



**HAL**  
open science

# Apports de la microcalorimétrie isotherme en préformulation galénique : analyse de trois principes actifs à l'état solide

Gilles Ducret

► **To cite this version:**

Gilles Ducret. Apports de la microcalorimétrie isotherme en préformulation galénique : analyse de trois principes actifs à l'état solide. Sciences pharmaceutiques. 2003. dumas-01368190

**HAL Id: dumas-01368190**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01368190>**

Submitted on 19 Sep 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble : [thesebum@ujf-grenoble.fr](mailto:thesebum@ujf-grenoble.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



1<sup>er</sup> exemplaire

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : ~~2002~~/2003

N° D'ordre : **7010**

APPORTS DE LA MICROCALORIMETRIE ISOTHERME EN  
PREFORMULATION GALENIQUE.  
ANALYSE DE TROIS PRINCIPES ACTIFS A L'ETAT SOLIDE.

THESE  
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN PHARMACIE  
DIPLOME D'ETAT

Gilles DUCRET

*[Données à caractère personnel]*

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 25 avril 2003 A 14 heures 30

DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

Monsieur le Professeur Aziz BAKRI, Président du jury  
Mademoiselle Joelle BARDON, Maître de confér  
Madame Sandrine LAUTHIER, Docteur en Pharm

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE  
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté

M. le Professeur P. DEMENGE

Vice Doyen

M. le Professeur J. CALOP

PROFESSEURS DE PHARMACIE

ALARY	Josette	Chimie Analytique
BAKRI	Abdelaziz	Pharmacie Galénique
BENOIT-GUYOD	Jean-Louis	Chimie Toxicologie et Eco-toxicologie
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique et Bio-technique
CUSSAC	Max	Chimie Thérapeutique
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Générale
DEMENGE	Pierre	Physiologie/Pharmacologie
DROUET	Emmanuel	Microbiologie-Immunologie
FAVIER	Alain	Biochimie
GOULON	Chantal	Physique-Pharmacie
GRILLOT	Renée	Parasitologie
LECLERC	Gérard	Chimie Organique
MARIOTTE	Anne-Marie	Pharmacognosie
RIBUOT	Christophe	Physiologie-Pharmacologie
ROUSSEL	Anne-Marie	Biochimie
SEIGLE-MURANDI	Françoise	Botanique et Cryptogamie
STEIMAN	Régine	Biologie Cellulaire
WOUESSIDJEWÉ	Denis	Pharmacie Galénique

)  
A celui qui m'a initié à l'étonnement de ce que les choses sont ce quelles sont et m'a encouragé pendant mes études ... Merci de m'avoir donné le goût des plaisirs simples

A celle qui m'a appris à me faire cuire un œuf et m'a appris le sens du mot douceur

Aux trois qui me subissent depuis trente ans et avec qui j'ai appris le partage

A celui trop tôt disparu qui m'a appris le manque

A celle qui supporte mes manies émétiques au quotidien (... et mes jeux de mots vaseux)

A mon petit binôme préféré en souvenir de nos longues années d'études communes et Pinouille, Nicus, Manu, Del, Pom, Soso, Paty, Gilou, Pascale, Bouli... et tous les autres qui ont donné un sens au mot amitié

A Aziz BAKRI pour m'avoir donné le goût de la galénique

A Jean-luc DUBOIS pour l'intérêt qu'il a manifesté pour mon travail et le temps qu'il m'a consacré

A Joelle BARDON qui m'a fait le plaisir de juger ce travail

... Remerciements tout particuliers à l'attention de Le Chat (*Felix catus*) pour sa collaboration silencieuse et la plupart du temps somnolente sur le moniteur de mon ordinateur...

)

# **TABLE DES MATIERES**

## TABLE DES MATIERES

<b>Introduction</b>	page 3
<b>Historique</b>	page 5
<b>Recherches bibliographiques</b>	page 11
1. Bases de calorimétrie	page 15
2. Domaines d'application	page 19
2.1. Applications non pharmaceutiques	page 23
2.2. Applications dans le domaine de la préformulation	page 27
2.2.1. Etudes de stabilité	page 27
2.2.2. Amorphicité de surface	page 30
2.2.3. Rôle de l'humidité relative dans les transformations amorphe → cristallin	page 32
2.2.3.1. Techniques de mesure de l'amorphicité de surface	page 34
2.2.3.2. Analyse en gradient d'humidité relative	page 35
2.2.3.3. Analyse en incréments d'humidité relative	page 36
2.3. Solubilité et polymorphisme	page 37
2.3.1. Etude de solubilité des molécules	page 37
2.3.2. Solubilité et polymorphisme	page 38
2.4. Compatibilité	page 41
2.5. Isothermes de sorption	page 42
2.5.1. Méthode gravimétrique simple	page 45
2.5.2. Méthode calorimétrique	page 45
2.6. Etude de la dissolution des poudres	page 46
<b>Introduction à la partie expérimentale</b>	page 48
<b>Etude de compatibilité entre un antiprogestatif et ses excipients</b>	page 51
1. Introduction	page 51
2. Matériel et méthode	page 52
3. Résultats	page 56
4. Conclusions	page 59
<b>Analyse thermique isotherme en gradient d'humidité relative     d'un kétolide</b>	page 62
1. Introduction	page 62
2. Matériel et méthode	page 63
3. Résultats	page 64
4. Conclusions	page 72
<b>Influence des processus de fabrication sur la forme cristalline     de la Roxithromycine</b>	page 75
1. Introduction	page 75
2. Matériel et méthode	page 76
3. Résultats	page 83
4. Conclusions	page 95
<b>Synthèse</b>	page 97
<b>Définitions</b>	page 101
<b>Références</b>	page 106
<b>Liste des abréviations</b>	page 111

---

Apport de la microcalorimétrie en préformulation galénique. Analyse de trois principes actifs à l'état solide.

## Introduction :

La préformulation galénique est la phase du développement d'un médicament pendant laquelle sont déterminées les propriétés physico-chimiques des principes actifs (solubilité, cinétique de dissolution, coefficient de partage, constante diélectrique, mesure d'angle de contact pour l'évaluation de la mouillabilité, granulométrie, surface spécifique,...) en vue de leur formulation ultérieure.

Elle consiste à rechercher la forme galénique la mieux adaptée pour le principe actif testé, afin d'optimiser son efficacité et d'obtenir la meilleure biodisponibilité du produit.

Elle évalue l'incidence de divers procédés galéniques sur la stabilité du principe actif (telle que la granulation, le séchage, la compression, la lyophilisation...).

La palette des techniques d'analyse dont dispose le galéniste pour mener ces études à terme est très large. Parmi celles-là, la microcalorimétrie isotherme est une technique de mesure d'infimes quantités de chaleurs, et qui est apparue tardivement dans l'industrie pharmaceutique. Elle permet d'étudier la plupart des phénomènes physiques ou chimiques, puisqu'ils s'accompagnent d'un échange thermique avec l'environnement. Elle couvre ainsi de vastes champs d'application. Elle permet d'apporter une information aussi bien sur les paramètres thermodynamiques que cinétiques des processus analysés. Des expériences bien conçues, et une certaine habitude dans l'interprétation des données, font de cette technique un outil précieux pour l'industriel dans le domaine pharmaceutique, aussi bien au niveau de la production, que de l'analyse ou de la formulation.

Ce travail a pour objectif de présenter d'une part les potentialités de la technique dans différents domaines, et plus particulièrement dans l'industrie pharmaceutique. D'autre part, nous traiterons trois exemples d'application sur des poudres :

Dans un premier temps, nous étudierons la compatibilité entre un antiprogestatif et ses excipients. Puis, nous observerons l'influence de l'humidité relative sur un kétolide. Enfin, nous chercherons à comprendre l'influence des processus de fabrication sur la forme cristalline de la roxithromycine.



# HISTORIQUE

## Un peu d'histoire...

Les prémices de la calorimétrie remontent au siècle des Lumières.



Un chimiste et physicien écossais, **Joseph Black** (1728-1799), débuta les travaux dans le domaine de la calorimétrie. Il découvrit notamment le phénomène de la chaleur latente en 1761. Trois ans plus tard, il mesura la chaleur latente de la vapeur. Il découvrit également que des substances différentes présentaient des capacités calorifiques diverses. Vers 1754, Black découvrit le dioxyde de carbone, un gaz qu'il dénomma *air fixe*, réfutant de ce fait la théorie phlogistique.



Parallèlement, **Antoine Laurent Lavoisier**, chimiste français (1743-1794), s'intéressa entre autre à la combustion, au phénomène d'oxydation et montra l'inutilité de la théorie du phlogistique à partir du moment où l'on avait identifié une combustion comme une consommation d'oxygène. Il étendit ce principe à la respiration et montra le premier que la chaleur animale résulte de combustions organiques. Une relation existe entre le travail mécanique effectué par un être vivant et les phénomènes biochimiques mesurables qui en sont le moteur. Désireux de mesurer ces échanges gazeux et l'effet sur eux du repos, de la digestion, du travail musculaire, Lavoisier inventa avec le mathématicien et physicien français

---

Apport de la microcalorimétrie en préformulation galénique. Analyse de trois principes actifs à l'état solide.



**Pierre-Simon (Marquis de) Laplace** (1749-1827) le calorimètre à glace en 1783. L'appareil mesurait les quantités de chaleur en pesant l'eau produite par la fusion de la glace.



Tous deux mesurèrent les effets de la respiration d'un cochon d'Inde, qu'ils comparèrent à la combustion d'une bougie, en utilisant une balance et leur calorimètre.

*" Lorsqu'un animal est dans un état permanent et tranquille, de telle sorte qu'après plusieurs heures le système animal n'éprouve point de variation sensible, la conservation de la chaleur animale est due au moins en grande partie, conclurent-ils, à la chaleur que produit la combinaison de l'oxygène respiré avec la base de l'air fixe que le sang lui fournit. "* La respiration, signala Lavoisier, est l'origine d'une combustion lente, analogue à celle du charbon.

Il établit ainsi plusieurs données générales sur la respiration : les mouvements et la digestion augmentent son rythme et la consommation d'air. Parmi les erreurs que comporte encore son oeuvre figure l'idée selon laquelle la chaleur est recensée comme un élément (le calorique).

Plus tard, un physicien anglais, **James Prescott** (1818-1889) énonça la loi de l'effet Joule, relative à l'échauffement d'un conducteur électrique au passage d'un courant (1841). Il établit l'équivalence du travail et de la chaleur, appelée aujourd'hui premier principe de la

---

Apport de la microcalorimétrie en préformulation galénique. Analyse de trois principes actifs à l'état solide.

thermodynamique (1845), grâce à des mesures précises effectuées lors d'expériences où un travail, celui de la rotation d'un moulinet agitateur dans un calorimètre, provoque une élévation de température de l'eau contenue dans le calorimètre.

Il déduisit par ailleurs de ce type d'expériences des valeurs de chaleurs spécifiques. Il étudia également l'électrolyse et les dégagements de chaleur qui l'accompagnent.

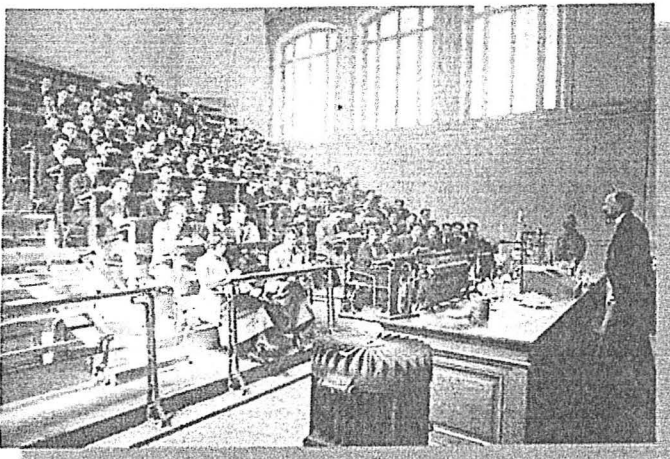
Lavoisier et Laplace avaient donné le premier énoncé quantitatif touchant à la thermochimie, postulé, il est vrai, sans vérification expérimentale.



**Henri Hess** (1802-1850), chimiste helvético-russe, procéda à Pétersbourg aux premières investigations systématiques. En 1840, il stipula comme une loi empirique la constance de la somme des effets thermiques dans le passage entre deux états donnés d'un système chimique, quelles que soient les étapes transitoires. Cet énoncé est une conséquence de la loi de la conservation de l'énergie formulée deux ans plus tard par l'allemand **Julius. R. Mayer** (1814-1878) et qui sera précisée en 1847 par **Hermann (von), Helmholtz** (1821-1894), un compatriote physicien et physiologiste. Suite à ses travaux, un chimiste danois **Julius Thomsen** (1826-1909) introduisit les considérations précédentes dans l'interprétation des phénomènes thermochimiques. La chaleur de réaction mesure la différence de l'énergie d'un système avant et après la transformation. Ces vues ont conservé leur validité, et elles sont à la base du calcul des chaleurs de réaction dans de nombreux cas de processus organiques qui ne se prêtent pas à des mesures directes. Thomsen a encore noté que la chaleur de combustion des composés organiques est approximativement une grandeur additive de valeurs propres aux atomes et à des éléments structuraux qu'il n'était pas en son pouvoir de définir. Mais en prenant la chaleur de réaction pour une mesure de l'affinité chimique, il en vint à prétendre imprudemment que tout processus purement chimique libère de la chaleur. Publiées en 1854, les idées de Thomsen anticipèrent sur les thèses du chimiste français, **Pierre Eugène Marcellin Berthelot**, (1827-1907).



Ce dernier construisit une bombe calorimétrique pour la mesure des chaleurs de combustion à volume constant. Il appliqua ses méthodes expérimentales à l'étude des explosifs (mesure des chaleurs spécifiques des gaz produits par l'explosion). C'est à partir de 1865 qu'il entreprit ses études de thermochimie qui le conduirent à formuler en 1873 son " principe du travail maximal Berthelot, et non sans mauvaise foi, récusait la priorité du chimiste danois. " *Tout changement chimique accompli sans l'intervention d'une énergie étrangère tend vers la production du corps ou du système de corps qui dégage le plus de chaleur.* " Tel est l'énoncé dans lequel Berthelot espérait avoir trouvé une loi fondamentale, et qui ne tardera pas à être vivement contesté.



Les travaux effectués au début des années 1920 par **Albert Tian** (1880-1972), professeur de chimie à l'université de Marseille, sont à l'origine de la plupart des appareils calorimétriques modernes. Il décrivit, pour la première fois, son microcalorimètre à compensation en 1922, l'utilisant -avec son collègue **Cotte** - pour étudier le métabolisme d'insectes. Il perfectionna cet instrument à thermocouples en 1924 et 1926. En introduisant le montage différentiel (1948) et une construction rationnelle des deux éléments calorimétriques jumelés, son successeur, **Edouard Calvet** (1895-1966), transforma l'instrument de Tian en véritable

instrument de laboratoire, largement utilisé aujourd'hui dans de nombreux domaines de la recherche pure et appliquée.

Au début des années 1980, **J.Suurkuusk** et **Ingemar Wadsö** décrivent un calorimètre baptisé Bioactivity Monitor (BAM). L'instrument est constitué par un bain thermostaté à  $\pm 0,5 \cdot 10^{-4}$  °C, et peut recevoir jusqu'à quatre modules microcalorimétriques à conduction de chaleur indépendants.

Les progrès de l'électronique ont permis de développer des instruments de plus en plus sensibles, de l'ordre du microwatt, voire du nanowatt, pour des domaines d'applications de plus en plus larges.

**RECHERCHES  
BIBLIOGRAPHIQUES**

L'analyse thermique regroupe diverses techniques permettant l'étude du comportement thermique des matériaux. Quand un produit est chauffé ou refroidi sa structure et sa composition chimique subissent des changements: fusion, fonte, cristallisation, oxydation, décomposition, réaction, transition, expansion, agglomération...

Pour mesurer ces diverses transformations, la variation de différents paramètres est suivie en fonction de la température.

### **Quelques définitions**

#### **ANALYSE THERMIQUE**

Différentes techniques, permettent de suivre une propriété de l'échantillon soumis à une température donnée, en fonction du temps ou de la température appliquée.

La programmation de température peut impliquer des gradients de chauffage ou de refroidissement, une étude en isotherme ou un mélange de différentes séquences.

#### **L'ANALYSE THERMIQUE DIFFÉRENTIELLE (ATD)**

##### ***DIFFERENTIAL THERMAL ANALYSIS (DTA)***

L'analyse thermique différentielle est une technique mesurant la **différence de température** entre un échantillon et une référence (un produit thermiquement inerte) en fonction du temps ou de la température appliquée, quand ils subissent simultanément un balayage en température sous atmosphère contrôlée. L'ATD permet la **détection de n'importe quelle transformation** de tous types de matériaux.

#### **LA CALORIMÉTRIE À BALAYAGE DIFFÉRENTIEL (CBD) ou ANALYSE ENTHALPIQUE DIFFÉRENTIELLE (AED)**

##### ***DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY (DSC)***

La calorimétrie à balayage différentiel est une technique déterminant la **variation du flux de chaleur** absorbé ou dégagé par un échantillon soumis à un balayage en température sous atmosphère contrôlée.

Toute transformation subie par l'échantillon lors d'un chauffage ou d'un refroidissement, est accompagnée d'un échange de chaleur. La DSC permet la détermination de la **température de cette transformation** et la **quantification de l'enthalpie** qui lui est associée.



La DSC est depuis longtemps l'une des plus importantes techniques de l'analyse thermique.

## **LA THERMOGRAVIMÉTRIE (TG)**

### ***THERMOGRAVIMETRY (TG)***

La thermogravimétrie est une technique mesurant la **variation de masse** d'un échantillon soumis à un balayage en température sous atmosphère contrôlée. Il peut s'agir aussi bien d'une perte de masse (**émission de vapeur**) que d'un gain (**fixation de gaz**).

## **L'ANALYSE THERMOMECHANIQUE (ATM)**

### ***THERMOMECHANICAL ANALYSIS (TMA)***

L'analyse thermomécanique est une technique mesurant la **déformation** d'un échantillon soumis à une contrainte non oscillante et un balayage en température sous atmosphère contrôlée. La contrainte appliquée peut être une compression, une tension, ou une torsion.

## **LA MICROSCOPIE A VARIATION THERMIQUE**

### ***HOT-STAGE MICROSCOPY (HSM),***

Cette technique permet de suivre visuellement des transformations d'un corps soumis à une variation thermique, croissante ou décroissante

## **LA MICROCALORIMÉTRIE**

### ***MICROCALORIMETRY***

Tous les calorimètres sont des instruments thermodynamiques mais certains sont aussi utilisés pour des études cinétiques ou comme outils analytiques. Récemment, les microcalorimètres isothermes ont gagné une place grandissante comme outil analytique et plus particulièrement dans certains domaines d'applications.

Le terme de microcalorimètre isotherme est mal défini mais est communément utilisé pour les calorimètres dont la sensibilité est de l'ordre de micro watt sous des conditions (essentiellement) isothermes. Cependant, les nanocalorimètres (nom donné aux calorimètres dont la limite de détection est de l'ordre du nanowatt) sont regroupés avec les microcalorimètres isothermes. Les récents développements de la technique ont permis la

---

Apport de la microcalorimétrie en préformulation galénique. Analyse de trois principes actifs à l'état solide.

distribution sur le marché d'appareils faciles d'utilisation. Certains sont modulables pour rendre l'appareil plus spécifique à certaines mesures.

Principe de mesure et caractéristiques :

Les calorimètres sont généralement classés en trois groupes : adiabatiques, à conduction de chaleur et les calorimètres à compensation de puissance.

