

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**Université Blida 1**

**Facultés des sciences**

**Département de Chimie**



En vue de l'obtention d'un diplôme de Master en Chimie

Spécialité : chimie Appliquée

**Thème**

---

**Validation analytique de la méthode de séparation chirale des  
énantiomère de l'ibuprofène par Chromatographie Liquide à  
Haute Performance (HPLC)**

---

Réalisé par :

Dahri Hassene

Soutenu le 04-07-2024 devant le jury composé de :

Mme. Bessi Assia	MCB	USDB1	Présidente
Mr. Ait Yahia Ahmed	MAA	USDB1	Examineur
Mme. Missoum Amina	MCB	ENS	Promotrice
Mme. Hamza Kahina	MCB	USDB1	Co-promotrice

**2023/2024**

## Remercîment

*Au nom de Dieu, le Tout miséricordieux, le Très miséricordieux. Que la paix et les bénédictions soient sur notre maître Muhammad, que Dieu le bénisse et lui accorde la paix. Tout d'abord, je remercie Dieu Tout-Puissant, qui nous a donné la force et la patience pour accomplir une humble œuvre. La réalisation de cette thèse a été rendue possible grâce au concours de nombreuses personnes à qui nous tenons à exprimer notre gratitude.*

*Je tiens avant tout à exprimer ma gratitude à **Dr. Missoum Amina** pour avoir accepté de m'encadrer dans cette étude et de m'apporter sa sagesse, surtout lorsque le chemin était plus compliqué. Je la remercie également pour sa participation, son soutien et ses encouragements tout au long de ce travail.*

*Je tiens également à remercier sincèrement mon Co-promoteur **Dr. Hamza Kahina** pour son aide, sa disponibilité et ses conseils extrêmement précieux. Je tiens également à remercier ses conseils continus tout au long de la réalisation de ce travail.*

*J'adresse également mes remerciements à **M. Ait Yahia Ahmed**, chef du département de Chimie, que j'honore pour avoir examiné ce travail et lui exprime ma profonde gratitude pour nous avoir enseigné.*

*J'adresse également mes remerciements à **Dr. Bessi Assia** je suis très honorée que vous avez accepté la présidence du jury de ce mémoire et d'apporter vos remarques et critiques à l'occasion de la soutenance.*

*Enfin, nous tenons à remercier toutes les personnes qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à la réussite de ces travaux et que nous ne pouvons citer ici.*

## Dédicace

*Je dédie ce mémoire de fin d'étude*

*A mes très chers parents*

*Grâce à leurs tendres encouragements et leurs sacrifices, ils ont pu créer le climat affectueux  
et propice à la poursuite de mes études.*

*Aucune dédicace ne pourrait expliquer mon respect, ma considération et mes profonds  
sentiments envers eux.*

*En ce jour. J'espère avoir réalisé l'un de vos rêves et j'espère que Dieu vous garde et vous  
procure santé, bonheur et longue vie.*

*A tous les membres de ma famille, spécialement mon cher frère Ayoub,*

*Merci pour l'encouragement et de m'avoir accompagné toutes ces longues années d'étude et  
de m'avoir donné la force de continuer jusqu'au bout.*

*À mes chers amis, **Koudri Muhammad Aldan**, avec qui j'ai passé les plus belles années  
d'études, ainsi qu'à **Zoukh Abd El Kader et Zakaria et Abd El Rahmane et Aymen et Chams  
El Dine, Dia El Din, Saif El Din** et Oussama j'espère vous voir tous réussir dans la vie.*

*À Tous mes collègues de la promo Master 2 Chimie Appliquée (2023/2024) pour les bons  
moments que nous avons passés ensemble.*

*À Tous Mes enseignants du département de chimie En particulier Madame Hamza Kahina.*

## Résumé

L'objectif de notre travail est la validation d'une méthode analytique de séparation chirale d'un mélange racémique d'ibuprofène, c'est un anti-inflammatoire non-stéroïdien (AINS), en utilisant la technique de chromatographie liquide à haute performance HPLC. Cette séparation a été réalisée par un appareil HPLC de type Agilent 1260 technologies avec une colonne chirale Ultron-ES-OVM (150 × 4.6 mm) à base de protéine. Nous avons utilisé une phase mobile constituée de (30/70 % MeOH/KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>), avec une concentration de (KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>)50 mM à pH = 3.22, à température ambiante.

La validation de la méthode selon le guideline l'ICH 2005 Q2(R1) « la Conférence Internationale d'harmonisation »[1], donner des résultats conforme aux critères d'acceptabilité telle que la spécificité montrant que les deux pics de l'ibuprofène sont distincts bien séparé sans interférence significative au des autres pics de la phase mobile, avec un temps de rétention  $t_{r1}=9.186$  min et  $t_{r2}=10.299$  min, par conséquent les résultats de la linéarité sur une gamme de concentration allant de 0,01 à 0.9 mg/ml donner un excellente linéarité avec un coefficient de corrélation ( $R^2$ ) est de ( $R_1=0,998$  et  $R_2=0,9928$ ), quant aux résultats de la précision inter-jour sont conforme aux critères d'acceptabilité ( $RSD \geq 15\%$ ), la déviation standard relative variée entre ( $RSD_1 ; 0,08149$  et  $3,89567$ ) et ( $RSD_2 ; 0,11635$  et  $6,47649$ ). D'autre part, la répétabilité est bien validée, ce qui assure la fidélité de la méthode avec une valeur de la déviation standard relative inférieure à 2 % ( $RSD_1 \% = 0,908$ ) et ( $RSD_2 \% = 1,41$  %). Les résultats de la limite de détection et de quantification obtenues confirment la haute sensibilité de la méthode HPLC ( $LD_1=0,00247325$ ) et ( $LD_2=0,001867689$ ), ( $LQ_1=0,007494724$ ) et ( $LQ_2=0,005659664$ ). Les résultats de la robustesse donnent des valeurs de temps de rétention qui ne diffèrent pas sensiblement les unes des autres, donc la méthode résiste aux variations mineures des conditions expérimentales. La technique s'est montrée valide pour les utilisations définies et en conformité parfaite avec les critères de validation définis par l'ICH 2005 Q2(R1).

**Mot-clé :** validation, HPLC, ibuprofène, énantiomères, chirale.

## Abstract

The objective of our work is the validation of an analytical method for the chiral separation of a racemic mixture of ibuprofen, a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), using the high-performance liquid chromatography technique. HPLC. This separation was carried out by an Agilent 1260 technologies type HPLC with a chiral Ultron-ES-OVM column (150 × 4.6 mm) based on protein. We used a mobile phase consisting of (30/70% MeOH/KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>), with a concentration of (KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>) 50 mM at pH = 3.22, at room temperature.

Validation of the method according to the ICH 2005 Q2(R1) “International Conference on Harmonization” guideline[1], giving results consistent with acceptability criteria such as specificity showing that the two peaks of ibuprofen are distinct well separated without significant interference to the other peaks of the mobile phase, with a retention time  $t_{r1}=9.186$  min and  $t_{r2}=10.299$  min, therefore the linearity results over a concentration range from 0.01 to 0.9 mg/ml give excellent linearity with a correlation coefficient ( $R^2$ ) is ( $R_1=0.998$  and  $R_2=0.9928$ ), as for the inter-day precision results comply with the acceptability criteria ( $RSD \geq 15\%$ , the relative standard deviation varied between ( $RSD_1$ ; 0.08149 and 3.89567) and ( $RSD_2$ ; 0.11635 and 6.47649). On the other hand, the repeatability is well validated, which ensures the fidelity of the method with a value of the relative standard deviation less than 2% ( $RSD_1\% = 0.908$ ) and ( $RSD_2\% = 1.41\%$ ). The results of the limit of detection and quantification obtained confirm the high sensitivity of the HPLC method ( $LD_1=0.00247325$ ) and ( $LD_2=0.001867689$ ), ( $LQ_1=0.007494724$ ) and ( $LQ_2=0.005659664$ ). Robustness results yield retention time values that do not differ significantly from each other, so the method is robust to minor variations in experimental conditions. The technique has been shown to be valid for the defined uses and in full compliance with the validation criteria defined by ICH 2005 Q2(R1).

**Keyword :** validation, HPLC, ibuprofen, enantiomers, chiral.

## ملخص

الهدف من عملنا هو التحقق من صحة طريقة تحليلية للفصل الكروماتوغرافي لخليط راسمي من الإيبوبروفين، وهو عقار مضاد للالتهابات (NSAID)، باستخدام تقنية التحليل الكروماتوغرافي السائل عالي الأداء. تم إجراء هذا الفصل بواسطة جهاز HPLC من نوع Agilent 1260 مع استعمال عمود Ultron-ES-OVM اللولبي (150 × 4.6 مم) يعتمد على البروتين. استخدمنا طورًا متحركًا يتكون من (MeOH/KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> %70/30)، بتركيز 50 (KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>) مم عند درجة الحموضة = 3.22، عند درجة حرارة الغرفة.

التحقق من صحة الطريقة وفقًا للمجلس الدولي لتنسيق المتطلبات التقنية للمستحضرات الصيدلانية للاستخدام البشري ICH2005 Q2(R1) [1]، مما يعطي نتائج متوافقة مع معايير المقبولية مثل الخصوصية التي توضح أن قمتي الإيبوبروفين منفصلتان بشكل جيد دون تدخل كبير في الآخر قمم الطور المتحرك، مع زمن استبقاء  $tr_1=9.186$  دقيقة و  $tr_2=10.299$  دقيقة، وبالتالي فإن نتائج الخطية على مدى تركيز من 0.01 إلى 0.9 ملغم/مل تعطي خطية ممتازة مع معامل ارتباط ( $R^2$ ) هو ( $R_1=0.998$  و  $R_2 = 0.9928$ )، أما بالنسبة لنتائج الدقة خلال الأيام المطابقة لمعايير القبول ( $RSD \geq 15\%$ )، فقد تراوح الانحراف المعياري النسبي بين ( $RSD_1; 0.08149$  و  $RSD_2; 0.11635$ ) و ( $6.47649$  و  $RSD_2$ ). من ناحية أخرى، تم التحقق من صحة التكرار بشكل جيد، مما يضمن دقة الطريقة مع قيمة الانحراف المعياري النسبي أقل من 2% ( $RSD_1\% = 0.908$ ) و ( $RSD_2\% = 1.41\%$ ). تؤكد نتائج حد الكشف والقياس الكمي التي تم الحصول عليها الحساسية العالية لطريقة HPLC ( $LD_1=0.00247325$ ) و ( $LD_2=0.001867689$ ) و ( $LQ_1=0.007494724$ ) و ( $LQ_2=0.005659664$ ). نتائج المتانة تسفر عن قيم وقت الاحتفاظ التي لا تختلف بشكل كبير عن بعضها البعض، وبالتالي فإن الطريقة قوية للتغيرات الطفيفة في الظروف التجريبية. لقد ثبت أن هذه التقنية صالحة للاستخدامات المحددة وتتوافق تمامًا مع معايير التحقق المحددة في ICH 2005 Q2(R1).

**الكلمات المفتاحية:** التحقق من الصحة، HPLC، إيبوبروفين، المتماكبات، الكروماتوغرافي.

## Table des matières

Remerciement .....	2
Dédicace.....	3
Résumé.....	4
Abstract.....	5
ملخص.....	6
Liste des figures .....	10
Liste des tableaux.....	12
Liste des observations .....	13
Introduction générale .....	15

### Chapitre I : Généralité sur l'ibuprofène

I.1. Histoire .....	17
I.2. Définition.....	17
I.3. Stéréochimie .....	18
I.4. Synthèse classique de l'ibuprofène .....	19
I.5. Caractéristiques de l'ibuprofène .....	21
I.5.1. Les caractéristiques physiques et chimiques de l'ibuprofène .....	22
I.5.2. Caractéristiques physicochimiques de l'ibuprofène .....	24
I.5.3. Caractéristiques cristallographiques de l'ibuprofène .....	25
I.6. Propriétés pharmacologie .....	25
I.6.1. La pharmacodynamie .....	26
I.6.2. La pharmacocinétique .....	27
I.6.2.1. Absorption.....	27
I.6.2.2. Distribution .....	28
I.6.2.3. Métabolisme.....	29
I.6.2.4. Elimination.....	29
I.7. Effet indésirable .....	29

### Chapitre II : chiralité, chromatographie chirale et chromatographie liquide à haut performance

Partie A : Chiralité et chromatographie chirale.....	32
II.1. Chiralité et carbone asymétrique .....	32
II.2. Les énantiomères .....	33
II.3. Les différentes méthodes de résolution chirale des énantiomères .....	34
II.4. Les méthodes non chromatographie.....	35
II.4.1. La méthodes de biotransformation.....	35
II.4.2. La cristallisations .....	35
II.4.3. Électrophorèse capillaire.....	36
II.4.4. Les membranes.....	36
II.4.5. Les biocapteurs .....	37
II.5. la chromatographie chirale .....	38
II.5.1. Les phase stationnaire chirale .....	39
II.5.1.1. Les sélecteurs de type Pirkle : .....	39

II.5.1.2. Les échangeurs de ligands .....	39
II.5.1.3. Les cyclo dextrines .....	40
II.5.1.4. Les éthers-couronnes chiraux .....	41
II.5.1.5. Les antibiotiques macrocycliques .....	42
II.5.1.6. Les protéines .....	43
II.5.1.7. Les polymères synthétiques .....	44
II.5.1.8. Les dérivés de polysaccharides .....	45
II.5.2. Les phases mobiles chirale .....	46
Partie B : chromatographie liquide à haute performance .....	47
II.1. Définition .....	47
II.2. Histoire .....	47
II.3. Principe .....	48
II.4. Classifications des méthodes chromatographie .....	48
II.4.1. Classification selon la nature des phases .....	48
II.4.2. Classification selon nature des phénomènes .....	49
II.4.3. Selon la nature de la phase mobile .....	49
II.5. La chromatographie liquide à haute performance HPLC .....	49
II.5.1. Définition .....	49
II.5.2. Principe .....	50
II.5.3. Conception générale d'un appareil HPLC .....	51
II.5.3.1. Le réservoir de la phase mobile .....	51
II.5.3.2. La phase mobile .....	51
II.5.3.3. Les pompes .....	52
II.5.3.4. Les injecteurs .....	53
II.5.3.5. La colonne .....	53
II.5.3.6. Les détecteurs .....	54
II.5.4. Le chromatogramme .....	55

### Chapitre III : La validation analytique

III.1. Définition .....	57
III.2. Aspect réglementaire et normatif .....	57
III.3. Objectifs de la validation .....	58
III.4. Validation des méthodes analytiques à l'industrie pharmaceutique .....	59
III.5. Cycle de vie d'une méthode analytique .....	59
III.5. Critères de validation .....	60
III.5.1. La spécificité / sélectivité .....	60
III.5.2. Linéarité .....	61
III.5.3. La précision .....	61
III.5.3.1. Répétabilité .....	61
III.5.3.2. Précision intermédiaire .....	62
III.5.3.3. Reproductibilité .....	62
III.5.4. EXACTITUDE .....	62



III.5.5. Limite de détection (LD) .....	62
III.5.6. Limite de quantification (LQ) .....	63
III.5.7. ROBUSTESSE .....	63
<u>Chapitre IV : Matérielle Et méthode</u>	
IV.1. Matérielle .....	65
IV.1.1. Appareillage .....	65
IV.1.2. Réactifs .....	70
IV.1.3. Solvants .....	70
IV.2. Méthode .....	71
IV.2.1. Méthodologie de la validation analytique .....	71
IV.2.4. Préparation de la solution standard (PA) .....	71
IV.2.5. Préparation de la phase mobile .....	71
IV.2.6. Préparation d'une série détalonnage .....	72
IV.3. Validation de la méthode .....	72
<u>Chapitre V : Résulta et Discussion</u>	
V.1. Introduction .....	76
V.2. Conditions chromatographiques optimal .....	76
V.3. Validatione de la methde .....	76
V.3.1. Résultats de test de la spécificité .....	77
V.3.2. Résultats de test de linéarité .....	78
V.3.3. Précision inter-jour .....	82
V.3.4. Profils d'exactitude obtenue .....	85
V.3.5. Précision intra-jour .....	86
V.3.6. Limite de détection (LD) et limite de quantification (LQ) .....	87
Conclusion Générale .....	91
Référence bibliographie .....	92

## Liste des figures

<b>FIGURE 1:</b> PHOTOGRAPHIE DU DR STEWART ADAMS PRISE EN 1987[5].	17
<b>FIGURE 2:</b> STRUCTURE CHIMIQUE DE (RS)-IBUPROFENE[8].	18
<b>FIGURE 3:</b> SYNTHÈSE CLASSIQUE DE L'IBUPROFENE[13].	20
<b>FIGURE 4:</b> STRATÉGIE SYNTHÉTIQUE POUR LA SYNTHÈSE EN FLUX CONTINU DE L'IBUPROFENE[13].	21
<b>FIGURE 5:</b> DISSOLUTION PARTIELLE DE L'IBUPROFENE PUR DANS 0,1 M HCL A PH 1,2 ET DES TAMPONS PHOSPHATE A PH 5,5 (0,1 M), PH 6,8 (0,05 M) ET 7,2 (0,05 M) A 37 °C[19].	23
<b>FIGURE 6:</b> LIBÉRATION D'IBUPROFENE DES COMPLEXES VIBU DANS 0,1 M HCL A PH 1,2 ET TAMPONS PHOSPHATE A PH 5,5 (0,1 M), PH 6,8 (0,05 M) ET 7,2 (0,05M) A 37 °C[19].	23
<b>FIGURE 7:</b> FORMATION D'UN DIMÈRE CYCLIQUE ENTRE DEUX MOLECULES D'IBUPROFENE[24].	25
<b>FIGURE 8:</b> POURCENTAGE D'INHIBITION DE LA PRODUCTION DE (PGE 2, PROSTAGLANDINE E) PAR RAPPORT AUX NIVEAUX DE PREDOSE (DE BASE) APRES UNE ADMINISTRATION ORALE UNIQUE DE 200 MG D'IBUPROFENE SELON TRIOS DIFFÉRENTES FORMULATIONS 8 HEURES APRES LE TRAITEMENT[30].	27
<b>FIGURE 9:</b> PROFILS D'ABSORPTIONS CUMULATIVES MOYENNES DES ENANTIOMÈRES DE L'IBF APRES UNE ADMINISTRATION SÉPARÉE DE L'IBF RACÉMIQUE ET DE CHAQUE ENANTIOMÈRE.	28
<b>FIGURE 10:</b> LES DEUX ENANTIOMÈRES D'UN ACIDE AMINE CHIRAL.	32
<b>FIGURE 11:</b> STRUCTURE DES ENANTIOMÈRES DE LA THALIDOMIDE[43].	33
<b>FIGURE 12:</b> ORGANIGRAMME DES DIFFÉRENTES TECHNIQUES DE RÉSOLUTION CHIRALE[46].	34
<b>FIGURE 13:</b> MÉLANGES RACÉMIQUES ET RÉSOLUTION DES ENANTIOMÈRES PAR LA MÉTHODE CRISTALLISATION.	36
<b>FIGURE 14:</b> SCHEMA REPRESENTATIF DE MEMBRANES CHIRALES INHERENTES CONTENANT DE LA CELLULOSE OU DU CHITOSANE[54].	37
<b>FIGURE 15:</b> MODELE DES TROIS POINTS D'INTERACTION SELON DALGLIESH[58].	38
<b>FIGURE 16:</b> CSPS CHIRALES COMPLÉMENTAIRES AVEC SÉLECTEUR DE TYPE PIRKLE (WHELK-O-1 ET PAR RÉCIPROCITE (S)-NAPROXÈNE[59].	39
<b>FIGURE 17:</b> STRUCTURE DE LA CSP ÉCHANGE DE LIGAND A BASE DE L-HYDROXYPROLINE GREFFÉE SUR MONOLITHE DE SILICE	40
<b>FIGURE 18:</b> LA STRUCTURE CHIMIQUE DES CD, AVEC UN EXTERIEUR HYDROPHILE ET UN INTERIEUR HYDROPHOBE. SELON LEUR NOMBRE D'UNITES GLUCOPYRANOSE, ILS PEUVENT ÊTRE RESPECTIVEMENT A-CD, B-CD ET Γ-CD.	41
<b>FIGURE 19:</b> LES STRUCTURES DE (R,R)-BIS-(1,1-BINAPHTYL)-22-COURONNE-6 ( A GAUCHE ) ET (+)-(18-COURONNE-6)-2,3,11, ACIDE 12-TETRACARBOXYLIQUE ( A DROITE )[65].	42
<b>FIGURE 20:</b> SÉLECTEURS CHIRAUX GLYCOPEPTIDES, VANCOMYCINE, TEİCOPLANINE.	43
<b>FIGURE 21:</b> SCHEMA DE SYNTHÈSE DE DÉRIVÉS DE POLYACRYL (POLYMETYLACRYLAMIDE) OPTIQUEMENT ACTIFS.	44

<b>FIGURE 22:</b> STRUCTURE DES CSPs (A) CELLULOSE-TRIS (3,5-DIMETHYLPHENYL CARBAMATE), (B) AMYLOSE-TRIS (3,5-DIMETHYLPHENYL CARBAMATE), ET (C) CELLULOSE-TRIS (4-METHYLBENZOATE)[79].	45
<b>FIGURE 23:</b> SCHEMA REPRESENTANT LE PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT D'UNE CHAÎNE HPLC.	50
<b>FIGURE 24:</b> CONCEPTION GÉNÉRALE D'UN APPAREIL HPLC.	51
<b>FIGURE 25:</b> LA POMPE À PISTON DE L'APPAREIL HPLC.	52
<b>FIGURE 26:</b> SCHEMA DU FONCTIONNEMENT DE L'INJECTEUR DE HPLC.	53
<b>FIGURE 27:</b> LA GAMME DE COLONNES C18 DE REGIS TECHNOLOGIES.	54
<b>FIGURE 28:</b> DÉTECTEUR À BARRETTE DE DIODES AGILENT 1260 INFINITY.	55
<b>FIGURE 29:</b> EXEMPLE REPRESENTANT LE CHROMATOGRAMME OBTENU PAR LE DÉTECTEUR.	55
<b>FIGURE 30:</b> CRITÈRES ET PROCÉDURES DE VALIDATION LIÉS AU CYCLE DE VIE.	60
<b>FIGURE 31:</b> CHAÎNE HPLC DE TYPE AGILENT TECHNOLOGIES, SÉRIE 1260 INFINITY.	65
<b>FIGURE 32:</b> POMPE QUATÉNAIRE DE L'APPAREIL HPLC DE TYPE AGILENT 1260.	65
<b>FIGURE 33:</b> UNE COLONNE CHIRALE DE TYPE ULTRON-ES-OVM OVUMUCOÏDE GREFFÉE.	66
<b>FIGURE 34:</b> DÉTECTEUR UV-VISIBLE À BARRETTES DE DIODES D'HPLC DE TYPE AGILENT 1260.	67
<b>FIGURE 35:</b> AUTO-ÉCHANTILLONNEUR D'HPLC DE TYPE AGILENT 1260.	67
<b>FIGURE 36:</b> DISPOSITIF DE FILTRATION SOUS VIDE.	68
<b>FIGURE 37:</b> BALANCE ANALYTIQUE SCALTEC. MODÈLE. SPB31.	69
<b>FIGURE 38:</b> FILTRE SERINGUE DE 0,22 µM EN POLYTÉTRAFLUOROÉTHYLENE, MARQUE ISOLAB.	69
<b>FIGURE 39:</b> PH MÈTRE DE TYPE HANNA.	69
<b>FIGURE 40:</b> CHROMATOGRAMME DE LA PHASE MOBILE (MeOH / KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 30/70%).	77
<b>FIGURE 41:</b> CHROMATOGRAMME DE L'IBUPROFÈNE EN UTILISANT UNE PHASE MOBILE CONSTITUÉE D'UNE SOLUTION AQUEUSE (MeOH / KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 30/70%) À TEMPÉRATURE AMBIANTE.	77
<b>FIGURE 42:</b> COURBE D'ÉTALONNAGE DU PREMIER ENANTIOMÈRE POUR LE DOSAGE DE L'IBUPROFÈNE PAR HPLC.	80
<b>FIGURE 43:</b> COURBE D'ÉTALONNAGE DU DEUXIÈME ENANTIOMÈRE POUR LE DOSAGE DE L'IBUPROFÈNE PAR HPLC.	82
<b>FIGURE 44:</b> PROFIL D'EXACTITUDE DE DEUX ENANTIOMÈRES DU L'IBUPROFÈNE.	86

## Liste des tableaux

<b>TABLEAU 1:</b> LA STRUCTURE CHIMIQUE DES DEUX ENANTIOMERE R ET S IBUPROFENE[8].	19
<b>TABLEAU 2:</b> DIFFERENTES IMPURETES DETECTEES DANS L'IBUPROFENE[17].	22
<b>TABLEAU 3:</b> SOLUBILITE DE L'IBUPROFENE DANS DES SOLVANTS ORGANIQUES[18].	22
<b>TABLEAU 4:</b> SOLUBILITE DE L'IBUPROFENE DANS DIFFERENTS MILIEUX DE DISSOLUTION A 37 °C[19].	23
<b>TABLEAU 5:</b> CARACTERISTIQUES PHYSIQUES DE L'IBUPROFENE[20].	24
<b>TABLEAU 6:</b> CARACTERISTIQUES CHIMIQUES DE L'IBUPROFENE[22].	24
<b>TABLEAU 7:</b> CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'IBUPROFENE[23].	24
<b>TABLEAU 8:</b> DONNEE CRISTALLOGRAPHIQUES SUR LA MAILLE D'IBUPROFENE[24].	25
<b>TABLEAU 9:</b> TYPE DE CHROMATOGRAPHIE SELON LA NATURE DE LA PHASE MOBILE ET PHASE STATIONNAIRE.	49
<b>TABLEAU 10 :</b> TYPE DE PRECISION D'UNE PROCEDURE ANALYTIQUE.	62
<b>TABLEAU 11:</b> LA VERRERIE ET LE MATERIEL UTILISES DANS CE PRESENT TRAVAIL SONT RESUMES DANS LE TABLEAU SUIVANT.	70
<b>TABLEAU 12:</b> PRINCIPE ACTIF IBUPROFENE.	70
<b>TABLEAU 13:</b> LES CONDITIONS OPTIMALES RETENUES LORS DE CETTE ETUDE SONT RESUMES.	76
<b>TABLEAU 14:</b> VARIATIONS DES SURFACES DE PICS DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE PREMIER ENANTIOMERE.	79
<b>TABLEAU 15:</b> VARIATIONS DES SURFACES DE PICS DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE DEUXIEME ENANTIOMERE.	81
<b>TABLEAU 16:</b> RESULTA DE LA PRECISION INTER-JOUR DE PREMIER ENANTIOMERE TESTEE PAR HPLC DES INJECTIONS REPETEES TROIS FOIS PENDENT SIX JOUR.	83
<b>TABLEAU 17:</b> RESULTA DE LA PRECISION INTER-JOUR DE DEUXIEME ENANTIOMERE TESTEE PAR HPLC DES INJECTIONS REPETEES TROIS FOIS PENDENT SIX JOUR.	84
<b>TABLEAU 18:</b> RESULTA DE LA PRECISION INTRA-JOUR TESTEE PAR HPLC DES INJECTIONS REPETEES DIX FOIS D'UNE CONCENTRATION 0.9 (MG/ML).	87
<b>TABLEAU 19:</b> DONNEE DE DEUX COURBE D'ETALONNAGE POUR CALCULEE LD ET LQ.	88
<b>TABLEAU 20:</b> LES RESULTATS DE LA LIMITE DE DETECTION ET DE QUANTIFICATION.	89
<b>TABLEAU 21:</b> TABLEAU REPRESENTANT LES RESULTATS DE TEMPS DE RETENTION A LA VARIATION DE LA TEMPERATURE ET DU DEBIT.	89

## **Liste des observations**

**HPLC** : Chromatographie Liquide Haute Performance

**CPG** : Chromatographie en Phase Gazeuse

**CMC** : Chromatographie sur Couche Mince

**IBF** : ibuprofène

**NSAIDs** : Médicaments anti-inflammatoires Non stéroïdien

**COX** : cyclooxygénase

**COA** : coenzyme A

**RMN** : résonance magnétique nucléaire

**CDs** : cyclo dextrines

**AGP** :  $\alpha$ 1-Acid Glycoprotéine

**ACN** : Acétonitrile

**MeOH** : méthanol

**pH** : Potentiel hydrogénation

**PS** : Phase stationnaire

**PM** : Phase mobile

**PMC** : Phase mobile chirale

**PSC** : Phase stationnaire chirale

**DAD** : Détecteur barrette de diode

**FDA** : Food and Drug Administration

**ICH** : Le Conseil International pour l'Harmonisation

**LQ** : Limite de quantification

**LD** : Limite de détection

**RSD** : Standard déviation relatif

# Introduction Générale

### Introduction générale

Les produits pharmaceutiques et les médicaments sont des préparations médicales fabriquées ou extraites des matériaux naturels et des cellules animales ou végétales utilisées dans la médecine moderne et traditionnelle, qui sont indispensables pour prévenir et traiter les maladies ainsi que pour protéger la santé publique.

