

**UNIVERSITE DE MONASTIR TUNISIE  
UNIVERSITE PARIS DESCARTES FRANCE  
FACULTE DE PHARMACIE DE MONASTIR  
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET  
BIOLOGIQUES PARIS DESCARTES**



Année universitaire 2014/2015



N° d'ordre.....

**THESE**

Présenté pour l'obtention du grade de  
DOCTEUR EN SCIENCES PHARMACEUTIQUES DE L'UNIVERSITE DE  
MONASTIR ET L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Par

**Mme Inès GANA**

Titre de la thèse

**« Caractérisation physique et chimique des  
substances à activité thérapeutique. Application aux  
études de profil de stabilité et de préformulation »**

**Thèse co-dirigée par : Professeur Fethi SAFTA**

**Docteur Ivo RIETVELD**

**Soutenue le : 21/05/2015 à Paris**

**JURY :**

Pr. Viatcheslav AGAFONOV,.....Rapporteur  
Pr. Siro TOSCANI,.....Rapporteur  
Pr. Fethi SAFTA,.....Co-Directeur  
Dr. Ivo RIETVELD,.....Co-Directeur  
Pr. Fathi MOUSSA,.....Membre  
MCU. Mohamed Salah BILKHIRIA,.....Membre

## Dédicaces

Je souhaite rendre hommage à :

Ma chère regrettée mère

Mon cher papa : ma vie

Ma sœur Chiraz : ma joie

Mon frère Ali : mon soutien

Chouchou et Fattoum : mon avenir

Toute ma famille : ma fierté

Je vous dois mon succès, je vous dédie ma carrière.

Les mots seuls ne peuvent exprimer l'amour que je porte pour vous.

A mes amis à Paris qui m'ont soutenue pendant toutes ces années : Amine, Stoura, Ghassen, Zina, Asma, Nesrina. Je ne trouve pas les mots pour vous remercier. Merci tout simplement d'être là.

A mes amis à Tunis : Hichem et Mourid. Merci d'avoir supporté mes caprices, de m'avoir apporté le sourire et d'être toujours présents quand j'ai besoin de vous.

A Ayako, merci pour ton amitié.

## Remerciements

Ce travail est le résultat d'une collaboration entre le Laboratoire de Physico-Chimie Industrielle du Médicament de l'Université Paris Descartes, le Département Laboratoires de l'Etablissement Pharmaceutiques des Hôpitaux de Paris, le Laboratoire de Chimie Analytique de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Monastir et le Département de Physique et Ingénierie Nucléaire de l'Escola Tecnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona.

Je souhaite remercier ici toutes les personnes qui m'ont accompagnée dans ce parcours et aidée à l'accomplissement de ce travail.

Je tiens tout d'abord à remercier mes deux chers directeurs, Messieurs Ivo B. RIETVELD et Fethi SAFTA pour avoir accepté de diriger ce travail et de s'être investi dans mon encadrement. Merci Monsieur le Docteur Ivo B. Rietveld (Laboratoire de Physico-Chimie Industrielle du Médicament, Université Paris Descartes) pour tout ce que vous m'avez appris, pour votre disponibilité et votre compréhension. Merci Monsieur le Professeur Fethi SAFTA (Laboratoire de Chimie Analytique de la Faculté de Pharmacie de Monastir, Université de Monastir) pour vos conseils, votre soutien et votre aide précieuse. Je me permets de vous déclarer mon estime pour la qualité de votre savoir, votre encadrement et votre accompagnement tout au long de ce parcours.

Je remercie Monsieur le Docteur Bernard DO (Département Laboratoires de l'Etablissement Pharmaceutiques des Hôpitaux de Paris) qui est à l'initiative de ce projet, qui m'a accueillie dans son laboratoire et qui n'a cessé de m'apporter de l'aide pour pouvoir réaliser et accomplir tous les travaux. Veuillez trouver dans ces lignes le témoignage de ma reconnaissance et ma gratitude.

Je remercie Monsieur le Professeur René Céolin (Laboratoire de Physico-Chimie Industrielle du Médicament, Université Paris Descartes) de s'être impliqué dans mon apprentissage, d'avoir trouvé de temps pour me guider et de m'avoir permis de s'ouvrir au monde de la recherche.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Viatcheslav AGAFONOV (Université François Rabelais, Tours) d'avoir porté de l'intérêt à mes recherches et d'avoir accepté de les évaluer.

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur Siro TOSCANI (Université Rennes 1) d'avoir accordé de l'importance à mon travail et d'avoir accepté de l'examiner.

Je remercie vivement Monsieur le Professeur Fathi MOUSSA (Université Paris Sud, Orsay) d'avoir accepté de juger ce travail. Je vous suis reconnaissante pour les conseils que vous m'avez donnés et les améliorations que vous m'avez proposées.

Je remercie vivement Monsieur le Docteur Mohamed Salah BELKHIRIA (Université de Sousse, Hammam Sousse) d'avoir accepté de juger ce travail. J'espère profondément avoir la chance de collaborer avec vous à l'avenir.

Je tiens aussi à remercier Monsieur le Professeur Josep Lluís Tamarit (Département de Physique et Ingénierie Nucléaire de l'Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona) de m'avoir accueillie dans son laboratoire ainsi que toute son équipe, en particulier Madame Maria BARRIO, Lolla, Carla, pour leur gentillesse et leur générosité. Je leur suis reconnaissante pour leur collaboration et leur investissement.

Je remercie toute l'équipe de l'UA 4066 en particulier Annabelle DUGAY, Nathalie MAHE et Béatrice NICOLAI pour leur aide précieuse. Ce fut pour moi un plaisir de travailler avec vous. Veuillez croire à mon estime à l'égard de votre compétence chacune dans votre domaine. Sans vous ce travail ne serait pas ce qu'il est.

Un grand merci à toute l'équipe du département Laboratoires de l'Ageps en particulier à Romain ROTIVAL, Gaëtan BOCADIFUOCCO, Carine GHADDAR, Théo HENRIET, Christelle DE LA ROBERDIA pour leur aide précieuse et leur soutien moral.

Je remercie vivement mes supérieurs au Laboratoire de Chimie Analytique de la Faculté de pharmacie de Monastir, Monsieur Mohamed KALLEL et Monsieur Farhat FARHAT, ainsi que tous mes collègues Inès, Amel et Hanène qui se donnaient de la peine pour me remplacer pendant mon absence.

Je remercie particulièrement Monsieur le Professeur Abderrazak Lehdhili (Chef de Service Laboratoire du Centre d'Assistance Médicale Urgente et de Réanimation), Madame Souad SFAR (ancienne Doyenne de la Faculté de Pharmacie de Monastir) et Monsieur Habelhalim TRABELSI (nouveau Doyen de la Faculté de Pharmacie de Monastir) pour m'avoir autorisée à s'absenter pendant des périodes longues et de m'avoir accordé des bourses me permettant ainsi d'accomplir ce travail. Merci pour votre soutien et vos encouragements.

Je remercie tous mes collègues du Service Laboratoire du Centre d'Assistance Médicale Urgente et de Réanimation qui m'ont toujours soutenue en particulier Dorra, Anouar, Manel, Fethia, Dorra, hayet, Amel, Hajer, Samia, Lamia.

Je remercie infiniment toutes les personnes des différentes administrations impliquées dans l'aboutissement de mon projet : Secrétariat de l'école doctorale ED436, Secrétariat du Laboratoire de chimie Analytique de la Faculté de Pharmacie de Monastir (Salwa), Secrétariat de la Faculté de Pharmacie de Monastir (Madame Hayet et Fériel), les différentes autorités (Chokri, Faouzi).

## **Caractérisation physique et chimique des substances à activité thérapeutique.**

### **Application aux études de profil de stabilité et de préformulation.**

#### **Résumé :**

Le développement d'un médicament pour une cible thérapeutique donnée passe par plusieurs étapes qui se résument en une étape de criblage, une phase préclinique et plusieurs phases cliniques. Ces étapes permettent de sélectionner une substance active et de démontrer son efficacité thérapeutique et sa sécurité toxicologique. Ces deux critères définissent la qualité du médicament qui, une fois démontrée, doit être garantie pendant toute sa durée de validité. La qualité est évaluée au moyen d'études de stabilité qui sont réalisées d'abord sur la matière première de la substance active au cours de la phase de pré-développement du médicament, ensuite sur le produit fini. La stabilité intrinsèque de la substance active concerne à la fois ses propriétés chimiques et ses propriétés physiques qui sont liées à la nature de la substance. L'étude de stabilité repose d'abord sur la caractérisation de ces propriétés, et ensuite sur l'étude de la sensibilité de la substance à l'égard des facteurs environnementaux pouvant modifier les propriétés intrinsèques de la substance.

L'approche adoptée dans ce travail repose d'une part sur l'évaluation de la stabilité chimique c'est à dire de la réactivité chimique des substances à usage pharmaceutique au travers des études de pureté chimique et des études de dégradation forcée de ces substances en solution, et d'autre part, sur l'évaluation de la stabilité physique. Dans ce cadre, l'étude du polymorphisme cristallin revêt une grande importance, tout comme l'aptitude à la formation d'hydrates ou de solvates. Cette étude, basée sur la thermodynamique, consiste pour l'essentiel à construire un diagramme de phases pression-température permettant de définir les domaines de stabilité relative des différentes formes cristallines.

Cinq substances actives, existant à l'état solide et entrant dans la composition de médicaments administrés par voie orale, ont été étudiées dans le cadre de ce travail. L'analyse chimique du tienoxolol, présentant un effet anti-hypertenseur, a montré qu'il est très sensible à l'hydrolyse et à l'oxydation. Sept produits de dégradation ont été identifiés pour ce produit dont un schéma probable de fragmentation a été établi. Des diagrammes de phases pression-température ont été construits pour le bicalutamide et le finastéride, médicaments du cancer de prostate, en utilisant une approche topologique basée simplement sur les données disponibles dans la littérature. Cette étude a montré que la relation thermodynamique (énantiotropie ou monotropie) entre les formes

crystallines sous conditions ordinaires peut être modifiée en fonction de la température et de la pression. Ce résultat est important pour la production des médicaments car il montre comment une telle information peut être obtenue par des mesures simples et accessibles aux laboratoires de recherche industrielle, sans que ces derniers soient contraints d'expérimenter sous pression. La méthode topologique de construction de diagramme de phases a été validée ensuite en la comparant à une méthode expérimentale consistant à suivre, par analyse thermique, des transitions de phases en fonction de la pression. La méthode expérimentale a été appliquée à deux composés, la benzocaïne, anesthésique local, et le chlorhydrate de cystéamine, médicament utilisé pour les cystinoses. Les deux formes étudiées de benzocaïne présentent une relation énantiotrope qui se transforme en relation monotrope à haute pression. Une nouvelle forme cristalline (forme III) du chlorhydrate de cystéamine a été découverte au cours de ce travail. La relation thermodynamique entre cette forme III et la forme I est énantiotrope dans tout le domaine de température et de pression. De plus, le chlorhydrate de cystéamine, classé hygroscopique, a fait l'objet d'une étude quantitative de sa sensibilité à l'eau, montrant qu'il devient délquiescent sans formation préalable d'hydrate. Enfin, une étude combinée d'analyses thermique et chromatographique a montré que, sous l'effet de la température, il se transforme en cystamine, impureté majeure de la cystéamine.

En conclusion, l'approche développée dans ce travail a permis de caractériser les propriétés des substances actives étudiées et de déterminer les différents facteurs pouvant les modifier et donc en influencer la stabilité intrinsèque. La construction de diagramme de phases pression-température constitue un outil permettant de décider sans ambiguïté quelle forme cristalline doit être choisie pour être développée. Cette construction permet également de prédire la stabilité de cette forme tout au long de la fabrication et du stockage du produit commercialisé. Les diagrammes ainsi construits ne donnent toutefois que la stabilité relative d'une forme par rapport à une autre sans exclure l'éventuelle existence et donc l'apparition d'une autre forme, non connue, qui pourrait être plus stable. La caractérisation physico-chimique de la substance active ainsi établie revêt une importance primordiale pour garantir la qualité du produit fini et la maintenir constante pendant toute la durée de validité du médicament correspondant. Cette caractérisation conditionne d'une part la prise de brevet et la constitution d'un dossier pharmaceutique de la matière active, et d'autre part, le choix de la formulation galénique et du procédé de fabrication industriel, les conditions de stockage et de transport de la matière première et du produit fini et la stratégie de contrôle de qualité.

# Sommaire

CHAPITRE 1. INTRODUCTION.....	1
1.1. Développement des médicaments .....	2
1.2. Stabilité et pureté des médicaments .....	3
1.3. Cadre réglementaire .....	4
1.4. Approche générale.....	7
REFERENCES .....	9
CHAPITRE 2. ASPECTS THEORIQUES.....	11
2.1. Brefs rappels thermodynamiques .....	13
2.2. Polymorphisme et considérations pharmaceutiques .....	23
2.3. Notions fondamentales concernant la stabilité physique .....	30
2.4. Notions fondamentales concernant la stabilité chimique .....	45
REFERECES .....	50
CHAPITRE 3. MATERIELS ET METHODES.....	57
3.1. Matériels.....	58
3.2. Protocole de dégradation forcée .....	59
3.3. Méthodes de l'analyse chimique .....	59
3.4. Méthodes de l'analyse thermique.....	67
3.5. Méthodes d'étude des interactions avec l'eau .....	77
3.6. Analyse par diffraction des rayons X .....	80
REFERENCES .....	84
CHAPITRE 4. EVALUATION DE LA STABILITE CHIMIQUE DU TIENOXOLOL.....	86
4.1. Introduction .....	87
4.2. Etude de la dégradation forcée du tienoxolol .....	88
4.3. Caractérisation des différents produits de dégradation et élaboration des différents schémas de fragmentations.....	94
4.4. Schéma réactionnel des voies de dégradation de tienoxolol .....	107
4.5. Conclusions .....	109
REFERENCES .....	110
CHAPITRE 5. EVALUATION DE LA STABILITE PHYSIQUE DES POLYMORPHES AU MOYEN DES DIAGRAMMES TOPOLOGIQUES PRESSION-TEMPERATURE :	
CAS DUBICALUTAMIDE.....	112
5.1. Introduction .....	113



5.2.	Données de la littérature.....	113
5.3.	Analyse des données de la littérature .....	115
5.4.	Construction topologique du diagramme de phases P-T du bicalutamide .....	116
5.5.	Hierarchie et domaine de stabilité des deux polymorphes .....	124
5.6.	Conclusions .....	125
	REFERENCES .....	127
CHAPITRE 6. EVALUATION DE LA STABILITE PHYSIQUE DES POLYMORPHES AU MOYEN DES DIAGRAMMES TOPOLOGIQUES PRESSION-TEMPERATURE : CAS DU FINASTERIDE. ....		
		129
6.1.	Introduction .....	130
6.2.	Données de la littérature.....	130
6.3.	Analyse des données de la littérature .....	133
6.4.	Construction topologique du diagramme P-T du finastéride .....	134
6.5.	Conclusions .....	143
	REFERENCES .....	144
CHAPITRE 7. EVALUATION DE LA STABILITE PHYSIQUE DES FORMES II ET III DE LA BENZOCAÏNE PAR DES MESURES EXPERIMENTALES ET PAR APPROCHE TOPOLOGIQUE.....		
		146
7.1.	Introduction .....	147
7.2.	Données de la littérature.....	148
7.3.	Analyse des données de la littérature et estimation de la température de fusion de la forme III .....	152
7.4.	Analyse expérimentale .....	152
7.5.	Construction topologique du diagramme de phases P-T de la benzocaïne .....	159
7.6.	Conclusions .....	168
	REFERENCES .....	170
CHAPITRE 8. EVALUATION DE LA STABILITE CHIMIQUE ET DE LA STABILITE PHYSIQUE PAR MESURES EXPERIMENTALES ET PAR APPROCHE TOPOLOGIQUE DU CHLORHYDRATE DE CYSTEAMINE. ....		
		172
8.1.	Introduction .....	174
8.2.	Données de la littérature.....	175
8.3.	Résultats .....	177
8.4.	Discussion .....	192
8.5.	Conclusions .....	203

REFERENCES .....	205
CHAPITRE 9. CONCLUSIONS. ....	206
REFERNCES.....	213

## Liste des Figures

Figure 1-1. Principales phases de la conception d'un médicament.....	2
Figure 2-1-1. Transformation d'un système.....	17
Figure 2-1-2. Changement d'état d'un corps.....	18
Figure 2-1-3. Diagramme de phases (P, T) d'un corps pur.....	22
Figure 2-1-4. Equilibre entre deux phases dans un diagramme P-T et relations entre leurs enthalpies libres.....	22
Figure 2-2-1. Différentes formes sous lesquelles peut se rencontrer une substance [2.2] .....	24
Figure 2-2-2. Différentes formes que peut présenter une substance active .....	25
Figure 2-2-3. Arbre décisionnel étudiant la nécessité de fixer des critères d'acceptation pour le polymorphisme dans la substance médicamenteuse [2.19].....	28
Figure 2-2-4. Arbre décisionnel étudiant la nécessité de fixer des critères d'acceptation pour le polymorphisme dans le produit fini [2.19].....	29
Figure 2-3-1. Les quatre diagrammes P-T possibles pour un cas de dimorphisme cristallin [2.38] .....	32
Figure 2-3-1bis. Représentation des domaines d'existence des solides I et II dans le cas illustré par la figure 2c .....	33
Figure 2-3-2. Diagramme énergie libre de Gibbs -température d'un système hypothétique A-B-L (solides A et B, liquide L) et ses relations de phases sous conditions ordinaires.....	39
Figure 2-3-3. Diagramme de phases P-T montrant les positions relatives des domaines des phases solide, liquide et vapeur.....	43
Figure 3-1. Schéma d'une chaîne HPLC avec ces principaux constituants.....	62
Figure 3-2. Différentes parties constituant un spectromètre de masse.....	65
Figure 3-3. Schématisation de la méthode DSC à compensation de puissance (gauche) et DSC à flux de chaleur (droite) .....	70

Figure 3-4. Thermogramme DSC présentant une transition vitreuse ( <i>glass transition</i> ), une cristallisation ( <i>crystallization</i> ) et une fusion ( <i>melting</i> ) (température de fusion : $T_{\text{onset}}$ ou température commençante) .....	71
Figure 3-5. Schéma d'un bloc calorimétrique .....	72
Figure 3-6. Description de la connexion entre le capillaire contenant le liquide comprimé qui arrive à travers le raccordement latéral et le thermocouple introduit à travers le raccordement supérieur, le tout plongeant dans les cellules de mesure contenues dans le bloc calorimétrique.....	73
Figure 3-7. Equipement d'analyse thermique différentielle à haute pression du Laboratoire de Caractérisation des Matériaux à l'Université Polytechnique de Catalogne (Barcelone) .....	74
Figure 3-8. Capsule en étain utilisée en analyse thermique différentielle à haute pression.....	75
Figure 3-9. Principe de fonctionnement d'un appareil de gravimétrie DVS.....	79
Figure 3-10. Diffraction des rayons X par un cristal selon la loi de Bragg .....	82
Figure 4-1. Structure chimique du tienoxolol .....	87
Figure 4-2. Chromatogrammes correspondants au tienoxolol et à ses produits de dégradation (DP) .....	90
Figure 4-3. Courbes de dégradation du tienoxolol (1/C) en fonction de la durée d'exposition (t) pour les différents agents de stress .....	93
Figure 4-4. Spectres de masse du tienoxolol (TXL) et de ses différents produits de dégradation .....	95
Figure 4-5. Spectre $MS^2$ de l'ion moléculaire de tienoxolol.....	96
Figure 4-6. Schéma de fragmentations ESI- $MS^n$ proposé pour l'ion protoné à $m/z = 421$ correspondant au tienoxolol .....	97
Figure 4-7. Spectre $MS^2$ de l'ion moléculaire de DP1 .....	98
Figure 4-8. Comparaison des profils de fragmentation des ions protonés à $m/z = 421$ correspondant au tienoxolol et à $m/z = 393$ correspondant à DP1 .....	99
Figure 4-9. Structure chimique proposée pour DP1 et sa formation par hydrolyse du tienoxolol.....	99
Figure 4-10. Spectre $MS^2$ de l'ion moléculaire de DP2.....	100
Figure 4-11. Structure chimique et schéma de fragmentations ESI- $MS^n$ proposés pour l'ion protoné à $m/z = 365$ correspondant à DP2 .....	101
Figure 4-12. Structure chimique proposée pour DP3 et sa formation à partir de DP1 .....	101

Figure 4-13. Comparaison des deux spectres MS <sup>2</sup> des ions moléculaires de DP3 et de DP1 .....	102
Figure 4-14. Spectre MS <sup>2</sup> de l'ion moléculaire de DP4 .....	102
Figure 4-15. Structure chimique proposée pour DP4 .....	103
Figure 4-16. Spectre MS <sup>2</sup> de l'ion moléculaire de DP5 .....	103
Figure 4-17. Structure chimique proposée pour DP5 .....	104
Figure 4-18. Spectre MS <sup>2</sup> de l'ion moléculaire de DP6 .....	104
Figure 4-19. Structure chimique et schéma de fragmentations ESI-MS <sup>n</sup> proposés pour l'ion protoné à m/z = 288 correspondant à DP6 .....	105
Figure 4-20. Spectre MS <sup>2</sup> de l'ion moléculaire de DP7 .....	105
Figure 4-21. Structure chimique et schéma de fragmentations ESI-MS <sup>n</sup> proposés pour l'ion protoné à m/z = 531 correspondant à DP7 .....	106
Figure 4-22. Structures proposées des différents produits de dégradation de tienoxolol .....	107
Figure 4-23. Voies de dégradation de la molécule de tienoxolol en solution .....	108
Figure 5-1. Formule chimique développée du bicalutamide .....	113
Figure 5-2. Positionnement des points de fusion, assimilés à des points triples, sur la courbe représentant l'équilibre liquide-vapeur (L-V) .....	117
Figure 5-3. Cycle thermodynamique (cycle de Hess) "vapeur-solide-liquide" autour d'un point triple Solide-Liquide-Vapeur .....	118
Figure 5-4. Positionnement des courbes des équilibres solide-liquide dans le diagramme P-T et leur intersection (point triple) à haute pression .....	121
Figure 5-5. Placement de l'équilibre solide-solide I-II .....	122
Figure 5-6. Localisation du point triple I-II-V dans le diagramme P-T du bicalutamide .....	123
Figure 5-7. Diagramme topologique présentant les relations thermodynamiques de phases du bicalutamide .....	124
Figure 5-8. Domaines de stabilité des différentes phases du bicalutamide et illustration schématique de l'influence de la pression sur son dimorphisme .....	126
Figure 6-1. Formule chimique développée du finastéride .....	130
Figure 6-2. Positions relatives des deux formes I et II du finastéride dans le diagramme P-T .....	135
Figure 6-3. Positions relatives des points triples I-II-Vap, I-L-Vap et II-L-Vap .....	136

Figure 6-4. Positions relatives des deux formes solides du finastéride autour de l'équilibre de transition I-II .....	138
Figure 6-5. Positions des différents équilibres de phases du finastéride dans le diagramme P-T .....	140
Figure 6-6. Diagramme topologique P-T du finastéride .....	141
Figure 6-7. Diagramme topologique P-T du finastéride incluant une représentation schématique des équilibres comportant la phase vapeur (V) .....	142
Figure 6-8. Régions de stabilité des différentes phases (solide I, solide II, liquide et vapeur) du finastéride dans le diagramme de phases pression-température.....	143
Figure 7-1. Structure chimique de la benzocaïne, $C_9H_{11}NO_2$ , $M = 165,19 \text{ g mol}^{-1}$ .....	147
Figure 7-2. Estimation de la variation des volumes spécifiques des formes I (cercles), II (carrés) et III (losanges) en fonction de la température à partir des données de la littérature .....	149
Figure 7-3. Thermogramme, obtenu à $10 \text{ K min}^{-1}$ , d'un échantillon de benzocaïne montrant la transition III→II et la fusion de la forme II .....	153
Figure 7-4. Diagrammes de diffractions des rayons X obtenus à différentes températures avec une poudre de benzocaïne .....	156
Figure 7-5. Endothermes de la fusion de la forme II obtenus à différentes pressions par analyse thermique différentielle à haute pression (HP-DTA) .....	157
Figure 7-6. Endothermes de la transition III→II obtenus à différentes pressions par analyse thermique différentielle à haute pression (HP-DTA) .....	157
Figure 7-7. Représentation des équilibres III-II (cercles pleins) et II-L (cercles vides) .....	158
Figure 7-8. Positionnement du point triple III-II-L dans le diagramme de phase P-T du polymorphisme de la benzocaïne .....	161
Figure 7-9. Position de l'équilibre III-L dans le diagramme de phases topologique P-T de la benzocaïne .....	165
Figure 7-10. Courbes de sublimation des deux formes solides II et III dans le diagramme de phases topologique P-T de la benzocaïne.....	167
Figure 7-11. Diagramme de phases topologique pression-température complet montrant la hiérarchie de stabilité des polymorphes III et II de la benzocaïne et présentant toutes les courbes d'équilibres et les points triples entre les phases III, II, L et Vap.....	168

Figure 8-1. Cystéamine, produit de dégradation la cystine et intermédiaire de synthèse de la taurine.....	174
Figure 8-2. Structure chimique développée du chlorhydrate de cystéamine .....	174
Figure 8-3. Diagramme de diffraction X de la poudre de la forme triclinique, d'après sa structure résolue à 145 K.....	176
Figure 8-4. Diagramme de diffraction X de la poudre de la forme monoclinique d'après sa structure résolue à 173 K.....	177
Figure 8-5. Thermogramme d'un échantillon de chlorhydrate de cystéamine, enregistré avec une vitesse de chauffage de 2 K min <sup>-1</sup> .....	177
Figure 8-6. Comportement thermique d'un échantillon commercial de chlorhydrate de cystéamine .....	178
Figure 8-7. Variation de la température des deux endothermes enregistrés lors du premier chauffage d'un échantillon commercial de chlorhydrate de cystéamine en fonction de la vitesse de chauffage .....	179
Figure 8-8. Comparaison des diffractogrammes d'un échantillon commercial de chlorhydrate de cystéamine .....	180
Figure 8-9. Comparaison des diffractogrammes calculés de la forme II triclinique (en rouge) et de la forme I monoclinique (en bleu) avec celui obtenu après chauffage jusqu'à 318 K puis refroidissement jusqu'à 200 K (en vert).....	181
Figure 8-10. Affinement de Rietveld de la structure cristalline de la forme III du chlorhydrate de cystéamine .....	181
Figure 8-11. Maille élémentaire et empilement cristallin de la forme III du chlorhydrate de cystéamine monoclinique <i>I2/a</i> .....	182
Figure 8-12. Température de transition I→III (cercles bleus) et température de fusion de la forme III (carrés rouges) du chlorhydrate de cystéamine en fonction de la pression appliquée par analyse thermique différentielle à haute pression .....	186
Figure 8-13. Comportement d'un échantillon de chlorhydrate de cystéamine vis-à-vis de la vapeur d'eau lors d'un cycle au cours duquel le taux d'humidité relative varie, à 25 °C, de 0 à 90 % puis de 90 à 0 % .....	188
Figure 8-14. Variation de la masse d'un échantillon de chlorhydrate de cystéamine en fonction du taux d'humidité relative (RH) .....	188
Figure 8-15. Sensibilité du chlorhydrate de cystéamine à la vapeur d'eau à 25 °C.....	189
Figure 8-16. Variation de la masse d'un échantillon de chlorhydrate de cystéamine en fonction du taux de l'humidité relative de 0 à 90 % .....	190

Figure 8-17. Formation de la cystamine par dimérisation de la cystéamine .....	190
Figure 8-18. Fraction de cystamine dans des échantillons de chlorhydrate de cystéamine soumis à l'analyse thermique jusqu'à fusion complète à des vitesses de chauffage croissantes .....	191
Figure 8-19. Les différentes conformations de la cystéamine dans les trois formes cristallines de son chlorhydrate. Dans la forme triclinique II, les deux conformations A et B coexistent .....	192
Figure 8-20. Positions relatives des deux points triples I-III-Vap et III-L-Vap dans le diagramme de phases P-T. (V = vapeur).....	193
Figure 8-21. Volumes spécifiques ( $v$ ) des trois formes cristallines du chlorhydrate de cystéamine en fonction de la température .....	194
Figure 8-22. Positions relatives des formes I et III du chlorhydrate de cystéamine dans le diagramme de phases P-T .....	195
Figure 8-23. Positionnement de l'équilibre de fusion de la forme III du chlorhydrate de cystéamine dans le diagramme de phases P-T .....	196
Figure 8-24. Intersection des deux courbes d'équilibres I-III et III-L .....	197
Figure 8-25. Positionnement du point triple I-L-Vap dans le diagramme de phases P-T du chlorhydrate de cystéamine (V = vapeur) .....	199
Figure 8-26. Positionnement de la droite représentative de l'équilibre diphasé I-L dans le diagramme de phases P-T du chlorhydrate de cystéamine .....	200
Figure 8-27. Diagramme de phases topologique du chlorhydrate de cystéamine incluant les formes I et III.....	203



## Liste des Tableaux

Tableau 2-2-I : Opérations galéniques concernées par les changements polymorphiques [2.14] .....	27
Tableau 4-I : Paramètres chromatographiques du tienoxolol et de ses produits de dégradation après dégradation forcée.....	91
Tableau 4-II : Cinétique de dégradation du tienoxolol sous les différentes conditions de stress étudiées.....	94
Tableau 4-III : RT et m/z de tienoxolol (TXL) et ses produits de dégradation.....	94
Tableau 5-I : Données calorimétriques et cristallographiques disponibles dans la littérature pour les polymorphes I et II du bicalutamide.....	114
Tableau 5-II : Paramètres de maille des polymorphes I et II du bicalutamide disponibles dans la littérature [5.8].....	115
Tableau 5-III : Variables utilisées pour l'approche topologique conduisant à la construction du diagramme de phases du bicalutamide.....	123
Tableau 6-I : Données cristallographiques pour les deux formes du finastéride selon la littérature .....	131
Tableau 6-II : Données calorimétriques associées aux transitions de fusion des deux formes I et II du finastéride et à la transition de la forme I à la forme II selon la littérature .....	132
Tableau 6-III : Paramètres de maille des polymorphes I et II du finastéride disponibles dans la littérature [6.6].....	132
Tableau 6-IV : Données calorimétriques et volumétriques calculées et utilisées pour construire le diagramme topologique P-T du finastéride .....	134
Tableau 6-V : Volumes spécifiques ( $v_{\text{spec}}$ ) des différentes phases solides du finastéride à température ambiante et à leurs points de fusion respectifs, volume spécifique de la phase liquide et les différences entre les volumes spécifiques des phases solide et liquide .....	139
Tableau 6-VI : Données calorimétriques et des formes I et II du finastéride .....	139

Tableau 7-I : Volumes spécifiques ( $v_{\text{spec}}$ ) des différents polymorphes de benzocaïne extraits de la littérature.....	148
Tableau 7-II : Volumes spécifiques ( $v_{\text{spec}}$ ) estimés des différentes formes solides de benzocaïne à température ambiante (298 K).....	149
Tableau 7-III : Données calorimétriques ( $T_{\text{fus}}$ : température de fusion, $\Delta_{\text{fus}}H$ : enthalpie de fusion) extraites de la littérature concernant la fusion de certains des polymorphes de la benzocaïne.....	150
Tableau 7-IV : Chaleurs spécifiques ( $C_p$ ) de la benzocaïne à l'état solide et à l'état liquide	151
Tableau 7-V : Mesures calorimétriques de la benzocaïne obtenues par DSC : températures et enthalpies des transitions solide-solide III→II et solide-liquide II→L (fusion de la forme II) .....	154
Tableau 7-VI : Température de la transition solide-solide en fonction de la vitesse de chauffage .....	154
Tableau 7-VII : Paramètres du réseau et volume spécifique ( $v_{\text{spec}}$ ) de la forme III (basse température, monoclinique $P2_1$ ) de la benzocaïne en fonction de la température .....	155
Tableau 7-VIII : Paramètres du réseau et volume spécifique ( $v_{\text{spec}}$ ) de la forme II (haute température, orthorhombique $P2_12_12_1$ ) de la benzocaïne en fonction de la température .....	155
Tableau 7-IX : Températures et pressions caractéristiques pour les équilibres III-II et II-L .....	158
Tableau 7-X : Données calorimétriques, volumétriques et $dP/dT$ pour les transitions étudiées.....	159
Tableau 7-XI : Données utilisées pour le calcul de la pente de la courbe de l'équilibre de fusion de la forme III (III-L) .....	164
Tableau 7-XII : Coordonnées des points triples dans le diagramme de phases pression-température des formes solides II et III de la benzocaïne .....	167
Tableau 8-I : Données cristallographiques des deux formes du chlorhydrate de cystéamine extraites de la littérature .....	176
Tableau 8-II : Paramètres de maille des polymorphes I et II du chlorhydrate de cystéamine disponibles dans la littérature .....	176
Tableau 8-III : Données calorimétriques ( $T$ : température, $\Delta h$ : enthalpie) correspondant à la transition solide-solide et à la fusion observées sur des échantillons commerciaux de chlorhydrate de cystéamine .....	179

Tableau 8-IV : Facteurs d'accord de l'affinement de Rietveld .....	182
Tableau 8-V : Données cristallographiques obtenues pour la nouvelle forme III du chlorhydrate de cystéamine à température ambiante .....	182
Tableau 8-VI : Paramètres de la maille élémentaire, en fonction de la température, pour la forme I du chlorhydrate de cystéamine .....	183
Tableau 8-VII : Paramètres de la maille élémentaire, en fonction de la température, pour la (nouvelle) forme III du chlorhydrate de cystéamine .....	184
Tableau 8-VIII : Paramètres de la maille élémentaire en fonction de la température pour la forme II triclinique du chlorhydrate de cystéamine .....	185
Tableau 8-IX : Température de transition I→III ( $T_{I\rightarrow III}$ ) et température de fusion de la forme III ( $T_{III\rightarrow L}$ ) du chlorhydrate de cystéamine en fonction de la pression (P) hydrostatique appliquée .....	186

# Chapitre 1.

## Introduction.

CHAPITRE 1. INTRODUCTION.....	1
1.1. Développement des médicaments .....	2
1.2. Stabilité et pureté des médicaments .....	3
1.3. Cadre réglementaire .....	4
1.4. Approche générale.....	7
REFERENCES .....	9

## 1.1. Développement des médicaments

La recherche exploratoire, ou screening, permet de rechercher une ou plusieurs molécules susceptibles de répondre à un besoin donné. A partir de ces molécules, une seule est sélectionnée pour donner lieu à un médicament. Cet aboutissement, connu sous le terme de conception d'un médicament, en anglais "*drug design*", passe par plusieurs étapes et dure une dizaine d'années. Dans l'industrie pharmaceutique, ces étapes peuvent être subdivisés en quatre phases : phase de recherche, phase de développement, phase clinique et phase de mise sur le marché (Figure 1-1).



**Figure 1-1. Principales phases de la conception d'un médicament**

La phase de recherche porte en général sur des milliers de molécules et permet de sélectionner celles qui présentent un intérêt thérapeutique. Ces molécules sélectionnées, seulement une centaine, font par la suite l'objet de tests pour étudier leur innocuité, tolérance et efficacité sur des cellules ou des animaux, l'ensemble de ces tests constituant la phase de développement préclinique et permettant de retenir une seule molécule candidate. Une fois la molécule sélectionnée et brevetée, elle entre dans la phase de développement clinique où elle sera testée sur l'homme par la réalisation d'essais cliniques qui sont de trois types : essais cliniques de phase I, II et III. Les essais cliniques de phase III constituent les essais à grande échelle qui permettent de prouver l'efficacité et la tolérance du médicament. Une fois cette phase validée, un dossier de mise sur le marché du médicament est déposé afin d'autoriser sa commercialisation. Une fois sur le marché, des essais cliniques de phase IV sont menés sur le médicament commercialisé dans le but de rechercher des éventuels effets indésirables non détectés pendant la phase clinique.

Pour réaliser les essais cliniques, des lots pilotes sont fabriqués à partir de la substance active retenue. La mise en forme galénique constitue alors une étape indispensable entre la phase préclinique et la phase clinique. Elle est basée sur des études de préformulation visant à bien connaître le principe actif, sur des études de formulation tenant en compte les excipients nécessaires à la mise au point de la forme galénique retenue et sur des études permettant de mettre au point le procédé de fabrication. L'étape de préformulation est très importante pour le développement du médicament car elle conditionne toute la phase de développement

galénique. Elle inclut la détermination des propriétés physico-chimiques du principe actif (structure cristalline, taille particulière, polymorphisme, solubilité, pKa,...), le contrôle de sa pureté, la recherche des impuretés et des solvants résiduels, l'étude de la sensibilité aux conditions de stress (température, pression, humidité), la définition des propriétés secondaires influencées par les propriétés primaires (vitesse de dissolution, biodisponibilité, stabilité...).

## **1.2. Stabilité et pureté des médicaments**

Les médicaments fabriqués doivent répondre à deux critères, l'efficacité et l'innocuité. Ces deux critères, exigés par les autorités et définissant la qualité du médicament, sont évalués dès la phase préclinique au cours du développement du médicament et sont par la suite prouvés au cours de la phase clinique et même contrôlés après commercialisation. Ces deux critères doivent alors être garantis pendant toute la durée de validité du médicament et ils sont évalués par des études de stabilité qui concernent avant tout le principe actif en tant que matière première puis le médicament en tant que produit fini.

Selon les recommandations et définitions de l'ICH (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use), la stabilité d'un médicament est son aptitude à conserver ses propriétés chimiques, physiques, microbiologiques et biopharmaceutiques dans des limites spécifiées pendant toute sa durée de validité. Les études de stabilité ont alors pour objectif d'évaluer la qualité d'un principe actif ou d'un produit médicamenteux et de donner des informations sur la façon dont leur qualité varie en fonction du temps sous l'effet de divers facteurs environnementaux.

Au cours de la phase de préformulation, la substance active fait l'objet d'étude de pureté et de stabilité visant à déterminer sa stabilité intrinsèque, à identifier ses produits de dégradation, à orienter le choix des méthodes de contrôle de la substance active. Ces études conditionnent aussi les études de stabilité, les méthodes de contrôle, la durée de validité et les conditions de stockage du produit fini.

Etudier la pureté et la stabilité des substances actives dans leurs états solides est indispensable à la fabrication de médicaments « de qualité » destinés à la voie orale. Ces études se basent avant tout sur la caractérisation physique et chimique de ces substances permettant de bien les connaître et de maîtriser toute éventuelle transformation ou dégradation pouvant porter atteinte à « la qualité » du produit fini. C'est l'un des objectifs de cette thèse.

La caractérisation chimique concerne la réactivité chimique de la substance active en solution et consiste à évaluer sa pureté, à rechercher des substances apparentées ou des produits de dégradation sous conditions de stress, à caractériser les éventuelles impuretés présentes et d'établir le schéma de dégradation de cette substance. Cette étude nécessite le recours à des outils d'analyse pertinents permettant de faire une recherche exhaustive afin d'atteindre ces objectifs. A côté de sa réactivité chimique, une substance active en tant que matière première existe généralement sous forme de poudre et donc répond à toutes les propriétés de l'état solide. Elle doit par conséquent faire l'objet d'une étude physique consistant à caractériser sa structure cristalline et à étudier son polymorphisme.

Depuis le cas du ritonavir [1.1, 1.2], les industriels et les autorités réglementaires accordent une grande importance à l'étude du polymorphisme cristallin des substances actives lors de l'étape de préformulation, au point que cette étude doive être incluse dans le dossier pharmaceutique de prise de brevet du médicament correspondant. En effet, le ritonavir, médicament antirétroviral, a été mis sous le marché en 1996 sous une forme solide dénommée ultérieurement forme I. En 1998, le test de dissolution a été trouvé non conforme pour quelques lots de ritonavir commercialisés. Les investigations ont montré l'apparition de nouveaux cristaux de ritonavir ayant précipité au sein de la formulation. Cette nouvelle forme cristalline, moins soluble que la forme initiale, fut ainsi dénommée forme II. Devant cet accident qui suspendit la commercialisation du médicament, une nouvelle formulation bioéquivalente du ritonavir a été développée par l'industrie durant une année d'efforts.

Cette étude du polymorphisme cristallin doit donc être complétée par celle de la stabilité relative des formes cristallines afin d'orienter le choix de la forme la plus adaptée à la commercialisation. Cette étude fait alors appel à la thermodynamique des équilibres entre phases qui permet d'établir les conditions (thermodynamiques) de stabilité des différentes formes et d'identifier la forme stable dans le domaine d'utilisation commerciale du produit pharmaceutique.

### **1.3. Cadre réglementaire**

En 1979, Un comité de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) rassemblant des experts des spécifications relatives aux préparations pharmaceutiques a rendu un rapport sur les garanties de qualité des systèmes d'approvisionnement en produits pharmaceutiques. Dans l'annexe de ce rapport, il est noté que le stockage constitue un des aspects importants de l'assurance de la qualité. Il y est précisé qu'un stockage défectueux peut conduire à la

détérioration physique et à la décomposition chimique des produits, desquelles il résulte une perte d'activité et la formation de produits de dégradation éventuellement nocifs. Plus tard, on a commencé à envisager d'autres aspects, tels que l'instabilité microbiologique et la perte de biodisponibilité [1.3].

Les principaux facteurs susceptibles d'influencer le degré et la vitesse de détérioration des médicaments sont les suivants :

- Facteurs environnementaux : chaleur, humidité, lumière, oxygène de l'air et diverses autres formes d'agressions et de modifications physiques (par exemple vibrations, congélation).
- Facteurs intrinsèques, notamment :
  - Propriétés chimiques du principe actif et des excipients utilisés (par exemple, présence de certaines impuretés, polymorphe ou forme cristalline, granulométrie, présence éventuelle d'eau ou d'autres solvants) ;
  - Forme pharmaceutique et sa composition ;
  - Procédé de fabrication (y compris les conditions environnementales et les techniques employées) ;
  - Nature du récipient et de tout autre matériau de conditionnement avec lequel le produit peut être en contact direct ou qui peut d'une autre façon influencer sa stabilité.

La stabilité du produit fini dépend largement de la stabilité de la substance pharmaceutique qu'il contient. Il faut également noter que la formulation et le conditionnement peuvent exercer une influence positive ou négative sur la stabilité du principe actif [1.4].

Le guide ICH Q6A est un guide portant sur l'établissement des spécifications des substances actives. Ce référentiel publie des directives concernant les tests spécifiques à appliquer dans le cadre du développement de nouvelles substances actives. Selon ces directives, les critères à étudier concernent les propriétés physico-chimiques de ces substances, la taille des particules, les formes polymorphes, la chiralité, la teneur en eau, les impuretés inorganiques et les limites microbiologiques. Concernant le polymorphisme, le texte indique que les différentes formes de l'état solide de la substance (polymorphes ou solvates) diffèrent dans leurs propriétés physiques, et sont donc susceptibles d'affecter la performance, la biodisponibilité ou la stabilité du produit fini. Par conséquent, ainsi que ce



texte le mentionne, une recherche du polymorphisme doit être effectuée sur les substances actives afin de rechercher la forme appropriée à développer et un suivi d'un éventuel changement polymorphique pouvant se produire dans le produit fini est nécessaire [1.5].

La FDA rassemble sous le terme générique “formes polymorphes“ les formes amorphes et cristallines, les hydrates et les solvates. Elle précise que les formes polymorphes d'une substance active présentent des propriétés physiques et chimiques différentes incluant le point de fusion, la réactivité chimique, la solubilité apparente, la vitesse de dissolution, les propriétés optiques et mécaniques, la pression de vapeur et la densité. Ces propriétés peuvent avoir un effet direct sur la fabrication de la substance active ou le médicament, mais aussi sur la stabilité, la dissolution et la biodisponibilité. Le polymorphisme peut par conséquent affecter la qualité, la sécurité et l'efficacité du médicament [1.6].

Le guide ICH Q1A, relatif à la stabilité des substances actives et des produits finis, stipule que la stabilité de la substance active est une composante intégrale dans l'approche systématique pour l'évaluation de la stabilité d'un médicament. Il exprime la nécessité de réaliser des études de dégradation forcée permettant d'identifier les produits de dégradation, d'établir les voies de dégradation et de déterminer la stabilité intrinsèque de la molécule. Les études de dégradation forcée doivent inclure l'effet de la température, l'humidité, l'oxydation, la photolyse et l'hydrolyse à différentes valeurs de pH [1.7].

Le guide ICH Q3A porte sur la recherche d'impuretés chimiques. Ce référentiel classe ces impuretés en impuretés organiques incluant les produits de dégradation, impuretés inorganiques et solvants résiduels et il préconise l'utilisation d'outils analytiques validés et adaptés à la détection et à la quantification de ces impuretés [1.8].

Les directives de surveillance de stabilité des produits médicaux et pharmaceutiques sont proposées par l'ICH. Les orientations définitives sur les essais de stabilité ont été adoptées dans toute l'Europe, au Japon et aux États-Unis. En outre, dans le CFR (Code of Federal Regulations) titre 21 partie 203 “Prescription drug marketing“, la FDA (food and drug administration, USA) stipule que les fabricants, les distributeurs agréés de médicaments et leurs représentants doivent stocker et traiter tous les échantillons de médicaments conformément aux « conditions favorables à la préservation de leur stabilité, de leur intégrité et de leur efficacité » tout en veillant à ce que les échantillons de médicaments soient exempts de toute contamination, détérioration et falsification.

Selon le guide technique pour l'élaboration des monographies des Pharmacopées, les propriétés à l'état solide comprennent la cristallinité et le polymorphisme, ainsi que la masse volumique, la granulométrie et la surface spécifique des solides. Ces propriétés, notamment le polymorphisme et le pseudo-polymorphisme (formation des solvates), peuvent avoir un impact sur la biodisponibilité de la substance et la fabrication du médicament [1.9].

#### 1.4. Approche générale

L'approche adoptée dans ce travail comporte deux axes. Le premier axe vise à caractériser la réactivité chimique et l'existence de polymorphes. Le deuxième axe tente de combiner l'analyse thermodynamique, spectrale et chimique pour établir les critères thermodynamiques de stabilité de la substance active.

Cette approche a été appliquée à 5 cas de substances actives de synthèse d'origine chimique entrant dans la composition de médicaments destinés à être administrés par voie orale.

Le **tienoxolol** présente un effet antihypertenseur [1.10]. Une étude faite en 2012 sur le tienoxolol a porté sur la résolution de sa structure cristalline, son comportement thermique ainsi que l'étude de sa pureté chimique [1.11]. Pour compléter sa caractérisation, le tienoxolol a fait l'objet, dans le cadre de ce travail, d'une étude de sa réactivité chimique en solution à travers une étude de dégradation forcée permettant d'étudier sa sensibilité à l'égard de différents facteurs de stress, de déterminer ses différents produits de dégradation et d'établir le schéma de sa dégradation. Les résultats ont abouti au profil de stabilité de la molécule, ce qui constitue une information importante conditionnant habituellement le choix de la formulation, du procédé de fabrication, des conditions de stockage et de contrôle du produit médicamenteux fini.

Le **bicalutamide** et le **finastéride**, utilisés tous les deux pour le traitement du cancer de prostate ont constitué deux autres cas d'étude [1.12 - 1.14]. Selon les données de la littérature, chacune de ces molécules possède deux polymorphes. Les structures cristallines des différentes formes ont été résolues et les données associées, calorimétriques et cristallographiques, sont disponibles dans la littérature. Par contre, aucune donnée sur la stabilité relative des polymorphes n'était disponible. Ces deux cas constituent des exemples de construction de diagrammes de phases pression-température simplement à partir des données de la littérature. En plus, ils constituent des exemples où la relation

thermodynamique entre les polymorphes pourrait changer selon les conditions de température et de pression.

Les mêmes raisons ont conduit à l'étude du cas de la **benzocaïne**, anesthésique local [1.15]. En plus, parce que les températures de fusion des deux formes étudiées de benzocaïne sont relativement faibles, des mesures expérimentales (calorimétriques sous hautes pressions et cristallographiques en fonction de la température) ont été effectuées et ont permis de construire le diagramme de phases et ainsi de valider l'approche topologique utilisée dans les deux cas d'étude précédents.

Enfin, le cas du **chlorhydrate de cystéamine**, utilisé pour le traitement des cystinoses [1.16], constitue à la fois un exemple d'application de construction de diagramme de phases à partir de mesures directes expérimentales et aussi un exemple d'étude combinée du comportement thermique de l'état solide et de la réactivité chimique en solution. Ce composé a été choisi à cause de l'absence d'informations sur son éventuel polymorphisme cristallin et à cause de données très lacunaires sur son caractère hygroscopique, sachant par ailleurs que son principal produit de dégradation en solution est la cystéamine. En résumé, ce dernier exemple a permis de caractériser au mieux et d'établir le profil de stabilité complet de cette molécule active.

Enfin, les publications issues de ce travail de thèse ont été rassemblées en fin du manuscrit.

**REFERENCES**

- [1.1] Datta S., Grant D.J.W., 2004. Crystal structures of drugs: advances in determination, prediction and engineering. *Nature Reviews Drug Discovery* 3, 42–57.
- [1.2] Chemburkar, S.R., Bauer, J., Deming, K., Spiwek, H., Patel, K., Morris, J., Henry, R., Spanton, S., Dziki, W., Porter, W., Quick, J., Bauer, P., Donaubaue, J., Narayanan, B.A., Soldani, M., Riley, D., McFarland, K., 2000. Dealing with the impact of ritonavir polymorphs on the late stages of bulk drug process development. *Organic Process Research & Development* 4(5), 413-417.
- [1.3] OMS, Séries de Rapports techniques, N°645, 1980 (vingt-septième rapport du comité OMS d'experts des spécifications relatives aux préparations pharmaceutiques), p 29.
- [1.4] OMS d'experts des spécifications relatives aux préparations pharmaceutiques. Trente et unième rapport. Genève. Organisation mondiale de la santé, 1990 (OMS, Série de Rapports techniques, N°790).
- [1.5] ICH Q6A Guideline. 1.12. Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products. Comments for its application. 101-122.
- [1.6] Guidance for industry. ANDAs : pharmaceutical solid polymorphism. Chemistry, manufacturing and controls information. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). July 2007.
- [1.7] ICH harmonized tripartite guideline stability testing of new drug substances and products. Q1A(R2), Current Step 4 version dated 6 February 2003.
- [1.8] ICH harmonized tripartite guideline impurities in new drug substances. Q3A(R2) Current Step 4 version dated 25 October 2006.
- [1.9] Pharmacopée Européenne, 6<sup>ème</sup> édition, 2011.
- [1.10] Berdeaux, A., Loueslati, E., Gerard, J.L., Pussard, E., Giudicelli, J.F., 1988. Evaluation of the natriuretic and beta-adrenoceptor-blocking effects of tienoxolol in normal volunteers. *Fund. Clin. Pharmacol.* 5, 441-454.
- [1.11] Mahé, N., Do, B., Nicolai, B., Rietveld, I.B., Barrio, M., Tamarit, J.L., Céolin, R., Guéchet, C., Teulon, J.M., 2012. Crystal structure and solid-state studies of aged samples of tienoxolol, an API designed against hypertension. *Int. J. Pharm.* 422, 47-51.

[1.12] Schellhammer, P.F., 2002. An evaluation of bicalutamide in the treatment of prostate cancer. *Expert Opin. Pharmacother.* 3 (9), 1313-1328.

[1.13] Fradet, Y., James, N., Maher, J., 2004. Bicalutamide (Casodex) in the treatment of prostate cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 4 (1), 37–48.

[1.14] Rasmusson, G.H., Reynold, G.F., Steinberg, N.G., Walton, E., Patel, G.F., Liang, T.M., Cascieri, M.A., Cheung, A.H., Brooks, J.R., Berman, C., 1986. Azasteroids – structure-activity-relationships for inhibition of 5- $\alpha$ -reductase and of androgen receptor-binding. *J. Med. Chem.* 29, 2298-2315.

[1.15] Ritsert, E., 1925. Development of anesthesine. *Pharm. Ztg.* 70, 1006-1008.

[1.16] Kataoka, H., Imamura, Y., Tanaka, H., Makita, M., 1993. Determination of cysteamine and cystamine by gas chromatography with flame photometric detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 11(10), 963-969.

## Chapitre 2.

### Aspects théoriques.

CHAPITRE 2. ASPECTS THEORIQUES.....	11
2.1. Brefs rappels thermodynamiques .....	13
2.1.1. La thermodynamique.....	13
2.1.1.1. Historique .....	13
2.1.1.2. Définition.....	13
2.1.2. Système thermodynamique .....	14
2.1.2.1. Définition.....	14
2.1.2.2. Etat d'un système thermodynamique .....	14
2.1.2.3. Paramètres d'état .....	14
2.1.2.4. Equation d'état.....	15
2.1.2.5. Etat d'équilibre d'un système thermodynamique .....	15
2.1.2.6. Transformation d'un système .....	16
2.1.3. Changement d'état et transition de phases d'un corps pur.....	17
2.1.3.1. Etat de la matière .....	17
2.1.3.2. Phase.....	17
2.1.3.3. Transition de phases .....	17
2.1.4. Température et chaleur .....	18
2.1.4.1. Température.....	18
2.1.4.2. Chaleur.....	19
2.1.5. Potentiels thermodynamiques .....	19
2.1.5.1. Capacité calorifique (ou chaleur spécifique) .....	19
2.1.5.2. Energie libre et enthalpie libre.....	20
2.1.5.3. Energie totale d'un système fermé .....	20
2.1.5.4. Entropie .....	21
2.1.6. Diagramme de phases.....	22
2.2. Polymorphisme et considérations pharmaceutiques .....	23
2.2.1. Définition du polymorphisme .....	23
2.2.2. Considérations pharmaceutiques.....	24
2.3. Notions fondamentales concernant la stabilité physique .....	30
2.3.1. Monotropie et énantiotropie .....	33

---

2.3.2.	Energie de Gibbs .....	35
2.3.3.	Equation de Clapeyron .....	36
2.3.4.	Estimation de l'expansion thermique .....	37
2.3.5.	Equation proposée par Yu .....	37
2.3.6.	Construction topologique d'un diagramme de phases .....	42
2.3.7.	Tensions de vapeur .....	45
2.4.	Notions fondamentales concernant la stabilité chimique .....	45
2.4.1.	Différents types d'études de stabilité .....	46
2.4.2.	Les études de dégradation forcée .....	47
2.4.3.	Contexte réglementaire .....	48
REFERECES	.....	50

## 2.1. Brefs rappels thermodynamiques

### 2.1.1. La thermodynamique

#### 2.1.1.1. Historique

Josiah-Willard Gibbs (1839-1903), scientifique américain, fut le premier qui posa les bases de la chimie énergétique et qui fit le pont entre les principes de la thermodynamique macroscopique (principe de conservation de l'énergie et principe de Carnot-Clausius selon lequel l'entropie est maximum à l'état d'équilibre) et les lois empiriques sur les équilibres chimiques. L'entropie est ici définie comme étant le rapport  $Q/T$  entre le contenu de chaleur d'un corps ( $Q$ ) et la mesure de son degré (la température,  $T$ ). L'entropie  $s$  est, par principe, considérée comme une fonction d'état car elle est supposée (second principe de la thermodynamique) ne dépendre que de l'état initial et de l'état final du corps lorsqu'il gagne ou perd une quantité finie de chaleur  $q$  à la température  $T$  : on pose  $\Delta s = s(\text{final}) - s(\text{initial}) = Q/T$ .

Ludwig Boltzmann (1844-1906), quant à lui, relia les propriétés macroscopiques de la matière, établies par les développements de la thermodynamique, au comportement des particules de la matière, les atomes. Il a traité ce problème, à première vue mathématiquement insoluble étant donné le très grand nombre de particules impliquées dans les phénomènes thermiques, en introduisant la statistique dans son traitement par la mécanique. Ce traitement du problème a donné naissance à la thermodynamique statistique (par opposition à la thermodynamique classique, basée uniquement sur la mise en relations de variables macroscopiques, comme la température, la pression, et de fonctions thermodynamiques comme l'enthalpie, l'entropie, etc.

#### 2.1.1.2. Définition

La thermodynamique est la branche de la science consacrée à l'étude de l'énergie et de ses interactions avec la matière. Elle est ainsi concernée par le comportement des corps et les changements d'état de la matière.

Elle est née d'une préoccupation pratique, consistant à rechercher comment produire du travail à partir de la chaleur avec le meilleur rendement possible. C'est ainsi que, sous sa dénomination initiale de « théorie mécanique de la chaleur », la thermodynamique a formalisé les échanges d'énergie entre un « système » et son environnement (extérieur) sous forme de



chaleur et de travail, qui sont deux modes d'échanges (transfert) d'énergie entre deux endroits de l'espace.

### **2.1.2. Système thermodynamique**

En thermodynamique, il est nécessaire de décrire parfaitement le système étudié.

#### **2.1.2.1. Définition**

Un système thermodynamique est un corps (entité matérielle) ou ensemble de corps délimité par une frontière matérielle, réelle ou fictive, qui le sépare du milieu extérieur. Les échanges d'énergie se font au travers de cette frontière (surface délimitant le système).

Il est en effet constitué d'un très grand nombre de particules (atomes, molécules, ions,...), et peut alors être décrit à l'échelle macroscopique par des grandeurs statistiques, intensives ou spécifiques, (volume, pression, température, concentrations,...), qui sont des valeurs moyennes rendant compte du comportement des diverses particules constituant le système. Ces grandeurs statistiques sont appelées variables d'état.

#### **2.1.2.2. Etat d'un système thermodynamique**

Un système thermodynamique est défini par son état. L'état d'un système est décrit par un ensemble de variables (ou paramètres) permettant de reconstituer expérimentalement le système avec un ensemble de propriétés parfaitement définies.

#### **2.1.2.3. Paramètres d'état**

Les paramètres d'état sont les grandeurs physiques qui permettent de décrire l'état d'un système thermodynamique à l'équilibre. Pour qu'une grandeur puisse être considérée comme une variable d'état, il est essentiel qu'elle puisse être déterminée à un instant donné. La température  $T$ , la pression  $P$ , le volume  $V$  et la quantité de matière sont les variables d'état les plus couramment nécessaires.

On distingue les variables « intensives », pression et température, qui ne dépendent pas de la quantité de matière et les variables extensives, volume et entropie, qui en dépendent. Ces dernières sont alors rendues « intensives » en étant rapportées à l'unité de quantité de matière. On parle alors de grandeurs « spécifiques ».

A l'opposé, les quantités de travail ou de chaleur échangées entre le système et le milieu extérieur ne répondent pas à la définition de variables d'état, car ces grandeurs dépendent généralement du « chemin » suivi par le système, c'est-à-dire de la façon dont se fait l'échange.

#### **2.1.2.4. Equation d'état**

On appelle équation d'état (ou fonction d'état) la relation de dépendance entre les paramètres d'état  $P$ ,  $T$  et  $V$ , entre lesquelles on suppose qu'il existe, pour une espèce chimique donnée capable d'exister sous les trois états solide, liquide et vapeur, une fonction  $f(P, V, T) = 0$ .

Exemple :  $PV = nRT$  est l'équation d'état empirique caractérisant les états d'équilibres de  $n$  moles de gaz parfait. On la qualifie d'empirique car elle a été établie par des mesures expérimentales (en fait elle n'est valable que dans un petit intervalle de pression faible et elle ne s'applique, en toute rigueur, qu'à un gaz dit « parfait » car ses molécules n'ont aucun volume propre).

Une équation d'état est donc une relation qui relie entre elles les différentes variables d'état d'un système, à l'équilibre thermodynamique (condition nécessaire pour que les variables d'état intensives soient définies).

#### **2.1.2.5. Etat d'équilibre d'un système thermodynamique**

Un système est en équilibre si, étant isolé (absence de tout échange avec l'extérieur), son état demeure inchangé. Autrement dit, un système est «à l'équilibre» si toutes les grandeurs qui le caractérisent restent constantes en tout point de son volume au cours du temps. Ceci implique que dans cet état, tout changement spontané de l'état du système est impossible, c'est-à-dire, il n'existe aucun transfert de matière ou d'énergie avec le milieu extérieur. Ainsi l'équilibre thermodynamique équivaut à deux conditions :

- Equilibre mécanique : les résultantes des forces exercées sur les parties mobiles du système sont nulles, la pression  $y$  est partout uniforme.
- Equilibre thermique : la température de chaque partie du système est uniforme et le reste.

Dans le cas d'un système chimique, il faut rajouter une troisième condition qui est la condition d'équilibre chimique qui se traduit par une composition homogène lorsque le système est homogène.

On définit la "variance  $v$ " comme le nombre de paramètres d'état intensifs pouvant varier librement sans modifier le nombre de phases en équilibre dans un système à  $c$  constituants indépendants. On appelle constituants indépendants d'un système celui ou ceux qui servent à le définir. Par exemple, le système formé entre l'eau et la L-citrulline comporte trois constituants : l'eau, la L-citrulline et le dihydrate de L-citrulline. Ce dernier n'est pas un constituant indépendant du système puisqu'il est défini par les deux autres.

La variance  $v$  d'un système est donnée par la règle des phases de Gibbs qui se résume à la relation :

$$v = c + 2 - \phi \quad \text{Eq. 2.1.1}$$

où  $c$  est le nombre de constituants indépendants, et  $\phi$  le nombre de phases en équilibre. Le nombre 2 indique qu'il existe deux variables intensives à prendre en compte : la pression et la température.

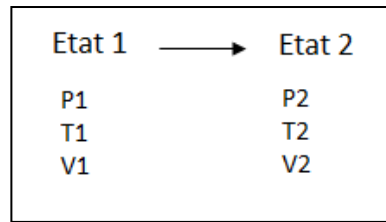
Ainsi, un système à UN constituant (indépendant) est :

- divariant quand il apparaît monophasé,
- monovariant quand il apparaît diphasé,
- invariant quand il se présente sous la forme de trois phases en équilibre (exemple du point triple de l'eau).

Dans le cas où le système n'est pas à l'équilibre (une ou plusieurs variables d'état évoluent dans le temps), le système subit une transformation (ou évolution).

#### 2.1.2.6. Transformation d'un système

On appelle transformation la succession temporelle d'états qu'un système parcourt entre un état initial hors d'équilibre (Etat 1) et un état d'équilibre final (Etat 2) vers lequel il tend (Figure 2-1-1). Lors d'une transformation, l'état du système considéré évolue car des échanges entre ce système et le milieu extérieur ont lieu en s'accompagnant de modifications d'un ou de plusieurs paramètres.



**Figure 2-1-1. Transformation d'un système**

### 2.1.3. Changement d'état et transition de phases d'un corps pur

#### 2.1.3.1. Etat de la matière

On postule qu'un corps pur, de composition chimique bien définie et invariable, peut exister sous trois états (ou phases) : solide, liquide, gaz.

#### 2.1.3.2. Phase

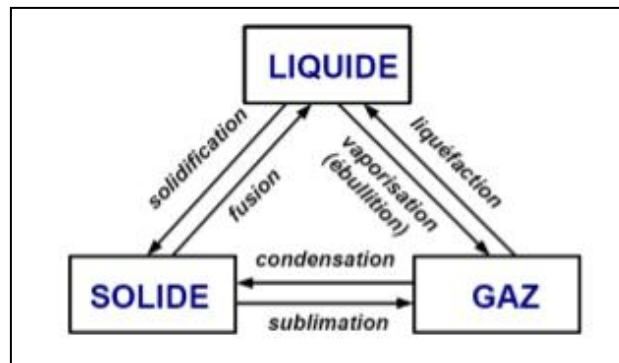
La définition du terme "phase", qui n'a de sens qu'en thermodynamique classique (ou macroscopique), est arbitraire : on appelle phase toute portion d'un système qui apparaît homogène à l'examen sous le microscope optique dont le pouvoir séparateur est de 1000 Å. En effet, au-dessous de cette valeur, l'hétérogénéité apparaît à cause de la nature discontinue de la matière, constituée d'atomes et/ou de molécules.

#### 2.1.3.3. Transition de phases

Lorsqu'il y a discontinuité d'au moins une grandeur intensive, on parle de changement de phase. L'évolution d'une phase vers une autre peut être exothermique si l'état final a une énergie plus faible que l'état initial, ou endothermique dans le cas contraire.

En thermodynamique classique, on peut aussi définir les transitions de phases du "premier ordre" lorsque, lors de la transition à une température et une pression données, on observe la coexistence des deux phases en question (leur équilibre se déplace d'une phase à l'autre et, pendant le déplacement, on peut observer le mélange des deux phases). A l'opposé, lorsqu'on n'observe pas cette coexistence mais seulement le passage soudain d'une phase à l'autre, on parle de transition du "second ordre". La fusion, par exemple, constitue un exemple de transition du premier ordre alors que le point critique qui termine la courbe d'équilibre liquide-vapeur constitue un cas de transition du second ordre (on passe de la vapeur au liquide sans observer leur coexistence).

Les changements d'état d'un corps sont de six types comme l'illustre la figure 2-1-2.



**Figure 2-1-2. Changement d'état d'un corps**

- gaz  $\rightleftharpoons$  solide : la transformation d'un corps à l'état gazeux en un corps à l'état solide est appelée condensation. On parle également de déposition. La transformation inverse est appelée sublimation.
- solide  $\rightleftharpoons$  liquide : la transformation d'un corps à l'état solide cristallisé en un corps à l'état liquide est appelée fusion. La transformation inverse est appelée solidification (ou cristallisation).
- liquide  $\rightleftharpoons$  gaz : la transformation d'un corps à l'état liquide en un corps à l'état gazeux est appelée vaporisation. La transformation inverse est appelée liquéfaction ou parfois condensation.

Les paramètres fixant le changement d'état d'un corps pur sont la pression et la température.

#### 2.1.4. Température et chaleur

La température et la chaleur dérivent de la sensation de chaud et de froid que l'on a cherché à rendre quantitative.

##### 2.1.4.1. Température

La température indique le "degré de chaleur" d'un corps (froid ou chaud). Elle est mesurée à l'aide d'un thermomètre. En thermodynamique, on utilise l'échelle absolue donnée en K (kelvin) avec la correspondance suivante entre les kelvins et les degrés Celsius (°C):

$$T \text{ (K)} = t \text{ (}^\circ\text{C)} + 273,15$$

Eq. 2.1.2

### 2.1.4.2. Chaleur

La chaleur est une “sensation“ qui a été rendue quantitative grâce à un instrument, le thermomètre, dont il a fallu standardiser la fabrication et la graduation. Cette “sensation“ correspond à la “chaleur sensible“ dont la variation, à l’intérieur d’une portion de matière, est mesurable grâce au thermomètre. Ce dernier mesure alors un “degré de chaleur“. Ainsi, la chaleur a d’abord été perçue comme une entité “matérielle“ contenue dans une portion donnée de matière. On admet aujourd’hui que cette entité est due au mouvement désordonné des molécules et d’atomes, mouvement appelé “agitation thermique“. Autrement dit, la “chaleur sensible“ est l’énergie calorifique (ou thermique) échangée par un corps au cours d’une variation de température  $\Delta T$ .

On doit au physicien écossais Joseph Black d’avoir mis en évidence un autre type de chaleur, non détectée par le thermomètre : la chaleur “latente“ (par opposition à la chaleur “sensible“). Black mélange une certaine masse d’eau à  $78^\circ$  (de chaleur) avec une masse égale de glace à  $0^\circ$  (de chaleur). Il observe la fusion de la totalité de la glace et, à la fin de l’expérience, il note que la température finale de la totalité de l’eau est  $0^\circ$ . Il conclut que la masse d’eau à  $78^\circ$  a cédé la quantité de chaleur nécessaire à la fusion de la même masse de glace. Cette quantité de chaleur ( $78^\circ$ ) n’a pas disparu : elle a servi à transformer la glace en eau à  $0^\circ$ .

Plus généralement, le changement d’état physique d’un corps se fait toujours à la température constante et à pression constante. On passe d’un état physique à un autre état par échange de chaleur appelée chaleur latente. La chaleur latente est donc une quantité d’énergie qui est consommée ou produite par un système qui change de phase (le mot “phase“ vient du grec et signifie “apparence“). Sa température reste constante.

### 2.1.5. Potentiels thermodynamiques

#### 2.1.5.1. Capacité calorifique (ou chaleur spécifique)

Soit une transformation infinitésimale où le système passe d’un état  $P, V, T$  à  $P + dP, V + dV, T + dT$  en recevant de l’extérieur une quantité de chaleur  $\delta Q$ . On suppose  $dT$  différent de 0 et on définit la capacité calorifique du système, dans les conditions expérimentales considérées, comme étant le rapport  $C_{C.E.} = \delta Q/dT$ .  $C_{C.E.}$  caractérise « la réponse » (en température) du système à un afflux de chaleur. Sont très souvent utilisées les notations  $C_V$

(qui se rapporte à la capacité calorifique à volume constant) et  $C_P$  (la capacité calorifique à pression constante (avec  $P = -P_{\text{ext}}$ )). On montre facilement que :

$$C_V = (\partial U / \partial T)_V \quad \text{Eq. 2.1.3}$$

$$C_P = (\partial H / \partial T)_P \quad \text{Eq. 2.1.4}$$

où  $H = U + P V$  est l'enthalpie du système et  $U$  est l'énergie interne du système ( $H$  et  $U$  sont des fonctions d'état).