#### Calorimètres adiabatiques

Un calorimètre adiabatique idéal est défini par l'absence d'échange entre la cellule du calorimètre et son environnement. Les conditions adiabatiques sont obtenues en plaçant un « bouclier adiabatique » entre la cellule et son environnement. Pendant la mesure, la différence de température entre le récipient et le bouclier est ramenée à 0. La quantité de chaleur qui est dégagée ou absorbée pendant l'expérience avec un tel instrument est égale au produit du changement de température et la capacité de chaleur de la cellule et de son contenu. Les calorimètres semi-adiabatiques, souvent appelés calorimètres isopériboles sont plus communément employés. S'ils sont utilisés pour réaliser des mesures précises, des corrections de transfert de chaleur entre la cellule et son environnement sont nécessaires.

Le calorimètre à glace de Lavoisier-Laplace ou la bombe calorimétrique de Berthelot sont des calorimètres adiabatiques.

#### Calorimètres à conduction de chaleur

Avec un calorimètre à conduction de chaleur, la chaleur dégagée (ou absorbée) dans la cellule de mesure peut être évacuée (ou transmise) vers (depuis) un environnement thermostaté. Normalement, une thermopile placée entre l'échantillon et le bain thermostaté détecte le flux de chaleur. La différence de température entre la cellule de mesure et le bain se traduit par un courant électrique,  $U$ , à travers la thermopile.

A condition que la température soit uniforme dans la cellule et le bain, la puissance thermique dégagée dans la cellule est donnée par l'équation de Tian

$$P = \varepsilon (U + \tau \cdot dU/dt)$$

Où  $P = dq/dt$  est la puissance thermique

$\varepsilon$  est la constante de calibration

$\tau$  la constante de temps de l'instrument

$dU/dt$  la dérivée du courant par rapport au temps

Pour un processus à l'équilibre l'équation se simplifie en :

$$P = \varepsilon \cdot U$$

Pour n'importe quel processus la quantité de chaleur dégagée dans la cellule de mesure est donnée par l'intégration du potentiel par rapport au temps :

$$q = \varepsilon \int U dt$$

Les microcalorimètres à conduction de chaleur sont habituellement équipés avec des thermopiles semi-conductrices, souvent appelé thermocouples ou éléments Peltier, qui détectent le flux de chaleur. Leur conductibilité thermique est élevée et la différence de température entre la cellule de mesure et le bain thermostaté est minime (de l'ordre du mK). Par conséquent de tels instruments peuvent être considérés comme des calorimètres isothermes.

Pour les processus lents (jusqu'à quelques minutes) l'équation simplifiée de Tian permet de décrire la cinétique avec une précision satisfaisante. Par contre, il est nécessaire d'appliquer l'équation complète de Tian ou l'une de ses formes plus développées, pour décrire une réaction rapide. Les microcalorimètres isothermes commercialisés permettent des « corrections dynamiques » automatiques.

La calorimètres utilisés pour des mesures courantes sont la plupart du temps des calorimètres à conduction de chaleur (CSC (USA) ; Setaram (France) ou encore Thermometric (Suède))

### Calorimètres à compensation de puissance.

Avec ce type d'appareillage, la puissance thermique d'un processus exothermique (ou endothermique) est contrebalancée par une puissance de refroidissement (ou de chauffage).

En calorimétrie on utilise l'effet Peltier.

Pour un processus endothermique, la compensation peut être également obtenue en utilisant un système chauffant électrique.

## **1. Bases de calorimétrie**

### Définition

A l'aide de la microcalorimétrie, il devient possible de mesurer de très petits flux de chaleurs. La microcalorimétrie isotherme est particulièrement adaptée au suivi de nombreux processus, puisqu'elle est une technique non destructrice, et non invasive. Elle ne nécessite aucun traitement préalable de l'échantillon, et ne se limite pas à l'analyse d'un unique état physique. Ainsi, des solides, des liquides, des gaz, des échantillons transparents ou opaques, des milieux homogènes ou hétérogènes peuvent être étudiés.

La majorité des phénomènes physiques et chimiques sont accompagnés d'un échange thermique avec l'environnement.

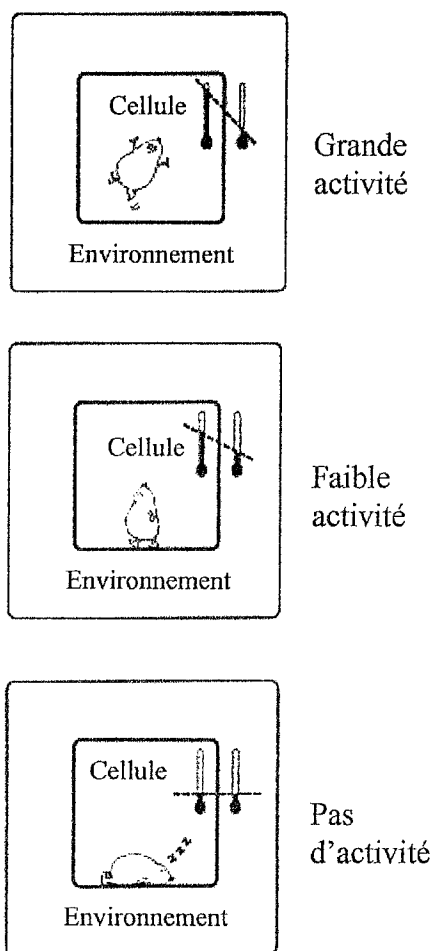
Lors d'une réaction, un système peut produire de la chaleur (la réaction est exothermique) ou en absorber (la réaction est endothermique).

La calorimétrie permet de qualifier et quantifier ce transfert de chaleur afin de suivre le processus étudié. La variation des grandeurs thermodynamiques peut en être déduite (enthalpie, entropie, enthalpie libre de Gibbs).

Les récents progrès en électronique ont permis d'augmenter considérablement la sensibilité des appareils (de l'ordre du microwatt ou du nanowatt) ouvrant ainsi la microcalorimétrie à de nouveaux domaines (mesures des interactions enzyme-substrat, ligand-protéine...)

## Principe

Dans le calorimètre, la chaleur qui est produite pendant le processus crée une différence de température entre l'échantillon dans la cellule et son environnement. Plus le processus est intense, plus la production de chaleur est élevée, et donc plus la différence de température est importante. En mesurant cette différence de température en continu, l'intensité du processus peut être déterminée. En connaissant le flux de chaleur total, il devient possible de déterminer l'étendu du phénomène.



Principe de mesure par microcalorimétrie :

La chaleur générée par l'échantillon est canalisée à travers des thermopiles extrêmement sensibles, les éléments Peltier, avant d'être captée par l'échangeur de chaleur.

Les éléments Peltier agissent comme des générateurs thermoélectriques utilisant l'effet Seebeck. Ils sont constitués de dispositifs biméalliques construits en matériaux semi-conducteurs, et sont capables de réagir à des variations de température inférieures au millionième de degré Celsius. Ces détecteurs très sensibles, composés d'un grand nombre de jonctions semi-conductrices en série, convertissent l'énergie thermique en signal électrique proportionnel au flux de chaleur.

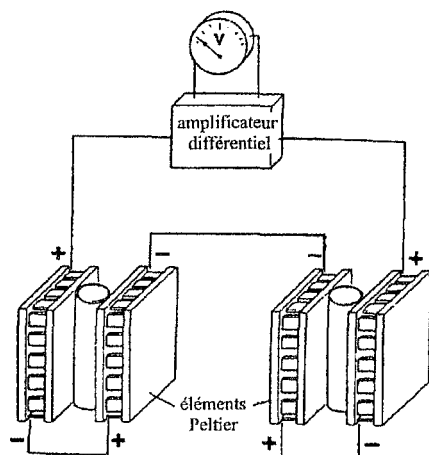


Figure 1 : Principe de mesure jumelée

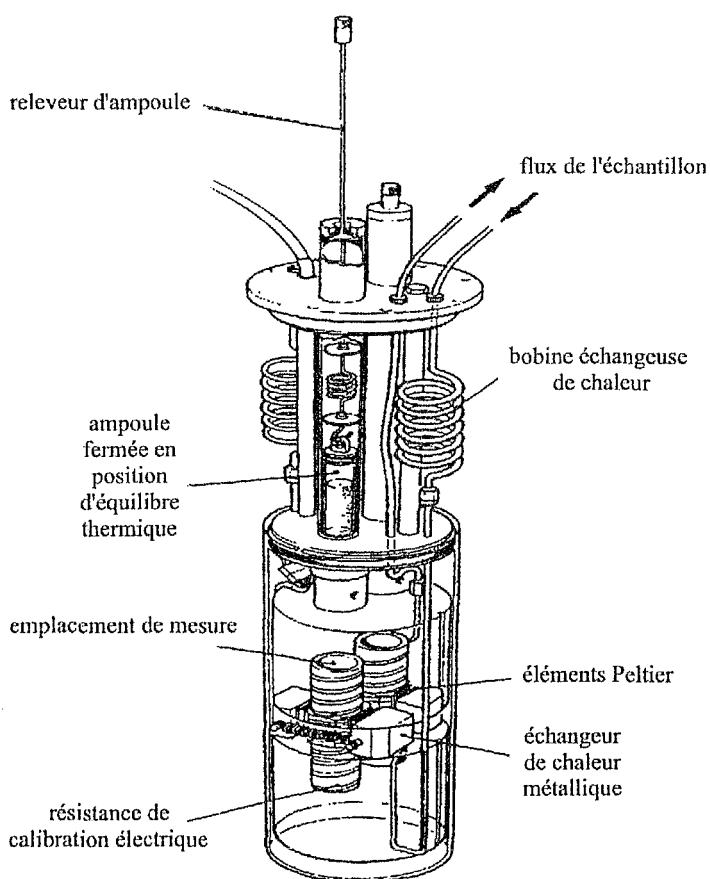


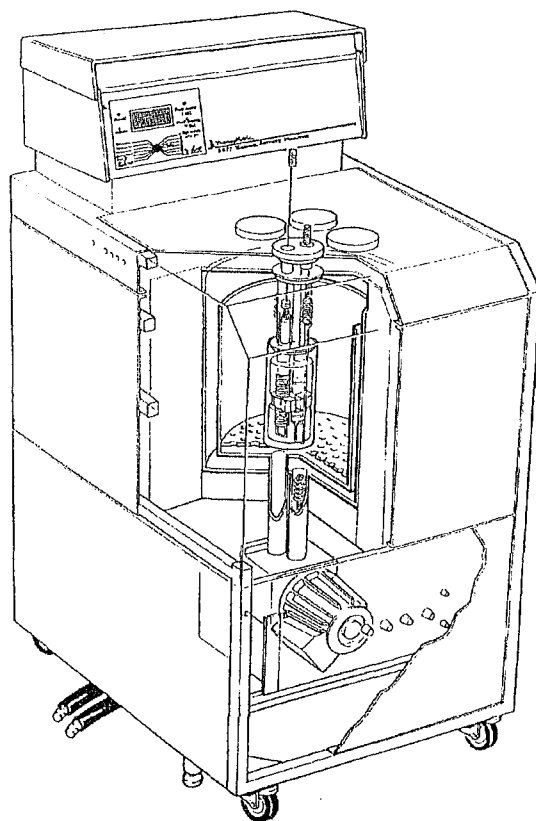
Figure 2: Cylindre de mesure

L'appareil enregistre une variation de chaleur au niveau de l'échantillon par unité de temps. Le signal de sortie est appelé « puissance » par abus de langage, en raison de l'unité de mesure (Joules/seconde = Watt).

La mesure est réalisée contre une référence. Les éléments Peltier au niveau de l'échantillon et de la référence sont montés en série et en opposition, de telle sorte que le signal enregistré représente la différence entre les flux de chaleur de la cellule de mesure et la cellule de référence. Les effets de perturbations thermiques sont minimisés.

### Quelques données techniques

Le Thermal Activity Monitor 2277 Thermometric (TAM 2277) permet la détection d'événements thermiques de l'ordre du microWatt. C'est à dire que des variations de température de l'ordre du millionième de degré peuvent être mesurées. Un tel niveau de sensibilité oblige à placer le microcalorimètre dans un bain thermostaté à  $\pm 2.10^{-4}^{\circ}\text{C}$ . Les réactions peuvent être étudiées entre 5 et 80°C (plage de température du thermostat). Le TAM 2277 peut recevoir jusqu'à 4 canaux de mesure.



Les résultats sont quantifiés par une calibration électrique préalable. Un courant d'intensité  $I$  connue est envoyé au niveau des thermocouples par l'intermédiaire d'une résistance de référence  $R$  placée autour du canal de mesure. La puissance d'entrée ( $P = R \cdot I^2$ ) est comparée au signal de sortie.


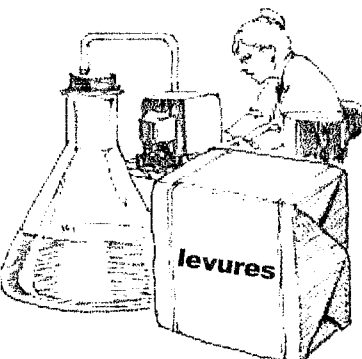
Chen & Wadsö [20] ont décrit une méthode de calibration chimique basée sur la quantification de la chaleur dégagée lors de l'hydrolyse lente de la triacétine dans un tampon imidazole/acide acétique. En changeant la composition du tampon, la vitesse de l'hydrolyse du triester, et donc la « puissance » thermique générée, peut être régulée. La chaleur dégagée lors de la réaction peut être précisément calculée ( $\pm 0.5\%$ ).

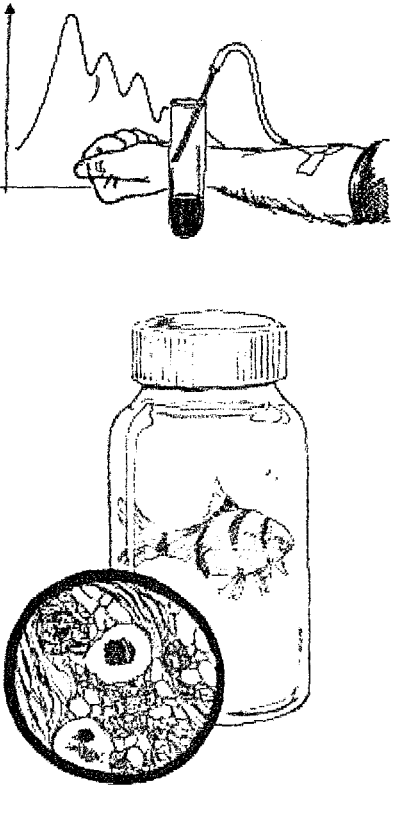
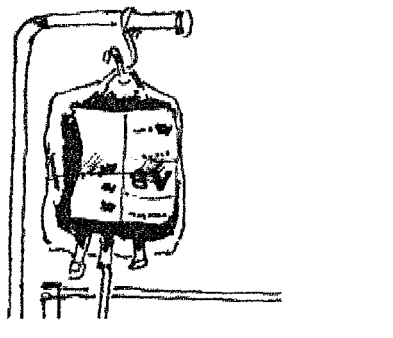
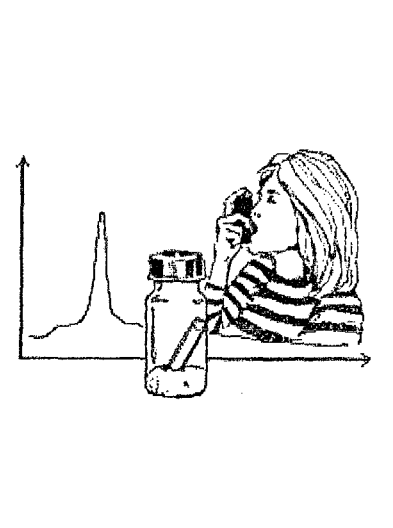
Cette dernière méthode présente l'avantage de réaliser la calibration directement au niveau de la mesure. A l'inverse, la position de la résistance de calibration fait que les valeurs de calibration électrique peuvent être entachées d'erreurs systématiques.

## 2. Domaines d'application

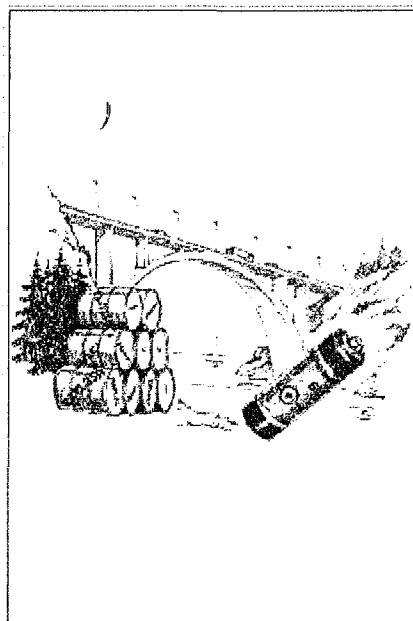
Le microcalorimètre est employé dans des domaines très variés, tels que l'écologie, les biotechnologies, la médecine/biologie cellulaire, les tests de biocompatibilité, des études thermodynamiques classiques, les sciences des matériaux en chimie et dans l'industrie pharmaceutique. La microcalorimétrie est la méthode par excellence pour les études cinétiques des produits solides, pour lesquels les autres méthodes peuvent difficilement être employées. Dans l'industrie pharmaceutique la microcalorimétrie isotherme est devenu un puissant outil pour le contrôle de qualité des solides, et est devenu de plus en plus indispensable pour la formulation de nouveaux principes actifs. La moitié des instruments est dédiée à l'industrie pharmaceutique et aux instituts.



	<p><b>Ecologie</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- tests in vitro avant l'observation des conséquences dans la Nature.</li><li>- étude d'environnements naturels complexes, tels que les sédiments dans les rivières et les lacs qui peuvent être affectés par des substances toxiques.</li><li>- démonstration de l'effet de toxines de l'environnement sur des systèmes écologiques sensibles.</li><li>- enregistrement de la croissance et de l'activité de populations de micro-organismes vivants dans différents sites naturels.</li><li>- étude des substances toxiques dans l'environnement qui peuvent influencer le métabolisme de cellules vivantes.</li></ul>
	<p><b>Biotechnologies</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- enregistrement de la croissance, la formation de produits et l'utilisation de substrats.</li><li>- optimisation de la maîtrise de la production de la levure de boulanger.</li><li>- surveillance du métabolisme des levures, des bactéries ou des cellules tissulaires quand de nouvelles sources d'éléments nutritifs et d'énergie sont utilisées</li><li>- obtention de la quantité d'énergie nécessaire pour la production de biomasse ou la formation de produits.</li><li>- étude de sensibilité d'une culture à des conditions stressantes externes.</li></ul>

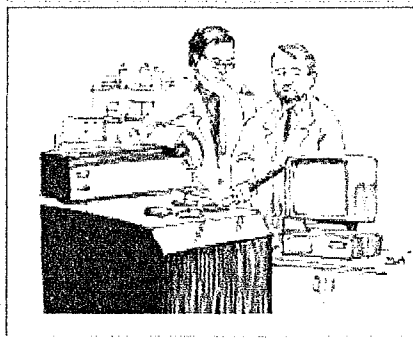
	<p><b>Médecine/Biologie cellulaire</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- démonstration de l'effet stimulants ou inhibant des médicaments sur les cellules vivantes.</li><li>- détermination de l'action des médicaments et des antibiotiques sur des cellules ou des parties d'organes.</li><li>- enregistrement de l'activité thermique des cellules tumorales, traduisant l'activité de la tumeur.</li><li>- caractérisation de maladies métaboliques, telles que des déséquilibres thyroïdiens, le diabète et l'obésité.</li><li>- observation de la réaction des cellules vis-à-vis de matériaux étrangers tels que les valves cardiaques artificielles, les vaisseaux sanguins ou des articulations artificielles de membres.</li></ul>
	<p><b>Tests de biocompatibilité</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>-étude de compatibilité entre le matériau du contenant et son contenu.</li></ul>
	<p><b>Sciences des matériaux – Industrie pharmaceutique</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- prédiction de péremption.</li><li>- mesure de la sensibilité à l'humidité de la structure cristalline des composés pharmaceutiques.</li><li>- étude de la fixation d'un PA avec son récepteur dans l'organisme.</li><li>-détermination de la cinétique et du mode de libération du PA à partir du médicament dans l'organisme.</li></ul>

Apport de la microcalorimétrie en préformulation galénique. Analyse de trois principes actifs à l'état solide.