L'utilisation des produits inefficaces de qualité inférieure ou dangereuse et toxique peut causer l'échec thérapeutique et créer des effets secondaires dans le corps humain. La plupart des médicaments sont commercialisés sous la forme d'un mélange racémique, lorsque l'ibuprofène est fabriqué et vendu sous forme de mélange racémique (S-ibuprofène et R-ibuprofène), avec S-IBF qui est responsable des propriétés pharmacologiques, et notamment l'efficacité en tant qu'anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique, et soit capable d'inhiber la cyclooxygénase (COX), est une enzyme clé impliquée dans la biosynthèse des prostanoides, y compris les prostaglandines, les prostacyclines et les thromboxanes, à partir de l'acide arachidonique, et l'autre énantiomère R-IBF et moins actif que son homologue S-IBF et Les deux énantiomères de l'ibuprofène sont donc différents en termes de propriétés pharmacologiques, et R-IBF n'est pas un inhibiteur de la COX [1].

Il existe plusieurs méthodes de purification et de quantification d'énantiomères des médicaments dans l'industrie pharmaceutique; la plus efficace, rapide, et puissante c'est la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Cette technique nous permet également de séparer les composés chiraux sur des phases stationnaires chirales ou après addition de réactifs chiraux à la phase mobile pour séparer et éliminer l'isomère indésirable [2].

Dans ce manuscrit, la première section se concentrera sur une étude bibliographique en trois chapitres, présentant les caractéristiques physico-chimiques et les propriétés pharmacocinétiques de l'ibuprofène, ainsi que l'importance de la reconnaissance chirale dans le contexte thérapeutique. Ensuite, nous aborderons de manière générale les fondements des différentes méthodes de chromatographie, avec la validation de la méthode de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) selon le document ICH.

Notre méthodologie expérimentale sera divisée en deux parties: la première décrira en détail les équipements et les méthodes employés, tandis que la seconde se penchera sur les résultats obtenus et les discussions qui en découlent. En conclusion, nous résumerons les principaux résultats de notre travail et mettrons en lumière leurs implications dans le contexte plus large de notre recherche.

# Chapitre I : Généralité sur l'ibuprofène



## I.1. Histoire

L'ibuprofène a été découvert pour la première fois par le pharmacologiste Adam Stewart le 19 décembre 1961 en Angleterre au niveau de département de recherche de Boots Pure Drug Company à Nottingham (UK), et celui qui a fabriqué le médicament était le regretté Dr John Nicholson et M. Colin Burrows.

L'ibuprofène est utilisé pour traiter les douleurs, les inflammations et la fièvre. Il a été employé comme l'aspirine et paracétamol ou indométhacine, mais l'ibuprofène est plus efficace que l'aspirine. Il est devenu un standard universel pour la comparaison dans les applications cliniques[3]. Il a été présenté au Comité de sécurité des médicaments (CSM) britannique pour faire soutenir l'argument en faveur de l'utilisation sans ordonnance de l'ibuprofène. Par la suite, une fois sa relative sécurité reconnue, il a été approuvé par les autorités britanniques en 1983 et aux États-Unis en 1984 pour une utilisation en vente libre à faible dose (1200 mg/jour)[3].

En 1969, l'ibuprofène a été mis sur le marché en tant que le premier médicament anti-inflammatoire non stéroïdien (NSAID) sous le nom de marque Brufen. Il a rapidement gagné en popularité en raison de son efficacité pour soulager la douleur, l'inflammation et la fièvre, ainsi que de son profil relativement sûr par rapport à d'autres AINS disponibles à l'époque[4].



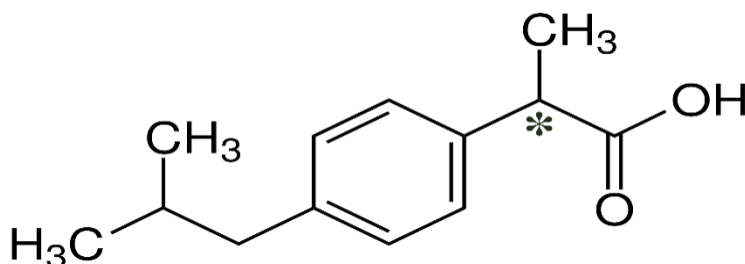
**Figure 1:** Photographie du Dr Stewart Adams prise en 1987[5].

## I.2. Définition

L'ibuprofène est un médicament anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique largement utilisé qui correspond à la classification de médicaments anti-inflammatoires non stéroïdien (NSAIDs), l'ibuprofène est une molécule relativement simple appelée acide (2RS)-2-[4-(2-méthylpropyl) phényle] propanoïque constituée d'un seul groupement fonctionnel (-COOH) et d'une partie hydrocarbonée inerte (hydrophobe) [-CH(CH<sub>3</sub>) C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]

[5]. L'ibuprofène est un AINS chiral de la classe des acides 2 arylpropioniques, chimiquement apparenté au fénoprofène et au naproxène, comme tous les AINS, exerce de nombreux effets indésirables gastro-intestinal et hématologiques nettement moins que les autres médicaments de la même famille elle est utilisé en médecine humaine pour traiter des maux de tête, des douleurs musculaires et menstruelles douloureuses, la fièvre et l'arthrite des études pharmacologiques ont indiqué que les problèmes gastro-intestinaux sont les effets secondaires les plus fréquents associés à la consommation de l'ibuprofène[6].

L'ibuprofène est sensible aux dégradations causées par l'oxydation et la photolyse, les quelles, via un mécanisme radicalaire, produisent divers composés. Il est crucial de noter que deux des produits de dégradation, la 4-isobutylacétophénone et le 1-[4-isobutylphényl]-1-éthanol, ont démontré des effets toxiques respectivement in vivo et in vitro. L'efficacité pharmacologique de ce médicament chiral est essentiellement due à l'énantiomère (S). En revanche, l'énantiomère (R) est considéré comme l'énantiomère indésirable, car il est fréquemment associé à des effets secondaires ou à une toxicité accrue. IBF est soluble dans l'eau uniquement en milieu alcalin ( $\text{NH}_3$  ou  $\text{NaOH}$ )[7].



**Figure 2:** Structure chimique de (RS)-ibuprofène[8].

### I.3. Stéréochimie

L'ibuprofène contient un atome de carbone asymétrique au niveau du groupement d'acide propanoïque d'une configuration (S) ou (R) ; seul l'énantiomère de configuration S de la molécule possède une activité médicamenteuse efficace. En effet, l'énantiomère R est trois fois moins puissant au niveau de l'organisme et peut être converti biologiquement. R-IBF vers S-IBF implique premièrement l'activation de R-(-)-ibuprofène avec ATP Mg pour former la dérivée AMP et ensuite l'estérification avec le coenzyme A par l'action de acyl-CoA synthétase, avec le coenzyme A (CoA) est une coenzyme de transfert de groupements acyle intervenant dans de très nombreuses voies du métabolisme. Le R-ibuprofène COA subit une épimérisation pour donner S-ibuprofène[9].

Tandis que l'énantiomère R-IBF est non toxique et inefficace et dont l'inversion chirale vers l'énantiomère S-IBF n'est pas instantanée, la résolution chirale continue de racémique IBF avec la formule ibuprofène (rac-Ibu). Il s'agit d'un processus important pour la production de S-ibuprofène (S-Ibu). Il utilise une technique de résolution chirale catalysée par voie enzymatique dans un réacteur à piston sous vide, permettant une séparation continue des particules nanométriques et réacteur enzymatique à membrane. Il fonctionne comme un réacteur agité en continu, utilisant des membranes pour faciliter le cyclage. Le développement de cette résolution chirale continue pour produire l'énantiomère unique S-Ibu, plus efficace, présente un grand intérêt[10].

**Tableau 1:** La structure chimique des deux énantiomère R et S ibuprofène[8].

R-ibuprofène	S-ibuprofène

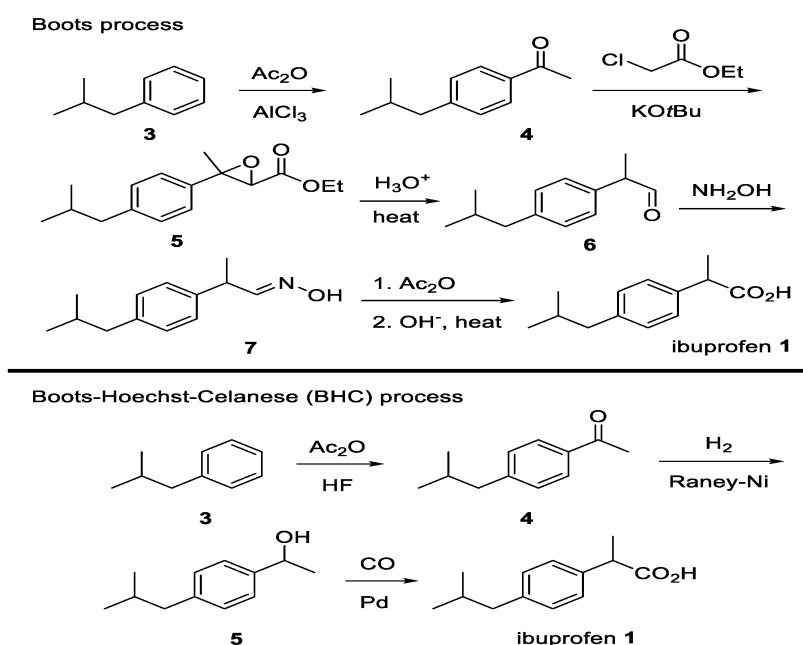
#### I.4. Synthèse classique de l'ibuprofène

La société Boots Pure Drug a développé l'ibuprofène en 1961, celui-ci était préparé en six étapes, alors elle a utilisé le chlorure d'aluminium toxique au stade précoce, cependant, en 1992, a été remplacé par le fluorure d'hydrogène recyclable comme alternative au chlorure d'aluminium par la société Hoechst[11]. La synthèse classique de l'ibuprofène en trois étapes suivante :

- **Alkylation:** Le processus commence par une réaction de Friedel-Crafts entre l'isobutylbenzène et l'acide acétique en présence d'un catalyseur tel que le chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ). Cette réaction produit le 4'-isobutylacétophénone.
- **Oxydation:** La 4'-isobutylacétophénone est ensuite oxydée pour former (l'acide 4'-isobutylphénylacétique), l'oxydation se fait généralement à l'aide d'un réactif tel que le permanganate de potassium ( $\text{KMnO}_4$ ).
- **Formation du cycle propionique:** L'étape suivante consiste à cycliser (l'acide 4'-isobutylphénylacétique) pour former l'ibuprofène. Cette étape utilise une réaction de Darzens (condensation de Darzens) suivie d'une hydrolyse pour former l'intermédiaire

époxyde, qui est ensuite réarrangé pour produire [l'acide 2-(4-isutylphényl) propionique (ibuprofène)][12].

Ce processus traditionnel en trois étapes a été remplacé par une méthode plus verte et plus efficace en utilisant un procédé catalytique, réduisant le nombre d'étapes et la quantité de déchets chimiques produisant et simplifier les étapes de production, optimiser les conditions de réaction, étendre les échelles de réaction et obtenir une sélectivité faciale. De plus, il est intéressant de noter que certains composés ont été créés pour illustrer de nouvelles méthodes de synthèse récemment mises au point[13].



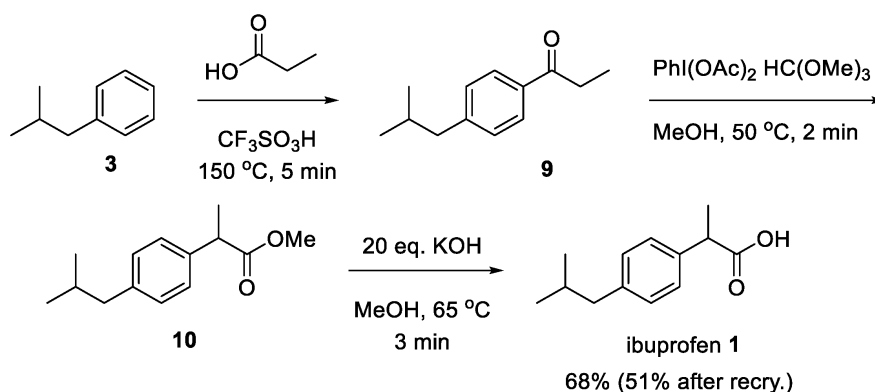
**Figure 3:** Synthèse classique de l'ibuprofène[13].

Après plusieurs années de fabrication d'ibuprofène de manière classique, un groupe de chercheurs a développé une méthode moderne de production d'ibuprofène par la synthèse en flux continu, par une réaction de migration des 1,2-aryles en utilisant l'iode comme médiateur, avec l'utilisation de l'acide trifluoro sulfonique comme catalyseur, remplaçant le chlorure d'aluminium traditionnel, afin d'éviter les sous-produits d'aluminium indésirables qui interfèrent avec les étapes ultérieures. Après une analyse minutieuse des conditions de réaction, la conversion de la cétone en ester méthylique a été réalisée efficacement. L'étape finale de saponification a permis d'obtenir l'ibuprofène sous forme solide[14].

La synthèse en flux continu est une méthode avancée utilisée pour la production de composés pharmaceutiques comme l'ibuprofène. Cette méthode présente plusieurs avantages par rapport à la synthèse traditionnelle en lots, notamment un meilleur contrôle des réactions,

une répétabilité améliorée, et une réduction des déchets chimiques. Voici une explication détaillée de la stratégie synthétique pour la synthèse en flux continu de l'ibuprofène :

- **Réaction de migration des 1,2-aryles :** Cette réaction est essentielle pour la formation de l'ibuprofène et est réalisée en flux continu en utilisant l'iode pour contrôler précisément la migration des 1,2-aryles, améliorant ainsi l'efficacité et la sélectivité de la réaction[14].
- **Utilisation d'un catalyseur avancé:** L'acide trifluoro méthane sulfonique est utilisé comme catalyseur. Ce catalyseur avancé permet d'éviter les sous-produits indésirables d'aluminium, qui pourraient nuire aux étapes suivantes du processus[14].
- **Conversion de la cétone en ester méthylique:** Cette étape implique la transformation de la cétone intermédiaire en ester méthylique. En conditions de flux continu.
- **Saponification:** La dernière étape de la synthèse consiste la saponification de l'ester méthylique pour obtenir l'ibuprofène sous forme de solide[14].



**Figure 4:** Stratégie synthétique pour la synthèse en flux continu de l'ibuprofène[13].

La synthèse en flux continu permet des avantages comme le contrôle rigoureux de la température, de la pression et du temps de réaction, ce qui améliore la reproductibilité et la qualité du produit final.

## I.5. Caractéristiques de l'ibuprofène

En raison des différentes méthodes de fabrication, l'ibuprofène laisse une sensation de brûlure dans la gorge lorsqu'il est pris. Il a un goût fort et distinctif et se présente sous la forme d'une poudre cristalline blanche[15]. Il peut contenir diverses impuretés dans le produit final, l'ibuprofène est faiblement soluble dans l'hexane, mais soluble dans la plupart des solvants organiques comme l'éthanol, octanol, diméthylsulfoxyde et chloroforme et relativement insoluble dans l'eau[16].

### I.5.1. Les caractéristiques physiques et chimiques de l'ibuprofène

Au cours des étapes de fabrication, plusieurs impuretés peuvent apparaître, notamment les réactifs, les solvants et les conditions de synthèse. Le tableau ci-dessous présente quelques impuretés courantes[17].

**Tableau 2:** Différentes impuretés détectées dans l'ibuprofène[17].

Impureté	Quantité (µg/g)
Acide 2-(4-méthylphényl) propanoïque *	Jusqu'à 100
2-(4-isobutylphényl) propioamide *	1000
Acide 2-(4-n-propylphényl) propanoïque *	* Jusqu'à 500
Acide 2-(3-isobutylphényl) propanoïque *	500
Acide 2-(4-n-butylphényl) propanoïque *	* Jusqu'à 500
Acide 2-hydroxy-2-(4-isobutyl phényl) propanoïque **	< 500
Acide 2-(3-isobutylphényl) propanoïque **	~ 600
Acide 2-(4-n-butylphényl) propanoïque **	3000
Acide di-isobutylisotropique **	< 500
1,3-di-(isobutylphényl) butane **	< 200
1,3-di-(isobutylphényl)-1-butanone **	< 200

La solubilité de l'ibuprofène est faible dans les environnements acides et augmente considérablement dans les milieux alcalins, ce qui permet une meilleure absorption et efficacité du médicament lorsqu'il atteint l'intestin, où le pH est plus élevé. Et fortement influencée par le pH du milieu environnant. En tant qu'acide faible, l'ibuprofène présente une caractéristique significative lorsque le pH augmente la solubilité augmente. Dans des conditions plus basiques (alcalines), l'ibuprofène se dissocie en sa forme ionisée, beaucoup plus soluble dans l'eau. Par exemple, dans des solutions tampon à pH 5.4 et 7.4, l'ibuprofène montre une solubilité nettement plus élevée en comparée à sa solubilité dans l'eau pure ou dans des milieux acides[18].

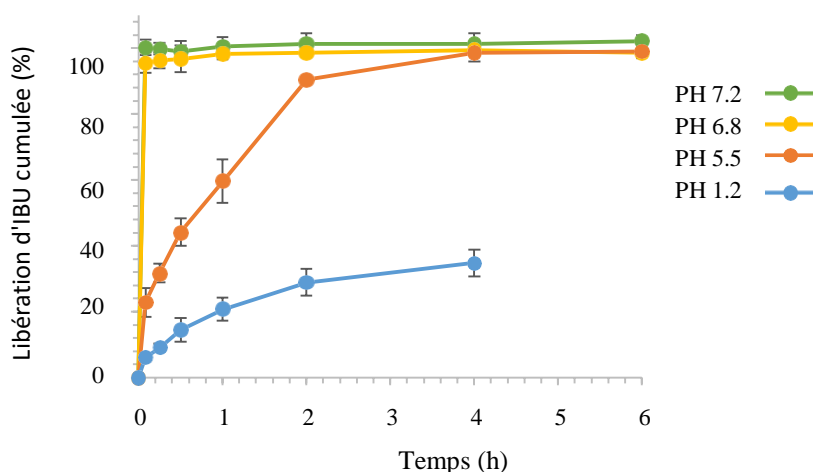
**Tableau 3:** Solubilité de l'ibuprofène dans des solvants organiques[18].

Solvant	Approximative à température ambiante (%)
Acétone	> 10
Ethanol	> 10
Octanol	33.0
Hexane	3,3
Eau distillée	< 0,1

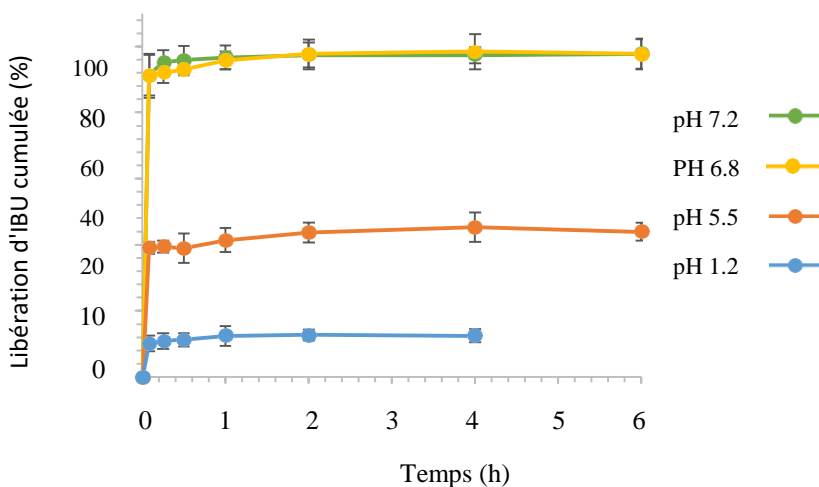
La solubilité de la poudre brute d'ibuprofène dans différents milieux a été étudiée à mesure que le taux de dissolution augmente avec l'augmentation du pH. Dans le milieu acide (pH 1,2), la fraction moléculaire d'IBU dissoute était d'environ 40% après 4 h, alors que dans des environnements à pH plus élevé, elle atteignait 100% dans le même temps[19].

**Tableau 4:** Solubilité de l'ibuprofène dans différents milieux de dissolution à 37 °C[19].

Milieu	pH	Solubilité (mg.L-1)
0,1 M de HCl	1.2	75,28 ± 4,39
Tampon phosphate 0,1 M	5.5	427,74 ± 6,60
Tampon phosphate 0,05 M	6.8	3071,32 ± 18,65
Tampon phosphate 0,05 M	7.2	4609,90 ± 45,84



**Figure 5:** Dissolution partielle de l'ibuprofène pur dans 0,1 M HCl à pH 1,2 et des tampons phosphate à pH 5,5 (0,1 M), pH 6,8 (0,05 M) et 7,2 (0,05 M) à 37 °C[19].



**Figure 6:** Libération d'ibuprofène des complexes VIBU dans 0,1 M HCl à pH 1,2 et tampons phosphate à pH 5,5 (0,1 M), pH 6,8 (0,05 M) et 7,2 (0,05 M) à 37 °C[19].

L'ibuprofène est disponible sous forme d'une poudre cristalline blanche non hygroscopique le tableau suivant résumé les différentes propriétés physiques de l'ibuprofène.

**Tableau 5:** Caractéristiques physiques de l'ibuprofène[20].

Catégories disponibles	IB25	IB38	IB50
Taille des particules ( $\mu\text{m}$ )	20-33	33-45	45-60
Densité volumique ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )	0,20-0,40	0,25-0,50	0,40-0,60
Densité tapée ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )	0,40-0,60	0,50-0,70	0,60-0,80

Les propriétés chimiques permettent à l'ibuprofène d'exercer un effet thérapeutique en inhibant les enzymes cyclo-oxygénases (COX), réduisant ainsi la production de prostaglandines responsables de l'inflammation, de la douleur et de la fièvre, Ces propriétés sont résumées dans le tableau suivant[21].

**Tableau 6:** Caractéristiques chimiques de l'ibuprofène[22].

Test	Caractéristique
Aspect en solution	Clair, non colorée
Rotation optique	-0,05 à 0,05°
Métaux lourds	Au maximum 10 $\mu\text{g}/\text{g}$
Perte à la dessiccation	Au maximum 5000 $\mu\text{g}/\text{g}$
Cendres sulfurique	Au maximum 1000 $\mu\text{g}/\text{g}$
Eau	Au maximum 1%
Quantité de 4-isobutyrylacétophenone*	Au maximum 1000( $\mu\text{g}/\text{g}$ )

### I.5.2. Caractéristiques physicochimiques de l'ibuprofène

La différence dans les points de fusion de deux énantiomères est importante, car elles peuvent affecter la formulation et l'efficacité du médicament. Par exemple, un point de fusion plus bas peut indiquer une meilleure solubilité, ce qui pourrait être bénéfique pour la biodisponibilité du médicament dans le corps. L'énantiomère S-IBF ont un point de fusion varie entre 47 et 54 °C, tandis que celui de R-IBF est légèrement plus élevé. Le composé racémique (mélange des deux isomères) possède un point de fusion plus élevé, entre (76 et 78 °C)[23].

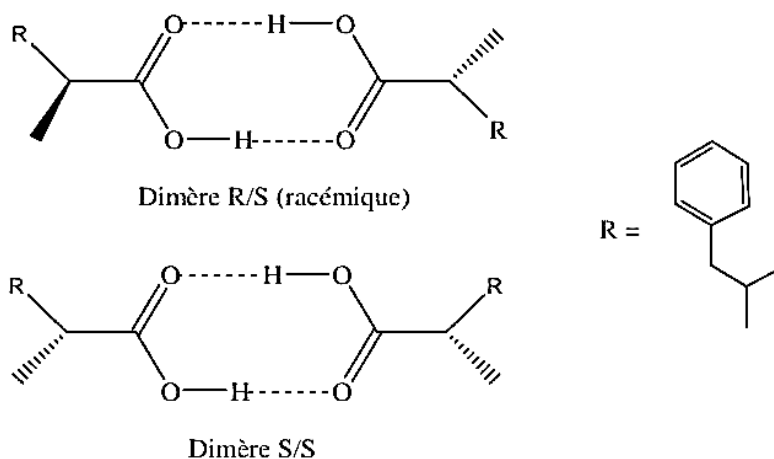
**Tableau 7:** Caractéristiques physico-chimiques de l'ibuprofène[23].

Masse molaire ( $\text{g}/\text{mol}$ )	$\lambda$ max (nm)	$\Delta H_{\text{fus}}$ ( $\text{kJ}/\text{mol}$ )	$\Delta H_{\text{sub}}$ ( $\text{kJ}/\text{mol}$ )	$\Delta H_{\text{vap}}$ ( $\text{kJ}/\text{mol}$ )	pka
206,27	200	25,5	121	42,7	5,2



### I.5.3. Caractéristiques cristallographiques de l'ibuprofène

Cristallisation de l'ibuprofène : Lorsque l'ibuprofène cristallise, il se rassemble sous forme d'unités appelées dimères cycliques grâce à la réaction de deux parties asymétriques par un pont hydrogène. La nature des molécules qui composent le dimère peut être différent, par exemple (S-R), ou de même nature(S-S) ou (R-R)[24].



**Figure 7:** Formation d'un dimère cyclique entre deux molécules d'Ibuprofène[24].

Le tableau suivant résume les caractéristiques cristallographiques de la maille des cristaux de l'ibuprofène

**Tableau 8:** Donnée cristallographiques sur la maille d'ibuprofène[24].

Type de réseau	Groupe spatial	Paramètres de maille	Volume de la maille	Nombre de motif /maille(Z)
Monoclinique	P21/c	a = 12,462 Å b = 8,035 Å c = 13,539 Å β = 112,89 °	1248,8 Å <sup>3</sup>	4

### I.6. Propriétés pharmacologie

L'ibuprofène est un médicament largement utilisé pour ses propriétés anti-inflammatoires, analgésiques (contre la douleur) et antipyrétiques (contre la fièvre). Il est utilisé pour traiter une variété de conditions inflammatoires, douloureuses et fébriles. Son mécanisme d'action implique une modulation de la réponse inflammatoire en inhibant la production de prostaglandines, des substances chimiques qui contribuent à la douleur, à l'inflammation, et à la fièvre. En bloquant spécifiquement l'activité de l'enzyme cyclo-oxygénase, l'ibuprofène

réduit la synthèse des prostaglandines, ce qui entraîne une diminution de l'inflammation, de la douleur, et de la fièvre[25].

### **I.6.1. La pharmacodynamie**

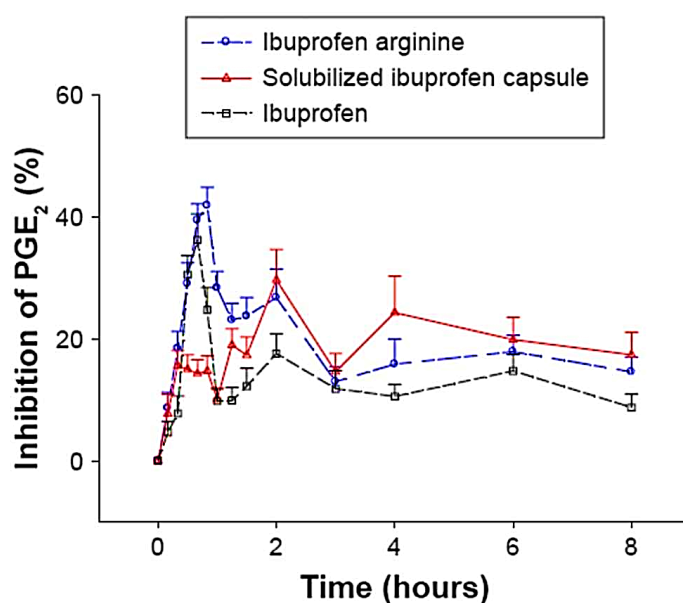
L'ibuprofène est un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS). Il se caractérise par ses propriétés analgésiques, antipyrétiques, anti-inflammatoires, et inhibitrices à court terme de la fonction plaquettaire. Ces propriétés inhibent la formation de prostaglandines par l'inhibition sélective de la cyclo-oxygénase. Il existe sous deux formes (COX-1) et (COX-2), le eicosanoïdes produits par la COX-1 protègent la muqueuse gastrique, régulent le débit de filtration glomérulaire et induisent l'agrégation plaquettaire, et la (COX-2) agit dans les cas d'inflammation et la douleur par la production de prostaglandines vasodilatatrices[26].