### 2.1.5.2. Energie libre et enthalpie libre

Les combinaisons mathématiques des produits entre grandeurs liées au travail mécanique ( $P$  et  $V$ ) avec les produits de grandeurs liées à la chaleur ( $S$  et  $T$ ) donnent lieu à l'expression de quatre fonctions d'état qui sont respectivement l'énergie interne  $U$ , l'enthalpie  $H$  ( $H = U + PV$ ), l'énergie libre (d'Helmholtz,  $F = U - TS$ ) et l'enthalpie libre (de Gibbs,  $G = H - TS$ ). Leurs variations infinitésimales sont les suivantes :

$$dU = T dS - P dV \quad \text{Eq. 2.1.5}$$

$$dH = T dS + V dP \quad \text{Eq. 2.1.6}$$

$$dF = -S dT - P dV \quad \text{Eq. 2.1.7}$$

$$dG = -S dT + V dP \quad \text{Eq. 2.1.8}$$

### 2.1.5.3. Energie totale d'un système fermé

L'énergie totale  $E_T$  d'un système thermodynamique fermé de masse  $m$  est une grandeur d'état extensive et conservative qui dépend de la position, du mouvement et de la nature du système. Elle est la somme de l'énergie interne  $U$ , de l'énergie cinétique  $E_c$  et de l'énergie potentielle  $E_p$  du système, telle que :

$$E_T = U + E_c + E_p \quad \text{Eq. 2.1.9}$$

La grandeur d'état  $E$  étant extensive, on peut écrire son bilan en faisant apparaître le terme d'échange (indice  $e$ ) et le terme interne (indice  $i$ ). La variation d'énergie totale s'écrit :

$$dE = \delta eE + \delta iE \quad \text{Eq. 2.1.10}$$

Comme l'énergie totale est une grandeur conservative, le terme interne est identiquement nul :  $\delta_i E = 0$ .

Par ailleurs, en thermodynamique, les systèmes étudiés sont bien souvent au repos, ce qui entraîne la nullité de l'énergie cinétique et la constance de l'énergie potentielle. Le bilan énergétique s'écrit alors de manière simplifiée :

$$dU = \delta_e U \quad \text{Eq. 2.1.11}$$

Ce qui signifie que : "l'énergie varie exclusivement par des échanges; il n'y a pas de production ou consommation d'énergie dans un volume donné".

U est une grandeur extensive appelée énergie interne du système. Elle est liée à l'agitation moléculaire ou atomique interne, elle somme l'ensemble des énergies cinétiques moléculaires du système, quelque soit son déplacement global macroscopique. L'énergie interne d'un corps immobile qui reçoit une quantité de chaleur ( $Q > 0$ ) augmente.

#### 2.1.5.4. Entropie

Il existe une fonction d'état (appelée entropie, notée S) ayant les propriétés suivantes :

(a) S est extensive, et en particulier, l'entropie d'un système composite est la somme des entropies des sous-systèmes qui le composent.

(b) Un système évoluant sous l'effet de la modification de certaines contraintes extérieures sans apport de chaleur atteint l'équilibre dans un état où S est maximale (par rapport aux variations des grandeurs extensives caractérisant le système : U, V, N...). C'est ce qu'énonce le second principe de la thermodynamique. C'est à Clausius qui, s'inspirant du mémoire de Carnot sur la chaleur, énonce ce principe sous la forme de "l'entropie d'un système isolé tend vers un maximum".

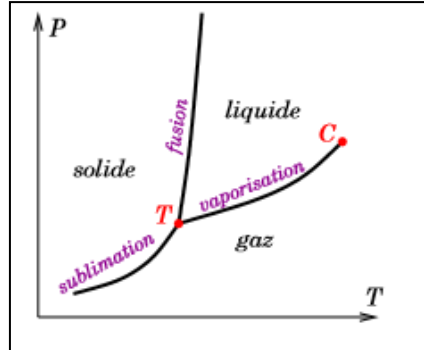
(c) S est une fonction monotone et croissante de U.

L'entropie n'est pas (contrairement à l'énergie) une quantité conservative ; après la disparition d'une contrainte, S évolue pour un système isolé, sans échange avec l'extérieur et ne peut de ce fait qu'augmenter :  $\Delta S = S_2 - S_1 \geq 0$ .



### 2.1.6. Diagramme de phases

Les différents états d'un corps pur peuvent être représentés dans un diagramme pression-température (P,T) (Figure 2-1-3).



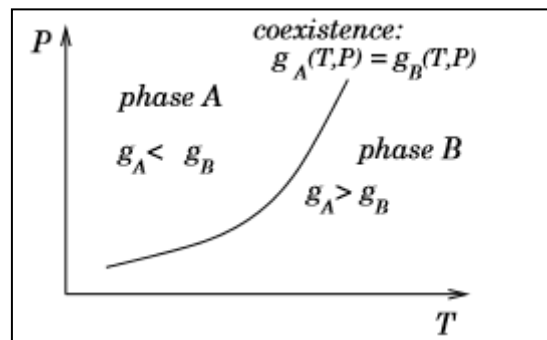
**Figure 2-1-3. Diagramme de phases (P, T) d'un corps pur**

On y retrouve les états solide, liquide et gazeux ainsi que des courbes d'équilibre entre ces états (courbes de sublimation, de fusion et de vaporisation).

L'équation exprimant l'égalité des enthalpies libres spécifiques de deux phases A et B,  $g_A(T,P) = g_B(T,P)$ , définit une ligne dans le diagramme (P,T): la courbe de coexistence des deux phases. Lorsqu'une substance subit une transition de phases, elle échange de l'énergie avec l'extérieur, à la fois sous forme de travail (parce que son volume varie) et sous forme de chaleur. Dans les conditions d'équilibre, le passage de  $A \rightarrow B$  s'effectue à T et P fixes (Figure 2-1-4) et le système reçoit une quantité de chaleur.

$$Q_{A \rightarrow B} = H_B - H_A = \Delta H_{A \rightarrow B}$$

$$\text{Eq. 2.1.12}$$



**Figure 2-1-4. Equilibre entre deux phases dans un diagramme P-T et relations entre leurs enthalpies libres**

Il est utile de remarquer que la transition de phases à l'équilibre est réversible et correspond donc à une variation d'entropie  $\Delta S = Q_{A \rightarrow B}/T$  d'après l'(in)égalité de Clausius. On

note  $L_{A \rightarrow B} = Q_{A \rightarrow B} / \text{masse}$ .  $L_{A \rightarrow B}$  est la “chaleur latente” de la transition, elle n’est définie que dans les conditions de la coexistence, c’est donc une fonction de T (ou P) seulement. Si h et s sont l’enthalpie et l’entropie massique dans les conditions de la coexistence (coex), on a :

$$L_{A \rightarrow B} = h_B - h_A = T(s_B - s_A) = T(v_B - v_A) / (dP/dT)_{\text{coex}} \quad \text{Eq.2.1.13}$$

L’égalité  $g_A = g_B$  (avec  $g = h - Ts$ ) implique que, pour tous les corps purs,  $L_{\text{fusion}}$ ,  $L_{\text{vaporisation}}$  et  $L_{\text{sublimation}}$  sont positives en conséquence de l’inégalité  $S_{\text{vapeur}} > S_{\text{liquide}} > S_{\text{solide}}$ . Au point triple, on a  $L_{\text{sublimation}} = L_{\text{vaporisation}} + L_{\text{fusion}}$ .

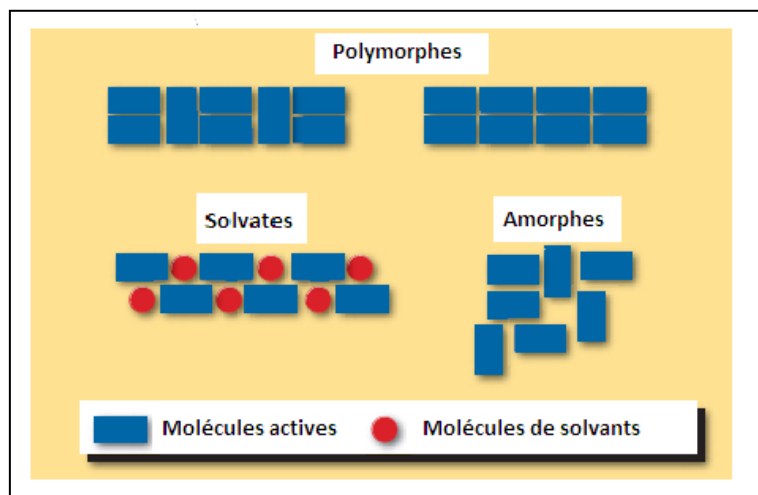
## 2.2. Polymorphisme et considérations pharmaceutiques

### 2.2.1. Définition du polymorphisme

Dans le domaine de la cristallographie, le terme de polymorphisme (Greek: *poly* = plusieurs, *morph* = forme) a été utilisé pour la première fois par Mitscherlich en 1823 qui a montré que le soufre (un corps simple) pouvait exister sous deux variétés cristallines différentes. Ultérieurement, McCrone (1965), entre autres, reprend cette observation et définit un polymorphe comme étant ‘*a solid crystalline phase of a given compound resulting from the possibility of at least two different arrangements of the molecules of that compound in the solid state*’. Un système est dit polymorphique si les structures cristallines sont différentes mais conduisent aux mêmes états liquide et gazeux. La définition de McCrone a été simplifiée par Rosenstein et Lamy (1969) qui donnaient au polymorphisme la définition suivante ‘*when a substance can exist in more than one crystalline state it is said to exhibit polymorphism*’. Cette définition a été aussitôt adoptée par Burger (1983) qui disait ‘*If these [solids composed of only one component] can exist in different crystal lattices, then we speak of polymorphism*’. Reinke et al, eux, utilisaient le langage de chimie supramoléculaire pour définir le polymorphisme comme suit ‘*the phenomenon where supermolecular structures with different, well-defined physical properties can be formed by chemically uniform species both in the liquid and solid state.*’ [2.1].

En d’autre terme, le polymorphisme cristallin est défini comme étant la capacité d’une même substance d’exister ou d’apparaître, sous l’effet de la variation d’un paramètre, le plus souvent la température, sous différentes formes cristallines. Certains auteurs ont inclus la solvataion, l’hydratation et les formes amorphes (Figure 2-2-1) dans la définition du polymorphisme cristallin. Toutefois, une nuance a été apportée avec la création du terme “pseudo- polymorphes“ : solvataion et hydratation sont appelées pseudo-polymorphisme.

C'est un terme qui désigne des formes cristallines incluant des molécules de solvant ou d'eau faisant partie intégrante de la structure [2.2]. Les polymorphes, qui diffèrent par leurs propriétés physiques dans l'état solide, présentent le même comportement en solution [2.3] car la dissolution détruit la barrière énergétique (d'origine réticulaire ou intermoléculaire) qui empêche la transformation de l'un dans l'autre.



**Figure 2-2-1. Différentes formes sous lesquelles peut se rencontrer une substance [2.2]**

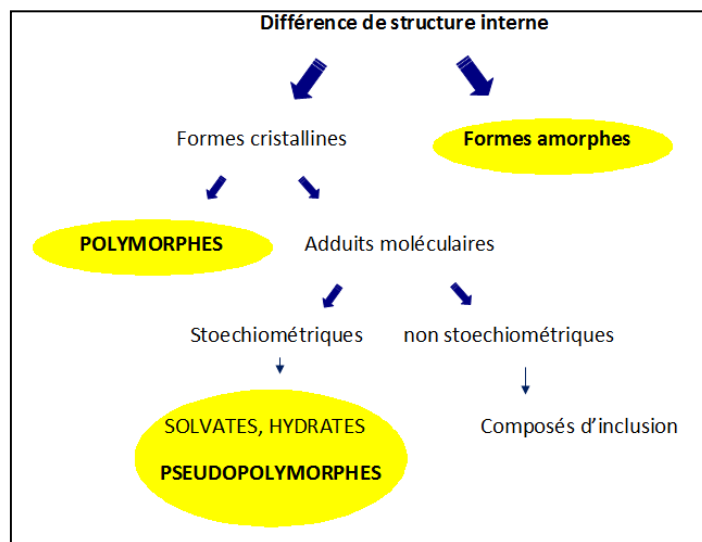
Plusieurs méthodes sont disponibles pour cristalliser les différents polymorphes d'un composé, comme le refroidissement à partir du produit fondu, la sublimation, la recristallisation avec un seul solvant ou un mélange de solvants, la variation du pH de la solution, et encore la présence ou l'ajout d'additifs, choisis ou non. La cristallisation est un processus à plusieurs étapes, qui inclut la nucléation, la croissance du cristal et la maturation des cristaux. Les étapes de nucléation et de croissance définissent ensemble la nature du polymorphe qui va finir par cristalliser à partir de la solution. La nucléation est par contre l'étape la plus critique dans la cristallisation des polymorphes individuels.

### 2.2.2. Considérations pharmaceutiques

Il est bien connu que les substances organiques peuvent présenter différentes structures cristallines ou intégrer dans leur structure des molécules de solvant (dont l'eau). Ces substances répondent donc à la définition du polymorphisme et du pseudo-polymorphisme [2.4]. A côté des formes cristallines, ces substances peuvent aussi exister sous forme amorphe (Figure 2-2-2). Plus de la moitié des substances organiques de la Pharmacopée Européenne (Ph. Eur.) présentent un polymorphisme ou un pseudo-polymorphisme, selon la répartition suivante [2.5] :

- Substances uniquement monomorphes (42%)
- Substances uniquement amorphes (2%)
- Polymorphes, hydrates et/ou solvates (56%) dont :
  - Polymorphes (58%)
  - Hydrates (57%)
  - Solvates (20%)

Ces chiffres montrent que le polymorphisme vrai est un phénomène qui touche environ un tiers des substances organiques, un autre tiers existant sous forme d'hydrates et de solvates [2.6]. Toutefois, une étude récente a estimé que 80 à 90% des composés organiques sont capables d'exister sous différentes formes cristallines [2.7].



**Figure 2-2-2. Différentes formes que peut présenter une substance active**

A l'état amorphe, les substances actives solides ont l'avantage de présenter une meilleure solubilité permettant d'améliorer la dissolution et donc la biodisponibilité [2.2, 2.8]. D'un autre côté, ces formes amorphes sont caractérisées par une grande énergie et une mobilité moléculaire importante diminuant ainsi leur stabilité par rapport aux formes cristallines correspondantes. Au cours des opérations de fabrication et/ou de stockage, les formes amorphes peuvent se transformer en formes cristallines stables ou métastables [2.3, 2.9, 2.10]. Pour toutes ces raisons, ces formes amorphes ne sont généralement pas commercialisées à l'exception de quelques ingrédients actifs, tel le cas de la Novobiocine, commercialisée sous sa forme amorphe, qui permet d'atteindre des concentrations plasmatiques suffisantes [2.3].

Dans l'industrie pharmaceutique, la cristallisation est une opération importante qui permet de préparer les formes cristallines des produits actifs. Il s'agit généralement d'une recristallisation à partir de solutions utilisant différents solvants et différentes conditions expérimentales, comme la température, la sursaturation initiale, le taux de sursaturation, et l'agitation. Selon ces conditions, les produits peuvent cristalliser de différentes manières. Il est donc nécessaire de maîtriser les étapes influençant la cristallisation et qui sont surtout les processus de nucléation et de croissance cristalline. Au cours de cette opération, le produit obtenu peut être sous forme solvatée. C'est le cas de certains types de médicaments tels que les stéroïdes, les antibiotiques et les sulfamides. Beaucoup de substances actives sont commercialisées sous forme d'hydrate en raison de l'utilisation fréquente de l'eau dans les processus de cristallisation [2.3].

En raison de leurs structures cristallines différentes, les polymorphes et pseudo polymorphes présentent des caractéristiques physico-chimiques différentes, telles que point de fusion, point de transition, densité, plasticité, solubilité, hygroscopicité, réactivité chimique. Dans le domaine pharmaceutique, un changement de propriétés physico-chimiques d'un principe actif ou des excipients peut avoir des conséquences sur leur aptitude à la compression ("comprimabilité"), leur mouillabilité, leur vitesse de dissolution, et ainsi modifier leur biodisponibilité, leur activité pharmacologique et leur stabilité. Considérant une substance chimiquement bien définie, on peut se trouver en présence de différents polymorphes ou pseudo polymorphes en fonction de la source d'approvisionnement ou simplement du lot en question. Mais il se peut aussi que l'on observe des changements de propriétés pharmacotechniques ou biopharmaceutiques dus à des phénomènes de transformations polymorphes, selon le traitement mécanique (broyage, compression) ou les conditions environnementales (intervention d'un solvant, désolvatation) qu'a subi le produit au cours de sa fabrication et/ou conservation [2.11, 2.12]. Dans les cas extrêmes, un polymorphe non souhaitée pourrait même être toxique [2.13].

Les opérations galéniques responsables de ces phénomènes sont résumées dans le tableau 2-2-I.

**Tableau 2-2-I : Opérations galéniques concernées par les changements polymorphiques [2.14]**

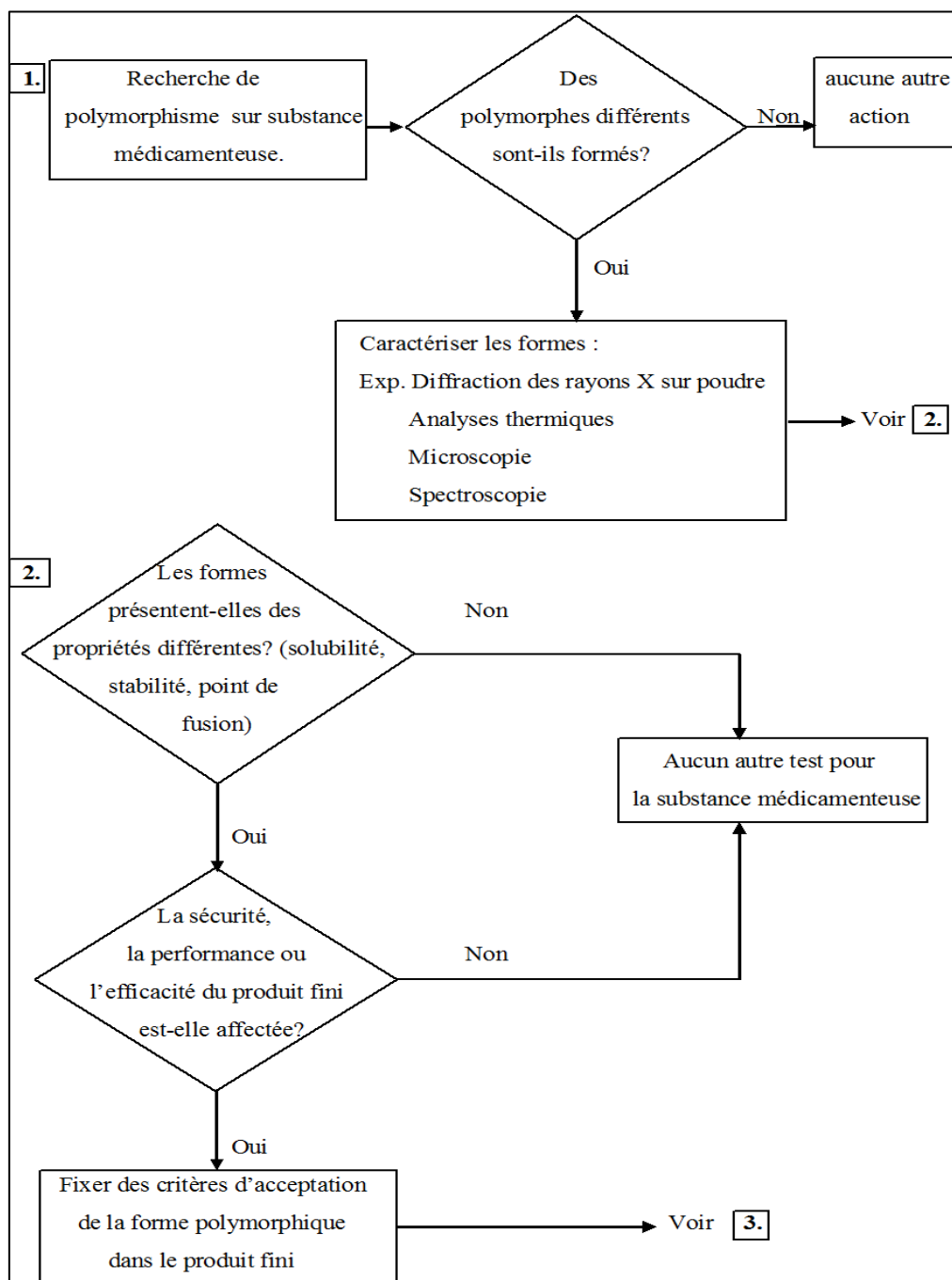
Traitement mécanique	Broyage, trituration Compression, compactage
Intervention de l'eau ou d'un solvant	Formulation de suspensions Etape de fabrication d'une forme sèche (granulation, enrobage) Tests de dissolution ou de libération Essais de stabilité en atmosphère contrôlée, stockage
Déshydratation ou désolvatation	Nébulisation Lyophilisation Préparation d'adsorbats

L'état cristallin des principes actifs, comme celui des excipients, joue un rôle déterminant dans les caractéristiques technologiques et biopharmaceutiques des formes médicamenteuses solides ou semi-solides. Il est donc nécessaire de maîtriser le polymorphisme et le pseudo-polymorphisme des produits utilisés, phénomènes qui doivent être considérés dans les industries pharmaceutiques [2.14-2.15]. Toutes ces considérations ont conduit les autorités sanitaires comme la Food and Drug Administration (FDA) à renforcer les exigences réglementaires quant à la caractérisation des principes actifs des médicaments [2.16]. En effet, l'état solide d'une substance peut changer sous l'effet des conditions extrêmes utilisées dans les étapes de fabrication, comme les stress thermiques et mécaniques, et l'exposition à des solvants. Comme résultat, la performance du produit fini, le médicament, peut être altérée et dans certains cas peut ne plus respecter les spécifications exigées. Par conséquent, une étude adéquate incluant la recherche des différentes formes de l'état solide des produits utilisés, la connaissance des domaines de stabilité de ces différentes formes et la détermination du comportement polymorphique (monotrope ou énantiotrope), est importante à mettre en place au cours du développement du candidat-médicament. Le choix de la "bonne" forme cristalline est décisif pour assurer des produits de "haute qualité" contenant le polymorphe souhaité. Cette étude doit être considérée comme une partie intégrante du développement et de la commercialisation d'un produit [2.17, 2.18].

Si la forme métastable d'un système monotrope est souhaitée, des précautions doivent être prises pour maintenir les conditions appropriées permettant d'éviter la transformation de la forme métastable dans une forme stable. Ces précautions ne sont pas nécessaires si c'est la forme stable du système monotrope qui est souhaitée. Pour obtenir ou maintenir le

polymorphe souhaité dans un système énantiotrope, la connaissance du point de transition est nécessaire.

Des arbres décisionnels dont le but est d'aider à contrôler le polymorphisme dans la substance médicamenteuse ainsi que dans le produit fini ont été proposés par le guide Q6A de l'International Conference on Harmonization (ICH) (Figures 2-2-3 et 2-2-4) [2.19].



**Figure 2-2-3. Arbre décisionnel étudiant la nécessité de fixer des critères d'acceptation pour le polymorphisme dans la substance médicamenteuse [2.19]**

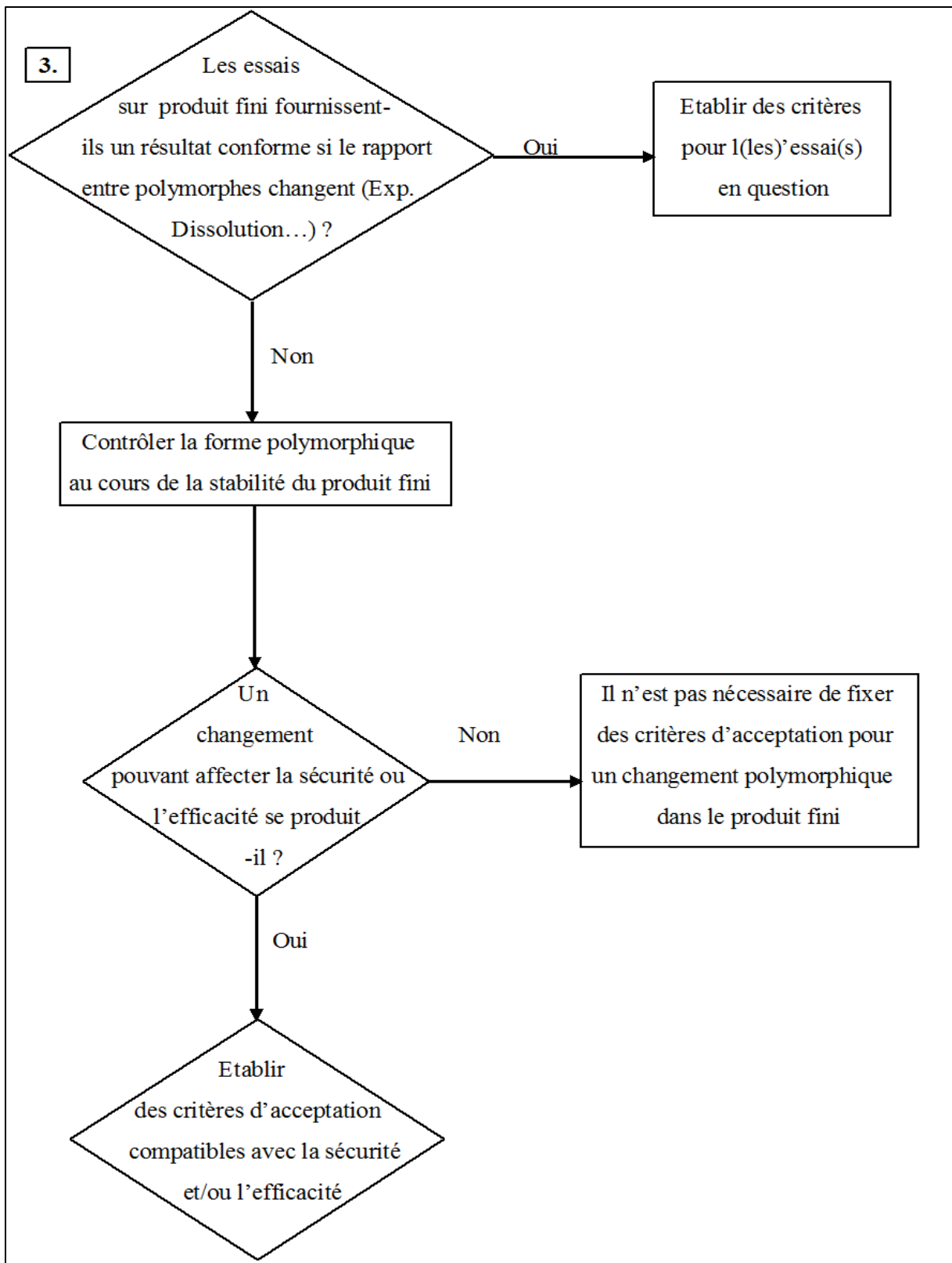


Figure 2-2-4. Arbre décisionnel étudiant la nécessité de fixer des critères d'acceptation pour le polymorphisme dans le produit fini [2.19]



### 2.3. Notions fondamentales concernant la stabilité physique

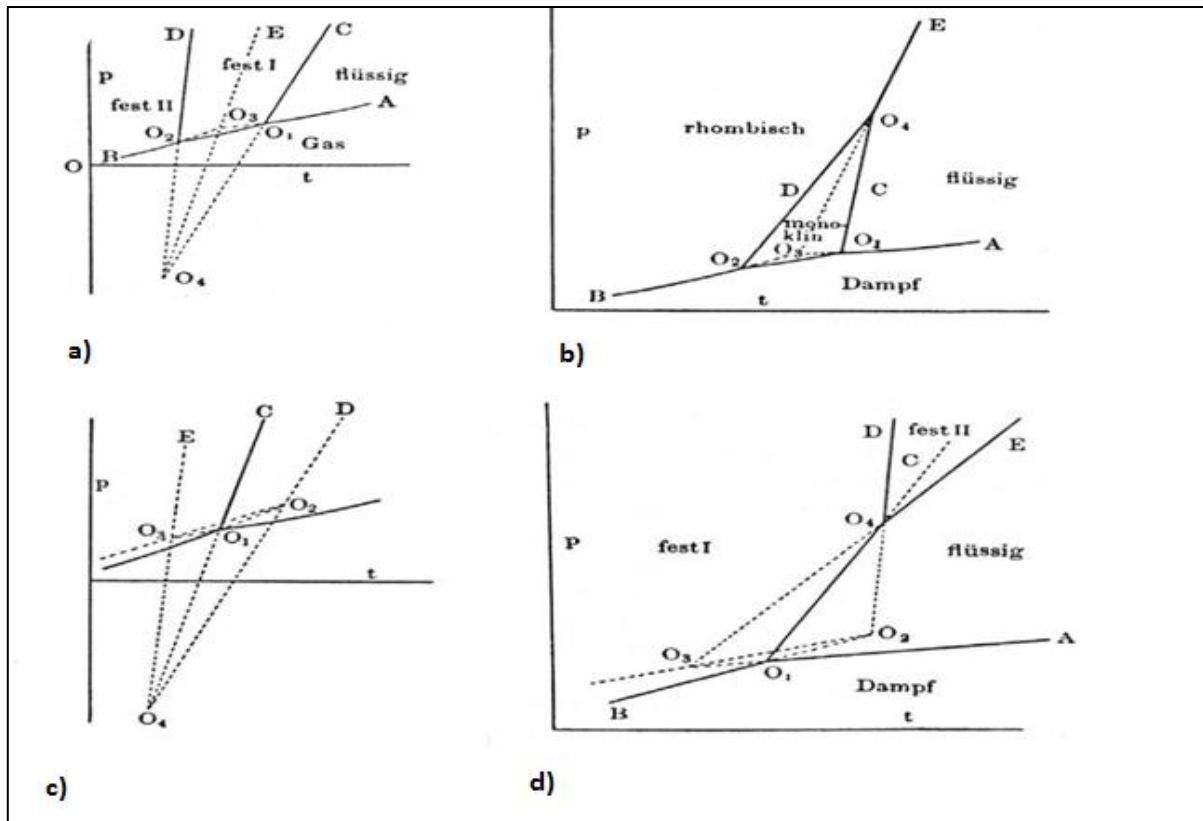
La connaissance de la stabilité physique des polymorphes est importante dans la phase de préformulation au cours du développement d'un médicament. Pour déterminer la hiérarchie de stabilité entre deux phases différentes, une méthode appelée méthode topologique a été développée, basée sur des données calorimétriques et volumétriques obtenues dans les conditions ordinaires d'expérimentation et sur l'équation de Clapeyron,  $dP/dT = \Delta H/T\Delta v$ . Cette équation permet de déterminer la pente  $dP/dT$  de l'équilibre entre les deux phases, dans sa représentation graphique "pression-température", au moyen des variations d'enthalpie  $\Delta H$  et de volume  $\Delta v$  qui accompagnent le passage (transition) de l'une à l'autre à la température  $T$ . Ces données peuvent être fournies ou bien par des méthodes expérimentales assez simples à mettre en œuvre aujourd'hui, telles que la diffraction des rayons X et la calorimétrie, ou bien par des valeurs disponibles directement dans la littérature, comme c'est le cas pour bicalutamide et finastéride (Chapitres 5 et 6) [2.20 - 2.29]. Plus récemment, la méthode topologique a été confrontée à des données expérimentales sur différents équilibres entre phases obtenues par des mesures à hautes pressions. Il a ainsi été démontré, dans plusieurs articles, que la méthode topologique peut être utilisée pour construire des diagrammes de phases pression-température fiables, sans pour autant que les données expérimentales collectées sous conditions ordinaires soient de bonne qualité [2.30 – 2.34].

La construction topologique des diagrammes de phases P-T obéit à plusieurs règles largement détaillées auparavant [2.21] et déjà utilisées pour décrire des cas de dimorphisme [2.35, 2.36], de trimorphisme [2.21, 2.29] et même deux cas de tétramorphisme [2.20, 2.27]. Ces règles stipulent que :

- Les points triples de fusion  $S_i$ -L-Vap des polymorphes  $S_i$  sont localisés sur une seule courbe liquide-vapeur (S = solide, L = liquide, Vap = vapeur),
- Dans un système comportant  $(n + 2)$  phases ( $n$  phases solides, une phase liquide et une phase vapeur), le nombre  $C$  de points triples (chacun correspondant à un groupe de  $p = 3$  phases) est donné par l'équation de Riecke :  $C = (n + 2) ! / [p ! (n + 2 - p) !]$  [2.36]. Dans le cas d'un dimorphisme, quatre points triples doivent alors exister ( $S_I$ -L-Vap,  $S_{II}$ -L-Vap,  $S_I$ - $S_{II}$ -L et  $S_I$ - $S_{II}$ -Vap),
- Le degré de métastabilité de chaque point triple  $S_i$ -L-V augmente selon l'ordre décroissant des températures des points triples de fusion,  $T(S_i$ -L-V) (règle de Tammann),

- L'équilibre L-Vap présente une seule partie stable qui s'étend entre le point triple de fusion le plus élevé et le point critique (à partir duquel le liquide et la vapeur ne sont plus discernables). Il en résulte que, parmi les points triples  $S_1$ -L-Vap, un seul doit être stable, celui dont la température est la plus élevée,
- La hiérarchie de stabilité est liée aux inégalités de tension de vapeur par la règle d'Ostwald selon laquelle plus la tension de vapeur est faible plus la phase est stable,
- Chaque équilibre entre deux phases correspond à une courbe qui peut être dessinée comme une ligne droite dans un diagramme P-T,
- Chaque point triple est le point d'intersection entre trois courbes diphasées, de manière à ce que leurs extensions métastables alternent avec leurs parties les plus stables (règle d'alternance).

La construction d'un diagramme de phase pression-température passe par plusieurs étapes. Ces étapes permettent de positionner de façon relative les éléments constitutifs du diagramme (points triples et courbes d'équilibre) et conduisent nécessairement à un des quatre cas topologiques de dimorphisme cristallin présentés par Bakhuis-Roozeboom en 1901 (Figure 2-3-1) [2.38].



**Figure 2-3-1. Les quatre diagrammes P-T possibles pour un cas de dimorphisme cristallin [2.38]**

fest : solide, flüssig : liquide, dampf : vapeur.

Dans cette figure, les points triples sont marqués par O et les équilibres entre deux phases par des lettres majuscules (de A à E). Les lignes continues indiquent des équilibres stables, les lignes discontinues des équilibres métastables.

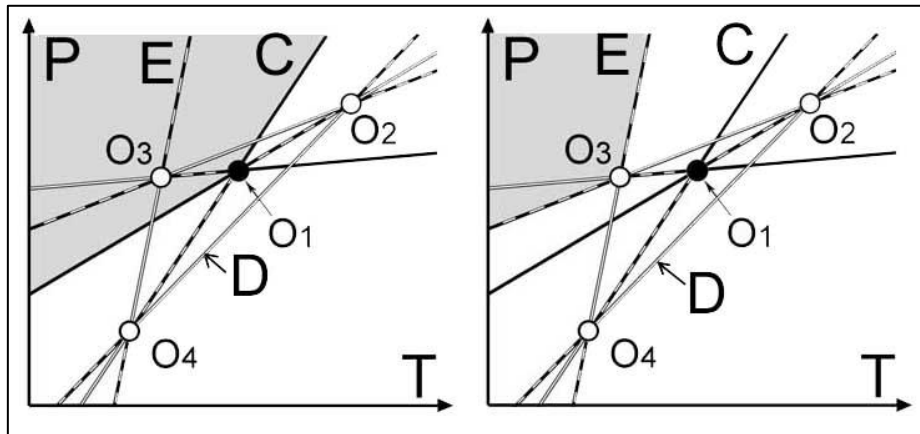
Les quatre cas représentés par Bakhuis-Roozeboom méritent d'être détaillés. Les lignes correspondent aux équilibres diphasés suivants :

- ligne A : liquide-vapeur,
- ligne B : solide II-vapeur (Figure 2-3-1a) ou rhombish (orthorhombique)-vapeur (Figure 2-3-1b), ou encore fest (solide)-vapeur (Figure 2-3-1d),
- ligne C : solide I-vapeur (Figure 2-3-1a), ou monoklin (monoclinique)-liquide (Figure 2-3-1b), ou encore solide I-liquide (Figure 2-3-1d),
- ligne D : solide I-solide II (Figures 2-3-1a et 2-3-1d) ou orthorhombique-monoclinique (Figure 2-3-1b),
- ligne E : solide II-liquide (Figures 2-3-1a et 2-3-1d), ou orthorhombique-liquide (Figure 2-3-1b).

Quant aux quatre points triples, ils sont identifiés de la façon suivante :

O1 = Solide I (le plus stable)-liquide-vapeur, O2 = solide I-solide II- vapeur, O3 = solide II (le moins stable)-liquide-vapeur, O4 = solide I-solide II-liquide.

On remarque que, dans le cas de la figure 2c, les régions de stabilité des deux polymorphes ne sont pas explicitées (Figure 2-3-1bis).



**Figure 2-3-1bis. Représentation des domaines d'existence des solides I et II dans le cas illustré par la figure 2c**

A gauche, le domaine du seul solide stable est représenté en gris. A droite, le domaine d'existence du second solide, toujours métastable, est représenté en gris. La ligne D correspond à l'équilibre métastable entre les deux solides.

### 2.3.1. Monotropie et énantiotropie

Enantiotropie et monotropie sont deux possibilités de comportement de polymorphes en fonction de la température. Ces comportements ont été observés et nommés pour la première fois par Lehmann qui les a décrits en 1880. Lehmann [2.39] a observé que, lors de l'échauffement (apport de chaleur), une forme cristalline peut se transformer dans une autre qui, lors de son refroidissement, redonne la forme initiale ou ne la redonne pas. Dans le premier cas, la transformation est renversable (énantiotropie), dans le second cas, elle ne l'est pas (monotropie). On doit remarquer que Lehmann n'a pas étudié le comportement des polymorphes sous l'effet de la pression, ce que Nagasakoa rappelle dans les années 1920 [2.40], après que Mallard et Le Chatelier ont montré que la pression peut, tout comme la température, induire la transformation d'un polymorphe dans un autre [2.41].

Traditionnellement, dans les études pharmaceutiques de l'état solide, la conclusion d'une étude sur la relation thermodynamique entre deux polymorphes est le plus souvent basée sur des règles, proposées en 1979 par Burger et Ramburger [2.42, 2.43], limitant à deux le nombre de possibilités : énantiotropie ou monotropie. Il est intéressant de noter que le

Le fondement de ces règles a été établi environ un siècle auparavant et qu'il conduit bien évidemment aux mêmes conclusions. Il s'agit du principe de Le Chatelier, qui indique qu'un système matériel tend à s'opposer à une action extérieure, autrement dit tend à compenser tout changement induit par son environnement. Ce principe a une portée très générale, il s'applique aussi bien aux réactions chimiques qu'aux changements de phases. Dans le cas d'un apport de chaleur, le système s'y oppose en l'absorbant avec, pour conséquence, soit une augmentation de sa température (chaleur spécifique) soit un changement d'état (chaleur latente). Dans le cas d'un apport de travail, le système s'y oppose en diminuant son volume ou en se transformant en une phase de moindre volume spécifique.

Pour déterminer si, dans un système à un constituant montrant l'existence de deux polymorphes I et II, ces derniers présentent une relation énantiotrope ou monotrope, le sens de la transition I-II en fonction de la température et de la pression doit être connu ainsi que la valeur algébrique de l'enthalpie associée à cette transition.

Dans le cas de l'énantiotropie, une forme présente à température ambiante (forme II) se transforme, lors de son échauffement, dans une autre forme (forme I) à la température  $T$  de transition et de façon endothermique (absorption de chaleur). Dans ce cas, la forme II est stable aux températures inférieures à la température de transition et la forme I est stable aux températures supérieures. Autrement dit, chaque forme possède un intervalle thermique de stabilité à pression ordinaire.

Dans le cas de la monotropie, une forme II, présente à température ambiante, se transforme à l'échauffement dans une autre forme (Forme I) à une certaine température et de façon exothermique (libération de chaleur). Dans ce cas, la forme II n'est plus obtenue lorsque la forme I est chauffée à nouveau depuis la température ambiante. Autrement dit, seule la forme I est stable dans tout l'intervalle de température à pression ordinaire.

Dans la discussion ci-dessus, la stabilité du système est considérée uniquement en fonction de la température. Or, en thermodynamique classique, l'énergie d'un état du système est fonction de deux variables indépendantes; dans le cas de l'énergie de Gibbs, qui est le plus souvent utilisée quand on considère la stabilité, les deux variables sont la température et la pression. Appliquant le principe de Le Chatelier aux effets de la pression, on doit donc s'attendre à ce que le système diminue son volume lorsqu'il est soumis à une augmentation de la pression extérieure (et donc augmente sa pression interne) ; par conséquent, les transitions

stables qui se produisent sous une augmentation de pression présentent un changement négatif du volume spécifique (la densité augmente).

Le principe de Le Chatelier, bien antérieur aux règles de Burger et Ramburger, ne connaît aucune exception. Par contre, il existe quelques situations où les règles de Burger et Ramburger connaissent des exceptions à la règle de densité (selon laquelle la phase stable devrait être la plus compacte). Ceci est dû au fait que la pression n'est pas prise en compte par ces auteurs. C'est pourquoi, la construction d'un diagramme de phases P-T devrait être préférée à l'utilisation aveugle de "règles" car ainsi on peut mettre en évidence le fait qu'un polymorphe à comportement énantiotrope à pression ordinaire puisse adopter un comportement monotrope à pressions plus ou moins élevées (et vice versa).

### 2.3.2. Energie de Gibbs

Lorsque la température et la pression [2.38, 2.44, 2.45] sont les deux variables indépendantes utilisées par l'expérimentateur, la stabilité relative entre les polymorphes d'un système thermodynamique est régie par l'énergie de Gibbs, encore appelée enthalpie libre G. Par conséquent, pour obtenir une image complète de la stabilité relative entre deux polymorphes, leur comportement thermodynamique doit être décrit non seulement en fonction de la température mais aussi de la pression sous la forme d'un diagramme d'équilibre entre phases "pression-température" (P-T). Le diagramme P-T ainsi obtenu permet de bien comprendre le comportement du système étudié (la substance active) et donc de prédire les changements thermodynamiques que pourrait subir cette substance active lors de certains traitements au cours de la fabrication des médicaments correspondants, tels que le broyage et la compression.

L'expression mathématique de l'énergie de Gibbs G inclut deux autres grandeurs : l'entropie s (spécifique) reflétant le changement de l'énergie en fonction de la température, et le volume v (spécifique) reflétant le changement de l'énergie en fonction de la pression. Une variation infinitésimale, dG, de l'enthalpie libre G s'écrit  $dG = -sdT + vdP$ .

Lorsque deux phases (I et II) sont en équilibre à la température T **et à la pression P** ( $dT = 0$  et  $dP = 0$ ), leurs enthalpies libres sont égales ( $\Delta G = 0$ ). On peut alors écrire :

$$G_{(I)} = -s_{(I)}T + v_{(I)}P = G_{(II)} = -s_{(II)}T + v_{(II)}P \quad \text{Eq. 2.3.1}$$

Cette égalité conduit à

$$\Delta G = G_{(II)} - G_{(I)} = 0 = -s_{(II)}T + s_{(I)}T + v_{(II)}P - v_{(I)}P = -T (s_{(II)} - s_{(I)}) + P (v_{(II)} - v_{(I)}),$$

$$\text{C'est-à-dire : } \Delta G = -T \Delta s + P \Delta v \quad \text{Eq. 2.3.2}$$

On voit ainsi que la variation  $\Delta v$  du volume spécifique du système lors d'un changement de phase doit être pris en compte, en plus de la variation  $\Delta s$  d'entropie spécifique, pour obtenir la variation totale  $\Delta G$  de l'énergie de Gibbs associée à ce changement (on note que, lorsque cette variation est nulle, la chaleur  $T\Delta s$  compense le travail  $P\Delta v$ ).

### 2.3.3. Equation de Clapeyron

Le comportement pression-température d'une transition de phase (c'est-à-dire la position d'un équilibre entre deux phases) peut être déterminé expérimentalement par des mesures d'analyse thermique différentielle à haute pression (High-Pressure Differential Thermal Analysis, HP-DTA).

Par contre, en l'absence d'un tel équipement, l'équation de Clapeyron, déjà évoquée précédemment, peut être utilisée. Elle est considérée comme étant une version numérique du principe de Le Chatelier, même si ce dernier a été énoncé postérieurement à l'équation de Clapeyron. Celle-ci fournit en effet la pente  $dP/dT$  de la courbe représentative d'un équilibre entre deux phases dans le plan pression-température à la température  $T$  où la transition est observée :

$$\frac{dP}{dT} = \frac{\Delta s}{\Delta v} = \frac{\Delta h}{T\Delta v} \quad \text{Eq. 2.3.3}$$

La pente  $dP/dT$ , généralement exprimée en  $\text{MPa K}^{-1}$ , se détermine avec  $\Delta s$ , variation de l'entropie spécifique, et  $\Delta v$ , variation du volume spécifique lors de la transition correspondant au déplacement réversible de l'équilibre entre les deux phases considérées. Dans ces conditions,  $\Delta s$  est obtenue par le rapport  $\Delta h/T$  entre la différence d'enthalpie et la température de transition, ces deux grandeurs étant en général obtenues facilement par calorimétrie.

En bref, l'équation de Clapeyron peut être utilisée, en combinaison avec le principe de Le Chatelier, non seulement pour construire un diagramme de phases P-T topologique mais encore pour vérifier la cohérence des résultats expérimentaux issus de l'analyse thermique à haute pression et même les compléter.

### 2.3.4. Estimation de l'expansion thermique

Les solides cristallisés, et en particulier les solides moléculaires, se dilatent quand on les chauffe. Les systèmes cristallins dans lesquels cristallisent ces solides sont, dans leur immense majorité, de symétrie basse, orthorhombique, monoclinique ou triclinique. Il s'ensuit que leur expansion thermique n'est pas isotrope puisqu'elle dépend de façon évidente de l'anisotropie des interactions intermoléculaires. Dans la plupart des cas, l'expansion thermique des deux polymorphes n'est pas connue, mais elle peut toutefois être estimée à partir des densités respectives des deux formes solides. En effet, il est admis que les réseaux cristallins des composés organiques moléculaires se dilatent de 2% environ, depuis la température ambiante jusqu'au point de fusion.

Pour calculer les pentes  $dP/dT$  des deux équilibres de fusion I-L et II-L, il est nécessaire de déterminer le volume spécifique de la phase liquide. Ce genre de données est rarement disponible dans la littérature et même difficile à obtenir expérimentalement étant donné que beaucoup de composés pharmaceutiques se décomposent à la fusion. Toutefois, le volume du liquide à la température de fusion peut être estimé en utilisant un rapport obtenu grâce aux résultats issus d'autres molécules pharmaceutiques. On trouve en effet que, au point de fusion, le volume spécifique de la substance fondue  $v_L$  est approximativement 1,10 fois  $v_I(T_{fus})$ , le volume spécifique de la forme I à sa température de fusion. Les données sur lesquelles sont basées l'estimation de la valeur 1,10 peuvent être trouvées dans l'article de Ceolin et Rietveld en 2010 [2.24] et dans l'article de Barrio en 2012 [2.31]. Le rapport entre le volume spécifique de la substance fondue et le volume spécifique de la phase solide à 298 K est alors estimé à 1,12.

### 2.3.5. Equation proposée par Yu

Yu a montré que la température de transition entre deux phases solides peut être calculée quand la transition n'est pas observée expérimentalement, si les températures et les enthalpies de fusion des deux formes solides sont connues [2.46]. Cette estimation est basée sur l'évaluation de la différence de l'énergie de Gibbs entre les deux phases solides (A et B),  $\Delta_{A \rightarrow B}G$ . En évaluant la température à laquelle  $\Delta_{A \rightarrow B}G$  est égale à zéro (équilibre), une expression peut être dérivée pour déterminer la température de transition  $T_{A \rightarrow B}$ , qui peut être trouvée par la formule suivante, en négligeant les capacités calorifiques :



$$T_{A \rightarrow B} = \frac{\Delta_{A \rightarrow L} h - \Delta_{B \rightarrow L} h}{\frac{\Delta_{A \rightarrow L} h}{T_{A \rightarrow L}} - \frac{\Delta_{B \rightarrow L} h}{T_{B \rightarrow L}}} \quad \text{Eq. 2.3.4}$$

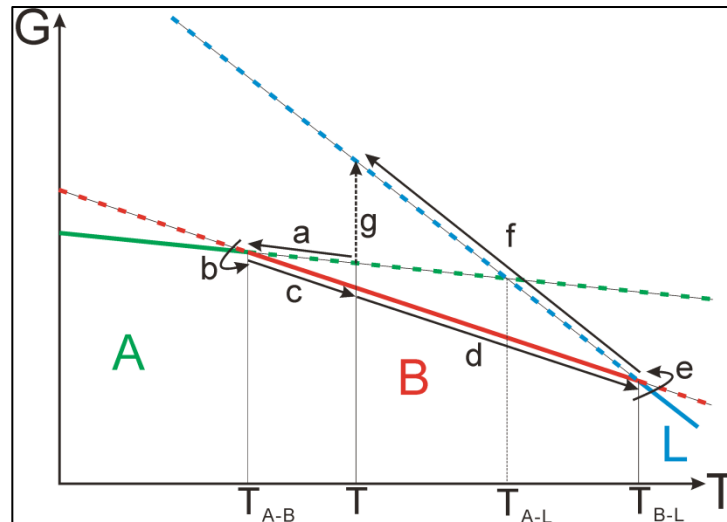
Cette expression est basée sur les données de fusion :  $\Delta_{A \rightarrow L} h$  et  $\Delta_{B \rightarrow L} h$  sont respectivement les enthalpies spécifiques de fusion de A et de B à leurs températures respectives de fusion,  $T_{A \rightarrow L}$  et  $T_{B \rightarrow L}$ .

Cette approche est thermodynamiquement raisonnable ; mais l'absence de certaines données impose des approximations. L'équation proposée est en effet une version simplifiée qui ne tient pas compte des chaleurs spécifiques. Elle peut donc être utilisée dans sa version simplifiée lorsque la différence entre  $T_{A \rightarrow L}$  et  $T_{B \rightarrow L}$  est petite ou encore lorsque les différences entre les chaleurs spécifiques sont faibles.

L'explication thermodynamique de l'approche utilisée par Yu pour la détermination d'une température de transition non observée entre deux phases solides A et B est discutée ci-dessous.

A une température donnée T, la transition de fusion de la forme A est représentée par la flèche g dans la figure 2-3-2. Même si la transition est métastable, la différence entre les énergies de Gibbs des phases A et L,  $\Delta_g G$ , peut être calculée à la température T en utilisant un cycle thermodynamique en se basant sur le fait que  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  et  $\Delta S$  sont des fonctions d'état. Ainsi, les changements d'énergie de Gibbs,  $\Delta_x G$  (x = a, b, c, d, e, f), suivant les flèches noires de a à f de la figure 2-3-2, doivent conduire au même changement dans l'énergie de Gibbs représenté par la flèche g (Figure 2-3-2) :

$$D_g G = D_a G + D_b G + D_c G + D_d G + D_e G + D_f G \quad \text{Eq. 2.3.5}$$



**Figure 2-3-2. Diagramme énergie libre de Gibbs -température d'un système hypothétique A-B-L (solides A et B, liquide L) et ses relations de phases sous conditions ordinaires**

La phase qui présente l'énergie de Gibbs la plus faible est la phase la plus stable. A (ligne verte) est la forme cristalline "basse température", B (ligne rouge) est la forme cristalline "haute température" qui fond à la température la plus élevée (intersection des lignes rouge et bleue). Le point de fusion de la forme A est définie par l'intersection entre les lignes discontinues verte et bleue. Une ligne solide représente une phase stable et une ligne discontinue une phase métastable.

La somme  $\Delta_a G + \Delta_b G + \Delta_c G$  représente le changement d'énergie de Gibbs associé à la transition de A à B à une température donnée T (Eq. 2.3.6) et la somme  $\Delta_d G + \Delta_e G + \Delta_f G$  est le changement d'énergie de Gibbs associé à la transition de B vers l'état liquide à la température T (Eq. 2.3.7)

$$D_{A \rightarrow B} G(T) = D_a G + D_b G + D_c G \quad \text{Eq. 2.3.6}$$

$$D_{B \rightarrow L} G(T) = D_d G + D_e G + D_f G \quad \text{Eq. 2.3.7}$$

La relation (Eq. 2.3.5) peut alors être écrite comme suit :

$$D_{A \rightarrow L} G(T) = D_{A \rightarrow B} G(T) + D_{B \rightarrow L} G(T) \quad \text{Eq. 2.3.8}$$

Le changement de l'énergie de Gibbs peut être exprimé en fonction des changements d'enthalpie,  $\Delta H$  et d'entropie,  $\Delta S$ . Pour la transition A  $\rightarrow$  B :

$$D_{A \rightarrow B} G(T) = D_{A \rightarrow B} H - T D_{A \rightarrow B} S = D_{A \rightarrow B} H - T \frac{D_{A \rightarrow B} H}{T_{A \rightarrow B}} \quad \text{Eq. 2.3.9}$$

Cette équation est valable dans le cas où  $\Delta H$  et  $\Delta S$  sont supposées être indépendantes de la température. On peut noter que si  $\Delta H$  et  $\Delta S$  sont constantes,  $\Delta_{A \rightarrow B} S$  peut être déterminée en

posant  $\Delta_{A \rightarrow B}G$  égale à zéro à  $T = T_{A \rightarrow B}$ . Dans le cas où  $\Delta H$  et  $\Delta S$  dépendent de la température, l'équation (Eq. 2.3.9) devient :

$$D_{A \rightarrow B}G(T) = D_{A \rightarrow B}H(T) - T D_{A \rightarrow B}S(T) \quad \text{Eq. 2.3.10}$$

Dans ce cas, l'équation 2.3.10 peut être écrite en utilisant les capacités de chaleur pour prendre en considération les changements de  $\Delta H$  et  $\Delta S$  :

$$D_{A \rightarrow B}G(T) = D_{A \rightarrow B}H + \int_T^{T_{A \rightarrow B}} C_{p,A} dT + \int_{T_{A \rightarrow B}}^T C_{p,B} dT - T \frac{D_{A \rightarrow B}H}{T_{A \rightarrow B}} - T \left( \int_T^{T_{A \rightarrow B}} \frac{C_{p,A}}{T} dT + \int_{T_{A \rightarrow B}}^T \frac{C_{p,B}}{T} dT \right) \quad \text{Eq. 2.3.11}$$

L'équation 2.3.11 peut être écrite selon un ordre différent :

$$D_{A \rightarrow B}G(T) = \int_T^{T_{A \rightarrow B}} C_{p,A} dT - T \left( \int_T^{T_{A \rightarrow B}} \frac{C_{p,A}}{T} dT \right) + D_{A \rightarrow B}H - T \frac{D_{A \rightarrow B}H}{T_{A \rightarrow B}} + \int_{T_{A \rightarrow B}}^T C_{p,B} dT - T \left( \int_{T_{A \rightarrow B}}^T \frac{C_{p,B}}{T} dT \right) \quad \text{Eq. 2.3.12}$$

Il peut être noté que les différentes contributions dans l'équation 2.3.12 représentent la somme des énergies de Gibbs dans l'équation 2.3.6 ; les deux premiers termes sont  $\Delta_a G$ , les troisième et quatrième termes sont  $\Delta_b G$  et les deux derniers termes sont  $\Delta_c G$ , en fonction de la température  $T$ .

Le même raisonnement peut être appliqué pour l'équation 2.3.7 :

$$D_{B \rightarrow L}G(T) = \int_T^{T_{B \rightarrow L}} C_{p,B} dT - T \left( \int_T^{T_{B \rightarrow L}} \frac{C_{p,B}}{T} dT \right) + D_{B \rightarrow L}H - T \frac{D_{B \rightarrow L}H}{T_{B \rightarrow L}} + \int_{T_{B \rightarrow L}}^T C_{p,L} dT - T \left( \int_{T_{B \rightarrow L}}^T \frac{C_{p,L}}{T} dT \right) \quad \text{Eq. 2.3.13}$$

Les deux premiers termes représentent  $\Delta_d G$ , les troisième et quatrième représentent  $\Delta_e G$  et les deux derniers termes représentent  $\Delta_f G$ .

La somme des équations 2.3.12 et 2.3.13 a pour résultat l'énergie libre de Gibbs associée à la fusion de la forme A,  $\Delta_{A \rightarrow L}G$ , comme décrit dans l'équation 2.3.8. Dans un premier temps, pour simplifier la problématique, la contribution des chaleurs spécifiques est négligée. Dans ce cas, l'équation 2.3.8 devient :

$$D_{A \rightarrow L}G(T) = D_{A \rightarrow B}G(T) + D_{B \rightarrow L}G(T) = D_{A \rightarrow B}H - T \frac{D_{A \rightarrow B}H}{T_{A \rightarrow B}} + D_{B \rightarrow L}H - T \frac{D_{B \rightarrow L}H}{T_{B \rightarrow L}} \quad \text{Eq. 2.3.14}$$

Si deux phases sont en équilibre, la différence de l'énergie de Gibbs est égale à zéro. De ce fait, pour trouver la température de fusion de la forme A, on va poser  $\Delta_{A \rightarrow L}G(T_{A \rightarrow L}) = 0$  et la température  $T = T_{A \rightarrow L}$  peut être directement obtenue à partir de l'équation 2.3.14. Il est à

noter que cette équation avec  $\Delta_{A \rightarrow L}G(T_{A \rightarrow L}) = 0$  conduit directement à l'équation suivante, utilisée pour calculer la température de fusion d'une forme A :

$$T_{A \rightarrow L} = \frac{\Delta_{B \rightarrow L}h + \Delta_{A \rightarrow B}h}{\frac{\Delta_{B \rightarrow L}h}{T_{B \rightarrow L}} - \frac{\Delta_{A \rightarrow B}h}{T_{A \rightarrow B}}} \quad \text{Eq. 2.3.15}$$

Dans le cas où les chaleurs spécifiques ne sont pas négligées, elles doivent être prises en considération de façon explicite. Parce que les domaines de température sont les mêmes pour les deux premiers et deux derniers termes de l'équation 2.3.12, les contributions des chaleurs spécifiques peuvent être combinées dans une seule intégrale. Le même raisonnement peut être appliqué pour l'équation 2.3.13. L'équation 2.3.8 devient :

$$\begin{aligned} D_{A \rightarrow L}G(T) = & D_{A \rightarrow B}H - T \frac{D_{A \rightarrow B}H}{T_{A \rightarrow B}} + D_{B \rightarrow L}H - T \frac{D_{B \rightarrow L}H}{T_{B \rightarrow L}} + \int_{T_{B \rightarrow L}}^T C_{p,L} - C_{p,B} dT - T \left( \int_{T_{B \rightarrow L}}^T \frac{C_{p,L}}{T} - \frac{C_{p,B}}{T} dT \right) \\ & + \int_{T_{A \rightarrow B}}^T C_{p,B} - C_{p,A} dT - T \left( \int_{T_{A \rightarrow B}}^T \frac{C_{p,B}}{T} - \frac{C_{p,A}}{T} dT \right) \end{aligned} \quad \text{Eq. 2.3.16}$$

A ce moment, il est important de savoir quelle information est disponible concernant les chaleurs spécifiques. Si les données concernant les chaleurs spécifiques sont manquantes, l'approche la plus simple est de supposer que la différence entre les chaleurs spécifiques à l'état solide est égale à zéro et, par conséquent, que les deux derniers termes de l'équation 2.3.16 seront nuls. Si les chaleurs spécifiques varient linéairement avec la température, leur différence devrait être linéaire elle aussi, et la différence dans les chaleurs spécifiques du liquide et du solide pourrait être exprimée suivant :

$$C_{p,L} - C_{p,B} = aT + b \quad \text{Eq. 2.3.17}$$

L'incorporation de cette équation dans l'équation 2.3.16 avec un réarrangement des différents termes donne lieu à l'équation suivante :

$$D_{A \rightarrow L}G(T) = D_{B \rightarrow L}H + D_{A \rightarrow B}H - T \frac{D_{B \rightarrow L}H}{T_{B \rightarrow L}} - T \frac{D_{A \rightarrow B}H}{T_{A \rightarrow B}} - \frac{1}{2}a(T_{B \rightarrow L} - T)^2 - b \left( T_{B \rightarrow L} - T + T \ln \left( \frac{T}{T_{B \rightarrow L}} \right) \right) \quad \text{Eq. 2.3.18}$$

Encore, en posant  $\Delta_{A \rightarrow L}G(T_{A \rightarrow L}) = 0$ , la température de fusion de la forme A peut être déterminée. Dans ce cas, il est nécessaire de faire les calculs numériques. Il est aussi à noter que plus le point de fusion de la forme A est proche de celui de la forme B, moins la contribution des chaleurs spécifiques est importante. Mais il ne faut pas oublier que ceci n'est valable que si la différence entre chaleurs spécifiques des phases A et B est très faible. Sinon,

une expression similaire aux derniers termes seront ajoutés avec la contribution de la différence de chaleur spécifique entre les formes A et B.

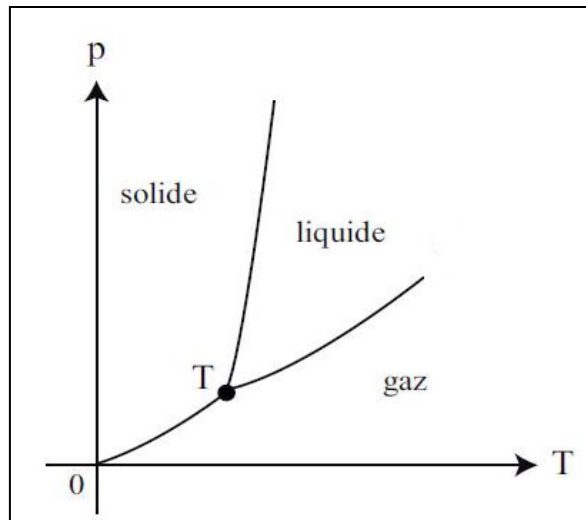
Une approche similaire a aussi été décrite par Bennema et al. [2.47].

### 2.3.6. Construction topologique d'un diagramme de phases

Dans un système présentant deux phases solides I et II, une phase liquide (L) et une phase vapeur (Vap), six courbes d'équilibres diphasés existent (au moins théoriquement) : I-L, II-L, I-Vap, II-Vap, I-II et L-Vap. Sachant qu'un point triple décrit la condition thermodynamique de coexistence de trois phases, il se trouve nécessairement à l'intersection de trois courbes d'équilibres diphasés. Par exemple, le point triple I-II-L est situé à l'intersection des trois courbes I-II, I-L et II-L. Ainsi, un système présentant les six courbes d'équilibre ci-dessus (cas du dimorphisme) doit comporter quatre points triples : I-L-Vap, II-L-Vap, I-II-L et I-II-Vap [2.37].

La démarche générale de construction topologique d'un diagramme de phases pression-température d'un système polymorphique repose sur trois éléments dont l'ordre dépend de la disponibilité des données. Ce diagramme étant une construction essentiellement topologique, seul le positionnement relatif et non absolu des éléments constitutifs du diagramme (points triples et courbes d'équilibre) est à considérer du point de vue de la cohérence thermodynamique de cette construction. Pour rendre le diagramme quantitatif, il est nécessaire de calculer et d'introduire les valeurs des coordonnées des points triples et les valeurs des pentes  $dP/dT$  des équilibres diphasés.

Le premier élément consiste à déterminer de façon globale les positions probables des différentes phases considérées dans le diagramme. La phase vapeur se trouve à des pressions basses et son domaine s'étend en augmentant la température. La phase solide se trouve à des températures basses et, pour la plupart des composés chimiques, son domaine a tendance à augmenter légèrement en augmentant la pression. Le domaine de la phase liquide se trouve entre ceux des phases solide et vapeur à des pressions et des températures intermédiaires (Figure 2-3-3). Quand plusieurs phases solides existent, il est important de connaître comment les domaines de ces deux phases sont positionnés l'un par rapport à l'autre dans le diagramme.



**Figure 2-3-3. Diagramme de phases P-T montrant les positions relatives des domaines des phases solide, liquide et vapeur**

Le principe de Le Chatelier peut être utilisé pour positionner les différentes phases dans le diagramme. Présentant une densité plus faible que celles des phases solide et liquide, la phase vapeur est la phase stable aux basses pressions (inférieures ou égales aux pressions de vapeur saturante du solide et du liquide). Dans le cas où différentes phases solides existent, Le principe de Le Chatelier stipule, de la même manière, que la phase la moins dense est celle qui présente un domaine de stabilité à des pressions inférieures à celles sous lesquelles on trouve la phase la plus dense. D'autre part, il est connu que les solides, par chauffage, se transforment en liquides avec un apport endothermique d'énergie. Il est alors clair que la phase liquide, possédant une énergie plus élevée que celle du solide, présente un domaine de stabilité à hautes températures. Le principe de Le Chatelier stipule de la même manière que, pour les différentes phases solides, la forme ayant l'enthalpie la plus élevée sera stable à hautes températures et celle qui présente l'enthalpie la plus faible aura un domaine de stabilité à températures basses. Le principe de Le Chatelier permet donc de déterminer la stabilité relative entre deux formes solides connues, mais ne permet pas de prévoir l'existence du domaine de stabilité d'une phase inconnue.

Le deuxième élément de construction topologique d'un diagramme de phase consiste à localiser les points triples, points où trois phases sont en équilibre, dans le diagramme en déterminant leurs coordonnées en température et en pression. On a vu que ces points sont en nombre de quatre si le système étudié possède quatre phases différentes [2.37]. Les températures des deux premiers points triples, I-L-Vap et II-L-Vap, correspondent sensiblement aux températures de fusion des formes I et II si elles sont mesurées dans des

conditions sous lesquelles les phases condensées sont en équilibre avec leur phase vapeur. Les températures de fusion des formes solides sont généralement mesurées dans des petites capsules pour analyse calorimétrique différentielle (Differential Scanning Calorimetry, DSC). Ces capsules en aluminium sont fermées par un couvercle serti du même métal et contiennent toujours un certain volume mort. Le volume mort dans ces capsules est en général très faible (environ 30 à 40 microlitres). Au cours du cycle de chauffage appliqué en cours d'analyse, la plus grande part de l'échantillon va fondre tandis qu'une partie va subir une sublimation progressive en sorte que la vapeur sature le volume mort. Le volume mort de telles capsules sera donc rapidement saturé en vapeur, d'autant plus facilement que la tension de vapeur des solides ainsi conditionnés est faible. En d'autres termes, l'échantillon fond en présence de sa vapeur saturante et donc, à sa température de fusion, trois phases (solide, liquide et vapeur) se trouvent en équilibre. Dans ces conditions, les points de fusion peuvent être considérés comme étant des points triples. Il en est de même pour les autres transitions contenant la phase vapeur à condition que les capsules DSC utilisées soient scellées (la masse d'échantillon doit en effet rester constante).

De la même manière, le point triple I-II-Vap peut être confondu avec la température de transition entre les deux formes I et II si celle-ci est mesurée par DSC. Les coordonnées du dernier point triple I-II-L sont, par contre, les plus difficiles à déterminer puisque ce dernier ne peut généralement pas être localisé aux moyens d'analyses calorimétriques effectuées à pression (extérieure) habituelle.

Les pentes des équilibres diphasés sont fournies par l'équation de Clapeyron (Eq. 2.3.3) grâce au changement de l'entropie spécifique ( $\Delta s$ ), ou bien à celui de l'enthalpie spécifique ( $\Delta h$ ), et au changement du volume spécifique ( $\Delta v$ ), à la température  $T$  de l'équilibre en question.

Étant donné que les équilibres de phase sont représentés par des courbes croissant de façon monotones, et donc ne pouvant se croiser qu'une seule fois, il est possible de les représenter par des droites continues (qui sont topologiquement les plus simples des courbes monotones). Pour chaque équilibre de phases, en déterminant la pente de la droite correspondante et en utilisant les coordonnées d'un point sur la droite, celles du point triple par exemple, les différents équilibres de phase peuvent être tracés dans le diagramme pression-température.

### 2.3.7. Tensions de vapeur

Le point d'ébullition normal d'un liquide est atteint quand la vapeur émise par le liquide est égale à celle de la pression atmosphérique, soit 1 bar ou  $10^5$  Pa (0.1 MPa). Avec cette information, la tension de vapeur du liquide peut être décrite en fonction de la température selon l'expression générale :

$$\ln P = \frac{-\Delta_{L \rightarrow \text{vap}} H}{RT} + B_{L \rightarrow \text{vap}} \quad \text{Eq. 2.3.19}$$

Avec P la tension de vapeur en Pa, R la constante de gaz parfait ( $8,3145 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ) et  $B_{L \rightarrow \text{vap}}$  une constante déterminée connaissant  $\Delta_{\text{vap}} H$  et T, sachant qu'alors,  $P = 10^5 \text{ Pa}$ . Il est clair que cette équation fournit seulement une estimation des tensions de vapeur parce que l'enthalpie de vaporisation  $\Delta_{\text{vap}} H$  est considérée constante, c'est-à-dire indépendante de la pression et de la température.

Les tensions de vapeur constituent un autre moyen pour comparer les énergies de Gibbs des différentes phases. La phase possédant la tension de vapeur la plus faible est nécessairement la phase la plus stable et donc celle qui possède la plus petite énergie de Gibbs. De ce fait, les calculs suivants constituent un moyen supplémentaire pour étudier les relations entre phases tout en complétant le diagramme topologique P-T. Il convient de rappeler que le terme topologique signifie que le diagramme de phases ne représente que les positions relatives des différents domaines de phases, des équilibres diphasés et des points triples les uns par rapport aux autres. Un tel diagramme ne prétend pas représenter quantitativement le diagramme de phases absolu, pour lequel toutes les phases possibles devraient être connues et tous les points triples et les équilibres de phase devraient être confirmés expérimentalement. Les tensions de vapeur calculées au moyen de l'équation 2.3.19 ne sont alors que des estimations dans le sens absolu, qui restent néanmoins acceptables pour comparaison dans le sens relatif.