### Sciences des matériaux – Industrie chimique

- estimation du risque de combustion spontanée et d'explosion pendant le stockage des carburants, des explosifs et autres substances chimiques instables.
- détermination de la qualité des piles, par exemple celles des pacemakers cardiaques, en enregistrant le courant de fuite interne.
- mesure de la corrosion de la surface des métaux et des plastiques en présence de liquide, de gaz et vapeurs.



### Thermodynamique classique

La calorimétrie aide le scientifique à comprendre quand, comment et pourquoi les processus chimiques et biologiques se déroulent.

Toute réaction accompagnée d'un flux de chaleur peut être suivie par cette méthode. La microcalorimétrie est donc une technique non spécifique. Elle ne permet pas de distinguer les différentes sources de chaleur à l'intérieur de la cellule de mesure. Ainsi, le signal enregistré est la somme algébrique de tous les événements thermiques se déroulant en même temps au moment de la mesure. Par conséquent, l'interprétation des thermogrammes est parfois très délicate. L'expérimentateur veillera donc à inventorier méthodiquement l'ensemble des réactions se déroulant dans l'ampoule de mesure pour éviter une mauvaise interprétation du thermogramme obtenu.

La non spécificité et la grande sensibilité de la méthode ont amené la calorimétrie à se développer dans les domaines les plus divers.

## 2.1 Applications non pharmaceutiques

### Stabilité

La calorimétrie est décrite comme une méthode d'analyse des explosifs et des carburants. Hansson [25] et Svensson [37] [38] ont décrit l'intérêt de la microcalorimétrie pour les tests de stabilité et de compatibilité des explosifs et d'agents rentrant dans des compositions pyrotechniques. La dégradation du bore (utilisé comme agent réducteur dans les compositions pyrotechniques) a été étudiée sous O<sub>2</sub> et N<sub>2</sub>. La calorimétrie permet d'observer dans le premier cas un exotherme, dû à la formation de B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, qui n'est pas observé sous flux d'azote. Les résultats de tests de compatibilité entre un carburant et un adhésif (contenant des peroxydes et des esters acryliques) sont présentés.

Le développement d'une cellule de perfusion pour humidité relative contrôlée a permis de mener des expériences sous des conditions atmosphériques parfaitement définies. Paulsson [33] décrit les nouveaux champs d'application de la calorimétrie dans le domaine de la caractérisation de la sensibilité des explosifs à l'humidité et l'étude des processus de corrosion des matériaux.

### Microbiologie

Face aux différentes questions que le biologiste se pose devant une culture, la microcalorimétrie isotherme permet de lui apporter des réponses :

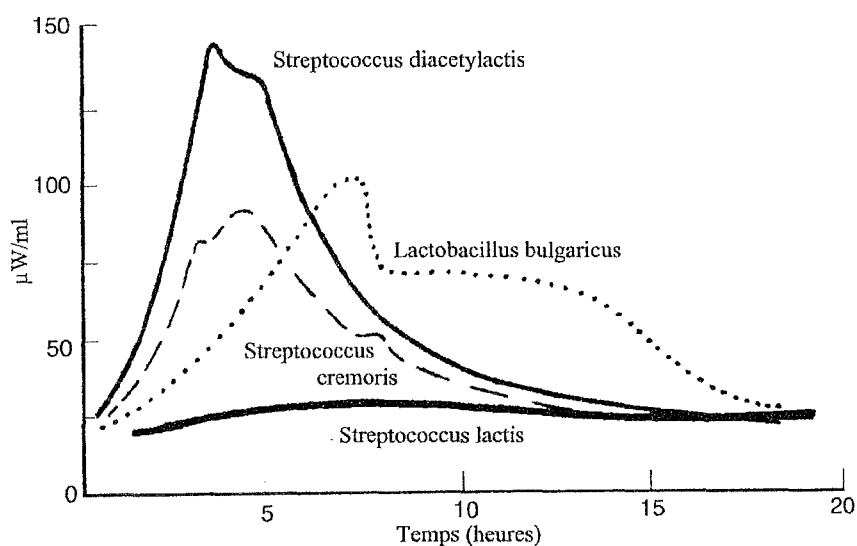
<i>Qu'est-ce que c'est ?</i>	→ Enumération
<i>Combien ?</i>	→ Identification/Caractérisation
<i>Quels sont les processus impliqués ?</i>	→ Croissance/Métabolisme
<i>Comment les stimuler ou les inhiber ?</i>	→ Stimulation/Inhibition

Chowdry & al. [21] et Buckton [19] dressent la liste des applications de la microcalorimétrie dans le domaine de la microbiologie. La technique est décrite pour des tests de mesure de bioactivité, l'élucidation du mode d'action des principes actifs au niveau moléculaire, l'évaluation du site d'action et les mécanismes de résistance des souches bactériennes.

---

Apport de la microcalorimétrie en préformulation galénique. Analyse de trois principes actifs à l'état solide.

Par ailleurs, chaque souche bactérienne est caractérisée par une « empreinte thermique » qui lui est propre, permettant son identification dans un prélèvement (si la préparation des échantillons et les conditions opératoires sont standardisées).



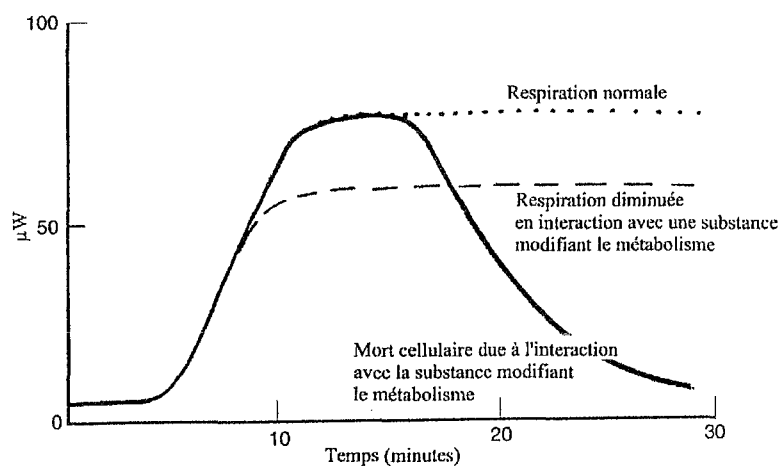
La chaleur due au métabolisme des micro-organismes est proportionnelle au nombre de cellules en présence. La calorimétrie permet donc la numération bactérienne rapide dans un prélèvement urinaire.

La technique peut être étendue à tout autre système cellulaire en culture et permet des analyses même avec des liquides présentant une grande turbidité. Le seuil de détection de la plupart des cellules est de l'ordre de  $10^5$  à  $10^6$  cellules/ml, et de l'ordre de  $10^4$  bactéries /ml.

cellules	conditions	T° (°C)	Chaleur Spécifique	détection
<b><u>Bactéries</u></b>				
Echerichia coli	milieu minimum, glucose, aérobie	37	2,5 mW/mg	10 <sup>6</sup> cellules/ml
Staphylococcus aureus	milieu complexe, glucose, aérobie	37	2,5 pW/cellule	4. 10 <sup>5</sup> cellules/ml
Cellulomonas sp.	cellulose	37	1,2 pW/cellule	10 <sup>6</sup> cellules/ml
Lactobacillus	fabrication du yaourt	25	1-300 µW/ml	1-4 µl
<b><u>Levures</u></b>				
Saccharomyces cerevisiae	milieu complexe, glucose, aérobie	30	2,15 mW/mg	10 <sup>5</sup> cellules/ml
Levure de boulanger	milieu complexe, anaérobie		0,34 mW/mg	5. 10 <sup>5</sup> cellules/ml
<b><u>Champignons</u></b>				
spores de Fusarium roseum			40 pW/spore	10 <sup>5</sup> spores/ml
<b><u>Protozoaires</u></b>				
Tetrahymena pyriformis			3,3 nW/cellule	10 <sup>3</sup> cellules/ml
<b><u>Algues vertes</u></b>				
Scenedesmus obstusiusculus	Culture continue	30	1-8 pW/cellule	10 <sup>6</sup> cellules/ml

Tableau 1 : niveau de détection de quelques organismes (d'après S. Russell [35])

Toute substance capable de modifier les processus métaboliques lors de la croissance cellulaire et/ou respiratoire entraîne également une modification du profil des thermogrammes obtenus.



Apport de la microcalorimétrie en préformulation galénique. Analyse de trois principes actifs à l'état solide.

Recherches Bibliographiques

Une étude de la croissance cellulaire a été présentée par Schön [36] pour l'évaluation des anticancéreux. La décroissance du métabolisme de cellules tumorales après addition de méthotrexate à différentes concentrations est enregistrée, et permet de construire des courbes dose-réponse.

### Agronomie

Mourik et Bakri [29] ont montré la thermogenèse des plantes en analysant la production de chaleur lors du processus germinatif et évalué l'influence des conditions de stockage sur la germination de graines.

### Etude des récepteurs en pharmacologie

En 1997, Hallén [22] a décrit l'apport de la microcalorimétrie de titration dans la conception rationnelle de nouvelles molécules (« rational drug design »). Les données thermodynamiques calculées pour la liaison du facteur de croissance de l'insuline (IGF-I) sur son récepteur (IGF-I-rec) ont permis de montrer un changement conformationnel de ce dernier après la liaison avec son agoniste.

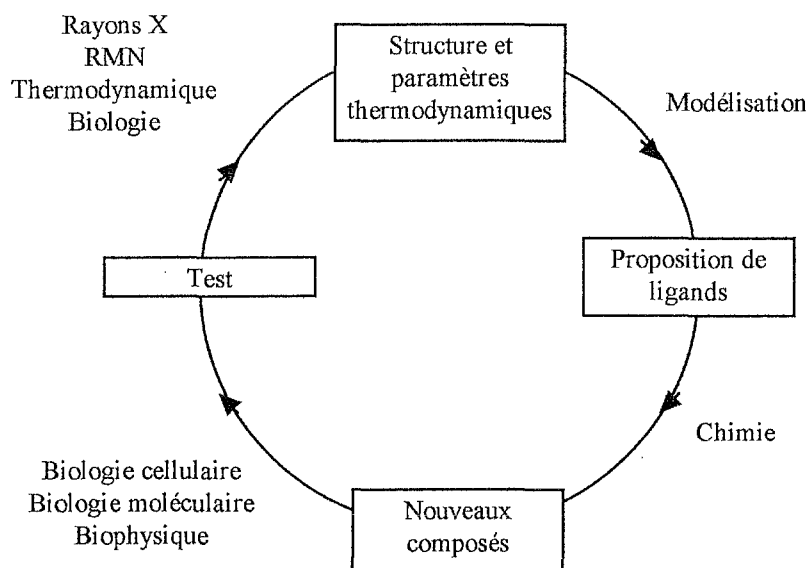


Figure 3: Présentation schématique de la structure itérative de la notion de « conception rationnelle des médicaments » (" rational drug design")

---

Apport de la microcalorimétrie en préformulation galénique. Analyse de trois principes actifs à l'état solide.

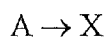
## 2.2 Applications dans le domaine de la préformulation

### 2.2.1 Etudes de stabilité

De nombreuses études ont été menées pour tenter de prédire la stabilité des produits dans les conditions auxquelles ils étaient soumis. Angberg & al. ont publié une série d'articles sur le sujet [3][4][5][6][7][8][9][10][11][12], Barkri [14][15], de même que Wilson & al. [37] ou Aso & al. [13]

Dans des conditions isothermes, la chaleur totale (absorbée ou générée) résultante de la réaction observée reflète l'ampleur de la transformation.

En suivant une réaction quelconque, à pression constante :



où  $x$  = le nombre de moles formées.

La chaleur totale échangée avec l'environnement est par définition :

$$Q = \Delta H \times x$$

où  $\Delta H$  est l'enthalpie du phénomène étudié (en Joules/mole)

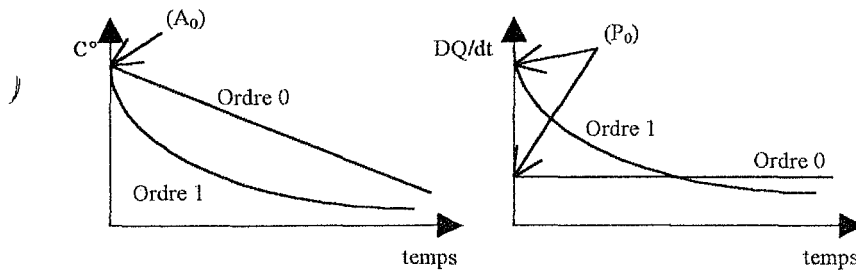
La dérivée de  $Q = dQ/dt$  est le flux de chaleur en Watts

$$dQ/dt = \Delta H \times (dx/dt) \text{ Equation 1 : mesure du flux de chaleur}$$

A tout instant, le signal enregistré permet donc d'obtenir des informations d'ordre thermodynamique (ampleur du phénomène) et cinétique sur le processus.

La plupart des produits pharmaceutiques présentent des cinétiques de décomposition d'ordre 0 ou 1 (ou pseudo ordre 1).





**Figure 4 : allure des courbes de stabilité obtenues par le suivi de la concentration (à gauche) et par le suivi du flux de chaleur (à droite)**

La microcalorimétrie donne une information directe sur la vitesse de la réaction.

L'équation 1 montre que le flux de chaleur est le produit d'une enthalpie et de la vitesse de la réaction. Cette dernière est la dérivée de la courbe de variation de concentration.

Par conséquent, pour une réaction d'ordre 0, il est normal d'obtenir un thermogramme parallèle à l'axe des abscisses ( $dx/dt$  est constant).

Par contre, pour une réaction d'ordre 1, le suivi de la concentration en fonction du temps présente une courbe exponentielle décroissante. Sa dérivée, et par conséquent l'allure du thermogramme correspondant, sont une exponentielle décroissante. Le flux de chaleur est dans ce cas maximal en début de mesure ( $P_0$ ).

La très grande sensibilité de l'appareil (sensibilité spécifique  $10^4$  supérieure par rapport à celle de la DSC) permet de conduire des études de stabilité à des températures proches de « l'ambiante ».

L'équation 1 montre que le flux de chaleur est proportionnel à la vitesse de la réaction.

Sa constante de vitesse  $k_T$  augmente avec la température, d'après la loi d'Arrhénius :

$$k_T = A \cdot e^{-(E_a/R.T)} \quad \text{Equation 2 : loi d'Arrhénius}$$

avec  $k_T$  est la constante de vitesse,

A est le facteur préexponentiel (qui rend compte de la fréquence des collisions et des exigences géométriques de la réaction),

Ea est l'énergie d'activation de la réaction étudiée,

R est la constante des gaz parfaits

T est la température à laquelle se déroule la réaction (Kelvin),

$k_T$  augmente avec l'énergie d'activation (Ea) de la réaction étudiée.

(Lors des études de stabilité en développement pharmaceutique, ces énergies sont de l'ordre de 50 à 100 kJ/mole).

La connaissance des valeurs de Ea en préformulation contribue au choix des conditions opératoires de fabrication, voire même au choix de certaines opérations pharmaceutiques (mode de stérilisation par exemple).

La détermination des Ea par des méthodes classiques est d'autant plus longue que le processus étudié est lent et passe obligatoirement par la détermination des  $k_T$  à des températures différentes.

La microcalorimétrie permet une détermination des Ea aussi précise en quelques heures de mesure seulement.

Il a été démontré et vérifié expérimentalement que la température affecte la valeur des  $P_0$  mesurés à différentes températures de manière identique à celle des constantes de vitesse ( $k_T$ ) selon la loi d'Arrhénius. L'utilisation des  $P_0$  à différentes températures permet donc le calcul des Ea de la réaction selon l'équation :

$$Ea = \ln \left( \frac{P_{0(T1)}}{P_{0(T2)}} \times R \times \left( \frac{T_1 \times T_2}{T_1 - T_2} \right) \right) \quad \text{Equation 3 : calcul de Ea avec les } P_0$$

Les représentations graphiques de  $\ln(P_0)$  ou de  $\ln(k)$  obtenues à différentes températures en fonction de  $1/T$  livrent deux droites distinctes mais de pente égale à  $-Ea/R$ .

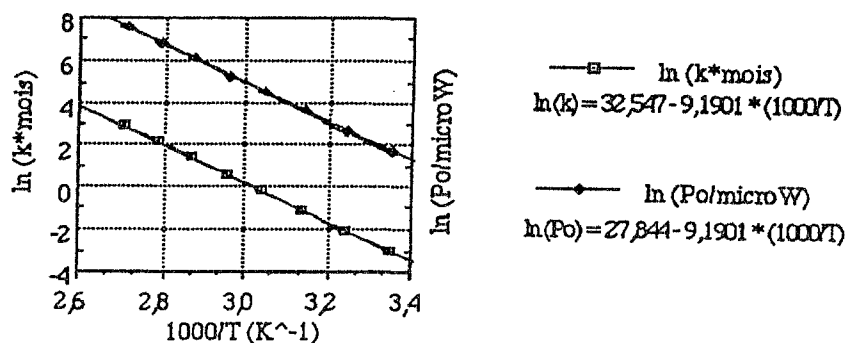


Figure 5 : Représentation graphique de  $\ln(P_0)$  et  $\ln(k)$  en fonction de  $(1000/T)$

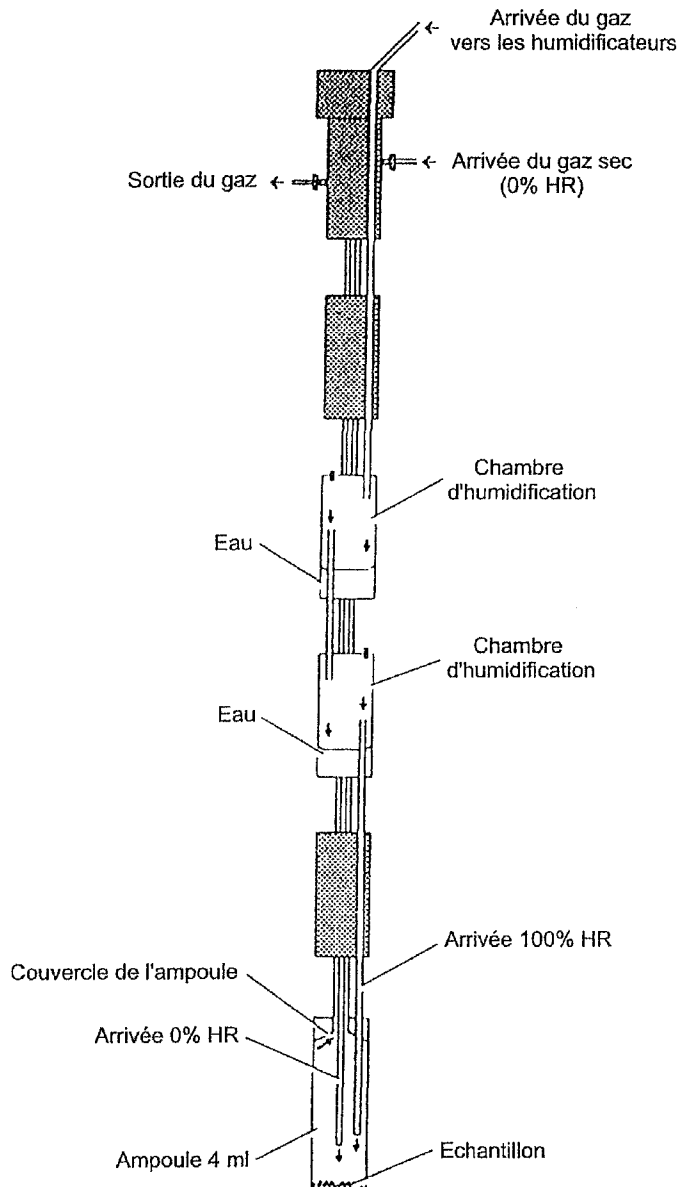
### 2.2.2 Amorphicité de surface

Certains procédés pharmaceutiques peuvent être traumatisants pour les poudres. Le broyage ou la micronisation sont décrits par Briggner [18] comme pouvant être à l'origine de la formation de régions amorphes à la surface des particules composant la poudre. Ces points, de plus faible stabilité par rapport à un état cristallin, sont rendus particulièrement réactifs. En présence de petites quantités d'eau (ou de solvant), et/ou en augmentant simplement la température au-dessus de la température de cristallisation du produit ( $T_c$ ), ces régions peuvent évoluer vers des états plus stables. Le nouvel état cristallin présente des propriétés différentes (en particulier la solubilité, du produit est affectée - la forme la plus stable étant toujours la moins soluble). La possibilité d'amorphisation en surface ainsi que la proportion d'amorphe sont donc des paramètres à évaluer lors de la préformulation.

