C.P. Basilio. Stability assay of allantoin in lotions and creams by high-pressure liquid chromatography. *J. Pharm. Sci.* 71 (1982) 997–999.
- [58] V.D. Gupta. Quantitation of meperidine hydrochloride in pharmaceutical dosage forms by high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Sci.* 72 (1983) 695–697.
- [59]:V.D. Gupta. Quantitation of metronidazole in pharmaceutical dosage forms using high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Sci.* 73 (1984) 1331–1333.
- [60] F.A. El-Yazbi, H.H. Abdine, R.A. Shaalan. Spectrophotometric and spectrofluorometric methods for the assay of lisinopril in single and multicomponent pharmaceutical dosage forms. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20 (1999) 343–350.
- [61]:J. Frank, L. Chafetz. IR spectrophotometric assay of carbachol solutions. *J. Pharm. Sci.* 66 (1977) 439.

- [62] S. Rubnov, D. Levy, H. Schneider; Liquid chromatographic analysis of physostigmine salicylate and its degradation products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 18 (1999) 939–945.
- [63] N.A. El Ragehy, S.S. Abbas, S.Z. El-Khateeb. Stability indicating method for determination of nortriptyline hydrochloride using 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH). *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 143-151.
- [64] V. Andrisano, R. Gotti, A. Leoni, V. Cavrini. Photodegradation studies on Atenolol by liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21 (1999) 851–857.
- [65] E.A. Gad Kariem, M.A. Abounassif, M.E. Hagga, H.A. Al-Khamees. Photodegradation kinetic study and stability-indicating assay of danazol using high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23 (2000) 413–420.
- [66] E.M. Abdel-Moety, O.A. Al-Deeb; Stability-indicating liquid chromatographic determination of trifluoperazine hydrochloride in bulk form and tablets. *Eur. J. Pharm. Sci.* 5 (1997) 1–5.
- [67] V.B. Patravale, V.B. Nair, S.P. Gore, High performance thin layer chromatographic determination of nifedipine from bulk drug and from pharmaceuticals ; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23 (2000) 623–627.
- [68] A.E.-A. El-Bayoumi, A. El-Shanawany, M.E. El-Sadek, A.A. El-Sattar. Stability indicating spectrodensitometric determination of ranitidine hydrochloride using linear and non-linear regression. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21 (1999) 867–873.
- [69] H. Bartsch, A. Eiper, H. Kopelent-Frank, J; Stability indicating assays for the determination of piroxicam—comparison of methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20 (1999) 531–541.

[70] T. Ramesh, P.N. Rao, R.N. Rao, LC–MS/MS method for the characterization of the forced degradation products of Entecavir, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 368–375.

[71] A. Khedra, I. Darwish, F. Bamane, Analysis of abiraterone stress degradation behavior using liquid chromatography coupled to ultraviolet detection and electrospray ionization mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 74 (2013) 77–82.

[72] P.H. Morgan, A.H. Beckett, Synthesis of some N-oxygenated products of 3,4-dimethoxyamphetamine and its N-alkyl derivatives, *Tetrahedron* 31 (1975) 2595–2601.

[73] G. Zinner, W. Kliegel, On the oxidation of secondary amines with hydrogen peroxide. Hydroxylamine derivatives, *Arch. Pharm. Ber. Dtsch. Pharm. Ges.* 299 (1966) 166–173.

[74] H. Beckett, S. Al-Sarraj, N-oxidation of primary and secondary amines to give hydroxylamines— a general metabolic route, *J. Pharm. Pharmacol.* 24 (1972) 916–917.

[75] ICH, International Conference on Harmonization Guideline on Validation of Analytical Procedure, Test and Methodology, Geneva, Q2 (R1), 2005.