Parfois, l'isomère R-IBF peut être bio converti vers isomères S via la partie gastro-intestinale. La première étape c'est la formation de dérivée AMP, qui est ensuite estérifié par acylCoA synthétase en présence d'ATP (adénosine triphosphate) et de magnésium (Mg). Cette activation aboutit la formation d'un intermédiaire appelé R-(-)-ibuprofène-AMP (adénosine mono phosphate). Et ensuite hydrolysé pour former S-IBF[27].

Les propriétés pharmacologiques de deux énantiomères de l'ibuprofène sont différents, également différents en termes métaboliques; l'énantiomère R-IBF est incorporé au triglycéride avec les acides gras endogènes. Mais l'autre énantiomère S-IBF ne semble pas être impliqué dans ces réactions métaboliques [28], donc on considère l'énantiomère S-IBF métaboliquement plus propre que le mélange racémique. Lorsque l'ibuprofène racémique est administré, environ 40 à 60% de la forme R-IBF est métaboliquement bio converti en S-IBF, donc la dose S-IBF doit représenter environ 75% du mélange racémique pour une efficacité clinique optimale. Des études cliniques ont prouvé que la prise individuelle de 200 mg de S-IBF est supérieure ou au moins équivalente à 400 mg du mélange racémique pour soulager les douleurs[28].

En plus, l'ibuprofène possède des propriétés indépendantes, c'est l'inhibition des facteurs de transcription comme NF-kappa-B (NF-κB). Ce facteur de transcription joue un rôle crucial dans la réponse inflammatoire. Il régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'inflammation, la réponse immunitaire, et la survie cellulaire. L'ibuprofène inhibe l'activation de (NF-κB), empêchant ainsi ce facteur de transcription d'entrer dans le noyau des cellules et de déclencher la transcription des gènes pro-inflammatoires, ce qui peut conduire à une réduction de la douleur, de l'enflure et d'autres symptômes inflammatoires dans le corps[29].

D'après des études pharmacodynamie sur trois catégories de l'IBF, l'ibuprofène arginine et la capsule d'ibuprofène solubilisée et l'autre était un comprimé de formulation standard d'ibuprofène, L'inhibition de la synthèse de PGE<sub>2</sub> par les AINS reposait sur le blocage de la transformation de l'acide arachidonique médiée par la COX en thromboxane et en PG, entraînant des effets anti-inflammatoires, avec un mécanisme d'inhibition de la COX2 était dépendant du temps et irréversible, contrairement à l'inhibition instantanée et réversible de manière compétitive de la COX1, l'ibuprofène arginine possède un action plus rapide a fourni un (T<sub>max</sub>) plus court et une inhibition remarquable de la formation de PGE<sub>2</sub>. De plus, la capsule d'ibuprofène solubilisée a mieux inhibé la PGE<sub>2</sub> que l'ibuprofène standard[30].



**Figure 8:** Pourcentage d'inhibition de la production de (PGE<sub>2</sub>, prostaglandine E) par rapport aux niveaux de pré-dose (de base) après une administration orale unique de 200 mg d'ibuprofène selon trios différentes formulations 8 heures après le traitement[30].

## I.6.2. La pharmacocinétique

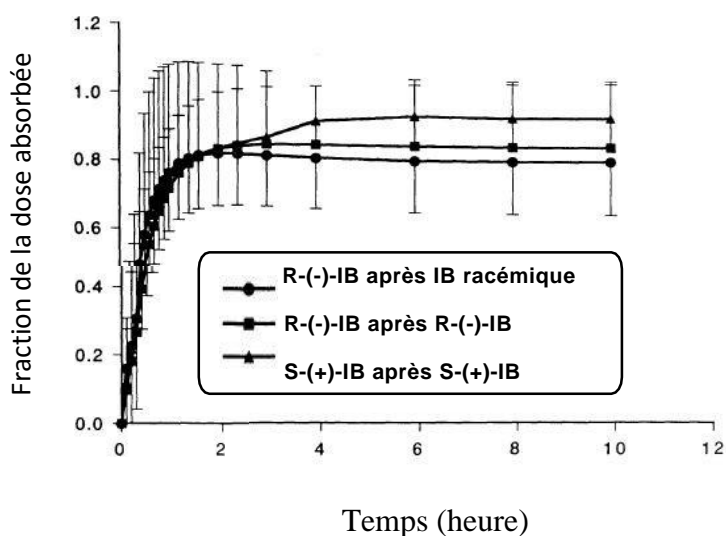
Après le devenir de l'ibuprofène dans le corps humain passant par des étapes et influencé par plusieurs facteurs tels que l'âge, le poids corporel et la présence de maladies hépatiques ou rénales, avec biodisponibilité systémique complète, et un taux d'absorption (T<sub>max</sub>) et (C<sub>max</sub>) dépend de la formulation utilisé[31].

### I.6.2.1. Absorption

L'absorption de l'ibuprofène il est rapide par la partie gastro-intestinal environ deux heure après l'avoir pris par voie orale et même aussi est absorbé par le rectum et la peau, S-Ibuprofène a produit une biodisponibilité plus élevée (92,0 %) que le mélange racémique (70,7 %), et la

biodisponibilité de l'autre énantiomères R-Ibuprofène égal (83,6 %) la biodisponibilité de la majorité des médicaments ça dépende de sa formulation[32].

Après l'administration orale, l'ibuprofène atteint des concentrations plasmatiques maximales ( $C_{max}$ ) généralement entre 1 et 2 heures pour les énantiomères R et S. Avec un effet nourriture peut retarder l'absorption de l'ibuprofène mais n'affecte pas de manière significative la quantité totale absorbée, ces caractéristiques permettent à l'ibuprofène de fournir un soulagement rapide et efficace de la douleur et de l'inflammation[33].



**Figure 9:** Profils d'absorptions cumulatives moyennes des énantiomères de l'IBF après une administration séparée de l'IBF racémique et de chaque énantiomère.

### I.6.2.2. Distribution

L'ibuprofène se caractérise par une liaison élevée aux protéines plasmatiques et un volume de distribution limité, selie principalement à l'albumine, une protéine abondante dans le plasma sanguin. Plus de 99% de l'ibuprofène circulant dans le sang est lié à ces protéines; cette forte liaison réduit la quantité de médicament libre (non lié) disponible pour traverser les membranes cellulaires et atteindre les tissus cible[34].

Et le volume de distribution limite ( $V_d$ ) est un paramètre pharmacocinétique qui indique dans quelle mesure un médicament se distribue dans les tissus par rapport au plasma. Sa distribution dans les tissus humains dépend de divers facteurs, notamment la biodisponibilité et la perfusion tissulaire principalement à l'albumine. Cette liaison protéique peut influencer la distribution et la libération[35]. Il existe des facteurs influençant la distribution comme l'impact de la liaison protéique qui peut influencer son efficacité thérapeutique, et autre facteur assurer

une bonne biodisponibilité, c'est la fraction de la dose administrée qui atteint la circulation systémique sous forme active, Les AINS passent dans le lait maternel à travers la barrière placentaire et plus ou moins rapidement à travers la barrière hémato-encéphalique.

### **I.6.2.3. Métabolisme**

L'ibuprofène subit une importante bioconversion énantiomérique, le foie métabolisant ce pourcentage en composés inactifs par hydroxylation ou l'oxydation de la chaîne iso butyle, puis en produisant des dérivés conjugués, il existe un polymorphisme d'acides aminés du cytochrome P 4502C9 (CYP2C9), une enzyme impliquée dans le métabolisme de plusieurs anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), tandis que 10 % sont excrétés sous forme inchangée[36].

Les principaux métabolites de l'ibuprofène sont l'acide propionique 2-[4-(2-carboxypropyl) phényle] et l'acide propionique 2-[4-(2-hydroxy-2méthylpropyle)]. On retrouve aussi d'autres métabolites comme le 1-hydroxy-ibuprofène, le 2-hydroxy ibuprofène, le 3-hydroxy-ibuprofène ou encore le carboxyibuprofène, au niveau du foie 70% de l'énantiomère (R) ibuprofène est converti en énantiomère (S)[37].

### **I.6.2.4. Elimination**

L'élimination de l'ibuprofène s'effectue par la biotransformation en métabolites conjugués glucuronides, qui sont ensuite excrétés dans l'urine. Une fraction minime du médicament est éliminée sous forme inchangée. La fonction rénale peut influencer l'excrétion des conjugués, et en cas d'insuffisance rénale terminale, une accumulation de ces conjugués peut se produire. Les maladies hépatiques et la mucoviscidose peuvent altérer la cinétique d'élimination de l'ibuprofène. Il est à noter que l'ibuprofène ne présente pas d'excrétion significative dans le lait maternel, Selon une étude comparant des individus âgés de 65 à 78 ans et des jeunes adultes de 22 à 35 ans, l'âge n'a pas d'impact sur la pharmacocinétique de ce médicament[37].

### **I.7. Effet indésirable**

L'ibuprofène provoque des nombreux effets secondaires indésirables tels que des saignements gastro-intestinaux, une dépression du système nerveux central, des troubles respiratoires et une insuffisance rénale aiguë, et nausées, vomissements, diarrhée, brûlures d'estomac, douleurs épigastriques, douleurs abdominales, dyspepsie, flatulences, constipation, hypertension, contractions myocardiques, agranulocytose, anémie, méningite aseptique, ainsi que des réactions anaphylactiques et cutanées[38]. Voici un aperçu détaillé de ces effets ;

**Effets digestifs :** L'ibuprofène peut causer des douleurs abdominales, des nausées, des vomissements, de la diarrhée, des flatulences, ainsi que des brûlures d'estomac et des ulcères

**Réactions allergiques :** Des réactions allergiques peuvent survenir, se manifestant par une gêne respiratoire, un gonflement du visage et du cou (angioœdème), et des éruptions cutanées

**Effets sur le système nerveux :** Des maux de tête, des étourdissements et une sensation de somnolence peuvent être observés chez certains utilisateurs

**Problèmes rénaux :** L'utilisation prolongée d'ibuprofène peut entraîner une altération de la fonction rénale, en particulier chez les patients présentant des facteurs de risque

**Effets cardiovasculaires :** Bien que plus rares, des œdèmes périphériques et des effets sur le cœur, comme l'aggravation de l'hypertension ou une augmentation du risque de crise cardiaque, peuvent se produire. Ces effets secondaires montrent l'importance de suivre les doses recommandées et de consulter un professionnel de santé en cas de doute ou de symptômes persistants.

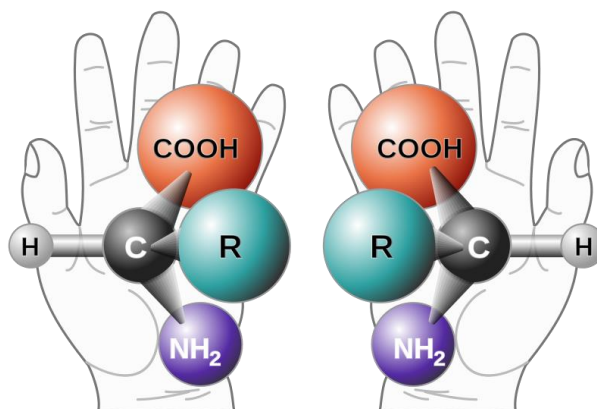
L'ibuprofène peut devenir toxique et mortel chez les humains dans le cas de surdosage, par exemple en prenant 10 grammes de l'ibuprofène. En général sa toxicité est faible lors de la prise de 100 mg/ Kg de poids corporel, alors que la dose la plus élevée de 400 mg/ Kg de poids corporel peut en provoquer des conséquences mortelles, il y a une faible risque chez les enfants fiévreuse dans certaines situations cliniques (varicelle, pneumonie, angine)[39].

**Chapitre II : chiralité,  
chromatographie chirale  
et chromatographie  
liquide à haut  
performance**

## Partie A : Chiralité et chromatographie chirale

### II.1. Chiralité et carbone asymétrique

La chiralité représente une caractéristique géométrique universelle présente dans divers domaines scientifiques tels que la physique, la chimie et la biologie, elle revêt une importance significative dans des domaines clés, notamment la dissymétrie matière-antimatière et l'origine de la vie, Le terme "chiralité" trouve son origine dans le grec χείρ, signifiant « main », pour appréhender cette propriété, il est utile de considérer les mains droite et gauche, En chimie, cela est souvent associé aux molécules chirales, qui existent sous deux formes non superposables appelées énantiomères. Cela a des implications importantes en pharmacologie, par exemple, où un énantiomère peut avoir des effets biologiques très différents de son énantiomère miroir[40].



**Figure 10:** Les deux énantiomères d'un acide aminé chiral.

Dans le cas des molécules organiques, si un atome de carbone possède quatre atomes ou groupes d'atomes tous différents, ce carbone est dit « asymétrique » et constitue un centre de chiralité. Ainsi une molécule chirale possède toujours au moins un carbone asymétrique. Ce carbone est toujours marqué d'une étoile pour le différencier des autres atomes de carbone[41].

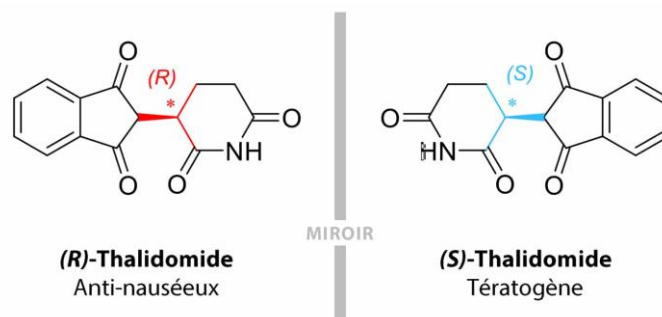
En pharmacologie de nombreux médicaments existent sous forme de deux énantiomères, c'est-à-dire de deux molécules qui sont des images miroirs l'une de l'autre et ne sont pas superposables. Ces deux formes peuvent avoir des effets très différents dans le corps humain. Par exemple, la thalidomide est tristement célèbre pour avoir eu des effets bénéfiques dans une de ses formes chirales (R) comme sédatif, alors que l'autre forme (S) provoquait des malformations congénitales lorsqu'il était administré aux femmes enceintes. L'importance de la chiralité dans les médicaments montre à quel point cette propriété moléculaire peut influencer la sécurité et l'efficacité des traitements, justifiant des recherches approfondies et des méthodes de production spécifiques pour les composés chiraux[41].



## II.2. Les énantiomères

En 1846, Faraday découvrit que l'activité optique pouvait être induite dans un échantillon autrement inactif par un champ magnétique. Il a observé la rotation optique dans une tige de verre borate de plomb placée entre les pôles d'un électroaimant avec des trous percés à travers les pièces polaires pour permettre le passage d'un faisceau lumineux polarisé linéairement. En 1848, Pasteur introduit le terme « dissymétrique » pour décrire des objets ayant une symétrie inversée comme une image dans un miroir. Il étend ce concept à d'autres domaines, erronément associant le champ magnétique à la dissymétrie moléculaire. Le terme « dissymétrie » est désormais remplacé par « chiralité », popularisé par Sir William Thomson[41].

Nous avons vu que tout objet dont l'image miroir n'est pas superposable à elle, ou en d'autres termes ne possède aucun élément de symétrie inverse, est chiral. Il existe sous la forme de deux isomères qui ont la même composition chimique et la même connectivité des atomes qui le constituent. Ces deux isomères sont appelés énantiomères. Les énantiomères ont les mêmes propriétés physiques, seulement par leurs propriétés vectorielles qui sont inversées et notamment leur capacité à faire tourner le plan de polarisation de la lumière. La rotation vers la droite correspond à l'isomère lévogyre (-)[42].



**Figure 11:** Structure des énantiomères de la thalidomide[43].

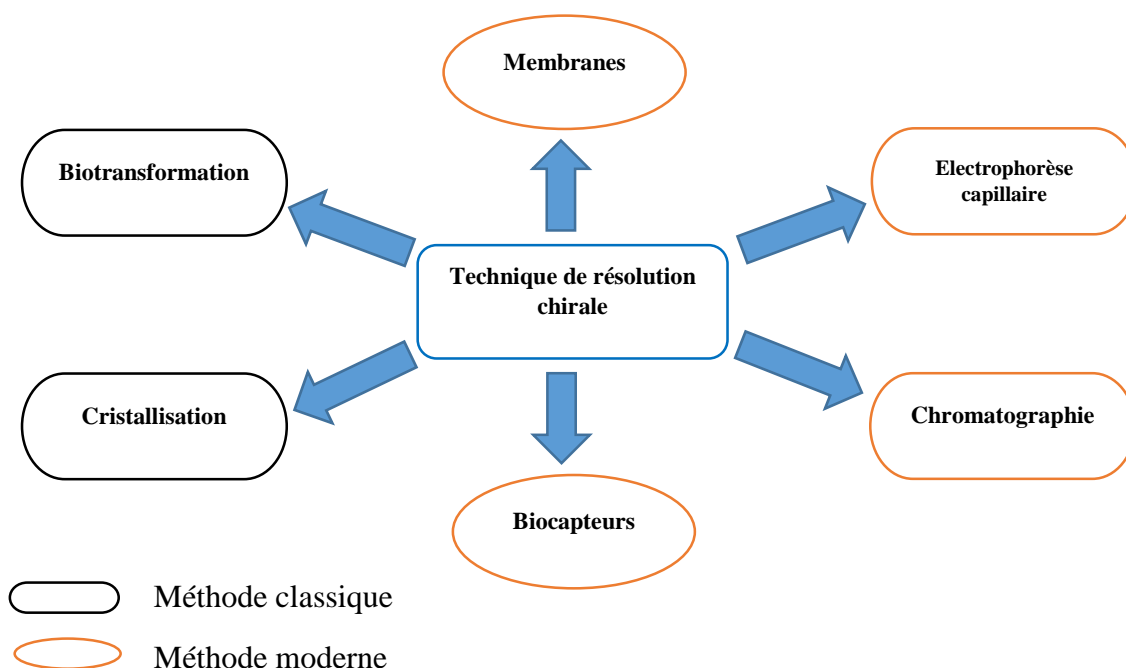
Les médicaments chiraux contiennent des molécules qui existent en deux formes non superposables appelées énantiomères. La synthèse des médicaments chiraux, utilise des catalyseurs ou des réactifs chiraux pour favoriser la formation d'un énantiomère spécifique. Les catalyseurs homogènes ou hétérogènes, souvent des complexes métalliques avec des ligands chiraux, appelé les synthés asymétrique[44]. Il existe des autres méthodes de synthèse comme la biocatalyse et il utiliser des enzymes ou des microorganismes pour catalyser des réactions chirales. Les enzymes peuvent être très spécifiques et efficaces dans la production de l'énantiomère désiré[45].

Ainsi, en raison des réglementations imposées par la FDA (Food and Drug Administration), il est devenu très compliqué, voire impossible, de commercialiser des molécules racémiques à des fins thérapeutiques. Depuis 1992, toute entreprise pharmaceutique désirant introduire un nouveau composé racémique sur le marché doit démontrer, séparément, les propriétés et caractéristiques de chaque énantiomère constituant ce composé racémique[44].

Afin d'éliminer l'isomère indésirable, le mélange racémique doit être analysé et séparé à l'aide de différentes méthodes de résolution chirale des énantiomères

### II.3. Les différentes méthodes de résolution chirale des énantiomères

Le développement de méthodes de résolution chirale est considéré comme un besoin urgent dans les industries pharmaceutique, agricole et chimique, le développement de nouveaux médicaments chiraux, nécessaires en raison des différentes propriétés physiologiques des énantiomères, est peut-être le plus essentiel, diverses approches de résolution chirale ont été développées et utilisées, mais la résolution directe par chromatographie liquide sur phases stationnaires chirales s'est avérée être l'une des plus efficaces et pratiques par à porte l'autre méthode comme la biotransformation et électrophorèse capillaire et la cristallisation sont des méthodes non chromatographie mais il y a plusieurs méthodes chromatographie comme (CPG, CMC, CPS) et en se concentrant sur la chromatographie liquide haute performance (HPLC) parce qu'il est plus efficace et économique[46].



**Figure 12:** Organigramme des différentes techniques de résolution chirale[46].

## II.4. Les méthodes non chromatographie

Elle ne dépend pas des colonnes de chromatographie mais utilisent plutôt d'autres principes pour discriminer entre les énantiomères, ces méthodes offrent des alternatives à la chromatographie pour la séparation chirale, chacune ayant ses avantages et ses limitations en fonction des propriétés spécifiques des composés à analyser comme la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN), et l'électrophorèse capillaire (CEC) utilisée en chromatographie pour séparer les espèces ioniques en fonction de leur charge et de leurs forces, et la spectroscopie infrarouge (IR).

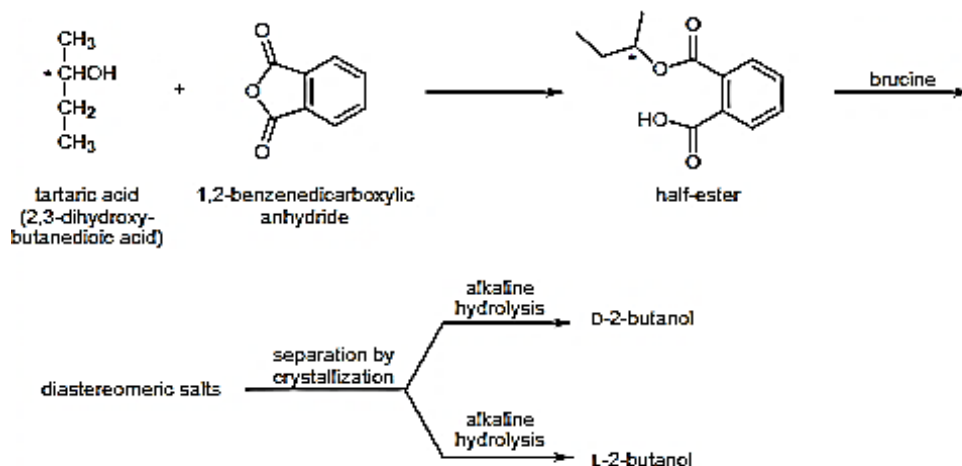
### II.4.1. La méthodes de biotransformation

La biotransformation se distingue en tant que méthode non chromatographique dans les séparations chirales, elle exploite des catalyseurs biologiques, tels que des enzymes, pour induire des transformations sélectives, facilitant ainsi la séparation des énantiomères, la biotransformation offre une approche spécifique et énantiosélective, permettant d'obtenir des produits hautement énantiomériquement enrichis, les enzymes les plus utilisées permettent de catalyser de hydrolyser les esters et les amides (estérases, lipases, peptidases), ou l'oxydation des alcools en cétones ou en aldéhydes[47]. Cette technique se caractérise par sa capacité à obtenir des produits de haute pureté, dans des conditions douces lors des réactions enzymatiques naturelles et elle est respectueuse de l'environnement pour éviter l'utilisation de réactifs chimiques toxiques[48].

### II.4.2. La cristallisations

La cristallisation dans la séparation chirale d'énantiomères est une technique utilisée pour séparer un mélange racémique en ses composants énantiomères, elle repose sur la formation de cristaux d'un dérivé dia stéréo-isomère, préalablement obtenu par la réaction du racémique avec un composé optiquement actif, en exploitant les différences de propriétés cristallines entre les dia stéréo-isomères, la cristallisation fractionnée permet de séparer les énantiomères, les cristaux enrichis en l'énantiomère souhaité sont obtenus, contribuant ainsi à la purification des composés chirales avec une haute sélectivité, cette méthode a été introduite par Louis Pasteur et demeure une approche cruciale en chimie asymétrique[49].

Les molécules racémiques peuvent produire différents types de cristaux en raison de leur chiralité. Si le cristallin contient des racémiques symétriquement réparties, il est dit heterochiral, appelé racémique, tandis qu'il est dit homochiral, il est dit conglomérat[50].



**Figure 13:** Mélanges racémiques et résolution des énantiomères par la méthode cristallisation.

La résolution chirale consiste à séparer les racémiques en leurs énantiomères en utilisant la méthode classique de cristallisation, qui inclut la transformation en dia stéréo-isomères et l'ensemencement chirale. De nouvelles techniques de cristallisation chirale continuent d'être développées. Lahav et ses collègues ont créé une méthode utilisant des additifs « sur mesure », pour la résolution cinétique des conglomerats. Ces additifs possèdent des structures moléculaires très proches de l'un des énantiomères des cristaux du substrat. Par conséquent, ces inhibiteurs s'adsorbent de manière stéréo sélective sur les surfaces de l'un des énantiomères, retardant ou empêchant sa croissance[50].

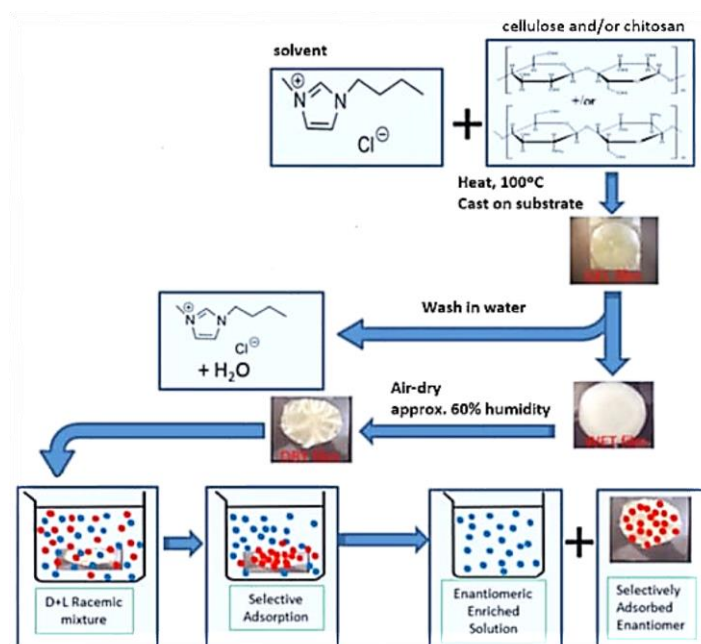
### II.4.3. Électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire sépare les énantiomères en exploitant leurs différences de mobilité électrophorétique dans un capillaire rempli d'électrolyte, les énantiomères interagissent distinctement avec une phase stationnaire chirale, telle qu'un polymère ou un dérivé de cyclo dextrine, à l'intérieur du capillaire, ce qui provoque leur séparation, bien que précise pour des composés spécifiques, cette méthode nécessite une optimisation des conditions expérimentales. Avec des avantages comme la rapidité d'analyses et une haute résolution permettant de distinguer des énantiomères très similaires, avec une consommation faible de réactifs. Cette technique nécessite de petites quantités des solvants et de réactifs, ce qui est économiquement avantageux et écologique. [51].

### II.4.4. Les membranes

Le premier travail décrivant l'application de la technologie membranaire pour la résolution énantiomérique a été rapporté par Cram et al. en 1980. Cette technologie été largement étudiée la séparation des énantiomères en raison de son facteur de séparation élevé

et de son flux de transfert de masse. Le principal avantage de ce type de membrane réside dans les coefficients de solubilité et de diffusivité des composés plus élevés dans un milieu liquide que dans une membrane solide[52]. Les membranes liquides peuvent être généralement divisées en trois catégories, à savoir la membrane liquide en émulsion, la membrane liquide en vrac et la membrane liquide sur support, est connue comme la combinaison de la technologie de séparation par membrane et d'extraction chirale, qui peut réaliser un processus efficace en temps réel pour extraire et récupérer les composés en une seule opération unitaire[53].