La microcalorimétrie est un outil précieux pour le formulateur, qui lui permet d'apporter une réponse rapide au problème soulevé ci-dessus.

Les études de recristallisation sous HR, d'excipients ou de principes actifs, ont fait l'objet de nombreuses publications [13][40][19].

Niqvist [32] a présenté une série de solutions salines saturées permettant de couvrir la plage des humidités relatives (HR). Le système développé par Bakri [16], cité précédemment, permet une maîtrise de cette HR avec une précision supérieure à 0.1% HR.



Son principe est le suivant :

Une valve laisse, dans une position, passer un gaz sec directement dans l'ampoule de mesure. Dans l'autre position, le gaz est distribué dans deux chambres humidificatrices successives, où il se sature en eau (100% HR), avant d'atteindre l'échantillon. Les deux conduits passent par des échangeurs de chaleur pour assurer l'équilibre thermique des gaz. L'humidité relative entrant dans la cellule de mesure, contrôlée par un logiciel, est obtenue par le mélange de

différentes proportions des deux gaz. Des variations de l'humidité relative en gradient ou en incrément sont possibles.

)

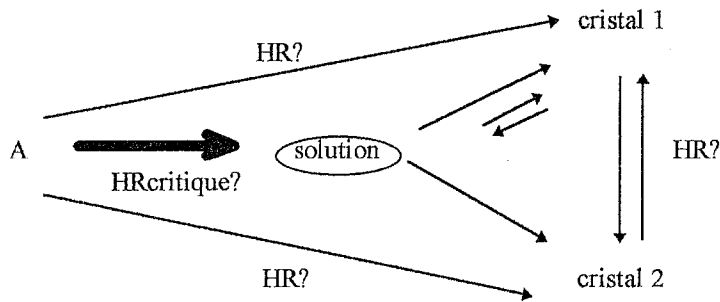


Figure 6 : diagramme de transition entre différents états cristallins d'un corps A sous l'influence de l'humidité relative

### 2.2.3 Rôle de l'humidité relative dans des transformations amorphe → cristallin

- sous humidité relative fixe

L'analyse d'un échantillon de lactose spray dried (amorphe), placé dans une ampoule en verre avec une cupule contenant une solution saline saturée (85% HR), présente le thermogramme suivant :

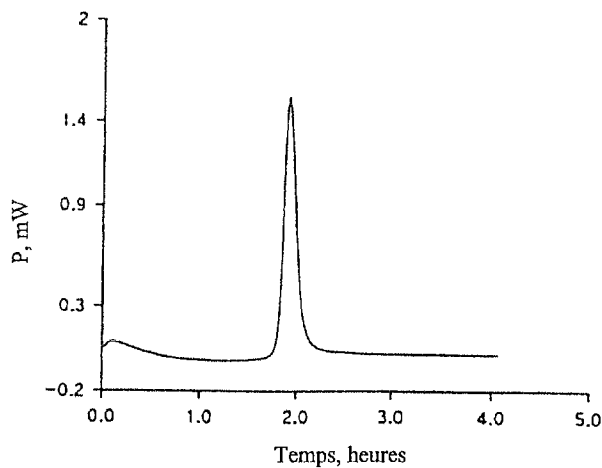


Figure 7 : thermogramme du lactose spray-dried sous 85% HR à 25°C

Au départ deux phénomènes se déroulent simultanément :

De l'eau s'évapore de la cupule pour saturer l'atmosphère dans l'ampoule (processus endothermique) ;

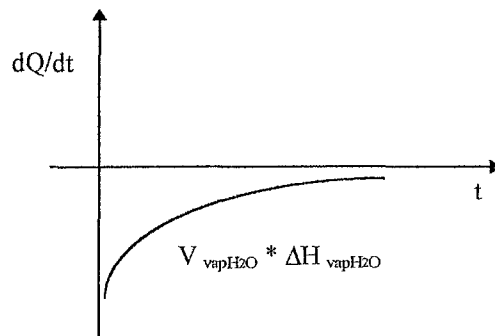


Figure 8 : thermogramme de l'évaporation d'eau

Parallèlement, la poudre fixe de l'eau (phénomène exothermique.)

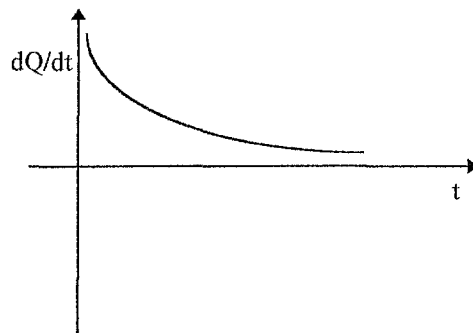


Figure 9 : thermogramme de la sorption d'eau sur un lit de poudre

Les cinétiques d'absorption et d'évaporation de l'eau sont les mêmes à l'intérieur de l'ampoule.

La différence entre les enthalpies d'évaporation d'eau et d'adsorption sur la poudre est à l'origine d'un léger exotherme au départ.

Le signal se négative par la suite, traduisant l'apparition d'un nouveau phénomène.

La poudre atteint une **HR critique** et se dissout en surface (phénomène endothermique).

Une **recristallisation** est alors rendue possible par la présence :

- d'une **solution saturée** d'un produit amorphe donc instable,

- et de quelques **germes de recristallisation** (résiduels à l'intérieur de l'amorphe.)

Le phénomène se traduit sur le thermogramme par un pic exothermique de recristallisation brutale, montrant que la réaction est concertée (la recristallisation ne se produit que lorsque la poudre est entièrement saturée en eau.)

L'équilibre n'est pas encore atteint. Le lactose recristallisé est **plus stable** donc **moins soluble** (ce qui est démontré ci-après.) Un transfert d'eau de la poudre vers la solution saline saturée se produit (les deux phénomènes, puisqu'ils se déroulent avec la même vitesse, s'annulent partiellement, l'un étant endothermique, l'autre exothermique.)

En intégrant le pic, on obtient la quantité de chaleur nécessaire pour recristalliser 100% d'amorphe.

#### *2.2.3.1 Technique de mesure de l'amorphicité de surface*

On peut réaliser une gamme de différents rapports d'un mélange amorphe + poudre cristalline. L'échantillon est placé dans une ampoule de mesure avec un hygrostat rempli avec une solution saline saturée, puis analysé. L'aire sous la courbe du pic de recristallisation est calculée.

On trace ainsi une droite d'étalonnage (pourcentage d'amorphe en fonction du signal de recristallisation) qui permet de mesurer de façon précise l'amorphicité d'une poudre en surface. La sensibilité est très supérieure à toute autre méthode (DSC, diffraction aux rayons X) et permet de détecter des teneurs inférieures à 1% d'amorphe dans l'échantillon.

Intérêt : Permet de maîtriser des processus de fabrication de nanoparticules pour inhalation. Les particules doivent être le plus finement divisées pour atteindre les bronchioles. Un taux trop élevé de la fraction amorphe dans la poudre peut se traduire par une recristallisation en surface avec formation d'agglomérats qui ne peuvent atteindre leur cible.

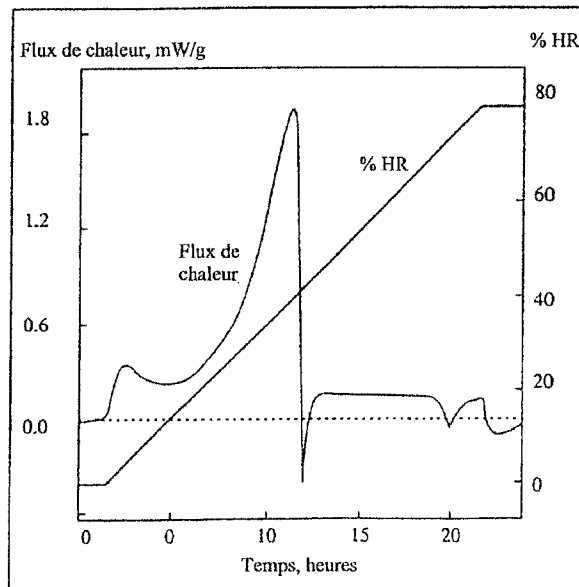
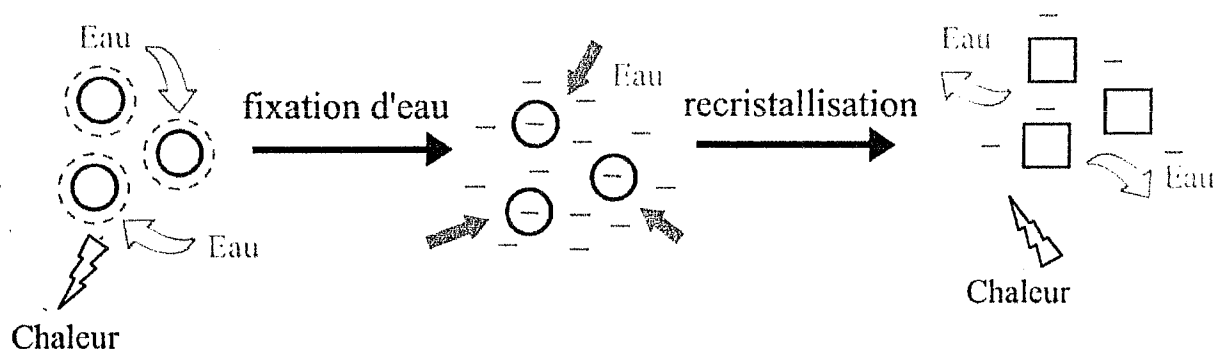


Figure 10 : thermogramme du lactose amorphe sous gradient d'humidité relative à 25°C

### 2.2.3.2 Analyse en gradient d'humidité relative

Lors du gradient le thermogramme présente une courbe exothermique qui correspond à l'absorption d'eau par la poudre. L'allure de cette courbe reflète la cinétique avec laquelle se déroule le phénomène. La poudre adsorbe de l'eau dans un premier temps puis absorbe une grande quantité d'eau (avec une cinétique élevée) pour recristalliser.

Un endotherme survient brusquement lors du gradient. Il reflète une expulsion d'eau brutale faisant suite à une transformation de l'amorphe vers un état cristallin (état plus stable donc moins soluble.)





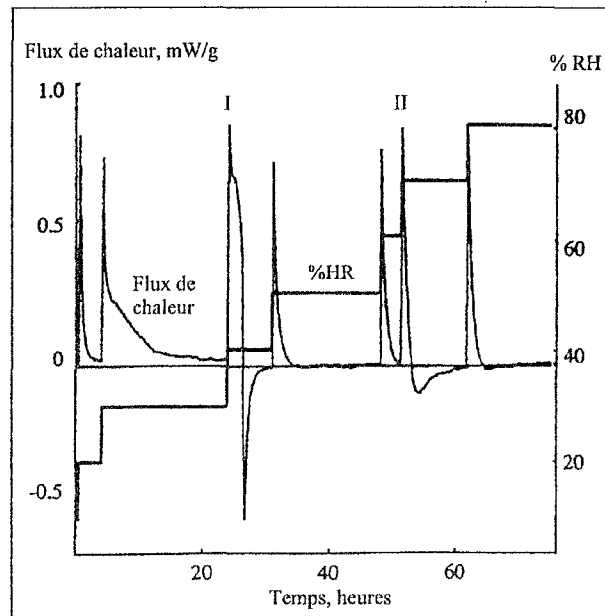


Figure 11 : thermogramme du lactose amorphe sous incréments d'humidité relative à 25°C

### 2.2.3.3 Analyse en incréments d'humidité relative

Cette analyse permet de localiser l'humidité à laquelle se produit la recristallisation.

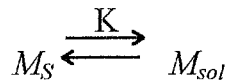
Le thermogramme présente, en l'absence de tout autre phénomène, une série de pics exothermiques d'amplitude croissante, qui retournent à la ligne de base, à l'équilibre. Ils correspondent respectivement à une ad - absorption d'eau par la poudre (phénomène exothermique).

Un endotherme pendant l'équilibre de la poudre à l'humidité relative appliquée, permet de révéler une transformation du type amorphe → cristallin avec expulsion d'eau.

## 2.3 Solubilité et polymorphisme

### 2.3.1 Étude de solubilité des molécules

Soit la réaction



avec  $M_s$  molécule à l'état solide

$M_{sol}$  Molécule dissoute

$$K = \frac{[M_s]}{[M_{sol}]} = \frac{\text{fraction molaire soluté}}{\text{fraction molaire solide}} = \frac{\text{solubilité}}{1} = \text{solubilité}$$

Or selon la loi de Van't Hoff  $\frac{d(\ln K)}{dT} = \frac{\Delta H}{RT^2}$ , **Equation 4 : loi de Van't Hoff**

K varie avec la température, laquelle influence donc la solubilité.

La solubilité du produit est déterminée à différentes températures.

On représente alors  $\ln(S)$  en fonction de  $1/T$  (température en Kelvin).

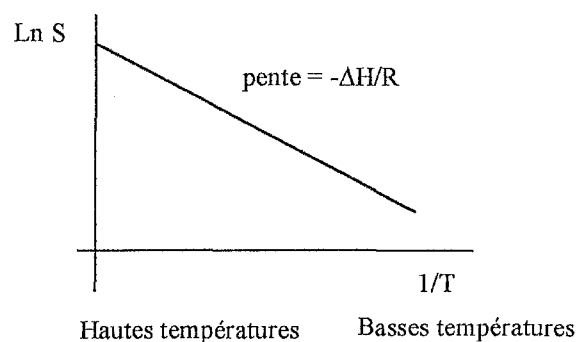


Figure 12 : représentation du  $\ln(S)$  en fonction de  $1/T$

Rq : La non linéarité, lorsque les points sont reliés, indique une température de transition et la présence de polymorphes.

---

Apport de la microcalorimétrie en préformulation galénique. Analyse de trois principes actifs à l'état solide.

Recherches Bibliographiques

Quelques rappels :

Une réaction se déroule spontanément si :

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \leq 0$$

Equation 5 : enthalpie libre

Lorsque  $\Delta G$  est nul, la réaction est à l'équilibre.

Le  $\Delta G$  (noté également  $\mu$  = potentiel chimique, lorsque l'enthalpie libre est ramenée à 1 mole) est affecté par :

- la température

- les concentrations (pour les solutés)

$$\mu_X = \mu^\circ + RT \ln X$$

(X = fraction molaire)

- la pression (pour les gaz) :

$$\mu_P = \mu^\circ + RT \ln P$$

$\mu^\circ$  est le  $\mu$  de la molécule à l'état pur.

### 2.3.2 solubilité des polymorphes

Un essai de solubilité est réalisé sur deux polymorphes  $\alpha$  et  $\beta$ .

$\alpha \rightarrow \beta$  ( $\alpha$  est moins stable que  $\beta$ )

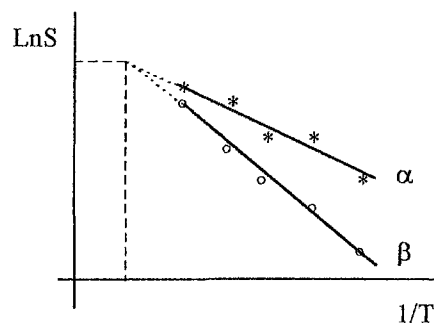


Figure 13 : représentation de Ln (S) en fonction de 1/T de deux polymorphes

L'essai montre que  $\beta$  est toujours moins soluble que  $\alpha$  pour une température donnée.

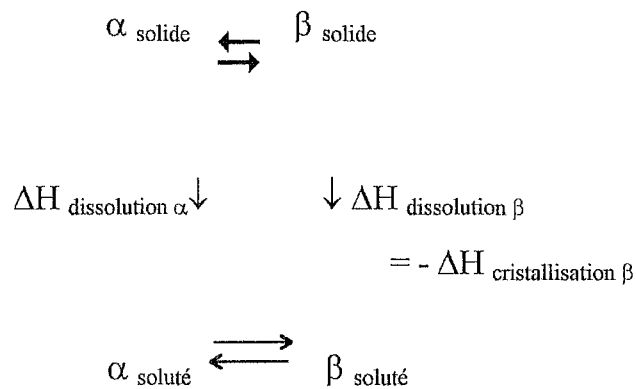
D'après la loi de Vant'Hoff, l'enthalpie de dissolution pour  $\alpha$  et  $\beta$  est déduite de la pente de la droite. )

On trouve pente 1 =  $-\Delta H_{\text{dissolution } \alpha} / R \rightarrow \Delta H_{\text{dissolution } \alpha}$

pente 2 =  $-\Delta H_{\text{dissolution } \beta} / R \rightarrow \Delta H_{\text{dissolution } \beta}$

La température de transition est lue au point de convergence des deux droites. A la température de transition,  $\alpha \leftrightarrow \beta$ , le produit est métastable.

On peut calculer l'enthalpie de transition en utilisant la loi de Hess



$$\Delta H_{\text{transition}} = \Delta H_{\text{dissolution } \alpha} - \Delta H_{\text{dissolution } \beta}$$

On peut également en tirer l'entropie de la réaction de transition :

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = 0 \text{ (équilibre)} \rightarrow \Delta S = \Delta H_{\text{transition}} / T_{\text{transition}}$$

On démontre ici que la forme la moins stable est la plus soluble :

A la température de transition, la réaction  $\alpha \leftrightarrow \beta$  est à l'équilibre.