### 2.4. Notions fondamentales concernant la stabilité chimique

En plus de la stabilité physique, la stabilité chimique des substances actives est aussi importante à étudier au cours du développement des médicaments. Cette stabilité chimique, une fois définie, que ce soit pour les matières premières que pour les produits finis, est susceptible d'être entravée par plusieurs facteurs d'agression tels que l'oxygène de l'air, l'humidité de l'atmosphère, la chaleur et la lumière, et ce au cours des phases de



préformulation, de développement, de transport et de conservation. Devant ces considérations, les études de stabilité chimique sont exigées par les autorités réglementaires du secteur du médicament et doivent figurer dans les dossiers pharmaceutiques d'autorisation de mise sur le marché. Ces études ont pour objectifs d'une part de déterminer la réactivité chimique de la substance active et de définir les conditions de sa stabilité permettant de fixer la date de péremption du médicament correspondant et de déterminer les conditions de conservation de la matière première et du produit fini. Elles servent d'autre part à mettre en évidence les produits de dégradation de la substance active et ainsi, à établir son schéma et son mécanisme de dégradation.

Les impuretés sont des composés chimiques qui peuvent se développer durant la synthèse ou au cours de la conservation de la substance active ou du produit fini. Elles sont susceptibles d'influencer l'efficacité et la sécurité du médicament [2.48, 2.49]. Le profil d'impuretés est devenu essentiel durant les étapes du développement pharmaceutique [2.50]. Les autorités réglementaires telles que l'International Conference on Harmonization (ICH) et la Food and Drug Administration (FDA) recommandent le report des impuretés présentes dans la substance active et/ou sa formulation au-delà des limites tolérées tel que mentionnées dans l'United States Pharmacopeia (USP) [2.51, 2.52]. Le processus de synthèse de la substance active, sa dégradation, et les incompatibilités entre principe actif et excipient sont les principales sources d'impuretés. Leur identification et leur quantification permettent d'apprécier la qualité de la substance active, de son produit médicamenteux ainsi que l'influence des facteurs de dégradation comme la température, l'humidité, la lumière, le pH, les solvants et les réactifs utilisés [2.53 – 2.55].

#### **2.4.1. Différents types d'études de stabilité**

La Conférence Internationale d'Harmonisation Q1A (International Conference for Harmonisation, ICH) [2.56] définit deux types d'études de stabilité sur le principe actif :

- Etude de stabilité dans des conditions de température et d'humidité définies qui permet d'étudier le devenir des matières premières dans les conditions d'entreposage de longue durée ( $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C} / 60\% \text{ HR} \pm 5\% \text{ HR}$ ), de dégradation accélérée ( $40\text{ °C} \pm 2\text{ °C} / 75\% \text{ HR} \pm 5\% \text{ HR}$ ) et, le cas échéant, dans les conditions intermédiaires ( $30\text{ °C} \pm 2\text{ °C} / 60\% \text{ HR} \pm 5\% \text{ HR}$ ). Cette étude sert :
  - A mettre en évidence l'évolution de la qualité dans le temps sous l'influence de facteurs de l'environnement qui sont la température et l'humidité,

- A déterminer les conditions de conservation et la durée de validité permettant de garantir le maintien de la qualité de la substance active, sa sécurité, son efficacité et son acceptabilité tout au long de cette durée.

Ces études accélérées, intermédiaires ou à long terme entrent dans le cadre des études systématiques de stabilité.

- Les essais sous contraintes complètent les essais précédents. Ils permettent d'évaluer la réactivité chimique de la molécule lorsqu'elle est mise en contact avec des éléments étrangers tels que les acides et les bases et les agents oxydo-réducteurs. Ces essais portent sur l'effet de la température, la lumière, l'oxydation et la sensibilité de la substance à l'hydrolyse (effet du pH), qu'elle soit en solution, en suspension ou solide.

Ces études sont des essais complémentaires appelées études dans des conditions de stress ou études de dégradation forcée.

#### **2.4.2. Les études de dégradation forcée**

Les études de dégradation forcée, ou études de stress, de principes actifs ou de formes pharmaceutiques sont d'un grand intérêt au cours du développement pour mieux connaître la stabilité du produit. Elles consistent à faire subir à un produit donné des traitements agressifs par différents facteurs de stress (température, l'humidité, pH, lumière, etc.) plus drastiques que ceux employés lors des études en conditions de conservation long terme ou accélérées telles que définies par l'ICH [2.57].

Les études de dégradation forcée sont réalisées pour répondre à plusieurs types d'objectifs intervenant aux différentes phases de développement [2.57] :

- La mise au point et la validation de méthodes analytiques de dosage et de recherche d'impuretés (spécificité et caractère indicateur de stabilité),
- La connaissance des principes actifs et des produits finis (voies de dégradation, conditions pour la conservation ou la manipulation future du produit, etc.),
- La formation spécifique d'impuretés de dégradation en vue de leur isolement et/ou de leur identification.

Le guide Q1A de l'ICH [2.56] concernant les essais de stabilité de nouveaux produits et substances médicamenteuses propose l'application des conditions suivantes :

- Une température au-dessus de laquelle sont effectués les essais de dégradation accélérée (par intervalle de 10 °C),
- Une humidité convenable, par exemple 75% HR ou plus,
- L'évaluation, sur une vaste gamme de pH, de la sensibilité de la substance à l'hydrolyse, qu'elle soit en solution ou en suspension,
- L'oxydation,
- La photolyse où les conditions standards de cet essai sont décrites dans le guide de l'ICH sur la photostabilité des nouveaux produits et des substances médicamenteuses [2.58].

Aucun des guides ne présente un protocole détaillé des conditions de l'hydrolyse et de l'oxydation. Ces conditions sont cependant citées dans la littérature [2.59, 2.60]. L'hydrolyse peut être effectuée en utilisant des solutions d'acide chlorhydrique HCl 0,1 M et d'hydroxyde de sodium NaOH 0,1 M. Pour l'oxydation, le réactif suggéré et le plus couramment utilisé est l'eau oxygénée à une concentration comprise entre 3 et 30 %, bien que le permanganate de potassium ait été essayé.

### **2.4.3. Contexte réglementaire**

Les notions d'études de dégradation forcée et de conditions de stress sont abordées dans les principales réglementations pharmaceutiques sans toutefois qu'elles en spécifient le déroulement précis [2.57].

Dans les guides ICH, il y a très peu d'informations sur la stratégie et les principes pour conduire des études de dégradation forcée, à l'exception de la photostabilité qui est décrite avec précision dans le guide Q1B de l'ICH [2.61].

Le guide Q1A de l'ICH [2.56] indique que l'étude de produits de dégradation obtenus sous contraintes aide à définir les voies de dégradation et à mettre au point et à valider des procédures analytiques appropriées. Il précise aussi que les méthodes d'évaluation de la stabilité doivent être validées. La directive Q1C de l'ICH [2.62] « Essais de stabilité des nouvelles formes posologiques » stipule que les protocoles d'évaluation de la stabilité des nouvelles formes posologiques doivent s'inspirer de la directive principale sur les essais de stabilité. De même, les guides Q3A et Q3B de l'ICH [2.51, 2.63] portant sur les impuretés dans les nouvelles substances actives et produits médicamenteux, soulignent que les procédures analytiques doivent être validées et permettre la détection et la quantification des

impuretés. Le guide Q6A de l'ICH [2.19] relatif aux spécifications mentionne aussi l'exigence des méthodes indicatrices de stabilité avec des essais et des critères universels pour les substances actives et les produits médicamenteux. La même exigence a été rapportée dans le guide Q5C de l'étude des essais de stabilité des produits biologiques et biotechnologiques [2.64]. Cependant, aucun de ces guides ne donne une définition claire et exacte à ces méthodes indicatrices.

Le protocole de validation des méthodes analytiques est détaillé dans le guide Q2 de l'ICH [2.65].

Par ailleurs, le guide de 1998 de la FDA (Food and Drug Administration) sur la stabilité [2.66] définit les méthodes indicatrices de stabilité comme étant des méthodes analytiques quantitatives validées qui peuvent détecter les changements au cours du temps des propriétés chimiques, physiques ou microbiologiques de la substance active ou du produit médicamenteux et qui sont spécifiques. Une définition comparable a été également proposée par le draft du guide de la FDA de 2001 sur les procédures analytiques et les méthodes de validation, de fabrication et la documentation des contrôles [2.67].

Les notions de stress sont rapportées aussi par les guides de l'OMS [2.68], du European Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP) [2.69, 2.70] et la ligne directrice canadienne du programme des produits thérapeutiques concernant les essais de stabilité des substances et produits médicamenteux existants [2.71].

Enfin, il est à noter que l'USP indique, dans le paragraphe concernant les études de stabilité dans la fabrication (Stability Studies in Manufacturing) [2.72], que les échantillons des produits doivent être dosés par une méthode de dosage indicatrice de stabilité.

**REFERECES**

- [2.1] Bernstein, J., 2002. Polymorphism in Molecular Crystals. International Union of Crystallography. Monographs on crystallography 14. Oxford Science Publications. Oxford.
- [2.2] Rodriguez-Spong, B., Price, C.P., Jayasankar, A., Matzger, A.J., Rodriguez-Homedo, N., 2004. General principles of pharmaceutical solid polymorphism : a supramolecular perspective. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 241-274.
- [2.3] Prohens, R., Puigjaner, C., 2007. Polimorfismo en la industria farmacéutica. *El Farmaceutico* 373, 58-68.
- [2.4] Brittain, H.G., 2009. Polymorphism in Pharmaceutical Solids. 2<sup>nd</sup> ed., Informa Healthcare USA, Inc., New York.
- [2.5] Henck, J.O., Greisser, U.J., Burger, A., 1997. Polymorphie von Arzneistoffen. Eine Wirtschaftliche Herausforderung? *Pharm. Ind.* 59, 165-9.
- [2.6] Threlfall, T.L., 1995. Analysis of organic polymorphs. A review. *Analyst* 120, 2435-2460.
- [2.7] Stahly, G., 2007. Diversity in single-and multiple-component crystals. The search for and prevalence of polymorphs and cocrystals. *Cryst. Growth & Des.* 7, 1007-1026.
- [2.8] Yu, L., 2001. Amorphous pharmaceutical solids : preparation, characterization and stabilization. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 48, 27-42.
- [2.9] Pudipeddi, M., Serajuddin, A.T., 2005. Trends in solubility of polymorphs. *J. Pharm. Sci.* 94, 929-939.
- [2.10] Hancock, B.C., Parks, M., 2000. What is the true solubility advantage of amorphous pharmaceuticals ? *Pharm. Res.* 17, 397-404.
- [2.11] Byrn, S.R., 1982. Solid-State Chemistry of drugs. New-York: Academic Press.
- [2.12] Heinz, A., Strachan, C.J., Gordon, K.C., Rades, T., 2009. Analysis of solid state transformations of pharmaceutical compounds using vibrational spectroscopy. *J. Pharm. Pharmacol.* 61, 971-988.
- [2.13] Knapman, K., 2000. Polymorphic predictions : understanding the nature of crystalline compounds can be critical in drug development and manufacture. *Mod. Drug Discov.* 3, 53-57.

- [2.14] Doelker, E., 2002. Modifications cristallines et transformations polymorphes au cours des opérations galéniques. *Ann. Pharm. Fr.* 60, 161-176.
- [2.15] Chieng, N., Rades, T., Aaltonen, J., 2011. An overview of recent studies on the analysis of pharmaceutical polymorphs. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 55, 618-644.
- [2.16] Byrn, S., Pfeiffer, R., Ganey, M., Hoiberg, C., Poochikian, G., 1995. Pharmaceutical solids: a strategic approach to regulatory consideration. *Pharm. Res.* 12, 945-954.
- [2.17] Buckton, G.D.P., 1999. Assessment of disorder in crystalline powders – a review of analytical techniques and their application. *Int. J. Pharm.* 179, 141-158.
- [2.18] Masse, J., 2002. Polymorphisme cristallin et médicament. Introduction. *Ann. Pharm. Fr.* 60, 150-151.
- [2.19] ICH Q6A, 2000. Specifications: Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: Chemical substances. International conference on harmonization.
- [2.20] Barrio, M., De Oliveira, P., Céolin, R., Lopez, D.O., Tamarit, J., 2002. Polymorphism of 2-methyl-2-chloropropane and 2,2-dimethyl propane (neopentane): Thermodynamic evidence for a high-pressure orientationally disordered rhombohedral phase through topological p-T diagrams. *Chem. Mater* 14, 851-857.
- [2.21] Ceolin, R., Toscani, S., Agafonov, V., Dugué, J., 1992. Phenomenology of polymorphism. 1. pressure-temperature representation of trimorphism – general rules; application to the case of dimethyl 3, 6-dichloro-2,5-dihydroxyterephthalate. *J. Solid State Chem.* 98, 366-78.
- [2.22] Ceolin, R., Toscani, S., Dugué, J., 1993. Phenomenology of polymorphism. 2. Criteria for overall (P, T) monotropy – applications to monochloroacetic acid and to hydrazine monohydrate. *J. Solid State Chem.* 102, 465-79.
- [2.23] Ceolin, R., Agafonov, V., Louër, D., Dzyabchenko, V.A., Toscani, S., Cense, J.M., 1996. Phenomenology of polymorphism. 3. P,T diagram and stability of piracetam polymorphs. *J. Solid State Chem.* 122, 186-94.

- [2.24] Ceolin, R., Rietveld, I.B., 2010. Phenomenology of polymorphism and topological pressure-temperature diagrams. Description of the phase relationship involving Atovaquone polymorphs I and III. *J. Therm. Anal. Calorim.*102, 357-360.
- [2.25] Espeau, P., Ceolin, R., Tamarit, J.L., Perrin, M.A., Gauchi, J.P., Leveiller, F., 2005. Polymorphism of paracetamol : relative stabilities of the monoclinic and orthorhombic phases inferred from topological pressure-temperature and temperature-volume phase diagrams. *J. Pharm. Sci.*94, 524-539.
- [2.26] Gana, I., Ceolin, R., Rietveld, I.B., 2012. Phenomenology of polymorphism: the topological pressure-temperature phase relationships of the dimorphism of finasteride. *Thermochim. Acta* 546, 134-137.
- [2.27] Giovannini, J., TerMinassian, L., Céolin, R., Toscani, S., Perrin, M.A., Louër, D., Leveiller, F., 2001. Tetramorphism of fananserine : p, T diagram and stability hierarchy from crystal structure determinations and thermodynamic studies. *J. Phys. IV* 11, 123-126.
- [2.28] Toscani, S., Dzyabchenko, A., Agafonov, V., Dugué, J., Ceolin, R., 1996. Polymorphism of sulfanilamide. 2. Stability hierarchy of alpha-, beta- and gamma-forms from energy calculations by the atom-atom potential method and from the construction of the P, T phase diagram. *Pharm. Res.*13, 151-154.
- [2.29] Toscani, S., de Oliveira, P., Ceolin, R., 2002. Phenomenology of polymorphism. IV. Tetrimerism of ferrocene and the overall metastability of its triclinic phase. *J. Solid State Chem.*164, 131-137.
- [2.30] Barrio, M., Espeau, P., Tamarit, J.L., Perrin, M.A., Veglio, N., Ceolin, R., 2009. Polymorphism of progesterone : relative stabilities of the orthorhombic phases I and II inferred from topological and experimental pressure-temperature phase diagrams. *J. Pharm. Sci.*98, 1657-1670.
- [2.31] Barrio, M., Maccaroni, E., Rietveld I.B., Malpezzi, L., Masciocchi, N., Ceolin, R., Tamarit, J.L., 2012. Pressure-temperature state diagram for the phase relationships between benfluorex hydrochloride forms I and II: a case of enantiotropic behavior. *J. Pharm. Sci.* 101, 1073-1078.
- [2.32] Ceolin, R., Tamarit, J.L., Barrio, M., Lopez, D.O., Nicolaï, B., Veglio, N., Perrin, M.A., Espeau, P., 2008. Overall monotropic behavior of metastable phase of biclotymol, 2,2'-

methylenebis(4-chloro-3-methyl-isopropylphenol), inferred from experimental and topological construction of the related P-T state diagram. *J. Pharm. Sci.* 97, 3927-3941.

[2.33] Ledru, J., Imrie, C.T., Pulham, C.R., Ceolin, R., Hutchinson, J.M., 2007. High pressure differential scanning calorimetry investigations on the pressure dependence of the melting of paracetamol polymorphs I and II. *J. Pharm. Sci.* 96, 2784-2794.

[2.34] Rietveld, I., Barrio, M., Espeau, P., Tamarit, J., Ceolin, R., 2011. Topological and experimental approach to the pressure-temperature-composition phase diagram of the binary enantiomer system D- and L- camphor. *J. Phys. Chem. B* 115, 1672-1678.

[2.35] Toscani, S., Dugué, J., Céolin, R., 1992. A new insight into phase separation in the As-Te glasses from the (p,T) diagram of As<sub>2</sub>Te<sub>3</sub>. *Thermochim. Acta.* 196, 191-202.

[2.36] Espeau, P., Céolin, R., 2001. Differential scanning calorimetry studies on substances with non-negligible vapor pressure: T-v and P-T diagrams of adamantane. *Thermochim. Acta.* 376, 147-154.

[2.37] Riecke, E., 1890. Spezielle Fälle von Gleichgewicht Erscheinungen eines aus mehreren Phasen zusammen gesetzten Systemes. *Z. Phys. Chem. (Munich)* 6, 411.

[2.38] Bakhuis-Roozeboom, H.W., 1901. Die heterogenen Gleichgewichte vom Standpunkte der Phasenlehre. Erstes Heft: Die Phasenlehre-Systeme au seiner Komponente. Braunschweig: Freidrich Vieweg und Sohn.

[2.39] Lehmann, O., 1888. *Molekularphysik*. Leipzig, Verlag von Wilhelm Engelmann.

[2.40] Nagasako, N., 1928. On enantiotropy and monotropy. I. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 3, 90-95.

[2.41] Mallard, E., Le Chatelier, H., 1884. Sur la variation, avec la pression, de la température à laquelle se produit la transformation de l'iodure d'argent. *Comptes Rendus Acad. Sci.*, 99, 157-160.

[2.42] Burger, A., Ramberger, R., 1979a. Polymorphism of pharmaceuticals and other molecular crystals. 1. Theory of thermodynamic rules. *Mikrochim. Acta.* 2, 259-316.

[2.43] Burger, A., Ramberger, R., 1979b. Polymorphism of pharmaceuticals and other molecular crystals. 2. Applicability of thermodynamic rules. *Mikrochim. Acta.* 2, 273-271.



- [2.44] Gibbs, J.W., 1875. On the equilibrium of heterogeneous substances, first part. *Trans. Conn. Acad.* 3, 108-248.
- [2.45] Gibbs, J.W., 1877. On the equilibrium of heterogeneous substances (concluded). *Trans. Conn. Acad.* 3, 343-524.
- [2.46] Yu, L., 1995. Inferring thermodynamic stability relationship of polymorphs from melting data. *J. Pharm. Sci.* 84, 966- 974.
- [2.47] Bennema, P., Van Eupen, J., Van der Wolf, B.M.A., Los, J.H., Meeks, H., 2008. Solubility of molecular crystals: polymorphism in the light of solubility theory. *Int. J. Pharm.* 351, 74-91.
- [2.48] Kovalski, J., Kraut, B., Matiuz, A., Giangiulio, M., Brosbst, G., Cango, W., 2007. Impurities in genetic pharmaceutical development. *Adverse Drug Rev.* 59, 56-63.
- [2.49] Rao, R.N., Nagaraju, V., 2003. A overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. *J. Pharmaceut. Biomed.* 33, 335-337.
- [2.50] Zhou, L., Mao, B., Novak, T., Ge, Z., 2007. Impurity profile tracking for act pharmaceutical ingredients : Case reports. *J. Pharmaceut. Biomed.* 4, 421-429.
- [2.51] ICH Q3A (R2), 2006. Impurities in New Drug Substances end products. International Conference on Harmonization.
- [2.52] ICH Q3C (R3), September 2002. Impurities : Guidelines for Residual solvents. International Conference on Harmonization.
- [2.53] Ranjit, S., Zia ur, R., 2012. Current trends in forced degradation study for pharmaceutical product development. *J., Pharm. Educ. Res.* 3 (1).
- [2.54] Qiu, F., Norwood, D.L., 2007. Identification of pharmaceutical impurities. *J. Liq. Chromatogr.* 30, 877-935.
- [2.55] Matthews, B.R., 1999. Regulatory aspects of stability testing in Europe. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25, 831-856.
- [2.56] ICH Q1A (R2), 2003. Stability testing of new drug substances and products. International Conference on Harmonization.

[2.57] Ellie, C., Breton, D., Brezillon, C., Buret, D., Camarade, M., Castel, F., Cosledan, S., Coupe, J., Creso, N., Duguet, A., Laschi, A., Laviron, S., Menier, I., Mennweg, V., Nolleau, V., Zanzi, V., 2007. Etudes de dégradation forcée au cours du développement pharmaceutique. STP Pharma Pratiques 17 (2), 89-99.

[2.58] Food and drug Administration 1997. International conference on harmonization; Guidelines for the photostability testing of new drug substances and products.

[2.59] Singhi, S., Bakshi, M., 2000. Pharm. Tech. 24, 1-14.

[2.60] Bakshi, M., Singhi, S., 2002. J. Pharm. Biomed. Anal. 28, 1011-1040.

[2.61] ICH Q1B, 1996. Photo-stability testing of new drugs substances and products. International Conference on Harmonization.

[2.62] ICH Q1C, 1996. Stability testing for new dosage forms. International Conference on Harmonization.

[2.63] ICH Q3B (R2), 2006. Impurities in new drug products. International Conference on Harmonization.

[2.64] ICH Q5C, 1995. Quality of biotechnological products: Stability testing of biotechnological / biological Products. International conference on harmonization.

[2.65] ICH Q2 (R1), 2005. Validation of analytical procedures: text and methodology. International conference on harmonization.

[2.66] FDA, 1998. Stability Testing of Drug Substances and Drug Products.

[2.67] FDA, 2000. Analytical Procedures and Methods Validation Chemistry, Manufacturing and Controls Documentation, draft guidance.

[2.68] WHO Guidelines on Stability Testing of Pharmaceutical Products Containing Well-Established Drug Substances in Conventional Dosage Forms, WHO, Geneva 1993.

[2.69] Guideline on Stability Testing of Existing Active Substances and Related Finished Products, CPMP (EMA), 1998.

[2.70] CPMP/QWP/130/96 Rev1: Guideline on the chemistry of new active substances.

[2.71] Guideline on Stability Testing of Existing Active Substances and Products, Therapeutic Products Directorate, Health Canada, 1997.

[2.72] The United States Pharmacopeia (USP) 26, US Pharmacopeial convention, Rockville, MD 2003, 2415.

## Chapitre 3.

### Matériels et méthodes.

CHAPITRE 3. MATERIELS ET METHODES.....	57
3.1. Matériels.....	58
3.2. Protocole de dégradation forcée.....	59
3.3. Méthodes de l'analyse chimique.....	59
3.3.1. Chromatographie liquide à haute performance.....	60
3.3.1.1. Principe.....	60
3.3.1.2. Conditions expérimentales.....	63
3.3.2. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.....	63
3.3.2.1. Principe.....	63
3.3.2.2. Conditions expérimentales.....	66
3.4. Méthodes de l'analyse thermique.....	67
3.4.1. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC).....	68
3.4.2. Analyse thermique différentielle sous haute pression (HP-ATD).....	72
3.4.2.1. Principe [3.12, 3.13].....	72
3.4.2.2. Conditions expérimentales.....	74
3.4.3. Analyse thermogravimétrique (ATG).....	75
3.4.3.1. Principe.....	75
3.4.3.2. Conditions expérimentales.....	76
3.5. Méthodes d'étude des interactions avec l'eau.....	77
3.5.1. Tests d'hygroscopicité en conditions statiques.....	77
3.5.2. Etude de sorption-désorption dynamique de vapeur d'eau.....	78
3.5.2.1. Principe.....	78
3.5.2.2. Conditions expérimentales.....	80
3.6. Analyse par diffraction des rayons X.....	80
3.6.1. Principe [3.18].....	80
3.6.2. Conditions expérimentales.....	83
REFERECES.....	84

Ce chapitre décrit brièvement le matériel utilisé et les méthodes d'analyse mises en œuvre au cours de ce travail. Pour chaque technique, le principe sera rappelé et les conditions expérimentales choisies et appliquées seront détaillées.

### 3.1. Matériels

**Tienoxolol.** Pour l'étude de dégradation forcée en solution du tienoxolol, des échantillons de tienoxolol ont été fournis par UPSA Pharma (Agen, France) et conservés à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'acétonitrile, de qualité HPLC, acheté à Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France) et l'eau ultra pure, obtenue à partir d'un système Q-Pod Milli-Q (Millipore, Molsheim, France), ont été utilisés pour la dissolution. La solution standard de stockage ( $600 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) a été préparée par dissolution de 120 mg de tienoxolol dans 200 mL d'un mélange d'eau purifiée et d'acétonitrile 20/80 (v/v). Une solution de travail a été préparée par dilution de la solution de stockage dans l'eau purifiée afin d'obtenir une concentration finale de  $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ . L'eau oxygénée 30% a été fournie par Carlo Erba SDS (Val de Reuil, France). L'hydroxyde de sodium 32%, obtenu de VWR international Prolabo (Fontenay Sous-bois, France), et l'acide chlorhydrique 32%, obtenu de Merck (Fontenay Sous-bois, France), ont été utilisés à une concentration de 1 M. L'acide trifluoroacétique (TFA), (99%) a été acheté chez VWR International Prolabo (Fontenay Sous-Bois, France).

**Benzocaïne.** Pour l'étude de la stabilité physique de la benzocaïne, l'échantillon utilisé (pureté  $\geq 99\%$ ) a été acheté à Fluka. Une analyse préliminaire par diffraction des rayons X a montré qu'il s'agissait de la forme orthorhombique  $P2_12_12_1$  (forme II).

**Chlorhydrate de cystéamine.** Pour l'étude de la stabilité physique et chimique du chlorhydrate de cystéamine, des échantillons (pureté  $> 98\%$ ) ont été achetés à Sigma Aldrich. A cause du caractère très hygroscopique de ce matériau, la préparation des échantillons a été réalisée dans une enceinte fermée dans laquelle l'humidité contrôlée a été fixée à des taux inférieurs à 10%. L'acétonitrile de qualité HPLC, acheté à Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France), l'eau ultra pure, obtenue à partir d'un système Q-Pod Milli-Q (Millipore, Molsheim, France), et l'acide heptafluorobutyrique (HFBA), acheté à VWR International Prolabo (Fontenay Sous-Bois, France), sont les trois liquides constituant la composition de la phase mobile utilisée pour l'analyse chromatographique.

### 3.2. Protocole de dégradation forcée

Des échantillons de tienoxolol en solution ont été exposés à différentes conditions de stress pour subir une dégradation forcée conformément aux conditions ICH [3.1].

Trois conditions de stress hydrolytique ont été appliquées utilisant des solutions de HCl 0,05 M et NaOH 0,05 M comme agents de dégradation. Elles sont effectuées de la manière suivante : (a) en conditions acides, 1 mL HCl (0,1 M) est ajouté à 1 mL de la solution de stockage de TXL et le tout est gardé à 80°C pendant 2,5 h. Cette solution est ensuite neutralisée par l'addition de 1 mL de NaOH (0,1 M) et placée à température ambiante ; (b) en conditions alcalines, 1 mL de NaOH est ajouté à 1 mL de la solution de stockage de TXL et le tout est gardé à 80°C pendant 2,5 h. Cette solution est par la suite neutralisée par l'addition de 1 mL de HCl (0,1 M) et placée à température ambiante ; et (c) à pH non modifié, 1 mL d'eau purifiée est ajouté à 1 mL de la solution de stockage de TXL et ce tout est gardé à 80°C pendant 4h.

Les études de dégradation en conditions oxydantes ont été réalisées par exposition aux peroxydes. Elles utilisent l'eau oxygénée 15% (v/v) comme facteur de stress et sont effectuées de la manière suivante : 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (v/v) est ajouté à 1 mL de la solution de stockage de TXL et le tout est ensuite gardé à 25°C pendant 24h.

Concernant les études de photolyse, un volume de 1 mL de la solution de travail de TXL contenue dans un tube en verre est exposé à une source de lumière dont la longueur d'onde est de 254 nm et l'intensité de 200 W h m<sup>-2</sup>. Une lampe UV, CAMAG TL-900 (Muttentz, Suisse) avec deux longueurs d'onde variables (254 et 350 nm) est utilisée pour effectuer ce traitement.

### 3.3. Méthodes de l'analyse chimique

Au cours de ce travail, l'analyse chimique de certains produits étudiés a été effectuée au moyen de la chromatographie liquide à haute performance, CLHP (en anglais : High Performance Liquid Chromatography, HPLC) et la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, CL-SM (en anglais : Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry, LC-MS).

### 3.3.1. Chromatographie liquide à haute performance

#### 3.3.1.1. Principe

La chromatographie liquide à haute performance est une technique d'analyse séparative et préparative utilisée à des fins d'identification et/ou de quantification. Elle permet la séparation, en phase liquide, des constituants présents dans des mélanges variés. Les molécules à séparer sont entraînées par un fluide liquide qui constitue la phase mobile à travers un support fixe (colonne chromatographique), contenant un solide finement divisé ou un liquide fixé, constituant la phase stationnaire. La séparation est donc basée sur la différence d'affinité de ces substances à analyser à l'égard des deux phases. En effet, les interactions chimiques ou physiques avec la phase mobile ainsi que la phase stationnaire diffèrent d'un produit à analyser à un autre, donnant pour chaque composé un coefficient de partage qui lui est propre. Si plusieurs composés sont présents (mélange), ils se trouvent alors entraînés à des vitesses différentes qui, selon leurs coefficients de partage, provoquent leur séparation. Une fois les constituants du mélange séparés, leurs concentrations sont suivies par un analyseur permettant d'obtenir une quantification exacte de chacun des composants du mélange [3.2 - 3.4].

D'une façon générale, le phénomène chromatographique mis en jeu repose sur la répartition des composés dans deux phases, non ou très peu miscibles, jusqu'à l'établissement d'un équilibre. Cette partition dépend des propriétés de chaque composé vis-à-vis des phases considérées. Le renouvellement continu de la phase mobile remet en cause cet équilibre et entraîne, par une succession d'autres équilibres, la migration des substances tout au long de la phase stationnaire. La séparation des différents composés tient au fait que chaque constituant du mélange migre avec une vitesse qui lui est propre [3.4].

Les méthodes chromatographiques peuvent être classées selon le phénomène chromatographique qui dépend de la nature de la phase stationnaire. D'après cette classification on considère [3.3, 3.5] :

- La chromatographie d'adsorption, lorsque la phase stationnaire est un solide doué de propriétés adsorbantes, tels que l'oxyde d'aluminium, les silicates de magnésium, les gels de silice. Elle met à profit la propriété que possèdent certaines substances en solution d'être retenues par la surface d'une phase stationnaire très finement divisée appelée adsorbant. Les composants sont simplement plus ou moins retenus à la surface

de la phase stationnaire par adsorption physique. C'est une technique qui prend en compte la polarité des composants.

- La chromatographie de partage, lorsque la phase stationnaire est un liquide non miscible à la phase mobile. Le phénomène mis en jeu est un phénomène de partage entre deux liquides non miscibles. Il implique que ces substances soient solubles dans ces deux phases, mais que leurs solubilités soient différentes. Les analytes sont séparés en fonction de leur affinité avec les phases stationnaire et mobile. L'affinité dépend de la polarité des analytes et des phases. En mode normal la phase stationnaire est polaire, en mode inverse elle est apolaire.

Dans la chromatographie à polarité de phases normale, le lit du matériau stationnaire est de nature fortement polaire (silice par exemple) et la phase mobile est apolaire (par exemple n-hexane ou tétrahydrofurane). Ce type de colonne retient donc les composés polaires plus longtemps que les composés moins polaires ou apolaires.

La chromatographie à polarité de phases inversée inverse cette situation : le lit de matériau stationnaire est de nature apolaire (hydrocarbures) et la phase mobile est constituée par un liquide polaire (par exemple eau ou alcool). Un composé y est retenu d'autant plus longtemps que sa polarité est faible.

- La chromatographie par échanges d'ions où la phase stationnaire est formée de macromolécules (résines) portant des groupements fonctionnels acides ou basiques qui permettent l'échange de certains de leurs ions avec des ions de même signe du mélange à chromatographier. Le phénomène de séparation repose sur cette propriété d'échange et ne peut s'appliquer qu'aux composés ayant des groupements échangeables, c'est-à-dire aux molécules ioniques ou ionisables. Plus la charge d'un ion de la molécule est grande, plus cet ion est attiré par ceux de la phase stationnaire et plus son temps d'élution est long. La phase mobile est constituée par un tampon aqueux dont le pH et la polarité peuvent être réglés pour modifier les temps d'élution des composés au travers de la colonne. Les groupements fonctionnels sont habituellement des groupes "acide sulfonique" ( $-\text{SO}_3\text{H}$ ) pour les échangeurs de cations et "ammonium quaternaire" ( $-\text{N}(\text{R})_3$ ) pour les échangeurs d'anions.
- La chromatographie d'exclusion diffusion, ou chromatographie par perméation de gel ou plus simplement chromatographie sur gel, dans laquelle la phase stationnaire est constituée d'un système poreux, tel que le gel, qui se comporte comme un véritable tamis vis-à-vis des molécules ayant des masses et des structures différentes. Cette méthode repose sur le comportement dissemblable de molécules, de volumes

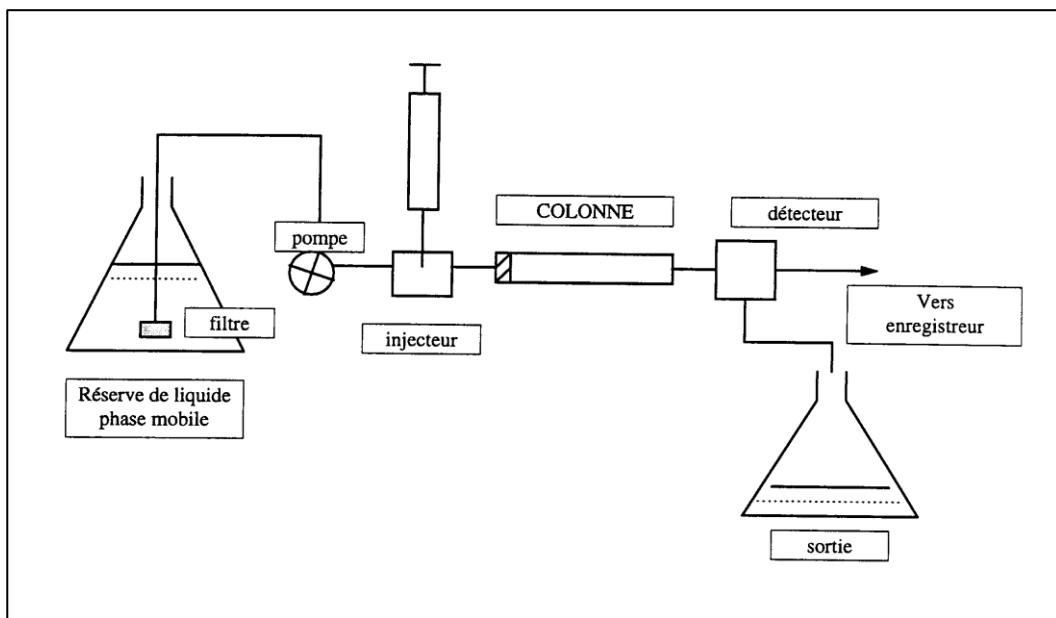


différents, vis-à-vis des grains poreux d'une phase stationnaire constituée par un gel : les molécules diffusent à l'intérieur des grains du gel ou en sont exclues.

La connaissance des masses molaires, des polarités et des caractères ioniques des solutés va orienter le choix de la méthode chromatographique à mettre en œuvre pour réaliser leur séparation [3.5] :

- Pour les molécules de masses molaires élevées ( $>$  à  $10\ 000\ \text{g mol}^{-1}$ ), on utilise généralement une des deux méthodes d'exclusion : la perméation de gel pour les espèces non polaires et la filtration de gel pour les composés polaires ou ioniques.
- Pour les espèces ioniques de faibles masses molaires, on utilisera la chromatographie par échange d'ions.
- Pour les petites molécules non ioniques on préférera les analyser par des méthodes de partage.

Un appareil d'HPLC comprend différents modules (Figure 3-1) : un ou plusieurs réservoirs à solvant contenant la phase mobile, un système de pompage permettant d'effectuer des éluions graduées, un système d'introduction des échantillons, une colonne, un système de détection et d'acquisition de données [3.2, 3.5].



**Figure 3-1. Schéma d'une chaîne HPLC avec ces principaux constituants**

### 3.3.1.2. Conditions expérimentales

Une technique de chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur UV (en anglais : High Performance Liquid Chromatography with UV detection, HPLC-UV) a été appliquée à des échantillons de chlorhydrate de cystéamine pour étudier l'effet de la chaleur. Cette technique a été réalisée à l'aide d'une chaîne HPLC U3000 de marque Dionex (Germany) avec une pompe Ultimate 3000 Pump (Dionex, Germany) et un passeur automatique Ultimate 3000 Autosampler (Dionex, Germany). Il s'agit d'une méthode de chromatographie de partage à polarité de phases inversées mise au point et validée au sein du laboratoire. La phase stationnaire est une phase peu polaire constituée d'une colonne de silice greffée octadécyl C18 de marque Polaris et de dimensions  $3\mu\text{m}$ ,  $150 \times 4.6$  mm. La phase mobile contient un contre ion organique volatile, acide heptafluorobutyrique (HFBA), conférant à la molécule une certaine hydrophobicité. Un gradient de phase mobile a été appliqué (solvant A : HFBA dans l'eau purifiée 0,1 % v/v et solvant B : HFBA dans l'acétonitrile 0,1 % v/v). A l'injection, la phase mobile est composée de 100% (v/v) de A, ce qui correspond à un plateau de force éluante faible. Un gradient linéaire débute ensuite pour atteindre, au bout de 12 minutes, un plateau de force éluante modérée, constituée de 75% (v/v) de A et 25% (v/v) de B et durant 5 minutes. Une stabilisation du système durant 2,5 minutes a été programmée entre les injections. L'utilisation du gradient permet d'améliorer la séparation des différentes impuretés et de prendre en charge les impuretés éluées tardivement.

Le débit de la phase mobile a été fixé à  $1\text{mL min}^{-1}$  et le volume d'injection à  $20\ \mu\text{L}$ . La concentration des solutions injectées est de  $1\ \text{mg mL}^{-1}$ . La détection est réalisée à l'aide d'un détecteur UV Ultimate 3000 Diode Array Detector (Dionex, Germany) en appliquant un scan de 190 à 600 nm. Les deux longueurs d'onde de lecture sont 210 et 247 nm.

### 3.3.2. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

#### 3.3.2.1. Principe

La spectrométrie de masse (en anglais : Mass Spectrometry, MS) est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse molaire, et de caractériser leur structure chimique. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Le composé est d'abord ionisé (technique d'ionisation), les ions sont

ensuite séparés selon leur rapport masse/charge (technique de séparation d'ions) et le nombre d'ions de chaque « unité » masse / charge est enfin enregistré sous la forme d'un spectre [3.6].

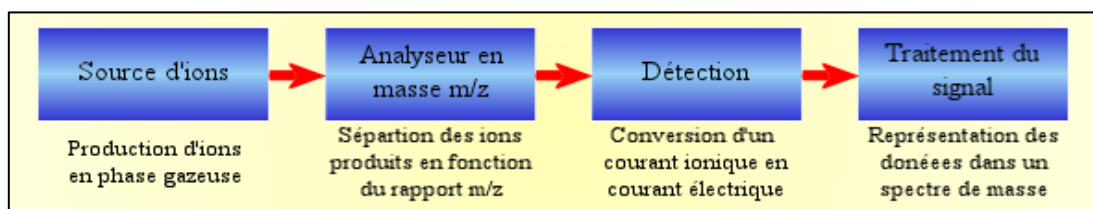
Un spectromètre de masse se compose donc de quatre parties (Figure 3-2) [3.6] :

- Le système d'introduction de l'échantillon : l'échantillon peut être introduit directement dans la source, sous forme gazeuse, liquide (infusion directe) ou solide (canne d'introduction directe, dépôt sur plaque MALDI...) ou encore par l'association à une méthode séparative (chromatographie en phase liquide, chromatographie en phase gazeuse, électrophorèse capillaire...).
- La source d'ionisation : elle consiste à vaporiser les molécules et à les ioniser. Une source d'ionisation peut être utilisée soit en mode positif pour étudier les ions positifs, soit en mode négatif pour étudier les ions négatifs. Plusieurs types de sources existent et sont utilisés en fonction du résultat recherché et des molécules analysées.
  - L'impact électronique (EI), l'ionisation chimique (CI) et la désorption-ionisation chimique (DCI),
  - Le bombardement par atomes rapides (FAB), atomes métastables (MAB) ou ions (SIMS, LSIMS),
  - Le couplage plasma inductif (ICP),
  - L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et la photoionisation à pression atmosphérique (APPI),
  - L'électronébulisation ou électrospray (ESI),
  - La désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI), activée par une surface (SELDI) ou sur silicium (DIOS),
  - L'ionisation-désorption par interaction avec espèces métastables (DART).

En phase gazeuse, l'impact électronique est la technique de production d'ions la plus répandue. Des molécules de l'échantillon en phase vapeur sont bombardées par des électrons très énergétiques (généralement 70 eV), qui éjectent un électron d'une molécule de l'échantillon en produisant un radical cation, nommé ion moléculaire. Comme le potentiel d'ionisation de composés organiques typiques est généralement inférieur à 15 eV, les électrons d'impact transfèrent un excédent d'énergie de 50 eV (ou plus) à l'ion moléculaire formé, qui le dissipe en partie par rupture de liaisons covalentes ayant une énergie comprise entre 3 et 10 eV.

L'ionisation par impact électronique provoque souvent une telle fragmentation qu'il est impossible d'observer le pic moléculaire. Un moyen de contourner ce problème est de recourir à des techniques d'ionisation « plus douces », parmi lesquelles, l'ionisation chimique (IC) est la plus importante. En IC, les molécules de l'échantillon (en phase vapeur) ne sont pas bombardées par un faisceau d'électrons énergétiques. Un gaz réactif (habituellement le méthane, l'isobutane, l'ammoniac ou autres) est introduit dans la source et ionisé. Les molécules de l'échantillon entrent en collision avec les molécules ionisées du gaz réactif ( $\text{CH}_5^+$ ,  $\text{C}_4\text{H}_9^+$ , etc.) dans la source IC où la pression est relativement élevée pour conduire à une ionisation secondaire par transfert de protons en produisant un ion  $[\text{M} + 1]^+$ , par addition électrophile en produisant des ions  $[\text{M} + 15]^+$ ,  $[\text{M} + 24]^+$ ,  $[\text{M} + 43]^+$  ou  $[\text{M} + 18]^+$  (avec  $\text{NH}_4^+$ ) ou plus rarement par transfert de charge en produisant un ion  $[\text{M}]^+$ .

- L'analyseur : il sépare les ions en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ). Il existe des analyseurs basse résolution : le quadripôle (Q), le piège à ions 3D (IT) ou linéaire (LIT), et des analyseurs haute résolution, permettant de mesurer la masse exacte des analytes : le secteur magnétique couplé à un secteur électrique, le temps de vol (TOF), la résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FTICR) et l'Orbitrap. Ces analyseurs peuvent être couplés entre eux pour réaliser des expériences de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). En général, un premier analyseur sépare les ions, une cellule de collision permet de fragmenter les ions, et un second analyseur sépare les ions fragments. Certains analyseurs, comme les pièges à ions ou le FT-ICR, constituent plusieurs analyseurs en un et permettent de fragmenter les ions et d'analyser les fragments directement.
- Le détecteur et système de traitement : le détecteur transforme les ions en signal électrique. Plus les ions sont nombreux, plus le courant est important. De plus, le détecteur amplifie le signal obtenu pour qu'il puisse être traité informatiquement.



**Figure 3-2. Différentes parties constituant un spectromètre de masse**

### 3.3.2.2. Conditions expérimentales

Une méthode de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (en anglais : Liquid Chromatography with Mass Spectrometer, LC-MS) a été utilisée pour étudier le profil d'impuretés des échantillons de tienoxolol soumis à des conditions de stress.

Le système LC (Dionex, Les Ulis, France) est composé d'une pompe quaternaire, d'un dégazeur sous vide et d'un injecteur automatique, le tout étant piloté par un logiciel Chromeleon<sup>®</sup> version 6.80 SR11 (Dionex, Les Ulis, France). La phase stationnaire consiste en une colonne Varian Polaris C18-A (P/N A2000150X020, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), de longueur 150 mm, de diamètre interne 2.0 mm et de taille des particules 5 µm. La phase mobile est constituée d'un mélange de solvant A composé d'acide trifluoroacétique (TFA) dans l'eau purifiée 0.1% v/v et de solvant B, l'acétonitrile. Un mode de gradient linéaire est appliqué afin d'optimiser la séparation des différentes impuretés et de prendre en charge les impuretés éluées tardivement. A l'injection, la phase mobile est composée de 75% (v/v) de A et 25% (v/v) de B. Le gradient atteint ensuite, au bout de 15 minutes, un plateau composé de 30% (v/v) de A et de 70% (v/v) de B et reste stable à ces proportions pendant 15 minutes. Une stabilisation du système pendant 3 minutes est programmée entre les différentes injections. Le débit de la phase mobile a été fixé à 0,2 mL/min et le volume d'injection à 20 µL. La concentration des solutions injectées est de 200 µg mL<sup>-1</sup>.

Le système chromatographique est lié à un spectromètre de masse de type piège à ions quadripolaire avec trappe Hybrid Qtrap 3200 (ABSciex, Framingham, USA), équipée d'une source d'ionisation par électro nébulisation (Electro Spray Ionisation, ESI), fonctionnant en modes d'ionisation positifs. La tension d'ionisation est de 5,5 kV. Les débits du gaz rideau (N<sub>2</sub>), du gaz de désorption (air) et du gaz auxiliaire (air) sont optimisés respectivement à 30, 40 et 50 psi. La température du capillaire du transfert est fixée à 600°C. Les ions fragments sont détectés sur la gamme m/z de 50 à 500 ua (unité arbitraire) avec un potentiel d'entrée en Q1 de 56 V. Pour les analyses de la spectrométrie de masse en tandem (MS<sup>n</sup>), les ions fragments sont isolés dans la trappe avec une fenêtre d'isolation de 3 Da et ensuite subissent une faible fragmentation dans la cellule de collision en utilisant différents niveaux d'énergie de collision (Low Collision Energy, CEL) afin d'optimiser les conditions de fragmentation. Une CEL de 30% produit de façon optimale l'intensité la plus élevée de l'ion précurseur nécessaire pour d'autres essais de dissociation induite par collision (Collision-Induced Dissociation, CID).

Les conditions expérimentales décrites ci-dessus ont été optimisées au sein du laboratoire et ont fait par la suite l'objet d'une validation analytique. La validation de la méthode repose sur une analyse de régression utilisant un modèle linéaire exprimant les concentrations du tienoxolol en fonction de la réponse MS dans l'intervalle de concentrations allant de 15 à 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Cette analyse a conduit à la détermination d'une équation linéaire caractérisée par un coefficient de corrélation  $R^2$  de 0,9987 et une ordonnée à l'origine statistiquement non significative ( $p=0,294$ ). La détermination de la p-value du test de normalité de Shapiro-Wilk ( $p=0,198$ ) conclut à la normalité de la distribution des résidus, permettant ainsi de valider la linéarité des données de la calibration dans l'intervalle étudié. Les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ), basées sur l'écart type des résiduels et de la pente de la courbe d'étalonnage, étaient respectivement de 3,4 et 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . La répétabilité de la méthode, étudiée en analysant six fois une solution ayant une concentration de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , a été validée avec un coefficient de variation inférieur à 2%, et la fidélité intermédiaire étudiée suivant le même protocole sur trois jours différents, a permis d'obtenir un coefficient de variation égal à 2,05%.

Concernant le traitement des résultats, différents types du mode scan sont exploités pour l'étude des structures chimiques, tels que  $\text{EMS}^+$  (Enhanced MS),  $\text{ER}^+$  (Enhanced Resolution) et  $\text{EPI}^+$  (Enhanced Product Ion). Les données MS sont traitées avec les logiciels Lightsight® (ABSciex, Les Ulis, France) et ACD/Labs MS Manager® (ACD/Labs, Strasbourg, France).

### 3.4. Méthodes de l'analyse thermique

En vue d'une étude thermodynamique, certains des composés étudiés (benzocaïne et chlorhydrate de cystéamine) ont fait l'objet d'une analyse thermique.

Le terme « analyse thermique » est fréquemment utilisé pour décrire des techniques analytiques étudiant le comportement d'un échantillon en fonction de la température. Ces techniques mesurent une propriété physique (par exemple, l'évolution du contenu de chaleur) d'un échantillon lorsqu'il subit un programme de chauffage et/ou de refroidissement. Un appareil d'analyse thermique est composé d'un détecteur de la propriété mesurée, d'un four à atmosphère contrôlée, d'un programmeur de température et d'un dispositif d'enregistrement [3.7].

Il existe différents types d'analyse thermique, notamment la calorimétrie différentielle à balayage (differential scanning calorimetry, DSC), l'analyse thermique différentielle

(Differential Thermal Analysis, DTA), l'analyse thermogravimétrique (Thermogravimetric Analysis, TGA), l'analyse thermomécanique (Thermo Mechanical Analysis, TMA), et l'analyse mécanique dynamique (Dynamic Mechanical Analysis, DMA) [3.6].

Seules les techniques mesurant les changements de température (DTA), d'énergie (DSC) ou de masse (TGA) seront abordées dans ce travail.

Selon la définition qu'en donne l'ICTA (International Conference on Thermal Analysis, ou « Conférence Internationale sur l'Analyse Thermique »), l'analyse thermique différentielle (ATD) proprement dite est une technique qui consiste à suivre la différence, en fonction de la température (ou du temps), entre la température de l'échantillon étudié et celle d'un témoin thermiquement inerte dans une atmosphère donnée. Selon la même source, l'analyse calorimétrique différentielle à balayage (DSC) est définie comme étant une technique dans laquelle le flux de chaleur (encore appelé "puissance thermique") est enregistré en fonction du temps ou de la température au cours d'un programme de chauffage et/ou de refroidissement dans une atmosphère donnée [3.8].

L'analyse enthalpique différentielle est souvent nommée analyse calorimétrique (ou calorimétrie) différentielle à balayage (en anglais : Differential Scanning Calorimetry, DSC) dont il existe deux variantes : DSC des flux de chaleur et DSC à compensation de puissance [3.7].

### **3.4.1. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)**

C'est une technique qui met en jeu une faible quantité de matière (5 à 10 mg) et qui est utilisée pour :

- Contribuer à la caractérisation de l'état du matériau analysé : solide amorphe ou cristallin, présence de polymorphes ou d'hydrates,
- Mesurer ses propriétés thermiques : capacités calorifiques, enthalpies de changement d'état, température de fusion, de transition vitreuse  $T_g$ , de cristallisation ou de dégradation,
- Evaluer la pureté et le taux de cristallinité. En effet, la fusion d'une substance pure totalement cristalline est caractérisée par une enthalpie et une température de fusion. Un abaissement de la température et/ou la modification de l'allure du pic de fusion peuvent constituer des indicateurs sensibles de présence d'impuretés.

Il existe deux techniques de calorimétrie différentielle à balayage : technique par compensation de puissance et technique des flux de chaleur (Figure 3-3) [3.8, 3.9].

- La compensation de puissance :

Comme son nom l'indique, la chaleur à mise en jeu en cours d'analyse est mesurée par la quantité d'énergie électrique qui la compense.

Dans cette méthode, brevetée par la société Perkin-Elmer, l'échantillon et la référence sont placés dans deux compartiments différents chauffés ou refroidis dans un même four (Figure 3-3) et chaque compartiment est doté d'un générateur électrique permettant de lui injecter de la chaleur par effet Joule. Quand une différence est détectée entre la température de l'échantillon et celle la référence, l'un des générateurs fournit l'énergie nécessaire pour rétablir sans délai l'égalité entre les deux températures. C'est cette variation d'énergie qui est enregistrée en fonction du temps ou de la température. L'intervalle de température exploré par ce type d'analyseur peut être compris entre 110 et 1000 K [3.7].

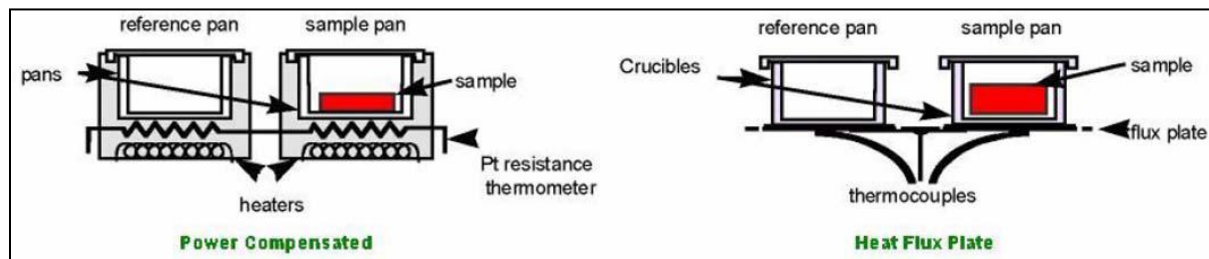
- Méthode des flux de chaleur :

Dans un appareil d'analyse thermique différentielle, les deux creusets (ou capsules-laboratoire) sont placés ensemble au centre du four. Un creuset est rempli par l'échantillon et l'autre par une référence inerte. Les thermocouples insérés dans (ou sous) chaque creuset mesurent constamment la différence de température entre l'échantillon (montage "différentiel" des thermocouples). La température du four est enregistrée et sa variation linéaire en fonction du temps est pré-programmée. Lorsque l'échantillon subit un changement de phases, une certaine quantité d'énergie est absorbée ou émise (sous forme de chaleur) et une différence de température ( $\Delta T$ ) entre l'échantillon et la référence est détectée. La différence de température minimale pouvant être mesurée par un appareil d'analyse thermique différentielle est de l'ordre de 0,01K [3.7].

Afin de rendre quantitative cette différence de température associée à une transformation de phase donnée, l'analyse thermique différentielle a évolué pour donner naissance à l'analyse enthalpique différentielle. Il existe une différence fondamentale entre ces deux méthodes très souvent confondues. L'analyse enthalpique différentielle permet en effet de mesurer des variations d'énergie, tandis que l'analyse thermique différentielle ne permet de mesurer que des variations de température [3.8].



Cette méthode, la plus fréquemment utilisée, a été développée par différents constructeurs (Setaram, TA Instruments, Mettler-Toledo, Netzsch, etc...).



**Figure 3-3. Schématisation de la méthode DSC à compensation de puissance (gauche) et DSC à flux de chaleur (droite)**

Quelque soit la technique utilisée, l'analyse enthalpique différentielle mesure en permanence un flux de chaleur entre un échantillon à analyser et son environnement par rapport à celui d'une référence inerte dont l'environnement est identique (par exemple alumine ou air). Les analyses sont réalisées sous balayage d'un gaz inerte (azote ou argon) pour éviter l'oxydation des pièces de l'analyseur susceptibles d'être portées à des températures élevées (4 à 800 °C) mais aussi pour assurer une conduction thermique constante à l'intérieur du four. Lors d'une transformation physique d'un échantillon, ce dernier va soit absorber soit libérer une certaine quantité de chaleur. Par exemple, la fusion est une transformation endothermique (c'est-à-dire une transformation qui nécessite une absorption de chaleur). La cristallisation, processus exothermique, s'accompagne au contraire d'une libération de chaleur. Cette technique peut également être utilisée pour observer des changements de phase d'un autre type, comme la transition vitreuse, c'est-à-dire le passage entre un verre et une phase liquide métastable [3.10, 3.11].

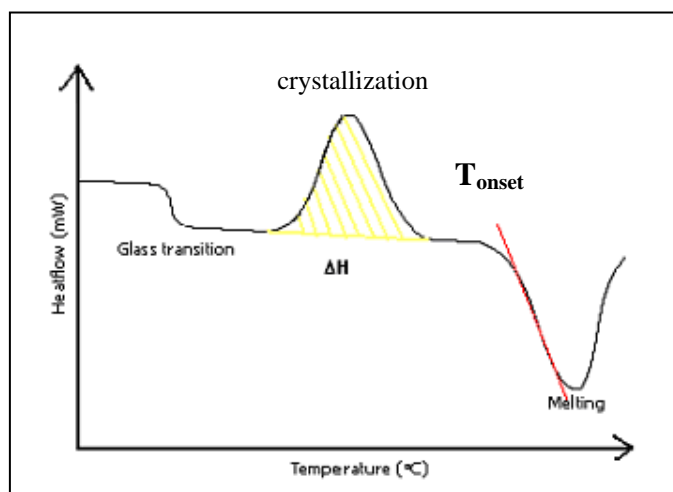
L'analyseur calorimétrique est composé d'une enceinte comportant deux cellules de chauffe, au contact de thermocouples en opposition (montage différentiel), et sur lesquelles sont placés respectivement l'échantillon et la référence. L'échantillon est placé dans une capsule sertie d'un couvercle en sorte d'assurer une étanchéité optimale garantissant la constance de sa masse. La référence est en général une capsule vide identique à celle contenant l'échantillon.

Le montage différentiel des thermocouples permet de mesurer la différence de température entre capsule-échantillon et capsule témoin, à la température mesurée par un troisième thermocouple (ou par le thermocouple-échantillon). Cette différence de température est ensuite convertie en flux de chaleur. Celui-ci est une quantité de chaleur échangée pendant

l'unité de temps qui est exprimée en milliWatts (mW),  $1 \text{ mW} = 1 \text{ joule par secondes (J s}^{-1}\text{)}$ , grâce à un étalonnage préalable. L'étalonnage en température et en énergie de l'appareil est réalisé au préalable avec un ou plusieurs composés de référence (indium ou zinc, par exemple) dont les températures et les enthalpies de fusion sont connues avec précision.

Les quantités de chaleur absorbées ou émises à chaque instant par l'échantillon et par la référence vide sont différentes. Par suite, grâce à un étalonnage approprié, cette différence permet d'estimer la chaleur spécifique (ou capacité calorifique) d'un composé, cristallisé ou non, dans un intervalle donné de température.

Ainsi, les quantités de chaleur échangées par l'échantillon avec son environnement en fonction de la température ou du temps conduisent à un tracé appelé thermogramme (Figure 3-4). Lorsque la transformation de l'échantillon étudié survient à une température fixe (fusion,...), elle est représentée par un accident (pic) endothermique ou exothermique. Il est alors possible d'obtenir les deux grandeurs que sont la température de cette transition et l'enthalpie qui lui est associée. Par convention, lorsqu'il s'agit de fusion et de transition solide-solide, la température est prise au début ( $T_{\text{onset}}$ ) du signal (pic) et l'enthalpie associée est obtenue en mesurant la surface du pic (après étalonnage).



**Figure 3-4. Thermogramme DSC présentant une transition vitreuse (*glass transition*), une cristallisation (*crystallization*) et une fusion (*melting*) (température de fusion :  $T_{\text{onset}}$  ou température commençante)**

Des expériences de calorimétrie différentielle à balayage ont été réalisées sur des échantillons de benzocaïne et de chlorhydrate de cystéamine à l'aide d'un analyseur Q100 de TA Instruments (New Castle, DE, USA). Différentes quantités d'échantillon (de 2 à 10 mg) et différentes vitesses de chauffage de  $0,2$  à  $10 \text{ K min}^{-1}$  ont été utilisées. Les mesures ont été

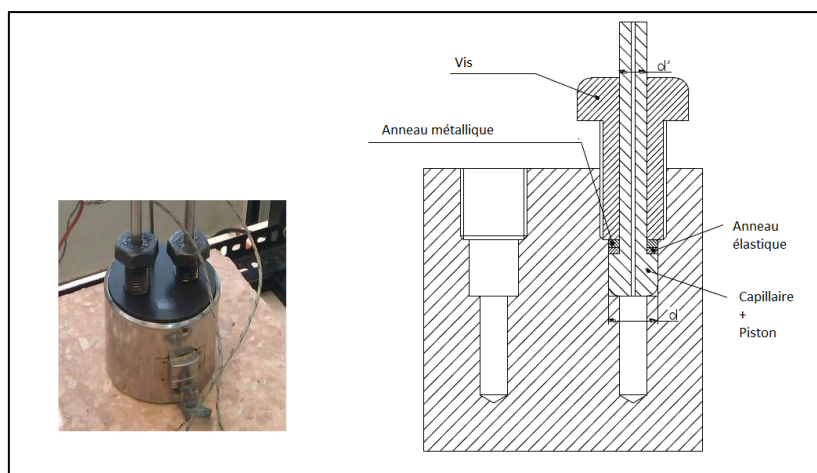
effectuées sur des échantillons pesés dans des capsules en aluminium rendues étanches par sertissage d'un couvercle du même métal.

### 3.4.2. Analyse thermique différentielle sous haute pression (HP-ATD)

L'analyse thermique différentielle sous hautes pression a été utilisée pour étudier l'effet de la pression sur les transitions de phases, dans le cas de la benzocaïne et dans celui du chlorhydrate de cystéamine.

#### 3.4.2.1. Principe [3.12, 3.13]

Un équipement d'analyse thermique différentielle sous haute pression se compose d'un bloc calorimétrique dans lequel deux cellules séparées renferment respectivement l'échantillon et la référence, tous deux maintenus sous une certaine pression. Le bloc calorimétrique doit être évidemment résistant à la pression et il doit transmettre uniformément la chaleur à l'échantillon et à la référence (Figure 3-5). Dans le but de garantir cette uniformité, les cellules qui les contiennent sont disposées symétriquement à l'intérieur du bloc. Pour mesurer la différence susceptible d'apparaître entre leurs températures, un thermocouple est intégré dans chaque cellule. Les deux thermocouples sont montés en opposition et le thermocouple de référence est connecté à un troisième thermocouple plongé dans un mélange d'eau et de glace (et donc maintenu à 0 °C).

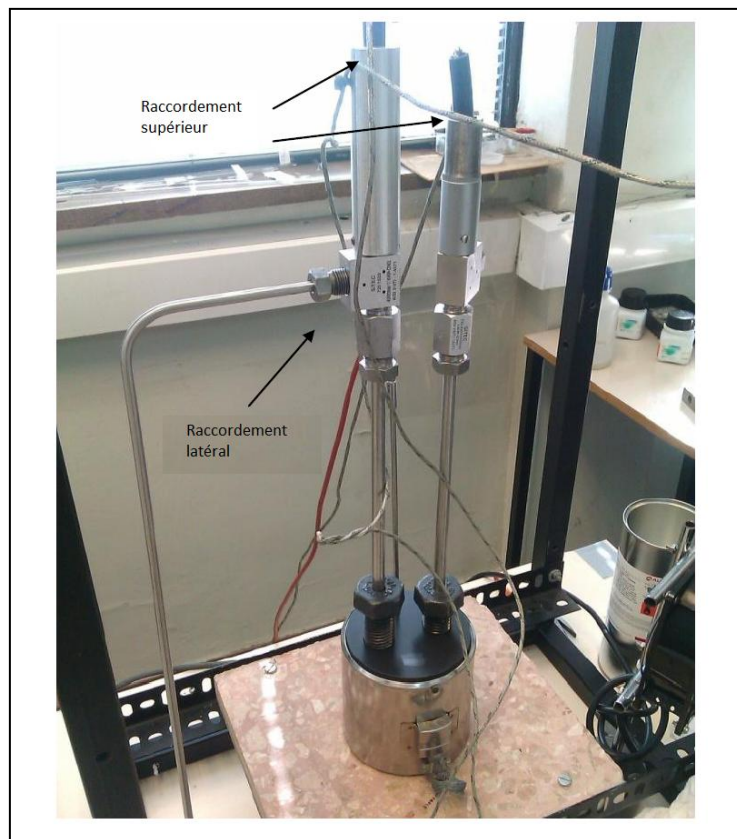


**Figure 3-5. Schéma d'un bloc calorimétrique**

Les mesures sont effectuées en régime quasi-isobare. Pour cela, on utilise un liquide compresseur (fluide transmetteur de pression) qui doit être maintenu en phase liquide dans la toute la gamme des pressions et des températures de travail. Un système de circuit à tube capillaire, une pompe et un manomètre sont utilisés pour transmettre la pression à l'intérieur

du bloc. Le liquide compresseur est placé dans un réservoir. La pompe comprime et entraîne le liquide compresseur qui est distribué le long du circuit pour atteindre le bloc où il va exercer une pression mesurée et contrôlée par le manomètre.

Le liquide compresseur vient au contact de l'échantillon à travers un capillaire fixé à un piston (Figure 3-5). Cet ensemble se compose d'un tube capillaire de 1,6 mm de diamètre intérieur à travers lequel le thermocouple (raccordement supérieur) et le liquide (raccordement latéral) sont introduits (Figure 3-6).

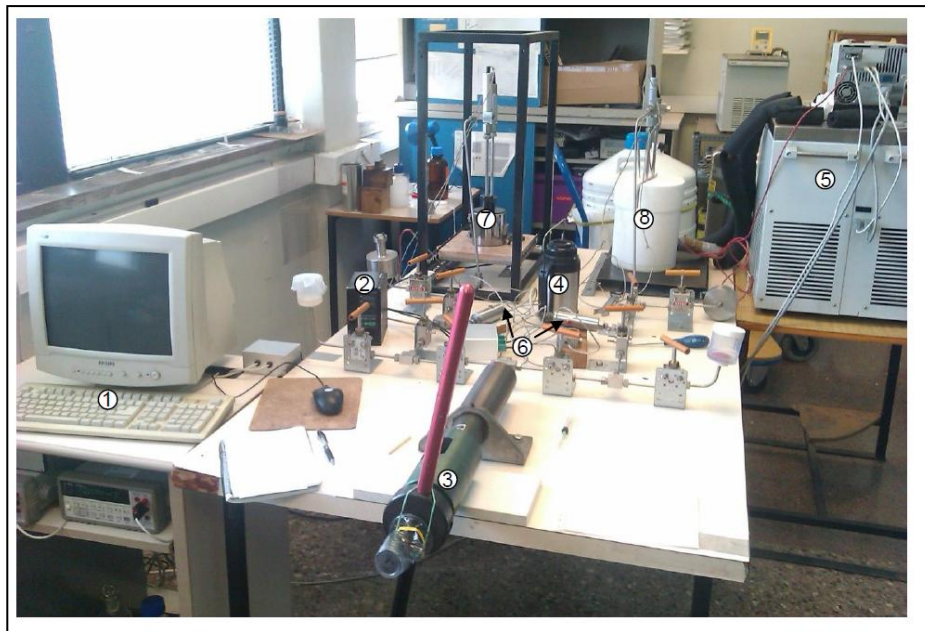


**Figure 3-6. Description de la connexion entre le capillaire contenant le liquide comprimé qui arrive à travers le raccordement latéral et le thermocouple introduit à travers le raccordement supérieur, le tout plongeant dans les cellules de mesure contenues dans le bloc calorimétrique**

L'application d'une pression donnée, au moyen du liquide transmetteur de pression, entraîne la déformation d'une bague en matériau déformable (dans ce cas, le téflon) contre les parois de la cellule, assurant ainsi le maintien de l'étanchéité qui permet la mesure à la pression souhaitée. Les données relatives à la pression, à la température et au signal différentiel sont transmises à l'ordinateur pour traitement.

### 3.4.2.2. Conditions expérimentales

L'appareil HP-DTA utilisé est un appareil unique, construit au Laboratoire de Caractérisation des Matériaux de l'Ecole d'Ingénieurs de l'Université Polytechnique de Catalogne. Cet appareil, qui dérive de celui conçu auparavant par Würflinger [3.12], fonctionne dans l'intervalle de température allant de 203 à 473 K et dans l'intervalle de pression allant de 0 à 300 MPa. Cet appareil est composé de deux analyseurs, l'un pour les analyses à haute température et l'autre pour celles à basse température (Figure 3-7). Le contrôle des basses températures (de 203 à 298 K) est réalisé à l'aide d'un circuit réfrigérant.



**Figure 3-7. Equipement d'analyse thermique différentielle à haute pression du Laboratoire de Caractérisation des Matériaux à l'Université Polytechnique de Catalogne (Barcelone)**

Explication : 1- système d'acquisition des données, 2- régulateur PID pour la température, 3- système de pompe, 4- thermos d'eau et de glace (mélange à 0 °C), 5- bain de chauffage, 6- manomètres, 7- analyseur de haute température, 8- analyseur de basse température.

Les capsules utilisées pour l'analyse thermique différentielle, non commercialisées, doivent être fabriquées individuellement avec de l'étain puis remplies en sorte de ne laisser aucun volume mort dans la capsule. Pour cela, le composé à étudier, s'il est à l'état solide, doit être mélangé au préalable avec un liquide qui est thermiquement inerte et dans lequel l'échantillon est rigoureusement insoluble.

L'étanchéité de la capsule est réalisée en rétrécissant progressivement l'extrémité ouverte tout en laissant s'échapper un excès de liquide (Figure 3-8).



**Figure 3-8. Capsule en étain utilisée en analyse thermique différentielle à haute pression**

Le liquide inerte utilisé habituellement est un hydrocarbure perfluoré (Galden® de Bioblock Scientifics, Illkirch, France). Les analyses sont effectuées à une vitesse de chauffage ne pouvant dépasser  $2 \text{ K min}^{-1}$ . Par ailleurs, des tests en DSC à pression ordinaire (dans des capsules standards en aluminium) doivent être réalisés sur des mélanges “échantillon + liquide perfluoré” afin de vérifier que ce dernier bien inerte (c.-à-d. qu’il ne modifie pas la réponse thermique du produit étudié).

### **3.4.3. Analyse thermogravimétrique (ATG)**

Des analyses thermogravimétriques ont été réalisées sur des échantillons de chlorhydrate de cystéamine.