**Figure 14:** schéma représentatif de membranes chirales inhérentes contenant de la cellulose ou du chitosane[54].

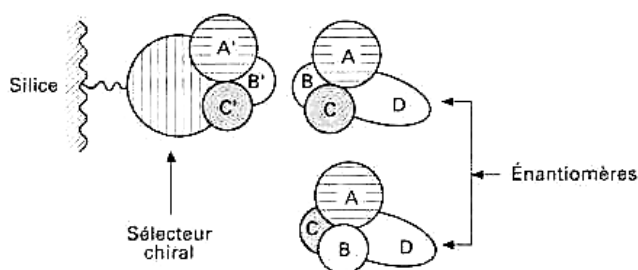
#### II.4.5. Les biocapteurs

Les biocapteurs sont des dispositifs analytiques qui combinent une composante biologique et un composant technologique pour détecter et mesurer des substances spécifiques, est constitué une membrane qui comprend une espèce d'origine biologique comme les enzymes, et les anticorps, ou récepteur. Ces éléments sont essentiels pour la reconnaissance moléculaire, c'est-à-dire qu'ils permettent d'identifier et de se lier spécifiquement à la substance cible (appelée ligand), et d'un transducteur chargé est responsable de convertir le signal biologique résultant de la liaison du ligand au récepteur en un signal physique. Ce signal peut être électrique, lumineux ou de toute autre nature physique comme signaux acoustiques (changement de fréquence des ondes acoustiques de surface), thermiques (changement de température), ou mécaniques (changement de masse ou de tension sur une surface sensible)[55].

## II.5. la chromatographie chirale

La chromatographie chirale est une technique analytique puissante utilisée pour séparer les énantiomères, qui sont des molécules ayant une structure chimique identique mais une configuration spatiale différente. Cette méthode joue un rôle crucial dans divers domaines, notamment en pharmacie, en chimie médicinale et en biochimie, où la distinction entre les énantiomères est essentielle en raison de leurs propriétés biologiques distinctes. Cette technique repose sur l'utilisation de phases stationnaires chirales qui interagissent sélectivement avec les énantiomères en raison de leurs différences stéréochimiques. Les molécules énantiomériques se séparent en fonction de leurs affinités respectives avec la phase stationnaire chirale, permettant ainsi leur analyse et leur purification[56].

La règle des trois points, proposée par Dalgliesh en 1952, est une théorie fondamentale en chimie organique qui explique la discrimination chirale lors de la formation de complexes diastéréoisomériques[57].



**Figure 15:** Modèle des trois points d'interaction selon Dalgliesh[58].

La discrimination chirale se produit lorsque des molécules chirales interagissent pour former des complexes diastéréoisomériques, c'est-à-dire des composés ayant la même formule moléculaire mais une disposition spatiale différente des atomes. Cette interaction est cruciale pour comprendre la sélectivité des réactions chimiques et la reconnaissance des énantiomères, selon la règle des trois points, la formation du complexe diastéréoisomérique implique au moins deux interactions attractives entre les molécules, telles que des liaisons hydrogène ou des interactions de Van der Waals, ainsi qu'une troisième interaction répulsive ou attractive. Ces interactions déterminent la stabilité du complexe formé. Lors de la formation du complexe, trois points d'ancrage sont établis entre les molécules chirales, résultant de leurs interactions spatiales spécifiques. Ces points d'ancrage définissent la géométrie du complexe et influencent sa stabilité[57].

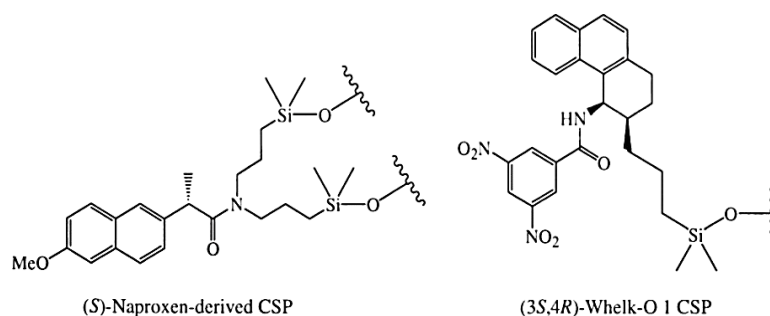
### II.5.1. Les phase stationnaire chirale

Les phases stationnaires chirales offrent une approche puissante pour la séparation énantiomérique, jouant un rôle essentiel dans divers domaines tels que la chimie pharmaceutique, la recherche médicale et l'industrie chimique, telles que la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) et la chromatographie en phase gazeuse (GC), voici quelques points clés sur les phases stationnaires chirales :

#### II.5.1.1. Les sélecteurs de type Pirkle :

Ce type des sélecteurs ont été développés par le chimiste américain William H. Pirkle en 1970, le principe de fonctionnement de cette sélecteurs basés sur la formation des liaisons hydrogène et présenté une caractéristique d'être simultanément donneurs ou accepteurs de liaisons hydrogène au niveau de la fonction amide[59].

Le principe de fonctionnement de cette sélecteurs basés sur la formation des liaisons hydrogène et présenté une caractéristique d'être simultanément accepteur d'électrons  $\pi$  (DNBPG ou (R)-3,5-dinitrobenzoyl phénylgylicine, Pirkle 1-J, Regis) sont plus utilisées dans le secteur pharmaceutique que celles à caractère donneur d'électrons  $\pi$  (( S ) ou ( R )-N-(2-naphtyl)alanine, Regis) car les molécules pharmaceutiques possèdent souvent des cycles aromatiques donneurs de la liaisons hydrogène au niveau de la fonction amide, ils exploitent les interactions entre les énantiomères et la phase stationnaire pour les séparer efficacement. Ils sont souvent utilisés en chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)[60].

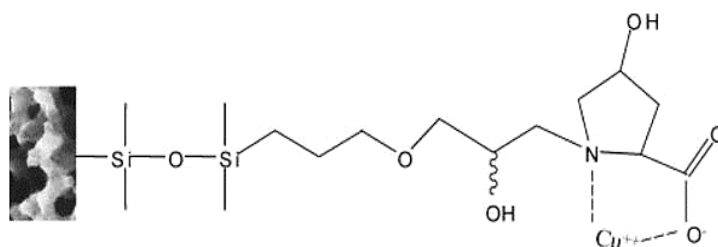


**Figure 16:** CSPs chirales complémentaires avec sélecteur de type Pirkle (Whelk-O-1 et par réciprocity (S)-naproxène[59].

#### II.5.1.2. Les échangeurs de ligands

Le principe de la chromatographie à échange de ligands a été décoré en 1960 par Davankov. cette technique de séparation basée sur la formation de complexes entre des métaux de transition , le plus souvent du cuivre, mais aussi d'autres métaux comme le cobalt ( $\text{Co}^{2+}$ ), le

zinc ( $Zn^{2+}$ ), et le nickel ( $Ni^{2+}$ ), qui est à la base d'un complexe entre un énantiomère et un sélecteur chiral. Le mécanisme de séparation est fondé sur la formation d'un complexe de trois composants ; le diastéréoisomérique ternaire entre un analyte, qui agit comme un donneur d'électrons, un métal de transition présentant des orbitales vacantes et un agent chélateur chiral, les ligands portent des groupes carboxylates, amines, amides, hydroxyles et thiols. Lors de la complexation avec le support sélecteur/ion métallique tel que  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ , des échanges de chélation avec d'autres ligands provenant de la phase mobile permettent d'assurer les séparations chirales[61].



**Figure 17:** Structure de la CSP échange de ligand à base de L-hydroxyproline greffée sur monolithe de silice

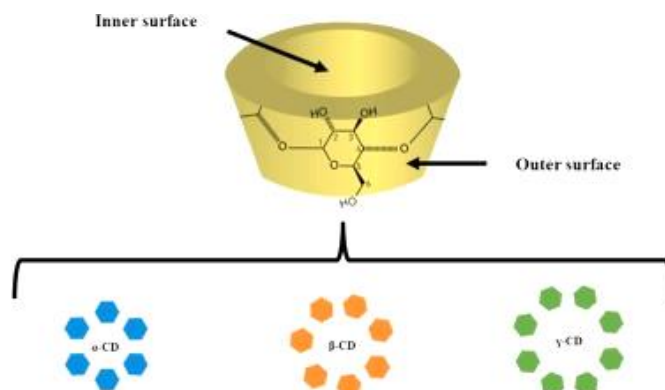
### II.5.1.3. Les cyclo dextrines

Les cyclodextrines comprennent une famille de trois produits industriels majeurs bien connus et de plusieurs rares oligosaccharides cycliques mineurs. Les trois principales cyclodextrines sont des substances cristallines, homogènes et non hygroscopiques, qui sont des macroanneaux en forme de tore, sont des macrocycles en forme de cône tronqué possédant une cavité aux propriétés hydrophobes de tailles variées selon le nombre (n) de motifs glucopyranose. Les principales cyclodextrines obtenues sont l' $\alpha$ -CD, la  $\beta$ -CD et la  $\gamma$ -CD, constituées respectivement de 6, 7 et 8 unités glucopyranoses[62].

La  $\beta$ -CD possède cependant de meilleures propriétés de reconnaissance chirale que ses deux sœurs ( $\alpha$ -CD et  $\gamma$ -CD), probablement en raison de son nombre impair de motifs plutôt que de sa taille. Parmi les propriétés remarquables des CDs, transparentes aux UV, hydrosolubles et efficaces dans la reconnaissance chirale, aussi bien dans un milieu aqueux que dans un milieu totalement organique, la cavité apolaire des CDs est occupée par des molécules d'eau, qui peuvent donc être facilement substituées par une molécule invitée appropriée, moins polaire que l'eau. Ces complexes sont formés par des liaisons hydrogène, des interactions de Van der Waals ou des interactions hydrophobes entre la molécule invitée et l'hôte, ce qui augmente la



stabilité chimique de la molécule, notamment en la protégeant contre l'hydrolyse, l'oxydation, la déshydratation et la photo décomposition[63].



**Figure 18:** la structure chimique des CD, avec un extérieur hydrophile et un intérieur hydrophobe. Selon leur nombre d'unités glucopyranose, ils peuvent être respectivement  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD et  $\gamma$ -CD.

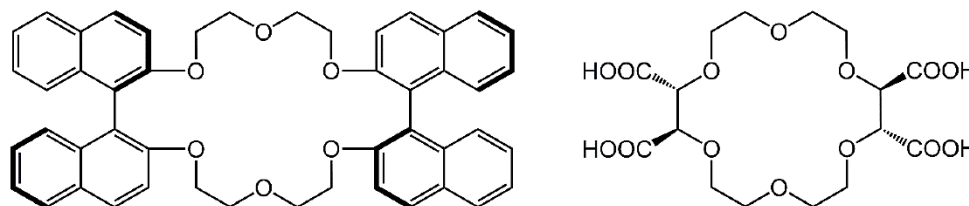
En effet, en milieux aqueux (phase inverse) on suppose que les principales interactions intervenant dans le mécanisme de reconnaissance chirale se déroulent dans la cavité des cônes tronqués. Avec ce type de phase stationnaire, on utilise une phase mobile constitué d'un mélange de phase aqueuse tamponnée associées à un modificateur organique (acétonitrile, alcools, diméthylformamide ou diméthylsulfoxyde), pour séparer les énantiomère des mélanges racémiques comme l'ibuprofène.

#### II.5.1.4. Les éthers-couronnes chiraux

Les éthers couronnes sont le plus souvent des dérivés de polyoxyéthylène (polyéther) cycliques, avec dix-huit atomes au total et six atomes d'oxygène, synthétisés en 1967 par Pedersen. À l'intérieur desquels peuvent se loger des ions, en particulier alcalins, selon leurs rayons, contiennent plusieurs atomes d'oxygène, peuvent former des complexes avec les ions alcalins et alcalino-terreux et les ions ammonium. Dans ces cas, l'ion central est placé dans l'anneau de la « couronne » du polyéther[64].

En 1979, Sogah et Cram ont été les premiers à signaler une séparation énantiosélective sur un CSP à base d'éther couronne lié à un squelette en polystyrène. Environ deux décennies plus tard, Hyun et ses collègues et Machida et al. ont décrit la synthèse et l'utilisation de phases stationnaires à base d'éther couronne chimiquement lié pour séparer les énantiomères de composés contenant un groupe amino primaire[65]. Les deux types d'éthers couronnes chiraux ont été fréquemment utilisés pour la préparation de CSP. L'un est dérivé du [bis-(1,1'-

binaphtyl)-22-couronne-6] et l'autre de [l'acide (18-couronne-6)-2, 3, 11,12-tétracarboxylique (18-C-6- TA)]. Leurs structures sont présentées dans la figure suivante.



**Figure 19:** Les structures de ( R,R )-bis-(1,1-binaphtyl)-22-couronne-6 ( à gauche ) et ( + )-(18-couronne-6)-2,3,11, Acide 12-tétracarboxylique ( à droite )[65].

L'ajout de chiralité à ces composés signifie que la molécule est asymétrique et ne peut être superposée à son image dans un miroir, et peuvent être employés dans des réactions énantiosélectives, où la stéréochimie (orientation spatiale des atomes) est cruciale pour obtenir un produit spécifique. La reconnaissance chirale implique la formation de liaisons hydrogène et d'interactions électrostatiques entre les hétéroatomes bordant la cavité de l'éther couronne et le groupement ammonium de la fonction amine primaire sur les CSP à base d'éthers couronnes chiraux incorporant une unité (1,1binaphtyle), avec une complexation tripodale des ions ammonium primaires ( $R-NH_3^+$ ) présente dans le composé chiral[66].

### II.5.1.5. Les antibiotiques macrocycliques

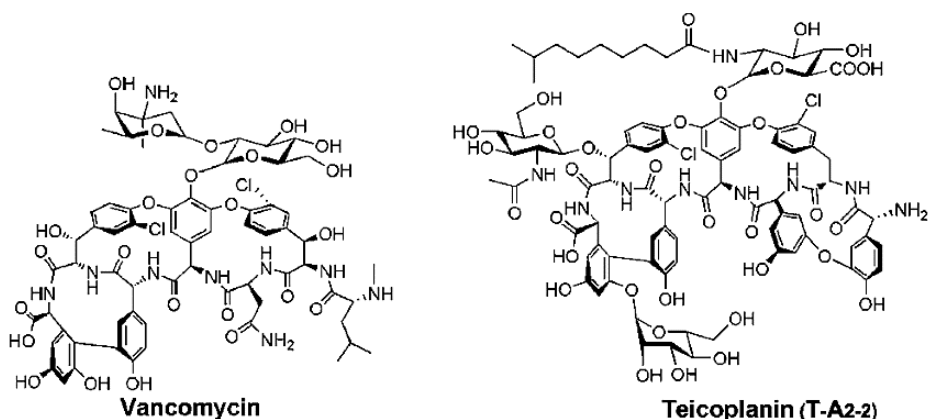
En 1994, Armstrong a introduit une nouvelle classe de sélecteurs chiraux à base d'antibiotiques macrocycliques en électrophorèse capillaire et en HPLC. Ce type d'antibiotiques macrocycliques est parfois utilisé en tant que sélecteurs chiraux dans les processus de séparation chirale. Ces composés présentent une structure en anneau de grande taille, ce qui leur confère une certaine capacité à former des complexes stables avec des molécules chirales[67].

La structure unique des glycopeptides macrocycliques et leur grande variété de sites interactifs (par exemple, poches hydrophobes, groupes hydroxyle, amino et carboxyle, atomes d'halogène, fragments aromatiques) expliquent leur large sélectivité et permettent de séparer une grande variété de composés énantiomères avec une bonne efficacité, une bonne capacité de chargement sur colonne, une reproductibilité élevée et une stabilité à long terme[68].

Le mécanisme de séparation chirale pour former des complexes diastéréoisomères non covalents transitoires avec des antibiotiques glycopeptides est basé sur des interactions électrostatiques ainsi que sur des interactions secondaires telles que les liaisons hydrophobes,

hydrogène, dipôle-dipôle, les interactions  $\pi$ - $\pi$  et la répulsion stérique. Dans lesquels la vancomycine et la teicoplanine sont les plus fréquemment utilisées et ont été appliquées avec succès à la HPLC ainsi qu'à la CEC pour la séparation chirale de composés d'intérêt pharmaceutique en utilisant des phases stationnaires emballées en mode phase inversée et phase normale[69].

Les sélecteurs les plus utilisés sont la vancomycine, la ristocétine et la teicoplanine, qui possèdent de nombreux centres stéréogéniques et de groupes fonctionnels, leur permettant d'avoir de multiples interactions avec des molécules chirales[70].



**Figure 20:** Sélecteurs chiraux glycopeptides, Vancomycine, Teicoplanine.

### II.5.1.6. Les protéines

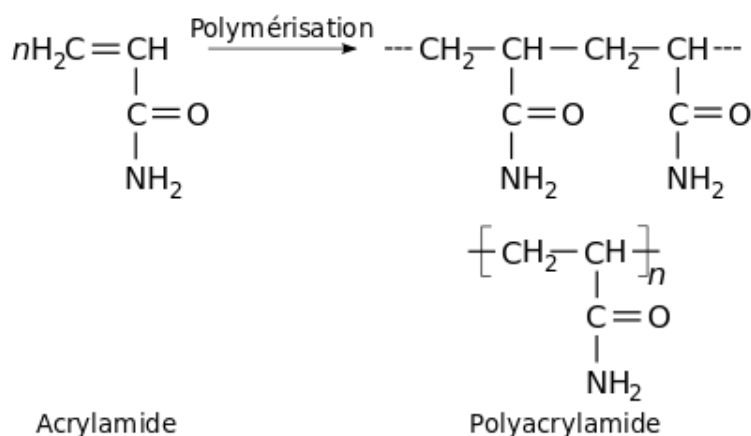
Les protéines sont des macromolécules biologiques composées d'acide aminé lié par des liaisons peptidiques, la diversité des protéines utilisées comme sélecteurs chiraux dans des applications de séparation chirale, quelque glycoprotéine [ $\alpha$ 1-acid glycoprotéine (AGP), albumine sérique humaine (HSA), cellulose tris (3,5-diméthylphénylcarbamate) (CDM)]. Chaque protéine offre une sélectivité spécifique envers certaines molécules, ce qui peut être exploité pour des séparations chirales précises[71]. Ce type de protéines est sensible à quelques paramètres comme la température, le pH et la force ionique. complique la reproduction de séparations chirales avec ces sélecteurs, malgré ces défis, les bio-macromolécules apparaissent comme des sélecteurs naturels idéaux pour réaliser l'énantioséparation d'une vaste gamme de solutés chiraux qui suscitent notre intérêt[72].

L'utilisation de phases stationnaires à base de protéines en chromatographie d'affinité haute performance offre une alternative prometteuse pour étudier la liaison des médicaments

aux protéines. Les colonnes HSA et AGP, initialement développées pour les résolutions chirales, sont remplies respectivement de sérumalbumine humaine et de glycoprotéine acide  $\alpha 1$  chimiquement immobilisées sur un squelette de silice. On utilise comme une phase mobile avec ce type de phase stationnaire chirale la solution aqueuse tamponnée, additionnée d'un modificateur organique (méthanol, éthanol)[73].

### II.5.1.7. Les polymères synthétiques

Des polymères synthétiques optiquement actifs peuvent être obtenus en greffant le sélecteur chiral sur les chaînes d'un polymère achiral, par réticulation avec de l'épichlorohydrine ou en copolymérisant des monomères organiques en présence d'un sélecteur chiral. Les polymères chiraux peuvent ainsi servir en tant que CSPs en HPLC et en CEC[74]. Ces polymères présentent des propriétés chirales grâce à l'incorporation de groupes chiraux spécifiques dans leur structure. Ces groupes confèrent aux polymères la capacité de discriminer entre les énantiomères, permettant ainsi la séparation de composés chiraux. Ils sont souvent utilisés dans des colonnes chromatographiques pour la séparation en phase liquide. Il est préparé par polymérisation de monomères chiraux et donnant un polymère réticulé d'une part (les dérivés de polyacryl- ou polyméthylacrylamide sont optiquement actifs) et sont des polymères optiquement actif[75].



**Figure 21:** Schéma de synthés de dérivés de polyacryl (polyméthylacrylamide) optiquement actifs.

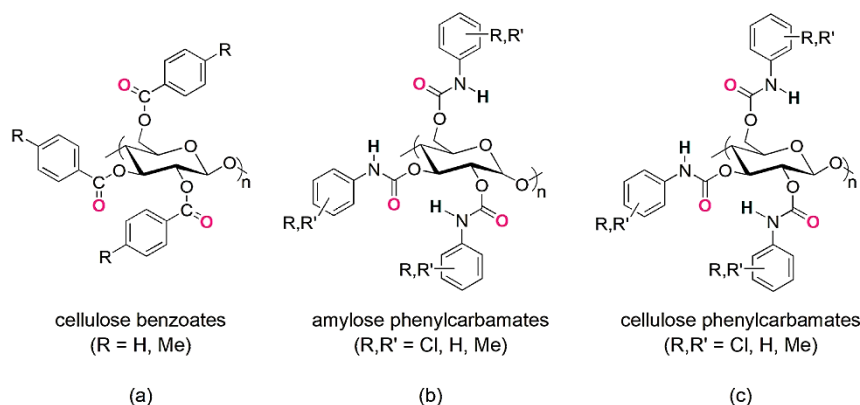
Les polymères synthétiques en tant que phases stationnaires chirales offrent des avantages significatifs en termes de sélectivité : ils peuvent être modifiés pour avoir des groupes fonctionnels spécifiques qui interagissent différemment avec les deux énantiomères d'un composé, améliorant ainsi la sélectivité de la séparation[76]. Ces polymères sont généralement très stables chimiquement, ce qui les rend adaptés à une utilisation répétée et à long terme dans

des conditions variées de chromatographie. Il est connu également par sa flexibilité et peut être conçu avec une grande variété de structures et une large gamme de compositions[77].

La phase mobile utilisée avec ces phases stationnaires chirales est généralement de type apolaire, comme un mélange d'hexane et de dioxane. Ce type de phase mobile favorise la sélectivité et l'efficacité de la séparation chirale en limitant les interactions non spécifiques avec les molécules chirales, permettant ainsi une résolution optimale des énantiomères.

### II.5.1.8. Les dérivés de polysaccharides

Les dérivés de polysaccharides sont fréquemment utilisés en tant que sélecteurs chiraux dans les techniques d'énantioséparation. Les polysaccharides, tels que la cellulose ou l'amylose, au début des années 1980, un groupe de scientifiques japonais a eu l'idée de les dériver afin d'améliorer leurs capacités de reconnaissance chirale, puis de les enduire sur un support de gel de silice. Ils sont modifiés chimiquement pour introduire des groupes chiraux. Ces dérivés de polysaccharides modifiés présentent une excellente capacité à discriminer entre les énantiomères, permettant ainsi la séparation de composés chiraux[78].



**Figure 22:** Structure des CSPs (a) cellulose-tris (3,5-diméthylphénylcarbamate), (b) amylose-tris (3,5-diméthylphénylcarbamate), et (c) cellulose-tris (4-méthylbenzoate)[79].

Les dérivés de cellulose les plus couramment utilisés en tant que phases stationnaires chirales comprennent la cellulose tris (3,5-diméthylphénylcarbamate) (CDMPC). Ces sélectrices celluloses agissent en tant que support solide pour la séparation des énantiomères, exploitant les interactions chirales entre les molécules cibles et la phase stationnaire. Les interactions peuvent inclure des liaisons hydrogène, des interactions dipôle-dipôle  $\pi$ - $\pi$ , et d'autres forces stéréochimiques spécifiques à la configuration spatiale des molécules[80].

Les phénylcarbamates de polysaccharides sont caractérisés par une structure modulaire composée de cinq régions pivots, chacune avec des fonctions spécifiques qui, lorsqu'elles sont combinées, contribuent de manière synergique à favoriser la reconnaissance des énantiomères d'un composé chiral[81]. Le squelette polysaccharidique comprend les régions stéréogéniques formées par des résidus D-glucopyranosyle liés par des liaisons  $\alpha$ - (amylose) ou  $\beta$ - (cellulose) (1,4)-glycosidique, il existe une région hydrophobe constituée de cycles aromatiques, qui peut exercer des interactions  $\pi - \pi$  et  $\pi - H$ . Les substituants (méthyle ou chlore), des groupes pendants phénylcarbamate agissent comme des modulateurs stéréoélectroniques envers les fragments carbamate, ayant un impact sur les performances des dérivés polysaccharides correspondants en tant que sélecteurs chiraux[82].

### II.5.2. Les phases mobiles chirale

Cette phase mobile chirale interagit avec les énantiomères présents dans l'échantillon, en complément des interactions avec la phase stationnaire chirale, facilitant ainsi la séparation des composés chiraux. Le choix de la phase mobile chirale dépend du type de sélecteur chiral utilisé dans la colonne stationnaire et des caractéristiques des énantiomères à séparer. La combinaison de la phase mobile chirale et de la phase stationnaire chirale dans la HPLC chirale permet d'optimiser la séparation des énantiomères, offrant une méthode puissante pour l'analyse des composés chiraux. On utilise des additifs, généralement les acides aminés. Si un réactif chiral capable de former un complexe (au sens le plus strict), une paire d'ions ou tout autre additif avec les énantiomères de l'échantillon est ajouté à la phase mobile, il y a une chance que les coefficients de distribution des diastéréomères formés entre les phases mobiles et stationnaires seront différents et, par conséquent, celles-ci peuvent être séparées sur une colonne HPLC[83].

L'avantage de cette méthode est que l'utilisateur peut sélectionner le composé qui semble le plus susceptible de produire une séparation parmi la large gamme de réactifs chiraux répertoriés dans les catalogues chimiques. Heureusement, tous les produits optiquement actifs ne sont pas chers et seules de petites quantités sont utilisées lors des tests préliminaires. Il n'y a aucune restriction sur le choix de la phase stationnaire et l'expérience en chromatographie non chirale constituera sans aucun doute la base de la sélection des éluants (l'option principale étant entre les variétés aqueuses et non aqueuses). Le réactif chiral ne doit pas nécessairement être optiquement pur (bien sûr, il n'y a pas de séparation s'il est racémique) et, s'il est disponible, le choix de l'antipode approprié permet d'obtenir l'ordre d'éluion privilégié[84].

## Partie B : chromatographie liquide à haute performance

### II.1. Définition

La chromatographie est une technique de séparation des composants d'un mélange, basée sur leurs différences d'interaction avec une phase stationnaire et une phase mobile. Elle est largement utilisée en chimie pour l'analyse et la purification de substances. C'est un terme d'origine grec : chromatós qui veut dire (couleur) et graphos (écrire).

### II.2. Histoire

En 1903-1906, Mikhaïl Semenovitch TSWEET (un chimiste russe) a développé la chromatographie pour séparer les pigments végétaux colorés (comme les chlorophylles et les caroténoïdes). Il a utilisé des colonnes remplies de carbonate de calcium pulvérisé et de l'éther de pétrole comme solvant. Ce processus a permis la formation de bandes colorées distinctes sur la colonne, ce qu'il a nommé chromatographie[85]. L'invention de la chromatographie s'est produite par Tsvet alors qu'il travaillait à Varsovie, en Pologne. Il prépara un extrait de feuilles et filtra cet extrait à travers un étroit tube de verre qu'il remplit de poudre de craie. Tsvet a été surpris par ce qu'il a observé. Il y avait des bandes distinctes des différents verts de chlorophylle et jaunes, rouges et oranges des caroténoïdes, au fur et à mesure que le liquide s'infiltrait à travers la colonne. C'était « comme les rayons lumineux dans un spectre ». Les pigments les moins fortement adsorbés migrent plus rapidement à travers la colonne et en ressortent successivement sous forme de substances relativement pures. Tsvet l'appelait un chromatogramme. Ces premières observations furent faites sur des pigments chlorophylliens, mais Tsvet se rendit compte que les phénomènes d'adsorption qu'il observait ne s'y limitaient pas du tout. Toutes sortes de composés chimiques colorés et incolores pourraient être soumis au même processus[86].

En 1941, Martin et Synge ont développé la chromatographie de partage et ont reçu le prix Nobel en 1952. D'après les travaux de Tswett ;

La chromatographie Introduit en laboratoire en 1930 par Richard Kuhn et Edgar Lederer pour purifier des substances, comme la lutéine du jaune d'œuf. Après l'introduction de la méthode dans les laboratoires, elle a été développée par plusieurs étapes :

En 1938, Reichstein a introduit la chromatographie liquide pour séparer des substances incolores.

En 1938, Ismailov et Shraiber ont développé la chromatographie sur couche mince (CMC).

En 1940, Samuelson et Walton ont découvert la chromatographie d'échange d'ions.

En 1952, James et Martin ont mis au point la chromatographie en phase gazeuse (CPG).

En 1965, Halász et Horváth ont découvert la chromatographie liquide haute performance (HPLC).