On note le  $\mu$  de la réaction  $\mu^* = \mu_{\beta} - \mu_{\alpha}$  où  $\mu = \Delta G$

$$\mu_{\text{dissolution } \alpha} = \mu_{\alpha \text{ soluté}} - \mu_{\alpha \text{ solide}} = 0 \text{ (car équilibre)}$$

$$\mu_{\text{dissolution } \beta} = \mu_{\beta \text{ soluté}} - \mu_{\beta \text{ solide}} = 0$$

$$\text{où } \mu_{\alpha \text{ solide}} = \mu_{\alpha \text{ solide}}^{\circ} + RT \ln X_{\alpha} \quad (X = \text{fraction molaire})$$

$$\text{et } \mu_{\beta \text{ solide}} = \mu_{\beta \text{ solide}}^{\circ} + RT \ln X_{\beta}$$

$$\text{ici, } \mu_{\alpha \text{ solide}}^{\circ} = \mu_{\beta \text{ solide}}^{\circ} = \mu_{\text{M}}^{\circ} \text{ (forme métastable)}$$

$$\text{donc } \mu_{\text{dissolution } \beta} = \mu_{\beta} - \mu_{\text{M}}^{\circ} - RT \ln X_{\beta} = 0$$

avec  $X_{\beta}$  = solubilité de  $\beta$

$$\Rightarrow \mu_{\text{dissolution } \beta} = \mu_{\beta \text{ soluté}} - \mu_{\text{M}}^{\circ} - RT \ln S_{\beta} = 0$$

de même

$$\mu_{\text{dissolution } \alpha} = \mu_{\alpha \text{ soluté}} - \mu_{\text{M}}^{\circ} - RT \ln S_{\alpha} = 0$$

$$\Leftrightarrow \mu_{\beta \text{ soluté}} = \mu_{\text{M}}^{\circ} + RT \ln S_{\beta}$$

$$\mu_{\alpha \text{ soluté}} = \mu_{\text{M}}^{\circ} + RT \ln S_{\alpha}$$

$$\Rightarrow \mu_{\beta \text{ soluté}} - \mu_{\alpha \text{ soluté}} = RT \ln(S_{\beta}/S_{\alpha})$$

On a :  $R > 0$

$$T > 0$$

$$\mu_{\beta \text{ soluté}} - \mu_{\alpha \text{ soluté}} < 0 \text{ si et seulement si } \ln(S_{\beta}/S_{\alpha}) < 0$$

$$\Leftrightarrow S_{\beta}/S_{\alpha} \text{ est compris entre } 0 \text{ et } 1$$

$$\Leftrightarrow S_{\beta} < S_{\alpha}$$

Remarques concernant l'expérience :

Il est nécessaire de travailler avec de grands volumes de solvants pour être en-dessous de la concentration maximale du cristal (pour éviter qu'il ne précipite).

La détermination de la solubilité d'un amorphe en fonction de la température peut se révéler délicate si la cinétique de recristallisation est très rapide.

## 2.4 *Compatibilité*

L'objectif est de prévoir une interaction entre deux produits de façon qualitative.

Une interaction peut être catalysée par l'eau. Il est donc fondamental dans ce cas de maîtriser la teneur en eau des poudres.

Remarque : une réaction peut également être amplifiée par un solvant autre que l'eau (molécules hydrophobes). On peut alors travailler sous pression de vapeur d'un solvant organique.

Les données des thermogrammes de deux produits isolés permettent de calculer le flux de chaleur théorique de leur mélange. Cette courbe théorique dite « non-interaction » peut ensuite être comparée au thermogramme d'un mélange réel des substances. La différence entre les deux thermogrammes indique le niveau de l'interaction entre ses constituants.

Le flux de chaleur est mesuré dans un premier temps individuellement pour chaque produit. Puis, la somme des flux de chaleur pour chaque constituant est calculée, permettant de déterminer le flux de chaleur théorique du mélange.

Le thermogramme pour le mélange réel est par la suite tracé.

La différence entre les flux de chaleur réels et théorique décrit le niveau de l'interaction et donc le degré de compatibilité entre les constituants du mélange. Si la différence entre le flux de chaleur réel et théorique est nulle, les produits sont considérés comme étant compatibles.

Avant tout calcul, toutes les valeurs expérimentales individuelles doivent être ramenées à l'unité de masse.

Les équations utilisées dans l'analyse de compatibilité sont :

$$p_{diff}(t) = p_{mix}(t) - p_{theor}(t)$$

**Equation 6 : calcul du flux de chaleur théorique  
pour les études de compatibilité**

où

$p_{diff}(t)$  = la courbe d'interaction

$p_{mix}(t)$  = flux de chaleur spécifique (en W/unité de masse) pour un mélange réel

$p_{theor}(t)$  = courbe théorique « non-interaction »

et où, pour un mélange de constituants

$p_{theo}(t) = Fract[1] \times pin[1](t) + Fract[2] \times pin[2](t)$

et

$pin[1](t)$  = flux de chaleur spécifique du constituant [i]

$Fract[1]$  = fraction du constituant [i] dans le mélange.

## ***2.5 Isothermes de sorption***

Les isothermes de sorption représentent, pour une température donnée, la prise de masse d'eau, d'un échantillon conditionné à l'équilibre sous différentes atmosphères d'hygrométrie donnée. La connaissance du profil de ces isothermes est un point essentiel pour les opérations de pesée ou de mélange.

Pesées : elles devront tenir compte de la teneur en eau de la poudre.

Les mélanges :

La majorité des mélanges de poudres sont réalisés sans en connaître les isothermes de sorption.

Cas du LiCl mélangé à un excipient.

Le chlorure de lithium présente une humidité critique à 11.6%HR.

A 11.6%HR LiCl devient soluble (il se forme une solution saturée en surface de la poudre.) Il peut s'en suivre des retransformations du produit tout ou partiellement en surface, à l'origine de modification de ses propriétés physico-chimiques (granulométrie, solubilité et profil de dissolution notamment.)

Par conséquent, il paraît légitime de s'interroger sur la nécessité d'un séchage des poudres avant de réaliser un mélange, (ce qui implique une grande quantité d'énergie)

Une autre façon d'envisager le problème serait : à quelle HR peut-on travailler pour garder LiCl sous forme de grain ?

Dans le mélange, les grains de LiCl sont entourés par l'excipient.

Si au départ l'excipient est équilibré à 50% HR et LiCl à une  $HR < 11.6\%$  HR, l'HR du mélange ne sera pas forcément la moyenne arithmétique des deux HR (même en tenant compte de la proportion du mélange.)

L'isotherme de sorption de LiCl se présente de la façon suivante :

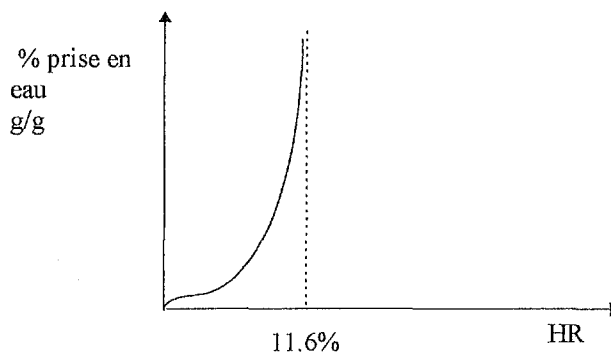


Figure 14 : isotherme de sorption de LiCl



L'excipient peut présenter un isotherme semblable au profil 1, 2 ou 3 :

)

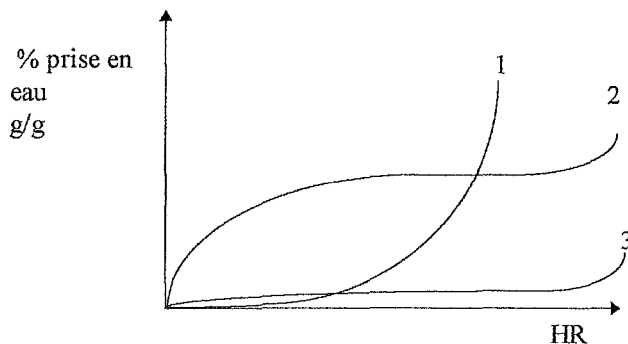


Figure 15 : profils possibles d'isothermes de sorption

Quand LiCl sera en présence d'un excipient présentant un isotherme de sorption de type 2, le mélange pourra se faire avec un transfert important d'eau de l'excipient vers LiCl (en fonction de l'humidité relative à laquelle il est stabilisé.)

A l'opposé, avec un excipient présentant un profil du type 3, c'est LiCl qui pourra lui transférer une partie de son eau.

Rq : Il est également important de connaître les variations des isothermes de sorption avec la température.

En galénique, il faut tenir compte de la cinétique des phénomènes qui peuvent jouer en faveur du formulateur.

Ainsi, une dégradation qui se déroulerait très lentement pourrait ne pas être critique si la durée de l'opération est courte.

#### Méthode d'obtention des isothermes de sorption

Des appareils tels que le DVS (Dynamic Vapour Sorption) permettent la détermination des isothermes de sorption des poudres (méthode gravimétrique)

La calorimétrie et le Gas flow permettent également de réaliser des isothermes de sorption de façon très précise.

### 2.5.1 Méthode gravimétrique simple

Une série d'échantillons, dont la masse est connue, est conditionnée sous des cloches contenant plusieurs solutions salines saturées, de façon à couvrir toute la gamme en humidité relative.

Pour chacun, la masse est relevée quotidiennement.

Le pourcentage de prise de masse, à l'équilibre, est reporté sur l'isotherme pour chaque HR.

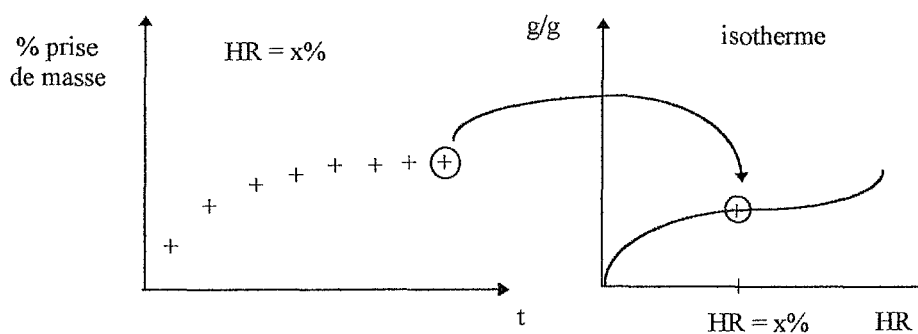


Figure 16 : Réalisation d'un isotherme de sorption

### 2.5.2 Méthode calorimétrique

La technique nécessite une cellule de perfusion pour humidité relative

Prochainement sortira une cellule de perfusion HR Twin qui permettra de mesurer simultanément l'absorption d'eau par la poudre et l'humidité relative sortant de la cellule.

Par différence avec l'HR entrant (qui est définie) l'expérimentateur pourra calculer la quantité d'eau fixée par la poudre.

En attendant, cette mesure est possible en utilisant deux cellules pour perfusion en humidité relative, montées en série sur deux canaux de mesure.

Le gaz qui sort de la première cellule est poussé vers la seconde. Dans celle-ci, l'ampoule de mesure est remplie d'eau.

La quantité de chaleur nécessaire pour évaporer l'eau est directement proportionnelle à l'HR entrant dans l'ampoule (pour une température et un flux de gaz donnés.)

La microcalorimétrie présente l'avantage de pouvoir tracer des isothermes de sorption avec de très petites quantités de poudre et de détecter des transformations du type amorphe vers un état cristallin (pouvant être à l'origine de phénomènes d'hystérèse.)

## *2.6 Etude de la dissolution des poudres*

La dissolution est décrite comme étant un processus en deux étapes : une étape de mouillage de la poudre dans un premier temps (« wetting »), est suivie de la dissolution à proprement parler.

Cette dernière étape est **toujours** un phénomène endothermique.

Dans ces conditions pourquoi la chaleur de dissolution mesurée est tantôt négative tantôt positive?

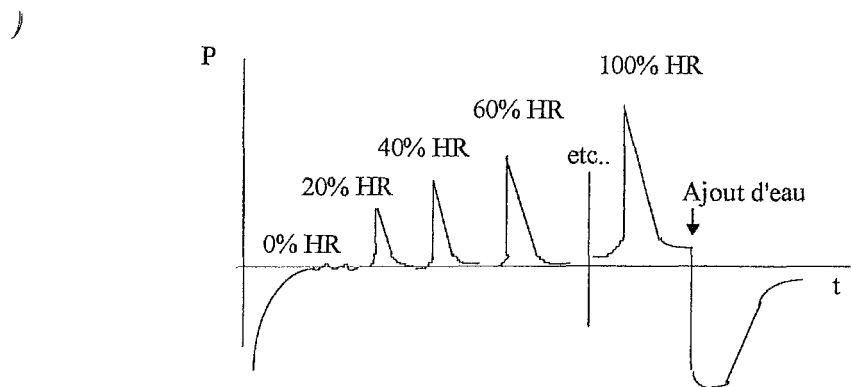
Essai en calorimétrie :

1 gramme de poudre séchée est analysée en calorimétrie. Un flux d'air à humidité relative contrôlée lui est envoyé. On observe un pic exothermique d'hydratation.

L'opération est répétée en incrémentant l'humidité relative entrant dans la cellule (par incréments de +20%HR par exemple) jusqu'à 100% HR.

On introduit alors dans la cellule de l'eau.

Un pic endothermique de dissolution est alors obtenu.



**Figure 17 : thermogramme type d'une étude de dissolution**

La chaleur totale nécessaire à la dissolution est la somme des aires sous la courbe de chaque pic d'hydratation (exothermique) et du pic de dissolution (endothermique).

Il est donc indispensable de standardiser l'état initial en choisissant une valeur d'humidité relative d'équilibre de la poudre qui sera constante pour toutes les analyses.

En effet, en fonction du choix de l'état initial la somme des chaleurs d'hydratation (qui n'est pas négligeable) sera tantôt supérieure à la chaleur de dissolution tantôt inférieure.

## **Introduction à la partie expérimentale**

Les applications potentielles de la microcalorimétrie ayant été définies précédemment, cette seconde partie abordera quelques utilisations de la technique dans le laboratoire de préformulation de Hoechst Marion Roussel (Roussel Uclaf.) L'objectif est de présenter ses avantages par rapport à des méthodes plus traditionnelles. Elle peut être également complémentaire avec d'autres techniques. Le développement d'un nouveau médicament nécessite en effet des études qui se révèlent décisives pour la suite à donner à un projet. Une restriction des coûts et des gains de temps y sont des paramètres importants à maîtriser.

L'une des étapes primordiales de la préformulation consiste en la prédiction des interactions principe actif/excipient, en vue de la fabrication d'un produit stable pour la durée de vie du médicament. Par des techniques HPLC, les tests de vieillissement à différentes conditions de température et d'HR demandent des mois d'attente (normes ICH). Ils sont néanmoins obligatoires pour le dépôt de l'AMM. De plus, la quantité d'échantillons à stocker (qui implique la possession d'étuves ou la sous-traitance des études) et le développement des techniques d'analyse HPLC, rendent ces études lourdes et coûteuses. Il est donc intéressant de limiter le nombre d'essais pour réduire les coûts et éviter le gaspillage de PA.

La microcalorimétrie peut être utilisée pour les études d'interactions principe-actif/excipients. En effet, toute dégradation ou interaction est accompagnée d'un flux de chaleur proportionnel à l'importance du phénomène observé.

Cette méthode permet de prédire en une journée de mesure, l'interaction d'un principe actif avec un excipient. Elles présentent de plus l'avantage de réaliser des essais à la température de mise en œuvre des produits.

Ensuite, l'étude de la stabilité chimique ou physique du principe actif vis à vis de l'humidité et de la chaleur reste une étape indispensable pour le galéniste. Elle permet d'assurer par exemple, des conditions optimales de stockage des produits. La microcalorimétrie a démontré son efficacité pour ces essais.

Enfin, la microcalorimétrie isotherme peut apporter des réponses à des problèmes rencontrés au cours de la fabrication.

Nous étudierons donc dans un premier temps la compatibilité d'un antiprogestatif avec ses excipients. Puis nous verrons l'influence de l'humidité sur un kétolide. Enfin, Nous chercherons à comprendre l'influence du processus de fabrication d'un macrolide sur sa forme cristalline.

**TRAVAIL EXPERIMENTAL  
PERSONNEL  
(1/3)**

## **Etude de compatibilité entre un antiprogestatif et ses excipients**

### **1. Introduction**

#### *1.1 Contexte*

La molécule A est un antiprogestatif développé au laboratoire.

#### *1.2 Objectif*

L'objectif de cette étude calorimétrique est :

- évaluer qualitativement la compatibilité entre le principe actif, un antiprogestatif de synthèse et les excipients classiques de formulation, dans des conditions de température et d'humidité relative prédéfinies.
  
- permettre un choix entre ces excipients.

L'interaction entre un principe actif et un excipient se traduit sur le thermogramme par un flux de chaleur proportionnel à l'amplitude du phénomène.

Deux études sont menées successivement:

- une première, dans les conditions les plus stressantes pour le principe actif :  
Température, eau, forte proportion d'excipient.

Le principe actif mélangé avec l'excipient et l'eau, est équilibré à 40°C. Ces conditions d'analyse permettent de montrer une d'interaction potentielle entre les produits.

- une seconde étude est menée dans des conditions moins stressantes, si et seulement si les premiers essais montrent une réaction avec l'eau. Le principe actif et l'excipient préalablement stabilisés à 75% HR à 40°C sont mélangés.



Les études de préformulation habituelles de cette molécule étant terminées au démarrage de l'essai, les données obtenues en microcalorimétrie pourront être comparées à celles obtenues en HPLC.

## 2. Matériel et méthode

### 2.1 Matières premières

Les matières premières utilisées pour cette étude sont listées dans le tableau suivant.

Dénomination	Lot	N° Contrôle	Fournisseur
Molécule A	-	-	Roussel-Uclaf
Lactose (Pharmatose D200)	-	6G1141	Lavallée-Chimie
Amidon de maïs	-	5G2082	Gazechim
Avicel pH101	-	5G1688	Seppic
Talc	-	5G1815	Gazechim
Stéarate de Magnésium	-	5G1682	Marcel-Quarre

Tableau 1 : liste des produits utilisés pour les tests de compatibilité

### 2.2 Matériel

Les appareils utilisés sont listés dans le tableau ci-dessous :

Matériel	Fonction	N° ROUSSEL-UCLAF
Microcalorimètre	Mesure de flux de chaleur	31564
Logiciel Digitam 4.1	Traitement et acquisition données	-
Cellule 23	ampoule pour poudre	-
Cellule 24	ampoule pour poudre	-

Apport de la microcalorimétrie en préformulation galénique. Analyse de trois principes actifs à l'état solide.

Matériel	Fonction	N° ROUSSEL-UCLAF
Cellule 31	ampoule pour poudre	-
Cellule 32	ampoule pour poudre	-
Etuve	Préparation de l'échantillon	63665
Balance Mettler AE163	pesée	60144

Tableau 2 : liste du matériel pour les essais de compatibilité

## 2.3 Méthode

### 2.3.1 Principe

La chaleur absorbée ou générée par l'échantillon étudié est échangée à travers des thermocouples, avec l'environnement calorimétrique, thermostaté à la température étudiée. Un flux de chaleur est mesuré et enregistré au cours du temps.

### 2.3.2 Conditions opératoires

#### 2.3.2.1 Calibration et bruit de fond

Une calibration électrique statique sur le canal de mesure est réalisée selon les spécifications du fabricant.

Le bruit de fond est enregistré sur chaque canal de mesure, il est de l'ordre de  $0,1 \mu W$ .

#### 2.3.2.2 Essai préliminaire

##### 2.3.2.2.1 Préparation des binaires

Constituants	quantité (mg)
Molécule A	100
excipient	100
eau	100

Chaque mélange est effectué directement dans l'ampoule de mesure préalablement conservée à la température d'étude.

La cellule fermée est transférée le plus rapidement possible dans le calorimètre. Le transport des cellules se fait dans un récipient calorifugé construit à cet effet.

Chaque constituant du mélange est analysé séparément dans les mêmes conditions.

#### 2.3.2.2.2 *Mesure du flux de chaleur*

L'analyse est effectuée à 40°C.

L'échantillon (exactement pesé) est introduit dans l'ampoule de mesure côté A contre une référence (ampoule vide) laissée côté B durant toutes les analyses.