#### **3.4.3.1. Principe**

L'analyse thermogravimétrique (ATG), en anglais “Thermo Gravimetric Analysis (TGA)”, est une technique d'analyse thermique qui consiste en la mesure de la variation de masse d'un échantillon soit en fonction du temps à température constante soit à température variant à vitesse constante sous atmosphère contrôlée. La variation de masse observée peut être une perte de masse (émission de vapeur) ou un gain de masse (fixation de gaz, oxydation...). Les pertes de masse peuvent correspondre à une perte de solvant de constitution ou de solvant adsorbé, à une sublimation ou encore à l'émission d'un produit de dégradation volatile [3.14].

Une thermobalance se compose typiquement d'une enceinte étanche permettant de maîtriser l'atmosphère de l'échantillon, d'un four permettant d'imposer la température, d'un module de pesée (microbalance), d'un thermocouple pour mesurer la température et d'un ordinateur permettant de piloter l'ensemble et d'enregistrer les données. La microbalance est placée dans une enceinte dont la température est programmée sous atmosphère inerte (par exemple diazote ou argon). Il est par ailleurs possible d'adjoindre au système un montage différentiel de thermocouple en sorte d'obtenir un appareil mixte ATG-ATD (ou TG-DTA en anglais) [3.15] pouvant être couplé à un spectromètre de masse afin d'identifier les composés volatils libérés lors du chauffage. Cette analyse par temps de vol permet de caractériser le rapport  $m/z$  de chaque impureté.

L'analyse thermogravimétrique est utilisée classiquement pour:

- Déterminer si l'échantillon comporte des impuretés volatiles ou surtout la quantité d'eau éventuellement présente. Cette mesure est importante car la quantité d'eau contenue dans un principe actif est susceptible d'influer sur la durée de vie d'un médicament,
- Mesurer la stœchiométrie d'un solvate. Les solvates comportent, dans leurs structures cristallines, des molécules de solvants ou d'eau (hydrates) en quantité stœchiométrique. Par exemple,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ , ou  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ ,
- Identifier la température à laquelle a lieu la décomposition chimique lorsque celle-ci produit des composés volatils.

Grace à la technique simultanée DSC-ATG, les phénomènes thermiques observés en DSC peuvent être associés à une éventuelle perte de masse. C'est non seulement le cas de la désolvation mais aussi celui de la fusion-décomposition.

#### **3.4.3.2. Conditions expérimentales**

Des essais d'analyses simultanées ont été effectués sur des échantillons de chlorhydrate de cystéamine au moyen d'un appareil SDT Q600 de TA-Instruments (New Castle, DE, USA) couplé à un spectromètre de masse Pfeiffer Vacuum Thermostar G320 avec analyseur quadripolaire.

Les caractéristiques techniques de l'appareil sont les suivantes :

- Gamme de température : ambiant +5°C à 1500°C
- Programme de température : de 0.01 à 99.9°C/min

- Sensibilité en masse : 0.1  $\mu\text{g}$
- Précision en température : 0.5°C
- Débit de gaz de purge (azote) : de 20 à 1000 ml/min
- Possibilité de brancher un autre gaz de purge
- Thermocouple type R (Platine/13% Rhodium)

On utilise le logiciel TA Instrument Explorer pour programmer les analyses et le logiciel TA Universal Analysis pour exploiter les résultats.

Pour le cas du chlorhydrate de cystéamine, les essais ont été effectués à une vitesse de chauffage de 10 K min<sup>-1</sup> entre 25 et 100 °C.

### 3.5. Méthodes d'étude des interactions avec l'eau

Pour compléter l'étude de la stabilité physique du chlorhydrate de cystéamine, ce dernier a été soumis à une étude de sensibilité à l'eau. L'activité de l'eau dans un produit dépend principalement de sa teneur en eau et de sa température. La courbe, représentant pour une température donnée, la variation de la teneur en eau en fonction de l'activité de l'eau du produit ou de l'humidité relative du milieu à l'équilibre est appelée :

- isotherme d'adsorption quand on part d'un produit sec ;
- isotherme de désorption lorsqu'on part d'un produit saturé en eau.

Ces isothermes sont déterminées expérimentalement par des méthodes statiques ou dynamiques.

#### 3.5.1. Tests d'hygroscopicité en conditions statiques

Cette méthode permet de déterminer le degré d'hygroscopicité d'un produit donné mais ne permet pas une mesure précise de l'hygroscopicité. Cette technique est définie par la Pharmacopée Européenne [3.16]. D'après la procédure imposée, les essais doivent être réalisés dans un cristalliseur de dimensions définies (diamètre interne 50 mm, hauteur 15 mm) et de masse  $m_1$  connue. Une quantité donnée de substance est placée dans le cristalliseur (masse totale  $m_2$ ). Le cristalliseur est ensuite placé dans un dessiccateur à  $25 \pm 1$  °C contenant une solution saline saturée, choisie en fonction du taux d'humidité souhaité.

Il existe des tables (Annexe 3-1) renseignant sur les solutions salines à utiliser pour fixer une humidité relative dans une enceinte fermée à une température donnée. Trois humidités relatives ont été choisies pour le cas du chlorhydrate de cystéamine, 35%, 45% et 75% ( $\pm 2\%$ )



d'humidité relative (HR), et chaque enceinte a été préparée en laissant s'équilibrer durant 48h des quantités données d'échantillon avec des solutions respectivement saturées avec du chlorure de magnésium, du carbonate de potassium et du chlorure de sodium.

La méthode d'étude consiste à placer un cristalliseur ouvert contenant un échantillon de chlorhydrate de cystéamine dans chacune des trois enceintes fermées maintenue à 25 °C. L'aspect de l'échantillon étudié est contrôlé et la masse totale du cristalliseur contenant l'échantillon (masse totale  $m_3$ ) est mesurée chaque jour pendant la période d'étude. Le pourcentage d'augmentation de la masse est calculé selon l'expression suivante :

$$x = \frac{m_3 - m_2}{m_2 - m_1} \times 100 \quad \text{Eq. 3.1}$$

Les résultats sont ensuite exprimés selon les critères suivants :

- Déliquescent : la quantité d'eau absorbée est suffisante pour former un liquide,
- Très hygroscopique : l'augmentation de masse est supérieure à 15%,
- Hygroscopique : l'augmentation de masse est inférieure à 15% et supérieure à 2%,
- Faiblement hygroscopique : l'augmentation de masse est inférieure à 2% et supérieure à 0,2%.

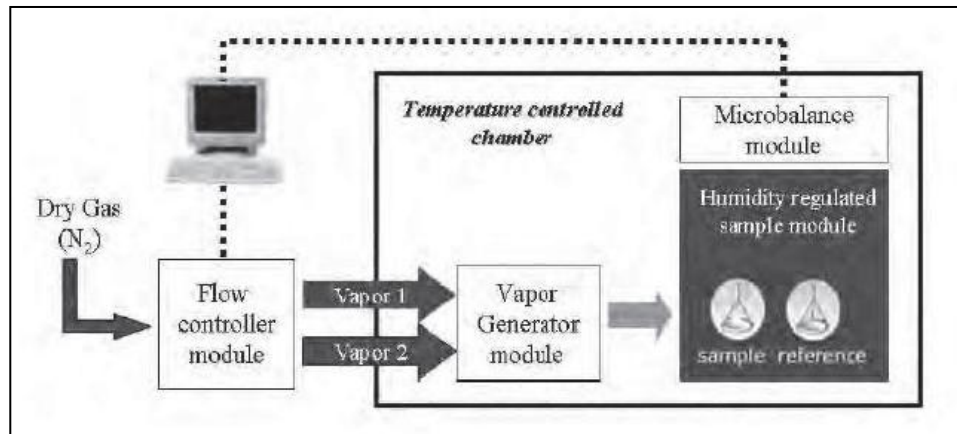
Cette méthode présente l'avantage d'être facile à exécuter. Par contre, le temps requis pour atteindre l'équilibre est long et l'erreur introduite par l'ouverture de l'enceinte (et donc la destruction provisoire de l'équilibre) afin d'effectuer les pesées constituent ses principaux inconvénients.

### **3.5.2. Etude de sorption-désorption dynamique de vapeur d'eau**

#### **3.5.2.1. Principe**

La gravimétrie d'adsorption de vapeur d'eau (Dynamic Vapor Sorption, DVS), méthode de sorption- désorption dynamique de vapeur, est une méthode d'analyse du comportement d'un produit vis-à-vis de la vapeur d'eau environnante dans des conditions isothermes. Elle permet de mesurer, grâce à une microbalance à humidité et température contrôlées, la variation de masse d'un échantillon en fonction de la pression de vapeur du solvant (généralement l'eau) [3.16].

Son principe consiste à appliquer, à un échantillon solide, un programme de variation d'humidité relative dans une enceinte à température constante afin de mesurer, à l'aide d'une microbalance, la prise ou la perte d'eau de l'échantillon. L'humidité relative (HR) est définie par le rapport entre la pression partielle de vapeur d'eau contenue dans l'air environnant l'échantillon et la pression de vapeur saturante (ou tension de vapeur) de l'eau pure à la même température (Figure 3-9) [3.17].



**Figure 3-9. Principe de fonctionnement d'un appareil de gravimétrie DVS**

La prise en masse peut être due à de l'eau adsorbée, c'est-à-dire retenue à la surface de l'échantillon, ou absorbée, c'est-à-dire intégrée dans la structure cristalline de l'échantillon. Ces deux phénomènes sont détectés et différenciés en DVS. L'existence d'un hydrate peut alors être mise en évidence par cette technique et son domaine de stabilité connu [3.17].

Pour un système  $A (s) + q H_2O (g) \Leftrightarrow A, qH_2O (s)$ , la quantité d'eau intégrée à la structure est calculée grâce à la relation suivante :

$$q = \% \text{ gain de masse} \times \frac{M(A)}{M(H_2O)} \quad \text{Eq. 3.2}$$

dans laquelle M symbolise la masse molaire, A un composé anhydre et A, qH<sub>2</sub>O son hydrate comportant q moles d'eau par mole de composé A.

En résumé, la gravimétrie DVS permet de conclure sur la stabilité d'un composé exposé à l'humidité, la capacité à former un hydrate, le type d'hydrate (stoechiométrique ou non), l'hygroscopicité (tendance à adsorber ou à absorber l'humidité) et la déliquescence (propriété d'un corps à passer à l'état liquide par absorption indéfinie de l'humidité ambiante).

### 3.5.2.2. Conditions expérimentales

La gravimétrie d'adsorption de vapeur d'eau (Dynamic Vapor Sorption, DVS) a été effectuée sur des échantillons d'environ 10 mg de chlorhydrate de cystéamine à l'aide d'un appareil DVS1000 de Surface Measurement Systems, SMS (UK) avec des intervalles de température de 5 à 85°C et d'humidité de 0 à 98% en humidité relative (RH). La pression partielle de vapeur d'eau est assurée par un mélange continu de gaz azote pur et azote saturé en vapeur d'eau. La température et l'humidité résiduelle sont mesurées directement avec une précision de  $\pm 0,5$  °C et  $\pm 0,5$  %. La variation de masse est mesurée de façon continue avec une précision de 0,1  $\mu\text{g}$ , permettant l'utilisation de faibles masses d'échantillon, de l'ordre de quelques milligrammes. Le débit de gaz total est de 200 sccm  $\text{min}^{-1}$  (centimètres cubes standards par minute). Pour analyser les échantillons, la variation du taux d'humidité relative est effectuée par paliers entre 0 et 90 % HR. Le processus de mesure de la masse et du taux d'humidité est automatisé. Le passage d'un palier d'humidité relative vers le suivant survient lorsque la masse de l'échantillon est stabilisée (appréciée par la mesure de  $dm/dt$  dont la variation devient nulle). Les isothermes de sorption-désorption obtenus à 24,5°C sont tracées en prenant en compte la masse obtenue à la fin de chaque palier. La présence d'une brusque augmentation de la masse adsorbée à une pression particulière témoigne de l'éventuelle formation d'un hydrate cristallin.

## 3.6. Analyse par diffraction des rayons X

Benzocaïne et chlorhydrate de cystéamine ont fait l'objet d'une analyse structurale par diffraction des rayons X.

### 3.6.1. Principe [3.18]

La matière solide cristallisée, atomique, moléculaire, organique ou minérale, peut exister sous différentes structures cristallines appartenant à l'un des sept systèmes cristallins: triclinique, monoclinique, orthorhombique, quadratique, rhomboédrique, hexagonal et cubique. Selon l'hypothèse formulée par l'abbé R.-J. Haüy il y a plus de deux siècles, ces systèmes résultent idéalement de la répétition, dans les trois directions de l'espace, d'un motif unité (élémentaire) appelé maille élémentaire. La régularité qui en découle constitue un « réseau » (cristallin) dont une particularité fondamentale consiste dans son aptitude à diffracter la lumière monochromatique dont la longueur d'onde est voisine des distances interatomiques. Celles-ci étant très petites (de l'ordre du dixième de nanomètre), la lumière

utilisée correspond au rayonnement X, très énergétique. Selon la périodicité de la distribution atomique d'un cristal, il existe 14 réseaux cristallins différents, appelés réseaux de Bravais (Annexe 3-2).

La diffraction des rayons X est une technique d'analyse très importante puisqu'elle permet de déterminer la structure cristalline d'une phase solide, d'évaluer la pureté structurale, le degré de cristallinité ou d'observer les possibles transitions de phases en fonction de la température. Cette technique permet encore d'identifier des polymorphes ou des solvates d'une substance donnée.

Cette méthode utilise un faisceau de rayons X monochromatique qui rencontre le cristal (ou la poudre cristalline) provoquant la dispersion d'une partie du faisceau dans des directions spécifiques. Par la mesure des angles et de l'intensité des rayons diffractés, il est possible de reconstruire la densité électronique dans le cristal et ainsi d'obtenir une image tridimensionnelle de l'ordre cristallin à l'échelle atomique (et a fortiori moléculaire). À partir de cette densité, la position moyenne des atomes du cristal est déterminée dans la maille élémentaire. Il en découle d'autres informations : longueurs des liaisons chimiques intra- et intermoléculaires, angles de liaison, etc. L'ensemble de ces données permet par ailleurs de calculer, au moyen de méthodes appropriées, les énergies de réseau et donc des comparaisons entre celles de différents polymorphes d'un même composé. .

Bragg a formalisé la diffraction par un cristal au moyen de la relation qui porte son nom :

$$n\lambda = 2d_{hkl}\sin\theta \quad \text{Eq.3.3}$$

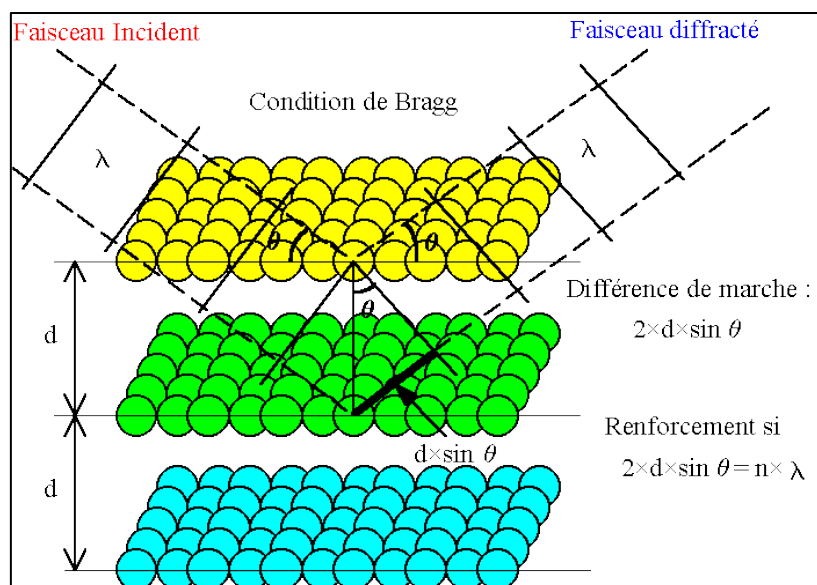
$n$  : nombre entier positif (1, 2, 3, etc.),

$\lambda$  : longueur d'onde du faisceau de rayons X incident,

$d_{hkl}$  : distance inter-réticulaire (entre deux plans identiques),

$\theta$  : angle de diffraction.

Autrement dit, la relation de Bragg indique que la diffraction n'a lieu que lorsque la distance inter-atomique est proportionnelle à un nombre entier de fois ( $n$ ) la longueur d'onde ( $\lambda$ ) du rayonnement X incident. Le rayonnement diffracté forme alors un angle  $\theta$  avec la direction du faisceau incident. C'est ce que montre la figure 3-10.



**Figure 3-10. Diffraction des rayons X par un cristal selon la loi de Bragg**

Il existe deux techniques de diffraction des rayons X, la diffraction par la poudre (cristalline) ou par un cristal unique (encore appelé monocristal).

Seule la diffraction des rayons X par les poudres, seule technique utilisée dans ce travail, est présentée.

Les substances actives pharmaceutiques sont, pour la plupart, conservées et utilisées à l'état de poudre micro-cristallines. Pour caractériser leur forme solide initiale, la technique de diffraction X sur poudre (DRX), définie par la Pharmacopée Européenne, est utilisée [3.16].

Le résultat d'une analyse expérimentale DRX sur poudres consiste dans un diffractogramme, suite discontinue de pics sur un « bruit de fond », laquelle représente l'intensité du rayonnement X diffracté en fonction de l'angle  $2\theta$ . Les valeurs de cet angle aux maxima d'intensité et la loi de Bragg permettent de calculer les paramètres de maille  $a$ ,  $b$  et  $c$  (et les angles  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) du réseau cristallin et de déterminer le système et le groupe d'espace auxquels il appartient. Les valeurs des intensités sont reliées aux positions des atomes dans la maille qui peuvent ainsi être déterminées. Autrement dit, grâce à la diffraction des rayons X, la structure d'un composé cristallin est déterminable, la résolution structurale étant toutefois d'autant plus compliquée que le nombre d'atomes formant le composé est élevé.

En adjoignant une source de froid (ou de chaleur) à un diffractomètre, il devient possible d'enregistrer des diffractogrammes à différentes températures et donc suivre l'influence de la

chaleur sur une structure cristalline. On obtient ainsi des informations décisives sur les relations thermodynamiques entre polymorphes en caractérisant le changement structural qui accompagne le passage de l'un vers l'autre à une température donnée. On obtient aussi des informations sur la dilatation d'un solide et sur l'anisotropie de cette dilatation.

### **3.6.2. Conditions expérimentales**

Les diagrammes de diffraction à haute résolution de rayons X sur poudre des échantillons de benzocaïne ont été obtenus en fonction de la température de 200 K jusqu'à l'état liquide. Ceux du chlorhydrate de cystéamine ont été obtenus de 120 K jusqu'à l'état liquide. Les essais ont été réalisés à l'aide d'un diffractomètre CPS120 de la société INEL (France) équipé d'un circuit de refroidissement par flux d'azote "700 series" d'Oxford Cryosystems (Oxford, UK). Les données ont été collectées pendant au moins une heure par diagramme. La vitesse de chauffage entre les mesures était de  $1,3 \text{ K min}^{-1}$  et, avant chaque collecte, la température de l'échantillon était stabilisée pendant au moins 15 min. Les paramètres de maille en fonction de la température ont été déterminés à l'aide de l'ajustement de Pawley en comparaison avec les mailles élémentaires connues au moyen du logiciel TOPAS Academic [3.19].

**REFERENCES**

- [3.1] Guidance for Industry Q1A (R2) Stability Testing of New Drugs Substances and Products, in : International Conference on Harmonisation of Technical Requirement for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, March, 2003.
- [3.2] Rouessac, F., Rouessac, A., 2009. Analyse chimique. Méthodes et techniques instrumentales. 7<sup>ème</sup> édition. Dunod.
- [3.3] Yost, R.W., Etre, L.S., Conlon, R.D. Traduit par Vaumoron J., 1981. Pratique de la chromatographie liquide. Technique et documentation.
- [3.4] Ornaf, M.R., Dong, M.W., 2005. Separation science and technology. Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC.2 Key concepts of HPLC in pharmaceutical analysis. Purdue Pharma, Ardslaay, NY. 658 pages.
- [3.5] Mahuzier, G., Hamon, M., 1990. Abrégé de chimie analytique. II Méthodes de séparation. 2<sup>ème</sup> édition. Masson. Paris.
- [3.6] Kiemle, D.J., Silverstein, R.M., Webster, F., 2007. Identification spectrométrique de composés organiques. 2<sup>ème</sup> édition. De Boeck.
- [3.7] Hatakeyama, T., Quinn, F.X., 1999. Thermal analysis. Fundamentals and applications to polymer science. Second edition. John Wiley and Sons Ltd. England.
- [3.8] Höhne, G.H.W., Hemminger W., Flammershein, H., 1996.J. Differential scanning calorimetry. An introduction for practitioners. Springer. New York.
- [3.9] Rawlinson, C., 2006. School of Pharmacy, University of Bradford, Differential scanning calorimetry, disponible sur :
- <http://www.mmsconferencing.com/pdf/eyp/c.rawlinson.pdf> (consulté le 17/12/2014).
- [3.10] Dean, J.A., 1995. The analytical chemistry handbook. New York. McGraw-Hill, p 15.1-15.5.
- [3.11] Pungor, E.A., 1995. Practical guide to instrumental analysis. Boca Raton. p 181-191.
- [3.12] Würflinger, A., 1975. Differential thermal analysis under high pressure IV. Low temperature DTA of solid-solid and solid-liquid transitions of several hydrocarbons up to 3

kbar. Berichte der Bunsen-Gesellschaft. Physicalchemistry-chemicalphysics. 79 (12), 1195-1201.

[3.13] Pizarro, Á., 2004. Diseño y construcción de un Analizador Térmico Diferencial de alta presión para bajas temperatura. Proyecto Final de Carrera, Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona.

<http://upcommons.upc.edu/pfc/handle/2099.1/2702> (consulté le 18 décembre 2014).

[3.14] Gutierrez, S., Introduction aux méthodes d'analyse thermique.

[http://www.ccm.usherbrooke.ca/fr/services/ccm/LCG/pdf/analyse\\_thermique.pdf](http://www.ccm.usherbrooke.ca/fr/services/ccm/LCG/pdf/analyse_thermique.pdf) (consulté le 19 décembre 2014).

[3.15] Cours de Génie pharmaceutique Master 1 disponible sur : <http://www.scribd.com/doc/51051300/thermogravimetrie> (consulté le 17/02/2012).

[3.16] Pharmacopée Européenne, 2011. Chapitre général, 5.11. Rubrique Caractères dans les monographies. European Directorate for the Quality of medicines and Health Care, 7ème édition.

[3.17] Hassel, R.L., Hesse, N.D., Investigation of Pharmaceutical Stability Using Dynamic Vapor Sorption Analysis, TA Instruments, New Castle.

[3.18] Atkins, P., De Paula, J., 2008. Chimie physique. 3ème édition. De Boeck. Bruxelles.

[3.19] Coelho, A.A., 2007. TOPAS Academic version 4.1 (Computer Software). Brisbane: Coelho Software.



**Annexe 3.1 : Solutions salines en hygrométrie**

L'humidité relative en % est donnée pour chaque sel en fonction de la température ambiante.

T (°C)	CeF	LiBr	KOH	LiCl	KCH <sub>3</sub> CO	KF	MgCl <sub>2</sub>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
0		7,8		11,2			33,7	43,1
5	5,5	7,4	14,3	11,3			33,6	43,1
10	4,9	7,1	12,3	11,3	23,4		33,5	43,1
15	4,3	6,9	10,7	11,3	23,4		33,3	43,2
20	3,8	6,6	9,3	11,3	23,1		33,1	43,2
25	3,4	6,4	8,2	11,3	22,5	30,9	32,8	43,2
30	3,0	6,2	7,4	11,3	21,6	27,3	32,4	43,2
35	2,7	6,0	6,7	11,3		24,6	32,1	
40	2,4	5,8	6,3	11,2		22,7	31,6	42,3
45	2,2	5,7	5,9	11,2		21,5	31,1	
50	2,1	5,5	5,7	11,1		20,8	30,5	45,6
55	2,0	5,4	5,6	11,0		20,6	29,9	
60	2,0	5,3	5,5	11,0		20,8	29,3	45,0
65	2,1	5,3	5,4	10,9		21,2	28,5	
70	2,2	5,2	5,3	10,8		21,7	27,8	
75	2,4	5,2		10,6		22,3	26,9	
80	2,6	5,2		10,5		22,9	26,1	
85		5,2		10,4		23,2	25,1	
90		5,3		10,2		23,3	24,1	
95		5,3					23,1	
100		5,4					21,1	

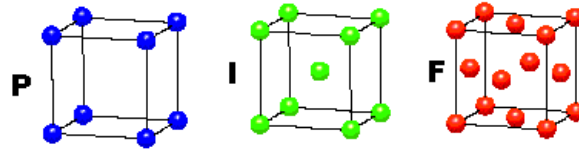
T (°C)	Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	NaBr	CuCl <sub>2</sub>	CoCl <sub>2</sub>	KI	NaCl	KCl	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
0	60,3					75,5	88,6	98,8
5	58,9	63,5			73,3	75,7	87,7	98,5
10	57,4	62,2			72,11	75,7	86,8	98,2
15	55,9	60,7			70,98	75,6	85,9	97,9
20	54,4	59,1	68,4		69,9	75,5	85,1	97,6
25	52,9	57,6		64,9	68,86	75,3	84,3	97,3
30	51,4	56,0	68,6	61,8	67,89	75,1	83,6	97,0
35	49,9	54,6		58,6	66,96	74,9	83,0	96,7
40	48,4	53,2	68,0	55,5	66,09	74,7	82,3	96,4
45	46,9	52,0		52,6	65,26	74,5	81,7	96,1
50	45,4	50,9	65,5	50,0	64,49	74,4	81,2	95,8
55		50,2		48,0	63,78	74,4	80,7	
60		49,7	63,3	46,7	63,11	74,5	80,3	95,7
65		49,5		46,3	62,5	74,7	79,9	
70		49,7		47,0	61,93	75,1	79,5	
75		50,3		48,8	61,43	75,6	79,2	
80		51,4		52,0	60,97	76,3	78,9	
85					60,56		78,7	
90					60,21		78,5	

## Annexe 3.2 : Les 14 réseaux de Bravais

**Cubique**

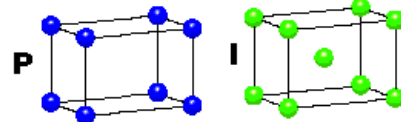
$$a = b = c$$

$$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$$

**Quadratique**

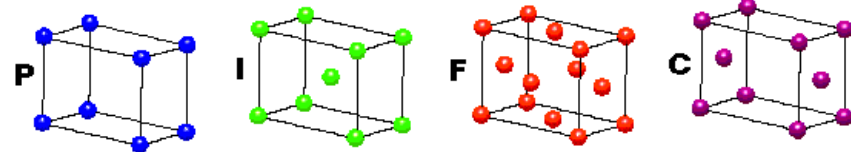
$$a = b \neq c$$

$$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$$

**Orthorhombique**

$$a \neq b \neq c$$

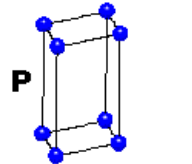
$$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$$

**Hexagonal**

$$a = b \neq c$$

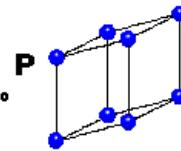
$$\alpha = \beta = 90^\circ$$

$$\gamma = 120^\circ$$

**Trigonal**

$$a = b = c$$

$$\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$$



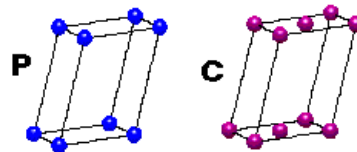
4 types de réseau

**Monoclinique**

$$a \neq b \neq c$$

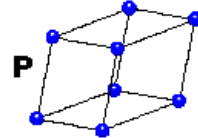
$$\alpha = \gamma = 90^\circ$$

$$\beta \neq 120^\circ$$

**Triclinique**

$$a \neq b \neq c$$

$$\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$$

**4 types de réseau**

P Primitif

I centré

F toutes faces centrées

C 1 face centrée

+ 7 systèmes cristallins

= 14 réseaux de BRAVAIS

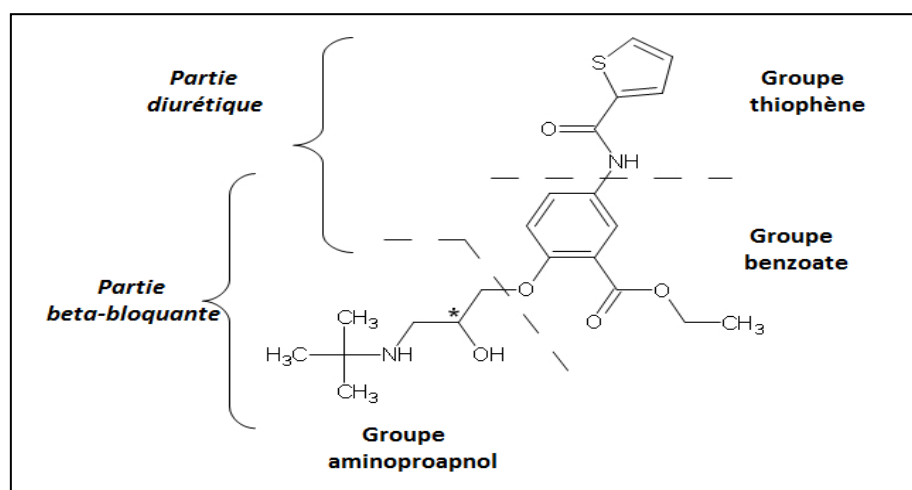
## Chapitre 4.

### Evaluation de la stabilité chimique du tienoxolol.

CHAPITRE 4. EVALUATION DE LA STABILITE CHIMIQUE DU TIENOXOLOL. ....	86
4.1. Introduction .....	87
4.2. Etude de la dégradation forcée du tienoxolol.....	88
4.2.1. Identification des produits de dégradation .....	88
4.2.2. Etude de la sensibilité du tienoxolol aux différentsfacteurs de stress .....	91
4.2.2.1. Influence de l'hydrolyse acide et alcaline .....	92
4.2.2.2. Influence de l'oxydation par les peroxydes .....	92
4.2.2.3. Influence de la lumière .....	92
4.2.2.4. Influence de la chaleur.....	93
4.2.3. Etude de la cinétique de dégradation du tienoxolol .....	93
4.3. Caractérisation des différents produits de dégradation et élaboration des différents schémas de fragmentations.....	94
4.3.1. Caractérisation des produits de dégradation.....	94
4.3.2. Elaboration des schémas de fragmentations.....	96
4.3.2.1. Fragmentation de tienoxolol .....	96
4.3.2.2. Fragmentation de DP1 .....	98
4.3.2.3. Fragmentation de DP2 .....	100
4.3.2.4. Fragmentation de DP3 .....	101
4.3.2.5. Fragmentation de DP4 .....	102
4.3.2.6. Fragmentation de DP5 .....	103
4.3.2.7. Fragmentation de DP6.....	104
4.3.2.8. Fragmentation de DP7 .....	105
4.4. Schéma réactionnel des voies de dégradation de tienoxolol .....	107
4.5. Conclusions .....	109
REFERECES .....	110

#### 4.1. Introduction

Dans les années 80, une des stratégies de développement de médicaments mise en œuvre par les laboratoires UPSA consiste à associer deux groupements fonctionnels dans la même structure d'une substance active afin d'optimiser les approches thérapeutiques. C'est ainsi que le tienoxolol a été conçu pour le traitement de l'hypertension. Le tienoxolol est une molécule présentant des groupements fonctionnels multiples (éthyl 2-[3-(tert-butylamino)-2-hydroxypropoxy]-5-(thiophene-2-carbonylamino)benzoate), lui permettant d'avoir à la fois un effet natriurétique et un effet antagoniste  $\beta$ -adrénergique (Figure 4-1). Ses activités pharmacologiques ont été démontrées chez les rats et les singes après une dose orale, mais aussi chez les humains [4.1]. Chez des volontaires sains, la substance active agit comme une prodrogue précoce et relativement durable, bloquant sélectivement les récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques, et présentant des propriétés natriurétiques significatives [4.2], d'où son effet antihypertenseur.



**Figure 4-1. Structure chimique du tienoxolol**

Une étude concernant l'état solide du tienoxolol a montré la survenue d'une hydrolyse au cours de son stockage à température ambiante et à l'abri de la lumière [4.3]. Par contre, aucune étude de la littérature n'a révélé des informations ni sur le profil de stabilité du tienoxolol ni sur ses produits de dégradation potentiels formés dans les conditions normales et/ou sous conditions de dégradation forcée.

La détermination de la stabilité intrinsèque d'une substance active fait partie des études de pré-formulation inhérentes au processus de développement des médicaments. La connaissance de ses caractéristiques intrinsèques constitue la base de la stratégie de contrôle qualité des

produits et des procédés pharmaceutiques. Par ailleurs, son profil de stabilité pourrait être étendu à d'autres composés contenant des groupements fonctionnels similaires, tels que les fonctions céto-arylthiophène, benzoate et/ou aryl-propanolamine.

Dans ce travail, nous nous sommes focalisés sur l'étude de stabilité chimique du tienoxolol et nous nous sommes intéressés à identifier et à caractériser les produits de dégradation formés en solution après avoir soumis cette molécule à l'action de différents facteurs de stress. Cette approche a été rendue possible grâce au couplage de la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse en tandem (High Performance Liquid Chromatography with multistage Mass Spectrometry, HPLC-MS<sup>n</sup>). Conformément aux directives ICH [4.4], différents facteurs de stress ont été appliqués afin de stimuler la dégradation des substances actives pharmaceutiques selon plusieurs voies comme l'hydrolyse acide et basique, l'oxydation, la photo-dégradation et la chaleur.

Le travail présenté dans ce chapitre se compose d'une première partie dont l'objectif est d'identifier et de caractériser les produits de dégradation du tienoxolol formés en solution, et de proposer leurs structures ainsi que les voies de leurs fragmentations, et d'une deuxième partie axée sur une analyse quantitative du tienoxolol dont le but est de fournir des données cinétiques selon les conditions spécifiques de stress.

## **4.2. Etude de la dégradation forcée du tienoxolol**

### **4.2.1. Identification des produits de dégradation**

La méthode LC-UV-MS<sup>n</sup> ainsi optimisée permet de séparer efficacement le tienoxolol et ses produits de dégradation en une seule analyse, le but étant de caractériser les produits de dégradation du tienoxolol formés dans des conditions de stress forcées. Des échantillons de tienoxolol non traités ainsi que les échantillons de tienoxolol ayant subi différents facteurs de stress selon le protocole décrit dans la section 3.2. sont analysés par la méthode décrite dans la section 3.3.2.2. En milieu acide, le tienoxolol et les produits de dégradation possédant encore une fonction amine sont chargés par protonation de l'atome d'azote et donc peuvent former des paires d'ions avec TFA (Acide trifluoroacétique). La molécule de tienoxolol est caractérisée par un pic chromatographique présentant un temps de rétention ( $R_T$ ) de 16,8 min. L'analyse globale des chromatogrammes correspondants aux échantillons de tienoxolol ayant subi un traitement montre la présence d'autres pics chromatographiques différents de celui correspondant au tienoxolol (Figure 4-2). Ces pics correspondent aux produits de dégradation

de tienoxolol et sont au nombre de sept. Nous leur avons attribué la notation de DP (degradation product selon la terminologie anglo-saxonne) et selon leur ordre d'élution, ils sont nommés DP1 à DP7.

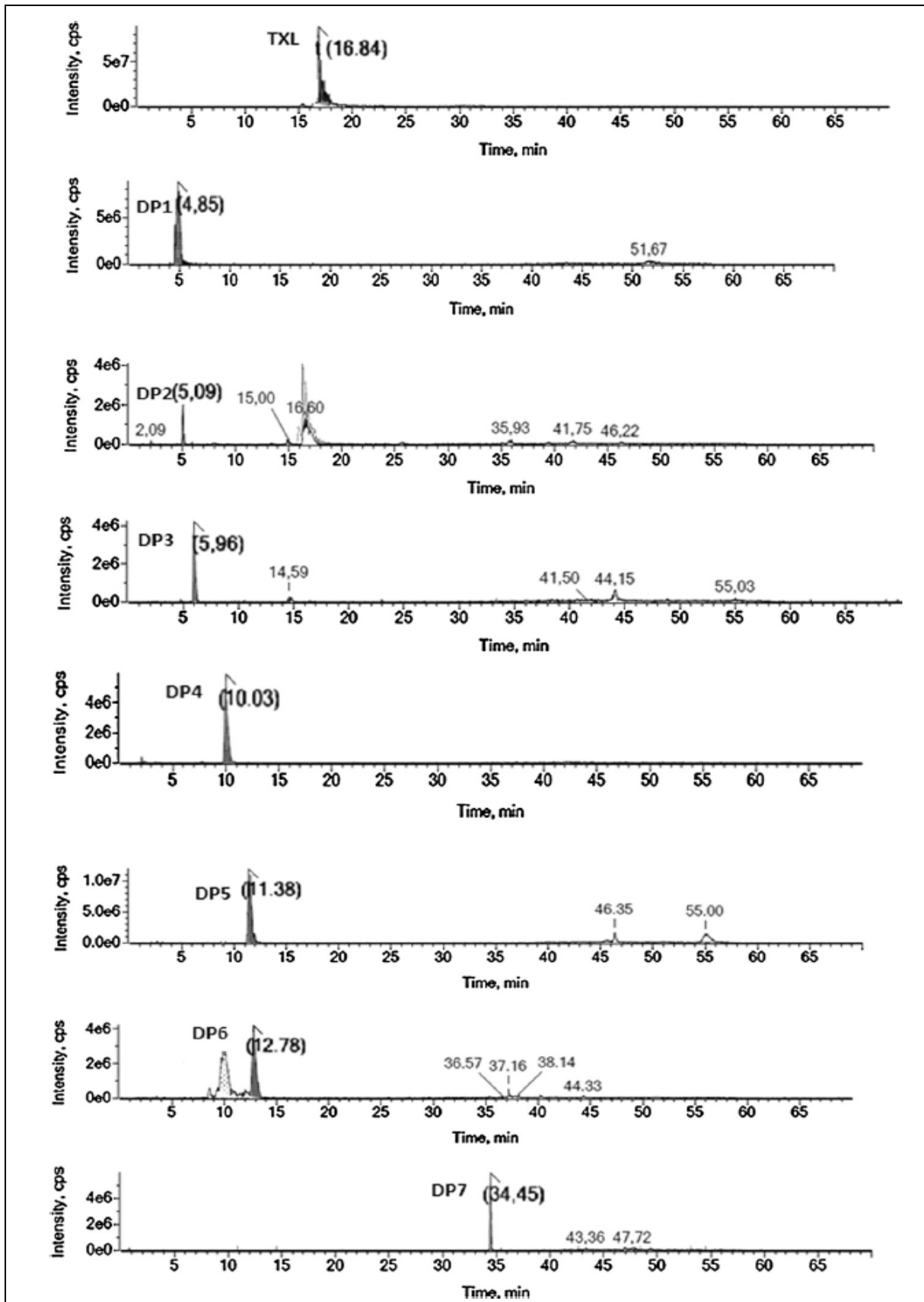


Figure 4-2. Chromatogrammes correspondant au tienoxolol et à ses produits de dégradation (DP)

La figure 4-2 montre la présence de sept produits de dégradation (DP). Parmi ces produits, celui élué à  $R_T = 4,8$  min, désigné comme DP1, a déjà été observé dans les solutions de tienoxolol non traitées.

La plupart des produits de dégradation sont élués avant le tienoxolol, laissant supposer qu'ils présentent un caractère hydrophile plus important que le composé d'origine. Un seul produit de dégradation présente un temps de rétention supérieur à celui du tienoxolol. Les temps de rétention et les facteurs de résolution entre les pics chromatographiques sont rassemblés dans le tableau 4-II.

**Tableau 4-I : Paramètres chromatographiques du tienoxolol et de ses produits de dégradation après dégradation forcée**

	Milieu de dégradation	DP1	DP2	DP3	DP4	DP5	DP6	TX L	DP7
$R_T$ (min)	Oxydation	4,80	5,11	-	10,03	11,38	12,78	16,84	-
	Acide	4,79	-	-	-	-	-	16,78	34,45
	Basique	4,79	-	-	-	-	-	16,79	-
	Température	4,85	5,09	6,01	-	-	-	16,89	-
	Lumière	4,84	-	5,96	-	-	-	16,87	-
Moyenne $R_T$ (min) $\pm$ écart type		4,81 $\pm 0,02$	5,10 $\pm 0,01$	5,98 $\pm 0,02$	10,03 <sup>a</sup>	11,38 <sup>a</sup>	12,78 <sup>a</sup>	16,87 $\pm 0,04$	34,45 <sup>a</sup>
Facteur de résolution <sup>b</sup>			0,4	2,7	5,9	1,1	1	3,9	41,3

<sup>a</sup> Ces valeurs de temps de rétention ne sont pas des moyennes. Elles constituent les valeurs trouvées dans les conditions d'oxydation pour DP4, DP5 et DP6 et en milieu acide pour DP7,

<sup>b</sup> Le facteur de résolution est calculé pour chaque deux pics consécutifs.

Ces paramètres chromatographiques montrent que le tienoxolol et ses produits de dégradation sont bien résolus les uns par rapport aux autres. Une analyse par CODA (Component Detection Algorithm, selon la terminologie anglo-saxonne) permet d'identifier les ions qui contribuent significativement au courant total d'ions pour chaque produit.

#### 4.2.2. Etude de la sensibilité du tienoxolol aux différents facteurs de stress

Le tienoxolol se dégrade principalement en un ou deux produits de dégradation dans la plupart des conditions de stress, à l'exception du milieu oxydant qui engendre un total de cinq produits de dégradation (Tableau 4-II et Figure 4-2). La corrélation entre la diminution du



signal de tienoxolol et l'augmentation des signaux des produits de dégradation est effectuée en calculant les coefficients de corrélation de Pearson.

#### **4.2.2.1. Influence de l'hydrolyse acide et alcaline**

L'influence de l'hydrolyse acide et alcaline a été testée à différentes conditions de pH et sur une période de sept jours. Les profils d'impuretés dans ces conditions montrent une augmentation du taux de DP1, déjà présent dans la matière première comme noté ci-dessus. En milieu alcalin, le tienoxolol se transforme quasi complètement en DP1 au bout de sept jours d'exposition, soulignant ainsi la grande sensibilité de la molécule vis-à-vis de l'hydrolyse alcaline. En comparant les profils d'impuretés obtenus à celui de la matière première et en plus de l'existence de DP1, le produit DP7 est formé en milieu acide avec un coefficient de corrélation de Pearson de -0,76, alors qu'aucun pic supplémentaire n'a été observé en milieu alcalin.

#### **4.2.2.2. Influence de l'oxydation par les peroxydes**

Le peroxyde d'hydrogène induit une dégradation chimique de tienoxolol pouvant atteindre 50% au bout de sept jours d'exposition. En plus de DP1, le profil d'impuretés est caractérisé par l'apparition de quatre nouveaux produits de dégradation par rapport à ceux observés après hydrolyse acide et basique. Ces produits sont DP2, DP4, DP5 et DP6.

Les produits de dégradation DP2, DP4 et DP6 apparaissent rapidement dès les premiers jours d'exposition, alors que la formation de DP5 est plus progressive. Les coefficients de corrélation de Pearson,  $R = -0,76$  (DP2),  $R = -0,73$  (DP4),  $R = -0,67$  (DP5) et  $R = -0,80$  (DP6), confirment que la diminution de tienoxolol est corrélée à la formation de ses produits de dégradation.

#### **4.2.2.3. Influence de la lumière**

Les études de photo-dégradation en solution à température et à humidité ambiantes ont montré une réactivité de la molécule vis-à-vis de l'irradiation lumineuse, atteignant 30% de dégradation au bout de sept jours d'exposition. Une impureté, DP3, est spécifiquement détectée dans les échantillons soumis à la photolyse avec un coefficient de corrélation de Pearson de -0,82.

#### 4.2.2.4. Influence de la chaleur

L'exposition de la molécule à des températures élevées (80°C) induit sa dégradation en deux impuretés, DP2 et DP3, avec des coefficients de corrélation de Pearson de -0,81 et -0,74, respectivement. Le produit de dégradation DP1 est aussi détecté à des concentrations élevées ( $R = -0,67$ ). Au bout de sept jours d'exposition, DP2 et DP3 présentent des concentrations plus faibles que celles trouvées respectivement sous conditions oxydantes et photolytiques au bout de la même période d'exposition, montrant ainsi que la molécule est peu réactive à la chaleur.

#### 4.2.3. Etude de la cinétique de dégradation du tienoxolol

Dans toutes les conditions de stress étudiées, le taux de tienoxolol diminue en fonction du temps selon des courbes de tendance  $1/C = f(t)$  représentées dans la figure 4-3. Ceci montre que la cinétique de dégradation est d'ordre 2. Les constantes de vitesse des réactions ( $k$ ) possèdent le même ordre de grandeur pour la dégradation sous l'effet de la chaleur et en milieu acide, alors que  $k$  double en présence d'agent oxydant. En plus, le temps au bout duquel 50% de la substance est dégradée ( $T_{0,5}$ ) dépend des conditions de stress étudiées. Ainsi, le tienoxolol, avec un  $T_{0,5}$  de 7,4 jours, serait plus sensible à l'oxydation qu'aux autres facteurs de dégradation (Tableau 4-III).

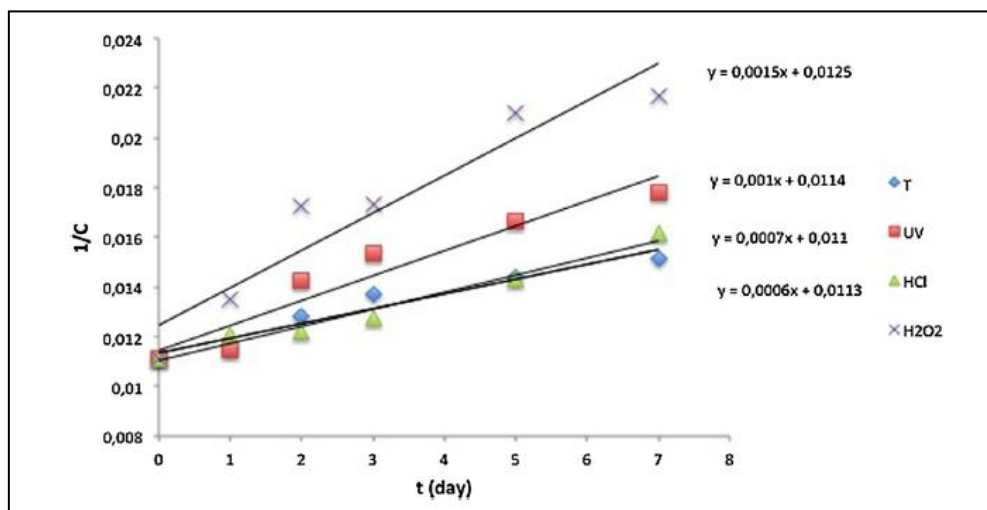


Figure 4-3. Courbes de dégradation du tienoxolol ( $1/C$ ) en fonction de la durée d'exposition ( $t$ ) pour les différents agents de stress

**Tableau 4-II : Cinétique de dégradation du tienoxolol sous les différentes conditions de stress étudiées**

Conditions de stress	Constante de vitesse ( $j^{-1}$ )	$T_{0,5}$ (jour)	Coefficient de corrélation ( $r^2$ )
Température	0,0006	18,5	0,9417
Milieu oxydatif	0,0015	7,4	0,9065
Milieu acide	0,0007	15,9	0,9741
Lumière	0,0010	11,1	0,9170

### 4.3. Caractérisation des différents produits de dégradation et élaboration des différents schémas de fragmentations

#### 4.3.1. Caractérisation des produits de dégradation

L'analyse des spectres de masse des différents pics chromatographiques correspondant aux produits de dégradation de tienoxolol permet d'identifier leurs masses moléculaires respectives. Les résultats sont présentés dans la figure 4-4.

Les temps de rétention ( $R_T$ ) et les rapports masse sur charge ( $m/z$ ) du tienoxolol et de ses produits de dégradation sont résumés dans le tableau 4-IV.

**Tableau 4-III :  $R_T$  et  $m/z$  de tienoxolol (TXL) et ses produits de dégradation**

Composé	TXL	DP1	DP2	DP3	DP4	DP5	DP6	DP7
$[M+H]^+$	421	393	365	375	296	341	288	531
$R_T$ (min)	16,87	4,81	5,10	5,98	10,03	11,38	12,78	34,45

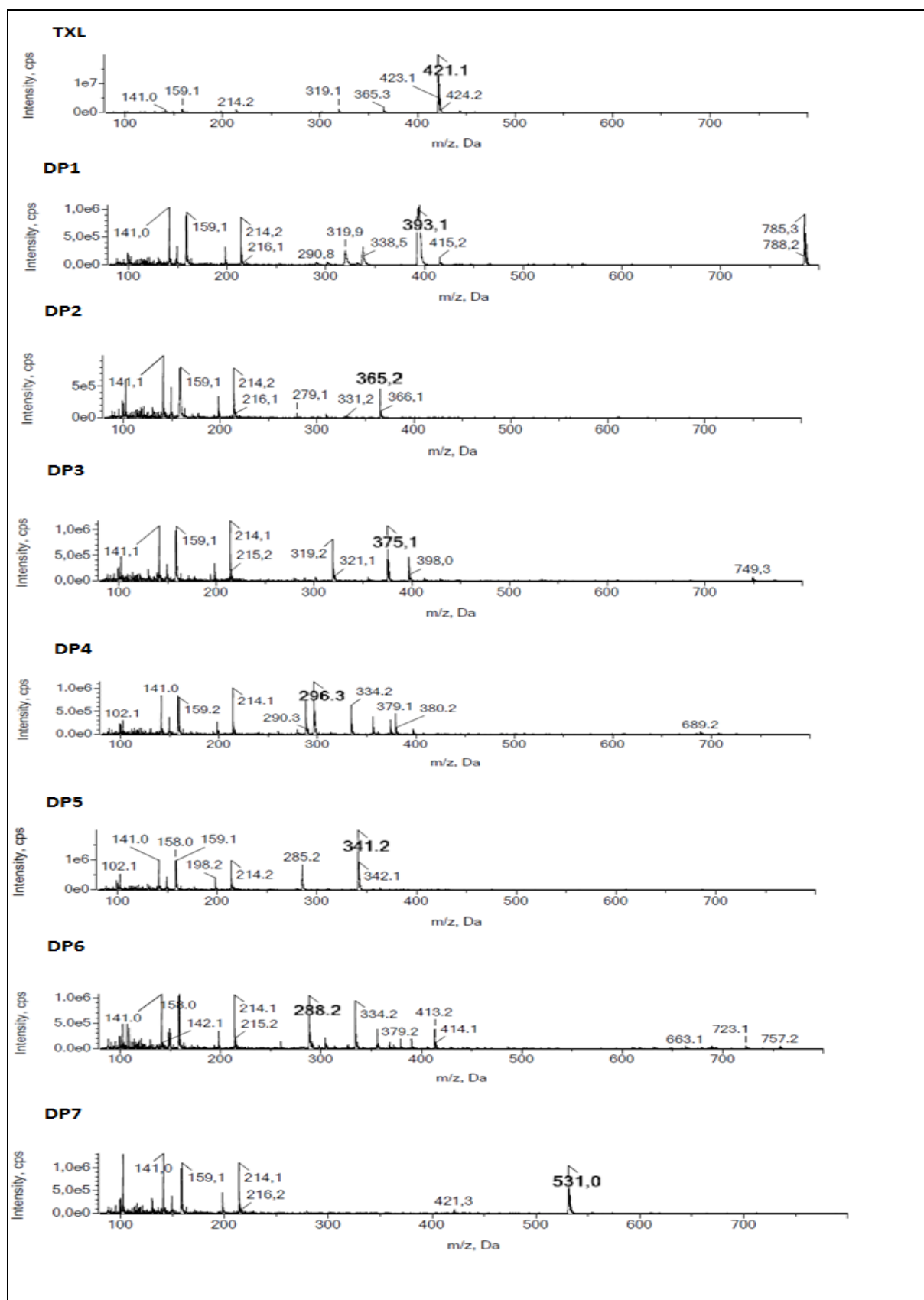


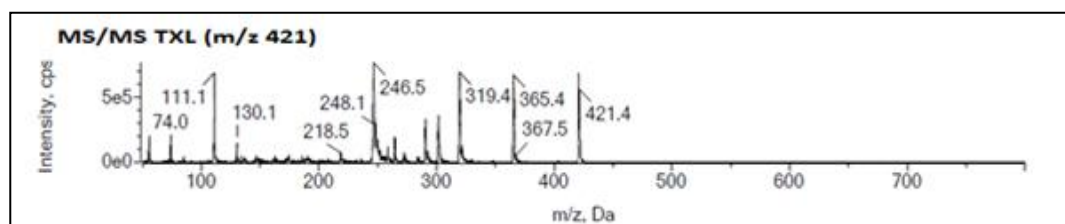
Figure 4-4. Spectres de masse du tienoxolol (TXL) et de ses différents produits de dégradation

Chaque molécule étudiée, caractérisée par un temps de rétention donné et un signal  $m/z$ , est isolée puis fragmentée dans le piège ionique afin de produire un spectre  $MS^2$ . L'identification des fragments constitutifs de ce spectre permet de caractériser le produit et d'élucider sa structure chimique. Cette approche nécessite tout d'abord la fragmentation  $MS^2$  du tienoxolol pour servir de modèle à l'interprétation des spectres de masse des produits de dégradation.

### 4.3.2. Elaboration des schémas de fragmentations

#### 4.3.2.1. Fragmentation de tienoxolol

L'ion moléculaire protoné de tienoxolol  $[M+H]^+$  est observée à  $m/z = 421$ . Le spectre ESI- $MS^2$  montre l'existence de plusieurs ions-fragments à  $m/z = 365, 319, 301, 291, 264, 246, 130, 111$  et  $74$  (Figure 4-5). Certains ions sont très probablement formés par protonation de l'atome d'azote de la fonction amine. D'autres pourraient être mieux expliqués par la dissociation d'espèces chimiques, comme les fonctions éther ou ester avec protonation de l'atome d'oxygène [4.5].



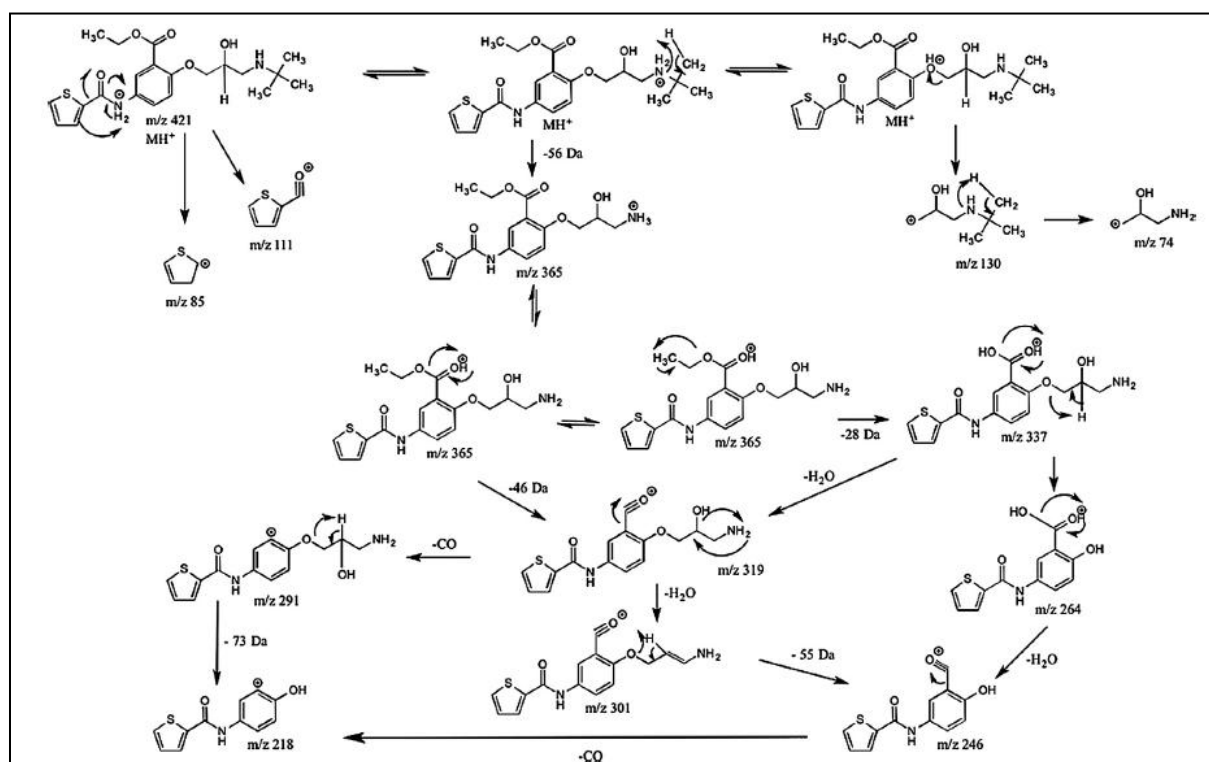
**Figure 4-5. Spectre  $MS^2$  de l'ion moléculaire de tienoxolol**

Le premier fragment ( $m/z = 365$ ) est obtenu par une perte de neutre de 56 Da correspondant à un fragment  $CH_2=C(CH_3)_2$ , qui est la conséquence d'un processus de déalkylation ou clivage de la liaison N-C comme illustré dans la figure 4-6. A son tour, cet ion-fragment pourrait subir deux schémas de fragmentation, rendus possibles grâce à un transfert d'hydrogène de l'amine à l'oxygène de la fonction ester carboxylique. Il pourrait soit perdre un fragment éthanol (46 Da) par un mécanisme de réarrangement intramoléculaire à quatre centres conduisant à la formation d'un ion acylium à  $m/z = 319$  par  $\alpha$ -clivage, soit perdre une fonction éthylène, pouvant être justifié par la présence d'un ion à  $m/z = 337$  [4.6]. L'ion-fragment à  $m/z = 319$  produit des ions de rapports masse/charge égaux à 291, 301 et 246 indiquant respectivement la perte d'une molécule de monoxyde de carbone [4.7], d'une molécule d'eau et d'un résidu aminopropène hydroxylé (73 Da), respectivement, et ceci par réarrangements intramoléculaires à quatre et à six centres. L'ion-fragment à  $m/z = 218$  pourrait

provenir de l'ion- précurseur à  $m/z = 246$  par élimination d'une molécule de monoxyde de carbone, suivie d'un réarrangement intramoléculaire, comme décrit précédemment par March et Miao [4.8]. La protonation de l'atome de l'azote au niveau de la fonction céto-amide thiophène de la molécule pourrait donner lieu à deux ions pseudo-moléculaires correspondants aux ions-fragments à  $m/z = 111$  et  $85$  [4.5].

Les ions-fragments résultant de la protonation de l'atome d'oxygène de la fonction éther du tienoxolol sont les ions à  $m/z = 130$  et  $74$ . Ils proviennent d'une perte de neutre au niveau de la fonction phénol substituée. La différence entre  $m/z = 130$  et  $74$  est due au résidu N-tertio-butyl. Le pic  $m/z = 74$  est caractéristique du résidu propanolamine au niveau de la chaîne latérale [4.9].

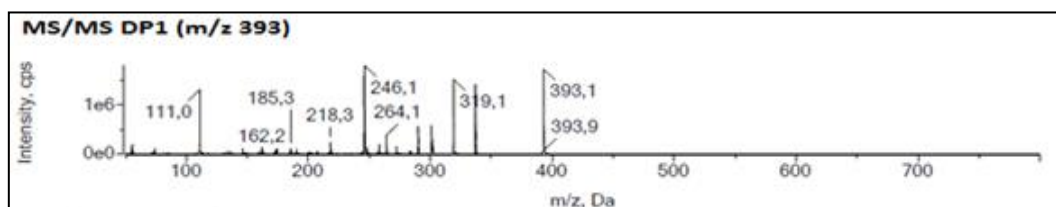
Ces hypothèses permettent d'établir un profil de fragmentation de la molécule de tienoxolol présenté dans la figure 4-6.



**Figure 4-6. Schéma de fragmentations ESI-MS<sup>n</sup> proposé pour l'ion protoné à  $m/z = 421$  correspondant au tienoxolol**

#### 4.3.2.2. Fragmentation de DP1

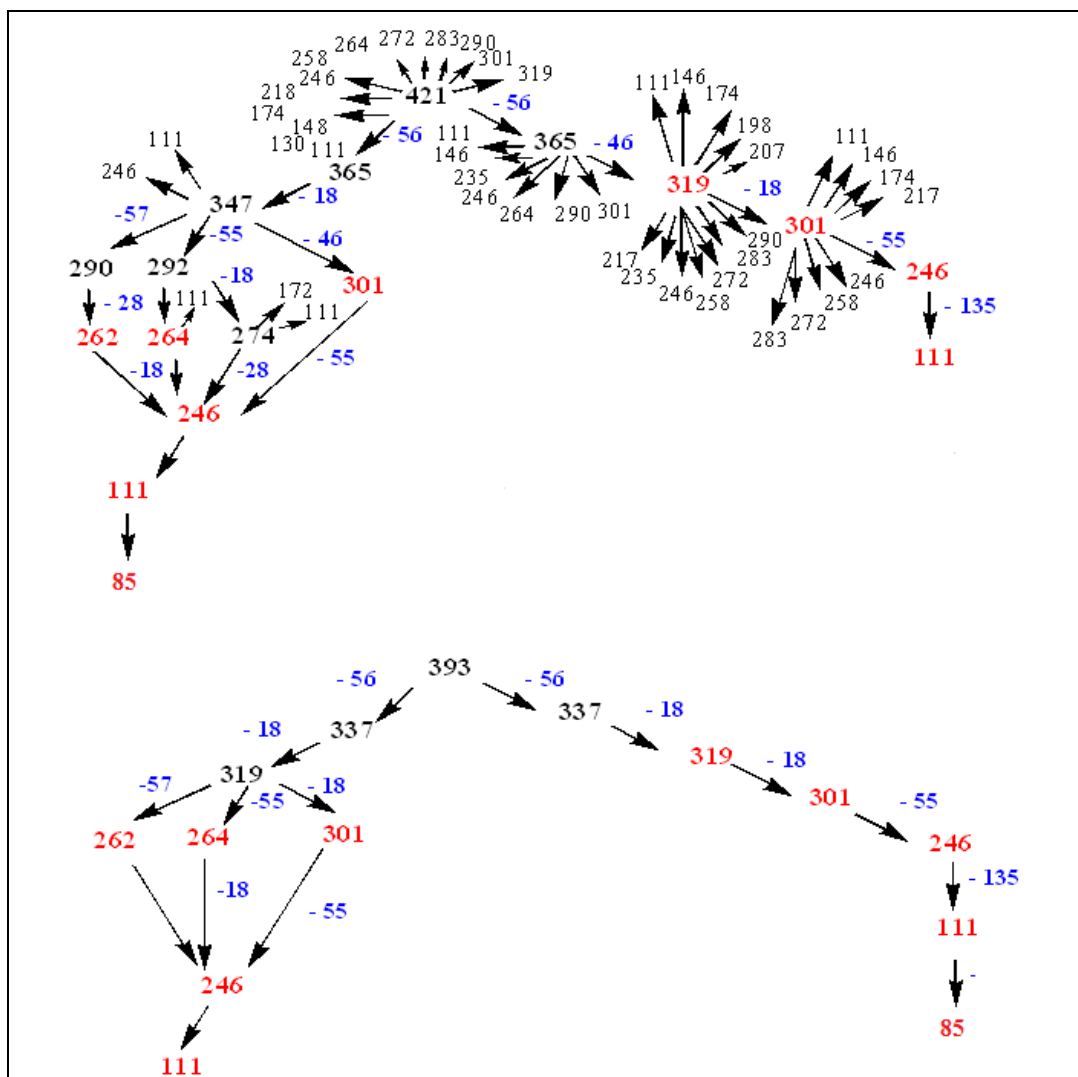
Présentant le temps de rétention le plus court (4,81 min), le produit de dégradation DP1 est considéré comme le composé le plus polaire de tous les produits de dégradation observés. Son spectre de masse montre un ion moléculaire de valeur  $m/z = 393$ . La fragmentation produit plusieurs ions à  $m/z = 319, 301, 264, 246, 218$  et  $111$  (Figure 4-7).



**Figure 4-7. Spectre MS<sup>2</sup> de l'ion moléculaire de DP1**

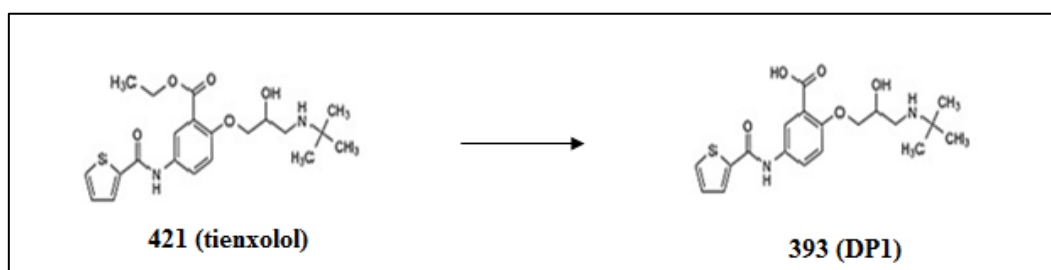
L'étude du schéma de fragmentation de DP1 montre qu'il reflète complètement celui de tienoxolol (Figure 4-8). En effet, l'ion précurseur DP1 subit les mêmes pertes que celles observées pour tienoxolol, notamment, la perte caractéristique du fragment 56 Da ainsi que les départs successifs du fragment 73 Da, d'une molécule d'eau et d'une molécule de monoxyde de carbone. Toutefois, la perte de neutre correspondant au fragment 46 Da, précédemment considérée comme spécifique au groupe ester acétique du tienoxolol, est absente du spectre de masse de DP1. Ce résultat laisse supposer que DP1 ne présenterait pas de fonction ester dans sa structure, et serait alors un produit formé par son hydrolyse [4.4] (Figure 4-9). Une différence de 28 Da dans la masse moléculaire du DP1 comparée à celle de tienoxolol vient consolider cette hypothèse. L'élution plus rapide de DP1 à partir de la phase stationnaire, par rapport à celle de tienoxolol, pourrait alors être expliquée par la transformation de la fonction ester en fonction carboxylique présentant une hydrophobicité plus faible.

Comme mentionné ci-dessus, ce produit de dégradation a déjà été retrouvé, en plus faibles concentrations, dans des solutions fraîchement préparées suggérant que l'échantillon de tienoxolol n'était pas pur dès le début et/ou s'est dégradé au cours de sa conservation.



**Figure 4-8. Comparaison des profils de fragmentation des ions protonés à  $m/z = 421$  correspondant au tienoxolol et à  $m/z = 393$  correspondant à DP1**

En rouge apparaissent les ions produits et sous-produits communs entre le tienoxolol et le produit de dégradation DP1. Les chiffres en bleu correspondent à la perte de masse existante entre un ion parent ou produit et un ion produit ou sous-produit issu de l'ion précédent.

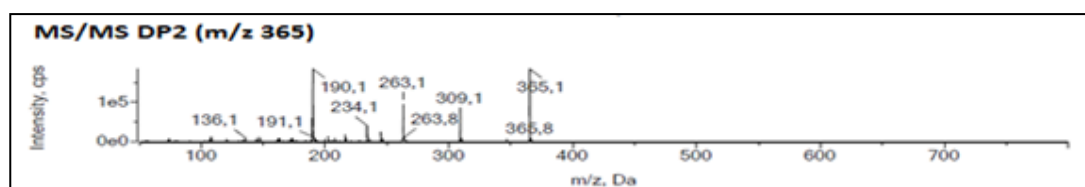


**Figure 4-9. Structure chimique proposée pour DP1 et sa formation par hydrolyse du tienoxolol**



### 4.3.2.3. Fragmentation de DP2

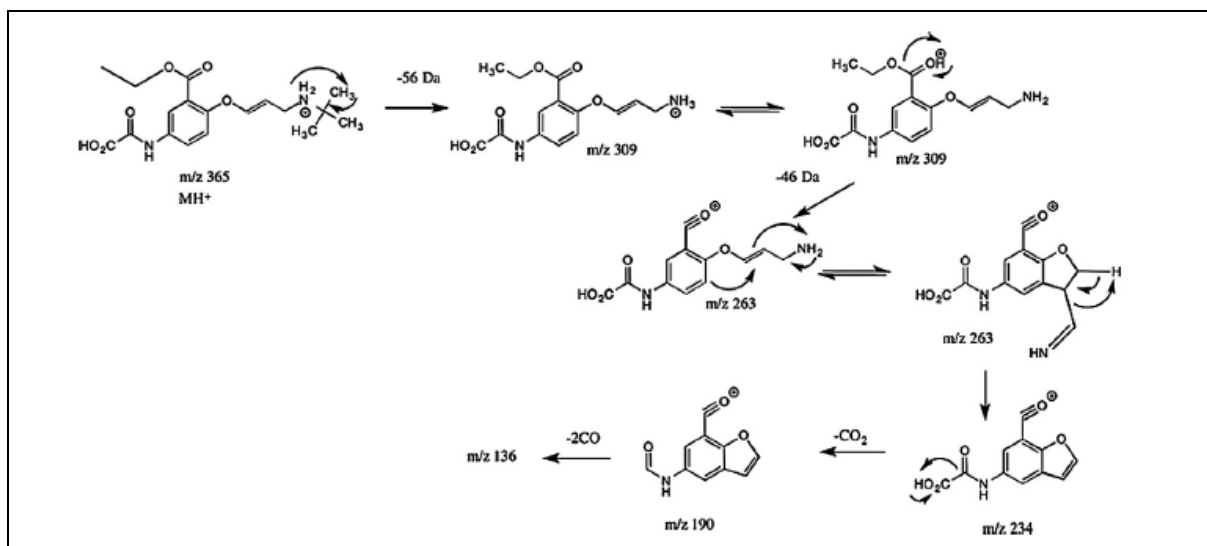
Présentant un temps de rétention de 5,1 min, le produit de dégradation DP2 est élué rapidement et est difficilement séparé de DP1. Il est détecté à  $m/z = 365$ . La fragmentation, à une énergie de 30%, produit six principaux ions-fragments à  $m/z = 309$ , 263, 245, 234, 190 et 136 au niveau du spectre de masse (Figure 4-10). L'ion caractéristique du résidu propanolamine à  $m/z = 74$  ainsi que l'ion acylium à  $m/z = 111$  reflétant la présence du groupe céto-thiophène ne sont pas détectés au niveau du spectre, suggérant que des transformations se sont produites aux niveaux de ces parties de la structure de tienoxolol pour donner DP2.