En 1972, Welch et Armstrong ont réalisé la première séparation chirale par HPLC.

Ces développements montrent l'évolution continue de la chromatographie, passant de la séparation de pigments végétaux à des techniques sophistiquées utilisées dans divers domaines scientifiques et industriels[86].

### **II.3. Principe**

Leur principe repose sur la séparation des composants d'un mélange en fonction de leur affinité avec une phase stationnaire et une phase mobile et la différence de vitesse de déplacement des composants d'un mélange à travers une phase stationnaire sous l'influence de la phase mobile. Cette différence de vitesse permet de séparer les composants en fonction de leurs propriétés physico-chimiques.

### **II.4. Classifications des méthodes chromatographie**

Les méthodes chromatographiques sont généralement classées en deux grandes catégories, qui peuvent être classées selon la nature des phases ou la nature des phénomènes de séparation ; chromatographie liquide (LC) ou chromatographie en phase gazeuse (GC). Outre ces méthodes, il existe deux autres modes qui utilisent une phase mobile liquide, mais la nature de son transport à travers la phase stationnaire poreuse se présente sous la forme soit de forces capillaires, comme en chromatographie planaire (également appelée couche mince de chromatographie, CCM), soit de flux électroosmotique, comme dans le cas de l'électrochromatographie capillaire (CEC).

#### **II.4.1. Classification selon la nature des phases**

- La chromatographie en phase gazeuse CPG.
- La chromatographie sur couche mince CCM.
- La chromatographie en phase liquide CPL.
- La chromatographie liquide à haute performance HPLC.
- La chromatographie en phase supercritique CPS



## II.4.2. Classification selon nature des phénomènes

- Chromatographie d'adsorption.
- Chromatographie de partage.
- Chromatographie ionique.
- Chromatographie d'exclusion.

## II.4.3. Selon la nature de la phase mobile

La chromatographie peut être classifiée selon la nature de la phase mobile utilisée. Voici les principales catégories dans le tableau suivant

**Tableau 9:** Type de chromatographie selon la nature de la phase mobile et phase stationnaire.

Type Chromatographie	Phase mobile	Phase stationnaire
Chromatographie en phase liquide (HPLC)	liquide	liquide
Chromatographie sur couche mince (CCM)	liquide	solide
Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	gaz	liquide ou solide
Chromatographie supercritique CPS	fluide supercritique	fluide supercritique

Chacune de ces méthodes offre des avantages spécifiques en fonction de la nature des échantillons à analyser et des informations souhaitées.

## II.5. La chromatographie liquide à haute performance HPLC

### II.5.1. Définition

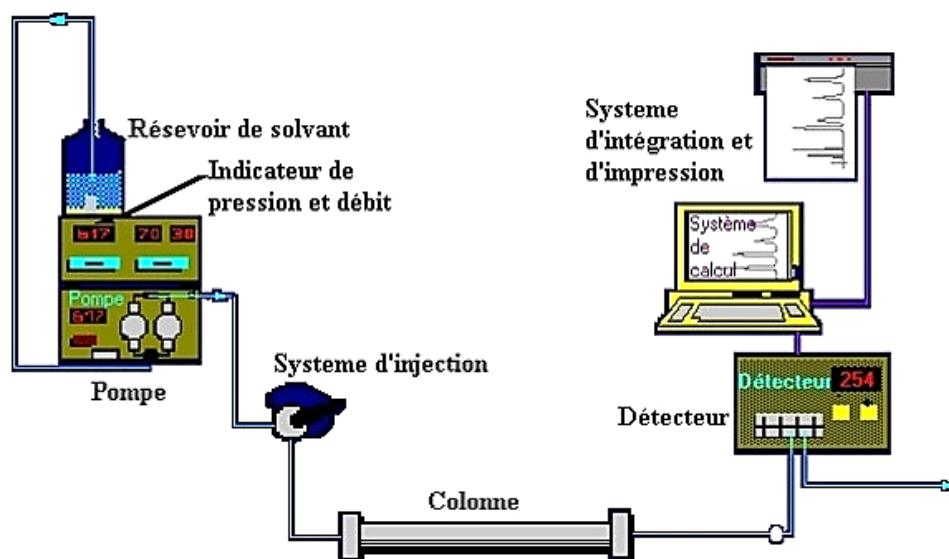
La chromatographie liquide haute pression est souvent appelée chromatographie liquide haute performance (les deux sont abrégées HPLC ou, simplement, LC) car elle offre des performances améliorées par rapport à la chromatographie liquide classique. La HPLC est la première technique d'analyse pharmaceutique, principalement utilisée dans l'industrie pharmaceutique pour une grande variété d'échantillons. Il s'agit de la méthode de choix pour vérifier la pureté des nouveaux médicaments candidats. C'est une technique d'analyse qualitative et quantitative qui permet l'identification et la purification et la séparation des composés chimiques chiraux ou non, puisque c'est une méthode essentielle pour les analyses de routine et la recherche scientifique en raison de sa précision, de sa sensibilité et de sa capacité à analyser des mélanges complexes, et aussi fiable à la fois dans différents domaines. L'HPLC est une méthode incontournable [87].

## II.5.2. Principe

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) sépare les composants d'un mélange en les faisant passer à travers une colonne remplie d'une phase stationnaire sous haute pression, ces composants interagissent différemment avec la phase stationnaire et sont détectés à la sortie de la colonne, la haute pression permet une séparation rapide et efficace, fournissant des résultats précis sur la composition du mélange, et les composés migrent dans la colonne à différentes vitesses et sur différentes durées, et après en représenté les substances qui sont séparer par des pics et sont appelées chromatogrammes liée avec une détecteur[88].

Les composés ayant une grande affinité avec la phase mobile dans la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ont tendance à se déplacer plus rapidement à travers la colonne de chromatographie. La phase mobile est le solvant ou le mélange de solvants qui transporte l'échantillon à travers la colonne. Il sera moins retenu par la phase stationnaire et sortira plus rapidement de la colonne.

Les composés ayant une grande affinité avec la phase stationnaire dans la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ont tendance à être plus retenus et à se déplacer plus lentement à travers la colonne de chromatographie. La phase stationnaire est le matériau immobilisé à l'intérieur de la colonne, et les composés interagissent différemment avec elle par des processus tels que l'adsorption, la distribution ou des interactions chimiques spécifiques. Il sera plus retenu, prolongeant son temps de rétention dans la colonne.



**Figure 23:** Schéma représenté le principe de fonctionnement d'une chaîne HPLC.

### II.5.3. Conception générale d'un appareil HPLC

Les appareils HPLC contiennent plusieurs composants essentiels pour assurer une séparation efficace des composants d'un échantillon liquide. L'ensemble de ces composants travaille en synergie pour permettre une séparation précise des composants d'un échantillon, offrant ainsi une analyse détaillée et quantitative des substances présentes. Voici une brève description de ces composants[89].

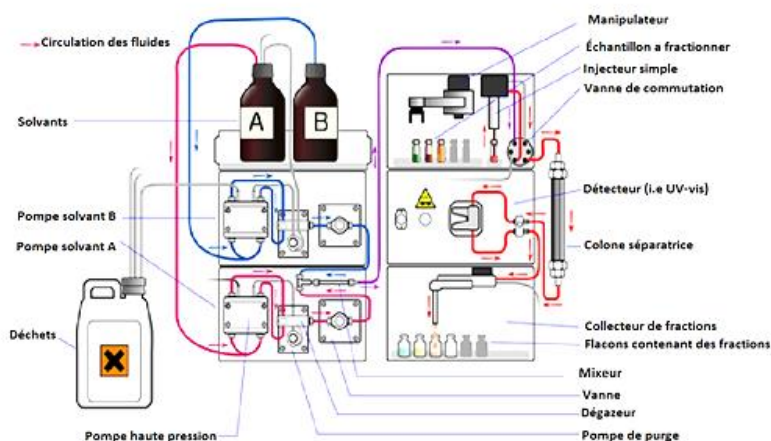


Figure 24: Conception générale d'un appareil HPLC.

#### II.5.3.1. Le réservoir de la phase mobile

Le réservoir de la phase mobile dans un système HPLC est l'endroit où est stockée la solution liquide utilisée comme solvant pour transporter l'échantillon à travers la colonne de séparation, l'appareil peut contenir plusieurs réservoirs en verre ou en acier inoxydable, qui contiennent plusieurs solvant de polarités différentes, également appelée éluant, qui peut être une combinaison d'eau, d'acétonitrile, de méthanol ou d'autres solvants, en fonction des exigences de l'analyse[87].

#### II.5.3.2. La phase mobile

La phase mobile en chromatographie liquide haute performance (HPLC) est le solvant ou le groupe de solvants utilisé pour déplacer l'échantillon à travers la colonne de séparation. La phase mobile est choisie en fonction des propriétés chimiques des composants à séparer. Il peut comprendre des solvants tels que l'eau, l'acétonitrile, le méthanol ou une combinaison de ceux-ci. La phase mobile doit être compatible avec le réactif utilisé et permettre une bonne séparation des composants de l'échantillon sur la colonne[90]. La polarité de la phase mobile affecte également la séparation des composants : il y a des phases mobiles plus polaires utilisées pour analyser les composés polaires, tandis que des phases mobiles moins polaires conviennent aux

composés moins polaires. Il est également nécessaire de maintenir la pureté de la phase mobile pour éviter toute contamination susceptible de perturber les résultats de l'analyse. On fait une filtration de la phase mobile par un filtre spécial (0,4  $\mu\text{m}$ ) pour éliminer les particules de taille supérieure à 0,45  $\mu\text{m}$  [91].

La stabilité de la phase mobile est essentielle pour garantir des résultats reproductibles. Les systèmes à vide peuvent être utilisés pour éliminer les gaz dissous dans la phase mobile[91].

### II.5.3.3. Les pompes

Les pompes HPLC jouent un rôle central dans le fonctionnement du système en assurant un mouvement continu de la phase mobile, contribuant ainsi à des résultats d'analyse fiables et répétables. Nous avons deux modes : le premier mode isocratique, on utilise un solvant constant dans le temps de séparation, le deuxième, c'est le mode gradient, on utilise un mélange de solvants de composition variable dans le temps pour améliorer la résolution d'un mélange[87].

Il existe plusieurs types de pompes utilisées en HPLC :

**Pompe à piston** : utilise un piston pour comprimer et déplacer la phase mobile. Elle offre un débit stable et précis, souvent utilisé dans les applications nécessitant une grande précision.

**Pompe à engrenages** : elle utilise des engrenages pour pousser la phase mobile à travers la colonne. Elle est souvent moins coûteuse que la pompe à piston, mais peut avoir un débit moins constant.

**Pompes quaternaires** : LPG (Low-Pressure Gradient) Ces pompes permettent de mélanger jusqu'à quatre solvants avant de les introduire dans le système HPLC, offrant ainsi une grande flexibilité pour les applications QA/QC (Assurance qualité/Contrôle qualité).



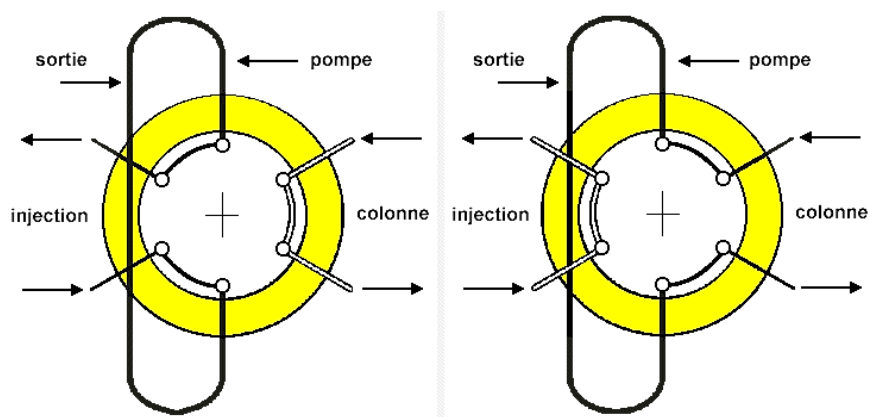
**Figure 25:** la pompe à piston de l'appareille HPLC.

### II.5.3.4. Les injecteurs

Les injecteurs d'un système HPLC sont chargés d'introduire avec précision des échantillons dans le flux de phase mobile, leur permettant d'être transportés à travers la colonne de séparation, Il existe deux principaux types d'injecteurs en HPLC ;

**Injecteurs à boucle constante:** délivrent des volumes d'échantillon prédéterminés à la colonne.

**Injecteur à anneau variable:** permet de varier le volume d'échantillon fourni, offrant une plus grande flexibilité[87], Actuellement, les systèmes HPLC modernes sont souvent équipés d'injecteurs automatiques, permettant une manipulation automatisée des échantillons et garantissant des injections répétées.



**Figure 26:** Schéma du fonctionnement de l'injecteur de HPLC.

### II.5.3.5. La colonne

La phase stationnaire en chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est le matériau immobilisé dans la colonne de chromatographie : c'est un tube en acier inoxydable de diamètre compris entre (4 et 20 mm) pour des longueurs généralement de (15 à 30 cm). Rempli de particules de silice hautement poreuses.

Les phases normales en HPLC sont caractérisées par une polarité élevée. Ce type de phases inclut des matériaux tels que la silice modifiée avec des groupes cyano, amino ou diol. Elles sont couramment utilisées pour séparer des composés organiques polaires[92].

**Les phases stationnaire inversée** en HPLC sont caractérisées par une polarité plus faible que la phase mobile ; cela signifie que cette phase retient mieux les composés apolaires et sont souvent constituées de silice modifiée avec des groupes alkyles, tels que C18 (octadécyl) ou C8 (octyle). Elles sont largement utilisées pour la séparation de composés organiques non polaires, tels que les médicaments, les lipides et les composés aromatiques[93].

Il existe des colonnes dites chirales et des colonnes achirales, le choix des colonnes dépend de la nature des substances à analyser ou à séparer dans un mélange;

**Les colonnes chirales** sont spécifiquement conçues pour séparer les énantiomères. Il est nécessaire d'utiliser une espèce chimique chirale qui ne contient qu'un seul type d'énantiomère consiste à combiner avec le mélange racémique, Cette méthode exploite les différences de propriétés entre les diastéréoisomères formées pour les séparer efficacement.

**Les colonnes achirales** sont utilisées pour séparer les composés qui ne présentent pas cette chiralité.



**Figure 27:** La gamme de colonnes C18 de Regis Technologies.

### II.5.3.6. Les détecteurs

Le détecteur positionné à la sortie de la colonne, associé à un intégrateur, permet de produire un graphique appelé chromatogramme. Ce détecteur envoie à l'intégrateur un signal stable (appelé ligne de base en présence uniquement du fluide porteur) qui varie avec le temps, reflétant le passage progressif des solutés. Le choix du détecteur dépend des caractéristiques des composés à analyser et des objectifs spécifiques de l'analyse. Certains détecteurs offrent une sensibilité accrue pour des classes spécifiques de composés, tandis que d'autres permettent une identification plus détaillée grâce à la spectrométrie, Voici quelques types de détecteurs :

**Détecteur UV-Visible :** Mesure l'absorption de la lumière par les composés. Les molécules absorbent la lumière UV ou visible, et l'intensité absorbée est utilisée pour quantifier les composés[94]. Il existe plusieurs types d'appareils :

Détecteur UV-Visible à longueur d'onde fixe  $\lambda=254$  nm.

Détecteur UV-Visible à longueurs d'onde variables : de 200 à 700 nm

Détecteur UV-Visible à barrette de diodes : qui donnent la valeur simultanée des intensités lumineuses sur tout le spectre (méthodes spectrales). Ces détecteurs sont particulièrement efficaces pour détecter les impuretés dans les matières premières pharmaceutiques.

**Détecte la fluorescence** : est particulièrement sensible et sélectif pour les composés qui présentent des propriétés fluorescentes. Il est souvent utilisé pour l'analyse de composés naturels, de médicaments et de produits chimiques environnementaux. L'avantage clé réside dans sa sensibilité accrue par rapport à d'autres détecteurs, ce qui permet la détection de composés à des concentrations plus faibles[95].

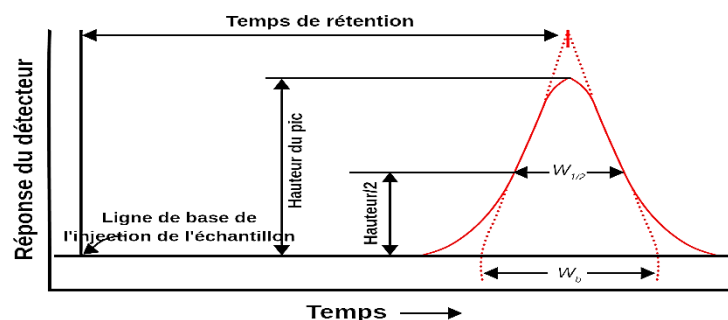
**Détecteur électrochimique** : Détecte les changements électrochimiques liés à la présence de composés électro actifs, tels que les composés redox ou certains neurotransmetteurs[96].



**Figure 28:** Détecteur à barrette de diodes Agilent 1260 Infinity.

#### II.5.4. Le chromatogramme

Le chromatogramme HPLC affiche l'intensité du signal (généralement détecté par un détecteur) en fonction du temps, chaque pic sur le chromatogramme représente un composant distinct de l'échantillon, avec sa propre rétention spécifique sur la colonne, les pics sont mesurés en termes de temps de rétention et d'aire sous la courbe, fournissant des informations sur la quantité relative et la pureté des composants, l'analyse du chromatogramme HPLC permet d'identifier les composants de l'échantillon, de déterminer leur concentration et de surveiller la pureté du produit[97], C'est une technique largement utilisée dans les domaines pharmaceutique, alimentaire et environnemental.



**Figure 29:** Exemple représente le chromatogramme obtenu par le détecteur.

# Chapitre III :

# La validation

# Analytique



La validation analytique est un processus essentiel dans le domaine de l'analyse scientifique, visant à démontrer la fiabilité, la précision et la performance d'une méthode d'analyse. Cela englobe diverses techniques utilisées pour évaluer la qualité des résultats. Nous avons choisi la validation de méthode analytique en chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), conformément aux lignes directrices du Comité international de l'harmonisation (ICH), qui est une étape cruciale dans l'assurance de la qualité des résultats analytiques.

Cette procédure rigoureuse vise à évaluer la performance et la fiabilité d'une méthode HPLC, garantissant ainsi sa validité pour des applications spécifiques. Les principaux paramètres examinés comprennent la précision, l'exactitude, la linéarité, la spécificité et la robustesse, assurant ainsi la conformité aux normes réglementaires et la production de données analytiques fiables et reproductibles.

### **III.1. Définition**

Selon la FDA (Food and Drug Administration), la validation est le processus de collecte et d'évaluation des données, par le biais de tests, afin de démontrer que les procédés, les systèmes et les méthodes sont capables de produire des résultats fiables et conformes aux spécifications préétablies. Ce concept s'applique largement dans l'industrie pharmaceutique et alimentaire pour assurer la qualité et la sécurité des produits[98].

Selon les normes ISO, y compris la norme ISO/IEC 17025 pour les laboratoires d'articles et d'analyses, repose sur un processus d'évaluation systématique pour garantir que les méthodes, processus et systèmes utilisés par un laboratoire sont appropriés, implémentables et conformes aux règles standards. Cela inclut la validation des méthodes analytiques, et les normes ISO doivent être respectées pour garantir la cohérence et la confiance dans les activités des laboratoires[99].

### **III.2. Aspect réglementaire et normatif**

**Documents ISO 17025** : les exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais et ISO 5725 exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure.

**Documents ICH Q2 (R1)** : validation of analytical procedures text and methodology (2005).

- ICH Q2A : texte sur la validation des procédures analytiques « définitions et terminologie » 1995.
- ICH Q2B : texte sur la validation des procédures analytiques « méthodologie » 1997.
- ICH Q2 (R1) validation des procédures analytiques : texte et méthodologie (2005).

**Documents de la FDA :** Validation of Bioanalytical Method (2001).

La commercialisation des médicaments est un processus réglementé visant à mettre des médicaments sur le marché et à les rendre disponibles pour les patients. Cela implique des étapes telles que la recherche et le développement, les essais cliniques, l'approbation réglementaire et enfin la distribution. Les autorités sanitaires, comme la FDA aux États-Unis ou l'EMA en Europe, jouent un rôle crucial dans l'évaluation de l'efficacité et de la sécurité des médicaments avant leur autorisation. Nous avons choisi de valider la méthode de séparation des énantiomères de IBF par la chromatographie liquide à haute performance selon la norme (ICH)[100].

### III.3. Objectifs de la validation

L'objectif principal de la validation des méthodes analytiques est d'assurer et garantir que chaque méthode utilisée est appropriée pour l'analyse prévue et qu'elle produit des résultats fiables et reproductibles et consistent à obtenir une estimation de la justesse et de la fidélité de la méthode, par rapport aux exigences réglementaires et normatives actuelles. Elle s'assure que chaque mesure effectuée respecte des critères d'acceptabilité spécifiques au type d'analyse et au produit analysé.

La validation des méthodes analytiques permet de garantir que les niveaux d'ingrédients actifs, ainsi que les impuretés potentiellement nocives, sont mesurés avec précision et maintenus dans des limites sûres pour garantir la sécurité des patients.

Il joue un rôle très important dans l'amélioration des processus de fabrication, car il fournit des données précises sur les composants du produit pharmaceutique. Cela permet aux fabricants d'optimiser leurs processus de fabrication, de contrôler la qualité des matières premières et des produits finis, ainsi que d'identifier et de résoudre rapidement les problèmes potentiels. Et permet d'éviter des erreurs coûteuses et des retards dans le développement et la fabrication de produits pharmaceutiques. Cela permet d'économiser du temps et des ressources.

### III.4. Validation des méthodes analytiques à l'industrie pharmaceutique

En 1985, l'industrie pharmaceutique et les autorités de réglementation des États-Unis et de l'Europe ont commencé à formaliser la validation des méthodes analytiques suivant les directives de l'ICH. Les directives ICH Q2(R1) sont un effort d'harmonisation entre les réglementations de l'Europe, des États-Unis et du Japon, impliquant aussi des représentants des industries pharmaceutiques de ces régions. En réponse à la croissance rapide du marché pharmaceutique mondial, la Conférence internationale sur l'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des produits pharmaceutiques à usage humain (ICH) a été conçue pour la première fois en 1990 lors d'une réunion organisée par la Fédération européenne des industries et associations pharmaceutiques (EFPIA) en fonction de validation de méthode analytique. Il existe quatre catégories principales de directives ICH, chaque catégorie est représentée par un code spécifique :

**Catégorie Qualité Code Q :** Cette catégorie regroupe les directives qui concernent les aspects de la qualité des produits pharmaceutiques, comme la pureté, la stabilité, et les tests de conformité[101].

**Catégorie Sécurité Code S :** Les directives sous ce code traitent des questions de sécurité pour les médicaments, y compris les études de toxicologie et les effets secondaires potentiels[102].

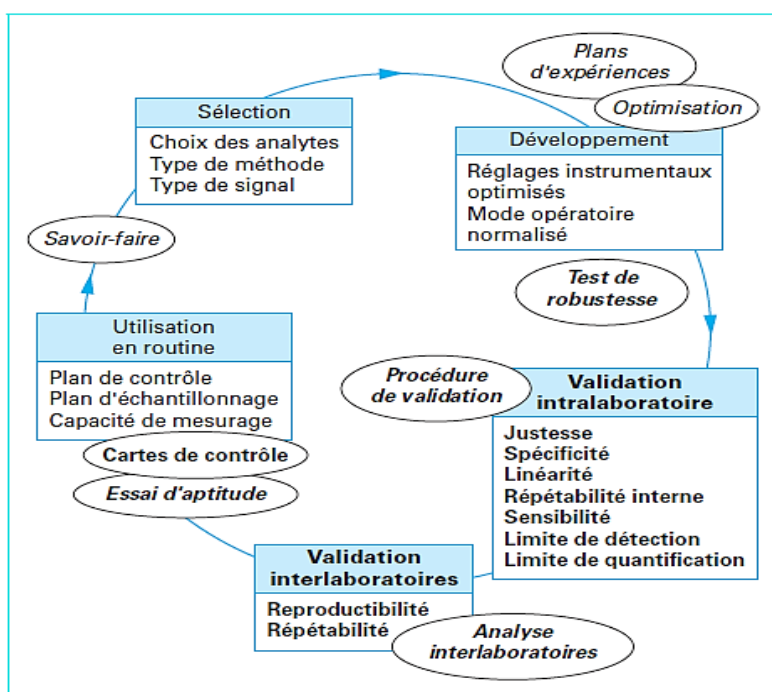
**Catégorie Efficacité, Performance Code E :** Cette catégorie inclut les directives relatives à l'efficacité et la performance des médicaments, telles que les études cliniques et les essais de performance[102].

**Catégorie Multidisciplinaire Code M :** Les directives multidisciplinaires couvrent des sujets qui ne tombent pas spécifiquement dans les autres catégories, comme les aspects réglementaires et les méthodologies diverses[102].

### III.5. Cycle de vie d'une méthode analytique

Le cycle de vie d'une méthode analytique comprend la conception, le développement, la validation (y compris la qualification instrumentale, la vérification continue des performances de la méthode et le transfert de la méthode) et la stratégie de contrôle (en routine). Il semble que les organismes de réglementation soient également plus sensibilisés à la gestion du cycle de vie des méthodes analytiques. Ainsi, le Conseil international pour l'harmonisation des exigences techniques relatives aux produits pharmaceutiques à usage humain (ICH), ainsi que le Forum pharmacopée des États-Unis, discutent de l'inscription de nouvelles lignes directrices

incluant la gestion du cycle de vie des méthodes analytiques[103]. L'objectif est d'aligner de manière globale la variabilité des méthodes sur les exigences du produit, ainsi que la confiance dans les données générées, une exigence réglementaire que l'industrie pharmaceutique doit respecter, les lignes directrices Q8, Q9, Q10, Q11 et Q12 du Conseil international pour l'harmonisation. Des exigences techniques pour les produits pharmaceutiques à usage humain (ICH) ont été discutées la gestion des risques et amélioration de la qualité des méthodes analytique à toutes les étapes de validation.



**Figure 30:** Critères et procédures de validation liés au cycle de vie.

### III.5. Critères de validation

Les critères de validation analytique sont des normes et des exigences établies pour s'assurer de la fiabilité, de la précision et de la reproductibilité des résultats obtenus par des méthodes d'analyse. Ces critères incluent généralement :

#### III.5.1. La spécificité / sélectivité

Une étude de spécificité doit être menée lors de la validation du test d'identification, de la détermination des impuretés et du test. Les procédures utilisées pour démontrer la spécificité dépendront de l'objectif visé de la procédure analytique. La sélectivité décrit la capacité de la méthode analytique à différencier diverses substances dans l'échantillon et s'applique aux méthodes dans lesquelles deux ou plusieurs composants sont séparés et quantifiés dans une

matrice complexe. Ainsi, le terme sélectivité est appliqué de manière appropriée aux techniques chromatographiques dans lesquelles les composants d'un mélange sont physiquement séparés les uns des autres[100].

### **III.5.2. Linéarité**

Il convient de déterminer s'il y a linéarité dans l'ensemble de l'écart d'utilisation de la méthode d'analyse. On peut démontrer l'existence d'une relation linéaire en appliquant la méthode proposée directement à la substance médicamenteuse (en diluant une solution-mère étalon) et en utilisant des portions pesées individuellement de mélanges synthétiques réunissant les composantes du produit fini[104].

Les paramètres de la courbe de régression peuvent donner une estimation mathématique du degré de linéarité. On détermine le coefficient de corrélation ( $R^2 = 0.999$ ), le point d'interception sur l'axe des ordonnées (y), la pente de la courbe de régression, ainsi que la somme des carrés des résidus, Il est recommandé d'utiliser au moins cinq concentrations pour la démonstration de la linéarité.

### **III.5.3. La précision**

La précision d'une procédure analytique exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion) entre une série de mesures obtenues à partir d'échantillonnages multiples du même échantillon homogène dans les conditions prescrites. La précision peut être considérée à trois niveaux : répétabilité, précision intermédiaire et reproductibilité. La précision doit être étudiée à l'aide d'échantillons homogènes et authentiques. Toutefois, s'il n'est pas possible d'obtenir un échantillon homogène, celui-ci peut être étudié à l'aide d'échantillons préparés artificiellement ou d'une solution échantillon. La précision d'une procédure analytique est généralement exprimée comme la variance, l'écart type ou le coefficient de variation d'une série de mesures[104].