#### 2.3.2.2.3 *Interprétation*

Pour chaque série d'analyse sont obtenus :

le thermogramme du mélange réel,

un thermogramme correspondant à l'excipient seul et au principe actif seul,

un thermogramme théorique du mélange sans interactions.

Ce dernier est la somme du flux de chaleur de chacun des composants entrant dans le mélange tenant compte de leur ratio.

Le flux de chaleur du mélange réel est mesuré ( $P_{mix}$ ).

Le flux de chaleur théorique ( $P_{théo}$ ) est comparé à celui du mélange réel ( $P_{mix}$ ).

La différence  $P_{diff} = P_{mix} - P_{théo}$  donne le niveau d'interaction entre les substances.

La compatibilité est analysée dès stabilisation du signal du mélange sur 10 heures.

Un écart entre le flux de chaleur réel et théorique supérieur à 5  $\mu$ W (environ cinq fois le bruit de fond) caractérise une réaction potentielle entre l'excipient et le principe actif

A l'opposé, une différence inférieure à ce seuil, ou nulle, de ce flux de chaleur traduit une bonne compatibilité entre le principe actif et l'excipient.

Chaque mélange ayant réagi avec l'eau est alors étudié dans des conditions moins stressantes pour affiner l'analyse.

Si le mélange n'a pas réagi, on peut conclure à une stabilité satisfaisante.

### *2.3.2.3 Etude des binaires*

#### *2.3.2.3.1 Préparation des mélanges binaires*

Les mélanges binaires, à 50/50, des poudres stabilisées préalablement à 75% HR à 40°C, sont effectués directement dans l'ampoule de mesure à l'aide d'une baguette de verre.

L'ampoule de mesure est préalablement équilibrée à 40°C, 75 % HR.

#### *2.3.2.3.2 Mesure du flux de chaleur*

L'analyse est effectuée à 40°C.

L'échantillon (exactement pesé) est introduit dans l'ampoule de mesure côté A contre une référence (ampoule vide) laissée côté B durant toutes les analyses.

La lecture de l'activité thermique de l'échantillon est faite après stabilisation du signal, pendant 10 heures.

La mesure est répétée deux fois.

### 2.3.2.3.3 Interprétation

Le modèle d'interprétation est identique à celui utilisé lors de l'étude préliminaire.

## 3. Résultats

### 3.1 Essai préliminaire

La mesure du flux de chaleur à T= 1,5 et 10 heures permet d'apprécier la différence du flux de chaleur au cours du temps.

	Temps (heures)	P/ unité de masse ( $\mu$ W/g) Interaction
Molécule A/Amidon de mais (50/50)	1	1
	5	0.3
	10	0.15
Molécule A/Avicel pH 101 (50/50)	1	4.5
	5	0.5
	10	0.5
Molécule A/ Lactose (Pharmatose D200) (50/50)	1	0.6
	5	0.25
	10	0.15
Molécule A/talc (50/50)	1	-0.8
	5	0.05
	10	0.15
Molécule A/ stéarate de magnésium (50/50)	1	125.0
	5	2
	10	0

Tableau 3 : flux de chaleur en fonction du temps de binares en présence d'eau

**Conclusion :**

)

**Molécule A/amidon/eau :** Il existe une interaction de l'ordre de  $1,1 \mu\text{W}$  au départ qui diminue à  $0,15 \mu\text{W}$  à 10 heures (ordre du bruit de fond). Cette interaction, qui est supérieure à  $0,5 \mu\text{W}$ , montre une possibilité d'interaction du principe actif au contact de l'amidon de maïs en présence d'eau.

**Molécule A/avicel PH 101/eau :** Une interaction de l'ordre de  $4,5 \mu\text{W}$  au départ qui diminue à  $0,5 \mu\text{W}$  à 10 heures est détectée. Cette interaction, qui est supérieure à  $0,5 \mu\text{W}$  montre une possibilité d'interaction du principe actif lorsqu'il est au contact de l'avicel PH 101 en présence d'eau.

**Molécule A/lactose/eau :** Il existe une très légère interaction de l'ordre de  $0,6 \mu\text{W}$  au départ qui diminue à  $0,15 \mu\text{W}$  à 10 heures (ordre du bruit de fond). Cette interaction étant de l'ordre de la limite de  $0,5 \mu\text{W}$  mais diminue rapidement. On suppose donc que la probabilité d'interaction entre le principe actif et le lactose est très faible. (Résultat difficile à interpréter car à la limite du seuil défini.)

**Molécule A/stéarate de magnésium/eau :** Il existe une interaction très importante de l'ordre de  $125 \mu\text{W}$  au départ qui diminue à  $0,15 \mu\text{W}$  à 10 heures (ordre du bruit de fond). Cette interaction montre avec évidence que le principe actif est instable avec le stéarate de magnésium en présence d'eau.

**Molécule A/Talc/eau :** on enregistre un endotherme de l'ordre de  $-0,8 \mu\text{W}$  au départ. Le signal retourne à la ligne de base au bout de 2 heures.

### 3.2 Mélanges binaires sous 75%HR, 40°C

	Temps (heures)	P/ unité de masse ( $\mu\text{W/g}$ )
Molécule A/amidon de mais (50/50)	1	-8
	5	-1
	10	-1
Molécule A/avicel pH 101 (50/50)	1	0.5
	5	0
	10	0
Molécule A/lactose (Pharmatose D200) (50/50)	1	-0.1
	5	-0.1
	10	-0.1
Molécule A/talc (50/50)	1	0.1
	5	0
	10	-0.1
Molécule A/stéarate de magnésium (50/50)	1	1.0
	5	0.3
	10	0.3

Tableau 4 : flux de chaleur pour les mélanges molécule A/excipients équilibrés à 75%HR, 40°C

**Molécule A/amidon:** Une interaction est détectée (réaction endothermique. Phénomène non expliqué.)

**Molécule A/avicel PH 101 :** Il existe une interaction de l'ordre de 0,5  $\mu\text{W}$  au départ qui diminue à 0 à 10 heures. Cette interaction qui est égale à 0,5  $\mu\text{W}$  montre une possibilité très légère d'interaction du principe actif lorsqu'il est au contact de l'avicel PH 101.

**Molécule A/lactose :** On n'enregistre qu'un signal de l'ordre de  $-0,1 \mu\text{W}$  (ordre du bruit de fond). Le principe actif en présence de lactose est stable.

**Molécule A/stéarate de magnésium/eau :** Il existe une interaction de l'ordre de  $1 \mu\text{W}$  au départ qui diminue à  $0,3 \mu\text{W}$  à 10 heures. Cette interaction montre que le principe actif est instable avec le stéarate de magnésium.

**Molécule A/talc:** Une interaction de l'ordre de  $0,1 \mu\text{W}$  (ordre du bruit de fond) est détectée. Le principe-actif en présence de talc est stable

#### 4. Conclusion

Le tableau ci-dessous montre que les résultats obtenus en microcalorimétrie vont dans le même sens que ceux obtenus en analyse HPLC.

<b>BINAIRE</b>	<b>40°C, 75 % HR HPLC (3 mois)</b>	<b>50°C HPLC 3 mois</b>	<b>40°C, 75 % HR microcalorimétrie</b>
<b>Molécule A/lactose</b>	non détecté	non détecté	non
<b>Molécule A/amidon de maïs</b>	traces	traces	oui. Signal endothermique
<b>Molécule A/avicel PH 101</b>	traces	traces	léger ( $0,5 \mu\text{W}$ )
<b>Molécule A/talc</b>	non détecté	non détecté	non
<b>Molécule A/stéarate de magnésium</b>	traces	2 %	oui ( $1,0 \mu\text{W}$ )

Tableau 5 : interaction entre la molécule A et une série d'excipients détectées par HPLC

Le signal obtenu n'est pas toujours aisé à interpréter, comme celui du binaire PA/lactose qui est à la limite du seuil défini.

Le signal obtenu ne nous donne qu'une information sur la possibilité ou non de réaction entre les deux produits mis en présence.



A l'inverse de l'HPLC, il n'est pas possible d'identifier les produits de dégradation par microcalorimétrie.

Le signal enregistré ne nous informe pas sur la nature du phénomène qui se déroule dans la cellule. Aussi ne peut-on émettre que des hypothèses en ce qui concerne l'interprétation des résultats. Les endothermes pourraient être dus à des sorptions d'eau (l'amidon ou le talc = silicate de magnésium étant hygroscopiques).

Le risque d'erreur dans l'interprétation n'est pas nul.

**TRAVAIL EXPERIMENTAL  
PERSONNEL**

**(2/3)**

## **Analyse thermique isotherme en gradient d'humidité relative d'un kétolide**

)

### **1. Introduction**

#### *1.1 Contexte*

La Molécule B est un antibiotique kétolide.

#### *1.2 Objectifs*

L'objectif de ce travail est d'étudier les transformations éventuelles du principe actif pouvant survenir sous certaines conditions de température et d'hygrométrie (et donc de prévoir éventuellement des précautions pour le stockage ultérieur de la matière première.)

La calorimétrie isotherme permet d'observer ces phénomènes de modification de structure en surface ou au cœur de la poudre. La présence d'une petite quantité d'amorphe (peu stable) pourra être à l'origine de transformations accompagnée d'un échange de chaleur avec l'environnement. Etudiée par microcalorimétrie, une recristallisation se traduit sur le thermogramme obtenu, par un exotherme. Elle est suivie d'une expulsion d'eau hors de la structure obtenue (plus stable donc moins soluble), qui se traduit par un endotherme.

Une analyse thermique isotherme en humidité relative contrôlée est réalisée ;  
en gradient d'humidité d'une part ;  
en incréments d'humidité d'autre part ;  
à l'arrivée du principe actif dans le laboratoire, puis après une période de stockage.

## 2. Matériel et méthodes

)

### 2.1 Matériel

Les appareils utilisés sont listés dans le tableau ci-dessous :

Matériel	Fonction
Microcalorimètre	Mesure de flux de chaleur
Logiciel DIGITAM 4.1	Traitement des données
Cellule de titration-perfusion	Cellule pour HR contrôlée
pompe péristaltique	Maîtrise du flux d'air

Tableau 1 : liste du matériel pour l'étude du comportement d'un kétolide sous humidité relative contrôlée

### 2.2 Méthodes

Des analyses thermiques isothermes à 25°C, en gradient ou incréments d'humidité relative, sont réalisées sur un T.A.M 2277 Thermometric contre une ampoule vide.

Avant les mesures, une calibration électrique est réalisée.

Une première série d'analyses a été réalisée à la réception du lot (décembre 1996), une seconde a été menée 5 mois plus tard (mai 1997).

#### 2.2.1.1 Analyse thermique isotherme en gradient d'humidité relative

La prise d'essai de 20 mg environ, exactement pesée, est mise à l'équilibre sous un flux d'air pulsé par une pompe péristaltique, puis balayée par un gradient d'humidité relative de 0 à 100% HR. L'échantillon est séché, avant l'application d'un deuxième gradient d'humidité relative.

---

Apport de la microcalorimétrie en préformulation galénique. Analyse de trois principes actifs à l'état solide.

### 2.2.1.2 Analyse thermique isotherme en incréments de 10% d'humidité relative

L'échantillon est préparé et stabilisé dans les conditions décrites ci-dessus.

Lorsque la poudre est équilibrée à 0% HR, des incréments de 10% HR entre 0% et 100% HR sont programmés.

## 3. Résultats

### 3.1.1 Analyse thermique isotherme en gradient d'humidité relative

1ere analyse :

#### Méthode d'analyse

La méthode d'analyse comporte deux étapes :

- I. Equilibration de l'échantillon à 20 % d'Humidité Relative (**HR**) et gradient d'HR jusqu'à 90 %HR ;
- II. Echantillon ramené à 20 %HR, équilibration et gradient d'HR jusqu'à 90 %HR.

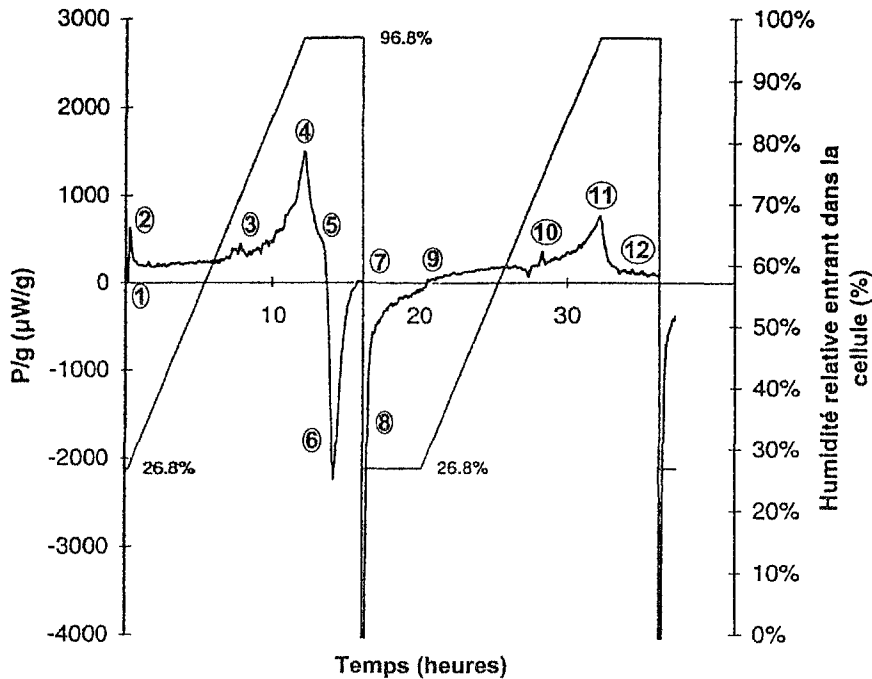


Figure 1 : thermogramme d'un échantillon de kétolide analysé sous un gradient d'humidité relative

### Analyse des événements observés sur le thermogramme :

#### I. Gradient d'humidité relative

1 - départ : poudre en équilibre à 26,8 %HR.

2 - pic dû à une erreur de programmation : initialement la méthode a été programmée pour avoir comme point de départ 20 % HR ; elle a été modifiée par la suite pour 26,8 %HR.

- après 2 heures d'équilibration à 26,8 %HR, début du gradient en %HR.

3 - événement imprévu - pas d'explication.

- entre les événements 2 et 3 : vitesse constante d'adsorption des molécules d'eau apportées par le gradient d'humidité relative.

- entre les événements 3 et 4 : vitesse très grande d'adsorption des molécules d'eau (phénomène exothermique.)

4 - vitesse maximale d'adsorption des molécules d'eau.

- entre les événements 4 et 5 : la vitesse d'adsorption des molécules d'eau sur la surface de la poudre diminue, la poudre est en train de s'équilibrer à 96,8 %HR.

5 - début d'un phénomène de modification de structure amorphe → cristallin : l'amorphe « impluse » avec expulsion de molécules d'eau (phénomène endothermique.)

- entre les événements 5 et 6 : le phénomène de réorganisation cristalline continue avec un vitesse importante.

6 - la surface du cristallin formé est devenue plus humide (vers 100 %HR) que l'air à 96,8% HR.

- entre les événements 6 et 7 : l'air qui entre dans la cellule à 96,8 %HR sèche la poudre qui est à 100% HR.

7 - poudre en équilibre à 96,8% HR.

## II. Gradient d'humidité relative

- entre les événements 7, 8 et 9 : la poudre est séchée de 96,8 %HR à 26,8 %HR - désorption des molécules d'eau (phénomène endothermique).

9 - début du deuxième gradient d'humidité relative: de 26,8 %HR à 96,8 %HR.

10 - événement imprévu - pas d'explication (similaire à l'événement 3).

- entre les événements 10 et 11 : poursuite du gradient d'humidité relative jusqu'à 96,8 %HR et vitesse élevée d'adsorption des molécules d'eau (phénomène exothermique).

- entre les événements 11 et 12 : poudre qui tend vers l'équilibre à 96,8% HR, la vitesse d'adsorption des molécules d'eau diminue ; en 12 la poudre est déjà équilibrée à 96,8 %HR sans avoir observé un phénomène endothermique similaire à celui constaté entre les événements 5, 6 et 7, fait qui confirme une transformation du type amorphe → cristallin irréversible au cours de la première rampe en HR.

- Des méthodes d'analyse pour confirmer le changement de forme amorphe → cristallin sont à prévoir :
  - D.S.C. : analyser des échantillons de poudre avant et après une analyse en calorimétrie.
  - Rayons X : même démarche.

2e analyse :

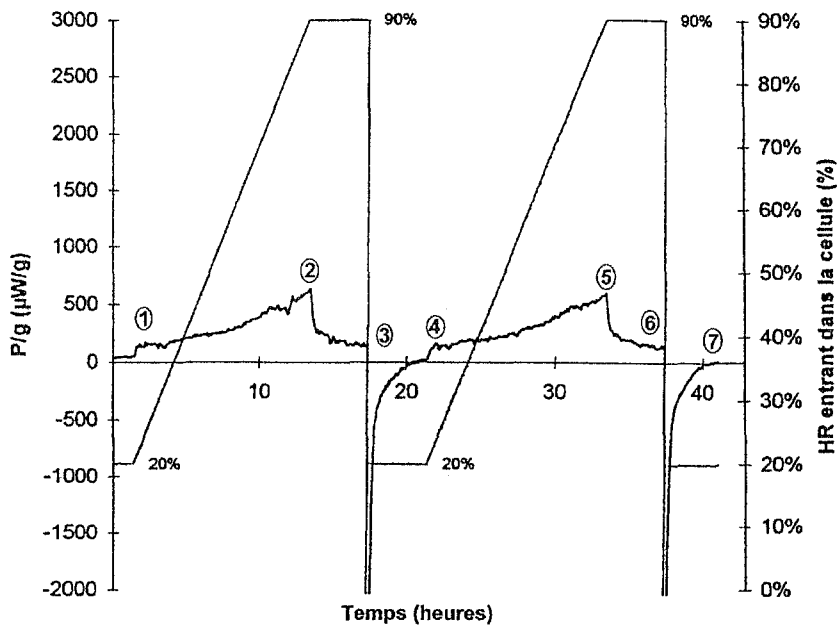


Figure 2 : thermogramme d'un échantillon de kétolide analysé sous un gradient d'humidité relative

Première partie:

- équilibre de la poudre à 20 %HR,
- premier gradient d' HR de 20 % à 90 %HR en 720 minutes,



Deuxième partie:

- retour à 20 %HR,

- deuxième gradient d'HR de 20 à 90 %HR en 720 minutes.

### **Première partie du thermogramme:**

Premier gradient d'humidité relative

En 1: départ du gradient d'humidité relative après équilibre de la poudre à 20 %HR.

La poudre adsorbe de l'eau, ce qui se traduit par un exotherme.

En 2, la vitesse d'adsorption est maximale.

Puis la poudre s'équilibre à 90 %HR, rapidement dans un premier temps, puis plus lentement jusqu'en 3.

Cependant, on n'observe pas d'endotherme soudain comme lors de l'analyse précédente, au cours de l'équilibre à 96.8 %HR. Celui-ci correspondait à la désorption d'eau captée dans un premier temps, à la suite d'une transition amorphe → cristallin.

De plus, lors de la première analyse, un accident (événement 3) auquel n'avait été attribué aucun phénomène, n'est pas retrouvé dans cette analyse.

En 3: de l'air à 20 %HR entre dans la cellule qui sèche la poudre (équilibrée à 90 %HR).

Ce phénomène est endothermique.

### **Deuxième partie du thermogramme:**

Deuxième gradient d'HR.

En 4, la poudre est revenue à 20 %HR.

Le même profil que lors de l'analyse est retrouvé sans l'événement accidentel 10, auquel n'avait été attribué aucun phénomène.

Entre 4 et 5, la poudre adsorbe de l'eau.