**Figure 4-10. Spectre MS<sup>2</sup> de l'ion moléculaire de DP2**

Une différence de 56 Da dans la masse moléculaire de DP2 comparée à celle du tienoxolol protoné pourrait en premier lieu indiquer que le produit est formé par N-déalkylation du tienoxolol. Toutefois, la détection d'une transition  $m/z 365 \rightarrow 309$  correspondant au départ d'un fragment de 56 Da, conduit à rejeter cette hypothèse et confirme la présence d'un résidu N-tertio-butyl dans la structure de DP2. D'autre part, la perte d'un fragment de 46 Da due à la transition  $m/z 309 \rightarrow 263$  montre que la fonction ester n'a pas été impactée et qu'elle est présente au niveau de la structure de DP2.

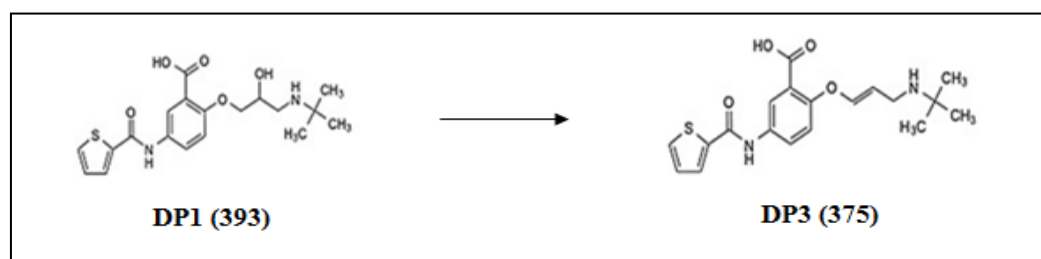
L'absence de  $m/z = 74$  suggère la perte du résidu propanolamine par dégradation pour produire DP<sub>2</sub> et l'absence de l'ion acylium à  $m/z = 111$  démontre clairement le remplacement du groupe céto-thiophène par un autre qui pourrait être un  $\alpha$ -céto-acide. Se basant sur ces hypothèses, le schéma de fragmentation de DP2 proposé dans la figure 4-11 s'avère correspondre aux données obtenues à partir du spectre de masse. Comme le montre la figure 4-11, l'ion-fragment à  $m/z = 234$  pourrait provenir de l'ion-produit à  $m/z = 263$  par réarrangement intramoléculaire suivi d'une cyclisation et de la formation d'un imine. Avec un mécanisme de réarrangement à quatre centres, la perte d'un fragment de 29 Da a été observée, correspondant au départ de CH<sub>2</sub>NH. A partir de là, un réarrangement d'atomes d'hydrogène et une élimination d'une molécule de CO<sub>2</sub> donne lieu à un ion-fragment à  $m/z = 190$ . Par la suite, des pertes successives de molécules de monoxyde de carbone et d'acétylène engendrent l'ion-fragment à  $m/z = 136$ .



**Figure 4-11. Structure chimique et schéma de fragmentations ESI-MS<sup>n</sup> proposés pour l'ion protoné à  $m/z = 365$  correspondant à DP2**

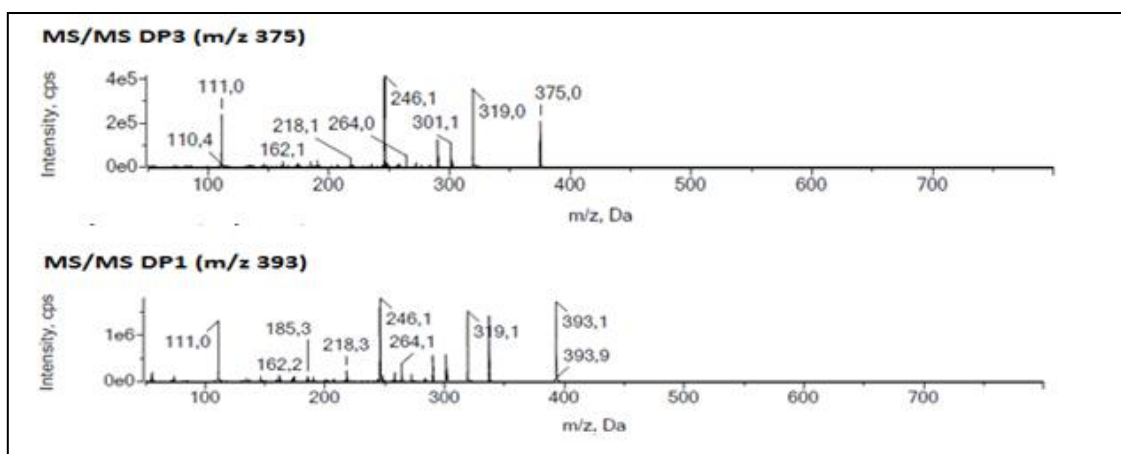
#### 4.3.2.4. Fragmentation de DP3

Le produit de dégradation DP3 présente un temps de rétention de 5,98 min et est détecté à  $m/z = 375$ . Sa masse moléculaire montre une différence de 18 Da comparée à celle de DP1 laissant ainsi supposer que DP3 serait un produit de dégradation secondaire de DP1 formé par déshydratation (Figure 12).



**Figure 4-12. Structure chimique proposée pour DP3 et sa formation à partir de DP1**

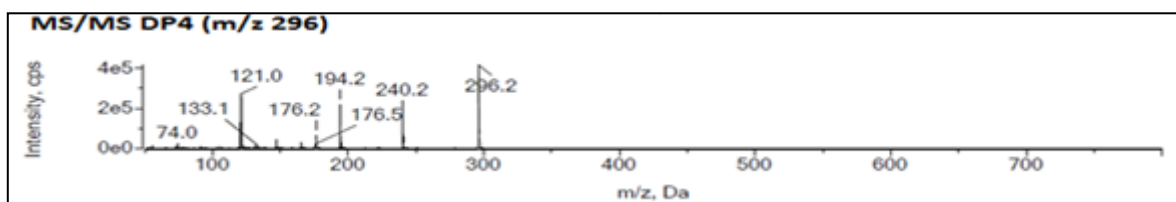
Cette hypothèse est confirmée par l'étude des spectres de masse des deux produits qui montre des similitudes au niveau des transitions observées et des ions-fragments (Figure 4-13).



**Figure 4-13. Comparaison des deux spectres MS<sup>2</sup> des ions moléculaires de DP3 et de DP1**

#### 4.3.2.5. Fragmentation de DP4

Le produit de dégradation DP4 présente un temps de rétention de 10,03 min et est caractérisé par un ion protoné à  $m/z = 296$ . Les principaux ions-fragments observés au niveau de son spectre MS<sup>2</sup> présentent des  $m/z = 240, 194, 176, 133, 121$  et  $74$  (Figure 4-14).

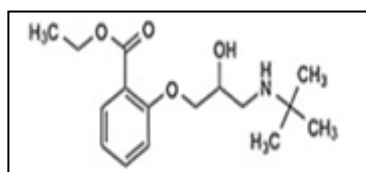


**Figure 4-14. Spectre MS<sup>2</sup> de l'ion moléculaire de DP4**

Comme DP2, l'ion acylium à  $m/z = 111$  n'est pas observé au niveau du spectre de masse, indiquant l'absence du groupe céto-thiophène de la structure. D'autre part, la règle de l'azote<sup>4.1</sup> stipule que l'ion protoné correspondant à DP4 devrait posséder un nombre impair de

<sup>4.1</sup>La règle de l'azote est une règle généralement utilisée en spectrométrie de masse. Elle stipule que toute molécule organique de masse moléculaire impaire contient un nombre impair d'atomes d'azote. Ainsi une molécule organique sans atome d'azote aura une masse monoisotopique paire (ex :  $C_6H_{12}O_6$ , glucose,  $M = 180$ ), une molécule organique avec un atome d'azote aura une masse impaire, une molécule organique avec deux atomes d'azote aura une masse paire, etc. Cette règle trouve sa source dans le fait que, à part l'azote, la plupart des éléments présents dans les molécules présentent une valence et une masse monoisotopique de même parité: ainsi le carbone 12 a une valence de 4, l'hydrogène 1 a une

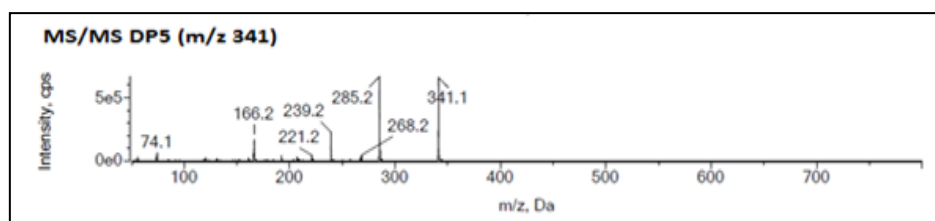
fonctions azote. De plus, les pertes caractéristiques des fragments 56 Da et 46 Da sont observées au niveau du spectre. Ces constatations laissent penser que la fonction amine secondaire devrait exister dans la structure de DP4, alors que la fonction amide aromatique en serait absente (Figure 4-15).



**Figure 4-15. Structure chimique proposée pour DP4**

#### 4.3.2.6. Fragmentation de DP5

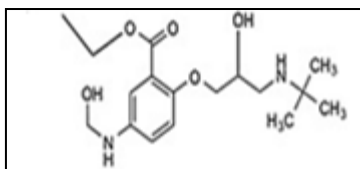
Le produit de dégradation DP5 présente un temps de rétention de 11,38 min et est caractérisé par un ion pseudo-moléculaire à  $m/z = 341$ . Selon la règle de l'azote, la molécule devrait contenir un nombre pair de fonctions azote. Le spectre  $MS^2$  de l'ion à  $m/z = 341$  présente cinq principaux ions-fragments à  $m/z = 285$ , 268, 239, 221 et 166 (Figure 4-16).



**Figure 4-16. Spectre  $MS^2$  de l'ion moléculaire de DP5**

Une fois encore, l'ion-fragment caractéristique du groupement céto-thiophène à  $m/z = 111$  est complètement absent du spectre de masse. Le spectre montre, par contre, les pertes de fragments précédemment observées, comme les fragments 56 Da et 46 Da, ainsi que la présence de l'ion-fragment caractéristique à  $m/z = 74$ . Tout ceci laisse supposer que la molécule DP5 garderait dans sa structure la fonction ester et la chaîne latérale du côté de la fonction éther. La structure suggérée du produit de dégradation DP5 pourrait être construite en introduisant un résidu N-aryl-méthanolamine à la place du groupe céto-thiophène ; ceci serait en concordance avec la masse moléculaire résultante de DP5 (Figure 4-17).

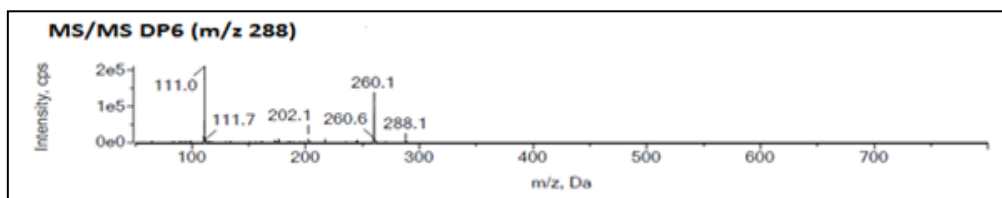
*valence de 1, l'oxygène 16 une valence de 2, le phosphore 31 a une valence 3 ou 5. En revanche, l'azote 14 a une valence 3. Cette règle permet, si le pic moléculaire d'un spectre de masse est impair, de confirmer que la molécule contient 1, 3, 5... atomes d'azote.*



**Figure 4-17. Structure chimique proposée pour DP5**

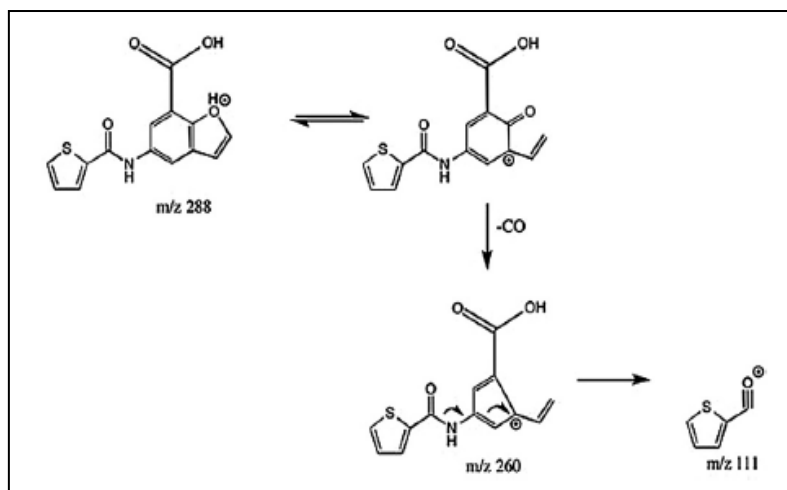
#### 4.3.2.7. Fragmentation de DP6

Le produit de dégradation DP6 est l'un des composés les plus lents à être élués avec un temps de rétention de 12,78 min, son ion pseudo-moléculaire est par contre seulement détecté à  $m/z = 288$ . Soumis au même niveau d'énergie de collision que les autres composés, le spectre de masse est plus pauvre en informations structurales. Il montre la présence d'ion-fragments de  $m/z = 260$ , 202, 176, 111 et 85 (Figure 4-18).



**Figure 4-18. Spectre MS<sup>2</sup> de l'ion moléculaire de DP6**

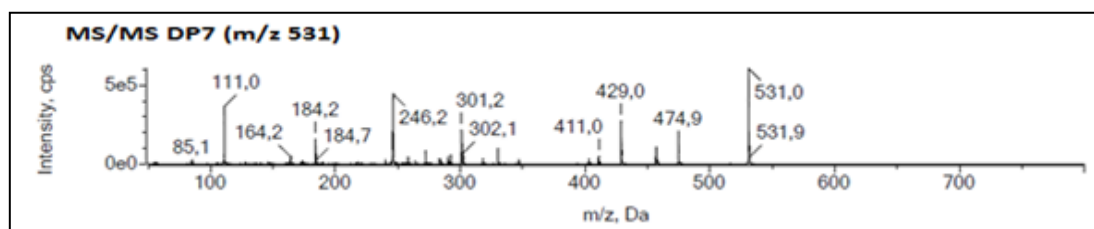
Les données montrent la présence de deux pics intenses caractéristiques du fragment céto-thiophène à  $m/z = 111$  et 85. Aucun signal correspondant à la chaîne latérale du côté de la fonction éther-propanolamine n'a été observé au niveau du spectre. Des pertes liées aux fonctions N-tertio-butyl et aryl-ester sont aussi absentes. L'ion-précurseur à  $m/z = 288$  peut donner naissance à l'ion-fragment à  $m/z = 260$  par élimination d'une molécule de monoxyde de carbone et à l'ion à  $m/z = 202$  par départs successifs d'une molécule de dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) et d'un groupement  $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$ . Ensuite, à travers des réarrangements intramoléculaires, l'ion à  $m/z = 176$  est obtenu après la perte d'une fonction acétylène. Ces informations permettent de proposer une structure pour ce produit de dégradation (DP6). Cependant, cette structure nécessite une confirmation par des données supplémentaires. Le schéma de fragmentation proposé est présenté dans la figure 4-19.



**Figure 4-19. Structure chimique et schéma de fragmentations ESI-MS<sup>n</sup> proposés pour l'ion protoné à  $m/z = 288$  correspondant à DP6**

#### 4.3.2.8. Fragmentation de DP7

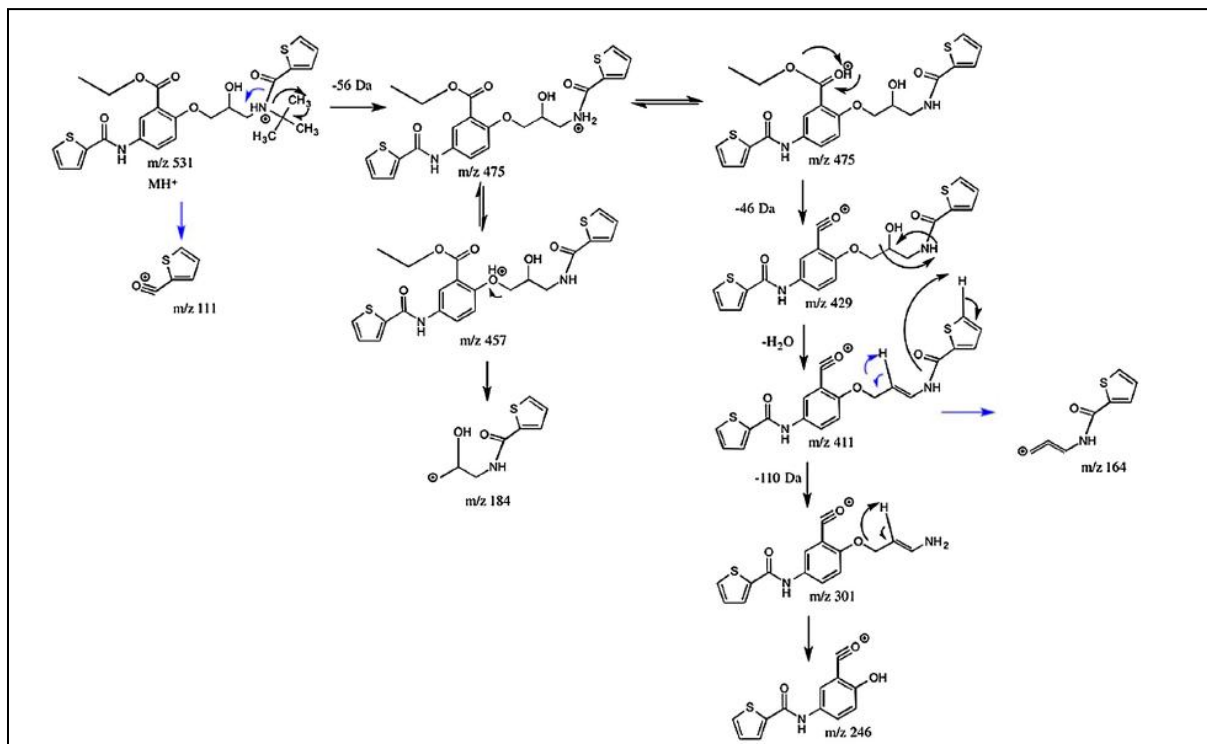
Elué à 34,45 min, le produit de dégradation DP7 ( $m/z = 531$ ) est considéré comme étant beaucoup plus hydrophobe que tienoxolol. Ce comportement chromatographique est attribué à sa masse moléculaire importante et à la présence de fonctions faiblement polaires. Son spectre de masse MS<sup>2</sup> révèle plusieurs ions-fragments présentant des  $m/z = 475$ , 411, 301, 184 et 111 (Figure 4-20).



**Figure 4-20. Spectre MS<sup>2</sup> de l'ion moléculaire de DP7**

Certains ion-fragments sont formés par pertes de neutres caractéristiques des fragments 46 Da, 55 Da et 56 Da, également observées pour le tienoxolol. Les autres pertes sont spécifiques à DP7. La différence de 110 Da observée entre les masses moléculaires de DP7 et du tienoxolol pourrait être obtenue par l'addition d'une unité céto-thiophène, ce qui rend l'ion acylium à  $m/z = 111$  un des ions-fragments les plus intenses au niveau du spectre de masse. La perte de neutre de 110 Da est clairement démontrée au niveau de la transition  $m/z$  411  $\rightarrow$  301. La présence de l'ion-fragment à  $m/z = 184$  montre qu'une unité céto-thiophène est connectée à la fonction amine secondaire pour former une fonction amide aliphatique.

Le schéma de fragmentation du produit DP7 ainsi décrit ci-dessus est proposé dans la figure 4-21.



**Figure 4-21. Structure chimique et schéma de fragmentations ESI-MS<sup>n</sup> proposés pour l'ion protoné à m/z = 531 correspondant à DP7**

Ainsi, en considérant les données obtenues à partir de ces spectres MS<sup>2</sup> ainsi que la structure de tienoxolol, nous avons pu attribuer une structure chimique à chaque produit de dégradation étudié. Les résultats sont présentés dans la figure 4-22.

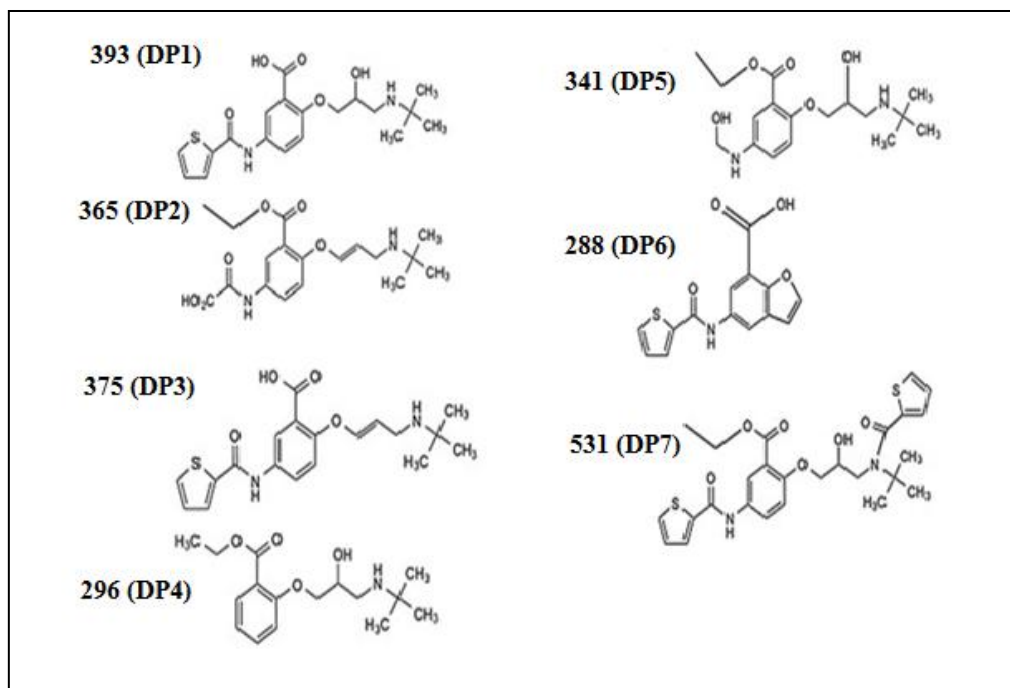


Figure 4-22. Structures proposées des différents produits de dégradation de tienoxolol

#### 4.4. Schéma réactionnel des voies de dégradation de tienoxolol

A partir des chromatogrammes obtenus avec des échantillons de tienoxolol dégradés, un total de sept produits de dégradation a été observé. Certains peuvent être expliqués par l'hydrolyse de la fonction ester [4.10] ou par déshydratation de la fonction alcool présente au niveau de la chaîne reliée à la fonction éther-propanolamine. DP7 est probablement le résultat d'une réaction de transamidation, comportant un transfert du fragment céto-thiophène de l'amide aromatique vers l'amine secondaire (Figure 4-23). En solution, la partie  $\beta$ -bloquante de la molécule active, combinant le groupement amino-propanol et le groupement benzyl, est réactive sous les conditions de stress. Cette constatation est concordante avec ce qui a été reporté pour notamment le propranolol, un antagoniste  $\beta$ -adrénergique [4.11].

D'autres produits de dégradation peuvent résulter de l'oxydation affectant le fragment aminocéto-thiophène. Les réactions d'oxydation conduisent à la formation de DP2, DP4 et DP5 comme illustré dans la figure 4-8. DP2 pourrait résulter d'une oxydation du fragment thiophène donnant lieu à la formation d'un  $\alpha$ -céto acide, comme reporté précédemment pour la tiagabine, agent antiépileptique, en présence de peroxyde d'hydrogène [4.12]. La même réaction suivie d'une décarboxylation pourrait expliquer la formation de DP5.



Les résultats obtenus dans ce travail ne permettent pas de proposer un mécanisme de formation de DP6. L'énergie de collision appliquée a produit un spectre de masse du produit de dégradation protoné présentant peu d'ions-fragments. Des données supplémentaires, comme l'analyse par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), sont nécessaires pour confirmer la structure proposée.

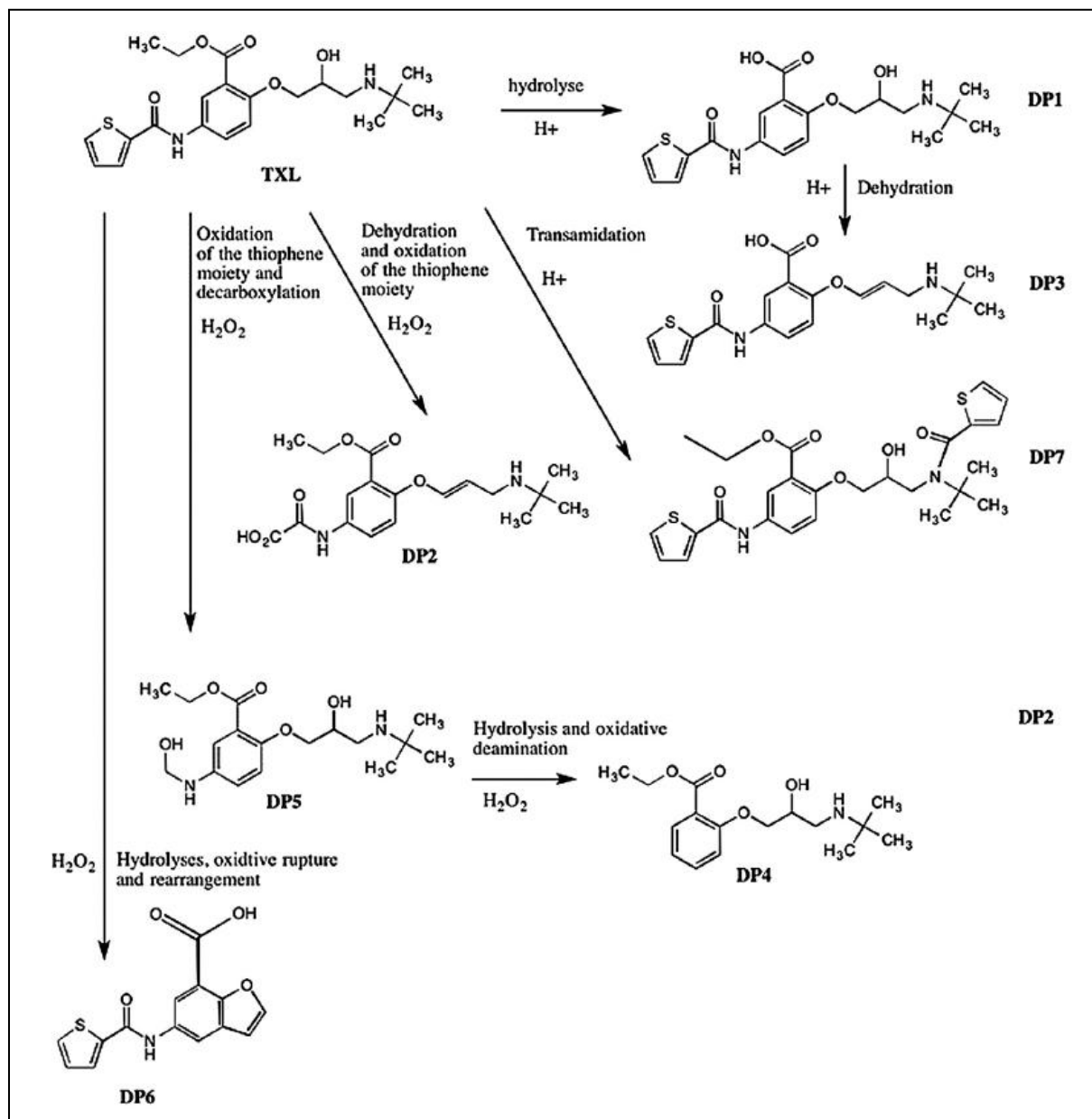


Figure 4-23. Voies de dégradation de la molécule de tienoxolol en solution

#### 4.5. Conclusions

Une méthode LC a été développée pour l'analyse de tienoxolol et ses produits de dégradation afin d'établir un profil de stabilité sous des conditions de stress forcées. Une analyse LC/MS<sup>2</sup> a été appliquée et a permis d'identifier sept produits de dégradation pour le tienoxolol. Certains mécanismes de fragmentation proviennent des ions azotes protonés et les autres des ions oxygènes protonés soit d'une fonction éther soit d'une fonction ester. Des ions-fragments caractéristiques ont été identifiés et utilisés comme marqueurs, i.e. l'ion à  $m/z = 74$ , caractéristique du fragment propanolamine et l'ion à  $m/z = 111$ , spécifique du groupe céto-thiophène. De la même manière, une perte de 56 Da a été attribuée à la fonction tertio-butyl au niveau de la chaîne latérale liée à la fonction éther et 46 Da à l'éthanol au niveau du groupe aryl-ester.

La plupart des produits de dégradation pourraient être expliqués par une hydrolyse du groupe benzoate, une déshydratation affectant la chaîne latérale liée à la fonction éther, fragment de la partie de la structure manifestant l'activité  $\beta$ -adrénergique et une oxydation du groupe céto-thiophène, fragment appartenant à la partie de la structure responsable de l'activité diurétique, et du groupe propanolamine. Certaines interactions intramoléculaires ont aussi été soulignées dans le milieu acide comportant une réaction de transamidation, qui résulte de l'attachement du groupement céto-thiophène à la fonction amine tertiaire. Mis à part l'hydrolyse, les études de cinétique ont clairement montré que les conditions oxydantes sont les facteurs les plus influençant la dégradation du tienoxolol. Ces résultats peuvent fournir des indications concernant les schémas de dégradation d'autres composés avec des structures similaires ou présentant les mêmes groupes fonctionnels.

**REFERENCES**

- [4.1] Bouley, E., Teulon, J.M., Cazes M., Cloarec, A., Deghenghi, R., 1986. P-(Thienylcarboxamido)phenoxypropanolamine derivatives as diuretic and beta-adrenergic receptor blocking agents. *J. Med. Chem.* 29, 100-103.
- [4.2] Berdeaux, A., Loueslati, E., Gerard, J.L., Pussard, E., Giudicelli, J.F., 1988. Evaluation of the natriuretic and beta-adrenoceptor-blocking effects of tienoxolol in normal volunteers. *Fund Clin. Pharmacol* 5, 441-454.
- [4.3] Mahé, N., Do, B., Nicolai, B., Rietveld, I.B., Barrio, M., Tamarit, J.L., Céolin, R., Guéchet, C., Teulon, J.M., 2012. Crystal structure and solid-state studies of aged samples of tienoxolol, an API designed against hypertension. *Int. J. Pharm.* 422, 47-51.
- [4.4] Guidance for Industry Q1A (R2), 2003. Stability Testing of New Drugs Substances and Products, in : International Conference on Harmonisation of Technical Requirement for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.
- [4.5] Alana, L., Uthagrove, M.H., Nelson, L.W., 1999. Mass spectral fragmentation pathways of propranolol related B-fluorinated amines studied by electrospray and electron impact ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13, 1671-1679.
- [4.6] Toth, K., Nagy, L., Mandi, A., Kui, A., Mezes M., Zsuga, M., Keki, S., 2013. Collision-Induced dissociation of aflatoxins. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27, 553-559.
- [4.7] Vessechi, R., Emery, F.S., Lopes, N.P., Galembeck, S.E., 2013. Electronic structure and gas-phase chemistry of protonated A- and B-quinonoid compounds: a mass spectrometry and computational study: study of protonated A- and B-quinonoid compounds. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27, 816-824.
- [4.8] March, R.E., Miao, X.S., 2004. A fragmentation study of kaempferol using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry at high mass resolution. *Mass Spectrom.* 231, 157-167.
- [4.9] Pham, M.H., Menet, M.C., Dugay, A., Regazzetti, A., Dauzonne, D., Auzeil, N., Scherman, D., Chabot, G.G., 2007. Characterization of monohydroxylated derivatives of the anticancer agent flavones-8-acetic acid by liquid chromatography with on-line UV and mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21, 3373-3386.

[4.10] Guechot, C., Bertrand, A., Cramaille, P., Teulon, J.M., 1988. Analytical profile of the new diuretic beta-blocking agent tienoxolol hydrochloride. *Arzneimittel-Forschung* 38, 655-660.

[4.11] Isarain, E., Rodriguez, R.M., Cabot, P.L., Centellas, F., Arias, C., Garrido, J.A., Brillas, E., 2011. Degradation of pharmaceutical beta-blockers by electrochemical advanced oxidation processes using a flow plant with a solar compound parabolic collector. *Water Res.* 45, 4119-4130.

[4.12] Hubert-Roux, M., Skiba, M., Sugh, A., Lahiani-Skiba, M., Olivier-Chanu, F., Levacher, V., Lange, C.M., 2012. Identification of tiagabine degradation products using liquid chromatography with electrospray ionization multistage mass spectrometry : identification of tiagabine degradation products. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26, 287-296.

## Chapitre 5.

### **Evaluation de la stabilité physique des polymorphes au moyen des diagrammes topologiques pression-température : Cas du bicalutamide.**

CHAPITRE 5. EVALUATION DE LA STABILITE PHYSIQUE DES POLYMORPHES AU MOYEN DES DIAGRAMMES TOPOLOGIQUES PRESSION-TEMPERATURE :

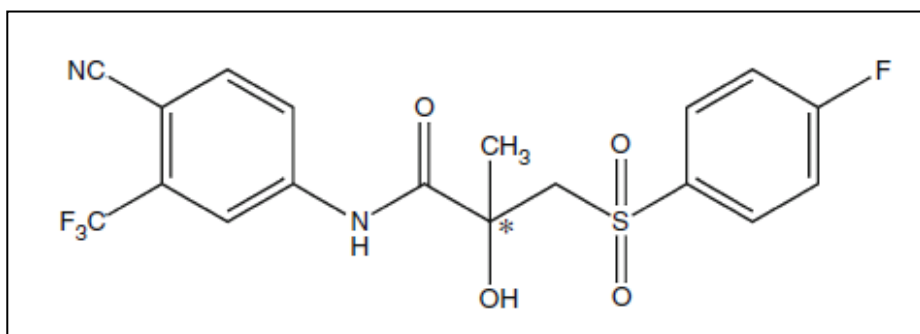
CAS DUBICALUTAMIDE.....	112
5.1. Introduction .....	113
5.2. Données de la littérature.....	113
5.3. Analyse des données de la littérature .....	115
5.4. Construction topologique du diagramme de phases P-T du bicalutamide .....	116
5.4.1. Positionnement des points de fusion .....	116
5.4.2. Calcul de la température de transition I-II.....	117
5.4.3. Tracé des courbes de fusion .....	118
5.4.3.1. Courbe de fusion de la forme I .....	119
5.4.3.2. Courbe de fusion de la forme II.....	119
5.4.3.3. Intersection des deux courbes de fusion I-L et II-L.....	120
5.4.4. Détermination de la courbe d'équilibre solide-solide .....	121
5.4.5. Localisation du point triple I-II-Vap .....	122
5.5. Hiérarchie et domaine de stabilité des deux polymorphes .....	124
5.6. Conclusions .....	125
REFERECES .....	127

## 5.1. Introduction

Dans ce chapitre, le cas du bicalutamide sera présenté comme exemple d'application de l'approche topologique utilisée pour construire un diagramme pression-température (P-T) comme décrit dans la section 2.3.6., à partir de données disponibles dans la littérature.

Le bicalutamide est une substance active qui possède une activité anti-androgénique par blocage des récepteurs d'androgène [5.1, 5.2]. Administré par voie orale, il est utilisé dans le traitement des cancers de prostate [5.3, 5.4] et dans l'hirsutisme [5.5]. Il était essentiellement indiqué dans les stades avancés du cancer de prostate en combinaison avec une castration chirurgicale ou médicale. A partir des années 95, il a plutôt été utilisé en monothérapie dans les stades précoces.

De nom chimique N-[4-cyano-3-(trifluorométhyl)phényl]-3-[(4-fluorophényl)sulfonyl]-2-hydroxy-2-méthylpropanamide (Figure 5-1) et de formule  $C_{18}H_{14}F_4N_2O_4S$ , le bicalutamide présente une masse molaire de  $430,37 \text{ g mol}^{-1}$ .



**Figure 5-1. Formule chimique développée du bicalutamide**

Le carbone asymétrique est marqué par une étoile.

## 5.2. Données de la littérature

A ce jour, deux polymorphes du bicalutamide ont été identifiés et leurs structures cristallines ont été résolues à température ambiante (298 K) à partir de monocristaux [5.6, 5.7] et à partir de poudres cristallines [5.8]. Des données calorimétriques ont conduit à la conclusion que la forme monoclinique I et la forme triclinique II présentent une relation monotrope (Section 2.3.1.) et que la forme I est la forme la plus stable [5.6]. Des données de tension de vapeur de la forme I ont été publiées dans la littérature dans l'intervalle de température compris entre 376 et 421 K. En utilisant l'équation 2.3.19, la pression de sublimation de la forme I,  $P_I$ , est exprimée selon la formule suivante :

$$\ln(P_I/\text{Pa}) = 33,138 - 14088/(T/\text{K}) \quad \text{Eq. 5.1}$$

Dans cette expression, dans laquelle R est la constante de gaz parfait et T la température en kelvin, l'enthalpie de sublimation,  $\Delta_{I \rightarrow \text{vap}}H$  (vap = vapeur), égale à 117,1 kJ mol<sup>-1</sup> et la constante,  $B_{I \rightarrow \text{vap}} = 33,138$ , ont été déterminés par Persson et al. [5.9].

Classiquement, une variation infinitésimale de l'énergie de Gibbs est exprimée par la relation  $dG = -SdT + VdP$ , dans laquelle  $-SdT+VdP$  correspondent respectivement à des variations des contenus de chaleur et de travail du système lors des changements de phases. Les données relatives à la chaleur peuvent être obtenues par des mesures calorimétriques grâce à l'analyse calorimétrique différentielle (Differential Scanning Calorimetry, DSC). Concernant les données liées au travail, les volumes des différentes phases peuvent être obtenus par diffraction de rayons X. Les données cristallographiques et calorimétriques disponibles dans la littérature concernant les deux polymorphes de bicalutamide sont résumées dans le tableau 5-I. Les paramètres de maille des polymorphes étudiés sont donnés dans le tableau 5-II [5.8].

**Tableau 5-I : Données calorimétriques et cristallographiques disponibles dans la littérature pour les polymorphes I et II du bicalutamide**

$\nu_I/\text{cm}^3\text{g}^{-1}$	$\nu_{II}/\text{cm}^3\text{g}^{-1}$	ref	$T_{\text{fus,I}}/\text{K}$	$\Delta_{\text{fus}h_I}/\text{Jg}^{-1}$	$T_{\text{fus,II}}/\text{K}$	$\Delta_{\text{fus}h_{II}}/\text{J g}^{-1}$	ref
0,65157 <sup>a</sup>	0,65318 <sup>a</sup>	[5.6]	465	111	462	100	[5.6]
0,64342 <sup>a</sup>	-	[5.7]	466,34	112,3	463,79	99,8	[5.10]
0,64635 <sup>a</sup>	0,64702 <sup>a</sup>	[5.8]	(469) <sup>b</sup>	(125) <sup>b</sup>	(466,65) <sup>b</sup>		[5.11]
			465,5	115			[5.9]
0,6490 <sup>c</sup>	0,6501 <sup>c</sup>	<b>Moyenne</b>	465,6 <sup>c</sup>	112,8 <sup>c</sup>	462,9 <sup>c</sup>	99,9 <sup>c</sup>	<b>Moyenne</b>

<sup>a</sup> volumes spécifiques à température ambiante (298 K)

<sup>b</sup> données exclues du calcul, leurs valeurs sont considérées comme erronées

<sup>c</sup> moyennes, voir le texte pour le calcul

**Tableau 5-II : Paramètres de maille des polymorphes I et II du bicalutamide disponibles dans la littérature [5.8]**

Polymorphe étudié	Forme I	Forme II
Groupe d'espace	P2 <sub>1</sub> /c	P-1
a /Å	14,9064(4)	7,7875(3)
b /Å	12,2234(3)	11,0355(4)
c /Å	10,4876(3)	11,2888(5)
$\alpha$ /°		87,963(3)
$\beta$ /°	104,7790(14)	77,050(3)
$\gamma$ /°		78,012(6)
V <sub>élé</sub> m /Å <sup>3</sup>	1847,7(7)	924,8(8)

V<sub>élé</sub>m : volume de la maille élémentaire,

Les chiffres entre parenthèses représentent les incertitudes.

A l'aide de l'approche topologique, le diagramme de phases P-T du dimorphisme cristallin du bicalutamide a pu être construit à partir des données calorimétriques et volumétriques représentées dans le tableau 5-I.

### 5.3. Analyse des données de la littérature

A partir des données de la littérature, et en excluant les données trouvées dans l'étude de Andrews et al., qui présentent des valeurs considérées comme erronées [5.11], les valeurs moyennes des températures et des enthalpies de fusion ont été trouvées égales à :  $T_{I \rightarrow L} = 465,6$  K (L = liquide),  $\Delta_{I \rightarrow L}h = 112,8$  Jg<sup>-1</sup>,  $T_{II \rightarrow L} = 462,9$  K et  $\Delta_{II \rightarrow L}h = 99,9$  Jg<sup>-1</sup>. Ces résultats montrent que la forme I fond à une température plus élevée (Différence de température entre les deux formes :  $\Delta T \approx 3$  K) que la forme II. Quant aux enthalpies de fusion, on note que celle de la forme I,  $\Delta_{I \rightarrow L}h$ , est supérieure à celle de la forme II,  $\Delta_{II \rightarrow L}h$ . La transition de phases de la forme I vers la forme II (I→II) s'accompagne d'une variation d'enthalpie qui peut être calculée en négligeant la différence de capacité calorifique entre les deux solides:  $\Delta_{I \rightarrow II}h = \Delta_{I \rightarrow L}h - \Delta_{II \rightarrow L}h = + 12,9$  J g<sup>-1</sup>; la transition de la phase I vers la phase II est donc endothermique.

La transition I→II étant endothermique, et la forme I présentant le point de fusion le plus élevé, l'application du principe de Le Chatelier (Section 2.3.1.) permet d'identifier un cas de



monotropie dans le domaine des basses pressions car le point de transition entre I et II est, dans ce cas, nécessairement situé à une température supérieure aux températures de fusion des deux formes.

Concernant les données cristallographiques, seules les valeurs des volumes spécifiques de Vega et al. [5.6] et celles de Inui et Ueda [5.8] ont été utilisées pour le calcul des moyennes des volumes spécifiques car chacune de ces deux études a utilisé le même équipement de diffraction des rayons X. Selon ces deux études, les volumes spécifiques des deux polymorphes à température ambiante sont presque égaux. C'est pourquoi, d'après le principe de Le Chatelier, on peut déduire que la pression n'aura qu'une faible influence sur la transition I-II.

Ces données permettent d'évaluer la variation de volume  $\Delta v$  qui accompagne la transition solide-solide et qui est nécessaire au calcul de la pente  $dP/dT$  de la courbe d'équilibre correspondante grâce à l'équation de Clapeyron (Eq. 2.3.3).

#### **5.4. Construction topologique du diagramme de phases P-T du bicalutamide**

Le bicalutamide constitue un exemple de cas de dimorphisme cristallin pour lequel le diagramme de phases P-T a été construit exclusivement à partir des données disponibles dans la littérature en appliquant la démarche topologique. Cette démarche généralisée se déroule en plusieurs étapes qui seront expliquées au moyen de deux cas, le bicalutamide et le finastéride. Pour le bicalutamide, les étapes de construction topologique du diagramme de phases sont détaillées ci-dessous.

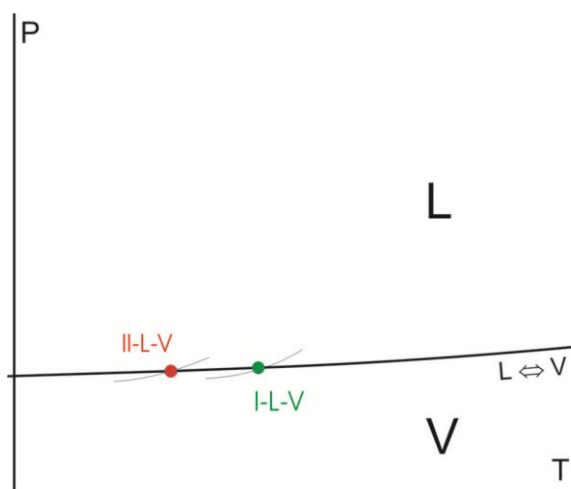
##### **5.4.1. Positionnement des points de fusion**

D'après les données calorimétriques disponibles, les points de fusion des deux formes solides I et II peuvent être placés dans le diagramme de phase P-T (Figure 5-2).

Comme expliqué dans la section 2.3.6., dans les conditions opératoires de la DSC, les points de fusion observés pour les solides I et II du bicalutamide correspondent aux points triples I-L-Vap et II-L-Vap. Ces derniers sont donc placés sur la courbe d'équilibre L-Vap dans le diagramme de phases P-T, comme le montre la figure 5-2.

Par ailleurs, les phases solides ont leurs propres équilibres avec la phase vapeur. Ces équilibres de sublimation sont indiqués, sur la figure 5-2, par les deux lignes qui coupent

l'équilibre liquide-vapeur aux points triples respectifs. Ces équilibres seront discutés plus tard à partir de la section 5.4.2.



**Figure 5-2. Positionnement des points de fusion, assimilés à des points triples, sur la courbe représentant l'équilibre liquide-vapeur (L-V)**

La vapeur est indiquée par le symbole V dans la figure.

#### 5.4.2. Calcul de la température de transition I-II

En utilisant l'équation 2.3.4, on trouve une température de transition de la phase I vers la phase II ( $T_{I \rightarrow II}$ ) de 487,9 K, environ 22 K au-dessus de la température de fusion de la forme stable I. Comme expliqué dans la section 2.3.7., on peut aussi calculer la température de cette transition solide-solide en utilisant les courbes de tension de vapeur des phases condensées (courbes de sublimation). L'avantage de cette dernière méthode est qu'on obtient aussi les tensions de vapeur des deux solides à leurs températures de fusion. Autrement dit, on obtient la valeur de la coordonnée "pression" de chaque point triple. De plus, on montrera que les températures de fusion obtenues par chacune des deux méthodes sont exactement égales.

Les données de la sublimation publiées dans la littérature [5.9] seront utilisées pour cet objectif. L'enthalpie de vaporisation,  $\Delta_{L \rightarrow \text{vap}}H$ , peut être calculée grâce au cycle de Hess «solide I–liquide–vapeur–solide I» (Figure 5-3). Selon ce cycle,  $\Delta_{I \rightarrow L}H + \Delta_{L \rightarrow \text{vap}}H - \Delta_{I \rightarrow \text{vap}}H = 48,5 + \Delta_{L \rightarrow \text{vap}}H - 117,1$  d'où  $\Delta_{L \rightarrow \text{vap}}H = 68,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ .

En se basant sur l'équation 2.3.19, l'équilibre correspondant à la pression de vapeur,  $P_{\text{vap}}$ , est donné par :

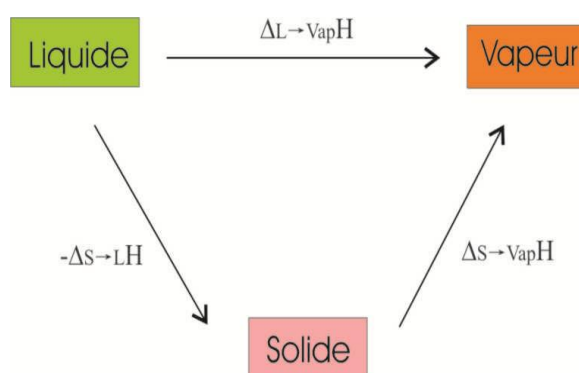
$$\ln(P_{\text{vap}}/\text{Pa}) = B_{\text{vap}} - \Delta_{\text{vap}}H / RT \quad \text{Eq. 5.2}$$

$B_{\text{vap}}$  (=20,60) est trouvé à partir de  $\ln(P_I)$  qui est égal à  $\ln(P_{\text{vap}})$  à  $T_{I \rightarrow L}$ , la température du point triple I-L-Vap.

La courbe de sublimation de la forme II est donnée par :

$$\ln(P_{II}/\text{Pa}) = B_{II \rightarrow \text{Vap}} - \Delta_{II \rightarrow \text{Vap}}H / RT \quad \text{Eq. 5.3}$$

L'enthalpie de sublimation de la forme II est obtenue par le cycle « vapeur-solide II-liquide-vapeur » (Figure 5-3). Elle est égale à :  $\Delta_{II \rightarrow \text{Vap}}H = \Delta_{II \rightarrow L}H + \Delta_{\text{vap}}H = 43,0 + 68,6 = 111,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ .  $B_{II \rightarrow \text{Vap}}$  (= 31,77) est trouvée à partir de  $\ln(P_{\text{vap}})$ , qui est égale à  $\ln(P_{II})$  à  $T_{II \rightarrow L}$ , la température du point triple II-L-Vap.



**Figure 5-3. Cycle thermodynamique (cycle de Hess) «vapeur-solide-liquide» autour d'un point triple Solide-Liquide-Vapeur**

Sachant qu'au point triple I-II-Vap, les tensions de vapeur des formes I et II doivent être égales, et donc respecter l'égalité  $\ln(P_{II}) = \ln(P_I)$ , la température du point triple qui s'en déduit est égale à 487,9 K, strictement identique à la valeur obtenue par l'équation de Yu. A cette température, une pression de vapeur saturante de 71 Pa est alors obtenue en utilisant l'équation 5.1, décrivant les valeurs expérimentales de la tension de vapeur saturante de la forme I.

Ainsi, les calculs conduisent à une valeur de la température de transition I-II supérieure à celle des points de fusion, ce qui impose de placer le point triple I-II-Vap dans la région où le liquide est la forme stable. C'est pourquoi, la relation thermodynamique entre les deux polymorphes du bicalutamide sous pression ordinaire est monotrope.

### 5.4.3. Tracé des courbes de fusion

Dans le cas d'un dimorphisme, les courbes de fusion sont au nombre de deux : I-L et II-L. Chaque courbe, qui peut être représentée par une droite, passe par le point de fusion du

polymorphe considéré, qui est approximativement égal au point triple S-L-Vap. Suivant les valeurs des pentes  $dP/dT$  des droites I-L et II-L, ces dernières peuvent se croiser soit dans le domaine des pressions négatives, soit dans le domaine des hautes pressions. Les valeurs des pentes peuvent être directement données par des essais de calorimétrie sous pression, ou à défaut, et pour le cas présent, elles peuvent être calculées à partir de l'équation de Clapeyron (Eq. 2.3.3) en utilisant les données calorimétriques et celles de diffractions des rayons X en fonction de la température.

#### 5.4.3.1. Courbe de fusion de la forme I

Selon les données de la littérature, la forme I du bicalutamide présente un volume spécifique égal à  $0,6490 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  à température ambiante. Partant de cette valeur, et en supposant qu'elle a augmenté de 2% (Section 2.3.4.) lorsque la température de fusion est atteinte, le volume spécifique de la phase solide I,  $v_I$ , à sa température de fusion, devient  $0,6490 \times 1,02 = 0,6619 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ . De plus, en estimant que le volume spécifique de la phase liquide,  $v_L$ , est supérieur de 12 % (Section 2.3.4.) à celui du solide au point de fusion  $T_{I \rightarrow L}$ , on trouve :  $v_L = 0,7268 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ . La différence entre les volumes spécifiques des phases solide et liquide à la température de fusion vaut donc :  $\Delta v = v_L - v_I = 0,7268 - 0,6619 = 0,0649 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ . En appliquant l'équation de Clapeyron (Eq. 2.3.3) et en utilisant les données du tableau 5-I, la pente  $dP/dT_{I-L}$  de l'équilibre solide I-L est trouvée égale à  $112,8 / (465,6 \times 0,0645) = 3,732 \text{ MPa K}^{-1}$ .

#### 5.4.3.2. Courbe de fusion de la forme II

Un calcul similaire peut être effectué pour l'équilibre solide II-L à partir du volume spécifique de la forme II à température ambiante qui est égal à  $0,6501 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ . Le volume spécifique de la forme II,  $v_{II}$ , à son point de fusion,  $T_{\text{fus,II}}$ , est estimé à  $0,6501 \times 1,02 = 0,6631 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  (Section 2.3.4.). Le volume spécifique du liquide,  $v_L$ , à  $T_{\text{fus,II}}$ , peut être considéré comme étant égal à celui à  $T_{\text{fus,I}}$ , puisque la différence entre les deux points de fusion n'est que d'environ 3 K.  $v_L$  est alors égal à  $0,7268 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ . La différence entre les volumes spécifiques de la forme II et liquide à la température de fusion,  $T_{\text{fus,II}}$ , est alors obtenue selon :  $\Delta v = v_L - v_{II} = 0,7268 - 0,6631 = 0,0637 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ . Ainsi, la pente de l'équilibre II-L peut être calculée :  $dP/dT_{II-L} = 99,9 / (462,9 \times 0,0637) = 3,388 \text{ MPa K}^{-1}$ .

Ces résultats montrent que la pente de l'équilibre I-L est plus grande que celle de l'équilibre II-L. Par conséquent, les courbes décrivant ces deux équilibres doivent se croiser quand P augmente (Figure 5-4).

#### 5.4.3.3. Intersection des deux courbes de fusion I-L et II-L

L'hypothèse selon laquelle les courbes de fusion sont des lignes droites est soutenue par le fait que les courbes d'équilibre à deux phases sont des fonctions monotones [5.12, 5.13]. Par conséquent, elles ne peuvent se croiser qu'une seule fois. Les deux équations représentatives de ces droites peuvent être obtenues en utilisant les valeurs des températures de fusion (Tableau 5-I) et celles des pentes obtenues par l'équation de Clapeyron.

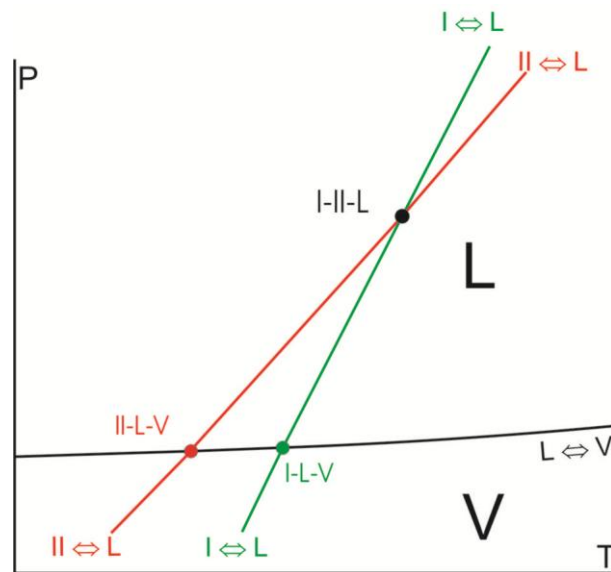
Par ailleurs, la tension de vapeur de la phase I, calculée avec l'équation 5.1, est de 18 Pa à sa température de fusion. Pour déterminer la tension de vapeur de la phase II à sa température de fusion, on utilise l'équation 5.3 qui conduit à la valeur de 16 Pa. Ainsi sont déterminées les coordonnées P-T des points triples de fusion des solides I et II. On note que les valeurs de pression de vapeur ainsi déterminées sont très faibles. Et c'est pourquoi le fait de les considérer comme nulles ne modifiera guère les expressions des pressions de fusion des équilibres I-L et II-L en fonction de la température :

$$\text{I-L : } P(\text{MPa}) = 3,732 \times T(\text{K}) - 1,738 \text{ (MPa)} \quad \text{Eq. 5.4}$$

$$\text{II-L : } P(\text{MPa}) = 3,388 \times T(\text{K}) - 1,569 \text{ (MPa)} \quad \text{Eq. 5.5}$$

D'une façon générale, pour une construction topologique du diagramme de phases, la pression peut être prise égale à 0 MPa étant donné que les tensions de vapeur des phases solides sont très faibles.

L'égalisation des deux équations 5.4 et 5.5 conduit aux coordonnées du point d'intersection des deux courbes de fusion, c'est-à-dire à celle du point triple I-II-L :  $T = 492 \text{ K}$  et  $P = 99 \text{ MPa}$  (Figure 5-3).



**Figure 5-4. Positionnement des courbes des équilibres solide-liquide dans le diagramme P-T et leur intersection (point triple) à haute pression**

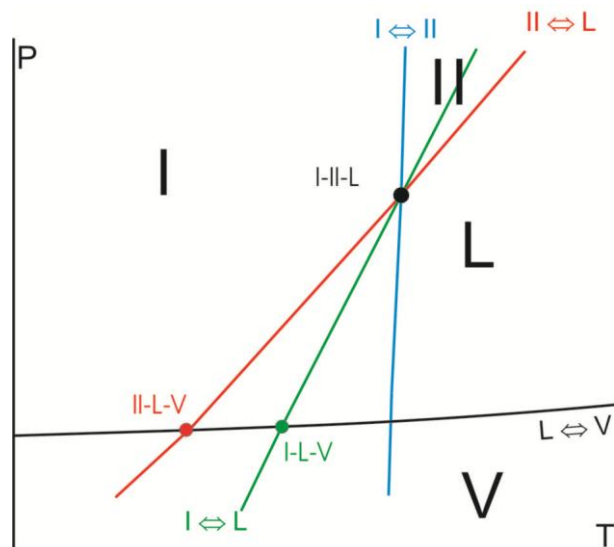
#### 5.4.4. Détermination de la courbe d'équilibre solide-solide

D'une part, le point triple I-II-L est nécessairement l'intersection des trois équilibres diphasés, I-L, II-L et I-II. La courbe correspondant à l'équilibre I-II doit alors passer ce point triple.

D'autre part, la pente de la droite décrivant cet équilibre peut être calculée en utilisant l'équation de Clapeyron (Eq. 2.3.3). L'enthalpie de transition I→II,  $\Delta_{I \rightarrow II}h$ , déjà déterminée dans la section 5.3., a été trouvée égale à  $+12,9 \text{ J g}^{-1}$ . La différence de volume spécifique,  $v_{II} - v_I$ , estimée constante, vaut  $0,6631 - 0,6619 = 0,0012 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ . Ceci conduit à la pente suivante :  $dP/dT_{I-II} = 12,9 / (492 \times 0,0012) = +22,5 \text{ MPa K}^{-1}$ .

La ligne décrivant l'équilibre entre les phases I et II peut alors être tracée en utilisant cette valeur de sa pente et les coordonnées du point triple I-II-L par lequel elle passe (Figure 5-5). Ceci conduit à l'expression suivante :

$$\text{I-II : } P(\text{MPa}) = 22,5 \times T(\text{K}) - 10,996 (\text{MPa}) \quad \text{Eq. 5.6}$$

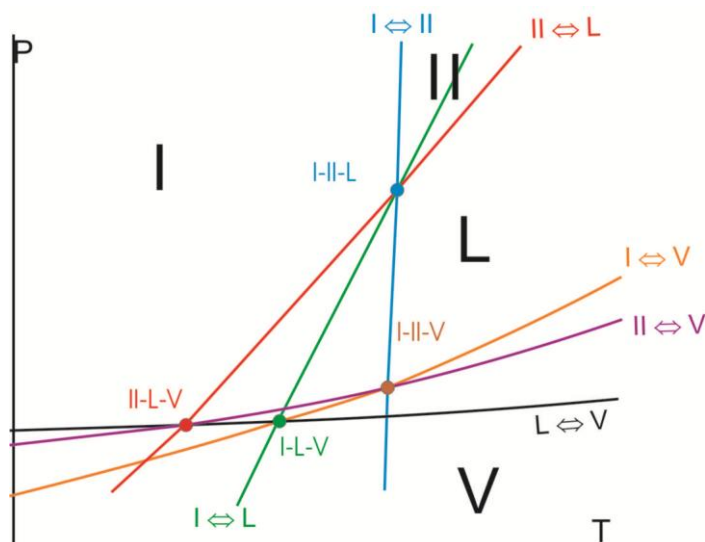


**Figure 5-5. Placement de l'équilibre solide-solide I-II**

#### 5.4.5. Localisation du point triple I-II-Vap

La transition entre les phases I et II sous conditions ordinaires de température et de pression se produit en présence de la phase vapeur. Autrement dit, elle correspond au point triple I-II-Vap qui est défini en calculant les coordonnées de l'intersection de la courbe expérimentale de sublimation de la phase I et la courbe de l'équilibre entre les deux solides (Equations 5.1 et 5.6). Le calcul est rendu complexe par le fait que, dans l'expression de la pression de sublimation, la température figure en exposant. Cependant, parce que la pente dans l'équation 5.6 est très grande et parce que la pression de vapeur de la phase I est très faible, la température peut être trouvée en supposant que la tension de vapeur prend la valeur 0. En évitant ainsi d'utiliser l'équation 5.1, on trouve une température de transition de 487,8 K pour le point triple I-II-V. La tension de vapeur, calculée en utilisant les données expérimentales (Equation 5.1), vaut 71 Pa à cette température. De plus, on note que la valeur 487,8 K est presque la même que celle (487,9K) trouvée selon l'approche appliquée dans la section 5.4.2.

Les coordonnées ainsi calculées du point triple I-II-Vap, le dernier à placer dans le diagramme pression-température, permettent de compléter ce diagramme P-T du bicalutamide, ainsi que le montre la figure 5-6.



**Figure 5-6. Localisation du point triple I-II-V dans le diagramme P-T du bicalutamide**

Dans cette figure, les courbes I-L et II-L représentent respectivement les courbes de fusions des deux formes I et II du bicalutamide. La courbe I-II représente la transition entre ces deux formes. Les courbes I-V et II-V correspondent respectivement aux courbes de sublimation des deux formes I et II et la courbe L-V correspond à la vaporisation. Tous ces équilibres engendrent quatre points triples : I-L-V, II-L-V, I-II-L et I-II-V (V pour la phase vapeur et L pour la phase liquide).

Un résumé des valeurs utilisées pour cette approche topologique du diagramme P-T du bicalutamide est présenté dans le tableau 5-III.

**Tableau 5-III : Variables utilisées pour l'approche topologique conduisant à la construction du diagramme de phases du bicalutamide**

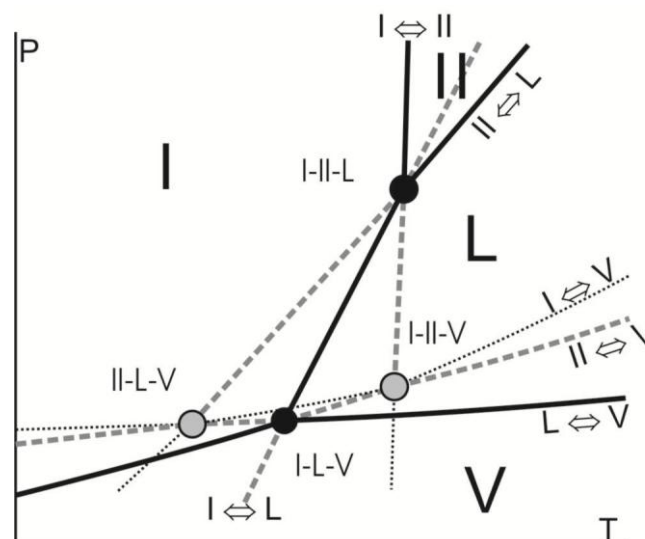
Transition	$T_{\text{trans}}$ /K	$P_{\text{trans}}$ /Pa	$\Delta_{\text{trans}}h$ /J g <sup>-1</sup>	$\Delta v_{\text{trans}}$ /cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup>	$dP/dT_{\text{trans}}$ /MPa K <sup>-1</sup>
I-L	465,6 <sup>a</sup>	18 <sup>b</sup>	112,8 <sup>a</sup>	0,0649 <sup>d</sup>	3,732 <sup>d</sup>
II-L	462,9 <sup>a</sup>	16 <sup>c</sup>	99,9 <sup>a</sup>	0,0637 <sup>e</sup>	3,386 <sup>e</sup>
I-II	487,8 <sup>f</sup>	71 <sup>f</sup>	12,9 <sup>h</sup>	0,0012 <sup>f</sup>	22,5 <sup>f</sup>
I-II-L	492 <sup>g</sup>	$99 \times 10^{6g}$			

<sup>a</sup> Données extraites du tableau 5-I, <sup>b</sup>Equation 5.1, <sup>c</sup> Equation 5.3, <sup>d</sup> Section 5.4.3.1., <sup>e</sup> Section 5.4.3.2., <sup>f</sup> Section 5.4.5., <sup>g</sup> Section 5.4.3.3., <sup>h</sup> Section 5.3.



### 5.5. Hiérarchie et domaine de stabilité des deux polymorphes

La dernière étape de la construction consiste à inférer la stabilité relative des courbes d'équilibre autour des points triples par application de la règle d'alternance de Gibbs-Tammann (Section 2.3.). Pour le cas du bicalutamide, le point triple I-L-Vap est stable par rapport au point triple II-L-Vap car la phase I possède la température de fusion la plus élevée. A partir du point triple stable I-L-Vap, la règle d'alternance stipule que l'équilibre I-L, stable entre I-L-Vap et I-II-L, devient métastable au-delà du point triple stable I-II-L à haute pression. L'équilibre II-L, métastable entre II-L-Vap et I-II-L, devient stable au-delà de I-II-L à haute pression. En appliquant les mêmes règles d'alternance autour de tous les points triples, le diagramme complet P-T du bicalutamide est construit, ainsi que le montre la figure 5-7, en tenant compte de la hiérarchie de stabilité des différents équilibres.



**Figure 5-7. Diagramme topologique présentant les relations thermodynamiques de phases du bicalutamide**

La forme II est stable dans la partie supérieure du diagramme à pression et température élevées. Les lignes solides indiquent des équilibres stables, les lignes discontinues en tirets gris indiquent des équilibres métastables, les lignes en pointillés indiquent des équilibres supermétastables, les cercles noirs indiquent les points triples stables, et les cercles gris indiquent les points triples métastables.

Les résultats montrent que les courbes correspondant aux équilibres I-L et II-L se croisent à pression élevée ; ce qui permet d'écarter le cas d'une monotropie généralisée. Ce diagramme du bicalutamide (Figure 5-7) correspond donc au cas d'un comportement monotrope qui devient énantiotrope à haute pression (Figure 2-3-1d).

La courbe de l'équilibre I-II (Figures 5-5 et 5-7) passe à travers le point triple I-II-L et le point triple I-II-Vap, ce dernier étant le point d'intersection des courbes de sublimation I-Vap et II-Vap (Figure 5-6). Les températures des points triples I-II-L et I-II-Vap sont différents de seulement 4 K environ et la courbe I-II est presque verticale. Cela signifie que la pression a peu d'influence sur la transition I-II. En effet, l'équilibre solide-solide présente une pente positive ( $dP/dT$ ) et en même temps présente une température de transition plus élevée que le point de fusion stable à pression ordinaire. Néanmoins, la forme II est stable à haute pression au-dessus d'un domaine de stabilité du liquide. Cette situation est relativement rare dans la mesure où elle est habituellement associée à un équilibre I-II dont la droite représentative possède une pente négative. Le cas du bicalutamide apparaît donc comme une « exception ».

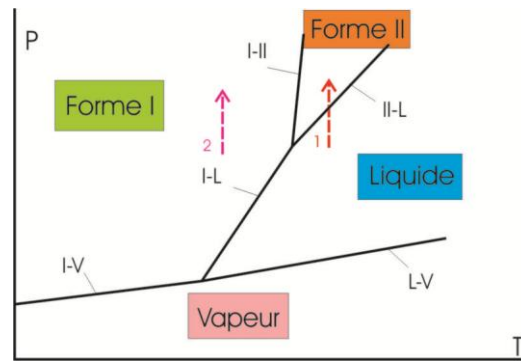
## 5.6. Conclusions

Cette étude montre clairement que les polymorphes du bicalutamide sont dans une relation thermodynamique monotrope à basse pression. Cette relation devient énantiotrope à haute pression. Le diagramme de phases (Figure 5-7), qui comporte une région stable pour la forme II à haute pression, correspond au quatrième cas de Bakhuis-Roozeboom reproduit dans la partie théorique (Figure 2-3-1d). On voit ici que la méthode topologique permet de différencier un tel cas du troisième cas de Bakhuis-Roozeboom (Figure 2-3-1c) dans lequel seule la forme I présente un domaine pression-température de stabilité thermodynamique ; le dimorphisme de biclotymol en est un exemple [5.14].

Les deux méthodes appliquées pour le calcul de la température de transition I-II conduisent à des résultats identiques. Ceci constitue un autre argument en faveur de la faible influence de la pression sur la transition solide-solide dans le cas du dimorphisme du bicalutamide. De plus, les pressions de vapeur calculées pour les points de transition à pression ordinaire montrent des valeurs très faibles (16 Pa à  $T_{II \rightarrow L}$ , 18 Pa à  $T_{I \rightarrow L}$ , et 71 Pa à  $T_{I \rightarrow II}$ ), indiquant ainsi que la pression de vapeur ne change pas de façon significative dans l'intervalle de température concerné. Dans ce cas, l'influence de la pression pourrait être ignorée dans l'établissement de la hiérarchie de stabilité des polymorphes. Néanmoins, la méthode topologique, en tenant en compte la pression, présente l'intérêt de donner une image complète des relations entre les phases du système considéré.