#### **III.5.3.1. Répétabilité**

Elle est exprimée avec précision dans les mêmes conditions opératoires sur un court intervalle de temps. La répétabilité est également appelée précision intra-essai, et doit être évaluée par préparation au minimum de 9 déterminations couvrant la plage spécifiée pour la procédure (par exemple, 3 concentrations/3 répétitions chacune), ou bien un minimum de 6 déterminations à 100 % de la concentration d'essai[105].

### III.5.3.2. Précision intermédiaire

La précision intermédiaire exprime des variations au sein des laboratoires : différents jours, différents analystes, différents équipements mais dans des conditions contrôlées et reproductibles. Cela permet d'évaluer la fiabilité et la cohérence des résultats produits par une méthode analytique dans des conditions réelles d'utilisation au sein d'un laboratoire[105].

### III.5.3.3. Reproductibilité

La reproductibilité exprime la précision entre laboratoires (études collaboratives, généralement appliquées à la standardisation des méthodologies)[105].

**Tableau 10** : Type de précision d'une procédure analytique.

Type de précision	Echantillon	méthode	Laboratoire	Opérateur	équipements	Jour
Répétabilité	Même	Même	Même	Même	Même	Même
Précision intermédiaire	Même	Même	Même	diffèrent	diffèrent	diffèrent
Reproductibilité	Même	Même	diffèrent	diffèrent	diffèrent	diffèrent

### III.5.4. EXACTITUDE

L'exactitude correspond au degré de concordance entre la valeur de la méthode obtenue et la valeur de référence ou la valeur considérée comme véritable par convention. L'exactitude est aussi désignée l'authenticité.

### III.5.5. Limite de détection (LD)

La limite de détection d'une procédure analytique individuelle est la quantité la plus faible de l'analyte dans un échantillon qui peut être détecté, mais pas nécessairement quantifié de manière exacte. La limite de détection peut être déterminée par diverses méthodes, l'approche variant selon la méthode à valider fait intervenir ou non des instruments. Nous avons choisi la méthode de l'approche de l'écart-type de la réponse et de la pente de la courbe d'étalonnage, mais d'autres méthodes peuvent aussi être acceptables[106]. Elle peut être représentée par la formule suivante :

$$LD = \frac{3,3 \sigma}{p}$$

Avec ;  $\sigma$  = écart-type de la réponse

P = pente de la courbe d'étalonnage

### III.5.6. Limite de quantification (LQ)

La quantité la plus faible de l'analyte dans un échantillon qui peut être déterminée quantitativement avec une précision appropriée et la précision. La limite de quantification est un paramètre des essais quantitatifs pour les faibles niveaux de composés dans les matrices d'échantillons, et est utilisée en particulier pour la détermination des impuretés et/ou des produits de dégradation[104]. Est peut être représentée par la formule suivante :

$$LQ = \frac{10 \sigma}{p}$$

Avec ;  $\sigma$  = écart-type de la réponse

P = pente de la courbe d'étalonnage

### III.5.7. ROBUSTESSE

L'évaluation de la robustesse doit être prise en compte lors du développement et dépend du type de procédure étudiée. Il doit démontrer la fiabilité d'une analyse par rapport aux variations délibérées des paramètres de la méthode. Si les mesures sont sensibles aux variations des conditions analytiques, celles-ci doivent être convenablement contrôlées ou une mise en garde doit être incluse dans la procédure [106].

Dans le cas de la chromatographie liquide, Ilya des variations typiques sont :

- L'influence des variations de pH dans une phase mobile
- L'influence des variations de la composition des phases mobiles
- Différentes colonnes (différents lots et/ou fournisseurs), la température et le débit.

# Chapitre IV : Matérielle Et méthode



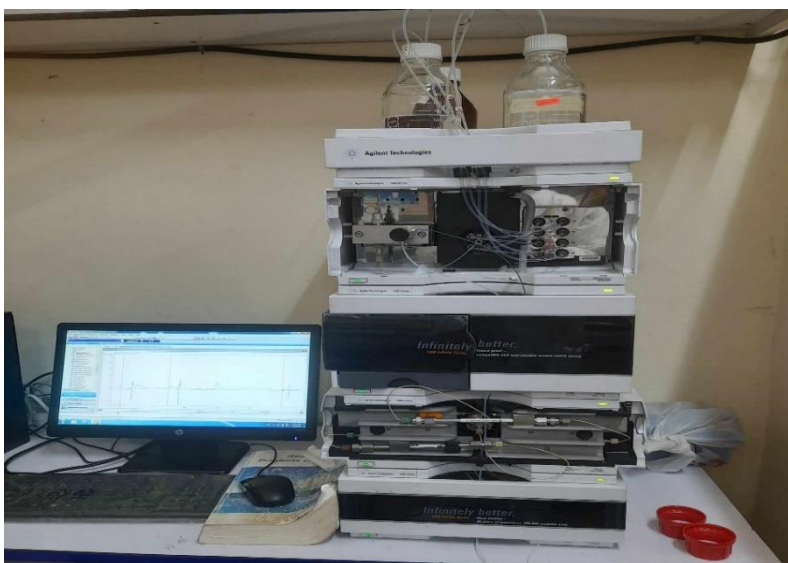
## IV.1. Matérielle

### IV.1.1. Appareillage

La conduite de ce travail a nécessité l'utilisation de différents matériels important :

- **Une chaîne HPLC de type Agilent Technologies**

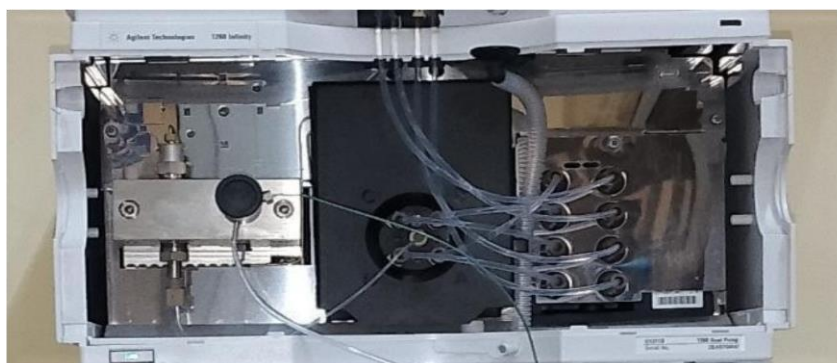
Série 1260 infinity quaternary constituée de Quatre réservoirs qui comportent des solvants ou des mélanges de solvants préalablement filtrés et dégazés.



**Figure 31:** chaîne HPLC de type Agilent Technologies, série 1260 infinity.

- **une pompe quaternaire**

Le modèle G1311B, référence DEAB706847 qui assure une circulation continue régulière de la phase mobile dans la colonne chirale. Elle permet d'obtenir des gradients par mélange sous basse pression instantanément.

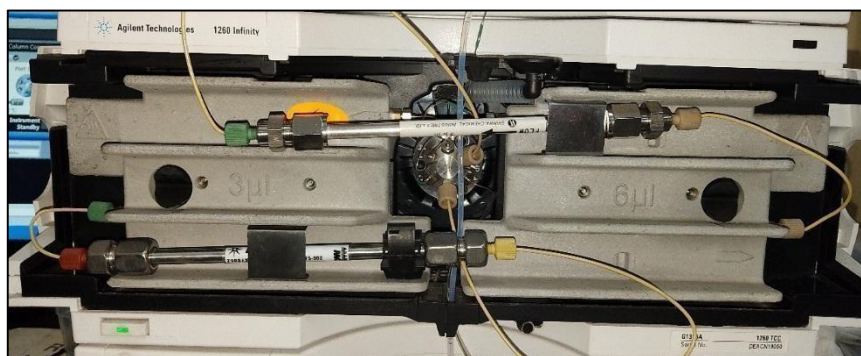


**Figure 32:** Pompe quaternaire de l'appareille HPLC De type Agilent 1260.

La pompe La pompe quaternaire est constituée d'un compartiment à solvants, d'un dégazeur à vide et d'une pompe à gradient à quatre voies. La pompe à gradient à quatre voies se compose d'une vanne proportionnelle rapide et d'un ensemble pompe. Elle permet d'obtenir des gradients par mélange sous basse pression. C'est pourquoi la pompe quaternaire comprend un dégazeur à vide Agilent Série 1200. Le compartiment à solvants peut recevoir jusqu'à quatre bouteilles d'un litre. Un accessoire de rinçage de joint en continu (optionnel) est disponible en cas d'utilisation de la pompe quaternaire avec des solutions tampons concentrées.

- **Une colonne chirale**

De type De type Ultron-ES-OVM Protéine ovumucoïde greffée ( $150 \times 4.6$  mm) sur silice de  $5 \mu\text{m}$  de diamètre, de porosité  $120 \text{ \AA}$ , caractérisée par un support de silice sphérique, le type de greffage assure une longue durée de vie. Elle reconnaît de nombreux sites chiraux et permet la séparation de gammes de composés. La stabilité du greffage permet l'utilisation d'une grande variété de phases mobiles : tampons pH 3 à 7,5 ainsi que solvants organiques (acétonitrile, méthanol, éthanol), permettant de travailler à des températures différentes de 20 à 40 °C.



**Figure 33:** Une colonne chirale de type Ultron-ES-OVM Ovumucoïde greffée.

Cette dernière figure (32) représente un compartiment de colonne thermostatée : chauffage et refroidissement par effet Peltie de 10 degrés au-dessous de la température ambiante à 80 °C du modèle G1316A, référence DEACN19050, contenant deux colonnes ; une colonne chirale de type Ultron-ES-OVM, et une autre colonne de la phase inversée.

La colonne de phase inversée utilisée dans l'appareil HPLC de type Agilent Technologies 1260 Infinity Quaternary, c'est une phase stationnaire hydrophobe (souvent C18) pour séparer les analytes sur la base de leur hydrophobicité, comme les composés non polaires à moyennement polaires.

- **Un détecteur UV-Visible à barrettes de diodes de modèle G1315B référence DEAX04258**

Les détecteurs à barrette de diodes donnent la lecture simultanée des intensités lumineuses à plusieurs longueurs d'onde, surtout le spectre, et permettent l'obtention de chromatogrammes en trois dimensions. Cela permet de capturer un spectre complet en une seule mesure, augmentant ainsi la rapidité et la précision des analyses.



**Figure 34:** Détecteur UV-Visible à barrettes de diodes d'HPLC De type Agilent 1260.

- **Auto-échantillonneur de modèle G1329B, référence DEAAC17482**

Leur rôle est d'automatiser le processus d'injection des échantillons dans le système HPLC, ce qui augmente l'efficacité et réduit le risque d'erreur humaine et d'assurer une injection précise et répétable, garantissant ainsi la fiabilité des résultats analytiques et de gérer un grand nombre d'échantillons, permettant des analyses continues sans intervention manuelle fréquente.



**Figure 35:** Auto-échantillonneur d'HPLC de type Agilent 1260.

Ce modèle est compatible avec une variété de flacons et de plaques d'échantillons, offrant une grande flexibilité pour différentes applications analytiques. L'auto échantillonneur G1329B est essentielle pour améliorer l'efficacité, la précision et la répétabilité des analyses HPLC, facilitant ainsi une gestion optimale des échantillons et une productivité accrue.

- **Dispositif de filtration**

Le dispositif de filtration maintient le filtre entre les rodages plans d'un support constitué d'une embase (à fritté ou à grille) et d'un entonnoir (ou « tulipe ») ; le tout est maintenu serré à l'aide d'une pince. Ce système est de mise en œuvre simple et rapide, et le remplacement du filtre est particulièrement facile, après chaque opération de filtration, nous changeons le papier filtre, Nous utilisons ce dispositif pour filtrer la phase mobile utilisée dans l'analyse HPLC.



**Figure 36:** Dispositif de filtration sous vide.

Le dispositif de filtration elle est composée de plusieurs pièces :

- un réservoir en verre, capacité de 250 ml, Supelco, référence 58063
- un flacon en fuseau en verre, capacité 1000 ml référence 58070U
- une pince pour immobiliser le réservoir et le flacon
- un tamis, référence 58053
- un joint d'étanchéité, référencé 58066
- une membrane en nylon ; 0.45  $\mu\text{m}$  X 47 mm de pore, Supelco, référence 58067
- une pompe à vide : VWR International GmbH, référence PM20405-86.

- **Balance Analytique**

SCALTEC. Modèle. SPB31, précision 0.1 mg illustrée, en t utilisé cette balance principalement dans laboratoire pour mesurer de petites quantités de masse avec une précision élevée.



**Figure 37:** Balance Analytique SCALTEC. Modèle. SPB31.

- **Filtre**
  - Les filtres de Whatman 150 mm, référence A015106-100 UNITS
  - Filtre seringue de 0,22  $\mu\text{m}$  en Polytetrafluoroethylene, marque ISOLAB



**Figure 38:** Filtre seringue de 0,22  $\mu\text{m}$  en Polytetrafluoroethylene, marque ISOLAB.

- **pH mètre**

Le pH mètres de type Hanna fournit des mesures précises et fiables du pH.



**Figure 39:** pH mètre de type hanna.

- **Verreries et autres**

**Tableau 11:** La verrerie et le matériel utilisés dans ce présent travail sont résumés dans le tableau suivant.

<b>Verreries</b>	<b>autres</b>
Fioles jaugées : 10 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml, 200 ml, 500 ml, 1000 ml.	Verre de montre
Pipettes graduées (Western Germany) 0.5ml, 1 ml, 5 ml, 10ml	Mortier et pilon
Béchers	Papier Filtre
Entonnoirs	Pissettes
Vials	Spatules
Erlenmeyers	Poire

#### IV.1.2. Réactifs

**Tableau 12:** Principe actif ibuprofène.

<b>Matière premier</b>	<b>Fournisseurs</b>
Standards : l'ibuprofène racémique (2RS) l'acide alpha-méthyl-[4- (2-méthylpropyl) phényl] propanoïque	Laboratoire Mirinal production pharmaceutique à Oude Smar Alger.

-L'acide ortho-phosphorique ( $H_3 PO_4$ ) de pureté (85 %)

-Potassium dihydrogèno-phosphate  $KH_2 PO_4$

-Hydroxyde de sodium NaOH

-L'eau distillée

#### IV.1.3. Solvants

-Méthanol : Chromosolv pour HPLC, Sigma-Aldrich, référence 5363C.

-Acétonitrile ou méthane nitrile ACN ( $C_2H_3N$ ) ( $\geq 99.8$  %) : pour HPLC grade, Biochem. Chemopharma, référence 6235A.

-Ethanol absolu 96%

-L'eau bidistillée

## **IV.2. Méthode**

### **IV.2.1. Méthodologie de la validation analytique**

Basée sur des exigences scientifiques et réglementaires, elle doit permettre d'évaluer les performances de la méthode par l'étude d'un certain nombre de paramètres appelés « critères de validation », et doit être étudiée la précision de la méthode et la linéarité et la robustesse, et la répétabilité et la reproductibilité.

### **IV.2.2. Choix du protocole de validation**

Le protocole que nous avons choisi est répondre au critère de validation défini par l'ICH 2005 Q2(R1), c'est un document sur la validation des procédures analytiques. Elle a été élaborée par le groupe de travail d'experts ICH approprié et a été soumise à la consultation des parties réglementaires, conformément au processus ICH. Elle est convenue par les trois organisations mondiales, l'Union européenne et le Japon et les États-Unis dans l'industrie pharmaceutique.

### **IV.2.4. Préparation de la solution standard (PA)**

On prépare une solution mère de concentration 1 mg/ml, on pèse exactement 100 mg de mélange racémique ibuprofène et on transmet cette quantité dans une fiole jauge de 100 ml, puis on verse de l'éthanol jusqu'au trait de jauge. On fait une agitation jusqu'à la dissolution totale de la poudre de principe actif. Après certain temps, on fait la filtration par papier filtre dans une autre fiole jauge de 100 ml à l'aide d'un entonnoir en verre.

### **IV.2.5. Préparation de la phase mobile**

On pèse exactement 6.87mg de potassium dihydrogèno phosphate  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et dissoudre cette quantité dans une fiole jauge de 1 litre puis ont versé de l'eau bi distillé jusqu'au trait de jauge avec une agitation jusqu'à la dissolution totale de la poudre dihydrogèno phosphate  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , et après on fait une opération de filtration en deux étape :

- Filtration par papier filtre dans une autre fiole jauge de 1 litre
- Filtration par Dispositif de filtration sous vide :

-Montage du système de filtration

-Mise en marche de la pompe à vide

-Déversement de la phase mobile dans le réservoir ; la pompe exerce une pression forcée qui permet au liquide de passer à travers la membrane filtre (diamètre pores 0,45 µm), cette dernière retient toutes les impuretés.

La phase mobile filtrée utilisée pour l'analyse HPLC.

Cette étape de filtration est primordiale pour l'analyse HPLC car elle permet d'éliminer toutes les impuretés présentes dans les solutions.

#### **IV.2.6. Préparation d'une série d'étalonnage**

Chaque jour, pendant 06 jours. A partir de la solution mère on prépare une gamme d'étalonnage de plusieurs niveaux de concentration allant de (0.01 mg/ml à 0.09 mg/ml) par la dilution de la solution mère de principe actif de l'ibuprofène de concentration 1mg/ml dans l'éthanol, on prend une fiole jauge de 10ml on prélève un volume spécifique afin de préparer une concentration spécifique puis on verse de l'éthanol jusqu'au trait de jauge avec une agitation on répète cette opération pour chaque concentration, puis à l'aide d'un filtre seringue 0,22 µm en Polytetrafluoroethylene, marque ISOLAB nous remplissons les vials et les mettons dans la carroucel qui sera introduit dans l'instrument HPLC.

Les solutions d'ibuprofène de concentration allant de 0,01 mg/ml à 0,9 mg/ml ont été injectées et analysées dans les conditions de chromatographie. Ces solutions sont analysées 2 fois pour chaque concentration. À partir des chromatogrammes obtenus, nous avons tracé la courbe de la variation de surface du pic en fonction de la concentration.

### **IV.3. Validation de la méthode**

La validation de la méthode basée sur un certain nombre de critères tels que la spécificité ou la sélectivité, la linéarité, la fidélité, l'exactitude, selon les directives du guideline Q2(R1) de l'Internationale Conférence sur l'Harmonisation (ICH) (ICH 2005-b, ICH 1996).

#### ➤ La spécificité ou (sélectivité)

La spécificité (ou sélectivité) d'une méthode analytique est la capacité de démontrer que le signal observé provient uniquement du composé cible, sans aucune interférence de la matrice environnante (comme les excipients, les produits de dégradation ou les impuretés). Pour cela, la sélectivité de la méthode a été vérifiée en injectant séparément le diluant (blanc). Après s'être



assuré qu'aucune forme n'est obtenue dans le chromatogramme, nous injectons un tube vial d'ibuprofène de concentration 1 mg/ml.

➤ La linéarité

Le but de ce critère est d'apporter la preuve que les résultats obtenus dans l'intervalle de mesure considéré sont directement proportionnels à la concentration (quantité) et de définir si cette méthode est linéaire sur des domaines de dosage prédéfinis selon ICH.

On réalise une étude sur le standard (PA seul) = gamme standard.

Concernant le protocole d'étude de la linéarité, on se réfère à ICH qui demande au minimum de travailler sur Cinq concentrations réparties sur l'intervalle d'étude (80 % à 120 %) seront préparées ; on effectuera six séries de mesures de plusieurs concentrations allant de (0.01 mg/ml à 0.9 mg/ml) pendant six jours consécutifs. Chaque solution est injectée 2 fois avec un volume de 5 µl.

Critères d'acceptation :

On doit s'assurer que la réponse obtenue est due à une régression linéaire. Pour cela, des tests statistiques sont à réaliser sur les résultats expérimentaux obtenus :

- Les tests statistiques de validation de la régression linéaire doivent être concluants au risque 5%.
- Les calculs du coefficient de corrélation  $R^2$  qui doit être  $\geq 0.999$  existences d'une pente ordonnée passent par l'origine.
- Les calculs de la standard déviation relative doivent être inférieurs à 2 % ( $RSD \% \geq 2 \%$ ).

➤ Exactitude

L'exactitude se définit comme le degré de concordance entre les mesures obtenues par une méthode et les valeurs de référence ou les valeurs considérées comme véritables. Elle concerne l'évaluation de la linéarité des résultats. Le concept de cette opération implique le calcul des pourcentages de récupération, comparant les quantités récupérées aux quantités introduites.

On déduit l'exactitude à partir des données de l'étude de linéarité de la gamme standard : on utilise l'équation de la courbe d'étalonnage pour calculer les concentrations théoriques, ou calcule la quantité du principe actif dans chaque solution. Après ce calcul, on fait les calculs de pourcentage de recouvrement pour chaque solution.

-Pour étalon : droite régression : aire étalon = a X + b

Quantité recouvrée = (aire pic spécialité - b)/a

[%] de recouvrement = (quantité recouvrée x 100)/quantité introduite

Critères d'acceptation :

La méthode est considérée comme exacte, si tous les biais individuels et le biais moyen (valeur moyenne de recouvrement) sont compris dans l'intervalle considéré (80 % à 120 %).

➤ La précision

**La précision intermédiaire :** de la solution de PA étudiée pendant six jours successifs tout en conservant le même opérateur et le même appareil. La précision a été déterminée par le calcul du recouvrement moyen et des coefficients de variation (CV) sur les six injections des concentrations (0.06 mg, 0.07 mg, 0.1 mg, 0.2 mg, 0.8 mg, 0.9 mg). Afin de calculer la moyenne et l'écart type, et la déviation standard relative (RSD %).

**Répétabilité :** une solution de l'ibuprofène dans l'éthanol de concentration 0,9 mg/ml a été injectée 10 fois dans les mêmes conditions. Dans le but de calculer la moyenne (X), l'écart type ( $\delta$ ) et la déviation standard (SD), afin de calculer la déviation standard relative (%RSD) selon la formule suivante :  $RSD [\%] = (SD/X) * 10$ , Critères d'acceptation :

Le coefficient de variation pour la précision intermédiaire doit être inférieur à 20 % ( $RSD \leq 20$  %) avec  $N \geq 6$ .

Le coefficient de variation répétabilité doit être inférieur à 2 % ( $RSD \leq 2$  %) avec  $N \geq 6$ .

# Chapitre V : Résultats et Discussion

### V.1. Introduction

L'objectif de cette étude est d'effectuer une validation complète de la méthode de séparation chirale de ces deux énantiomères de l'ibuprofène. Nous avons choisi d'utiliser la chromatographie liquide à haute performance HPLC de marque Agilent 1260 comme méthode de séparation, d'une pompe quaternaire, avec injection automatique et liée aux détecteurs barrette de diode (DAD). Nous avons utilisé une colonne chirale Ultron-ES-OVM. Avant l'étape de la validation, nous avons effectué une recherche bibliographique sur les conditions optimales pour obtenir une bonne séparation de mélange racémique d'ibuprofène en temps court par une méthode HPLC basée sur plusieurs paramètres : la longueur d'onde, la composition de la phase mobile, le débit, la température sont des paramètres importants dans la séparation. Par la suite, nous avons testé la linéarité (courbe d'étalonnage) et la répétabilité de ces conditions optimales obtenues et la précision intermédiaire et on a déterminé la limite de quantification et la limite de détection.

### V.2. Conditions chromatographiques optimal

Selon étude d'optimisation progressive, les variables les plus importantes affectant la rétention, la sélectivité et le rendement sont la phase stationnaire, le type et la composition du solvant organique dans la phase mobile, la longueur d'onde, la température, le débit, doit être déterminé par notre équipe étudiant en chimie appliqué encadré par le même promoteur [107].

**Tableau 13:** Les conditions optimales retenues lors de cette étude sont résumées.

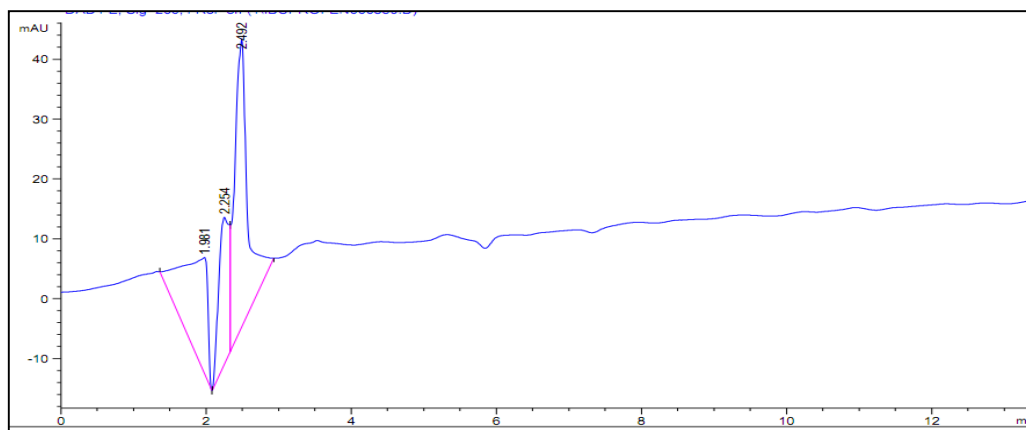
La colonne (phase stationnaire)	Ultron-ES-OVM Protéine Ovumucoïde greffée (150× 4.6 mm) sur silice de 5 µm de diamètre, de porosité 120 Å
La phase mobile	30/70% (MeOH/KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )
Longueur d'onde	λ=200nm
Volume d'injection	5µl
Débit	0,6ml/min
Température	25 °C

### V.3. Validation de la méthode

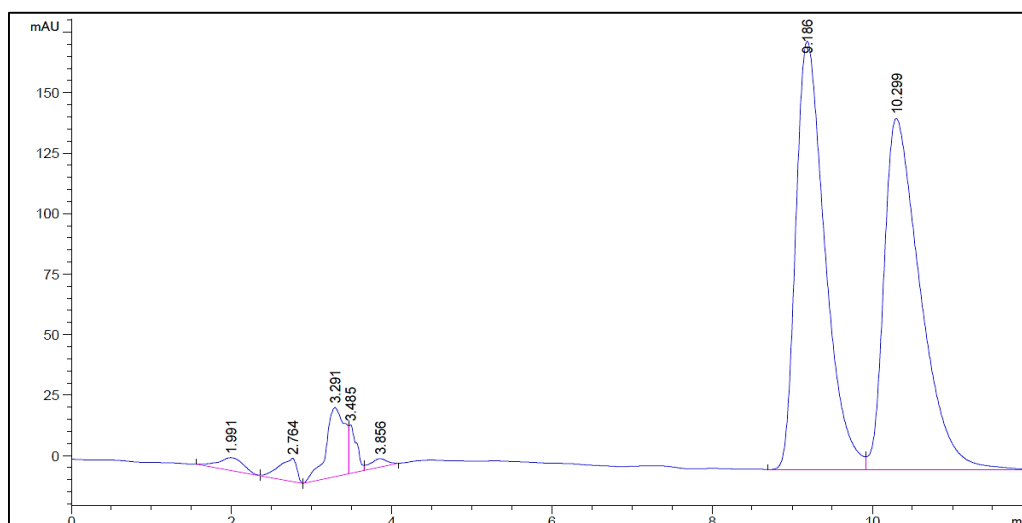
La validation d'une méthode analytique pour la séparation chirale de l'ibuprofène implique une série de tests pour garantir que la méthode est fiable, précise, et reproductible.

### V.3.1. Résultats de test de la spécificité

L'évaluation de la spécificité est faite par la comparaison entre deux chromatogrammes d'une injection d'une phase mobile seule, et la deuxième injection de la solution de l'ibuprofène.



**Figure 40:** Chromatogramme de la phase mobile (MeOH / KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30/70%).



**Figure 41:** Chromatogramme de l'ibuprofène en utilisant une phase mobile constituée d'une solution aqueuse (MeOH / KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30/70%) à température ambiante.

Les résultats de la spécificité montrant que les deux pics de l'ibuprofène sont distincts et séparés des pics de la phase mobile et des impuretés, les deux pics sont clairs et bien résolus avec un temps de rétention  $tr_1=9.186$  min et  $tr_2=10.299$  min, donc n'y a pas d'interférence significative avec les autres pics de la phase mobile. Le test de spécificité est une étape cruciale dans la validation analytique pour s'assurer que la méthode utilisée est capable de mesurer précisément l'ibuprofène.