En 5, la vitesse d'adsorption est maximale.

Entre 5 et 6, la poudre s'équilibre à 90 %HR.

Entre 6 et 7, la poudre est séchée et se rééquilibre à 20 %HR (phénomène endothermique).

Lors du stockage en étuve pour mise à l'équilibre à 20 %HR, un passage amorphe → cristallin a pu se produire, ce qui pourrait expliquer l'absence du premier endotherme de désorption d'eau suivant le premier gradient d'humidité relative.

### **3.1.2 Analyse thermique isotherme en incréments d'humidité relative**

Cet essai permet de localiser une humidité relative critique si elle existe.

1ere analyse :

#### **Méthode d'analyse**

La méthode d'analyse comporte 2 étapes :

**I.** Equilibration de l'échantillon à 20 % d'Humidité Relative (**HR**) puis incréments de 10 %HR jusqu'à 60 %HR. Chaque incrément est suivi d'une période d'équilibration avant l'incrément suivant.

**II.** L'échantillon est ramené à 20 %HR, équilibré et subit un gradient de 20 %HR jusqu'à 90 %HR en 1 heure.

---

Apport de la microcalorimétrie en préformulation galénique. Analyse de trois principes actifs à l'état solide.

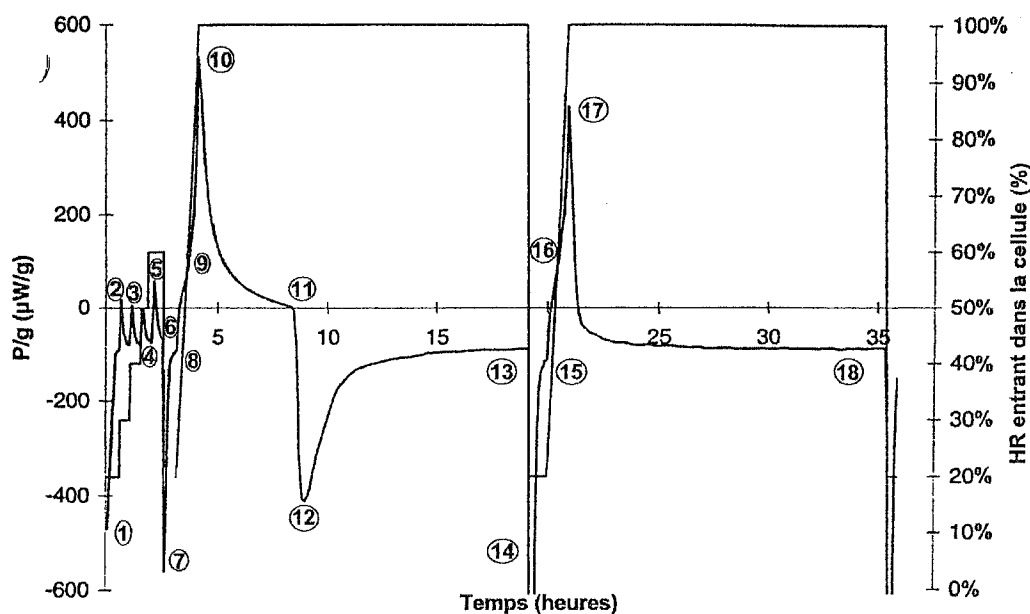


Figure 3 : thermogramme d'un échantillon de kétolide analysé sous incréments puis gradient d'humidité relative

### Analyse des événements observés sur le thermogramme :

#### **I. Incréments d'humidité relative**

1 - départ : poudre en équilibre à 20 %HR.

2 - incréments de 10 %HR (de 20 %HR à 30 %HR). Adsorption des molécules d'eau avec une vitesse importante (phénomène exothermique) suivie de l'équilibration de la poudre à 30 %HR.

- Les événements 3, 4, 5 sont des incréments de 10% HR similaires à l'événement 2.

Rq : Pour les événements 2, 3, 4, l'équilibration de la poudre apportée se fait sans incident. La courbe revient au niveau de départ.

Par contre, lors du dernier incrément (de 50% HR à 60% HR) la courbe ne retourne pas tout à fait à la ligne de base de départ. Un phénomène exothermique est observé qui peut correspondre à une dégradation du principe actif.

## II. Gradient d'humidité relative

- entre les événements 6, 7, 8 : la poudre est séchée de 60% HR à 20% HR - désorption des molécules d'eau (phénomène endothermique).

8 - départ du gradient d' HR : de 20% HR à 100% HR. La vitesse est élevée au départ (corrélée avec la vitesse du gradient d'HR = prise de 80% HR en 60 minutes)

9 - observation d'un épaulement, puis à nouveau la vitesse augmente.

Rq : cet accident sur la courbe, non expliqué mais répété en 16, semble correspondre aux événements 3 et 10 de l'essai 1 (fig 22).

10 - la vitesse d'adsorption des molécules d'eau est maximale.

Entre les événements 10 et 11 : la poudre s'équilibre à 100% HR rapidement dans un premier temps, puis plus lentement.

11 - brusque endotherme. L'amorphe se transforme en cristallin avec expulsion d'eau précédemment adsorbée (phénomène endothermique.)

Entre 12 et 13, le cristallin s'équilibre à 100% HR. On retrouve la ligne de base avant le gradient d'HR.

L'analyse montre par le pic de désorption, suivant le gradient d'humidité relative, une transformation du principe actif. Cette transformation se situe à une humidité relative supérieure à 60% HR.

2e analyse :

Le thermogramme présente une série d'exothermes qui correspondent à une adsorption d'eau pour des incréments d'humidité relative entre 20 et 90% HR. La poudre ne se transforme pas.

#### 4. Conclusion

En cinq mois de stockage à température ambiante ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) et à 50% HR environ (conditions de température et d'hygrométrie de la pièce de stockage) le produit semble s'être transformé en surface. La présence d'une partie non cristallisée dans la matière première après sa synthèse laisse sous-entendre des problèmes ultérieurs lors de la fabrication. En effet, une amorphisation, tout ou partiellement en surface du produit pendant le mode de fabrication de la forme galénique, sera à l'origine de problèmes de dissolution. Il faudra veiller tout particulièrement aux étapes suivantes : granulation humide et calibrage.

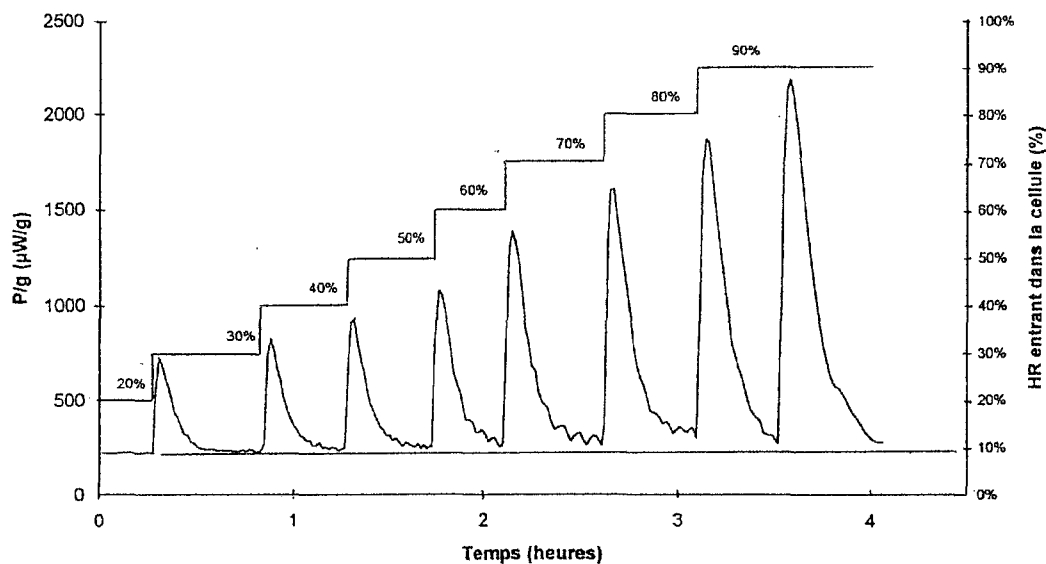


Figure 4 : thermogramme d'un échantillon de kétolide analysé sous incréments d'humidité relative

Pour affiner l'étude :

Analyser en DSC un échantillon avant et après la calorimétrie.

---

Apport de la microcalorimétrie en préformulation galénique. Analyse de trois principes actifs à l'état solide.

Analyser en gradient et en incrément d'humidité relative, un échantillon amorphe de la molécule B.

Prévoir une quantification de l'amorphe en surface selon la méthodologie décrite dans la partie bibliographique 2.2.3.1. *Technique de mesure de l'amorphicité de surface.*

**TRAVAIL EXPERIMENTAL  
PERSONNEL  
(3/3)**

# **Influence des processus de fabrication sur la forme cristalline de la Roxithromycine**

## **1. Introduction**

### *1.1 Contexte*

La roxythromycine RULID® est un antibiotique macrolide. Le produit est commercialisé depuis 1987. Plusieurs lots de comprimés se sont révélés non conformes à la seule spécification de la dissolution.

L'érythromycine, de structure proche de la roxythromycine, et certains de ses hydrates, ont présenté un comportement similaire [2] [28] qui laisse à penser que les propriétés physico-chimiques du produit (point de fusion) ajoutées à un schéma de fabrication de comprimés peuvent expliquer ce comportement.

### *1.2 Objectifs*

L'objectif de ce travail est :

- Mettre en évidence qualitativement et quantitativement l'influence de la nature physique du produit sur la cinétique de dissolution.
- Montrer que les transformations et retransformations peuvent avoir lieu au cours du schéma de fabrication (granulation – séchage - compression) et/ou au cours des contrôles de cinétiques de dissolution.
- Tenter d'apporter une explication et proposer des solutions acceptables.



Pour répondre à ces trois objectifs :

- dans un premier temps,

le principe actif seul (hydrates I), les formes amorphe, hydrates II, III et IV sont caractérisés par :

- une étude de vitesse de dissolution intrinsèque,
- une analyse thermique isotherme et en gradient de température

(Détermination de Tg, Pf, enthalpie de fusion et de recristallisation.)

Des transformations d'une forme à l'autre peuvent être mises en évidence à ce niveau.

- dans un deuxième temps,

l'influence des étapes de la fabrication des comprimés est étudiée à l'aide des mêmes critères (vitesse de dissolution intrinsèque, analyse thermique).

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1 Produit

Nom	N° de lot	Fournisseur
roxythromycine monohydrate forme I	796 HS	Roussel Uclaf
roxythromycine monohydrates II, III, IV	-	Roussel Uclaf
roxythromycine amorphe.	-	Roussel Uclaf

#### 2.1.1 Etats cristallins

Une étude de polymorphisme (en cours au DCA) a montré que :

- la roxythromycine peut exister sous 4 formes cristallines, une forme métastable ainsi qu'une forme amorphe. Les hydrates sont cristallisés avec une molécule d'eau;
- le produit présente une transition vitreuse vers 85°C.

Les hydrates présentent un point de fusion entre 105 et 130°C.

---

Apport de la microcalorimétrie en préformulation galénique. Analyse de trois principes actifs à l'état solide.

## 2.2 Méthodes

### 2.2.1 Mise en évidence d'une transformation au cours de la fabrication

Les phénomènes thermiques accompagnant la compression ont fait l'objet de nombreuses publications.

Nelson & al. [31] ont montré une augmentation de 5°C lors de la formation de comprimés de sulphathiazole.

Wurster & Creekmore [42] ont développé un système pour mesurer la température au sein du lit de poudre étudié. Ils ont ainsi mesuré des élévations de température de l'ordre de 5°C pour des pressions de 27.28 MPa appliquées sur du sulfathiazole.

Travers & Merriman [39] ont mesuré des échauffements d'environ 15°C lors de la compression d'Asagran (acide acétyl-salicylique) à 250 MPa.

Díaz & al. [22] ont enregistré un échauffement d'un mélange à base de salicylate de sodium, comprimée sur presse alternative, pouvant aller jusqu'à 10°C.

Hanus et King [26] ont montré en utilisant des sels thermochromiques que lors d'une compression, la température au sein du lit de poudre peut atteindre jusqu'à 55°C.

Cependant, les mesures réalisées peuvent être sous évaluées pour différentes raisons :

- difficulté pour mesurer la température en tout point du lit de poudre,
- problème de l'inertie thermique des matrices,
- vitesse de diffusion calorifique,
- échauffement des gaz dans la matrice...

L'élévation de la température lors de la compression peut donc, compte tenu de son point de fusion relativement bas, entraîner localement une fusion, suivie d'une recristallisation de la roxythromycine.

Par ailleurs, Briggner & al. [18] décrivent des changements du comportement des poudres, suite à certains processus de fabrication (comme le broyage) dus principalement à la formation d'amorphe en surface.

Donc, le mode opératoire par son étape de granulation (apport d'eau), de séchage (apport d'énergie) et de compression (abaissement du point de fusion du principe actif) peut être à l'origine de transformations et/ou retransformations locales au niveau de la poudre, à l'origine du problème.

Une simulation des grandes étapes de la fabrication du RULID® est conduite pour mettre en évidence de telles transformations.

- granulation

Des granulats sont préparés dans un mortier.

Le mouillage de la poudre est réalisé avec de l'eau.

- séchage

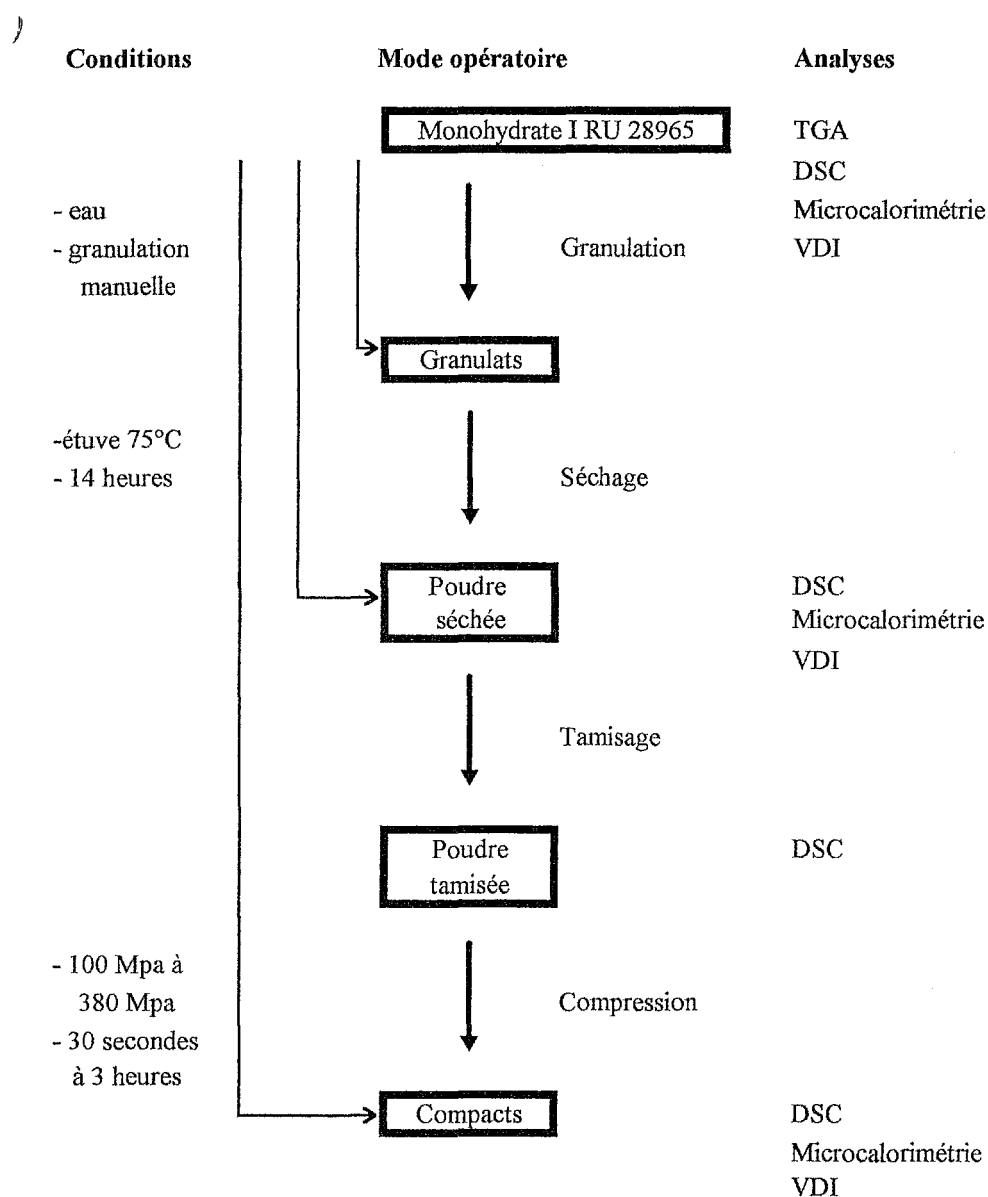
Le séchage est simulé en étuve : 14 heures à 75°C sur les granulats obtenus et sur un échantillon non granulé.

- compression

Des compacts sont fabriqués avec la poudre granulée et séchée, et avec la poudre uniquement séchée.

Les granulats et comprimés sont caractérisés par leur Vitesse de Dissolution Intrinsèque, une analyse microcalorimétrique et en DSC.

Figure 1 : schéma d'étude de la roxythromycine



### 2.2.2 Caractérisation des hydrates et de l'amorphe seuls

a - Les hydrates II, III et IV sont obtenus par recristallisation de la roxythromycine dans différents solvants (éthanol, méthanol).

Les compact pour études de dissolution intrinsèque sont obtenus à 380 MPa, pendant 30 secondes.

b - les verres sont obtenus par fusion rapide du produit (vers 130°C) dans une cupule d'analyse pour étude de la Vitesse de Dissolution Intrinsèque, suivie d'un refroidissement brutal par trempage dans l'azote liquide.

Leur conservation se fait sous atmosphère à 0% HR ( $P_2O_5$ .)

c- La forme cristalline I (forme commerciale) est étudiée dans différentes conditions :

1. - Non traitée.
2. - Après séchage sous  $P_2O_5$ , en étuve à 75°C.
3. - Après traitement thermique à 75°C pendant 14 heures (simulation de séchage en étuve).
4. - Après compactage de la poudre avant et après séchage en étuve (simulation de compression après le séchage.)
5. - Après compactage de la poudre après granulation et séchage (simulation du mode de fabrication)

Compacts A : 380 MPa pendant 30 secondes.

Compacts B : 380 MPa pendant 30 minutes.

Compacts C : 380 MPa pendant 1 heure.

Compacts D : 380 MPa pendant 2 heures.

Compacts E : 380 MPa pendant 3 heures.

Compacts F : 100 MPa pendant 30 secondes.

Compacts G : 200 MPa pendant 30 secondes.

Compacts H : 300 MPa pendant 30 secondes.

La surface de la pastille obtenue pour les vitesses de dissolution intrinsèque est de 3.14 cm<sup>2</sup> (diamètre du poinçon = 2 cm.)

### 2.2.3 Vitesse de Dissolution Intrinsèque (VDI)

Les échantillons sont installés au bout de la tige rotative à 100 tours/minute d'un Logan DTB 678A, et plongés dans 1 litre d'eau MilliQ (eau déminéralisée par osmose inverse) thermostatée à  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ .

Après vérification du domaine d'application de la loi de Beer-Lambert, et de la linéarité d'une gamme d'étalonnage, le dosage est réalisé en continu par spectrophotométrie UV à 205 nm sur un UVIKON 922.

Deux types d'échantillons sont analysés : les compacts et la roxithromycine amorphe.