Dans le contexte industriel, ces résultats permettent de recommander le développement de la forme I. En effet, dans le cas où la compression est une étape dans le processus de fabrication, il est intéressant de noter qu'en comprimant la substance fondue à température

constante, la forme II peut apparaître (Figure 5-8, flèche 1). Ceci ne risque pas de se produire si on comprime la forme I qui est la seule forme stable à pression ordinaire (Figure 5-8, flèche 2). On voit de surcroît que cette forme restera, aux températures inférieures à sa température de fusion, la forme stable quelle que soit la pression (Figure 5-8).



**Figure 5-8. Domaines de stabilité des différentes phases du bicalutamide et illustration schématique de l'influence de la pression sur son dimorphisme**

La flèche 1 montre que la phase II peut être obtenue par compression du liquide. La flèche 2 montre que la phase I reste stable sous pressions croissantes tant que la température est inférieure à sa température de fusion. (Les symboles L et V désignent respectivement le liquide et la vapeur).

**REFERENCES**

- [5.1] Mainwaring, W.I.P., Furr, B.J.A., Freeman, S.N., 1981. Studies on a novel anti-androgen- ICI 176334. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 23, 1244.
- [5.2] Furr, B.J.A., Calcaccia, B., Curry, B., Woodburn, J.R., Chesterson G., Tucker, H., 1987. ICI-176,334-a novel nonsteroidal, peripherally selective antiandrogen. *J. Endocrinol.* 113, R7-9.
- [5.3] Schellhammer, P.F., 2002. An evaluation of bicalutamide in the treatment of prostate cancer. *Expert Opin. Pharmacother.* 3 (9), 1313-1328.
- [5.4] Fradet, Y., James, N., Maher, J., 2004. Bicalutamide (Casodex) in the treatment of prostate cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 4 (1), 37-48.
- [5.5] Müderris, I.I., Bayram, F., Özçelik, B., Güven, M., 2002. New alternative treatment in hirsutism: bicalutamide 25 mg/day. *Gynecol. Endocrinol.* 16 (1), 63-66.
- [5.6] Vega, D.R., Polla, G., Martinez, A., Mendioroz, E., Reinoso, M., 2007. Conformational polymorphism in bicalutamide. *Int. J. Pharm.* 328, 112-118.
- [5.7] Hu, X.R., Gu, J.M., 2005. N-[4-cyan-3(trifluoromethyl)phenyl]-3-(4-fluorophenylsulfonyl)-2-hydroxy-2-methylpropionamide. *Acta Crystallogr. Sect E, Struct. Rep. Online* 61, o3897-8.
- [5.8] Inui, M., Ueda, M., 2008. Structure determination of bicalutamide polymorphic forms by powder X-ray diffraction: case studies using density functional theory calculations and Rietveld refinement. *Sumitomo Kagaku* 2008, 39-47.
- [5.9] Persson, R., Nordholm, S., Perlovich, G., Lindfors, L., 2011. Monte Carlo studies of drug nucleation 1: formation of crystalline clusters of bicalutamide in water. *J. Phys. Chem. B* 115, 3062-72.
- [5.10] Nemet, Z., Sztatisz, J., Demeter, A., 2008. Polymorph transitions of bicalutamide: a remarkable example of mechanical activation. *J. Pharm. Sci.* 97, 3222-32.
- [5.11] Andrews, G.P., Abudiak, O.A., Jones, D.S., 2010. Physicochemical characterization of hot melt extruded bicalutamide-polyvinylpyrrolidone solid dispersions. *J. Pharm. Sci.* 99, 1322-35.

[5.12] Bridgman, P., W., 1970. *The Physics of High Pressure*. Dover. New York.

[5.13] Oonk, H., A., J., 1981. *Phase Theory. The Thermodynamics of Heterogeneous equilibria*. Elsevier. Amsterdam.

[5.14] Ceolin, R., Tamarit, J.L., Barrio, M., Lopez, D.O., Nicolai, B., Veglio, N., Perrin, M.A., Espeau, P., 2008. Overall monotropic behavior of metastable phase of bicalotymol, 2,2'-methylenebis(4-chloro-3-methyl-isopropylphenol), inferred from experimental and topological construction of the related P-T state diagram. *J. Pharm. Sci.* 97, 3927-41.

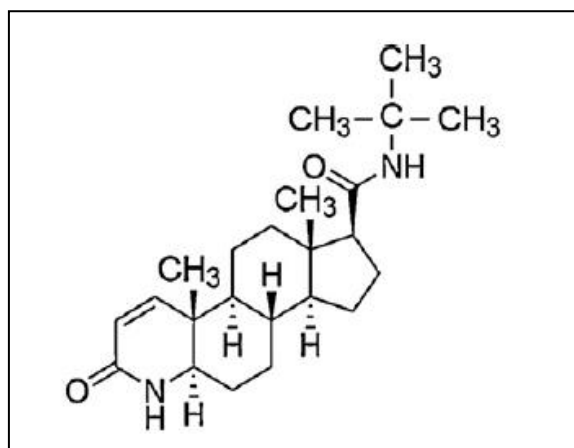
## Chapitre 6.

### **Evaluation de la stabilité physique des polymorphes au moyen des diagrammes topologiques pression-température : Cas du finastéride.**

CHAPITRE 6. EVALUATION DE LA STABILITE PHYSIQUE DES POLYMORPHES AU MOYEN DES DIAGRAMMES TOPOLOGIQUES PRESSION-TEMPERATURE : CAS DU FINASTERIDE .....	129
6.1. Introduction .....	130
6.2. Données de la littérature.....	130
6.3. Analyse des données de la littérature .....	133
6.4. Construction topologique du diagramme P-T du finastéride .....	134
6.4.1. Position de l'équilibre entre les deux formes solides .....	134
6.4.2. Coordonnées des points triples II-L-Vap, I-II-Vap et I-L-Vap .....	135
6.4.2.1. Points triples II-L-Vap et I-II-Vap.....	135
6.4.2.2. Point triple I-L-Vap .....	135
6.4.3. Pentes des équilibres diphasés.....	137
6.4.3.1. Pente de l'équilibre entre les phases solides I et II.....	137
6.4.3.2. Pentes des équilibres de fusion I-L et II-L .....	138
6.4.4. Coordonnées du point triple I-II-L .....	141
6.4.5. Diagramme topologique complet incluant la phase vapeur .....	142
6.5. Conclusions .....	143
REFERECES .....	144

## 6.1. Introduction

De nom chimique N-(1,1-diméthyléthyl)-3-oxo-4-aza-5- $\alpha$ -androst-1-ène-17- $\beta$ -carboxamide, de formule chimique brute  $C_{23}H_{36}N_2O_2$  et de masse molaire de  $372,55 \text{ g mol}^{-1}$ , le finastéride est un dérivé stéroïdien (Figure 6-1).



**Figure 6-1. Formule chimique développée du finastéride**

Inhibiteur  $5\alpha$ -réductase II, le finastéride est une substance active possédant une activité anti-androgénique [6.1, 6.2]. Administré par voie orale, il est utilisé en clinique dans le traitement de l'hypertrophie bénigne de la prostate, le cancer de la prostate, l'hirsutisme et la calvitie [6.3]. Deux polymorphes du finastéride ont été observés et caractérisés [6.4, 6.5]. D'après les résultats de l'analyse thermique différentielle à balayage (Differential Scanning Calorimetry, DSC), ces deux polymorphes présentent une relation énantiotrope à pression ordinaire.

L'objectif de ce chapitre est de décrire la construction du diagramme topologique pression-température du finastéride à partir des données calorimétriques et cristallographiques disponibles dans la littérature. Ce diagramme permettra de déterminer les domaines de stabilité des différentes phases du système étudié en fonction de la pression et de la température, et ainsi de déduire de façon non ambiguë la hiérarchie de stabilité des polymorphes en fonction de la température et de la pression.

## 6.2. Données de la littérature

Deux polymorphes du finastéride ont été identifiés et physiquement caractérisés : une forme orthorhombique  $P2_12_12_1$  (forme I) et une forme monoclinique  $P2_1$  (forme II) [6.4, 6.5]. La forme I est considérée comme étant la forme la plus stable dans les conditions ordinaires

de pression et de température. En augmentant la température, elle se transforme en une forme II moins dense, qui est thermodynamiquement stable à haute température. La température de cette transition dépend de la vitesse de chauffage (200°C à 0,1 K min<sup>-1</sup> jusqu'à 230°C à 10 K min<sup>-1</sup>). En chauffant davantage, la forme II fond vers 258 °C.

Les données cristallographiques et calorimétriques des deux formes de finastéride publiées dans la littérature sont présentées dans les tableaux 6-I et 6-II. Leurs paramètres de maille sont donnés dans le tableau 6-III [6.6].

Dans leur étude, Wawrzycka et al. ont résolu seulement la structure cristalline de la forme I et ont publié des paramètres de réseau attribués à une forme II monoclinique [6.4]. Wenslow et al. ont, quant à eux, effectué la résolution structurale complète d'une forme monoclinique [6.5]. Par la suite, il a été conclu par Karami et al. que les formes monocliniques trouvées par l'équipe de Wawrzycka et celle de Wenslow n'étaient qu'une seule et même forme [6.6] (Tableau 6-III).

**Tableau 6-I : Données cristallographiques pour les deux formes du finastéride selon la littérature**

Densité /g cm <sup>-3</sup> à température ambiante		Référence
Forme I	Forme II	
1,159	1,100	[6.4]
1,166	1,097	[6.5]
1,163	1,098	<b>Moyenne</b>



**Tableau 6-II : Données calorimétriques associées aux transitions de fusion des deux formes I et II du finastéride et à la transition de la forme I à la forme II selon la littérature**

Forme I (orthorombique, P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> )		Forme II (monoclinique, P2 <sub>1</sub> )		Transition I→II		Référence
T <sub>I→L</sub> /°C	Δ <sub>I→L</sub> h /J g <sup>-1</sup>	T <sub>II→L</sub> /°C	Δ <sub>II→L</sub> h /J g <sup>-1</sup>	T <sub>I→II</sub> /°C	Δ <sub>I→II</sub> h /J g <sup>-1</sup>	
253-256	-					[6.4]
		257	88,5	200 <sup>a</sup> à 230 <sup>b</sup>	+11 <sup>b</sup>	[6.5]
		258,66	81,53	226,4 <sup>c</sup>	+11,41	[6.7]
				217 <sup>d</sup>	-	[6.8]
		257,8	85,0		11,2	<b>Moyenne</b>

<sup>a</sup> en chauffant à 0,1 K min<sup>-1</sup>,

<sup>b</sup> en chauffant à 10 K min<sup>-1</sup>,

<sup>c</sup> en chauffant à 10 K min<sup>-1</sup>,

<sup>d</sup> en chauffant à 1 K min<sup>-1</sup>.

**Tableau 6-III : Paramètres de maille des polymorphes I et II du finastéride disponibles dans la littérature [6.6]**

Polymorphe étudié	Forme I	Forme II	
Groupe d'espace	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>	
<b>a</b> /Å	6,451	10,236	16,387
<b>b</b> /Å	12,741	7,948	7,958
<b>c</b> /Å	25,979	13,896	18,115
<b>α</b> /°	90		
<b>β</b> /°	90	95,84	107,25
<b>γ</b> /°	90		
<b>V<sub>élém</sub></b> /Å <sup>3</sup>	2135,2		2256
<b>Référence</b>	[6.6]	[6.4]	[6.5]

V<sub>élém</sub> : volume de la maille élémentaire.

### 6.3. Analyse des données de la littérature

A partir des études de Wawrzycka et al. et Wenslow et al., les valeurs moyennes calculées des densités de la forme I et de la forme II sont respectivement égales à  $1,163 \text{ g cm}^{-3}$  et  $1,098 \text{ g cm}^{-3}$  à température ambiante [6.4, 6.5]. Ces résultats montrent que la forme I est plus dense que la forme II.

Concernant les données calorimétriques, les valeurs publiées par l'équipe de Wenslow et al. et par celle de Schultheiss et al. [6.5, 6.7] sont utilisées pour calculer les valeurs moyennes de la température et l'enthalpie de fusion de la forme II:  $T_{\text{II} \rightarrow \text{L}} = 531,0 \text{ K}$  ( $257,8 \text{ °C}$ ) et  $\Delta_{\text{II} \rightarrow \text{L}}h = 85,0 \text{ J g}^{-1}$ . Peu d'études ont été publiées concernant la température de fusion de la forme I. Seuls Wawrzycka et al. ont reporté des valeurs comprises entre  $253$  et  $256 \text{ °C}$  [6.4]. Ces valeurs semblent cependant correspondre au point de fusion de la forme II. Aucune valeur n'a été reportée dans la littérature concernant l'enthalpie de fusion de la forme I.

Selon les données de la littérature, trois équipes (Wenslow et al. ; Schultheiss et al. ; Othman et al.) ont étudié la transition entre les deux formes du finastéride [6.5, 6.7, 6.8]. Les trois équipes ont conclu que la température de transition de la forme I à la forme II dépendait de la vitesse de chauffage, variant de  $200$  à  $230 \text{ °C}$  selon que le chauffage a respectivement lieu à  $0,1$  ou à  $10 \text{ K min}^{-1}$ . Il est connu que la température à laquelle deux formes solides sont en équilibre est d'autant plus exacte que l'on chauffe lentement, l'idéal inaccessible étant de déplacer l'équilibre à vitesse nulle de chauffage. C'est pourquoi, la valeur trouvée par Wenslow et al. en chauffant à  $0,1 \text{ K min}^{-1}$  [6.5] sera retenue comme valeur de température de transition pour les calculs qui vont suivre dans la section 6.4.ci-dessous. Cette valeur est de  $200 \text{ °C}$  soit  $473 \text{ K}$ . Deux de ces trois études ont rapporté des valeurs d'enthalpie de transition de la forme I vers la forme II, dont la valeur moyenne est égale à  $+11,2 \text{ J g}^{-1}$ . La transition est donc endothermique.

Les résultats obtenus et utilisés dans l'élaboration topologique du diagramme de phases sont présentés dans le tableau 6-IV.

**Tableau 6-IV : Données calorimétriques et volumétriques calculées et utilisées pour construire le diagramme topologique P-T du finastéride**

$d_I / \text{g cm}^{-3}$	$d_{II} / \text{g cm}^{-3}$	$T_{II \rightarrow L} / \text{K}$	$\Delta_{II \rightarrow L} h / \text{J g}^{-1}$	$T_{I \rightarrow II} / \text{K}$	$\Delta_{I \rightarrow II} h / \text{J g}^{-1}$
1,163	1,098	531,0	85,0	473,0	+11,2

*d* : densité

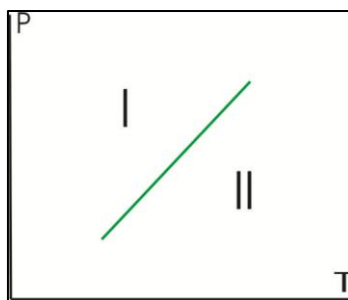
#### 6.4. Construction topologique du diagramme P-T du finastéride

##### 6.4.1. Position de l'équilibre entre les deux formes solides

Les formes I et II sont les deux formes solides connues du finastéride qui seront ici considérées. Les données cristallographiques présentées dans le tableau 6-III montrent que la forme I est plus dense que la forme II. Selon le principe de Le Chatelier (Section 2.3.1.), il s'ensuit que la forme I devient plus stable à haute pression alors que la forme II devient plus stable à basse pression. Par ailleurs, l'enthalpie de transition de la forme I à la forme II, égale à  $+11,2 \text{ J g}^{-1}$ , montre que le système gagne de l'énergie dans le sens de cette transformation. Ceci indique que l'enthalpie de fusion de la forme I, bien que non accessible expérimentalement, est plus faible que celle de la forme II. En négligeant les chaleurs spécifiques, on trouve que  $\Delta_{II \rightarrow L} h = 85 + 11,2 = 96,2 \text{ Jg}^{-1}$ .

Le principe de Le Chatelier permet de conclure que la forme I présenterait en principe un domaine de stabilité à basse température et que la forme II deviendrait plus stable à haute température (l'élévation de température déplace l'équilibre dans son sens endothermique, l'augmentation de pression le déplace dans le sens favorisant la phase la plus dense) (Section 2.3.1.).

Si l'on considère la représentation graphique du diagramme de phases pression-température, il est clair que le domaine de stabilité de la forme I sera représenté dans la partie haute à gauche du diagramme et celui de la forme II dans la partie basse à droite (Figure 6-2).



**Figure 6-2. Positions relatives des deux formes I et II du finastéride dans le diagramme P-T**

#### **6.4.2. Coordonnées des points triples II-L-Vap, I-II-Vap et I-L-Vap**

Le deuxième élément de construction topologique d'un diagramme de phases consiste à localiser les points triples, c'est-à-dire à déterminer leurs coordonnées (leurs températures et leurs pressions). Le système formé par les différents états du finastéride présente quatre phases différentes (forme I, forme II, phase liquide et phase vapeur). Il possède donc quatre points triples : I-L-Vap, II-L-Vap, I-II-Vap et I-II-L (L=liquide, Vap=vapeur).

##### **6.4.2.1. Points triples II-L-Vap et I-II-Vap**

La température de fusion de la forme II est mesurée par DSC. Comme expliqué dans la section 2.3.6., cette température peut être considérée comme étant le point triple II-L-Vap. De la même manière, la température de transition de la forme I à la forme II mesurée par DSC sera considérée comme étant celle du point triple I-II-Vap.

Les températures des points triples II-L-Vap et I-II-Vap sont respectivement égales à 531,0 K et 473,0 K (Tableau 6-II). On admettra par ailleurs que la pression (tension) de vapeur à cette température est négligeable (et donc prise égale à 0 MPa) (Section 5.4.3.3.).

##### **6.4.2.2. Point triple I-L-Vap**

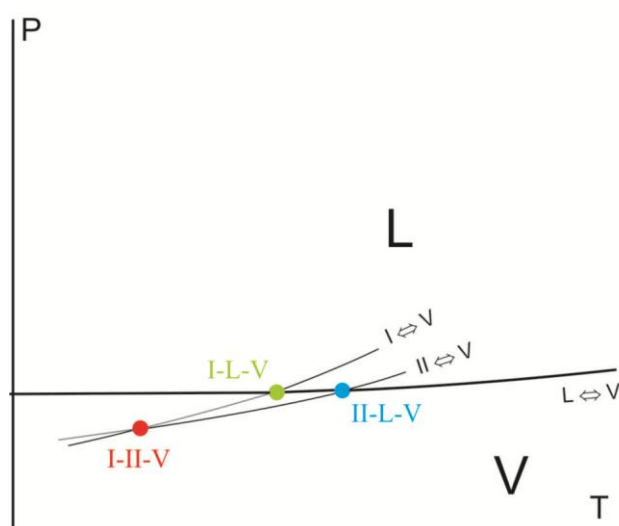
La température du point triple I-L-Vap pourrait être obtenue, de façon analogue à celle du point triple II-L-Vap, à partir du point de fusion de la forme I. Malheureusement, cette donnée n'est par contre pas disponible dans la littérature. Néanmoins, elle peut être calculée en utilisant l'équation 2.3.4, proposée initialement pour calculer la température de transition entre deux phases solides. Dans le cas du finastéride, elle va être utilisée pour calculer la température de fusion de la forme I et donc du point triple I-L-Vap, selon l'équation 2.3.15.

L'application de cette équation nécessite la connaissance de la valeur de l'enthalpie de fusion de la forme I qui n'est pas disponible dans la littérature mais qui peut être calculée à partir des enthalpies de fusion de la forme II et celle de la transition I→II présentées dans le tableau 6-III :  $\Delta_{I \rightarrow L}h = \Delta_{I \rightarrow II}h + \Delta_{II \rightarrow L}h = 11,2 + 85,0 = 96,2 \text{ J g}^{-1}$ , en négligeant à nouveau la contribution des capacités calorifiques.

L'équation 2.3.15 donne, pour le point de fusion de la forme I, la valeur de 523,5 K qui peut être attribuée au point triple I-L-Vap, comme expliqué dans la section 5.4.1. On peut également admettre que la tension de vapeur à cette température est négligeable et donc prise égale à 0 MPa (Section 5.4.3.3.).

Les positions des trois points triples II-L-Vap, I-II-Vap et I-L-Vap, ainsi définis, sont représentées dans la figure 6-3.

Les points triples I-L-Vap et II-L-Vap sont placés sur la courbe représentant l'équilibre diphasé L-V puisque les deux formes solides sont en équilibre avec la phase liquide à la fusion. D'autre part, ces formes solides ont aussi leurs propres équilibres avec la phase vapeur. Ces équilibres de sublimation sont représentés par les lignes I-V et II-V dans la figure 6-3 sur laquelle on voit également que le point triple I-II-V est le croisement des équilibres diphasés I-V et II-V, discutés ci-dessus, et de la courbe représentant l'équilibre I-II qui sera discuté ultérieurement dans la section 6.4.3.1.



**Figure 6-3. Positions relatives des points triples I-II-Vap, I-L-Vap et II-L-Vap**

V désigne la phase vapeur dans la figure.

Les coordonnées du dernier point triple I-II-L sont les plus difficiles à déterminer puisque sa température ne peut généralement pas être mesurée par un analyseur thermique standard. Ce point sera déterminé après que les positions des différents équilibres diphasés auront été définies (Section 6.4.3.).

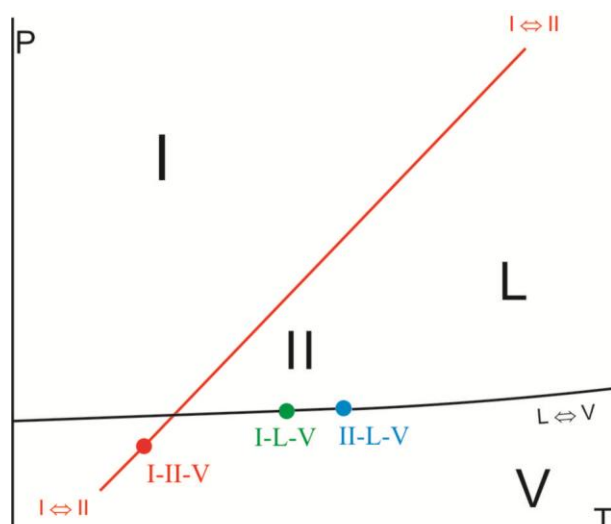
### 6.4.3. Pentas des équilibres diphasés

Le troisième élément de construction d'un diagramme de phases topologique consiste à déterminer les pentes des différents équilibres diphasés constituant le système étudié en utilisant l'équation de Clapeyron (Eq. 2.3.3). Dans le système finastéride, quatre équilibres diphasés sont à définir grâce à leurs pentes  $dP/dT$  : I-L, II-L, I-II et L-Vap.

#### 6.4.3.1. Pente de l'équilibre entre les phases solides I et II

L'application de l'équation 2.3.3 pour le calcul de la pente de l'équilibre entre les solides I et II utilise les données calorimétriques et volumétriques relatives à cette transition. Sa température et son enthalpie sont connues et sont égales à :  $T_{I \rightarrow II} = 473 \text{ K}$ ,  $\Delta_{I \rightarrow II}h = 11,2 \text{ J g}^{-1}$  (Tableau 6-III). La différence entre les volumes spécifiques ( $v$ ) des deux formes peut être calculée à partir des volumes respectifs de ces deux formes à température ambiante, qui sont égaux à l'inverse des densités présentées dans le tableau 6-III. On trouve ainsi  $v_I = 0,8598 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  pour la forme I et  $v_{II} = 0,9107 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  pour la forme II et donc une différence égale à :  $\Delta_{I \rightarrow II}v = v_{II} - v_I = 0,0502 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ .

En utilisant ces données, on obtient une pente positive de  $0,47 \text{ MPa K}^{-1}$  pour la courbe (assimilée à une droite) représentant l'équilibre I-II. L'utilisation qualitative du principe de Le Chatelier précédemment discutée dans la section 6.4.1. adéjà permis de conclure qu'au-dessus de cette ligne, la forme I est stable et qu'au-dessous, la forme II est stable ; ce qui est cohérent avec le sens de la transition observée expérimentalement (Figure 6-4).



**Figure 6-4. Positions relatives des deux formes solides du finastéride autour de l'équilibre de transition I-II**

V désigne la phase vapeur dans la figure.

#### 6.4.3.2. Pentas des équilibres de fusion I-L et II-L

Pour calculer les pentes des courbes des équilibres de fusion I-L et II-L (assimilées à des droites), les volumes spécifiques de la phase liquide et ceux des solides à leurs températures de fusion doivent être connus. Ces données n'étant pas disponibles et ne pouvant pas être déterminées expérimentalement, on peut les estimer à partir des volumes spécifiques des phases solides à la température ambiante (Section 2.3.4.). Dans le cas du finastéride, les volumes spécifiques des deux solides à température ambiante ont été calculés dans la section précédente. Le volume de chaque phase solide à son point de fusion peut alors être déterminé en augmentant de 2% son volume spécifique à température ambiante. Celui de la phase liquide à la température de fusion est ensuite déterminé selon le rapport  $v(\text{liquide}) / v(\text{solide}) = 1,10$ .

Les volumes spécifiques des deux formes solides I et II à leurs points de fusion respectifs sont ainsi estimés à  $0,877 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  pour la forme I et  $0,929 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  pour la forme II. Celui du liquide est par ailleurs estimé à la valeur  $1,012 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ . Etant donné que la différence entre les deux températures de fusion des deux formes solides est relativement faible (environ 7 K), ce volume spécifique de la phase liquide peut être utilisé pour chacune des deux formes I et II. Les changements estimés des volumes spécifiques lors des fusions sont alors:  $\Delta_{I \rightarrow L} v = v_L - v_I = 0,135 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  pour la fusion de la forme I et  $\Delta_{II \rightarrow L} v = v_L - v_{II} = 0,084 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  pour celle de la

forme II. Les valeurs des volumes spécifiques des différentes phases sont rassemblées dans le tableau 6-V.

**Tableau 6-V : Volumes spécifiques ( $v_{\text{spec}}$ ) des différentes phases solides du finastéride à température ambiante et à leurs points de fusion respectifs, volume spécifique de la phase liquide et les différences entre les volumes spécifiques des phases solide et liquide**

	Forme I	Forme II
$v_{\text{spec,S}} \text{ à } T_{\text{amb}}$	$0,8598 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$	$0,9107 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$
$v_{\text{spec,S}} \text{ à } T_{\text{fus}}$	$0,8770 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$	$0,9289 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$
$v_{\text{spec,L}}$	$1,012 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$	
$\Delta_{\text{S} \rightarrow \text{L}v} \text{ à } T_{\text{fus}}$	$0,135 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$	$0,084 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$

$v_{\text{spec,S}}$  : volume spécifique de la phase solide

$T_{\text{amb}}$  : température ambiante

$T_{\text{fus}}$  : température de fusion

$v_{\text{spec,L}}$  : volume spécifique de la phase liquide

$\Delta_{\text{S} \rightarrow \text{L}v}$  : différence du volume spécifique entre la phase liquide et la phase solide.

Par ailleurs, les données calorimétriques et volumétriques des formes I et II nécessaires au calcul des pentes des équilibres de fusion sont rassemblées dans le tableau 6-VI.

**Tableau 6-VI : Données calorimétriques et des formes I et II du finastéride**

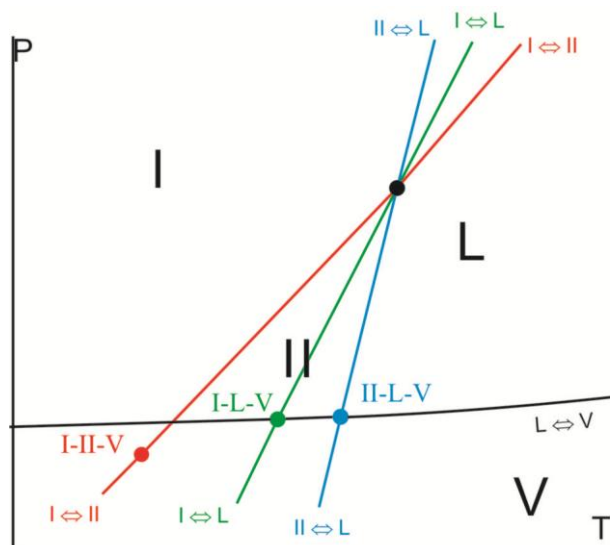
	Forme I	Forme II
$T_{\text{S} \rightarrow \text{L}} / \text{K}$	523	531
$\Delta_{\text{S} \rightarrow \text{L}h} / \text{J g}^{-1}$	96,2	85
$\Delta_{\text{S} \rightarrow \text{L}v} / \text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$	0,135	0,084

$T_{\text{S} \rightarrow \text{L}}$  : température de transition entre le solide (S) et le liquide (L) : température de fusion

$\Delta_{\text{S} \rightarrow \text{L}h}$  : enthalpie de la transition entre le solide (S) et le liquide (L) : enthalpie de fusion



En utilisant les données rassemblées dans les tableaux 6-IV et 6-V, on obtient les pentes suivantes :  $1,36 \text{ MPa K}^{-1}$  pour la courbe de fusion de la forme I et  $1,92 \text{ MPa K}^{-1}$  pour celle de la fusion de la forme II. Ces résultats montrent que la pente de l'équilibre II-L est plus grande que celle de l'équilibre I-L. En prenant en compte ce résultat et le fait que la forme II fond à une température supérieure à celle de la forme I, on conclut que les courbes des deux équilibres de fusion (assimilées à des droites) doivent se croiser quand la pression augmente (Figure 6-5).



**Figure 6-5. Positions des différents équilibres de phases du finastéride dans le diagramme P-T**

En admettant que la pression est quasiment nulle aux températures où les courbes I-II, I-L et II-L rencontrent la phase vapeur sur la courbe L-V, les équations représentatives de ces trois courbes sont les suivantes :

$$I \rightarrow II \quad P(\text{MPa}) = 0,47 T(\text{K}) - 223 \quad \text{Eq. 6.1}$$

$$I \rightarrow L \quad P(\text{MPa}) = 1,36 T(\text{K}) - 714 \quad \text{Eq. 6.2}$$

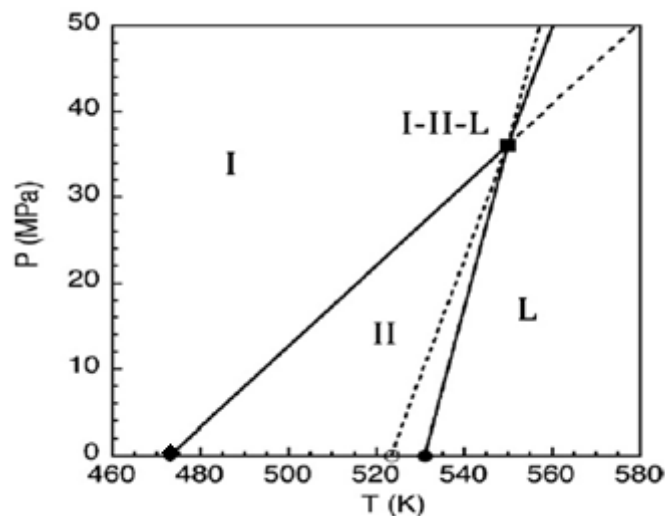
$$II \rightarrow LP \quad P(\text{MPa}) = 1,92 T(\text{K}) - 1017 \quad \text{Eq. 6.3}$$

L'intersection de ces équilibres deux à deux : I-II et II-L, ou I-II et I-L, ou I-L et II-L correspond aux coordonnées du point triple I-II-L, dernier point triple dont les coordonnées sont alors déterminées en utilisant les équations 6.1, 6.2 et 6.3.

#### 6.4.4. Coordonnées du point triple I-II-L

Si l'on considère les équilibres I-II et II-L, dont les courbes ont été obtenues directement à partir de données expérimentales et donc peuvent être considérées plus proches de la réalité par rapport à la courbe de l'équilibre I-L, ces équilibres se croisent à une pression et une température que l'on trouve en égalisant leurs équations représentatives (Equations 6.2 et 6.4). Cette égalisation conduit à une valeur de pression de 36 MPa et l'application de cette valeur à l'une des deux équations conduit à une température de 550 K. Ces valeurs ne sont autres que les coordonnées du point triple I-II-L. De la même manière, l'égalité des équations 6.2 et 6.3 pour l'intersection des courbes d'équilibre I-II et I-L ou celle des équations 6.3 et 6.4 pour l'intersection des courbes d'équilibre I-L et II-L conduisent à des valeurs très voisines (550 K, 36 MPa d'une part et 549 K, 35 MPa d'autre part).

Le diagramme topologique P-T prenant en compte les coordonnées du point triple I-II-L est représenté sur la figure 6-6. Comme mentionné ci-dessus, la forme I est stable à basse température (température ambiante) et haute pression, alors que la forme II présente un domaine de stabilité à température plus élevée et à basse pression.

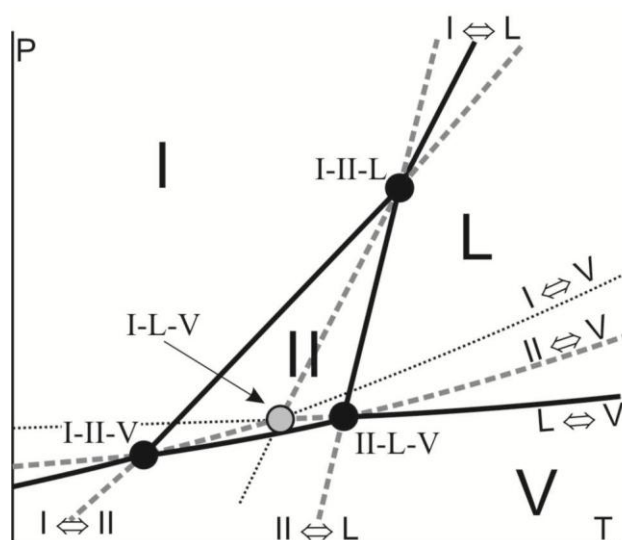


**Figure 6-6. Diagramme topologique P-T du finastéride**

Le domaine de la phase vapeur n'est pas représenté ; il se confond avec l'axe des abscisses. Losange plein : point triple I-II-Vap, cercle vide : point triple I-L-Vap, cercle plein : point triple II-L-Vap, carré plein : point triple I-II-L, lignes continues : équilibres diphasés stables, lignes en pointillés : équilibres diphasés métastables.

### 6.4.5. Diagramme topologique complet incluant la phase vapeur

Si on rajoute la phase vapeur au diagramme topologique P-T, on obtient le graphique représenté sur la figure 6-7, où sont définies les hiérarchies de stabilité des équilibres stables, métastables et supermétastables, ces derniers étant encore moins stables que les équilibres métastables.



**Figure 6-7. Diagramme topologique P-T du finastéride incluant une représentation schématique des équilibres comportant la phase vapeur (V)**

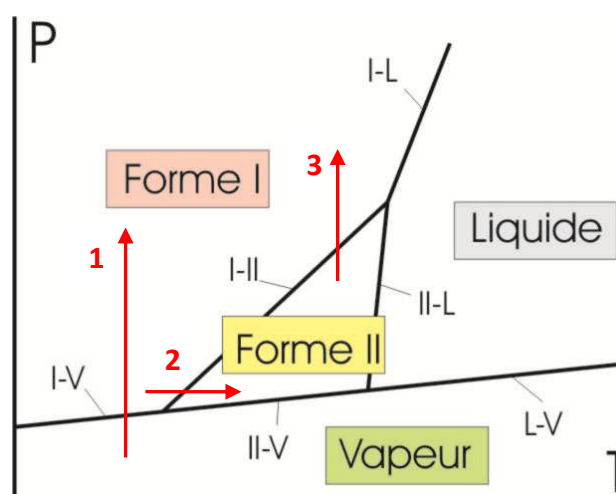
Les lignes continues sont des équilibres stables, les lignes grises discontinues sont des équilibres métastables et les lignes en pointillés sont des équilibres supermétastables. Les cercles pleins sont des points triples stables et le cercle gris est un point triple métastable.

En diminuant la température, de la droite vers la gauche, on voit que la courbe de l'équilibre liquide-vapeur (L-V) croise le point triple II-L-V, point de fusion stable de la forme II, devient métastable, croise ensuite le point triple métastable I-L-V, point de fusion de la forme I et devient enfin supermétastable. Un comportement similaire peut être observé pour les courbes de sublimation I-V et II-V. Les parties stables (lignes continues) des équilibres I-V, II-V et L-V délimitent le domaine de stabilité de la phase vapeur (V). Ce domaine de stabilité est le plus souvent tellement petit que la phase vapeur coïncide presque avec l'axe des abscisses du diagramme P-T, comme décrit dans la figure 6-6. Cependant, il est important de considérer la variable pression qui pourrait influencer les relations entre les polymorphes d'un système, comme c'est le cas du finastéride.

## 6.5. Conclusions

Le diagramme topologique de phases P-T décrivant le dimorphisme du finastéride (Figure 6-7) montre une relation énantiotrope entre les deux formes I et II à pression ordinaire et cette relation devient monotrope à haute pression. Un tel comportement a déjà été décrit dans la littérature définissant le polymorphisme de plusieurs autres substances actives : atovaquone, L-tyrosine éthyl ester et chlorhydrate de benfluorex [6.9- 6.11].

Dans le contexte industriel, un tel diagramme impose et recommande de développer la forme I du finastéride, forme la plus stable dans les conditions ordinaires de pression et de température. A température ambiante, cette forme reste stable à haute pression (Flèche 1 de la figure 6-8). Ceci veut dire que les techniques (compression) faisant varier la pression, et qui sont éventuellement utilisées au cours de la fabrication du médicament ne risquent pas d'induire un changement de phases de la forme I du finastéride. Par contre, si des traitements thermiques sont appliqués au cours du procédé de fabrication, la forme I peut se transformer en forme II, stable à plus haute température (Flèche 2 de la figure 6-8), laquelle peut ensuite se transformer en forme I si elle subit une compression isotherme (Flèche 3 de la figure 6-8).



**Figure 6-8. Régions de stabilité des différentes phases (solide I, solide II, liquide et vapeur) du finastéride dans le diagramme de phases pression-température**

**REFERENCES**

- [6.1] Kido, L.A., CiaHetzl, A., Candido, E.M., Montico, F., Lorencini, R.M., Alves Cagnon, V.H., 2014. Antiangiogenic and finastéride therapies: Responses of the prostate microenvironment in elder LT mice. *Life Sciences* 106, 58-70.
- [6.2] Nambiar, D., Singh, R.P., 2013. Advances in prostate cancer chemoprevention : a translational perspective. *Nutr. Cancer* 65 (1), 12-25.
- [6.3] Rasmusson, G.H., Reynold, G.F., Steinberg, N.G., Walton, E., Patel, G.F., Liang, T.M., Cascieri, M.A., Cheung, A.H., Brooks, J.R., Berman, C., 1986. Azasteroids – structure-activity-relationships for inhibition of 5- $\alpha$ -reductase and of androgen receptor-binding. *J. Med. Chem.* 29, 2298-2315.
- [6.4] Wawrzycka, I., Stepniak, K., Matyjaszczyk, S., Koziol, A.E., Lis, T., Abboud, K.A., 1999. Structural characterization of polymorphs and molecular complexes of finasteride. *J. Mol. Struct.* 474, 157-166.
- [6.5] Wenslow, R.M., Baum, M.W., Ball, R.G., McCauley, J.A., Varsolona, R.J., 2000. A spectroscopic and crystallographic study of polymorphism in an aza-steroid. *J. Pharm. Sci.* 89, 1271-1285.
- [6.6] Karami, S., Li, Y., Hughes, D.S., Hursthouse, M.B., Russel, A.E., Threlfall, T.L., Claybourn, M., Roberts, R., 2006. Further errors in polymorph identification : furosemide and finasteride. *Acta Crystallogr. B* 62, 689-691.
- [6.7] Schultheiss, N., Smit, J.P., Hanko, J.A., 2009. Three isostructural solvates of finasteride and their solid-state characterization. *Eur. J. Pharm. Sci.* 38, 498-503.
- [6.8] Othman, A., Evans, J.S.O., Evans, I.R., Harris, R.K., Hogkinson, P., 2007. Structural study of polymorphs and solvates of finasteride. *J. Pharm. Sci.* 96, 1380-1397.
- [6.9] Ceolin R., Rietveld I.B, 2010. Phenomenology of polymorphism and topological pressure-temperature diagrams. *J. Them. Anal. Calorim.* 102, 357-360.
- [6.10] Barrio, M., Maccaroni, E., Rietveld, I.B., Malpezzi, L., Masciocchi, N., Ceolin, R., Tamarit, J.L., 2012. Pressure-temperature state diagram for the phase relationships between benfluorex hydrochloride forms I and II : a case of enantiotropic behavior. *J. Pharm. Sci.* 101, 1073-1078.

[6.11] Rietveld, I.B., Barrio, M., Tamarit, J.L., Nicolai, B., Van de Streek, J., Mahe, N., Ceolin, R., Do, B., 2011. Dimorphism of the prodrug L-tyrosine ethyl ester : pressure-temperature state diagram and crystal structure of phase II. *J. Pharm. Sci.* 100, 4774-4782.

## Chapitre 7.

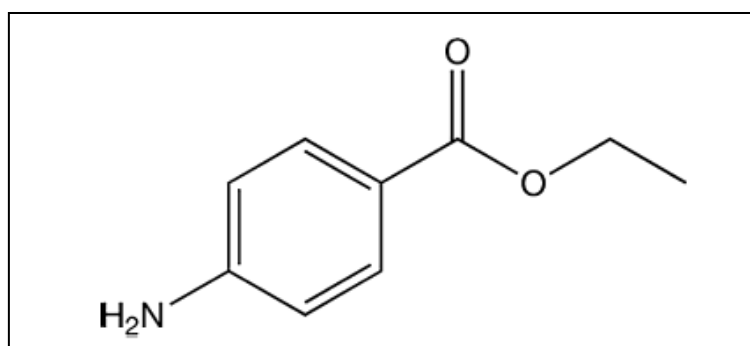
### **Evaluation de la stabilité physique des formes II et III de la benzocaïne par des mesures expérimentales et par approche topologique.**

CHAPITRE 7. EVALUATION DE LA STABILITE PHYSIQUE DES FORMES II ET III DE LA BENZOCAÏNE PAR DES MESURES EXPERIMENTALES ET PAR APPROCHE TOPOLOGIQUE.....	146
7.1. Introduction .....	147
7.2. Données de la littérature.....	148
7.2.1. Données structurales et volumétriques.....	148
7.2.2. Données calorimétriques .....	150
7.3. Analyse des données de la littérature et estimation de la température de fusion de la forme III .....	152
7.4. Analyse expérimentale .....	152
7.4.1. Essais de cristallisation.....	152
7.4.2. Analyse calorimétrique différentielle.....	152
7.4.3. Diffraction des rayons X .....	154
7.4.4. Analyse thermique différentielle à haute pression .....	156
7.5. Construction topologique du diagramme de phases P-T de la benzocaïne .....	159
7.5.1. Cohérence des résultats trouvés expérimentalement avec les données théoriques pour les deux équilibres de phases III-II et II-L.....	159
7.5.2. Coordonnées du point triple III-II-L .....	161
7.5.3. Position de l'équilibre III-L.....	161
7.5.4. Détermination des équilibres incluant la phase vapeur .....	165
7.5.5. Diagramme topologique complet incluant les deux formes II et III de la benzocaïne.....	167
7.6. Conclusions .....	168
REFERECES .....	170

## 7.1. Introduction

La benzocaïne est un anesthésique local très ancien, synthétisé pour la première fois en 1902 et utilisé depuis plus d'un siècle pour son action de surface sur la peau et les muqueuses [7.1]. Ayant un caractère lipophile, elle traverse la membrane axonique et bloque la conduction nerveuse par diminution de la perméabilité membranaire aux ions sodium  $\text{Na}^+$ . Elle est indiquée en application topique dans le prurit ou les crises hémorroïdaires ou en pastilles dans les maux de la gorge.

De nom chimique para-aminobenzoate d'éthyle, la benzocaïne appartient à la famille des amino-esters (Figure 7-1). Elle présente une masse molaire de  $165,19 \text{ g mol}^{-1}$ .



**Figure 7-1. Structure chimique de la benzocaïne,  $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$ ,  $M = 165,19 \text{ g mol}^{-1}$**

La benzocaïne présente du polymorphisme cristallin et l'existence d'au moins trois formes cristallines différentes a été rapportée [7.2]. Cependant, la hiérarchie de stabilité des différents polymorphes n'a pas été déterminée.

Dans ce chapitre, le cas de la benzocaïne sera présenté comme un exemple d'application des mesures à haute pression en combinaison avec l'approche topologique pour construire des diagrammes de phases pression-température. Pour ce cas spécifique, l'approche topologique de construction du diagramme de phases, basée sur les données de la littérature, sera comparée aux données obtenues directement par des mesures à hautes pressions, permettant de valider cette approche et d'étudier plus en détails les effets de la pression sur les équilibres de phases.



## 7.2. Données de la littérature

### 7.2.1. Données structurales et volumétriques

A ce jour, trois polymorphes de la benzocaïne ont été identifiés. La première structure cristalline qui a été résolue et nommée forme  $\alpha$  est orthorhombique avec le groupe d'espace  $P2_12_12_1$  [7.3]. Ensuite, en 1993, Gruno et al. ont démontré qu'il existe une autre forme solide, nommée forme  $\beta$ , qui se transforme en forme  $\alpha$  de manière endothermique [7.4]. Cette forme  $\alpha$  fond à 362 K environ [7.4].

En 2002, Lynch et McClenaghan ont publié la structure cristalline d'une forme monoclinique benzocaïne, de groupe d'espace  $P2_1/c$ . D'après la position des pics de diffraction des rayons X, cette forme semble être identique à la forme  $\beta$  précédemment trouvée par Gruno et al. [7.4, 7.5]. En 2009, Chan et al. ont revisité les structures cristallines des polymorphes de benzocaïne et ont trouvé une nouvelle structure cristalline, monoclinique  $P2_1$ , correspondant à une troisième forme solide benzocaïne [7.2, 7.6]. Ils ont aussi proposé une nouvelle nomenclature considérant les résultats de Gruno et al. [7.4] et Schmidt [7.7]. Selon cette nomenclature, la forme I, précédemment désignée forme  $\beta$ , est le polymorphe monoclinique  $P2_1/c$ , la forme II, précédemment nommée forme  $\alpha$ , est le polymorphe orthorhombique  $P2_12_12_1$ , et la forme III est la forme monoclinique  $P2_1$  trouvée par Chan et al. à basse température [7.6]. A partir des données trouvées dans la littérature [7.2 -7.7], les volumes spécifiques des formes I, II et III ont été extraits et résumés dans le tableau 7-I.

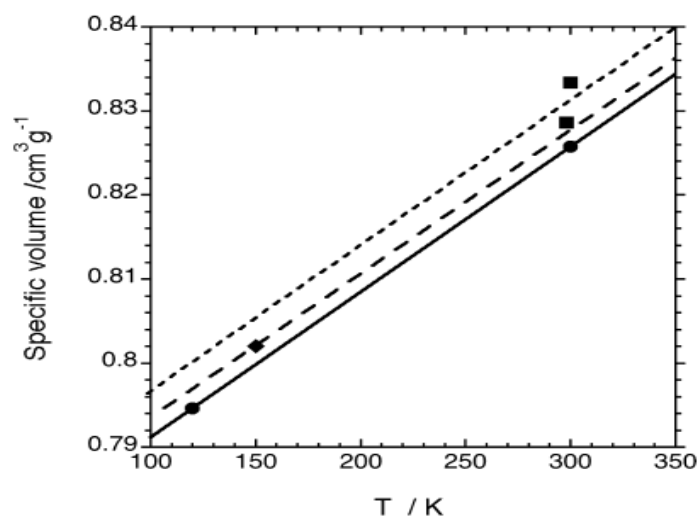
**Tableau 7-I : Volumes spécifiques ( $v_{\text{spec}}$ ) des différents polymorphes de benzocaïne extraits de la littérature**

Forme	T /K	$v_{\text{spec}} / \text{cm}^3 \text{g}^{-1}$	Référence
Forme I ( $\beta$ ), monoclinique $P2_1/c$	120	0,7946	[7.5]
	300	0,8257	[7.2]
Forme II <sup>a</sup> ( $\alpha$ ), orthorhombique $P2_12_12_1$	TA <sup>b</sup>	0,8287	[7.3]
	TA <sup>b</sup>	0,8286	[7.4]
	300	0,8334	[7.6]
<b>Forme III,</b> <b>monoclinique <math>P2_1</math></b>	150	0,8021	[7.6]

<sup>a</sup> Forme I dans le travail de Schmidt [7.7]

<sup>b</sup> Température Ambiante

D'après les valeurs indiquées dans le tableau 7-1, il n'est guère possible de déterminer avec certitude l'inégalité entre les volumes spécifiques des trois formes cristallines en fonction de la température car les valeurs mentionnées ont été obtenues avec des appareils différents. Néanmoins une approximation grossière a été effectuée en se basant sur les données concernant les volumes spécifiques de la forme I mesurés à deux températures différentes et l'équation de la droite correspondant à la variation de son volume spécifique en fonction de la température (Figure 7-2). De plus, on a supposé que les droites représentatives de chaque forme étaient parallèles.



**Figure 7-2. Estimation de la variation des volumes spécifiques des formes I (cercles), II (carrés) et III (losanges) en fonction de la température à partir des données de la littérature**

Les lignes discontinues sont des estimations basées sur l'hypothèse selon laquelle les volumes spécifiques augmentent parallèlement à celui de la forme I, selon l'équation :  $v_I / \text{cm}^3 \text{ g}^{-1} = 0,7739 + 0,0001728 \text{ T/K}$ .

Selon ces approximations, les volumes spécifiques des différentes formes solides de benzocaïne à température ambiante peuvent être estimés. Les résultats sont présentés dans le tableau 7-II et montrent que  $v_{II} > v_{III} > v_I$ .

**Tableau 7-II : Volumes spécifiques ( $v_{\text{spec}}$ ) estimés des différentes formes solides de benzocaïne à température ambiante (298 K)**

$v_I / \text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$	$v_{II} / \text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$	$v_{III} / \text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$
0,8254	0,8286	0,8277

### 7.2.2. Données calorimétriques

Les données disponibles dans la littérature concernant les caractéristiques calorimétriques des différents polymorphes de benzocaïne sont limitées. Ces données, résumées dans le tableau 7-III, sont essentiellement basées sur le travail de Schmidt [7.7]. La température de fusion de la benzocaïne a été rapportée par Schwartz et Paruta [7.8], Manzo et Ahumada [7.9] et Yalkowsky et al. [7.10]; cependant, aucune notion de polymorphisme n'a été mentionnée dans ces trois dernières publications.

**Tableau 7-III : Données calorimétriques ( $T_{\text{fus}}$  : température de fusion,  $\Delta_{\text{fus}}H$  : enthalpie de fusion) extraites de la littérature concernant la fusion de certains des polymorphes de la benzocaïne**

Forme	$T_{\text{fus}} / \text{K}$	$\Delta_{\text{fus}}H / \text{kJ mol}^{-1}$	Référence
Forme I ( $\beta$ ), $P2_1/c$	-	21,5 <sup>a</sup>	
Forme II <sup>b</sup> ( $\alpha$ ), $P2_12_12_1$	363	-	[7.4]
	361,8	20,5	[7.7]
	363,4	21	[7.11]
	362,85	22,3	[7.12]
	363	23,6	[7.13]
	363,05	20,51	[7.14]
	363	22,26	[7.15]
	361-363	21,05	[7.8]
	362,7	23,56	[7.9]
	363	19,75	[7.10]
	<b>362,8</b>	<b>21,6</b>	<b>Moyenne</b>

<sup>a</sup> Calculé par Schmidt dans la référence [7.7] à partir des données de Gruno et al. dans la référence [7.4]

<sup>b</sup> C'est forme I dans le travail de Schmidt [7.7]

Les données calorimétriques de la forme solide II de la benzocaïne ont pu être déterminées. Cette forme II présente des valeurs moyennes de 362,8 K pour la température de fusion ( $T_{\text{II} \rightarrow \text{L}}$ ) et de 21.6 kJ mol<sup>-1</sup> pour l'enthalpie de fusion ( $\Delta_{\text{II} \rightarrow \text{L}}H$ ) (Tableau 7-III).

Les travaux de Gruno et al. ont montré que la forme I (ou  $\beta$ ) ne subit aucune transformation pendant plusieurs mois de stockage à température ambiante. D'autre part, ils ont noté la survenue d'une transition de la forme I (ou  $\beta$ ) vers la forme II (ou  $\alpha$ ) de manière endothermique à 352 K environ [7.4]. En plus, en étudiant un échantillon de poudre de forme I

par diffraction des rayons X en fonction de la température, ils ont remarqué l'apparition de pics spécifiques à la forme II à 308 K [7.4]. A partir des courbes DSC (Differential Scanning Calorimetry) publiées par Gruno et al. [7.4], Schmidt a déduit que l'enthalpie de la transition de la forme I vers la forme II (I→II) est approximativement égale à +1 kJ mol<sup>-1</sup> [7.7].

Concernant les essais de cristallisation, Gruno et al. ont obtenu la forme II par cristallisation lente à partir de solutions d'acétate de butyle et la forme I par cristallisation rapide à partir des mêmes solutions ou de solutions de chloroforme [7.4]. Chan et al. ont, eux, obtenu les deux formes par évaporation de solutions éthanoliques à température ambiante [7.2]. D'autre part, Schmidt a listé un certain nombre de solvants permettant la cristallisation de la forme I et a mentionné que la forme II peut être obtenue par refroidissement, au-dessous de 337 K [7.7], de la matière préalablement fondue. Par ailleurs, Chan et al. ont observé une transition réversible de la forme II vers la forme III en abaissant la température jusqu'à atteindre 150 K [7.6]. Schmidt, par contre, n'a observé aucune transition solide-solide en analysant un échantillon commercial de benzocaïne correspondant à la forme II dans l'intervalle de température allant de -40 à 100°C [7.7].

Les capacités calorifiques (chaleurs spécifiques) de benzocaïne à l'état solide,  $C_{p,S}$  (S = Solide), et à l'état liquide,  $C_{p,L}$  (L = Liquide), ont été déterminées par Neau et Flynn [7.16]. Les données ont été compilées dans le tableau 7-IV. La forme cristalline n'ayant pas été précisée dans le texte; et donc, la forme solide en question pourrait donc être soit la forme I soit la forme II.

**Tableau 7-IV : Chaleurs spécifiques ( $C_p$ ) de la benzocaïne à l'état solide et à l'état liquide**

	Température /K	$C_p$ /J g <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>
<b>Solide</b>	300	1,43(5)
	310	1,47(4)
	320	1,52(4)
	330	1,56(2)
<b>Liquide</b>	370	2,02(4)
	380	2,05(4)
	390	2,06(5)
	400	2,10(5)

A partir de ces données, deux équations exprimant la variation de la capacité calorifique en fonction de la température (T) des deux états, solide et liquide, de la benzocaïne peuvent être déterminées :

$$\text{Solide : } C_{p,S} / J \text{ g}^{-1} \text{ K}^{-1} = 0,0044(3)T/K + 0,11(11) \quad \text{Eq. 7.1}$$

$$\text{Liquide : } C_{p,L} / J \text{ g}^{-1} \text{ K}^{-1} = 0,0025(4) T /K + 1,11(14) \quad \text{Eq. 7.2}$$

Les valeurs entre parenthèses sont les incertitudes sur les valeurs déterminées.

### **7.3. Analyse des données de la littérature et estimation de la température de fusion de la forme III**

Les transitions observées dans le système benzocaïne sont les transitions III→II et II→L. La transition III→L n'a par contre pas été observée et, par conséquent, le point de fusion inconnu de la forme III doit alors être déterminé de façon indirecte.

Pour déterminer le point de fusion de la forme III, l'équation 2.3.15 est utilisée en négligeant l'influence des chaleurs spécifiques.

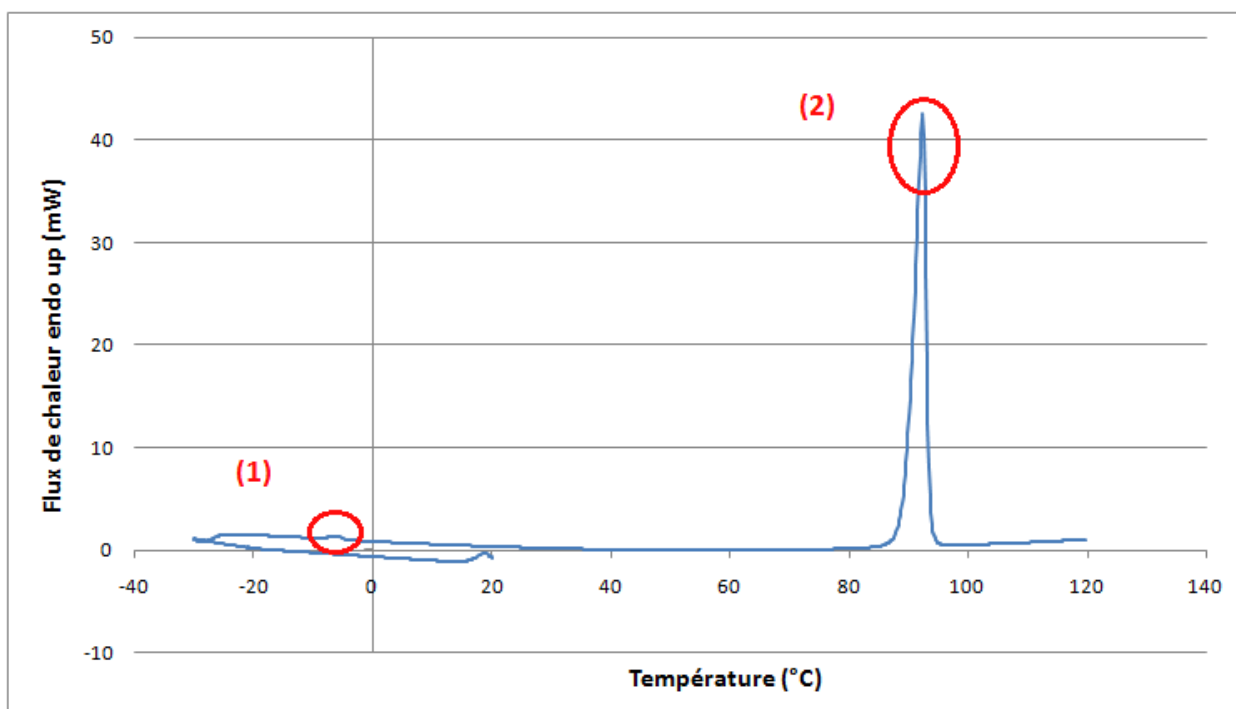
### **7.4. Analyse expérimentale**

#### **7.4.1. Essais de cristallisation**

Des essais de cristallisation en solution de la benzocaïne ont été réalisés en utilisant les solvants suivants : éthanol, p-xylène, acétate de butyle, chloroforme et éther diéthylique. Ces méthodes ont permis l'obtention de cristaux de la forme II. Au cours de nos expériences, et malgré plusieurs essais de différentes méthodes de cristallisation, la benzocaïne n'a pas pu être cristallisée sous la forme I.

#### **7.4.2. Analyse calorimétrique différentielle**

Une analyse calorimétrique différentielle à balayage (Differential Scanning Calorimetry, DSC) a été réalisée sur un échantillon de cristaux de benzocaïne forme II obtenues par cristallisation. L'application d'un cycle de refroidissement depuis la température ambiante jusqu'à 240 K suivi d'un chauffage jusqu'à 400 K conduit à un thermogramme montrant la présence de deux endothermes ; le premier (1) correspondant à une transition solide-solide et le deuxième (2) à la fusion de la forme II (Figure 7-3).



**Figure 7-3. Thermogramme, obtenu à  $10 \text{ K min}^{-1}$ , d'un échantillon de benzocaïne montrant la transition III→II et la fusion de la forme II**

Les résultats de 8 analyses par DSC sont reportés dans le tableau 7-V. Ils permettent de calculer les moyennes des températures et des enthalpies des transitions III→II et II→L. Selon ces résultats, la forme II de la benzocaïne présente une température de fusion de  $362,4 \pm 0,1 \text{ K}$  et une enthalpie de fusion de  $141,0 \pm 2,4 \text{ J g}^{-1}$ . La transition solide-solide III→II est caractérisée par une température de  $265,3 \pm 0,1 \text{ K}$  et une enthalpie de  $3,0 \pm 0,1 \text{ J g}^{-1}$  (Tableau 7-V).

**Tableau 7-V : Mesures calorimétriques de la benzocaïne obtenues par DSC : températures et enthalpies des transitions solide-solide III→II et solide-liquide II→L (fusion de la forme II)**

III→II		II→L	
T /K	$\Delta h$ /J g <sup>-1</sup>	T /K	$\Delta h$ /J g <sup>-1</sup>
265,29	3,05	362,25	137,6
265,48	3,057	362,36	140,4
265,21	3,185	362,30	144,2
265,31	3,131	362,31	141,4
265,27	2,857	362,41	138,2
265,28	2,97	362,41	140,6
265,46	3,048	362,44	144,2
265,18	2,952	362,38	141,1
<b>265,3 (± 0,1)</b>	<b>3,0 (± 0,1)</b>	<b>362,36 (± 0,07)</b>	<b>141,0 (± 2,4)</b>

Les moyennes sont données dans la dernière ligne du tableau avec les écarts type entre parenthèses.

De plus, en faisant varier la vitesse de chauffage, il a été possible de montrer (Tableau 7-VI) que la température initiale de transition solide-solide III→II ne varie pas en fonction de la vitesse de chauffage.

**Tableau 7-VI : Température de la transition solide-solide en fonction de la vitesse de chauffage**

Vitesse de chauffage /K min <sup>-1</sup>	10	5	2	1	0,5	0,2
T (initiale) /K	265,3	265,54	265,71	265,57	266,09	267,06

### 7.4.3. Diffraction des rayons X

Des échantillons de benzocaïne ont été analysés par diffraction, à haute résolution, des rayons X sur poudre tout en variant la température depuis 200 K jusqu'au point de fusion (Section 3.3.5.2.). Les paramètres du réseau cristallin obtenus en fonction de la température sont reportés dans les tableaux 7-VII et 7-VIII.

En augmentant la température, des modifications sont observées entre 260 et 270 K. Elles montrent un changement de phases dans cet intervalle de température (Figure 7-4). En comparant les diagrammes de diffraction X mesurés avec ceux disponibles dans la CSD (Cambridge Structural Database), les phases présentes à basse et à haute températures ont été identifiées comme étant respectivement les formes III et II. Le diagramme de diffraction X enregistré à 265 K montre les pics de Bragg des deux formes et donc leur coexistence à cette température.

Cette observation est cohérente avec les résultats trouvés par DSC, qui montrent la survenue d'une transition solide-solide à  $265,3 \pm 0.1$  K.

**Tableau 7-VII : Paramètres du réseau et volume spécifique ( $v_{\text{spec}}$ ) de la forme III (basse température, monoclinique  $P2_1$ ) de la benzocaïne en fonction de la température**

T/K	a /Å	b /Å	c /Å	y /°	$V_{\text{élém}}/\text{Å}^3$	$v_{\text{spec}}/\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
200	8,2112	10,695	20,559	99,403	1781,2	0,81165
220	8,2176	10,714	20,591	99,411	1788,6	0,81502
245	8,2333	10,752	20,658	99,527	1803,6	0,82186
260	8,2393	10,764	20,694	99,576	1809,7	0,82466

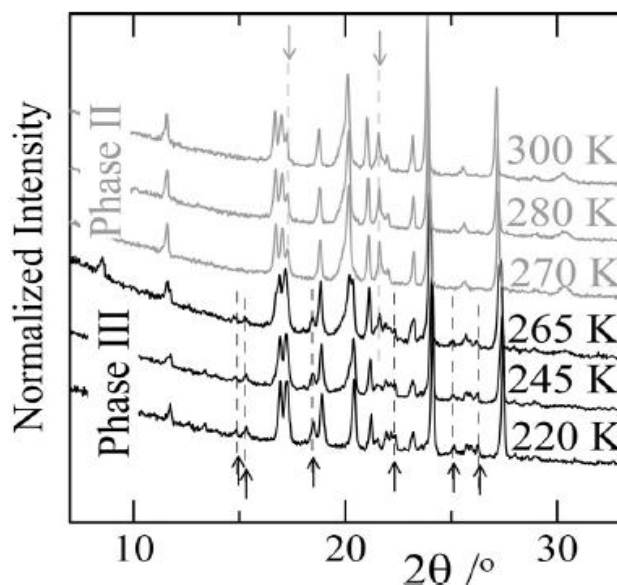
$V_{\text{élém}}$  : volume de la maille élémentaire

**Tableau 7-VIII : Paramètres du réseau et volume spécifique ( $v_{\text{spec}}$ ) de la forme II (haute température, orthorhombique  $P2_12_12_1$ ) de la benzocaïne en fonction de la température**

T/K	a /Å	b /Å	c /Å	$V_{\text{élém}}/\text{Å}^3$	$v_{\text{spec}}/\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
270	8,2430	5,3057	20,853	911,99	0,83116
280	8,2458	5,3039	20,885	913,41	0,83246
300	8,2592	5,3187	20,928	919,31	0,83784
310	8,2598	5,3246	20,940	920,93	0,83932
320	8,2652	5,3304	20,966	923,69	0,84183
330	8,2736	5,3375	20,997	927,20	0,84503
345	8,2813	5,3462	21,049	931,91	0,84932
355	8,2867	5,3522	21,082	935,02	0,85216
360	8,2873	5,3548	21,099	936,31	0,85333

$V_{\text{élém}}$  : volume de la maille élémentaire





**Figure 7-4. Diagrammes de diffractions des rayons X obtenus à différentes températures avec une poudre de benzocaïne**

Les paramètres du réseau cristallin des différentes formes solides ainsi déterminés permettent d'établir une relation entre le volume spécifique,  $v_{\text{spec}}$ , de chaque forme et la température selon les équations suivantes :

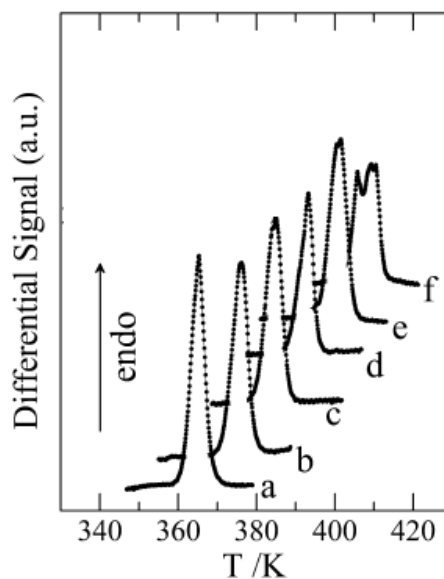
$$\text{Forme III : } v_{\text{III}} / \text{cm}^3 \text{ g}^{-1} = 0,766(3) + 2,2(2) \times 10^{-4} \text{ T/K} \quad \text{Eq.7.3}$$

$$\text{Forme II : } v_{\text{II}} / \text{cm}^3 \text{ g}^{-1} = 0,762(2) + 2,53(8) \times 10^{-4} \text{ T/K} \quad \text{Eq.7.4}$$

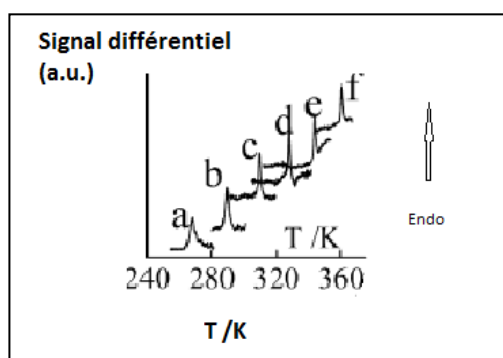
#### 7.4.4. Analyse thermique différentielle à haute pression

Des essais d'analyse thermique différentielle à haute pression (High-Pressure Differential Thermal Analysis, HP-DTA) ont été réalisés sur des échantillons de benzocaïne à différentes pressions (Section 3.3.2.2.).

Les endothermes obtenus par cette technique à différentes pressions sont représentés sur les figures 7-5 et 7-6.



**Figure 7-5. Endothermes de la fusion de la forme II obtenus à différentes pressions par analyse thermique différentielle à haute pression (HP-DTA)**



**Figure 7-6. Endothermes de la transition III→II obtenus à différentes pressions par analyse thermique différentielle à haute pression (HP-DTA)**

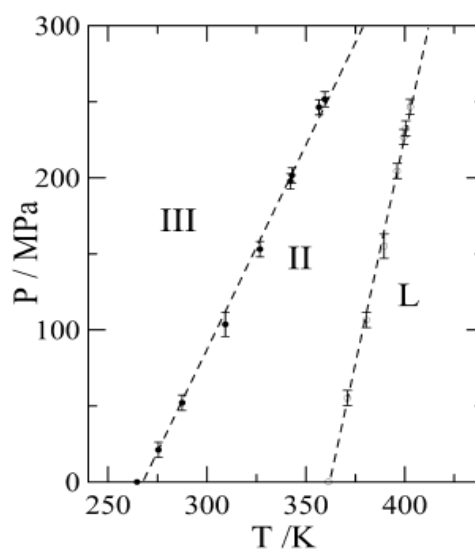
Le début du pic indique la température de transition pour la pression donnée.

Les pressions appliquées et les températures des transitions III→II et II→L obtenues pour chaque pression sont reportées dans le tableau 7-IX.