### V.3.2. Résultats de test de linéarité

La linéarité d'une méthode analytique est sa capacité à donner des résultats directement proportionnels à la concentration de l'analyte dans l'échantillon donné, des résultats proportionnels aux concentrations, dans un domaine de concentration donné. Il s'agit le plus généralement d'une droite. En utilisant les données de six répétitions de chaque niveau de concentration.

La linéarité est, dans un premier temps, évaluée par comparaison visuelle des représentations graphiques des réponses instrumentales  $Y$  en fonction des concentrations introduites  $X$  selon la fonction  $Y = f(X)$ . Cette proportionnalité s'exprime à travers une expression mathématique définie par une droite du 1er ordre  $Y = aX + b$ . Elle est vérifiée par le calcul des constantes de droite ainsi que du coefficient de corrélation en utilisant la méthode des moindres carrés (régression linéaire). Avec un coefficient de corrélation  $R^2$ , il doit être situé dans l'intervalle  $[0.97 - 1]$ . Où:

$X$  : représente la concentration introduite (en mg/ml).

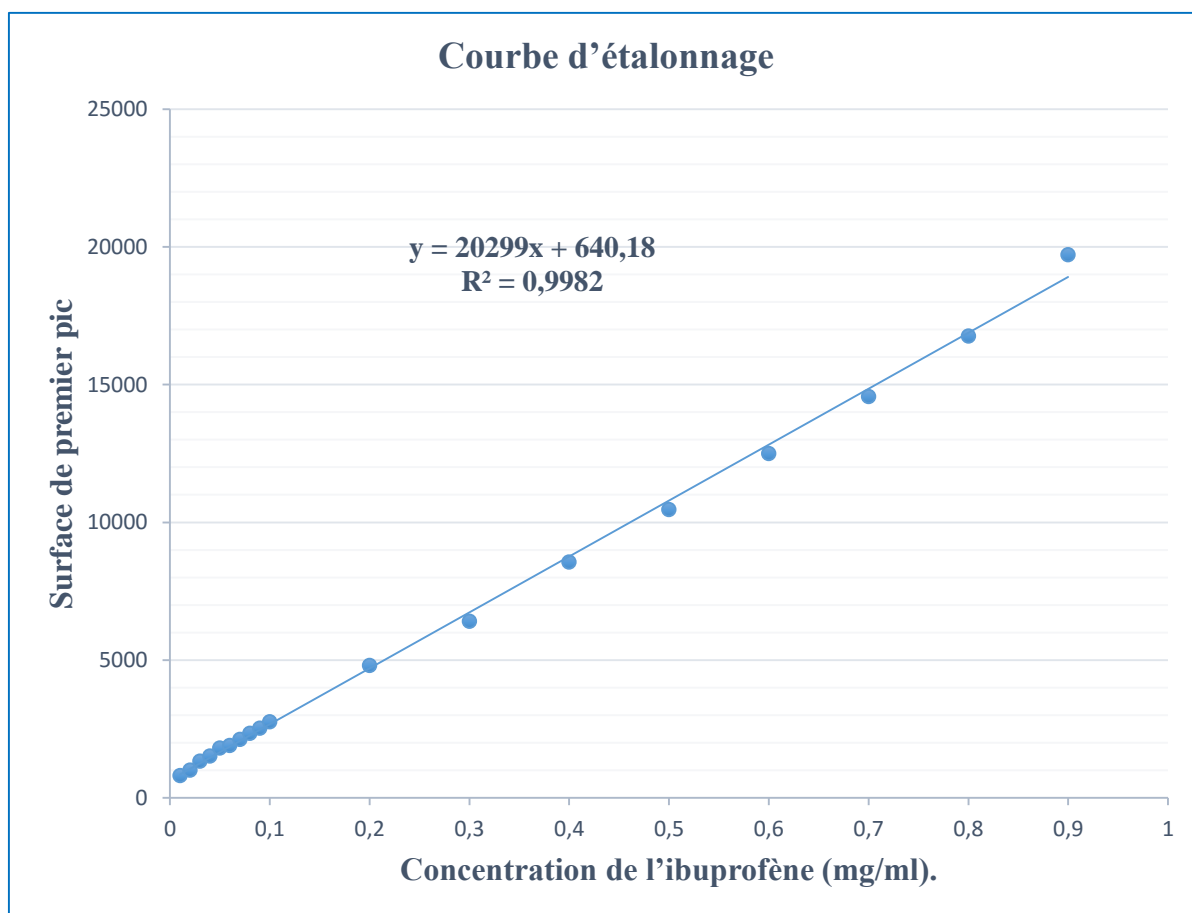
$Y$  : représente la réponse analytique (en aire du pic).

( $a$  et  $b$ ) : représente respectivement la pente et l'ordonnée à l'origine.

Afin de pouvoir établir la courbe de linéarité, nous l'avons réalisée en préparant six fois des solutions standard de l'ibuprofène à différentes concentrations allant de (0,01 mg/ml à 0,9 mg/ml) par dilutions de la solution mère de concentration 1 mg/ml. 5 $\mu$ L de chaque concentration ont été injectés plusieurs fois dans le système HPLC. Les réponses ont été lues à 200 nm, les résultats de linéarité ont été obtenus dans la plage de concentration. L'équation de la droite de régression linéaire et le coefficient de corrélation sont mentionnés sur la courbe d'étalonnage. Les résultats obtenus pour les deux pics sont présentés dans les tableaux suivants.

**Tableau 14:** Variations des surfaces de pics de différentes concentrations de premier énantiomère.

Concentration IBF (mg/ml)	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 4	Essai 5	Essai 6	moyen
0,01	861,069	808,718	774,651	881,557	789,833	774,651	815,0801
0,02	1056,155	966,921	991,525	986,369	1052,112	1020,194	1012,213
0,03	1241,598	1311,539	1332,537	1373,422	1361,179	1392,236	1335,419
0,04	1457,072	1422,331	1568,988	1568,807	1552,979	1568,897	1523,179
0,05	1829,518	1854,246	1723,729	1848,598	1748,795	1866,558	1811,907
0,06	1916,245	1902,231	1902,231	1904,613	1904,242	1904,427	1905,665
0,07	2138,348	2073,210	2091,845	2146,992	2164,984	2096,921	2118,717
0,08	2364,698	2375,844	2318,746	2379,985	2350,094	2310,556	2349,987
0,09	2515,979	2536,014	2530,126	2582,688	2515,979	2536,014	2536,133
0,1	2759,202	2716,340	2752,246	2757,202	2785,878	2779,394	2758,377
0,2	4854,422	4791,059	4794,973	4673,723	4876,646	4834,494	4804,219
0,3	6416,560	6207,054	6075,867	6087,201	7027,970	6674,047	6414,783
0,4	8889,825	8710,154	8558,375	8638,219	8323,806	8277,458	8566,306
0,5	10582,8	10557,9	10574,9	10409,7	10329,6	10374,5	10471,566
0,6	12694,3	12469,3	12661,1	12504,9	12355	12362	12507,766
0,7	14672,3	14682,3	14874	14419,9	14438,7	14357,7	14574,15
0,8	16898,6	16923,6	16743	17089	16478,5	16533,3	16777,666
0,9	19482,1	19687,7	19746,4	19947,4	19983,4	19482,1	19721,516
Pente	20300						
Ordonnée	639.91						
R <sup>2</sup>	0.9982						



**Figure 42:** Courbe d'étalonnage du première énantiomère pour le dosage de l'ibuprofène par HPLC.

La méthode proposée obéit à une linéarité comprise entre 0,1 et 0,9 mg/ml. Cela signifie que plus on augmente la concentration, plus les surfaces augmentent. La linéarité a été vérifiée, l'équation de la courbe d'étalonnage et le coefficient de corrélation de 1er pic sont donnés respectivement par :

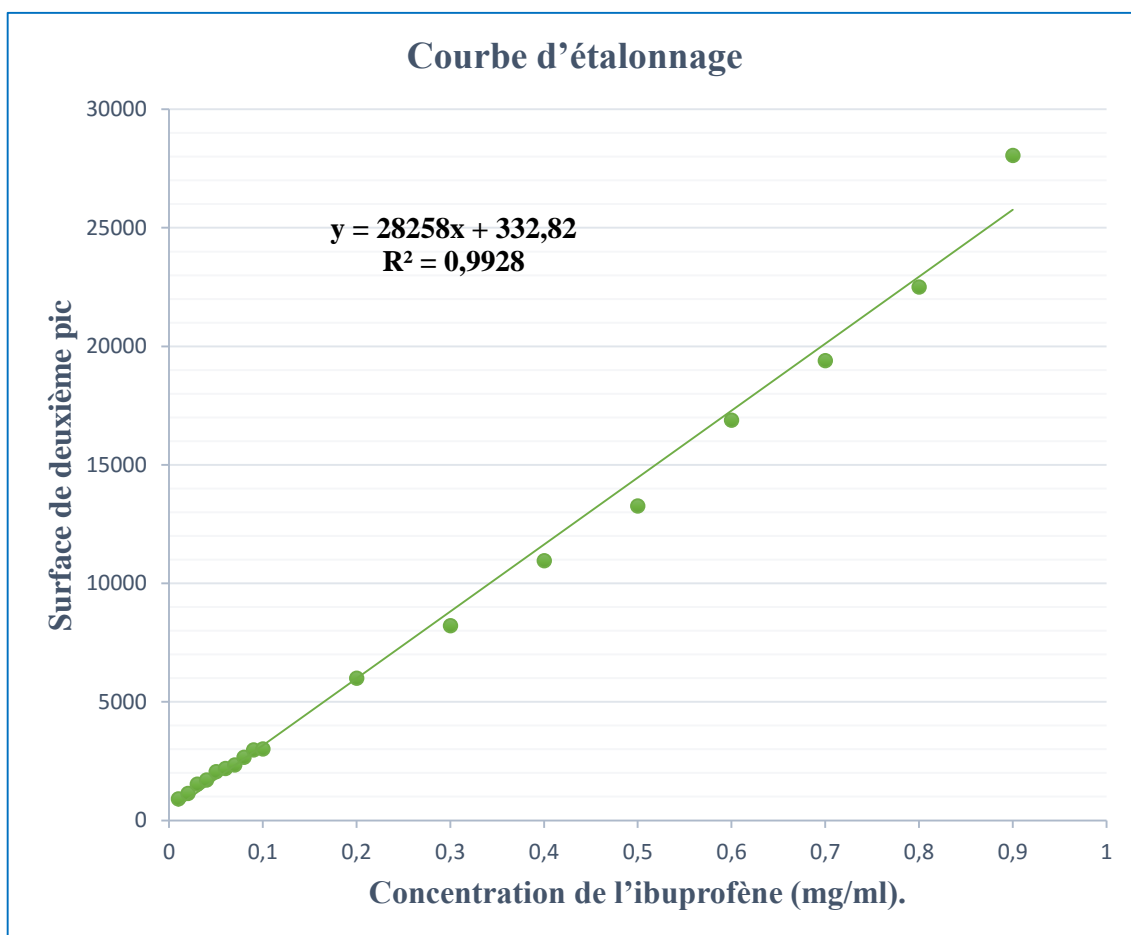
$$Y_1 = 20299 X + 640.18 \text{ et le coefficient de corrélation est } R_1 = 0,9982 (99,82 \%).$$

Le graphique de la réponse en fonction de la concentration montre une relation linéaire avec une équation de régression linéaire de la forme ( $Y_1 = 20299 X + 640.18$ ) où Y représente l'absorbance mesurée et X la concentration en mg/ml. Le coefficient de corrélation  $R_1 = 0,998$ , indiquant une excellente corrélation entre les concentrations et l'aire des pics. Ces valeurs sont satisfaisantes et nous permettent, dans un premier temps, de pouvoir affirmer qu'il existe bien une liaison hautement significative « de type croissante » entre l'air et la concentration. Par conséquent, la méthode d'analyse présente ainsi un profil linéaire.



**Tableau 15:** Variations des surfaces de pics de différentes concentrations de deuxième énantiomère.

Concentration IBF (mg/ml)	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 4	Essai 5	Essai 6	moyen
0,01	901,3602	854,1485	879,9809	1183,863	864,6109	879,9809	918,161
0,02	1092,966	1059,176	1152,708	1132,775	1219,044	1168,044	1137,452
0,03	1449,619	1392,393	1524,354	1514,496	1694,812	1607,875	1530,591
0,04	1697,802	1654,402	1787,576	1716,707	1678,293	1752,142	1714,487
0,05	2146,085	2290,226	2037,325	1859,626	2042,882	1954,347	2055,081
0,06	2239,732	2141,596	2141,596	2203,987	2254,377	2190,664	2195,325
0,07	2306,510	2235,399	2458,518	2298,485	2318,625	2417,947	2339,247
0,08	2736,048	2701,454	2707,378	2701,370	2648,026	2523,943	2669,703
0,09	3073,918	2895,309	2793,529	3136,259	3073,918	2895,309	2978,040
0,1	2895,231	3171,854	3154,073	2893,231	2968,972	3028,918	3018,713
0,2	6227,902	5896,305	5635,926	6323,090	6187,824	5772,682	6007,288
0,3	8423,712	7900,061	7080,619	7430,996	8553,240	9904,096	8215,454
0,4	12080,3	11544,2	10562,3	10764,4	10468,9	10334,4	10959,08
0,5	13296,8	13987,3	13564,9	13655,6	12659,1	12481,1	13274,13
0,6	17821,4	17236,1	17004	16182,6	16401,4	16651,5	16882,83
0,7	19207,9	19170,6	19937	20072,4	19234,6	18824,6	19407,85
0,8	22861,7	23255,4	22612	23999,2	20024,4	22285,3	22506,33
0,9	27493,6	28021,5	28372,6	28326,5	28653,7	27493,6	28060,25
<b>Pente</b>	28258						
<b>Ordonnée</b>	332.82						
<b>R<sup>2</sup></b>	0.9928						



**Figure 43:** Courbe d'étalonnage du deuxième énantiomère pour le dosage de l'ibuprofène par HPLC.

La méthode proposée maintient une linéarité entre 0,1 et 0,9 mg/ml, ce qui indique qu'à mesure que la concentration augmente, les surfaces augmentent également. On obtient la courbe d'étalonnage pour le deuxième énantiomère et le coefficient de corrélation de la première image, avec  $Y_2 = 28258 X + 332.82$  et  $R^2 = 0,9928$  (99,28 %). Un graphique illustrant la réponse basée sur la concentration est présenté, montrant une relation linéaire avec une équation de régression de la forme ( $Y_2 = 28258 X + 332.82$ ) et une corrélation élevée entre les concentrations et l'aire des images.

### V.3.3. Précision inter-jour

La précision inter jour ont été étudiée sur des concentrations faibles, moyennes et élevées dans six tests distincts, cette précision consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon dans des conditions identiques. La précision de la méthode est testée par des injections répétées de six jours, avec un critère acceptable  $RSD \geq 15 \%$ .

**Tableau 16:** Résultats de la précision inter-jour de premier énantiomère testée par HPLC des injections répétées trois fois pendant six jours.

Paramètre	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5	Jour 6
<b>Concentration introduit 0.06 (mg/ml)</b>						
Concentration calculé (mg/ml) $\pm$ SD	0,06287 $\pm$ 0,00069	0,06335 $\pm$ 0,00034	0,06218 $\pm$ 0,00083	0,06230 $\pm$ 0,00008	0,06335 $\pm$ 0,00074	0,06229 $\pm$ 0,00075
RSD	1,08919	0,54398	1,32463	0,13330	1,19134	1,20174
exactitude	105,602	105,194	104,618	103,736	104,716	104,708
Recouvrement	103,673	103,405	103,027	102,449	102,503	102,713
<b>Concentration introduit 0.08 (mg/ml)</b>						
Concentration calculé (mg/ml) $\pm$ SD	0,08496 $\pm$ 0,00053	0,08551 $\pm$ 0,00038	0,08270 $\pm$ 0,00198	0,08571 $\pm$ 0,00213	0,08551 $\pm$ 0,00014	0,08229 $\pm$ 0,00227
RSD	0,62397	0,45547	2,36469	2,53311	0,16847	2,71037
exactitude	106,676	106,549	105,134	105,262	107,019	104,882
Recouvrement	104,789	104,698	103,683	103,774	104,467	103,672
<b>Concentration introduit 0.4 (mg/ml)</b>						
Concentration calculé (mg/ml) $\pm$ SD	0,40686 $\pm$ 0,00033	0,40639 $\pm$ 0,00625	0,39754 $\pm$ 0,00528	0,39007 $\pm$ 0,00278	0,39400 $\pm$ 0,00250	0,39754 $\pm$ 0,01507
RSD	0,08149	1,55692	1,34249	0,70941	0,63310	3,89567
exactitude	101,658	100,493	98,4526	98,0096	98,9442	96,7228
Recouvrement	101,537	100,457	98,5656	98,1550	96,8162	97,0512
<b>Concentration introduit 0.5 (mg/ml)</b>						
Concentration calculé (mg/ml) $\pm$ SD	0,48979 $\pm$ 0,00979	0,48857 $\pm$ 0,00086	0,48940 $\pm$ 0,00059	0,48127 $\pm$ 0,00575	0,48857 $\pm$ 0,00516	0,47953 $\pm$ 0,00638
RSD	2,02775	0,17730	0,12109	1,18564	1,06455	1,31975
exactitude	96,5747	97,8368	97,7979	97,0678	96,9841	96,8107
Recouvrement	96,7779	97,9651	97,9285	97,2417	96,1050	96,8434
<b>Concentration introduit 0.7 (mg/ml)</b>						
Concentration calculé (mg/ml) $\pm$ SD	0,69125 $\pm$ 0,02610	0,69174 $\pm$ 0,00034	0,70118 $\pm$ 0,00667	0,67881 $\pm$ 0,01581	0,69174 $\pm$ 0,00914	0,67575 $\pm$ 0,01130
RSD	3,88044	0,05037	0,95876	2,29239	1,33378	1,65364
exactitude	96,1128	98,7852	99,4950	98,5717	97,8971	97,6783
Recouvrement	96,2803	98,8376	99,5167	98,6332	97,1675	98,0108
<b>Concentration introduit 0.9 (mg/ml)</b>						
Concentration calculé (mg/ml) $\pm$ SD	0,92818 $\pm$ 0,02006	0,93831 $\pm$ 0,00716	0,94120 $\pm$ 0,00204	0,95110 $\pm$ 0,00700	0,93831 $\pm$ 0,00904	0,92818 $\pm$ 0,00716
RSD	2,12869	0,76738	0,21757	0,73998	0,95755	0,76738
exactitude	104,707	103,694	104,417	105,128	104,967	103,694
Recouvrement	104,548	103,569	104,268	104,955	105,581	104,545

**Tableau 17:** Résultats de la précision inter-jour de deuxième énantiomère testée par HPLC des injections répétées trois fois pendant six jours.

Paramètre	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5	Jour 6
<b>Concentration introduit 0.06 (mg/ml)</b>						
Concentration calculé (mg/ml) $\pm$ SD	0,06748 $\pm$ 0,00034	0,06686 $\pm$ 0,00043	0,06400 $\pm$ 0,00201	0,06621 $\pm$ 0,00156	0,06800 $\pm$ 0,00126	0,06574 $\pm$ 0,00159
Précision RSD	0,51251	0,65226	3,08322	2,39770	1,87891	2,38407
exactitude	112,879	111,953	109,059	108,522	111,848	111,455
Recouvrement	110,766	109,992	107,573	107,123	109,903	109,575
<b>Concentration introduit 0.08 (mg/ml)</b>						
Concentration calculé (mg/ml) $\pm$ SD	0,08504 $\pm$ 0,00086	0,08382 $\pm$ 0,00086	0,08403 $\pm$ 0,00014	0,08381 $\pm$ 0,00015	0,08193 $\pm$ 0,00133	0,07753 $\pm$ 0,00310
RSD	1,02774	1,02524	0,17662	0,17913	1,61066	3,89407
exactitude	105,540	105,542	104,9081	104,906	103,593	99,6693
Recouvrement	104,829	104,831	104,2783	104,276	103,132	99,7117
<b>Concentration introduit 0.4 (mg/ml)</b>						
Concentration calculé (mg/ml) $\pm$ SD	0,41572 $\pm$ 0,01699	0,39675 $\pm$ 0,01341	0,36200 $\pm$ 0,02457	0,36915 $\pm$ 0,00505	0,35869 $\pm$ 0,00739	0,35393 $\pm$ 0,00336
RSD	4,20931	3,30225	6,47649	1,38333	2,03183	0,94455
exactitude	100,926	101,559	94,8442	91,3947	90,9815	89,0794
Recouvrement	100,900	101,514	94,9916	91,6408	91,2395	89,3918
<b>Concentration introduit 0.5 (mg/ml)</b>						
Concentration calculé (mg/ml) $\pm$ SD	0,45877 $\pm$ 0,00359	0,48320 $\pm$ 0,01727	0,46825 $\pm$ 0,01056	0,47146 $\pm$ 0,00226	0,43620 $\pm$ 0,02493	0,429905 $\pm$ 0,004454
RSD	0,77839	3,66856	2,22179	0,48303	5,49440	1,028537
exactitude	92,2622	94,1979	95,1467	93,9728	90,7674	86,61108
Recouvrement	92,4403	94,3314	95,2584	94,1115	90,9799	86,9192
<b>Concentration introduit 0.7 (mg/ml)</b>						
Concentration calculé (mg/ml) $\pm$ SD	0,66795 $\pm$ 0,01048	0,66663 $\pm$ 0,00093	0,69375 $\pm$ 0,01917	0,69854 $\pm$ 0,00338	0,66890 $\pm$ 0,02096	0,65439 $\pm$ 0,01025
RSD	1,58806	0,13987	2,81945	0,48669	3,06621	1,55060
exactitude	94,3625	95,3278	97,1708	99,4503	97,6748	94,5207
Recouvrement	94,4558	95,4052	97,2176	99,4594	97,7133	94,6114
<b>Concentration introduit 0.9 (mg/ml)</b>						
Concentration calculé (mg/ml) $\pm$ SD	0,96117 $\pm$ 0,03571	0,97985 $\pm$ 0,01320	0,99227 $\pm$ 0,00878	0,99064 $\pm$ 0,00115	1,00222 $\pm$ 0,00818	0,96117 $\pm$ 0,02902
RSD	3,62071	1,36111	0,89098	0,11635	0,82168	2,95706
exactitude	109,602	107,834	109,562	110,162	110,715	109,077
Recouvrement	109,478	107,733	109,439	110,031	110,576	108,960

Les résultats de la déviation standard relative pour la précision inter-jour représentée dans les tableaux (16 et 17) pour le premier énantiomère : elle est variée entre (RSD %) 0,08149 et 3,89567), ne dépasse pas 15 % (RSD % est inférieur à 15 %). Quant au deuxième énantiomère, la déviation standard relative variée entre (RSD % ; 0,11635 et 6,47649), on constate qu'il est élevé par rapport aux résultats du premier énantiomère, mais ne dépasse pas la valeur acceptable  $RSD \geq 15\%$ . Les résultats montrent que l'écart-type relatif (RSD) des mesures est inférieur à 15 % et sont conformes aux critères d'acceptabilité. Et ce qui indique une bonne précision inter-jour. Confirmant ainsi la robustesse de la méthode au fil du temps.

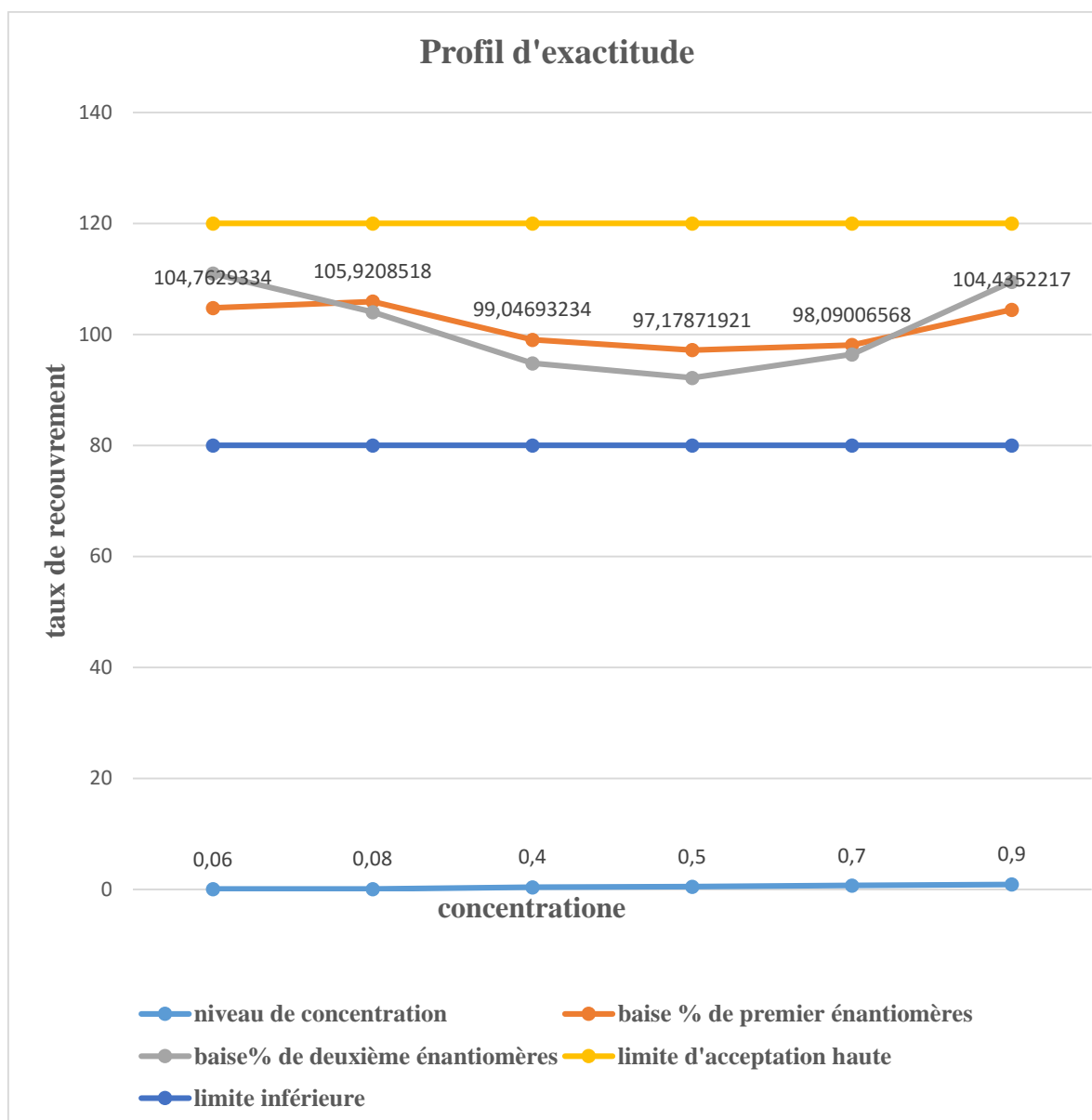
Les tableaux (16 et 17) présentent les résultats des tests de récupération pour les trois niveaux mesurés (0.06 /0.08 et 0.4 /0.5 et 0.7 /0.9 mg/ml). Les taux de recouvrement variaient entre (96,105 % et 105,581 %) pour le premier énantiomère, et les taux de recouvrement variaient entre (86,919 % et 110,766 %) pour le deuxième énantiomère. Les résultats montrent une efficacité de taux de recouvrement très élevée pour l'ibuprofène.

Quant aux résultats de l'exactitude pour les trois niveaux mesurés (0.06 /0.08 et 0.4 /0.5 et 0.7 /0.9 mg/ml), le pourcentage de l'exactitude varie entre (96,112 % et 107,01 %) pour le premier énantiomère, et entre (86,611 % et 112,879 %) pour le deuxième énantiomère. Les résultats montrent que les pourcentages de récupération pour les échantillons testés sont compris entre 80 % et 120 %, ce qui est conforme aux critères d'acceptabilité généralement admis pour les méthodes analytiques.

Les résultats des expériences de validation ne diffèrent pas sensiblement les uns des autres, ce qui indique que la méthode est fiable à la fois dans des jours différents. Ces résultats démontrent que la méthode HPLC développée est précise et capable de fournir des résultats reproductibles. La faible variation entre les valeurs indique une fiabilité élevée, essentielle pour des applications analytiques rigoureuses.