**Tableau 7-IX : Températures et pressions caractéristiques pour les équilibres III-II et II-L**

Transition III→II		Transition II→L	
T /K	P /MPa	T /K	P /MPa
265,4	0	361,4	0
275,4	21,2	371,0	55,3
287,4	52,2	380,6	106,5
309,2	103,7	389,6	155,1
326,8	153,1	396,2	204,5
342,2	197,8	399,4	226,8
359,6	251,6	402,6	246,6
343,0	201,7	400,6	232,5
356,6	246,4		

Selon ces résultats, les courbes exprimant la variation de la température de transition en fonction de la pression pour les deux transitions sont représentées sur la figure 7-7. Cette figure montre que ces courbes sont des droites dans les intervalles de pression et température considérés et que ces droites convergent quand la pression augmente. L'intersection de ces deux courbes d'équilibre (III-II et II-L) est le point triple III-II-L, qui doit donc, selon ces résultats, se situer à haute pression et à haute température.

**Figure 7-7. Représentation des équilibres III-II (cercles pleins) et II-L (cercles vides)**

Les erreurs sur la température sont représentées par des barres verticales.

Les équations de ces deux droites sont :

$$\text{III-II} : P/\text{MPa} = -722(18) + 2,70(6) T / \text{K} \quad \text{Eq.7.5}$$

$$\text{II-L} : P/\text{MPa} = -2166(50) + 5,99(13) T / \text{K} \quad \text{Eq.7.6}$$

Les différentes données calorimétriques et cristallographiques obtenues pour les deux transitions étudiées sont résumées dans le tableau 7-X.

**Tableau 7-X : Données calorimétriques, volumétriques et dP/dT pour les transitions étudiées**

Transition	T /K	$\Delta h / \text{J g}^{-1}$	$\Delta v / \text{cm}^3 \text{g}^{-1}$	dP/dT /MPa K <sup>-1</sup>
III→II	265,3 ± 0,5	3,0 ± 1,0	0,0030 ± 0,0010	2,70 ± 0,06
II→L (fusion)	362,4 ± 0,5	141,0 ± 2,4		5,99 ± 0,13

Dans ce tableau, la différence de volume  $\Delta v = v_{\text{III}} - v_{\text{II}} = 0.003 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  est obtenue avec les équations 7.3 et 7.4 et les valeurs de dP/dT sont déduites des équations 7.5 et 7.6.

## 7.5. Construction topologique du diagramme de phases P-T de la benzocaïne

### 7.5.1. Cohérence des résultats trouvés expérimentalement avec les données théoriques pour les deux équilibres de phases III-II et II-L

Pour la transition III→II, les résultats de DSC sous conditions ordinaires ont conduit à une température de transition de 265,3 K et une enthalpie de transition de 3,0 J g<sup>-1</sup> (Tableau 7-V) ; la valeur de la température de transition étant en accord avec les observations trouvées par la diffraction des rayons X à différentes températures (Figure 7-4). Ces mesures ont aussi permis de déterminer la différence du volume spécifique entre les deux phases solides II et III selon :  $\Delta v = v_{\text{II}} - v_{\text{III}} = 0,82893 - 0,82596 = 0,00297 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  (Tableau 7-X). La pente dP/dT de la droite exprimant l'équilibre entre ces deux phases a été trouvée, par HP-DTA, égale à 2,70 MPa K<sup>-1</sup> (Tableau 7-X). Ce dernier résultat est vérifié en utilisant l'équation de Clapeyron (Eq. 2.3.3) qui donne une valeur (3,76 MPa K<sup>-1</sup>) proche de celle trouvée expérimentalement. Cette équation est aussi utilisée pour vérifier la cohérence de tous les résultats obtenus concernant la transition III→II. En effet, selon Clapeyron, le produit des deux grandeurs, la température et la pente (T·dP/dT), présentant les erreurs expérimentales les plus faibles (Equation 7.7 et Tableau 7-X), devrait être égal au rapport  $\Delta h/\Delta v$ , qui ont les erreurs expérimentales relativement les plus grandes (Tableau 7-X). Ce produit et ce rapport calculés sont respectivement  $715 \pm 15 \text{ MPa}$  et  $1020 \pm 476 \text{ MPa}$ . On peut ainsi admettre que le

produit  $T \cdot (dP/dT)$  issu des valeurs expérimentales de  $T$  et  $dP/dT$  n'est pas significativement différent de celui calculé au moyen du rapport  $\Delta h/\Delta v$ , si l'on considère les erreurs respectives.

Concernant la transition II→L (fusion de la forme II), les analyses effectuées ont permis de déterminer les données suivantes : la température de fusion,  $T_{II \rightarrow L} = 362,4$  K, l'enthalpie de fusion,  $\Delta_{II \rightarrow L}h = 141,0$  J g<sup>-1</sup>, et la pente de la droite correspondant à l'équilibre entre II et L,  $dP/dT = 5,99$  MPa K<sup>-1</sup> (Tableau 7-X). Contrairement à la transition III→II, la cohérence des résultats obtenus pour la transition II→L ne peut pas être vérifiée à cause de l'ignorance du volume spécifique de la phase liquide, et donc du changement de volume spécifique associé à la transition de fusion ( $\Delta v_{II \rightarrow L}$ ). Ce dernier peut par contre être calculé en utilisant l'équation de Clapeyron (Eq. 2.3.3). Selon cette dernière, le changement du volume est égal au rapport  $\Delta h/(T(dP/dT))$  qui conduit à une valeur  $\Delta v_{II \rightarrow L}$  égale à  $0,0065 \pm 0,002$  cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>. L'incertitude est dans ce cas beaucoup plus faible parce que l'erreur expérimentale relative est plus faible sur l'enthalpie de fusion que sur l'enthalpie de transition solide-solide.

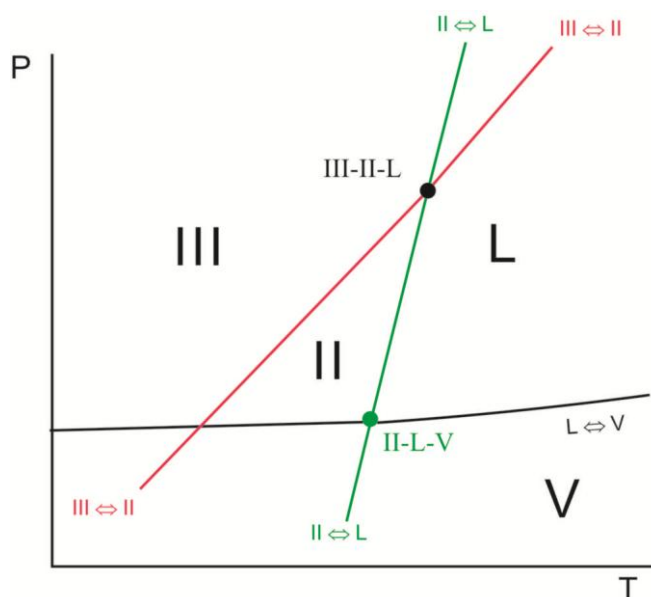
D'autre part, le volume spécifique  $v_{II}$  (362,4 K) de la forme solide II au point de fusion, calculé à partir de l'équation 7.6, est égal à  $0,8535 \pm 0,0007$  cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>. Ces deux derniers résultats permettent de calculer le volume spécifique de la matière fondue qui est alors égal à  $v_L = v_{II}(362,4 \text{ K}) + \Delta v_{II \rightarrow L} = 0,92 \pm 0,03$  cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>. A la température de fusion, le rapport entre le volume spécifique de la phase solide et celui de la phase liquide ( $v_L/v_{II}$ ) est alors égal à  $1,076 \pm 0,0036$ . Ce résultat est en accord avec ceux trouvés auparavant pour d'autres substances actives. En effet, le rapport moyen  $v_L/v_S$  à la température de fusion, publié et déterminé à partir de plusieurs résultats calculés pour différentes substances actives, est de 1,10 (Section 2.3.4.) [7.17-7.19].

Au cas où l'absence de données ne permettrait pas de calculer  $\Delta v_{II \rightarrow L}$ , le rapport 1,10 pourrait alors être appliqué pour trouver  $\Delta v_{II \rightarrow L}$  et, par la suite, calculer, à l'aide de l'équation de Clapeyron (Eq. 2.3.3), la pente  $dP/dT$  de la droite de l'équilibre II-L. De cette manière, cette pente serait trouvée égale à  $4,56$  MPa K<sup>-1</sup>. Cette valeur, plus faible que celle trouvée par les mesures HP-DTA ( $5,99$  MPa K<sup>-1</sup>), reste cependant supérieure à celle de la pente de l'équilibre III-II (Tableau 7-X). De ce fait, du point de vue topologique, les conclusions sur les positions relatives des courbes d'équilibres à deux phases resteraient inchangées, montrant que l'intersection des deux courbes d'équilibre III-II et II-L se produit à haute pression et à haute température ; ce qui est en accord avec la déduction issue des courbes P-T expérimentales (Figure 7-7).

### 7.5.2. Coordonnées du point triple III-II-L

L'intersection des deux courbes d'équilibres III-II et II-L correspond à un point dans le plan pression-température où les trois phases III, II et L sont en équilibre. Ce point ne peut être que le point triple III-II-L impliquant l'existence d'une troisième courbe, celle de l'équilibre III-L (courbe de fusion de la forme III). Les coordonnées de ce point triple peuvent être déterminées en égalisant les deux équations 7.5 et 7.6 correspondant respectivement aux courbes P-T mesurées pour les transitions III→II et II→L. Cette égalité conduit à une température de 439K et l'application de cette température à l'une des deux équations conduit à une pression de 463 MPa ; ce sont les coordonnées du point triple III-II-L. Ces coordonnées sont des estimations obtenues par extrapolation des courbes des équilibres de phases qui ne sont pas connues au-dessus de l'intervalle de pression étudié [0-250 MPa].

Les deux courbes des équilibres III-II et II-L, ainsi que le point triple III-II-L, sont représentées sur la figure 7-8 en fonction de la température et de la pression.



**Figure 7-8. Positionnement du point triple III-II-L dans le diagramme de phase P-T du polymorphisme de la benzocaïne**

### 7.5.3. Position de l'équilibre III-L

Pour le système benzocaïne, les formes II et III présentent une relation énantiotrope dans les conditions ordinaires de température et de pression. La forme III est stable à basse température et la forme II, stable à plus haute température, fond à sa température de fusion.

En augmentant la pression, à température ambiante, la forme III reste la forme la plus stable par rapport à la forme II. D'autre part, au-dessus du point triple III-II-L, la forme III possède un équilibre stable avec la phase liquide (équilibre de fusion) et la forme II devient métastable. Par conséquent, à haute pression, la forme II devient monotrope par rapport à la forme III ; cependant, la position de la courbe de fusion de la forme III n'est pas connue.

Il existe deux approches pour déterminer la position de la courbe de fusion de la forme III. La première consiste à utiliser les températures de transition et leurs enthalpies respectives (Eq. 2.3.15) et la seconde consiste à utiliser les relations thermodynamiques dans le diagramme de phases pression-température (Clapeyron). Les deux approches vont être utilisées et leurs résultats seront comparés pour vérifier leur cohérence mutuelle.

Concernant la première approche, une estimation du point de fusion de la forme III ( $T_{III \rightarrow L}$ ) va être calculée à partir de l'équation 2.3.15 tout en négligeant les capacités calorifiques. Dans cette équation, la phase A est la forme solide III, la phase B est la forme solide II et les valeurs utilisées pour les changements d'enthalpie et les températures de transition sont celles qui sont présentées dans le tableau 7-X. Cette équation conduit ainsi à une température de fusion de la forme III,  $T_{III \rightarrow L}$ , de 359,6 K, juste au-dessous de la température de fusion de la forme II,  $T_{II \rightarrow L}$  (362,4 K). Si les capacités calorifiques sont prises en considération, c'est la différence entre les chaleurs spécifiques de la phase liquide et de la phase solide ( $C_{p,L} - C_{p,II}$ ) qui est prise en compte dans l'équation 7.4 pour calculer le point de fusion de la forme III (Section 7.3.). Ces chaleurs spécifiques sont trouvées dans le tableau 7-IV et les équations qui en résultent exprimant leurs relations avec la température sont les équations 7.1 et 7.2. Avec ces dernières, on obtient alors l'équation suivante :

$$C_{p,L} - C_{p,III}(T) / J g^{-1} K^{-1} = - 0,0019T/K + 1,0 \quad \text{Eq. 7.7}$$

L'application de l'équation 2.3.18 conduit à une valeur de 359,6 K pour la température de fusion de la forme III, identique à celle trouvée sans prendre en considération les capacités de chaleur. Ce résultat est attendu puisque l'équation 2.3.18 montre que la contribution de la chaleur spécifique dépend uniquement de la différence entre la température de fusion de la forme III et celle de la forme II. Cette différence est très faible (3 K environ). En plus, la température de transition entre les deux phases solides apparait uniquement dans le dénominateur de son rapport avec la chaleur de transition solide-solide. L'enthalpie de transition étant très faible, ce sont essentiellement les quantités reliées à la fusion de la forme

II qui déterminent la position de la température de fusion de la forme III. Ceci est clairement reflété dans les résultats des équations 2.3.15 et 2.3.18.

La deuxième approche utilise l'équation de Clapeyron (2.3.3) qui permet de calculer la pente d'une transition donnée dans le plan défini par la pression et la température à une température donnée. Cette pente définit une droite correspondant à un équilibre entre deux phases et cette droite peut être extrapolée afin de trouver les coordonnées d'un point de l'équilibre pour une autre pression ou une autre température. L'application de cette approche permet de calculer la pente de l'équilibre III-L et, par extrapolation, de déterminer le point de fusion de la forme III.

L'utilisation de l'équation de Clapeyron nécessite la connaissance de la température, de la variation d'enthalpie et de la variation de volume associées à la transition considérée. Pour l'application de cette équation, le point de fusion de la forme II, qui est de 362,4 K, a été choisi comme donnée pour la température. L'enthalpie de fusion de la forme III devrait être relativement proche de celle de la forme II puisque que la variation d'enthalpie associée à la transition entre ces deux phases solides est seulement de 3 J g<sup>-1</sup> (Tableau 7-X). Même si cette valeur change à cause d'une différence entre les chaleurs spécifiques des différentes phases, l'enthalpie de fusion de la forme III sera donnée en grande partie par celle de la forme II, qui est de 141 J g<sup>-1</sup> et qui est exactement connue à son propre point de fusion. L'enthalpie de fusion de la forme III à la température de fusion de la forme II peut par conséquent être estimée à 144 J g<sup>-1</sup>. Concernant les données volumétriques, le volume spécifique de la phase liquide à la température de fusion de la forme II, choisie pour évaluer la pente de l'équilibre de fusion de la forme III, a déjà été calculé et a été trouvé égal à  $v_L = 0,9185 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ . Le volume spécifique de la forme III à  $T_{II \rightarrow L}$  peut être calculé en utilisant l'équation 7.3 qui conduit à une valeur de  $0,8478 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  et  $\Delta_{III \rightarrow L} v$  serait alors égal à  $0,0707 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ .

L'application numérique de l'équation de Clapeyron utilisant les valeurs calculées ci-dessus et présentées dans le tableau 7-XI conduit à une pente dP/dT de l'équilibre de fusion de la forme III de 5,62 MPa K<sup>-1</sup>. Le point triple III-II-L, dont les coordonnées ont déjà été déterminées (439 K et 463 MPa), doit obligatoirement se situer sur la courbe d'équilibre de fusion de la forme III. Par conséquent, les coordonnées de ce point peuvent être utilisées pour trouver l'équation de cette droite.

$$P / \text{MPa} = 5,62 T / \text{K} - 2006$$

Eq. 7.8



En posant la pression égale à 0 MPa, le point de fusion de la forme III sous conditions ordinaires est trouvé égal à 357 K ; très proche de celle obtenue à partir de l'application des équations 2.3.15 et 2.3.18 (359,6 K). Il est difficile de trancher lequel des deux résultats est le plus proche de la valeur correcte. D'une part, l'influence des capacités calorifiques des solides pourrait faire diminuer le point de fusion calculé à partir des équations 2.3.15 et 2.3.18 et, d'autre part, l'utilisation de l'équation de Clapeyron nécessite une longue extrapolation de la droite d'équilibre jusqu'à 0 MPa. Cependant, les résultats correspondant au point de fusion de la forme III obtenus à partir des deux méthodes sont cohérents.

**Tableau 7-XI : Données utilisées pour le calcul de la pente de la courbe de l'équilibre de fusion de la forme III (III-L)**

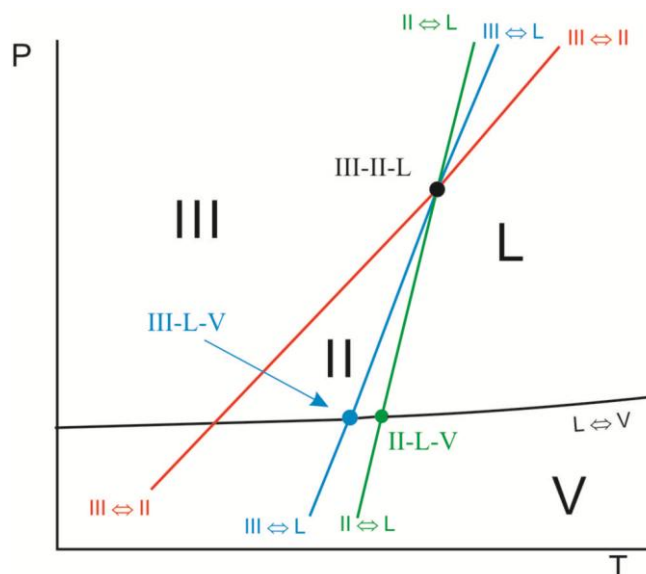
T /K	$\Delta_{III \rightarrow L}h / J g^{-1}$	$\Delta_{III \rightarrow L}v / cm^3 g^{-1}$
362,4	144	0.0707

Si le point de fusion obtenu à partir de l'équation 2.3.15 est utilisé, l'équation de la droite d'équilibre III-L exprimant sa relation avec la pression (Equation 7.8) doit être ajustée. Dans ce cas, les coordonnées respectives du point de fusion de la forme III et celles du point triple III-II-L, [359,6 K ; 0 MPa] et [439 K ; 463 MPa], doivent être utilisées. Elles conduisent à l'équation suivante :

$$P /MPa = 5,80 T /K - 2086 \quad \text{Eq. 7.9}$$

Les deux équations 7.8 et 7.9 ainsi obtenues peuvent être considérés comme les marges d'erreur concernant la position de la courbe d'équilibre III-L dans le diagramme de phases P-T.

La représentation topologique de la courbe d'équilibre III-L est montrée dans la figure 7-9 qui est en accord avec les résultats expérimentaux.



**Figure 7-9. Position de l'équilibre III-L dans le diagramme de phases topologique P-T de la benzocaïne**

#### 7.5.4. Détermination des équilibres incluant la phase vapeur

Dans le système benzocaïne étudié, on considère deux phases solides II et III, une phase liquide L et une phase vapeur Vap. Ces quatre phases impliquent l'existence de six courbes d'équilibres diphasés II-III, II-Vap, III-Vap, II-L, III-L et L-Vap et de quatre points triples III-II-L, II-L-Vap, III-L-Vap et III-II-Vap (Section 2.3.6.).

Le point triple III-II-L, point d'intersection des courbes de fusion de II et III et de la courbe de transition III→II, a été déterminé et possède les coordonnées  $T = 439$  K et  $P = 463$  MPa. Le point triple II-L-Vap est le point où la forme II est en équilibre avec sa phase liquide mais aussi sa phase vapeur, c'est-à-dire correspond au point de fusion de cette forme comme expliqué dans la section 2.3.6.

Par conséquent, dans le cas du système étudié, les quatre points triples sont connus : III-II-Vap (265,3 K ; 0 Mpa), III-L-Vap (359,6 K ; 0 Mpa), II-L-Vap (362,4 K ; 0 Mpa) et les III-II-L (439 K ; 463 MPa).

Les points triples III-II-Vap, III-L-Vap et II-L-Vap présentent une coordonnée en pression de 0 MPa (Section 5.4.3.3.).

Selon une étude approfondie de la littérature, il n'existe aucune donnée expérimentale disponible concernant la tension de vapeur de la benzocaïne. Pour cela, ces données vont être estimées par une méthode utilisant le logiciel ACD Labs [7.20]. Ce logiciel permet d'évaluer

la température d'ébullition et l'enthalpie de vaporisation de la benzocaïne à  $T_b = 583,8 \pm 15$  K (b : ébullition) et  $\Delta_{L \rightarrow \text{vap}}H = 55,16 \pm 3$  kJ mol<sup>-1</sup>.

L'application de l'expression générale de la tension de vapeur en fonction de la température (Eq. 2.3.18) au cas de benzocaïne en phase liquide conduit à l'équation suivante :

$$\text{Tension de vapeur : } \ln(P_{L \rightarrow \text{vap}}) = \frac{-55160}{RT} + 22,88 \quad \text{Eq. 7.10}$$

Au point triple II-L-Vap, la forme solide II, le liquide et la vapeur sont en équilibre ; ce qui veut dire que la tension de vapeur du solide II est égale à celle de la phase liquide. L'équation 7.10 est utilisée pour calculer la valeur (96 Pa) de la tension de vapeur du liquide à  $T_{\text{II} \rightarrow \text{L}}$  (362,4 K =  $T_{\text{II-L-Vap}}$ ). Cette valeur est utilisée pour trouver l'enthalpie de sublimation de la forme II ( $\Delta_{\text{II} \rightarrow \text{vap}}H$ ), qui est égale à la somme de l'enthalpie d'évaporation ( $\Delta_{L \rightarrow \text{vap}}H$ ) et de l'enthalpie de fusion ( $\Delta_{\text{II} \rightarrow \text{L}}H$ ) :  $\Delta_{\text{II} \rightarrow \text{vap}}H = \Delta_{L \rightarrow \text{vap}}H + \Delta_{\text{II} \rightarrow \text{L}}H = 78445$  J mol<sup>-1</sup>. En utilisant cette valeur d'enthalpie de sublimation, la constante de sublimation  $B_{\text{II} \rightarrow \text{vap}}$  peut être calculée ( $B_{\text{II} \rightarrow \text{vap}} = 30,60$ ) et conduire ainsi à l'expression suivante pour la pression de sublimation de la forme II en fonction de la température :

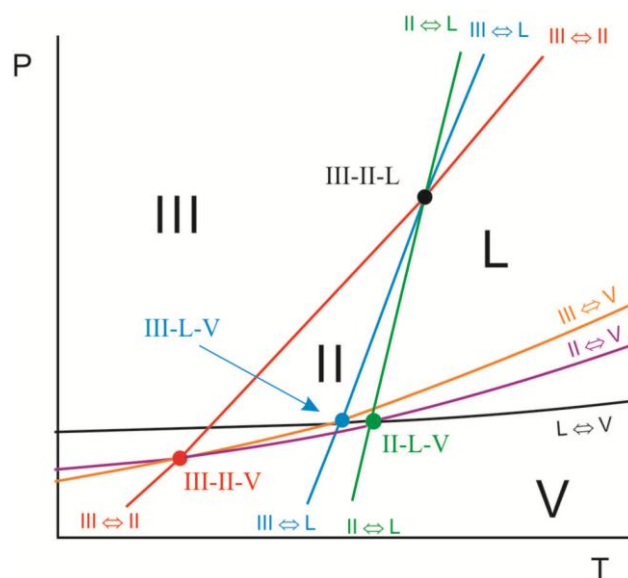
$$\text{Pression de sublimation de la forme II : } \ln(P_{\text{II} \rightarrow \text{vap}}/Pa) = \frac{-78445}{RT} + 30,60 \quad \text{Eq. 7.11}$$

La même approche peut être appliquée pour la pression de sublimation de la forme III :  $P_{\text{III} \rightarrow \text{vap}}$  ( $T_{\text{III} \rightarrow \text{L}} = T_{\text{III-L-Vap}} = 359,6$  K) = 84 Pa,  $\Delta_{\text{III} \rightarrow \text{vap}}H = \Delta_{L \rightarrow \text{vap}}H + \Delta_{\text{III} \rightarrow \text{L}}H = 78946$  J mol<sup>-1</sup>, et la constante de sublimation,  $B_{\text{III} \rightarrow \text{vap}}$ , devient 30,83. Il en résulte l'expression suivante pour la pression de sublimation de la forme III :

$$\text{Pression de sublimation de la forme III : } \ln(P_{\text{III} \rightarrow \text{vap}}/Pa) = \frac{-78946}{RT} + 30,83 \quad \text{Eq. 7.12}$$

On peut utiliser soit l'équation 7.11 soit 7.12 pour calculer la pression de sublimation de la forme III et la forme II à la température de la transition solide-solide II-III (265,3 K) et ainsi obtenir la pression de vapeur égale à 0,007 Pa à cette température.

De cette façon, les courbes de sublimation des deux formes solides II et III de la benzocaïne sont rajoutées au diagramme de phases topologique P-T (Figure 7-10).



**Figure 7-10. Courbes de sublimation des deux formes solides II et III dans le diagramme de phases topologique P-T de la benzocaïne**

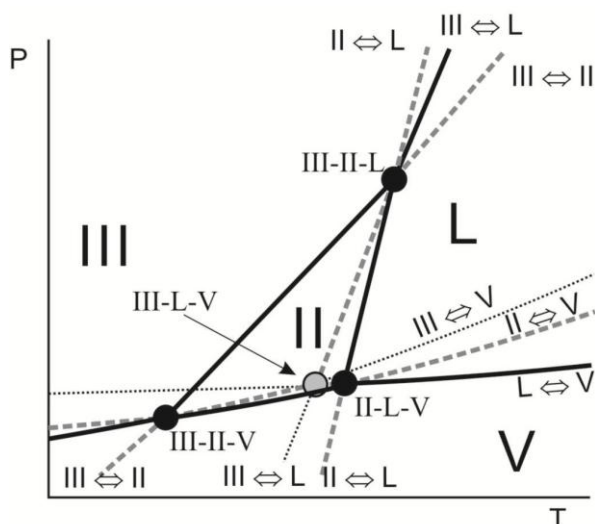
Ces derniers calculs permettent de compléter les données concernant les points triples dont les coordonnées sont trouvées dans le tableau 7-XII.

**Tableau 7-XII : Coordonnées des points triples dans le diagramme de phases pression-température des formes solides II et III de la benzocaïne**

Point triple	Température /K	Pression /Pa
III-II-Vap	265	0,007
III-L-Vap	360	84
II-L-Vap	362	96
III-II-L	439	$463 \times 10^6$

### 7.5.5. Diagramme topologique complet incluant les deux formes II et III de la benzocaïne

L'ensemble de ces résultats permet de construire le diagramme de phases topologique P-T comportant les formes II et III de la benzocaïne (Figure 7-11).



**Figure 7-11. Diagramme de phases topologique pression-température complet montrant la hiérarchie de stabilité des polymorphes III et II de la benzocaïne et présentant toutes les courbes d'équilibres et les points triples entre les phases III, II, L et Vap**

Vap = phase vapeur représentée par V dans le diagramme.

Lignes continues noires : équilibres de phases les plus stables, lignes discontinues grises : équilibres de phases métastables et lignes pointillées : équilibres supermétastables. Cercles en noir : points triples stables, cercles en gris : points triples métastables. Les équilibres de phases ont été marqués par III-II, III-L, III-V, II-L, II-V et L-V et les points triples par III-II-V, III-II-L, III-L-V et II-L-V. Si un équilibre entre deux phases (ligne) croise un point triple (cercle), la hiérarchie de stabilité de cet équilibre doit changer. Exemple : l'équilibre supermétastable III-V dans la partie droite du diagramme (ligne pointillée) passe à travers le point triple métastable III-L-V (cercle gris) et devient métastable (ligne grise discontinue), ensuite il passe à travers le point triple stable III-II-V (cercle noir) et devient stable (ligne noire continue), la courbe de sublimation de la forme solide III.

Le diagramme de phases représenté sur la figure 7.11 représente les relations thermodynamiques entre les formes II et III de la benzocaïne et entre leur liquide et leur vapeur. Au cours de ce travail, et malgré les essais de cristallisation répétés, la forme I de la benzocaïne n'a pas pu être obtenue et donc, à part les données déjà disponibles dans la littérature incluant la structure cristalline et les valeurs incertaines de la température et de l'enthalpie de transition, aucune donnée supplémentaire n'a été trouvée. Par conséquent, cette forme n'a pas pu être incorporée dans ce diagramme de phases.

## 7.6. Conclusions

Une transition entre la forme monoclinique  $P2_1$  précédemment reportée (forme III) et la forme orthorhombique  $P2_12_12_1$  (forme II) de la benzocaïne a été observée pour la première

fois. Cette transition se produit à une température de  $265,3 \pm 0,5$  K et est accompagnée d'une variation d'enthalpie de  $3,0 \pm 1,0$  J g<sup>-1</sup>.

Les courbes d'équilibre III-II et II-L dans le diagramme de phases pression-température ont été obtenues expérimentalement par analyse thermique différentielle à haute pression (HP-DTA). Elles se croisent à 439 K et 463 MPa, coordonnées du point triple III-II-L. En utilisant ces coordonnées, la position de l'équilibre III-L a été ensuite déterminée, permettant ainsi la construction d'un diagramme topologique de phases complet incluant les phases III, II, liquide et vapeur de la benzocaïne.

Il est surprenant de noter que la forme I n'a pas été obtenue au cours de l'étude malgré les essais répétés de cristallisation. Cet échec rappelle ce que Dunitz et Bernstein ont nommé «disappearing polymorphs» (polymorphes évanescents) [7.21]. Les données calorimétriques limitées disponibles dans la littérature concernant cette forme indiquent pourtant qu'elle pourrait être la phase la plus stable des trois phases solides connues de la benzocaïne sous conditions ordinaires de pression et de température. Cependant, même si cette forme I s'avérait être la forme la plus stable, les relations d'équilibre entre les autres phases présentées dans figure 7.11 resteraient valides.

**REFERENCES**

- [7.1] Ritsert, E., 1925. Development of anesthesine. *Pharm. Ztg.* 70, 1006-1008.
- [7.2] Chan, E.J., Welberry, T.R., Goossens, D.J., Heerdegen, A.P., Beasly, A.G., Chupas, P.J., 2009b. Single-crystal diffuse scattering studies on polymorphs of molecular crystals. I. The room-temperature polymorphs of the drug benzocaïne. *Acta Crystallogr. B* 65, 382-392.
- [7.3] Sinha, B.K., Patabhi, V., 1987. Crystal-structure of benzocaïne – a local-anesthetic. *Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.)* 98, 229-234.
- [7.4] Gruno, M., Wulff, H., Pfflegel, P., 1993. Polymorphism of benzocaïne. *Pharmazie* 48, 834-837.
- [7.5] Lynch, D.E., McClenaghan, I., 2002. Monoclinic form of ethyl 4-aminobenzoate (benzocaïne). *Acta Crystallogr. E* 58, O708-O709.
- [7.6] Chan, E.J., Rae, A.D., Welberry, T.R., 2009a. On the polymorphism of benzocaïne: a low temperature structural phase transition for form (II). *Acta Crystallogr. B* 65, 509-515.
- [7.7] Schmidt, A.C., 2005. Structural characteristics and crystal polymorphism of three local anaesthetic bases – crystal polymorphism of local anesthetic drugs: part VII. *Int. J. Pharm.* 298, 186-197.
- [7.8] Schwartz, P.A., Paruta, A.N., 1976. Solution thermodynamics of alkyl-para-aminobenzoates. *J. Pharm. Sci.* 65, 252-257.
- [7.9] Manzo, R.H., Ahumada, A.A., 1990. Effects of solvent medium on solubility. 5. Enthalpic and entropic contributions of the free-energy changes of disubstituted benzene-derivatives in ethanol water and ethanol cyclohexane mixtures. *J. Pharm. Sci.* 79, 1109-1115.
- [7.10] Yalkowsky, S.H., Slunick, T.G., Flunn, G.L., 1972. Importance of chain-length on physicochemical and crystalline properties of organic homologs. *J. Pharm. Sci.* 61, 852-857.
- [7.11] Pena, M.A., Bustamante, P., Escaler, B., reillo, A., Bosque-Sendra, J.M., 2004. Solubility and phase separation of benzocaine and salicylic acid in 1,4-dioxane-water mixtures at several temperatures. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36, 571-578.
- [7.12] Nordstrom, F.L., Rasmuson A.C., 2009. Prediction of solubility curves and melting properties of organic and pharmaceutical compounds. *Eur. J. Pharm. Sci.* 36, 330-344.

- [7.13] Chickos, J.S., Nichols, G., Ruelle, P., 2002. The estimation of melting points and fusion enthalpies using experimental solubilities, estimated total phase change entropies, and mobile order and disorder theory. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 42, 368-374.
- [7.14] Garmroodi, A., Hassan, J., Tamini, Y., 2004. Solubilities of the drugs benzocaïne, metronidazole benzoate, and naproxene in supercritical carbon dioxide. *J. Chem. Eng. Data* 49, 709-712.
- [7.15] Neau, S.H., Flynn, G.L., Yalkowsky, S.H., 1989. The influence of heat-capacity assumptions on the estimation of solubility parameters from solubility data. *Int. J. Pharm.* 49, 223-229.
- [7.16] Neau, S.H., Flynn, G.L., 1990. Solid and liquid heat-capacities of normal-alkyl para-aminobenzoates near the melting-point. *Pharm. Res.* 7, 1157-1162.
- [7.17] Ceolin, R., Rietveld, I.B., 2010. Phenomenology of polymorphism and topological pressure-temperature diagrams. Description of the phase relationship involving Atovaquone polymorphs I and III. *J. Therm. Anal. Calorim.* 102, 357-360.
- [7.18] Rietveld, I.B., Barrio, M., Do, B., Tamarit, J.L., Ceolin, R., 2012. Overall stability for the ibuprofen racemate: experimental and topological results leading to the pressure-temperature phase relationships between its racemate and conglomerate. *J. Phys. Chem. B* 116, 5568-5574.
- [7.19] Rietveld, I.B., Perrin, M.A., Toscani, S., Barrio, M., Nicolai, B., Tamarit, J.L., Ceolin, R., 2013. Liquid-liquid miscibility gaps in drug-water binary systems: crystal structure and thermodynamic properties of prilocaïne and the temperature-composition phase diagram of the prilocaïne-water system. *Mol. Pharmaceut.* 10, 1332-1339.
- [7.20] ACDLabs, Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) software, V11.02 ed. ACD/Labs.
- [7.21] Dunitz, J.D., Bernstein, J., 1995. Disappearing polymorphs. *Acc. Chem. Res.* 28, 193-200.



## Chapitre 8.

### **Evaluation de la stabilité chimique et de la stabilité physique par mesures expérimentales et par approche topologique du chlorhydrate de cystéamine.**

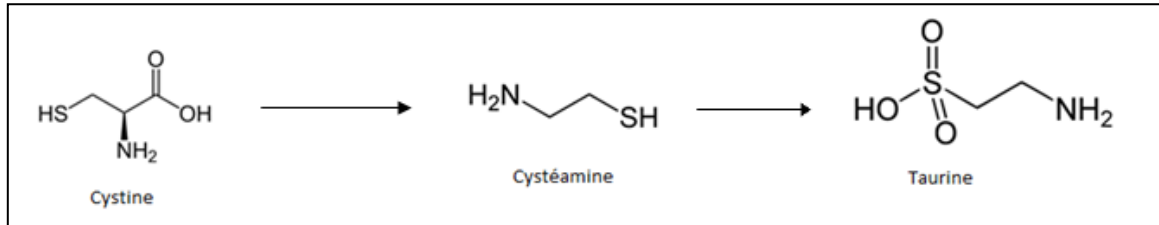
CHAPITRE 8. EVALUATION DE LA STABILITE CHIMIQUE ET DE LA STABILITE PHYSIQUE PAR MESURES EXPERIMENTALES ET PAR APPROCHE TOPOLOGIQUE DU CHLORHYDRATE DE CYSTEAMINE. ....	172
8.1. Introduction .....	174
8.2. Données de la littérature.....	175
8.3. Résultats .....	177
8.3.1. Comportement thermique.....	177
8.3.2. Diffraction des rayons X et expansion thermique .....	180
8.3.2.1. Comparaison des diagrammes de diffraction des rayons X de poudre, obtenus à différentes températures .....	180
8.3.2.2. Résolution de la structure cristalline de la nouvelle forme III.....	181
8.3.2.3. Variation des volumes de la maille élémentaire des formes I et III du chlorhydrate de cystéamine en fonction de la température .....	183
8.3.3. Analyse thermique différentielle à haute pression .....	185
8.3.4. Etude du comportement du chlorhydrate de cystéamine vis-à-vis de l'humidité .....	187
8.3.5. Etude de la sensibilité du chlorhydrate de cystéamine à la chaleur .....	190
8.4. Discussion .....	192
8.4.1. Comparaison de la conformation de la nouvelle structure avec celles des deux autres formes connues.....	192
8.4.2. Construction topologique du diagramme de phases P-T du chlorhydrate de cystéamine.....	193
8.4.2.1. Positions relatives des températures de transition I-III et de fusion III-L .....	193
8.4.2.2. Pente de la droite représentant l'équilibre I-III et inégalité des volumes spécifiques des différentes formes .....	194

---

8.4.2.3. Courbe pression-température de l'équilibre de fusion de la forme III (III-L) .....	196
8.4.2.4. Détermination des points triples I-III-L et I-L-Vap.....	197
8.4.2.5. Courbe P-T de l'équilibre de fusion de la forme I (I-L).....	199
8.4.2.6. Diagramme de phases pression-température complet, incluant les formes I et III du chlorhydrate de cystéamine, et conséquences topologiques. ....	201
8.5. Conclusions .....	203
REFERECES .....	205

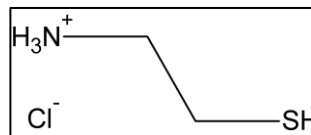
### 8.1. Introduction

La cystéamine est le plus simple aminothiols stable. C'est un produit de la dégradation par décarboxylation de l'acide aminocystéine et un intermédiaire dans le schéma de biosynthèse de la taurine (Figure 8-1).



**Figure 8-1. Cystéamine, produit de dégradation la cystine et intermédiaire de synthèse de la taurine**

Elle est utilisée en thérapeutique sous forme de sel de l'acide chlorhydrique, dans le traitement de la cystinose. De nom chimique chlorure de cysteaminium, improprement nommé chlorhydrate de 2-aminoéthanthiol (Figure 8-2) ou encore chlorhydrate de cystéamine, ce sel présente la formule brute  $C_2H_7NS \cdot HCl$  et une masse molaire de  $113,61 \text{ g mol}^{-1}$ .



**Figure 8-2. Structure chimique développée du chlorhydrate de cystéamine ( $113,7 \text{ g mol}^{-1}$ ) montrant le transfert du proton de l'acide chlorhydrique transformant la fonction amine  $-NH_2$  de la cystéamine en fonction ammonium  $-NH_3^+$**

La cystinose est une maladie autosomale récessive rare. Il s'agit d'une maladie métabolique, appelée cystinose néphropathique, caractérisée par une accumulation intralysosomale excessive de l'acide aminé cystine suite à un dysfonctionnement de son transporteur membranaire. Cette accumulation de cystine provoque une altération de plusieurs organes comme les reins, les yeux, les muscles, le pancréas et le cerveau.

Le chlorhydrate de cystéamine réagit avec la cystine en clivant ses ponts disulfures, produisant ainsi des molécules pouvant être évacuées des cellules lysosomiques au moyen d'un transporteur de lysine et, par conséquent, abaisser les concentrations intracellulaires de cystine [8.1-8.3]. Commercialisé sous forme de gélules (Cystagon<sup>®</sup>) ou de collyre (Cystadrops<sup>®</sup>), le chlorhydrate de cystéamine est utilisé par voie orale ou oculaire et est

indiqué dans le traitement de fond des cystinoses néphropathiques. Récemment, la commission européenne a attribué au chlorhydrate de cystéamine la désignation de médicament orphelin dans le traitement des cystinoses (EU/3/14/1314).

Dans ce chapitre, le cas du chlorhydrate de cystéamine sera présenté comme un exemple de combinaison d'études de la stabilité chimique et de la stabilité physique. Le travail décrit dans ce chapitre a pour but de déterminer la stabilité chimique d'échantillons de chlorhydrate de cystéamine après analyse de leur stabilité physique. La stabilité physique consiste non seulement dans l'étude du polymorphisme et la construction de son diagramme de phases par approche topologique et par mesures directes expérimentales, mais aussi dans l'étude de son comportement vis-à-vis de l'humidité.

## 8.2. Données de la littérature

A ce jour, deux structures cristallines du chlorhydrate de cystéamine ont été publiées [8.4, 8.5] dont les données cristallographiques et les paramètres de maille sont présentés dans les tableaux 8-I et 8-II. Une forme triclinique a été caractérisée par diffraction des rayons X sur mono-cristaux à 145 K (Figure 8-3). Ces cristaux ont été obtenus à partir du 1-butanol après deux semaines de cristallisation à 4°C (277 K) [8.4]. Selon les auteurs, l'isopropanol et le n-propanol peuvent aussi être employés pour la cristallisation de la forme triclinique [8.4]. Une forme monoclinique a été décrite en 2010 [8.5]. Le cristal correspondant a été trouvé dans un échantillon commercial et mesuré tel quel par diffraction des rayons X sur mono-cristaux à 173 K (Figure 8-4) [8.5]. Aucune information sur la relation entre ces deux formes solides n'a été fournie dans la littérature. Lahiani-Skiba et al. ont mentionné une valeur entre 70,2 et 70,7 °C ( $\approx 343,6$  K) pour le point de fusion du chlorhydrate de cystéamine mais sans indication de la structure cristalline de l'échantillon étudié. Les données calorimétriques collectées par Scifinder<sup>®</sup> (au 30 avril 2014) conduisent à une température moyenne de fusion égale à 69,7 °C (342,8 K) variant entre 64 et 72 °C et, une fois encore, les formes cristallines n'ont pas été spécifiées.

En fonction de ces données, une nomenclature est proposée pour nommer les deux formes cristallines connues afin de faciliter la discussion ultérieure. La forme présentant la structure monoclinique est nommée forme I et celle qui présente la structure triclinique est nommée forme II.

**Tableau 8-I : Données cristallographiques des deux formes du chlorhydrate de cystéamine extraites de la littérature**

Forme	Groupe d'espace	T /K	Z	$V_{\text{spéc}} / \text{cm}^3 \text{g}^{-1}$	Référence
II	Triclinique P-1	145	4	0,7402	[8.4]
I	Monoclinique $P2_1/c$	173	4	0,7429	[8.5]

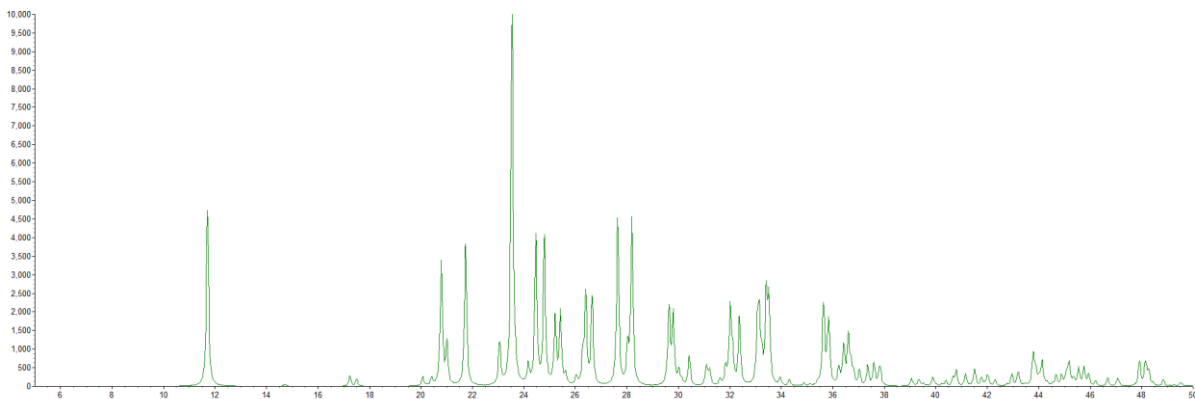
$V_{\text{spéc}}$  : volume spécifique, Z : nombre d'unités formulaires par maille élémentaire. La température T/K est celle à laquelle ont été collectées les données utiles pour la résolution de la structure cristalline.

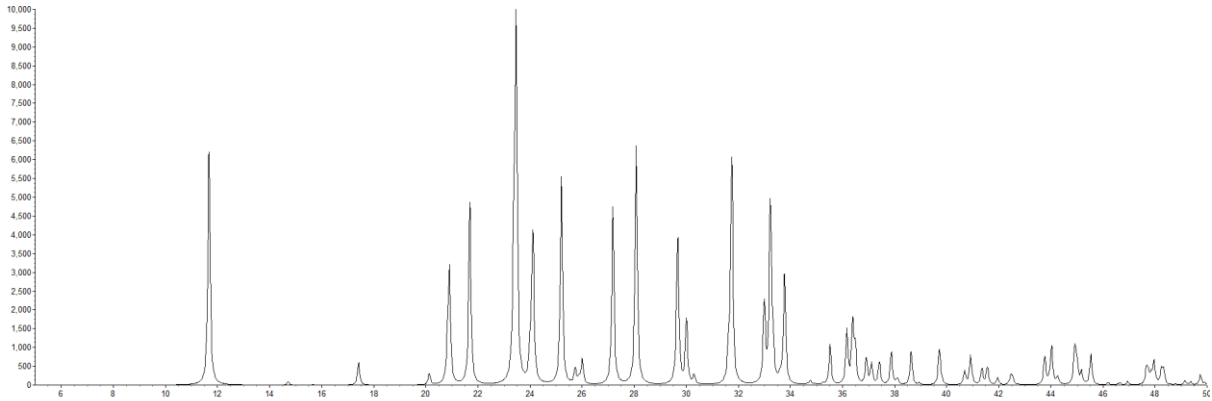
**Tableau 8-II : Paramètres de maille des polymorphes I et II du chlorhydrate de cystéamine disponibles dans la littérature**

Polymorphe étudié	Forme I	Forme II
Référence	[8.5]	[8.4]
Groupe d'espace	$P2_1/c$	P-1
a /Å	7,7441(4)	8,540(4)
b /Å	8,4931(5)	8,659(4)
c /Å	8,7126(5)	8,990(4)
$\alpha /^\circ$		107,12(3)
$\beta /^\circ$	101,962(4)	117,08(3)
$\gamma /^\circ$		90,00(3)
$V_{\text{élé}} / \text{Å}^3$	560,60(5)	558,6(2)

$V_{\text{élé}}$  : volume de la maille élémentaire,

Les chiffres entre parenthèses représentent les incertitudes.

**Figure 8-3. Diagramme de diffraction X de la poudre de la forme triclinique, d'après sa structure résolue à 145 K**

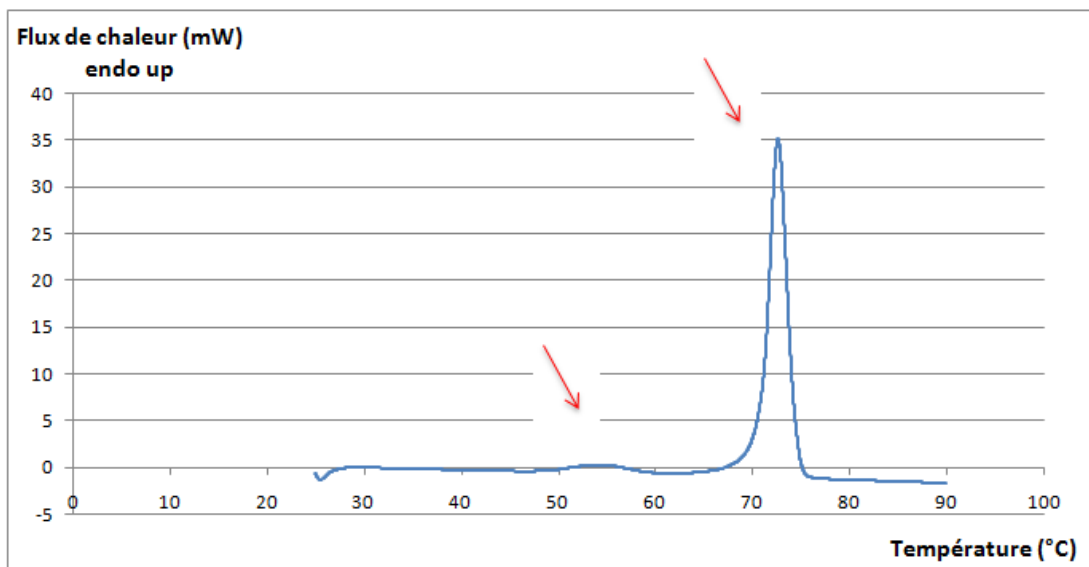


**Figure 8-4. Diagramme de diffraction X de la poudre de la forme monoclinique d'après sa structure résolue à 173 K**

### 8.3. Résultats

#### 8.3.1. Comportement thermique

Un échantillon commercial de chlorhydrate de cystéamine a été analysé par calorimétrie différentielle à balayage (Differential Scanning Calorimetry, DSC). Deux endothermes ont été observés ; un pic endothermique, de faible intensité, correspondant à une transition solide-solide suivi, à température plus élevée, par un deuxième pic correspondant à la fusion (Figure 8-5)

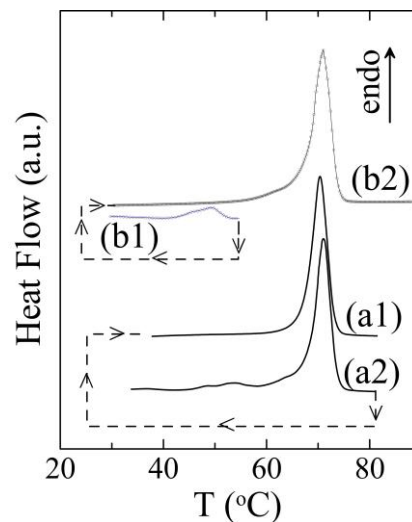


**Figure 8-5. Thermogramme d'un échantillon de chlorhydrate de cystéamine, enregistré avec une vitesse de chauffage de  $2 \text{ K min}^{-1}$**

Différentes quantités de chlorhydrate de cystéamine (2-10 mg) et différentes vitesses de chauffage (0,2 à 10 K min<sup>-1</sup>) ont été utilisés pour déterminer les données calorimétriques correspondant aux deux transitions. D'après ces expériences, la fusion débute à  $340,4 \pm 0,5$  K (67,3 °C) avec une enthalpie de fusion de  $141,6 \pm 6,7$  J g<sup>-1</sup>. A une température inférieure, un autre endotherme correspondant à une transition solide-solide est observé aux alentours de 322 K (49 °C) avec une enthalpie de  $9,9 \pm 1,8$  J g<sup>-1</sup>.

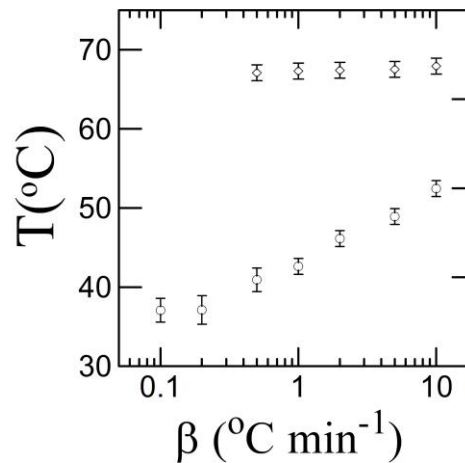
Le refroidissement enregistré juste après la fin de la transition solide-solide ne montre aucun effet exothermique. Par ailleurs, si ce refroidissement est aussitôt suivi par un deuxième cycle de chauffage depuis l'ambiante jusqu'à une température supérieure à la fusion, la transition solide-solide n'est plus observée (Figure 8-6, b1 et b2). Après fusion et recristallisation à température ambiante, seul le pic de fusion est observé au cours d'un ultime chauffage dont l'enregistrement fournit une température et une enthalpie de fusion comparables à celles obtenues lors du premier chauffage (Figure 8-6, a1 et a2).

Il convient de noter que la température de fusion est indépendante de la vitesse de chauffage alors que la température du début ( $T_{\text{onset}}$ ) du petit pic endothermique correspondant à la transition solide-solide en dépend, ainsi que le montre la figure 8-7. Cette température tend vers une valeur minimale à des vitesses de chauffage faibles (0,1 K min<sup>-1</sup>). C'est cette valeur, égale à 310 K (37 °C), qui sera considérée dans ce qui suit comme étant la véritable température de transition.



**Figure 8-6. Comportement thermique d'un échantillon commercial de chlorhydrate de cystéamine**

La forme commerciale fond après un petit endotherme (Courbe a2). Le pic à faible intensité ne réapparaît pas après refroidissement de la matière fondue suivi d'un nouveau chauffage (Courbe a1). Il ne réapparaît pas en chauffant après un refroidissement juste après le premier endotherme (Courbes b1 et b2).



**Figure 8-7. Variation de la température des deux endothermes enregistrés lors du premier chauffage d'un échantillon commercial de chlorhydrate de cystéamine en fonction de la vitesse de chauffage**

En haut : endotherme de fusion et en bas : endotherme de transition solide-solide. La température du premier endotherme prend la valeur  $310 \pm 1 \text{ K}$  ( $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ). «  $\beta$  » désigne la vitesse de chauffage.

Les données calorimétriques relatives aux transitions observées lors du chauffage d'échantillons commerciaux de chlorhydrate de cystéamine sont résumées dans le tableau 8-III.

**Tableau 8-III : Données calorimétriques (T : température,  $\Delta h$  : enthalpie) correspondant à la transition solide-solide et à la fusion observées sur des échantillons commerciaux de chlorhydrate de cystéamine**

	Transition solide-solide	Fusion
<b>T /<math>^{\circ}\text{C}</math></b>	37	67,3
<b>T /K</b>	310	340,4
<b><math>\Delta h</math> /J g<math>^{-1}</math></b>	9,9	141,6

Une analyse thermogravimétrique (ATG) a été réalisée sur un échantillon commercial de chlorhydrate de cystéamine et n'a montré aucune perte de poids dans l'intervalle de température allant de 25 à 100 $^{\circ}\text{C}$ .



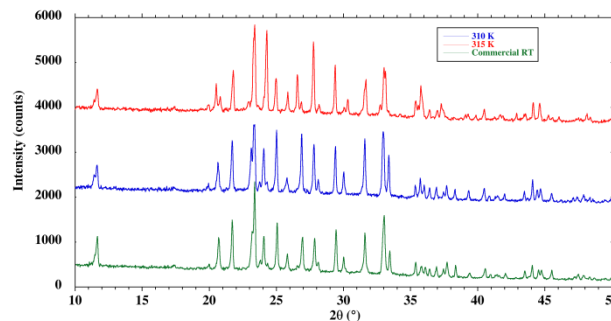
### 8.3.2. Diffraction des rayons X et expansion thermique

#### 8.3.2.1. Comparaison des diagrammes de diffraction des rayons X de poudre, obtenus à différentes températures

Un échantillon de poudre commerciale de chlorhydrate de cystéamine a été analysé par diffraction des rayons X à haute résolution. A température ambiante, le diffractogramme obtenu est strictement identique à celui qui est calculé à partir de la structure cristalline monoclinique, correspondant à la forme I (Figures 8-4 et 8-8).

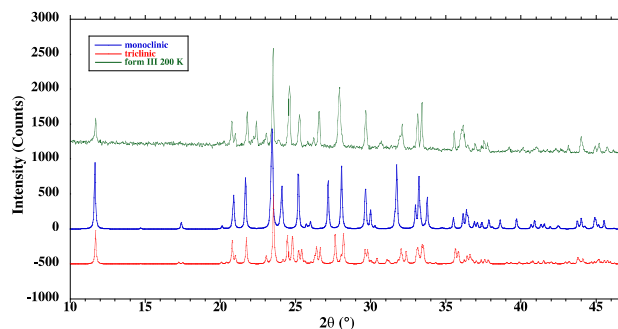
A partir de 310 K, un changement dans le diffractogramme est observé, indiquant qu'un changement dans la structure cristalline survient à partir de cette température ainsi que le montre la superposition des diffractogrammes de la figure 8-8. La nouvelle structure cristalline, dont le diffractogramme est obtenu à 200 K, ne correspond ni à la forme monoclinique ni à la forme triclinique comme indiqué dans la figure 8-9, mettant en évidence une nouvelle forme de chlorhydrate de cystéamine qu'il a fallu ainsi dénommer forme III.

La température de transition observée par diffraction des rayons X est concordante avec celle observée par DSC, pour laquelle la valeur minimale a été trouvée égale à 310 K.



**Figure 8-8. Comparaison des diffractogrammes d'un échantillon commercial de chlorhydrate de cystéamine**

En vert : forme I à température ambiante (298 K), en bleu : à 310 K, en rouge : à 315 K après transition. (longueur d'onde  $\lambda(\text{Cu-K}\alpha 1) = 1,5406 \text{ \AA}$ ).

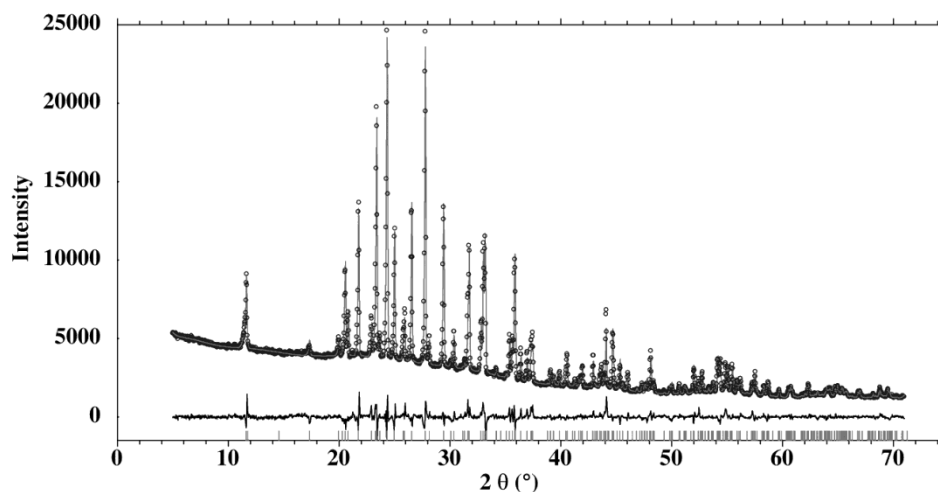


**Figure 8-9. Comparaison des diffractogrammes calculés de la forme II triclinique (en rouge) et de la forme I monoclinique (en bleu) avec celui obtenu après chauffage jusqu'à 318 K puis refroidissement jusqu'à 200 K (en vert)**

Au-dessous de 200 K, la forme III se transforme en forme II triclinique, qui revient en forme III au-dessus de 200 K. Cependant, une température de transition précise entre ces deux formes n'a pas été obtenue.

### 8.3.2.2. Résolution de la structure cristalline de la nouvelle forme III

La résolution de la structure cristalline de la nouvelle forme II du chlorhydrate de cystéamine a été effectuée à partir du diagramme de diffraction des rayons X de poudre à température ambiante (Section 3.6.) en utilisant la méthode de Rietveld. Les résultats de l'affinement sont illustrés par la figure 8-10 et les facteurs d'accord obtenus sont représentés dans le tableau 8-IV. L'empilement cristallin dans la maille élémentaire de la forme III est montré dans la figure 8-11 ainsi que la conformation de la molécule.

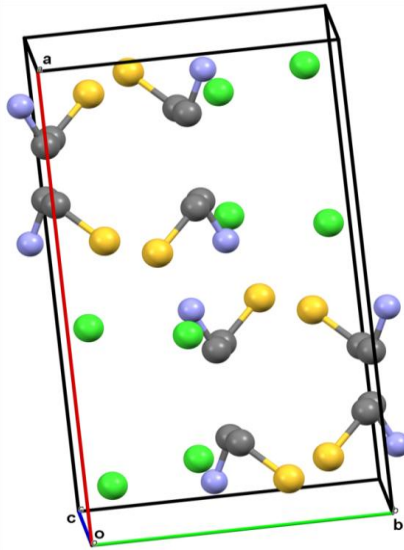


**Figure 8-10. Affinement de Rietveld de la structure cristalline de la forme III du chlorhydrate de cystéamine**

La ligne continue représente le résultat de l'affinement, les points dispersés représentent le diffractogramme expérimental. La ligne inférieure représente leur différence.

**Tableau 8-IV : Facteurs d'accord de l'affinement de Rietveld**

Facteur	Test statistique de l'ajustement (goodness-of-fit)	Résidu de profil non pondéré	Résidu de profil pondéré	Facteur isotrope de déplacement atomique
Notation	$\chi^2$	$R_p$	$R_{wp}$	$B_{iso}$
Valeur	2.604	18.072	16.711	2.98(14) Å <sup>2</sup>

**Figure 8-11. Maille élémentaire et empilement cristallin de la forme III du chlorhydrate de cystéamine monoclinique  $I2/a$** 

Couleurs des atomes : vert = Cl, jaune = S, bleu = N, noir = C. Les atomes d'hydrogène n'ont pas été représentés pour des raisons de clarté.

Les paramètres du réseau cristallin de la nouvelle forme III du chlorhydrate de cystéamine de structure monoclinique et de groupe d'espace  $I2/a$ , sont rassemblés dans le tableau 8-V.

**Tableau 8-V : Données cristallographiques obtenues pour la nouvelle forme III du chlorhydrate de cystéamine à température ambiante**

a / Å	b / Å	c / Å	$\beta$ / °	Z	$V_{\text{élém}}$ / Å <sup>3</sup>
15,5222(5)	8,6384(3)	8,7007(3)	101,556(2)	8	1143,00(6)

$V_{\text{élém}}$  : volume de la maille élémentaire

### 8.3.2.3. Variation des volumes de la maille élémentaire des formes I et III du chlorhydrate de cystéamine en fonction de la température

Des spectres (diffractogrammes) de diffraction des rayons X d'une poudre de la forme commerciale du chlorhydrate de cystéamine ont été enregistrés à différentes températures. Les résultats sont présentés dans les tableaux 8-VI et 8-VII. Selon ces résultats, les paramètres de maille de la forme commerciale de chlorhydrate de cystéamine correspondent à la forme I, et ceci dans l'intervalle de température allant de 150 à 293 K.

**Tableau 8-VI : Paramètres de la maille élémentaire, en fonction de la température, pour la forme I du chlorhydrate de cystéamine**

T /K	a /Å	b /Å	c /Å	$\beta$ /°	V /Å <sup>3</sup>
120	7,7358(3)	8,4615(3)	8,7036(3)	102,039(3)	557,18(3)
150	7,7404(4)	8,4771(5)	8,7080(5)	101,993(5)	558,91(5)
170	7,7481(3)	8,4924(3)	8,7152(3)	101,934(3)	561,06(4)
173 <sup>a</sup>	7,744(1)	8,493(1)	8,713(1)	101,96(1)	560,597
200	7,7502(3)	8,5100(3)	8,7185(3)	101,857(4)	562,75(4)
220	7,7564(3)	8,5253(3)	8,7260(3)	101,788(3)	564,84(3)
250	7,7592(3)	8,5458(3)	8,7305(3)	101,674(3)	566,94(4)
250	7,7609(3)	8,5480(2)	8,7324(3)	101,668(3)	567,34(3)
250	7,7588(8)	8,5440(7)	8,7251(8)	101,691(7)	566,40(9)
270	7,7635(3)	8,5649(3)	8,7378(3)	101,572(3)	569,20(4)
290	7,7648(3)	8,5828(3)	8,7437(3)	101,45(3)	571,12(4)
292,75	7,7671(3)	8,5872(4)	8,7449(4)	101,418(4)	571,72(4)
292,75	7,7645(2)	8,5885(2)	8,7441(2)	101,413(2)	571,57(2)
300	7,7659(4)	8,5930(4)	8,7467(4)	101,380(4)	572,21(4)
305	7,7656(4)	8,5988(3)	8,7480(4)	101,339(4)	572,75(4)
310	7,7663(4)	8,6045(4)	8,7498(4)	101,291(4)	573,39(5)

<sup>a</sup> structure publiée par Ahmad et al. [8.1]

**Tableau 8-VII : Paramètres de la maille élémentaire, en fonction de la température, pour la (nouvelle) forme III du chlorhydrate de cystéamine**

T /K	a /Å	b /Å	c /Å	$\beta$ /°	V /Å <sup>3</sup>
120	15,468(7)	8,466(4)	8,694(5)	102,10(4)	1113,2(9)
120	15,471(8)	8,461(4)	8,694(5)	102,10(4)	1113(1)
200	15,505(1)	8,5587(6)	8,6710(6)	102,270(7)	1124,3(2)
220	15,4978(9)	8,5665(6)	8,6728(6)	102,166(5)	1125,6(1)
250	15,5170(5)	8,5917(3)	8,6846(3)	101,966(3)	1132,65(6)
250	15,512(2)	8,5856(8)	8,624(8)	101,959(7)	1131,2(2)
270	15,5229(5)	8,5856(8)	8,6925(3)	101,812(3)	1137,10(7)
293	15,5235(5)	8,6348(3)	8,6996(3)	101,584(3)	1142,33(6)
293	15,5255(3)	8,6359(2)	8,7001(2)	101,577(2)	1142,75(4)
293	15,5226(5)	8,6666(4)	8,6989(2)	101,580(2)	1142,17(6)
293	15,5268(4)	8,6378(2)	8,7020(2)	101,568(2)	1143,4(4)
293	15,5268(4)	8,6615(5)	8,7019(2)	101,566(2)	1143,39(5)
293	15,5222(5)	8,5665(6)	8,7007(3)	101,556(2)	1143,00(6)
315	15,5259(8)	8,6687(3)	8,7100(5)	101,358(5)	1148,4(1)
318	15,5218(7)	8,7003(4)	8,7088(5)	101,339(5)	1148,6(1)
320	15,5188(5)	8,6795(4)	8,7094(3)	101,308(3)	1148,90(7)
325	15,5192(7)	8,6870(4)	8,7144(4)	101,246(4)	1151,27(9)
330	15,5150(7)	8,6095(3)	8,7184(4)	101,118(5)	1154,18(9)
335	15,5159(7)	8,6384(3)	8,7164(4)	101,183(4)	1152,5(9)
338	15,5136(7)	8,6378(2)	8,7182(4)	102,069(5)	1154,8(1)

A partir des données du tableau 8-IV, la variation du volume spécifique de la forme I,  $v_I$  (T) en  $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$  en fonction de la température en K, est exprimée selon l'équation suivante :

$$v_I(T) = 0,7320(17) + 3,1(1,6) \times 10^{-5} \times T + 1,9(4) \times 10^{-7} \times T^2 \quad \text{Eq. 8.1}$$

Cette expression présente un écart type global de  $4,2 \times 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  dans l'intervalle de température considéré et un coefficient de corrélation de 0,997.

A partir des données du tableau 8-V, la variation du volume spécifique de la forme III,  $v_{III}$  (T) en  $\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$ , en fonction de la température en K, est exprimée selon l'équation suivante :

$$v_{\text{III}}(T) = 0,735(2) - 1,5(1,4) \times 10^{-5} \times T + 3,1(3) \times 10^{-7} \times T^2 \quad \text{Eq. 8.2}$$

Cette expression présente un écart type global de  $5,6 \times 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  dans l'intervalle de température considéré et un coefficient de corrélation de 0,996.

A des fins de comparaison, les quelques données disponibles concernant les volumes de la maille élémentaire de la forme II triclinique, présentées dans le tableau 8-VIII, permettent d'obtenir une expression pour la variation de son volume spécifique dans l'intervalle de température allant de 120 à 220 K. Cette expression est la suivante:

$$v_{\text{II}}(T) = 0,737(3) - 4,3(3,4) \times 10^{-5} \times T + 4,3(1) \times 10^{-7} \times T^2 \quad \text{Eq. 8.3}$$

Elle présente un écart type global de  $2,4 \times 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  dans l'intervalle de température considéré et un coefficient de corrélation de 0,999.

**Tableau 8-VIII : Paramètres de la maille élémentaire en fonction de la température pour la forme II triclinique du chlorhydrate de cystéamine**

T /K	a /Å	b /Å	c /Å	$\alpha$ /°	$\beta$ /°	$\gamma$ /°	V /Å <sup>3</sup>
120	8,518(3)	8,650(4)	9,251(4)	106,60(3)	120,09(2)	89,86(3)	557,0(5)
120	8,518(4)	8,651(4)	9,252(5)	106,56(3)	120,07(3)	89,87(3)	557,3(5)
145 <sup>a</sup>	8,540(4)	8,659(4)	8,990(4)	107,12(3)	117,08(3)	90,00(3)	558,625
170	8,5464(5)	8,6642(5)	9,0102(6)	107,180(4)	117,101(4)	90,042(3)	560,21(6)
220	8,578(2)	8,675(1)	9,150(2)	107,1(1)	118,24(1)	89,97(2)	565,0(2)

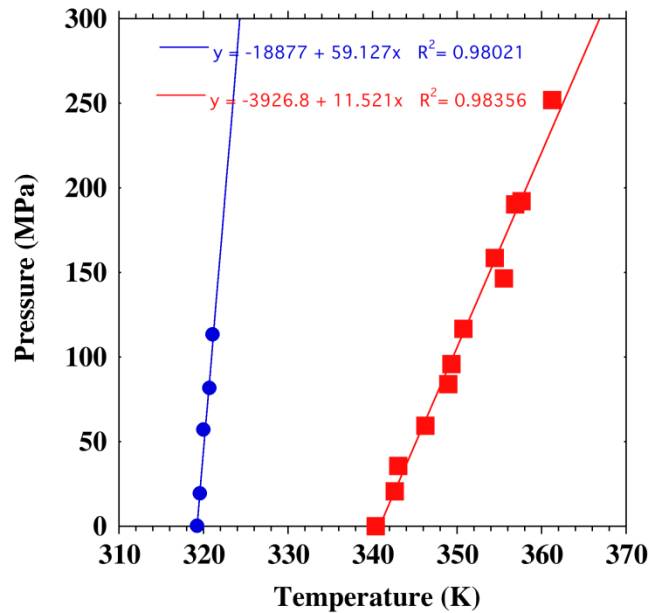
<sup>a</sup> publiée par Kataoka et al. [8.2].