#### **V.3.4. Profils d'exactitude obtenue**

Après le calcul des critères de validation, on collecte les données obtenues pour tracer le profil d'exactitude qui réunit le biais relatif, les deux bornes de l'intervalle d'acceptabilité (limite supérieure et limite inférieure), dans une courbe qui donne l'exactitude (%) en fonction des niveaux de concentration introduits. Chaque point sur la courbe représente un niveau de concentration spécifique et son exactitude pour les deux énantiomères de l'ibuprofène. Le profil d'exactitude est obtenu en reliant entre elles d'une part les bornes inférieures et d'autre part les bornes supérieures de l'intervalle de tolérance.



**Figure 44:** Profil d'exactitude de deux énantiomères de l'ibuprofène.

Les résultats des expériences indiquent une bonne exactitude, ce qui montre que la méthode est précise et acceptable pour l'analyse de l'échantillon.

### V.3.5. Précision intra-jour

La précision intra-jour consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon dans des conditions identiques. La précision de la méthode est testée par des injections répétées de dix fois d'une concentration de 0,9 mg/ml. L'exploitation de ces résultats consiste à calculer la moyenne ( $\bar{X}$ ) et la déviation standard (SD), afin de calculer la déviation standard relative (RSD %) selon la formule suivante :  $RSD (\%) = (SD/\bar{X}) * 100$

Les résultats du test de précision sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau 18:** Résultats de la précision intra-jour testée par HPLC des injections répétées dix fois d'une concentration 0.9 (mg/ml).

Injection	Surface de 1ere énantiomère élué	Concentration calculée de 1ere pic Xi (mg/ml)	Surface de 2eme énantiomère élué	Concentration calculée de 2eme pic Xi (mg/ml)
1	19482,1	0,92818	27493,6	1,32284
2	19687,7	0,93831	28021,5	1,34884
3	19746,4	0,94120	28372,6	1,36614
4	19947,4	0,95110	28326,5	1,36387
5	19983,4	0,95288	28653,7	1,37998
6	19482,1	0,92818	27493,6	1,32284
7	19584,9	0,93325	27757,55	1,33584
8	19717,05	0,93976	28197,05	1,35749
9	19846,9	0,94615	28349,55	1,36500
10	19732,75	0,94053	28073,65	1,35141
SD	0,008540779		0,019125771	
Moyen Xi	0,93995862		1,35142956	
RSD	0,908633559		1,415225186	

La déviation standard relative calculée comme suit :

$$RSD1 = (SD/X) * 100 = 0,908633559 = 0.90\% ; RSD2 = (SD/X) * 100 = 1,415225186 = 1.41\%.$$

Comme le montre le tableau 18, la déviation standard relative de répétabilité intra-jour ne dépasse pas 1,41 % (RSD % est inférieur à 2 %), donc la répétabilité est bien validée, ce qui assure la fidélité de la méthode. La méthode est donc répétable pour l'ibuprofène dans nos conditions d'analyse. Les résultats des expériences de validation ne diffèrent pas sensiblement les uns des autres, ce qui indique que la méthode est fiable à la fois dans le même jour.

### V.3.6. Limite de détection (LD) et limite de quantification (LQ)

On utilise dans les calculs de la limite de détection et quantification l'équation de la courbe d'étalonnage pour les deux énantiomères.

**Tableau 19:** Donnée de deux courbes d'étalonnage pour calculer LD et LQ.

Concentration introduite (µg/ml)	Surface de 1ere énantiomère élué	Facteur de réponse FR1	Surface de 2eme énantiomère élué	Facteur de réponse FR2
10	815,0801	81,50801	918,161	91,8161
20	1012,213	50,61065	1137,452	56,8726
30	1335,419	44,5139667	1530,591	51,0197
40	1523,179	38,079475	1714,487	42,862175
50	1811,907	36,23814	2055,081	41,10162
60	1905,665	31,7610833	2195,325	36,58875
70	2118,717	30,2673857	2339,247	33,4178143
80	2349,987	29,3748375	2669,703	33,3712875
90	2536,133	28,1792556	2978,040	33,0893333
100	2758,377	27,58377	3018,713	30,18713
200	4804,219	24,021095	6007,288	30,03644
300	6414,783	21,38261	8215,454	27,3848467
400	8566,306	21,415765	10959,083	27,3977075
500	10471,566	20,943132	13274,133	26,548266
600	12507,766	20,8462767	16882,833	28,138055
700	14574,15	20,8202143	19407,85	27,7255
800	16777,666	20,9720825	22506,333	28,1329163
900	19721,516	21,9127956	28060,25	31,1780556
Pente (a)	20299		28258	
SD	15,21354088		15,99307973	

La limite de détection et de quantification calculée comme suit :

$$LD_1 = \frac{3,3 \sigma}{p} = \frac{(3,3 * 15,21354088)}{20299} = 0,002473259$$

$$LD_2 = \frac{3,3 \sigma}{p} = \frac{(3,3 * 15,99307973)}{28258} = 0,001867689$$

$$LQ_1 = \frac{10 \sigma}{p} = \frac{(10 * 15,21354088)}{20299} = 0,007494724$$

$$LQ_2 = \frac{10 \sigma}{p} = \frac{(10 * 15,99307973)}{28258} = 0,005659664$$



**Tableau 20:** Les résultats de la limite de détection et de quantification.

Paramètre	Enantiomère 1	Enantiomère 2
Limite de détection LD	<b>0,002473259</b>	<b>0,001867689</b>
Limite de quantification LQ	<b>0,007494724</b>	<b>0,005659664</b>
Standard déviation SD	<b>15,21354088</b>	<b>15,99307973</b>

Les résultats obtenus montrent que la limite de détection (LD) pour les deux énantiomères est de (LD1 = 0,00247 mg/ml et LD2 = 0.00186 mg/ml), indiquant que la méthode est capable de détecter des concentrations très faibles de l'échantillon. Quant à la limite de quantification (LQ) elle est de (LQ1 = 0,0749 mg/ml et LQ2 = 0.00565 mg/ml), ce qui signifie que des quantités aussi faibles peuvent être quantifiées avec une précision et une exactitude exactes. Les limites de détection et de quantification obtenues confirment la haute sensibilité de la méthode HPLC développée, la rendant apte à des applications nécessitant une détection précise de faibles concentrations de l'échantillon.

### V.3.7. Robustesse

Le teste de la robustesse consiste à varier mineures quelque paramètre telle que la température et le débit, le tableau suivante représenté les résultats de temps de rétention :

**Tableau 21:** Tableau représentant les résultats de temps de rétention à la variation de la température et du débit.

Paramètre	[T C°]= 25	[T C°] =30	Débit 0.6	Débit 0.8
Tempe de rétention (Tr 1) Enantiomère 1	<b>9 ,186 min</b>	<b>9.104 min</b>	<b>9 ,186 min</b>	<b>9.104 min</b>
Tempe de rétention (Tr 2) Enantiomère 2	<b>10,299 min</b>	<b>10.038 min</b>	<b>10,299 min</b>	<b>10.036 min</b>

Les résultats obtenus montrent que la méthode résiste aux variations mineures des conditions expérimentales, comme les variations de température et de débit, ce qui atteste de sa robustesse et de son adéquation pour l'analyse de routine malgré les variations inhérentes aux conditions expérimentales.

# Conclusion Générale

### Conclusion Générale

La validation analytique est reconnue comme indispensable à la gestion de la qualité dans l'industrie pharmaceutique, puisque les réglementations sont strictes et complexes afin de protéger au maximum les patients, mais aussi les entreprises elles-mêmes. Le contrôle et la validation des méthodes sont essentiels pour la commercialisation des médicaments.

Dans notre travail, nous sommes intéressées à valider la méthode analytique de la séparation des énantiomères d'un principe actif ibuprofène par la technique d'analyse de chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Au cours d'optimisation les conditions chromatographiques nous avons réalisé une recherche bibliographique concernant les propriétés de l'ibuprofène et ces propriétés pharmacocinétiques, nous avons adopté ces conditions chromatographiques optimales une phase mobile constituée de (30/70% MeOH/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), avec une concentration de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM à pH=3,22, un volume d'injection 5 µL de la solution ibuprofène, une longueur d'onde 200 nm avec un débit 0,6 ml/min à température ambiante deux pics de temps de rétention  $t_{r1}=9,186$  min ;  $t_{r2}=10,299$  min avec une très bonne résolution.

La validation de la méthode de dosage d'un principe actif par HPLC concerne la vérification des critères de spécificité, de linéarité, de fidélité, de l'exactitude, de stabilité et de robustesse. Les résultats de la spécificité montrant que les deux pics de l'ibuprofène sont distincts bien séparés et résolus sans interférence significative avec les autres pics de la phase mobile, par conséquent la méthode d'analyse indiquant une excellente corrélation entre les concentrations et l'aire des pics, le graphique de la réponse en fonction de la concentration montre une relation linéaire avec un coefficient de corrélation ( $R^2$ ) est de ( $R_1=0,998$  et  $R_2=0,9928$ ), quant aux résultats de la précision inter-jour sont conformes aux critères d'acceptabilité, la déviation standard relative varie entre (RSD1 ; 0,08149 et 3,89567) et (RSD2 ; 0,11635 et 6,47649). D'autre part, la répétabilité est bien validée, ce qui assure la fidélité de la méthode avec une valeur de la déviation standard relative inférieure à 2 % (RSD1 % = 0,908) et (RSD2 % = 1,41 %). Les résultats de la limite de détection et de quantification ( $LD_1=0,00247325$ ) et ( $LD_2=0,001867689$ ), ( $LQ_1=0,007494724$ ) et ( $LQ_2=0,005659664$ ) confirment la haute sensibilité de la méthode HPLC. Les résultats de la robustesse montrent que la méthode résiste aux variations mineures des conditions expérimentales et donnent des valeurs de temps de rétention qui ne diffèrent pas sensiblement les unes des autres.

Les résultats obtenus lors de notre travail ont montré que la méthode est spécifique pour le principe actif ibuprofène, présente un profil linéaire valide, fidèle et exact, les résultats de répétabilité et des essais sont valides, ce qui implique que la méthode est précise.

### Référence bibliographie

1. Tegeder, I., J. Pfeilschifter, and G. Geisslinger, *Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors*. The FASEB Journal, 2001. **15**(12): p. 2057-2072.
2. Haroun, M., *Phases stationnaires chirales à base de teicoplanine et d'aminoglycosides pour la séparation d'énantiomères d'acides aminés*. 2007, Université Joseph-Fourier-Grenoble I.
3. Rainsford, K., *Fifty years since the discovery of ibuprofen*. Inflammopharmacology, 2011. **19**(6): p. 293-297.
4. Mirza, R., *Un bref historique du traitement de la polyarthrite rhumatoïde*.
5. Caviglioli, G., et al., *Identification of degradation products of ibuprofen arising from oxidative and thermal treatments*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2002. **30**(3): p. 499-509.
6. Long, W.S., et al., *Comparison of kinetic resolution between two racemic ibuprofen esters in an enzymic membrane reactor*. Process Biochemistry, 2005. **40**(7): p. 2417-2425.
7. Bushra, R. and N. Aslam, *An overview of clinical pharmacology of Ibuprofen*. Oman medical journal, 2010. **25**(3): p. 155.
8. Rainsford, K., *Ibuprofen: pharmacology, therapeutics and side effects*. 2013: Springer Science & Business Media.
9. Bannwarth, B., et al., *Stereoselective disposition of ibuprofen enantiomers in human cerebrospinal fluid*. British journal of clinical pharmacology, 1995. **40**(3): p. 266-269.
10. Long, W.S., A. Kamaruddin, and S. Bhatia, *Chiral resolution of racemic ibuprofen ester in an enzymatic membrane reactor*. Journal of membrane science, 2005. **247**(1-2): p. 185-200.
11. Acetti, D., et al., *Monitoring the synthetic procedures of commercial drugs by 2H NMR spectroscopy: The case of ibuprofen and naproxen*. Talanta, 2008. **76**(3): p. 651-655.
12. Ducamp, C., *La chimie verte. Développement durable et autres questions d'actualité: questions socialement vives dans l'enseignement et la formation*, 2011: p. 145.
13. Ha, M.-W. and S.-M. Paek, *Recent advances in the synthesis of ibuprofen and naproxen*. Molecules, 2021. **26**(16): p. 4792.
14. McQuade, D.T., A. Bogdan, and S.L. Poe, *Method and apparatus for continuous flow synthesis of ibuprofen*. 2013, Google Patents.
15. Adams, S., et al., *Some aspects of the pharmacology, metabolism, and toxicology of ibuprofen*. Rheumatology, 1970. **10**(suppl\_1): p. 9-22.
16. Gérard, D., *Séparation par voie enzymatique d'énantiomères de profènes: optimisation du biocatalyseur et mise en oeuvre en dioxyde de carbone supercritique*. 2016, Institut National Polytechnique de Toulouse-INPT.
17. Rainsford, K., *Discovery, mechanisms of action and safety of ibuprofen*. International journal of clinical practice. Supplement, 2003(135): p. 3-8.
18. Bogdani, E., *Étude expérimentale et optimisation du procédé de lyophilisation de l'ibuprofène en milieu organique*. 2011, Université Claude Bernard-Lyon I.
19. Le, C.A.K., *Inclusion complexes of amylose: morphogenesis, crystal structure and release of bioactive molecules*. 2018, Université Grenoble Alpes.
20. Rainsford, K.D., *Ibuprofen: A critical bibliographic review*. 2003.
21. Janssen, A., et al., *Evidence of COX-2 independent induction of apoptosis and cell cycle block in human colon carcinoma cells after S-or R-ibuprofen treatment*. European journal of pharmacology, 2006. **540**(1-3): p. 24-33.
22. Rainsford, K.D., *Nimesulide-actions and uses*. 2005: Springer Science & Business Media.
23. BERKANI, M., et al., *Etude des interactions de mélanges (polymères biodégradables/principe actif) obtenus par différentes méthodes de préparations*. Synthèse. **87**(89): p. 89.
24. Freer, A.A., et al., *Structure of (S)-(+)-ibuprofen*. Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications, 1993. **49**(7): p. 1378-1380.
25. Varrassi, G., et al., *Ibuprofen safety at the golden anniversary: are all NSAIDs the same? A narrative review*. Advances in therapy, 2020. **37**(1): p. 61-82.
26. Leroy, S., et al., *Quel niveau de preuve de l'efficacité et de la sécurité de l'ibuprofène dans ses indications pédiatriques?* Archives de pédiatrie, 2007. **14**(5): p. 477-484.

## Référence bibliographique

---

27. Angst, M., et al., *Cytokine profile in human skin in response to experimental inflammation, noxious stimulation, and administration of a COX-inhibitor: a microdialysis study*. Pain, 2008. **139**(1): p. 15-27.
28. Evans, A.M., *Comparative pharmacology of S (+)-ibuprofen and (RS)-ibuprofen*. Clinical rheumatology, 2001. **20**: p. 9-14.
29. Todoric, J., L. Antonucci, and M. Karin, *Targeting inflammation in cancer prevention and therapy*. Cancer Prevention Research, 2016. **9**(12): p. 895-905.
30. Shin, D., et al., *Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation according to absorption differences in three formulations of ibuprofen*. Drug design, development and therapy, 2017: p. 135-141.
31. Brocks, D.R. and F. Jamali, *The pharmacokinetics of ibuprofen in humans and animals*, in *Ibuprofen*. 1999, CRC Press. p. 87-142.
32. Cheng, H., et al., *Pharmacokinetics and bioinversion of ibuprofen enantiomers in humans*. Pharmaceutical Research, 1994. **11**: p. 824-830.
33. Weiser, T., et al., *Pharmacokinetic properties of ibuprofen (IBU) from the fixed-dose combination IBU/caffeine (400/100 mg; FDC) in comparison with 400 mg IBU as acid or lysinate under fasted and fed conditions—data from 2 single-center, single-dose, randomized crossover studies in healthy volunteers*. Clinical Pharmacology in Drug Development, 2019. **8**(6): p. 742-753.
34. KOBER, A. and I. SJÖHOLM, *The binding sites on human serum albumin for some nonsteroidal antiinflammatory drugs*. Molecular Pharmacology, 1980. **18**(3): p. 421-426.
35. Olive, G., *Traitement analgésique/antipyrétique: ibuprofène ou paracétamol? Mise au point*. Therapies, 2006. **61**(2): p. 151-160.
36. Martínez, C., et al., *The effect of the cytochrome P450 CYP2C8 polymorphism on the disposition of (R)-ibuprofen enantiomer in healthy subjects*. British journal of clinical pharmacology, 2005. **59**(1): p. 62-68.
37. Serveau, A., et al., *Thèse d'exercice*.
38. Rainsford, K., *Ibuprofen: pharmacology, efficacy and safety*. Inflammopharmacology, 2009. **17**: p. 275-342.
39. Faisantieu, N., V. Kowalski, and B. Soulié, *Bénéfices et risques de l'ibuprofène chez les enfants fébriles: revue systématique de la littérature en vue de la réalisation d'un outil écrit d'information à destination des patients*. Therapies, 2020. **75**(6): p. 553-567.
40. Zehnacker, A. and P. Roubin, *La chiralité, une propriété incontournable-quelques exemples venus de la physique*. Reflets de la Physique, 2022(73): p. 5-9.
41. Mezey, P.G., *New developments in molecular chirality*. Vol. 5. 2012: Springer Science & Business Media.
42. Amouri, H. and M. Gruselle, *Chirality in transition metal chemistry: molecules, supramolecular assemblies and materials*. 2008: John Wiley & Sons.
43. Tokunaga, E., et al., *Understanding the thalidomide chirality in biological processes by the self-disproportionation of enantiomers*. Scientific reports, 2018. **8**(1): p. 17131.
44. Kagan, H., *La synthèse asymétrique de composés biologiquement actifs*. Actualite Chimique, 2003(11/12): p. 10-14.
45. Shibata, N., T. Yamamoto, and T. Toru, *Synthesis of thalidomide*. Bioactive Heterocycles II, 2007: p. 73-97.
46. Aboul-Enein, H.Y. and I. Ali, *Chiral separations by liquid chromatography and related technologies*. Vol. 90. 2003: CRC Press.
47. Delobel, C., *Contribution à l'étude par chromatographie en phase fluide super critique de phases stationnaires chirales dérivées de trisphénylcarbammates de cellulose immobilisés*. 2010, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.
48. Müller, M. and M. Wubbolts, *Biotransformation Methods for Preparing Chiral Drugs and Drug Intermediates*. Chirality in Drug Research, 2006. **33**: p. 95-123.
49. Chankvetadze, B., *Capillary electrophoresis in chiral analysis*. 1997: John Wiley & Sons.
50. Pálovics, E., F. Faigl, and E. Fogassy, *Separation of the mixtures of chiral compounds by crystallization*. Advances in Crystallization Processes, 2012. **3**.
51. Terabe, S., K. Otsuka, and H. Nishi, *Separation of enantiomers by capillary electrophoretic techniques*. Journal of Chromatography A, 1994. **666**(1-2): p. 295-319.

## Référence bibliographique

---

52. Ingole, P.G. and N.P. Ingole, *Methods for separation of organic and pharmaceutical compounds by different polymer materials*. Korean Journal of Chemical Engineering, 2014. **31**: p. 2109-2123.
53. Keurentjes, J., L. Nabuurs, and E. Vegter, *Liquid membrane technology for the separation of racemic mixtures*. Journal of Membrane Science, 1996. **113**(2): p. 351-360.
54. Miao, L., et al., *Chiral resolution by polysulfone-based membranes prepared via mussel-inspired chemistry*. Reactive and Functional Polymers, 2017. **115**: p. 87-94.
55. Rochette, J.-F., *Développement de biocapteurs ampérométriques de troisième génération à partir de nanotubes de carbone*. 2004: École Polytechnique de Montréal.
56. Beesley, T.E. and R.P. Scott, *Chiral chromatography*. 1999: John Wiley & Sons.
57. Berthod, A., *Chiral recognition mechanisms*. 2006, ACS Publications.
58. Sardou, F., *Fabrication industrielle de principes actifs pharmaceutiques par séparation chirale et racémisation: compétitivité mondiale par rapport aux voies de synthèse énantiosélective*. 2014, Université de Lorraine.
59. Lakhlifi, M., *Conception et évaluation de phases stationnaires chirales pour l'emploi en électrochromatographie capillaire (Tubes ouverts et colonnes monolithes)*. 2017, Normandie Université.
60. Morin, P. *Séparation de molécules pharmaceutiques chirales par les techniques chromatographiques et électrophorétiques*. in *Annales pharmaceutiques françaises*. 2009. Elsevier.
61. Schmid, M.G., et al., *Enantioseparation by ligand-exchange using particle-loaded monoliths: capillary-LC versus capillary electrochromatography*. Journal of biochemical and biophysical methods, 2007. **70**(1): p. 77-85.
62. Szejtli, J., *Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry*. Chemical reviews, 1998. **98**(5): p. 1743-1754.
63. Popielec, A. and T. Loftsson, *Effects of cyclodextrins on the chemical stability of drugs*. International Journal of Pharmaceutics, 2017. **531**(2): p. 532-542.
64. Pedersen, C.J., *Cyclic polyethers and their complexes with metal salts*. Journal of the American Chemical Society, 1967. **89**(26): p. 7017-7036.
65. Berkecz, R., et al., *Liquid chromatographic enantioseparations utilizing chiral stationary phases based on crown ethers and cyclofructans*. Molecules, 2021. **26**(15): p. 4648.
66. Hyun, M.H., *Liquid chromatographic enantioseparations on crown ether-based chiral stationary phases*. Journal of Chromatography A, 2016. **1467**: p. 19-32.
67. Ilisz, I., R. Berkecz, and A. Péter, *Retention mechanism of high-performance liquid chromatographic enantioseparation on macrocyclic glycopeptide-based chiral stationary phases*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(10): p. 1845-1860.
68. Ilisz, I., et al., *Enantioseparations by high-performance liquid chromatography using macrocyclic glycopeptide-based chiral stationary phases: an overview*. Chiral Separations: Methods and Protocols, 2013: p. 137-163.
69. Hsieh, M.-L., L.-K. Chau, and Y.-S. Hon, *Single-step approach for fabrication of vancomycin-bonded silica monolith as chiral stationary phase*. Journal of Chromatography A, 2014. **1358**: p. 208-216.
70. Ward, T.J. and A.B. Farris Iii, *Chiral separations using the macrocyclic antibiotics: a review*. Journal of Chromatography A, 2001. **906**(1-2): p. 73-89.
71. Haginaka, J. and H. Matsunaga, *Separation of enantiomers on HPLC chiral stationary phases based on human plasma alpha1-acid glycoprotein: effect of sugar moiety on chiral recognition ability*. Enantiomer, 2000. **5**(1): p. 37-45.
72. Cârje, A.G., et al., *Enantioseparation of indapamide by high performance liquid chromatography using ovomucoid glycoprotein as chiral selector*. Farmacia, 2016. **64**: p. 181-186.
73. Chrysanthakopoulos, M., et al., *Investigation of the retention behavior of structurally diverse drugs on alpha1 acid glycoprotein column: Insight on the molecular factors involved and correlation with protein binding data*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014. **60**: p. 24-31.
74. Dzema, D., L. Kartsova, and D. Kapizova, *Hyperbranched polymers based on polyethyleneimine with terminal oligosaccharide groups as new chiral selectors in high-performance thin-layer chromatography*. Journal of analytical chemistry, 2015. **70**: p. 1023-1030.
75. Blaschke, G., *Chromatographic resolution of chiral drugs on polyamides and cellulose triacetate*. Journal of liquid chromatography, 1986. **9**(2-3): p. 341-368.

## Référence bibliographique

---

76. Okamoto, Y., *Chiral polymers for resolution of enantiomers*. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 2009. **47**(7): p. 1731-1739.
77. Tilottama, B. and K. Vijayakrishna, *Synthetic helical polymers: An overview on synthesis and their chiral separation efficiency*. European Polymer Journal, 2024: p. 113071.
78. Zhang, T., D. Nguyen, and P. Franco, *Enantiomer resolution screening strategy using multiple immobilised polysaccharide-based chiral stationary phases*. Journal of Chromatography A, 2008. **1191**(1-2): p. 214-222.
79. Dallochio, R., et al., *Molecular Dynamics Simulations of Amylose-and Cellulose-Based Selectors and Related Enantioseparations in Liquid Phase Chromatography*. Molecules, 2023. **28**(21): p. 7419.
80. Lecoeur-Lorin, M., *Intérêt du détecteur à dichroïsme circulaire en chromatographie liquide et du détecteur conductimétrique à couplage capacitif en électrophorèse capillaire pour l'analyse de molécules chirales. Applications aux composés pharmaceutiques et aux pesticides*. 2008, Université d'Orléans.
81. Yashima, E., et al., *Computational studies on chiral discrimination mechanism of cellulose trisphenylcarbamate*. Journal of Chromatography A, 1995. **694**(2): p. 347-354.
82. Chankvetadze, B., *Polysaccharide-based chiral stationary phases for enantioseparations by high-performance liquid chromatography: an overview*. Chiral separations: methods and protocols, 2019: p. 93-126.
83. Meyer, V.R., *Practical high-performance liquid chromatography*. 1994: John Wiley & Sons Inc.
84. Kazakevich, Y.V. and R. Lobrutto, *HPLC for pharmaceutical scientists*. 2007: John Wiley & Sons.
85. Hargittai, I., *The road to Stockholm: Nobel Prizes, science, and scientists*. 2002: Chemical Heritage Foundation.
86. Altova, E.P. and I. Hargittai, *Mikhail S. Tsvet—pioneer of chromatography—150 years from his birth*. 2022, Springer. p. 1-3.
87. Ahuja, S. and M. Dong, *Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC*. 2005: Elsevier.
88. McPolin, O., *An introduction to HPLC for pharmaceutical analysis*. 2009: Lulu. com.
89. Lough, W.J. and I.W. Wainer, *High performance liquid chromatography: fundamental principles and practice*. 1995: cRc press.
90. Chan, J., *Conception et études d'assemblages supramoléculaires conducteurs à base d'ADN G-quadruplexe contraint*. 2021, Université Grenoble Alpes.
91. Dong, M.W., *Modern HPLC for practicing scientists*. 2006: John Wiley & Sons.
92. Dong, M.W., *HPLC and UHPLC for Practicing Scientists*. 2019: John Wiley & Sons.
93. Ahuja, S., *Selectivity and detectability optimizations in HPLC*. Vol. 140. 1989: John Wiley & Sons.
94. MANGA, A.M. and J.K. SUNGULA, *Détermination par la chromatographie liquide à haute performance (CLHP)-détecteur à barrettes de Diode DAD-Spectrométrie de masse (SM) de dix anthocyanes principaux des feuilles pourpres de Canna indica Linn (1753)*. Afrique SCIENCE, 2023. **22**(1): p. 11-24.
95. Schwarz, E.L., W.L. Roberts, and M. Pasquali, *Analysis of plasma amino acids by HPLC with photodiode array and fluorescence detection*. Clinica Chimica Acta, 2005. **354**(1-2): p. 83-90.
96. Carpentier, G., *Étude du comportement d'un détecteur électrochimique voltampérométrique: conception originale d'une détection voltampérométrique différentielle en opposition couplée à un HPLC pour des applications en neurobiologie*. 1986, Paris 11.
97. Meyer, V.R., *Practical high-performance liquid chromatography*. 2013: John Wiley & Sons.
98. Ermer, J. and J.H.M. Miller, *Method validation in pharmaceutical analysis: A guide to best practice*. 2006: John Wiley & Sons.
99. Standard, B., *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*. EN ISO/IEC, 2006. **17025**: p. 42.
100. Swartz, M.E. and I.S. Krull, *Handbook of analytical validation*. 2012: CRC Press.
101. Branch, S.K., *Guidelines from the international conference on harmonisation (ICH)*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2005. **38**(5): p. 798-805.
102. Chkirida, B., *Le système de management qualité en industrie pharmaceutique: cas d'un établissement pharmaceutique industriel marocain*. 2020.
103. Parr, M.K. and A.H. Schmidt, *Life cycle management of analytical methods*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2018. **147**: p. 506-517.

## Référence bibliographie

---

104. Guideline, I.H.T. *Text on validation of analytical procedures*. in *International Conference on Harmonization, Geneva*. 1994.
105. Guideline, I.H.T., *Validation of analytical procedures: text and methodology*. Q2 (R1), 2005. **1**(20): p. 05.
106. Papageorgiou, S., et al., *Development and validation of a reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the quantitation and stability of  $\alpha$ -lipoic acid in cosmetic creams*. *International Journal of Cosmetic Science*, 2020. **42**(3): p. 221-228.
107. K.Chahinez, «Optimisation des conditions chromatographiques optimales pour la séparation chirale d'ibuprofène par HPLC» : thèse de l'Université Saad Dahleb (blida), 2023.