### 8.3.3. Analyse thermique différentielle à haute pression

L'influence de la pression sur les transitions observées du chlorhydrate de cystéamine a été étudiée par analyse thermique différentielle à haute pression (HP-ATD). Les résultats sont présentés dans le tableau 8-IX et sont tracés dans la figure 8-12.

**Tableau 8-IX : Température de transition I→III ( $T_{I\rightarrow III}$ ) et température de fusion de la forme III ( $T_{III\rightarrow L}$ ) du chlorhydrate de cystéamine en fonction de la pression (P) hydrostatique appliquée**

<b>P</b> <b>/MPa</b>	0	19,16	56,83	81,51	113,22							
<b><math>T_{I-III}</math></b> <b>/K</b>	319,29	319,65	320,05	320,75	321,15							
<b>P</b> <b>/MPa</b>	0	20,61	35,6	59,48	95,78	83,95	116,77	146,42	158,62	192,11	190,36	251,86
<b><math>T_{III-L}</math></b> <b>/K</b>	340,4	342,65	343,05	346,25	349,33	348,95	350,75	355,55	354,45	357,65	356,87	361,25



**Figure 8-12. Température de transition I→III (cercles bleus) et température de fusion de la forme III (carrés rouges) du chlorhydrate de cystéamine en fonction de la pression appliquée par analyse thermique différentielle à haute pression**

Les résultats obtenus conduisent aux expressions suivantes pour les courbes d'équilibre en fonction de la pression (MPa) et de la température (K) :

$$\text{Courbe I-III : } P(T) = -19(2) \times 10^3 + 59(5) \times T \quad \text{Eq. 8.4}$$

$$\text{Courbe III-L : } P(T) = -3,93(16) \times 10^3 + 11,5(5) \times T \quad \text{Eq. 8.5}$$

### **8.3.4. Etude du comportement du chlorhydrate de cystéamine vis-à-vis de l'humidité**

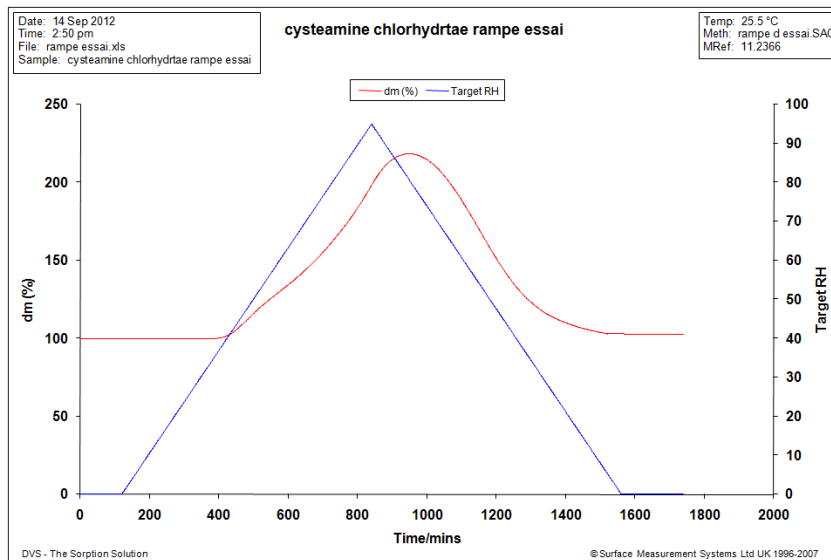
La sensibilité du chlorhydrate de cystéamine à l'eau a été étudiée à travers son comportement vis-à-vis de l'humidité.

D'abord, des essais d'hygroscopicité statique ont été réalisés sur des échantillons de chlorhydrate de cystéamine à 75, 45 et 35% d'humidité relative (Relative Humidity, RH). Les résultats obtenus ont montré que le chlorhydrate de cystéamine devient déliquescent dès le premier jour lorsqu'il est exposé à 75% d'humidité relative, mais seulement au troisième jour lors d'expositions quand les taux sont égaux à 45 et à 35%. Ceci montre que le chlorhydrate de cystéamine est sensible à l'humidité.

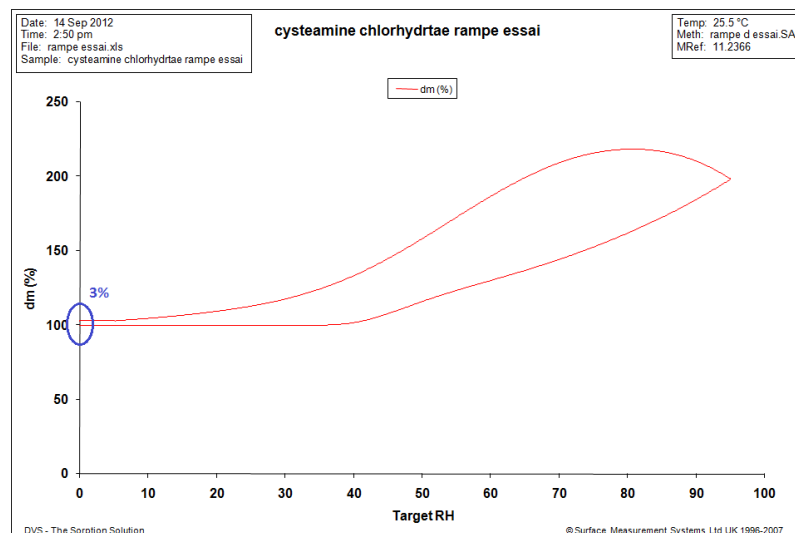
Ensuite, ces résultats ont été affinés par une étude gravimétrique d'hygroscopicité sous humidité relative dynamique (mesure de la masse de vapeur d'eau adsorbée –Dynamic Vapor Sorption, DVS, en anglais) (Section 3.5.2.1.) à la température de 25°C, maintenue constante.

Les essais de DVS ont été réalisés sur des échantillons de chlorhydrate de cystéamine suivant un cycle de sorption de 0 à 100% RH suivi d'un cycle de désorption de 100 à 0%RH par paliers de 10% (Section 3.5.2.2.). Les résultats montrent que la masse de l'échantillon reste constante jusqu'à 30% de RH, commence à augmenter entre 30 et 40% pour pratiquement doubler à 90% de RH (Figure 8-13). Au cours du cycle de désorption, la masse diminue progressivement et revient presque la valeur initiale (3% de plus par rapport à la masse initiale) comme le montre la Figure 8-14.





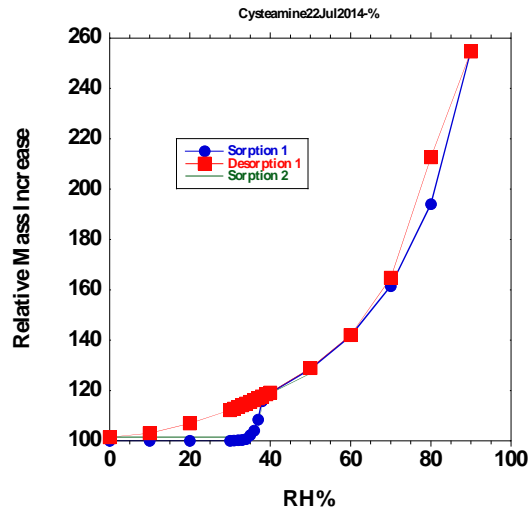
**Figure 8-13. Comportement d'un échantillon de chlorhydrate de cystéamine vis-à-vis de la vapeur d'eau lors d'un cycle au cours duquel le taux d'humidité relative varie, à 25 °C, de 0 à 90 % puis de 90 à 0 %**



**Figure 8-14. Variation de la masse d'un échantillon de chlorhydrate de cystéamine en fonction du taux d'humidité relative (RH)**

La partie inférieure de la courbe correspond à une humidité relative croissante, la partie supérieure correspond à une humidité relative décroissante.

D'autres essais d'analyse gravimétrique d'adsorption-désorption de vapeur d'eau ont été réalisés avec, entre 30 et 40 % RH, des paliers de 1% aussi bien en adsorption qu'en désorption. Les résultats sont présentés dans la figure 8-15.



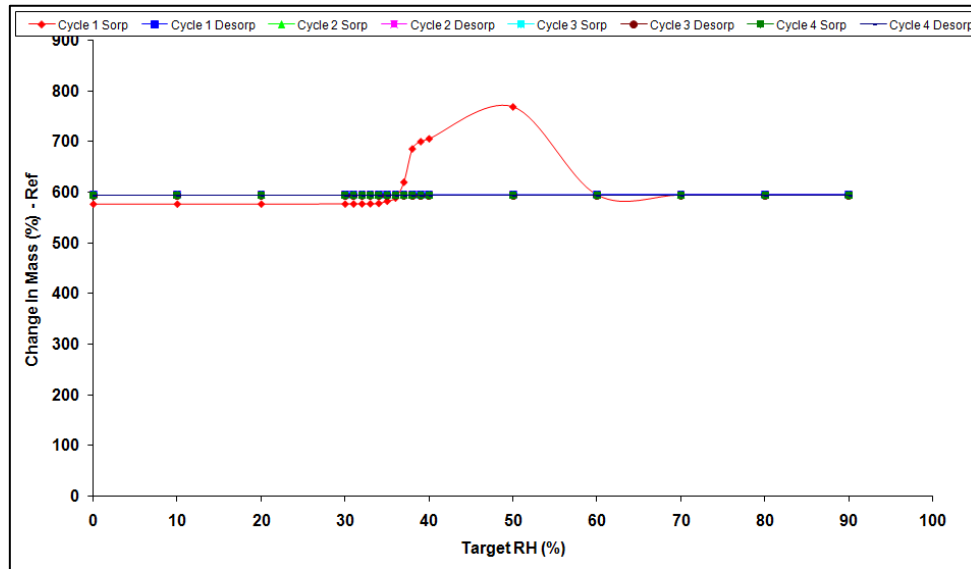
**Figure 8-15. Sensibilité du chlorhydrate de cystéamine à la vapeur d'eau à 25 °C**

En bleu : en fonction d'une humidité relative croissante. En rouge : en fonction d'une humidité relative décroissante.

La figure 8-15 montre que la masse de l'échantillon ne change pas jusqu'à 35% de RH et qu'à partir de cette valeur, elle augmente brusquement par absorption d'eau. Ce résultat montre qu'à température ambiante, le chlorhydrate de cystéamine n'est pas hygroscopique tant que le taux d'humidité relative n'atteint pas 35%. A partir de cette valeur, on observe une augmentation brusque de la masse d'échantillon, suivie par une augmentation plus faible, qui s'accélère progressivement avec le taux d'humidité. L'allure de la courbe isotherme d'adsorption entre 35 et 39% RH pourrait correspondre soit à une étape de dissolution soit une étape de formation d'un hydrate. Afin de choisir entre ces deux hypothèses, un échantillon constitué par un mélange de forme I et d'un excès d'eau a été soumis à la diffraction des rayons X. Malgré une longue durée d'exposition aux rayons X (plus de 5 heures), aucune modification du diffractogramme caractéristique de la forme I du chlorhydrate de cystéamine n'a été observée. Un tel résultat permet, sans ambiguïté, d'exclure l'hypothèse de la formation d'un hydrate lors de l'augmentation soudaine de la masse entre 35 et 39% RH. Cette dernière peut alors être attribuée à un processus de dissolution complète, suivie d'une étape de dilution correspondant à l'augmentation plus lente et progressive de la masse de l'échantillon. Il faut enfin remarquer que, lors de la désorption, il existe un retard (hystérèse) à la perte d'eau adsorbée qui demeure présente alors qu'elle aurait dû disparaître dès que l'humidité relative devient inférieure à 35%.

D'autre part, un deuxième échantillon de chlorhydrate de cystéamine a été exposé à l'humidité en utilisant le même programme décrit précédemment sans l'étape de désorption. Le résultat, présenté sur la figure 8-16, montre que la courbe présente la même allure entre 35

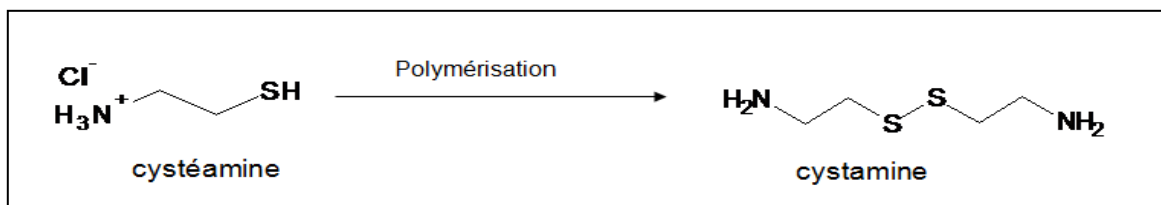
et 39% RH suivie par une augmentation de la masse de l'échantillon jusqu'à 50% RH. A partir de ce taux, la masse diminue progressivement et atteint le poids de départ à 60% RH. Ce résultat peut être attribué à une transformation du chlorhydrate de cystéamine pouvant correspondre à une éventuelle formation de cystamine, impureté majeure de la cystéamine. Cette hypothèse a été confirmée par une analyse infrarouge.



**Figure 8-16. Variation de la masse d'un échantillon de chlorhydrate de cystéamine en fonction du taux de l'humidité relative de 0 à 90 %**

### 8.3.5. Etude de la sensibilité du chlorhydrate de cystéamine à la chaleur

Une des impuretés connues de la cystéamine est la cystamine, obtenue par dimérisation (Figure 8-17). La matière première du chlorhydrate de cystéamine est considérée conforme (c'est-à-dire utilisable pour un usage médical) si la cystamine est présente à un taux inférieur à 0,2%.



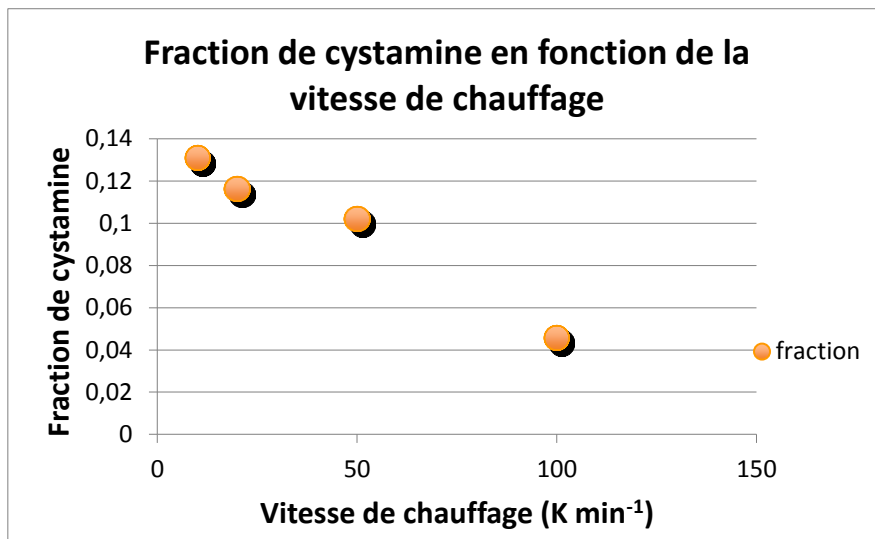
**Figure 8-17. Formation de la cystamine par dimérisation de la cystéamine**

Pour étudier la sensibilité du chlorhydrate de cystéamine vis-à-vis de la chaleur, des échantillons ont été portés à différentes températures par analyse thermique différentielle

(Section 3.4.1.) puis, après retour à la température ambiante, analysés par chromatographie liquide à haute performance (CLHP ou, en anglais, High Pressure Liquid Chromatography, HPLC).

Tout d'abord, l'analyse par CLHP couplée à un détecteur UV (High Performance Liquid Chromatography, HPLC-UV) (Section 3.3.1.2.) a été réalisée sur des échantillons chauffés jusqu'à 60°C (juste après la transition solide-solide et avant la fusion) et sur d'autres échantillons chauffés jusqu'à 90°C (après la fusion). Le pourcentage de cystamine présente dans ces échantillons a été calculé selon la méthode de normalisation d'air. Ce taux a été trouvé égal à 0,83% juste après la transition solide-solide et à 11,8% après la fusion.

Ensuite, d'autres échantillons de chlorhydrate de cystéamine ont subi des chauffages à différentes vitesses jusqu'à la fusion. Ils ont ensuite été mis en solution pour être analysés par HPLC couplée à la spectrométrie de masse en tandem (High Pressure Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry, HPLC-MS<sup>n</sup>). Par rapport à un témoin n'ayant pas subi de traitement thermique, les spectres de masse des échantillons étudiés montrent la présence de cystamine dont la fraction par rapport à la cystéamine semble dépendre de la vitesse de chauffage. En effet, les résultats présentés dans la figure 8-18 montrent que cette fraction diminue quand la vitesse de chauffage augmente.



**Figure 8-18. Fraction de cystamine dans des échantillons de chlorhydrate de cystéamine soumis à l'analyse thermique jusqu'à fusion complète à des vitesses de chauffage croissantes**

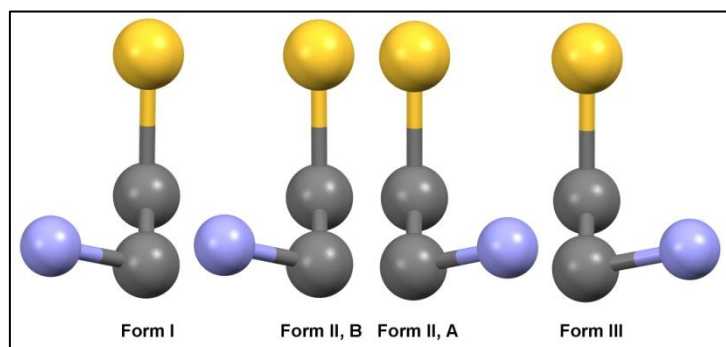
Ces résultats montrent que le chlorhydrate de cystéamine est sensible à la chaleur. Porté à une température voisine de 100°C (juste après la fusion), environ 13% de l'échantillon se

transforme en cystamine. Toutefois, cette transformation de cystéamine à cystamine est d'autant plus lente que l'exposition à la chaleur est brève : le pourcentage de dégradation passe de 13 % à  $10 \text{ K min}^{-1}$  à 4,5 % à une vitesse de chauffage de  $100 \text{ K min}^{-1}$ .

## 8.4. Discussion

### 8.4.1. Comparaison de la conformation de la nouvelle structure avec celles des deux autres formes connues

La cystéamine ne présente, dans les structures cristallines de son chlorhydrate, qu'un seul angle de torsion en ne tenant pas compte des atomes d'hydrogène (Figure 8-19). Dans ces trois formes, la conformation de l'angle de torsion (comportant les atomes d'azote et de soufre) est une conformation gauche. L'angle de torsion est de  $+61,49(15)^\circ$  dans la forme I et de  $-65,2(4)^\circ$  dans la forme III. Ces deux angles de torsion sont présents dans la forme II dont la structure comporte deux types de molécules de cystéamine : la molécule A avec un angle de torsion de  $-60,3(6)^\circ$  et la molécule B dont l'angle de torsion vaut  $+60,7(6)^\circ$  (Figure 8-18).



**Figure 8-19. Les différentes conformations de la cystéamine dans les trois formes cristallines de son chlorhydrate. Dans la forme triclinique II, les deux conformations A et B coexistent**

La conformation dans la forme III est clairement différente de celle observée dans forme I (Figure 8-19). La forme triclinique II, dans laquelle les deux conformations coexistent, semble ainsi être un intermédiaire entre la forme I et la forme III.

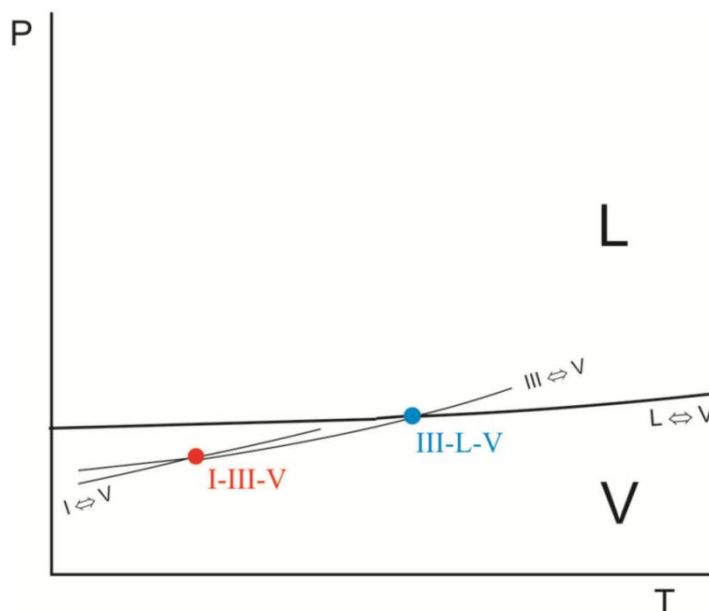
## 8.4.2. Construction topologique du diagramme de phases P-T du chlorhydrate de cystéamine

### 8.4.2.1. Positions relatives des températures de transition I-III et de fusion III-L

Les données présentées dans le tableau 8-II permettent d'envisager la construction au moins partielle d'un diagramme de phases pression-température (Figure 8-20). Ces températures des transitions I-III et III-L ont été mesurées par DSC et peuvent donc être respectivement confondues avec les points triples I-III-Vap et III-L-Vap puisque obtenues en utilisant des capsules comportant un volume mort non nul que sature la phase vapeur.

Le point triple III-L-Vap est placé sur la droite représentant l'équilibre diphasé L-Vap puisque la forme solide est en équilibre avec la forme liquide à la fusion. La phase solide est aussi en équilibre avec la phase vapeur et donc le point triple III-L-Vap doit en même temps se situer sur la droite correspondant à l'équilibre diphasé III-Vap représenté par la ligne III-V dans la figure 8-20.

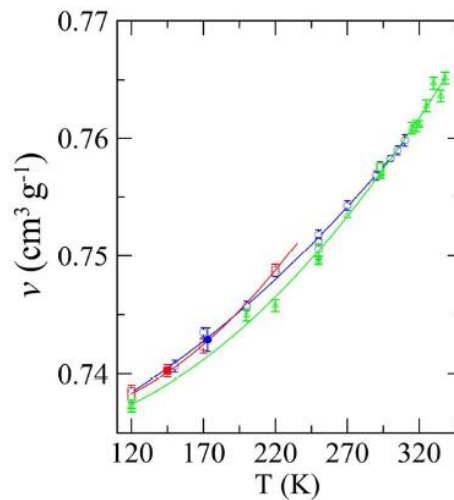
Comme le montre également la figure 8-20, le point triple I-III-Vap est le croisement de trois courbes : les courbes I-V, III-V représentant les équilibres diphasés I-Vap, III-Vap et la courbe (non dessinée) représentant l'équilibre I-III qui sera discuté ultérieurement.



**Figure 8-20. Positions relatives des deux points triples I-III-Vap et III-L-Vap dans le diagramme de phases P-T. (V = vapeur)**

#### 8.4.2.2. Pente de la droite représentant l'équilibre I-III et inégalité des volumes spécifiques des différentes formes

Les volumes spécifiques des trois formes I, II et III du chlorhydrate de cystéamine, représentés dans la figure 8-21, ont été déterminés en fonction de la température (Tableaux 8-IV, 8-V et 8-VI).



**Figure 8-21. Volumes spécifiques ( $v$ ) des trois formes cristallines du chlorhydrate de cystéamine en fonction de la température**

Cercles bleus : forme I, carrés rouges : forme II et triangles verts : forme III. Les symboles remplis correspondent à des valeurs extraites de la littérature.

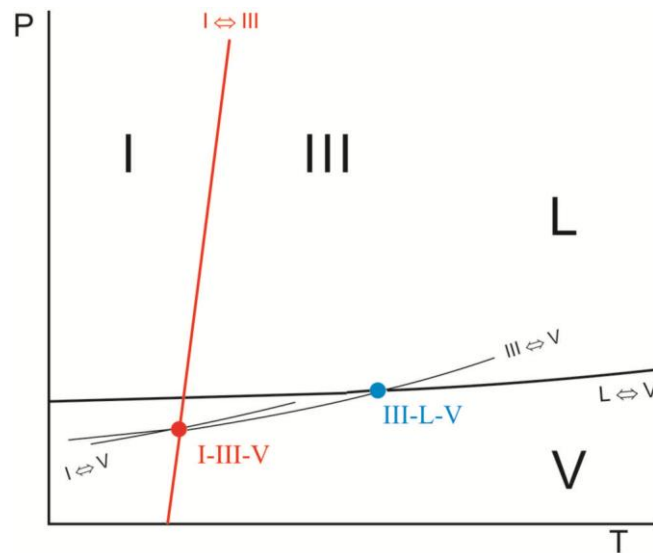
Même si les mesures ont été obtenues par diffraction de rayons X haute résolution, les volumes sont tellement proches qu'il n'est pas possible de déterminer le signe des inégalités entre les volumes des trois phases solides.

La figure 8-21 montre qu'il est difficile de déterminer les inégalités de volume entre les trois phases. En effet, les différences de volume semblent plus petites que l'erreur sur les mesures. Cette observation est renforcée par les valeurs des écarts types globaux fournis par les équations exprimant les variations des volumes spécifiques en fonction de la température (Eq. 8.1, 8.2 et 8.3). Cependant, l'inégalité (ou au moins son signe) peut être obtenue avec certitude grâce à l'équation de Clapeyron (Eq. 2.3.3).

En effet, la pente de l'équilibre I-III a été trouvée égale à  $59 \pm 5 \text{ MPa K}^{-1}$  (Eq. 8.4). De plus, la différence d'enthalpie entre les deux phases I et III est aussi connue et est égale à  $9,9 \pm 1,8 \text{ J g}^{-1}$ . Enfin, la température de transition a été déterminée à  $37 \text{ °C}$  ( $310 \pm 1 \text{ K}$ ).

En utilisant ces données, la différence entre le volume de la forme I et celui de la forme III est calculable par l'équation de Clapeyron (Eq. 2.3.3) qui donne  $\Delta_{I \rightarrow III} v = 5,4(1,1) \times 10^{-4} \text{ cm}^{-3} \text{ g}^{-1}$ . Ce résultat montre que la différence de volume lors de la transformation de la forme I en forme III est faible et positive, et donc que la forme III possède un volume un peu plus grand que celui de la forme I. Il est aussi clair que l'inégalité du volume serait du même ordre de grandeur que les erreurs globales calculées pour les volumes spécifiques des formes I et III en fonction de la température ( $4,2 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-3} \text{ g}^{-1}$  et  $5,6 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-3} \text{ g}^{-1}$  pour les équations 8.1 et 8.2 respectivement). D'autre part, la pente très forte de la courbe d'équilibre I-III (Figure 8-12) conduit aux mêmes observations et indique aussi que la transition est principalement dépendante de la chaleur c'est-à-dire gouvernée par l'entropie (entropy-driven, en anglais), puisque sa dépendance à la pression est très faible.

La droite représentative de l'équilibre diphasé I-III permet de déterminer les positions relatives des deux formes solides du chlorhydrate de cystéamine dans le diagramme de phases P-T (Figure 8-22). La forme I est stable dans la région des "basses" températures, la forme III devient stable à "haute" température.



**Figure 8-22. Positions relatives des formes I et III du chlorhydrate de cystéamine dans le diagramme de phases P-T**



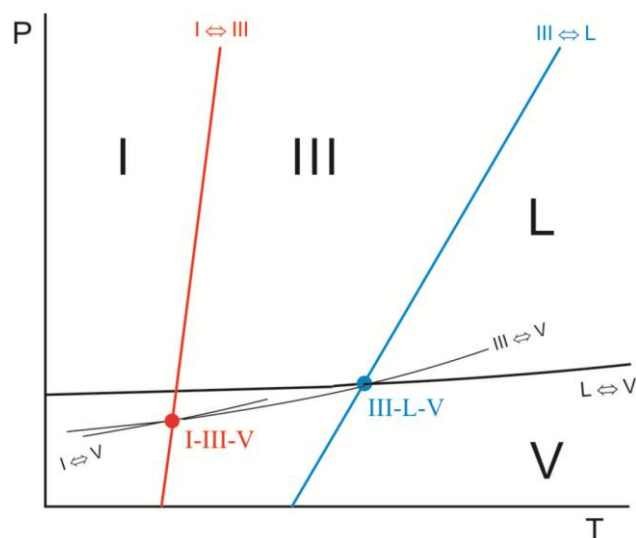
### 8.4.2.3. Courbe pression-température de l'équilibre de fusion de la forme III (III-L)

D'une part, les mesures HP-DTA ont conduit à une pente de  $11,5 \pm 0,5 \text{ MPa K}^{-1}$  pour l'équilibre III-L (Eq. 8.5). D'autre part, la transition III→L a été observée, à pression ordinaire par DSC, à une température de  $67,3 \text{ °C}$  ( $340,4 \text{ K}$ ) avec une enthalpie de fusion égale à  $142 \pm 7 \text{ J g}^{-1}$ .

Concernant les données volumétriques, l'inégalité entre volume de la forme solide III et celui du liquide est calculable par l'équation de Clapeyron (Eq. 2.3.3) en utilisant les valeurs de la pente de l'équilibre, de l'enthalpie et de la température mentionnées ci-dessus. Cette différence ( $\Delta_{\text{III} \rightarrow \text{L}} v$ ) est égale à  $0,0361 \pm 0,0026 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ .

Le volume de la forme III ( $v_{\text{III}}$ ) à sa température de fusion, calculé en utilisant l'équation 8.2, est égal à  $0,766 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ . Le volume spécifique du liquide ( $v_{\text{L}}$ ) au point de fusion, calculé selon  $v_{\text{L}} = \Delta_{\text{III} \rightarrow \text{L}} v + v_{\text{III}}$ , est égal à  $0,802 \pm 0,005 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ . Selon ces résultats, l'expansion thermique à la fusion est trouvée égale à 4,7%. Cette valeur est relativement faible en comparaison avec le pourcentage moyen qui, selon la littérature, est d'environ 11% (Section 2.3.4.). Cette différence pourrait être s'expliquer par le fait que le chlorhydrate de cystéamine est un composé fortement ionisé.

La courbe de l'équilibre de fusion de la forme III (III-L) est placée dans le diagramme de phases P-T (Figure 8-23).



**Figure 8-23. Positionnement de l'équilibre de fusion de la forme III du chlorhydrate de cystéamine dans le diagramme de phases P-T**

#### 8.4.2.4. Détermination des points triples I-III-L et I-L-Vap

- Point triple I-III-L

Selon la figure 8-12, l'intersection extrapolée des deux courbes I-III et III-L, doit se situer à pression négative. Ceci veut dire aussi que les courbes représentant ces deux équilibres divergent quand la pression augmente et donc que les formes I et III sont énantiotropes, possédant chacune un domaine d'existence stable à n'importe quelle pression positive.

L'intersection des deux équilibres de phase I-III et III-L représente le point triple où les formes I, III et liquide sont en équilibre. Ce point triple est calculable en utilisant les expressions correspondant aux équilibres pression-température I-III et III-L (Eq. 8.4 et 8.5), en supposant que les courbes exprimant ces équilibres sont des droites (Section 2.3.6.). L'égalité entre les deux équations 8.4 et 8.5 conduit aux coordonnées suivantes pour le point triple I-III-L :  $T = 314 \text{ K}$  et  $P = -309 \text{ MPa}$ . Le point triple ainsi défini se situe juste au-dessus de la température ambiante, mais à une pression négative relativement grande (Figure 8-24).

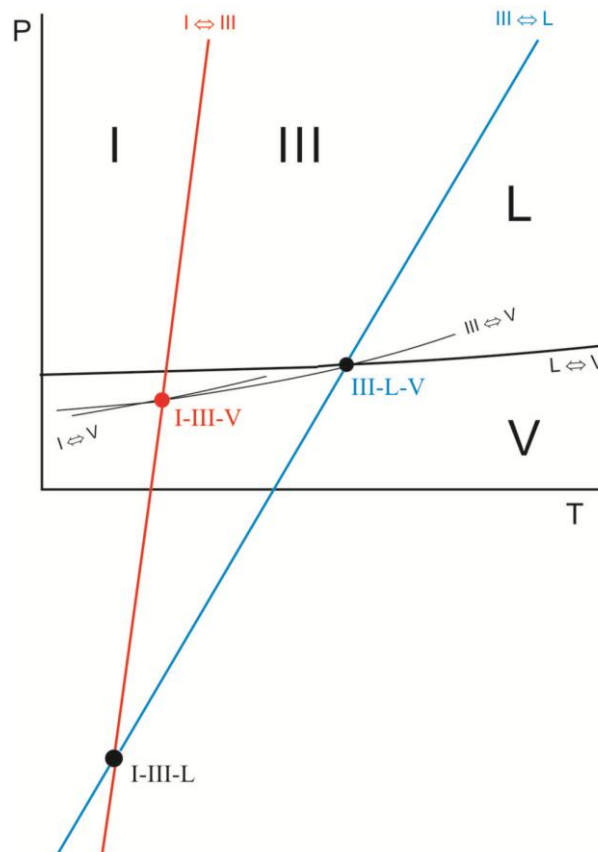


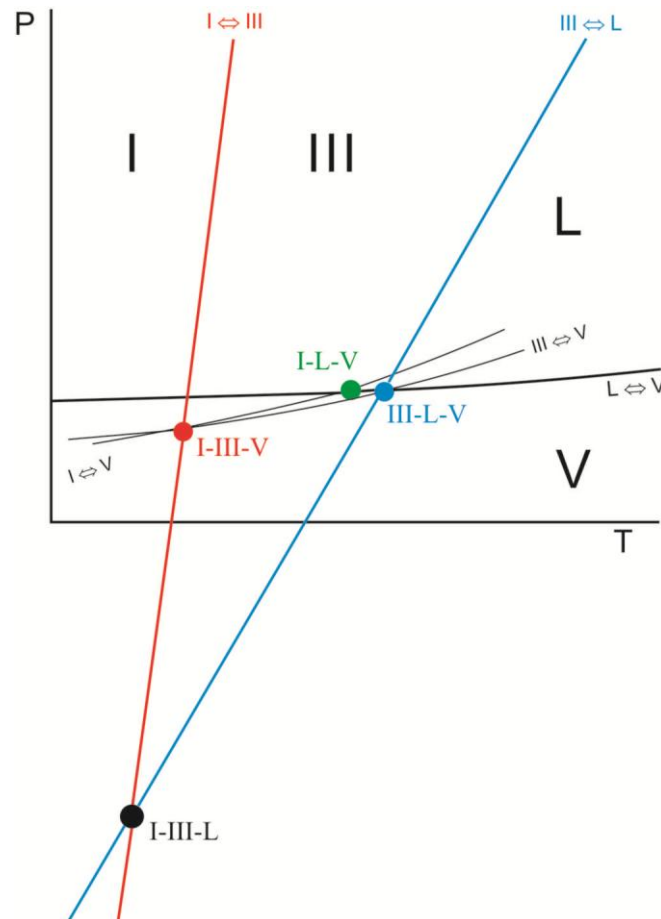
Figure 8-24. Intersection des deux courbes d'équilibres I-III et III-L

- Point triple I-L-Vap

Même si le point de fusion de la forme I n'est pas observé puisqu'elle se convertit en forme III avant de fondre, l'équilibre entre la forme I et le liquide existe, du point de vue thermodynamique, sous forme d'un équilibre métastable dont la température  $T_{I \rightarrow L}$  peut être déterminée au moyen de l'équation 2.3.15.

Il faut pour cela utiliser les valeurs de  $\Delta_{III \rightarrow L}h$ , l'enthalpie de fusion de la forme III,  $T_{III \rightarrow L}$ , la température de fusion de la forme III sous conditions ordinaires,  $T_{I \rightarrow III}$ , la température de transition de la forme I en forme III et  $\Delta_{I \rightarrow III}h$ , l'enthalpie associée à cette transition. Ces données, rassemblées dans le tableau 8-II et incorporées dans l'équation 2.3.15, conduisent à une valeur de 338,3 K (65,1 °C) pour le point de fusion de la forme I, juste en-dessous du point de fusion observé de la forme III. Ce résultat est cohérent puisque la forme I est une forme métastable et donc ne peut pas fondre à une température supérieure à celle de la forme III. Comme expliqué dans la section 2.3.6., cette température de fusion peut être considérée comme étant celle du point triple I-L-Vap ayant les coordonnées  $T = 338,3$  K  $P = 0$  MPa (Figure 8-25).

Ce point triple est alors placé sur la courbe représentant l'équilibre L-Vap puisque la forme solide est en équilibre avec la forme liquide à la fusion. La phase solide est aussi en équilibre avec la phase vapeur et donc le point triple I-L-Vap doit aussi se situer sur la courbe correspondant à l'équilibre diphasé I-Vap, représenté par la ligne I-V sur la figure 8-25.



**Figure 8-25. Positionnement du point triple I-L-Vap dans le diagramme de phases P-T du chlorhydrate de cystéamine (V = vapeur)**

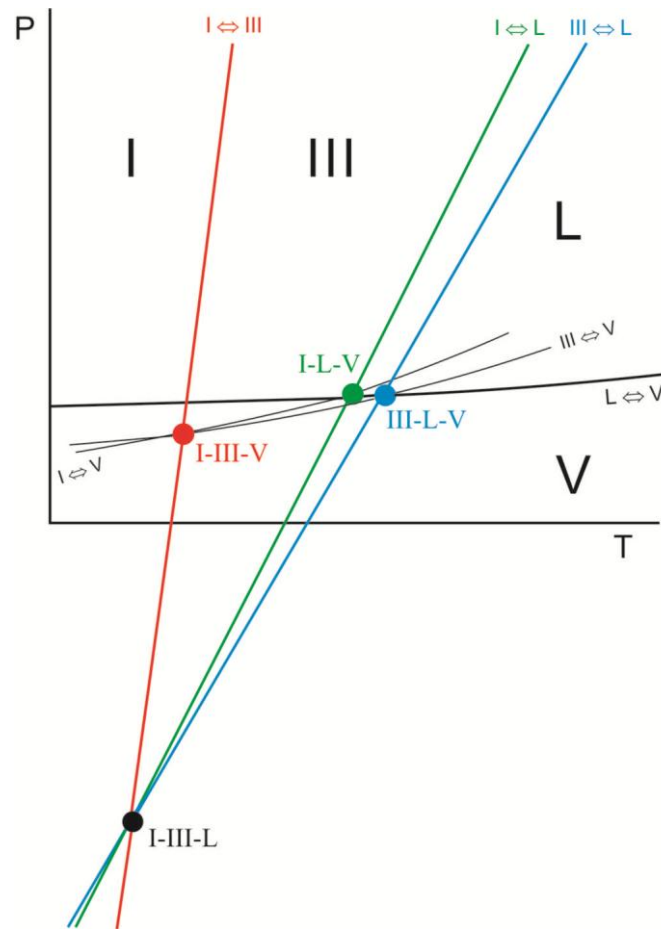
#### 8.4.2.5. Courbe P-T de l'équilibre de fusion de la forme I (I-L)

L'équilibre métastable I-L doit passer par le point triple I-III-L, où la forme I est en équilibre avec la forme III et le liquide, et aussi par le point triple I-L-Vap, où la forme I est en équilibre avec les phases liquide et vapeur.

En utilisant les coordonnées du point triple I-III-L, 314 K et -309MPa, et les coordonnées du point triple I-L-Vap, 338,3 K et 0 MPa, on obtient l'expression suivante pour la courbe, supposée rectiligne, représentant l'équilibre I-L dans le diagramme de phase pression-température :

$$\text{Courbe I-L: } P(T) = -4,3 \times 10^3 + 12,8 \times T \quad \text{Eq. 8.6}$$

La courbe de l'équilibre de fusion de la forme I du chlorhydrate de cystéamine peut alors être placée dans le diagramme de phases P-T (Figure 8.26).



**Figure 8-26. Positionnement de la droite représentative de l'équilibre diphasé I-L dans le diagramme de phases P-T du chlorhydrate de cystéamine**

Le volume spécifique de la forme I ( $v_I$ ) à sa température de fusion peut être calculé à partir de l'équation 8.1 qui donne une valeur de  $0,7641 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ . Supposant que le volume spécifique du liquide ne change pratiquement pas dans les deux degrés de différence entre les deux points de fusion, la valeur ( $v_L = 0,801 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ ) trouvée à la température de fusion de la forme III peut être prise comme volume spécifique de la phase liquide à celle de la forme I. L'inégalité entre le volume de la forme I et celui du liquide est ainsi:  $\Delta_{I \rightarrow L} v = 0,0369 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ . En utilisant la pente de l'équilibre I-L (Eq. 8.6), l'inégalité entre les volumes des formes solide et liquide et la température de fusion de la forme I, l'enthalpie de fusion de la forme I s'obtient avec l'équation de Clapeyron (Eq. 2.3.3) ; ce qui conduit à  $\Delta_{I \rightarrow L} h = 162 \text{ J g}^{-1}$ .

En utilisant un cycle thermodynamique (cycle de Hess), l'enthalpie de fusion de la forme I, qui est une fonction d'état, peut également être calculée selon l'expression,  $\Delta_{I \rightarrow L} h = \Delta_{I \rightarrow III} h$

+  $\Delta_{III \rightarrow L}h$ , qui égalise deux trajets dont l'état initial et l'état final sont les mêmes (forme I et liquide). Cette expression conduit à  $\Delta_{I \rightarrow L}h = 151 \text{ J g}^{-1}$ .

Les deux valeurs de l'enthalpie de fusion de la forme I,  $\Delta_{I \rightarrow L}h$ , calculées de deux manières différentes, sont proches ; ce qui démontre que même si certains calculs sont basés sur des extrapolations et des approximations, les résultats obtenus sont cohérents les uns avec les autres.

#### **8.4.2.6. Diagramme de phases pression-température complet, incluant les formes I et III du chlorhydrate de cystéamine, et conséquences topologiques.**

Le diagramme topologique de phases P-T présenté sur la figure 8-27 a été construit en utilisant l'ensemble des informations qui ont été obtenues expérimentalement et par le calcul. Les deux équilibres de phases stables, observés par analyse thermique à haute pression, sont représentés par deux lignes continues noires avec des pentes élevées. Celle de gauche représente l'équilibre stable solide-solide I-III et celle de droite l'équilibre stable solide – liquide III-L.

Pour une phase solide, l'augmentation de la pression entraîne une augmentation de sa densité ; cependant, d'un point de vue thermodynamique, la baisse de la pression va ramener le système à un certain point, l'équilibre solide-vapeur, où la sublimation du solide est permise. Ceci est schématiquement indiqué par les lignes continues noires, proches de l'horizontale, dans le diagramme. Les cercles pleins, correspondant à des équilibres comportant trois phases, représentent des points triples. Parce que les pressions de vapeur des médicaments sont généralement faibles et parce que les mesures sont réalisées en conditionnant les échantillons dans des capsules fermées, les points de transition mesurés par calorimétrie sont effectivement ces points triples (Section 3.2.6.).

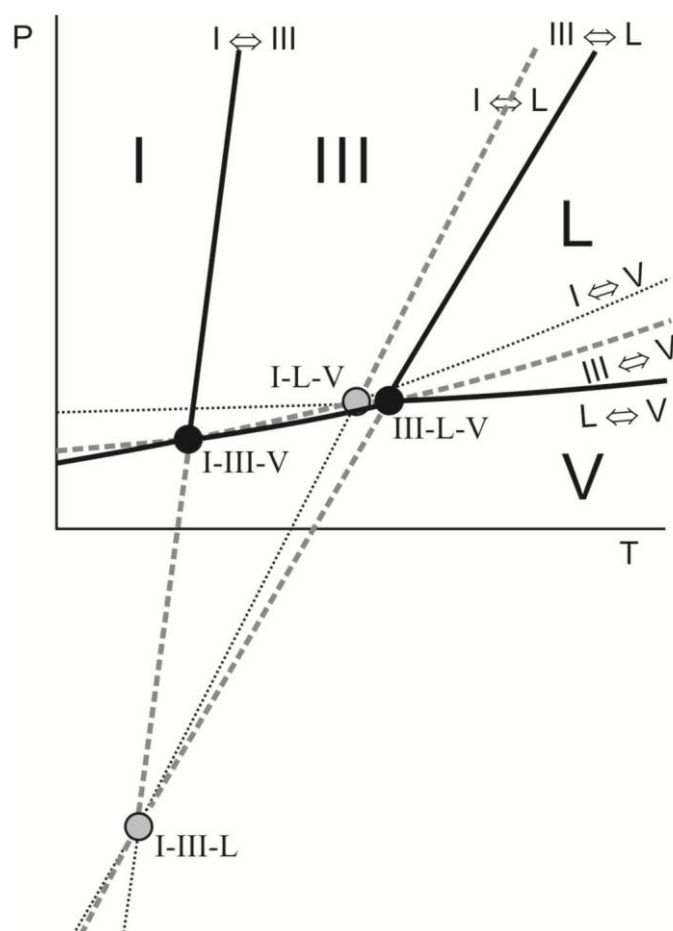
A des pressions inférieures à ces points triples mais positives, la vapeur est la phase stable, et donc les équilibres I-III et III-L deviennent nécessairement métastables. Ceci est indiqué par les lignes grises discontinues qui peuvent être prolongées jusqu'à leur intersection à pression négative. Cette intersection représente le point triple I-III-L, c'est-à-dire le point correspondant aux conditions P et T de coexistence métastable des trois phases I, III et liquide, qui sont communes aux deux équilibres I-III et III-L. Parce que ces deux équilibres sont métastables, ce point triple doit aussi être métastable. Considérant la règle d'alternance

(Section 2.3.) qui stipule qu'un équilibre entre deux phases doit changer de degré de (méta) stabilité quand il passe à travers un point triple, les équilibres autour du point triple I-III-L deviennent donc alternativement métastables et supermétastables. Ceci est symbolisé par l'alternance de lignes en pointillés et en tirets autour du point I-III-L.

Le reste du diagramme de phases est tracé en tenant également compte de la règle d'alternance. Par exemple, la fusion de la forme I (point triple I-L-V) doit être métastable parce qu'elle est située à une température inférieure à celle de la forme III. Ceci veut dire que l'équilibre liquide-vapeur qui est stable, depuis le point critique jusqu'au point triple III-L-V, devient métastable dès que la température devient inférieure à  $T_{III \rightarrow L}$ .

La figure 8-27 montre également que les solides I et III présentent tous les deux un domaine stable dans le diagramme de phases, depuis des conditions ordinaires (représentées par les courbes de sublimation et de vaporisation I-V, III-V et L-V) jusqu'à hautes pressions. La relation thermodynamique entre ces deux phases est donc de nature énantiotrope.

Il faut enfin noter que la forme II triclinique n'apparaît pas dans le diagramme représenté sur la figure 8-27. Cette forme a été obtenue au cours d'expériences réalisées à basse température et seul son volume spécifique est connu entre 100 et 200 K. Ces faits tendent à indiquer qu'elle serait plus stable que la forme III à basse température. Cependant, la température de transition I-III n'a pas pu être déterminée ni, à fortiori, l'enthalpie associée à cette transition. Par conséquent, il n'est pas encore possible d'incorporer la forme II dans le diagramme de phases afin de décrire complètement la thermodynamique du trimorphisme du chlorhydrate de cystéamine. Malgré cette lacune, on peut heureusement remarquer que les relations de phases entre les formes I et III ne seront pas modifiées par l'adjonction de leurs relations avec la forme II.



**Figure 8-27. Diagramme de phases topologique du chlorhydrate de cystéamine incluant les formes I et III**

Lignes : représentations schématiques des équilibres diphasés, lignes continues : stables, lignes discontinues : métastables, lignes pointillées : supermétastables. Cercles : points triples, cercles noirs : stables, cercles gris : métastables. Les formes solides ont été indiquées avec les chiffres romains I et III, L correspondant à la phase liquide et V à la phase vapeur.

### 8.5. Conclusions

A côté des deux formes solides du chlorhydrate de cystéamine déjà décrites dans la littérature, une nouvelle forme solide (dénommée forme III) a été découverte et sa structure cristalline, monoclinique de groupe d'espace  $I2/a$ , a été résolue à partir de la diffraction des rayons X sur poudre.

Des mesures cristallographiques en fonction de la température ont montré que cette nouvelle forme III persiste à basse température même si elle n'est pas la forme la plus stable.

L'échantillon de chlorhydrate de cystéamine étudié est la forme solide I. Dans les conditions ambiantes, cette forme ne se transforme spontanément ni en forme II, qui n'a été



observée qu'au-dessous de 200 K, ni en forme III qui est seulement obtenue à partir ou au-dessus de 310 K.

Les formes I et III sont énantiotropes. Autrement dit, chacune possède un domaine de stabilité dans le diagramme de phases P-T. L'équilibre I-III et l'équilibre III-L divergent quand la pression augmente, ce qui implique que l'équilibre de fusion de la forme I ne peut pas devenir stable.

D'un point de vue pharmaceutique, ces résultats impliquent que c'est la forme I qui doit être développée, puisqu'elle est la forme la plus stable dans les conditions ordinaires de température et de pression. Cependant, si le chlorhydrate de cystéamine est soumis à des températures supérieures à 40 °C pendant un temps suffisant pouvant être de quelques heures seulement, le composé peut se transformer en forme III et persister sous cette forme quand la température redescend à l'ambiante. Etant donné que les volumes spécifiques des formes I et III sont très proches, l'éventuelle transformation de la forme I en forme III ne présente pas de réels risques sur la consistance de la forme galénique orale finie. Néanmoins, la persistance de la forme III sous conditions ordinaires, forme moins stable que la forme I et donc présentant une tension de vapeur plus élevée, pourrait augmenter légèrement la solubilité de la formulation développée et par conséquent modifier la biodisponibilité du médicament. Il faut enfin noter que le chlorhydrate de cystéamine est très sensible à l'humidité relative. Cette avidité pour l'eau impose donc de le manipuler et de le conserver dans des conditions particulièrement rigoureuses d'humidité relative dont la valeur ne devra pas excéder 35 % à température ambiante afin de prévenir sa déliquescence.

**REFERENCES**

- [8.1] Kataoka, H., Imamura, Y., Tanaka, H., Makita, M., 1993. Determination of cysteamine and cystamine by gas chromatography with flame photometric detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 11(10), 963-969.
- [8.2] Kataoka, H., Tanaka, H., Makita, M., 1994. Determination of total cysteamine in urine and plasma samples by gas chromatography with flame photometric detection. *J. Chromatogr. B* 657, 9-13.
- [8.3] Stachowicz, M., Lehmann, B., Tibi, A., Prognon, P., Daurat, V., Pradeau, D., 1998. Determination of total cysteamine in human serum by a high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17, 767-773.
- [8.4] Kim, C.H., Parkin, S., Bharara, M., Atwood, D., 2002. Linear coordination of Hg(II) by cysteamine. *Polyhedron* 21, 225-228.
- [8.5] Ahmad, S., Shaheen, M.A., Stoeckli-Evans, H., 2010. A monoclinic polymorph of cysteamine hydrochloride. *Acta. Crystallogr. E* 66, o134.
- [8.6] Lahiani-Skiba, M., Boulet, Y., Youm, I., Bounoure, F., Verite, P., Arnaud, P., Skiba, M., 2007. Interaction between hydrophilic drug and  $\alpha$ -cyclodextrins: physico-chemical aspects. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 57, 211-217.



## **Chapitre 9.**

### **Conclusions.**

CHAPITRE 9. CONCLUSIONS. ....	206
REFERENCES .....	213

La caractérisation chimique et physique des substances à activité thérapeutique est une étape cruciale dans le développement des médicaments. Les exigences réglementaires requises par la FDA (Food and Drug Administration) lors du dépôt du dossier d'autorisation de mise sur le marché imposent que cette caractérisation consiste à « maîtriser » le principe actif en explorant ses propriétés en solution mais aussi liées à son état solide. Les deux volets d'exploration devraient être combinés au cours des études de préformulation et de stabilité des substances d'intérêt.

A l'inverse de la caractérisation chimique des substances actives, connue et bien étudiée depuis longtemps, la caractérisation physique est restée longtemps négligée. Fort heureusement, elle constitue aujourd'hui une nouvelle préoccupation de la part des industries pharmaceutiques qui sont contraintes de l'incorporer dans les dossiers pharmaceutiques de leurs médicaments.

L'analyse chimique d'une substance active comporte aussi bien la détermination de son taux de dégradation en solution, apportant une information d'ordre cinétique, que la recherche et l'identification de ses impuretés de dégradation potentielles apportant une information d'ordre structural. Des outils analytiques performants doivent alors être élaborés et employés pour arriver à ces fins. Ils doivent présenter d'une part une haute sélectivité, pour permettre la séparation des différents produits de dégradation, qui sont notamment des produits apparentés à la substance étudiée, et, d'autre part, une exhaustivité suffisante permettant de prendre en charge tous les produits présents dans l'échantillon, notamment ceux qui sont élués tardivement. Ces performances sont atteintes grâce à la mise au point d'une méthode de chromatographie liquide à haute performance en gradient de polarité de phases couplée à une détection par spectrométrie de masse. Cette technique a été appliquée à l'étude de la stabilité intrinsèque du tienoxolol, médicament antihypertenseur, exposé à des facteurs environnementaux. Les facteurs de stress testés en solution ont été l'hydrolyse acide et basique, l'oxydation, l'irradiation lumineuse et la température.

Le tienoxolol est une molécule de réactivité chimique importante particulièrement vis-à-vis des conditions hydrolytiques et oxydantes. Plusieurs sites de dégradation sont concernés et sont liés à la présence de plusieurs fonctions amines, éthers et esters. L'étude chromatographique qualitative, quantitative et structurale a permis de mettre en évidence sept produits de dégradation, d'identifier leurs structures chimiques et d'établir un schéma de dégradation probable [9.1]. De tels résultats sont à prendre en considération lors du

développement de la forme galénique du médicament et lors de l'élaboration des conditions de sa conservation. Ils peuvent aussi être exploités lors de l'étude d'autres composés organiques présentant des structures chimiques proches de celle du tienoxolol.

A côté des études sur leur réactivité chimique en solution, les substances actives sont caractérisées par des propriétés spécifiques liées à leurs états solides. Ces propriétés sont susceptibles d'être modifiées par des facteurs environnementaux tels que la température, la pression et l'humidité relative.

La maîtrise de ces facteurs environnementaux passe par l'élaboration de diagrammes de phases pression-température qui peuvent être construits à partir des données calorimétriques et cristallographiques, soit disponibles dans la littérature, soit obtenues par une expérimentation appropriée [9.2-9.12]. Cette approche, dite topologique, bien qu'approximative, a été vérifiée par une approche purement expérimentale utilisant une méthode d'analyse thermique sous pression [9.13-9.17]. Dans ce mémoire, cette approche est appliquée à quatre composés.

Le bicalutamide, médicament du cancer de prostate, et le finastéride, utilisé dans l'hypertrophie bénigne de la prostate, sont deux exemples décrivant la construction de diagrammes de phases par approche topologique. L'étude du bicalutamide montre que ses deux formes cristallines présentent une relation monotrope dans les conditions ordinaires de pression et que cette relation devient énantiotrope à haute pression [9.11]. En conséquence du diagramme de phases construit, il est recommandé de développer la forme I qui est la seule forme stable dans les conditions ordinaires de température et de pression. Il est néanmoins intéressant de noter qu'une éventuelle compression de la substance fondue au cours du processus de fabrication peut entraîner une transition de phases et conduire à l'apparition de la forme II.

Le cas du finastéride décrit au contraire une relation énantiotrope entre ses deux formes cristallines I et II à pression ordinaire, relation qui devient monotrope à haute pression [9.12]. Du point de vue pharmaceutique, cette étude recommande de développer la forme I du finastéride, forme la plus stable dans les conditions ordinaires de pression et de température. Contrairement au cas du bicalutamide, la compression, ou tout autre procédé faisant varier la pression au cours de la fabrication, ne risque pas d'entraîner un changement de phase pour le système finastéride. Par contre, des traitements thermiques éventuellement appliqués au cours

du procédé de fabrication, pourraient conduire à l'apparition de la forme II, qui devient la forme la plus stable à haute température.

Ces deux cas montrent que la stabilité physique d'un produit peut être explorée en utilisant seulement les données déjà disponibles dans la littérature, pour autant qu'elles soient suffisantes, sans avoir recours à des mesures supplémentaires.

Cette approche topologique de construction de diagrammes de phases pression-température a été validée en la comparant à une approche expérimentale de transitions de phases en fonction de la pression.

Le cas de la benzocaïne, troisième composé étudié, a été utilisé pour cette comparaison. Au moins trois formes cristallines sont connues pour la benzocaïne mais peu d'information sur la relation thermodynamique entre ces formes est disponible. Ce travail de thèse a permis de déterminer une transition de phases entre les formes II et III. Pour étudier la relation thermodynamique entre ces deux formes, le diagramme de phases pression-température a été construit à partir des données disponibles dans la littérature, mais aussi par mesures calorimétriques directes de la transition entre les formes II et III en fonction de la pression. Les deux approches, l'une topologique et l'autre expérimentale, ont conduit au même résultat, les diagrammes de phases pression-température étant très similaires voire sensiblement identiques [9.17]. Ce diagramme montre que les deux formes II et III de la benzocaïne présentent le même comportement que le finastéride, conduisant ainsi aux mêmes conclusions pharmaceutiques. La forme III de la benzocaïne, forme la plus stable dans les conditions ordinaires de pression et de température, est la forme la plus adaptée à la formulation du produit fini. Cette forme pourrait néanmoins subir une transition lors de traitements thermiques survenant au cours de la fabrication, du transport ou du stockage. La forme I de la benzocaïne, bien que décrite dans la littérature, n'a pas pu être obtenue au cours de ce travail malgré de multiples essais de cristallisation. Cependant, si cette forme s'avérait être la forme la plus stable, les relations thermodynamiques entre les phases II et III resteraient inchangées.

L'approche expérimentale de construction du diagramme de phases pression-température a aussi été appliquée au cas du chlorhydrate de cystéamine incluant la forme cristalline I, déjà connue dans la littérature, et une nouvelle forme cristalline (forme III) découverte au cours de ce travail de thèse. La structure cristalline de cette nouvelle forme a été résolue (structure monoclinique de groupe d'espace  $I2/a$ ). La relation entre les formes I et III est énantiotrope. D'un point de vue pharmaceutique, ceci implique que c'est la forme I, forme la plus stable

sous conditions ordinaires, qui devrait être développée. Cependant, un traitement thermique à des températures supérieures à 40 °C peut entraîner la transformation de la forme I en forme III, laquelle peut persister, de façon métastable, à température ambiante. Cette éventuelle persistance pourrait augmenter la solubilité de la formulation développée et par conséquent modifier la biodisponibilité du médicament. Par ailleurs, une étude du comportement du chlorhydrate de cystéamine vis-à-vis de la vapeur d'eau a montré qu'il est très sensible à l'humidité et qu'il forme rapidement une solution saturée à concentration élevée en cystéamine (environ 50 mol%). Aucun hydrate n'a été mis en évidence.

Ces observations montrent qu'il est indispensable de caractériser précocement l'état physique du composé à développer et de sélectionner, si ce composé présente un polymorphisme cristallin, la forme la plus adaptée à la formulation, c'est-à-dire la forme la plus stable. Ces mêmes observations incitent à prendre en considération et à maîtriser les facteurs environnementaux, tels que la température et l'humidité, et aussi tous les traitements susceptibles de faire varier la température ou la pression tout au long du procédé industriel de fabrication mais aussi lors de la conservation et du transport de la matière première et du produit fini.

Une bonne connaissance des domaines de stabilité relative des différentes formes cristallines d'un produit donné permet de savoir, pour n'importe quelle température et/ou pression donnée, laquelle des formes cristallines serait la plus stable. Ceci constitue un moyen de choisir la forme stable comme forme cristalline à développer, mais aussi un moyen de prévenir sa transformation en une autre forme cristalline. Au sein d'une même formulation contenant une substance active donnée, la transformation d'une forme cristalline à une autre, suite à des traitements thermiques ou une augmentation de la pression, entraîne un changement des propriétés physico-chimiques de cette substance active. Ces changements peuvent parfois avoir des conséquences pharmacologiques. L'apparition d'une forme cristalline moins soluble, par exemple, entraîne une diminution de la quantité dissoute et donc de la biodisponibilité, laquelle entraîne à son tour une baisse de l'efficacité thérapeutique. Au contraire, si la forme qui apparaît présente une solubilité plus grande, la biodisponibilité du médicament sera plus grande, et donc susceptible de conduire à une augmentation du risque toxique.

La caractérisation chimique et la caractérisation physique d'une substance active sont toutes les deux indispensables à la « maîtrise » de cette substance, permettant ainsi de



fabriquer des médicaments « de qualité » et de garantir une meilleure stabilité. La combinaison des deux volets vise à définir, de façon exhaustive, le profil de la stabilité physico-chimique de la substance active.

Dans ce contexte, le chlorhydrate de cystéamine a fait l'objet, dans ce travail, d'une étude combinée, physique et chimique, montrant que ce produit est sensible à la chaleur et que le traitement thermique conduit, par polymérisation, à la production de cystamine, impureté majeure de la cystéamine. Néanmoins, cette approche combinée nécessite d'être illustrée par un plus grand nombre d'exemples permettant d'une part de comprendre des phénomènes compliqués lors d'un traitement thermique, comme la fusion associée à une décomposition, et d'autre part d'établir une cinétique des phénomènes thermiques liés aux transformations de phase, composante nécessaire à l'interprétation des résultats [9.18, 9.19].

Au terme de ce travail, l'état solide des substances actives a été bien étudié à travers plusieurs cas : bicalutamide, finastéride, benzocaïne et chlorhydrate de cystéamine. L'étude a concerné particulièrement la caractérisation des différentes formes cristallines et l'étude de la relation thermodynamique qui existe entre ces formes aux conditions ordinaires de température et de pression et aussi à des températures et à des pressions élevées. Cette étude, aboutissant à des diagrammes de phases pression-température, ne donne cependant que la stabilité relative d'une forme par rapport à une autre et n'exclut donc pas l'éventuelle présence d'une autre forme, non connue, qui pourrait même être plus stable. Par ailleurs, à l'exception du chlorhydrate de cystéamine déjà étudié, la caractérisation physique de ces substances actives devrait être complétée par l'étude de leur comportement vis-à-vis de l'humidité, facteur environnemental à prendre en considération surtout lors du stockage, car susceptible de conduire à la formation d'hydrates ou à une dégradation chimique.

Enfin, la caractérisation de l'état solide doit concerner les excipients existant sous forme de poudre et entrant dans la formulation du médicament. Elle pourrait être complétée par des études d'interactions entre substance active et excipients pouvant modifier les propriétés initiales des différents produits. Pour une caractérisation exhaustive, les substances étudiées devraient aussi faire l'objet d'une étude de leur réactivité chimique en solution permettant de compléter les données indispensables à la constitution du dossier pharmaceutique du médicament.

Ainsi, au travers de ces quatre cas, et mis à part l'étude des propriétés chimiques des substances actives entrant dans la composition de médicaments destinés à la voie orale,

l'étude des propriétés physiques s'est avérée nécessaire car utile dans plusieurs étapes du développement du médicament. Elle permet en effet de fournir des données nécessaires aux études de préformulation, au procédé de fabrication et aux conditions de stockage, à la demande de mise sur le marché et à la caractérisation physique, essentielle pour la prise de brevet. En plus, l'étude de la relation thermodynamique entre les différents polymorphes d'une substance active montre qu'il est important, dès sa découverte, d'en rechercher les éventuels polymorphes, de déterminer laquelle de ses formes cristallines est la plus stable et de définir son domaine de stabilité en fonction de la température et de la pression ; c'est cette forme qui devra être choisie pour la formulation du produit fini. Ces informations permettent d'avoir une assurance quant à la forme cristalline de la substance active, qui doit rester la même depuis son étude en préformulation jusqu'à son intégration dans le produit fini et tout au long de la validité du médicament. Un changement de phase au sein même du médicament pourrait conduire à une non-conformité au cours du contrôle du produit fini et ainsi aboutir au retrait de lots du médicament et, si la nouvelle forme s'avère être plus stable que celle qui a été mise initialement sur le marché, un nouveau brevet pourrait être déposé afin de protéger le développement de la nouvelle forme cristalline de la substance active. Plus encore, si un tel événement se produisait à l'initiative d'une firme concurrente, il s'ensuivrait inévitablement des litiges onéreux qu'une stratégie judicieuse de recherche et développement aurait permis d'éviter.

**REFERNCES**

- [9.1] Gana, I., Dugay, A., Henriët, T., Rietveld, I. B., Bernard, M., Guechot, C., Teulon, J. M., Safta, F., Yagoubi, N., Ceolin, R., Do, B., 2014. Degradation pathways study of the natriuretic and  $\beta$ -adrenoceptor antagonist tienoxolol using liquid chromatography-electrospray ionization multistage mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 96, 58-67.
- [9.2] Barrio, M., De Oliveria, P., Céolin, R., Lopez, D.O., Tamarit, J., 2002. Polymorphism of 2-methy-2-chloropropane and 2,2-dimethyl propane (neopentane): Thermodynamic evidence for a high-pressure orientationally disordered rhombohedral phase through topological p-T diagrams. *Chem. Mater* 14, 851-857.
- [9.3] Ceolin, R., Toscani, S., Agafonov, V., Dugue, J., 1992. Phenomenology of polymorphism.1. Pressure temperature representation of trimorphism – general rules; application to the case of dimethyl 3,6-dichloro-2,5-dihydroxyterephthalate. *J. Solid State Chem.* 98, 366-78.
- [9.4] Ceolin, R., Toscani, S., Dugue J., 1993. Phenomenology of polymorphism. 2. Criteria for overall (P, T) monotropy – applications to monochloroacetic acid and to hydrazine monohydrate. *J. Solid State Chem.* 102, 465-79.
- [9.5] Ceolin, R., Agafonov, V., Louer, D., Dzyabchenko, V.A., Toscani, S., Cense, J.M., 1996. Phenomenology of polymorphism. 3. P, T diagram and stability of piracetam polymorphs. *J. Solid State Chem.* 122, 186-94.
- [9.6] Ceolin, R., Rietveld, I.B., 2010. Phenomenology of polymorphism and topological pressure-temperature diagrams. Description of the phase relationship involving Atovaquone polymorphs I and III. *J. Therm. Anal. Calorim.* 102, 357-360.
- [9.7] Espeau, P., Ceolin, R., Tamarit, J.L., Perrin, M.A., Gauchi, J.P., Leveiller, F., 2005. Polymorphism of paracetamol: relative stabilities of the monoclinic and orthorhombic phases inferred from topological pressure-temperature and temperature-volume phase diagrams. *J. Pharm. Sci.* 94, 524-539.
- [9.8] Giovannini, J., TerMinassian, L., Céolin, R., Toscani, S., Perrin, M.A., Louer, D., Leveiller, F., 2001. Tetramorphism of fananserine : p, T diagram and stability hierarchy form crystal structure determinations and thermodynamic studies. *J. Phys. IV* 11, 123-126.

- [9.9] Toscani, S., Dzyabchenko, A., Agafonov, V., Dugue, J., Ceolin, R., 1996. Polymorphism of sulfanilamide. 2. Stability hierarchy of alpha-, beta- and gamma-forms from energy calculations by the atom-atom potential method and from the construction of the P, T phase diagram. *Pharm. Res.* 13, 151-154.
- [9.10] Toscani, S., De Oliveira, P., Ceolin, R., 2002. Phenomenology of polymorphism. IV. Tetrimerism of ferrocene and the overall metastability of its triclinic phase. *J. Solid State Chem.* 164, 131-137.
- [9.11] Gana, I., Ceolin, R., Rietveld, I.B., 2013. Bicalutamide polymorphs I and II: a monotropic phase relationship under ordinary conditions turning enantiotropic at high pressure. *J. Therm. Anal. Calorim.* 112, 223-228.
- [9.12] Gana, I., Ceolin, R., Rietveld, I.B., 2012. Phenomenology of polymorphism: The topological pressure-temperature phase relationships of the dimorphism of finasteride. *Thermochimica Acta* 546, 134-137.
- [9.13] Barrio, M., Espeau, P., Tamarit, J.L., Perrin, M.A., Veglio, N., Ceolin, R., 2009. Polymorphism of progesterone : relative stabilities of the orthorhombic phases I and II inferred from topological and experimental pressure-temperature phase diagrams. *J. Pharm. Sci.* 98, 1657-1670.
- [9.14] Ceolin, R., Tamarit, J.L., Barrio, M., Lopez, D.O., Nicolay, B., Veglio, N., Perrin, M.A., Espeau, P., 2008. Overall monotropic behavior of metastable phase of bicalotymol, 2,2'-methylenebis(4-chloro-3-methyl-isopropylphenol), inferred from experimental and topological construction of the related P-T state diagram. *J. Pharm. Sci.* 97, 3927-3941.
- [9.15] Ledru, J., Imrie, C.T., Pulham, C.R., Ceolin, R., Hutchinson, J.M., 2007. High pressure differential scanning calorimetry investigations on the pressure dependence of the melting of paracetamol polymorphs I and II. *J. Pharm. Sci.* 96, 2784-2794.
- [9.16] Rietveld, I., Barrio, M., Espeau, P., Tamarit, J., Ceolin, R., 2011. Topological and experimental approach to the pressure-temperature-composition phase diagram of the binary enantiomer system D- and L- camphor. *J. Phys. Chem. B* 115, 1672-1678.
- [9.17] Gana, I., Barrio, M., Do, B., Tamarit, J. L., Ceolin, R., Rietveld, I. B., 2013. Benzocaine polymorphism : Pressure-temperature phase diagram involving forms II and III. *Int. J. Pharm.* 456, 480-488.

[9.18] Rotival, R., Espeau, P., Corvis, Y., Guyon, F., Do, B., 2010. Determination of quinacrine dihydrochloride dehydrate stability and characterization of its degradants. *J. Pharm. Sci.* 100 (8), 3223-3232.

[9.19] Rotival, R., Corvis, Y., Cartigny, Y., Négrier, P., Marchivie, M., Massip, S., Gana, I., Lemoine, P., Espeau, P., 2013. Comprehensive determination of the solid state stability of bethanechol chloride active pharmaceutical ingredient using combined analytical tools. *Cryst. Eng. Comm.* 1, 7970-7980.