Une éventuelle dégradation du principe actif au cours de la dissolution dans l'eau est recherchée sur les solutions à  $t = 1$  heure et à  $t = 5$  heures après séparation HPLC et dosage UV à 205 nm.

### 2.2.4 Analyse thermogravimétrique (TGA)

20 mg environ de produit, pesés exactement, sont stabilisés à  $25^\circ\text{C}$  pendant 10 minutes, puis analysés sur un appareil Du Pont de Nemours, sous flux d'azote sec à 100 ml/min, avec un gradient de température de  $5^\circ\text{C}/\text{minute}$ , entre  $25^\circ\text{C}$  et  $160^\circ\text{C}$ .

La perte de masse de l'échantillon est exprimée en mg et en % (p/p.)

### 2.2.5 Differential scanning calorimetry (DSC)

La prise d'essai de 5 mg environ, exactement pesée dans une capsule d'aluminium, est analysée sur une DSC modulée Du Pont de Nemours 2920 contre une capsule vide en référence.

Le gradient de température est de  $5^\circ\text{C}/\text{minute}$  et de  $1^\circ\text{C}/\text{minute}$  entre  $25^\circ$  et  $160^\circ\text{C}$ .

La calibration de l'appareil est réalisée avec de l'indium.

## 2.2.6 Microcalorimétrie

)

Des analyses thermiques isothermes à 40°C, en gradient ou incréments d'humidité relative, et à humidité relative fixée à 100% HR, sont réalisées sur un T.A.M 2277 Thermometric contre une ampoule vide en référence.

Avant les mesures, une calibration électrique est réalisée.

### 2.2.6.1 *Analyse thermique isotherme en gradient d'humidité relative*

20 mg environ, exactement pesés, sont mis à l'équilibre sous un flux d'azote de 150 ml/h à 0% HR, puis balayés par un gradient d'humidité relative de 0 à 100% HR en 60 minutes. L'échantillon est séché, avant la répétition d'un même gradient d'humidité relative.

### 2.2.6.2 *Analyse thermique isotherme en incréments de 10% d'humidité relative*

L'échantillon est préparé et stabilisé dans les conditions décrites ci-dessus.

Lorsque la poudre est équilibrée à 0% HR, des incréments de 10% HR entre 0% et 100% HR sont apportés. Chaque nouvel incrément est précédé d'un séchage de la poudre sous 0% HR.

### 2.2.6.3 *Analyse thermique isotherme à 100% HR*

Préparation des échantillons :

Un échantillon exactement pesé de 100 mg environ, ainsi qu'une cupule d'eau (hygrostat) sont introduits dans une ampoule en verre.

Après équilibre thermique à 40°C, la mesure est conduite sur 72 heures.

### 3. Résultats

#### 3.1 Vitesse de Dissolution Intrinsèque (VDI)

La mesure de la Vitesse de Dissolution Intrinsèque est une méthode analytique très fine, très précise et très reproductible. Pour une forme cristalline stable, les points obtenus, correspondant aux concentrations par unité de temps, de volume et de surface, sont alignés sur une droite dont le  $R^2$  est très proche de 1. A l'opposé, tout changement de forme cristalline à la surface du disque se traduit par une inflexion de la courbe [26] [27]

Cette méthode permet donc de mettre facilement en évidence des modifications de la cristallinité du produit après une série de traitements (granulation, séchage, compression.)

Pour cela, les VDI du produit sous ses différents états cristallins (amorphe, forme I, II, III, IV), et de la forme I traitée dans différentes conditions, sont mesurées.

Les résultats de ces mesures de VDI sont présentés dans le tableau I.

##### 3.1.1 Influence de la forme cristalline sur la VDI

La courbe pour la forme amorphe montre clairement deux portions de droite distinctes (cf. graphe 1.)

La transformation s'effectue après 50 minutes.

Il en est de même pour les quatre formes hydrates non traitées, mais la transformation est plus précoce.

Cependant, la faible linéarité de la première partie de la courbe pour ces derniers rend l'analyse délicate.

Les 4 hydrates, en l'absence de tout traitement, contiendraient donc des régions de cristallinité différente en surface, qui se retransforment en présence d'eau.

##### 3.1.2 Influence de la compression sur la VDI du monohydrate I

La faible tenue des compacts, pour des pressions inférieures à 380 MPa ne permet pas d'obtenir des résultats de VDI interprétables.

Le temps de compression ne semble pas modifier considérablement la VDI de la forme I.

---

Apport de la microcalorimétrie en préformulation galénique. Analyse de trois principes actifs à l'état solide.



Par contre, celle des granulats séchés et compactés se trouve diminuée.

Vitesse de Dissolution Intrinsèque  
 Titre : Comparaison des vdi de différentes formes du HMR 28965 après différents traitements thermiques et/ou compression, à 37°C

Molécule : RU 28965 Solubilité max. dans ce milieu : <0.25 mg/ml Vitesse de rotation : 100 T/min Longueur d'onde : 205 nm  
 Lot : 796HS Méthode analytique : spectrophotomètre UV Température : 37±0.5°C  
 N° de contrôle : 5V1000BJ Milieu de dissolution : Eau MilliQ Volume de dissolution : 1000 ml

		VDI ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )	SD ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )	n	Zone de régression	R <sup>2</sup>	Ss res
Influence de la nature de l'hydrate	Verre(1 <sup>ère</sup> zone de régression)	0.0763	0.0085	6	0 à 45 minutes	0.99556	0.12985
	Verre(2 <sup>ème</sup> zone de régression)	0.0046	0.0008		200 à 480 minutes	0.99436	0.00916
	Monohydrate I 380 MPa 30 s (1 <sup>ère</sup> zone de régression)	0.0287	0.0054	4	0 à 20 minutes	0.80514	0.05862
	Monohydrate I 380 MPa 30 s (2 <sup>ème</sup> zone de régression)	0.0082	0.0008	6	30 à 480 minutes	0.99262	0.22254
	Monohydrate II 380 MPa 30 s (1 <sup>ère</sup> zone de régression)	0.0210	-	2	0.5 à 10 minutes	0.84254	0.00900
	Monohydrate II 380 MPa 30 s (2 <sup>ème</sup> zone de régression)	0.0040	0.0010	3	45 à 480 minutes	0.99444	0.05282
	Monohydrate III 380 MPa 30 s (1 <sup>ère</sup> zone de régression)	0.0447	-	2	1 à 7 minutes	0.92855	0.00536
	Monohydrate III 380 MPa 30 s (2 <sup>ème</sup> zone de régression)	0.0034	-		60 à 480 minutes	0.99479	0.01185
	Monohydrate IV 380 MPa 30 s (1 <sup>ère</sup> zone de régression)	0.0249	0.0028	3	0.5 à 7 minutes	0.80994	0.00521
	Monohydrate IV 380 MPa 30 s (2 <sup>ème</sup> zone de régression)	0.0059	0.0017		200 à 480 minutes	0.99839	0.01301
Influence de la compression	Monohydrate I 380 MPa 30 min (1 <sup>ère</sup> zone de régression)	0.0228	-	2	0 à 45 minutes	0.86712	0.00699
	Monohydrate I 380 MPa 30 min (2 <sup>ème</sup> zone de régression)	0.0081	-		150 à 480 minutes	0.99471	0.23821
	Monohydrate I 380 MPa 60 min (1 <sup>ère</sup> zone de régression)	0.0501	-	2	0 à 10 minutes	0.96681	0.00115
	Monohydrate I 380 MPa 60 min (2 <sup>ème</sup> zone de régression)	0.0101	-		0 à 480 minutes	0.99464	0.47561
	Monohydrate I 380 MPa 120 min (1 <sup>ère</sup> zone de régression)	0.0390	-	2	1 à 6 minutes	0.95906	0.00100
	Monohydrate I 380 MPa 120 min (2 <sup>ème</sup> zone de régression)	0.0088	-		0 à 480 minutes	0.99788	0.07236
	RU28965 380 granulats MPa 30 s (1 <sup>ère</sup> zone de régression)	0.0262	0.0094	6	1 à 10 minutes	0.90443	0.00698
	RU28965 granulats 380 MPa 30 s (2 <sup>ème</sup> zone de régression)	0.0057	0.0014		90 à 480 minutes	0.99314	0.07743

Tableau 1 : VDI des différentes formes de la roxythromycine après différents traitements

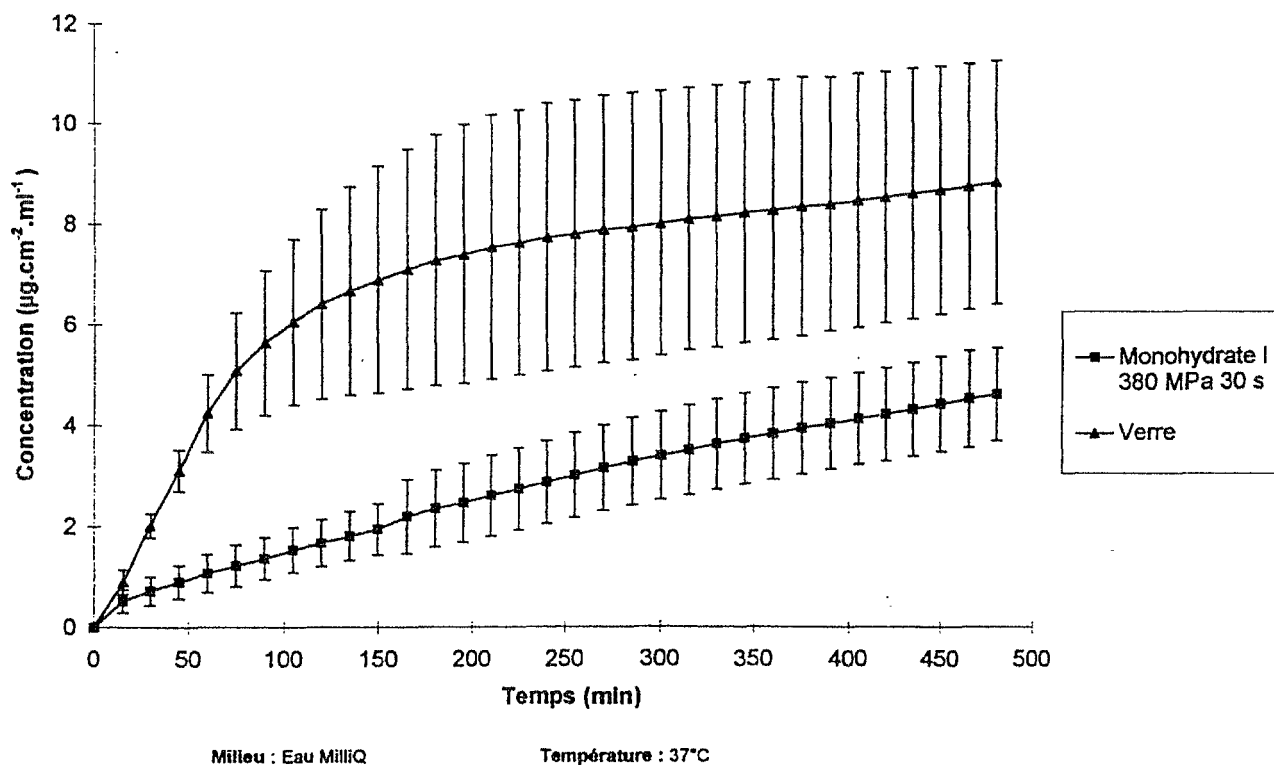


Figure 2 : VDI de deux formes de la roxythromycine (amorphe et monohydrate)

**RU 28965**

**Vitesses de dissolution intrinsèque**  
**Comparaison des hydrates**

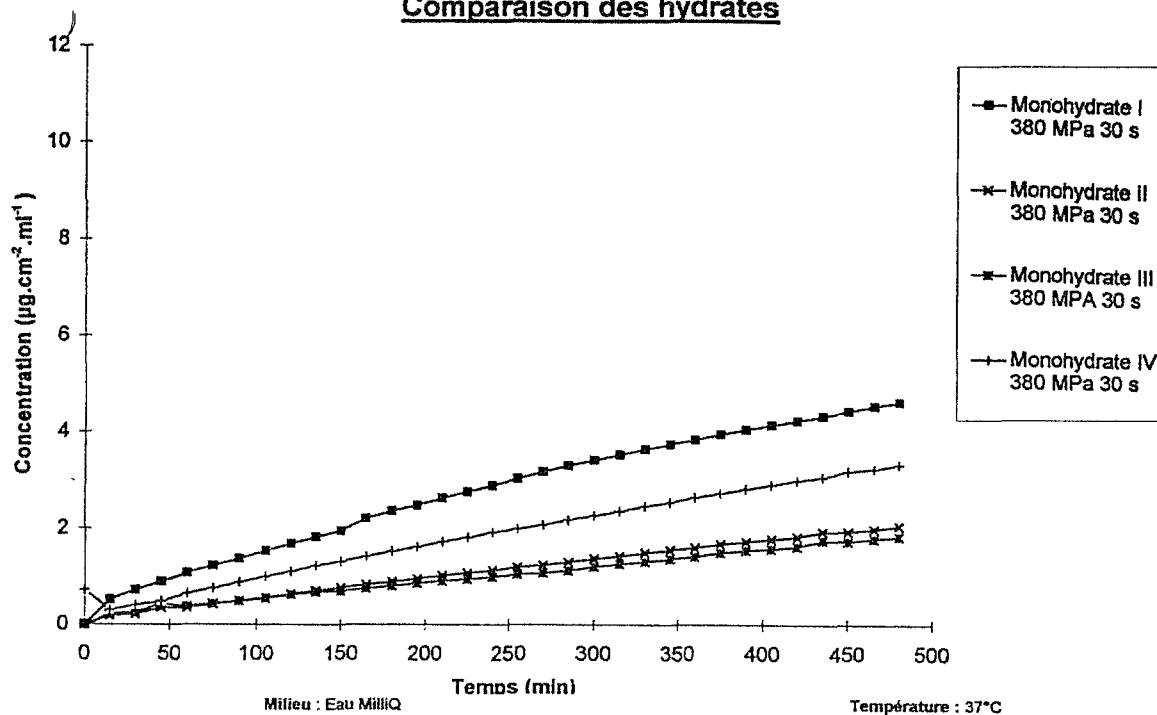


Figure 3 : VDI des différents hydrates de la roxythromycine sur 480 minutes

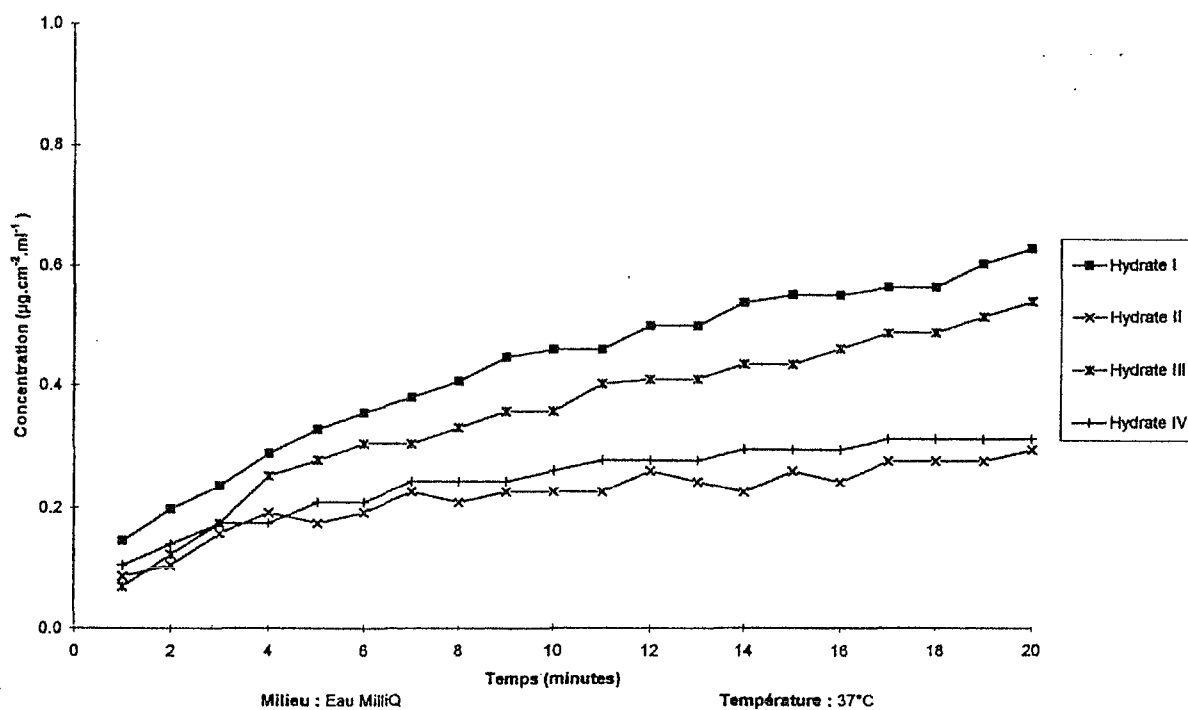


Figure 4 : VDI des différents hydrates de la roxythromycine sur 20 minutes

**RU 28965**

**Vitesses de dissolution intrinsèque  
Comparaison de la compression**

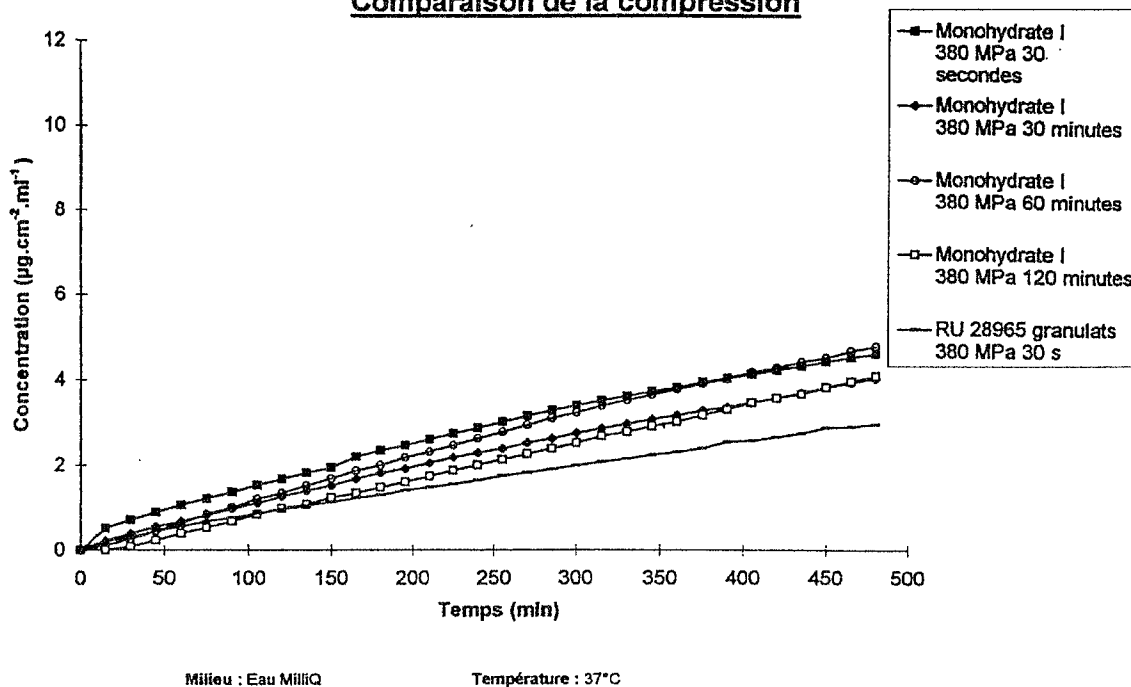


Figure 5 : influence de la compression sur la VDI de la roxythromycine, sur 480 minutes

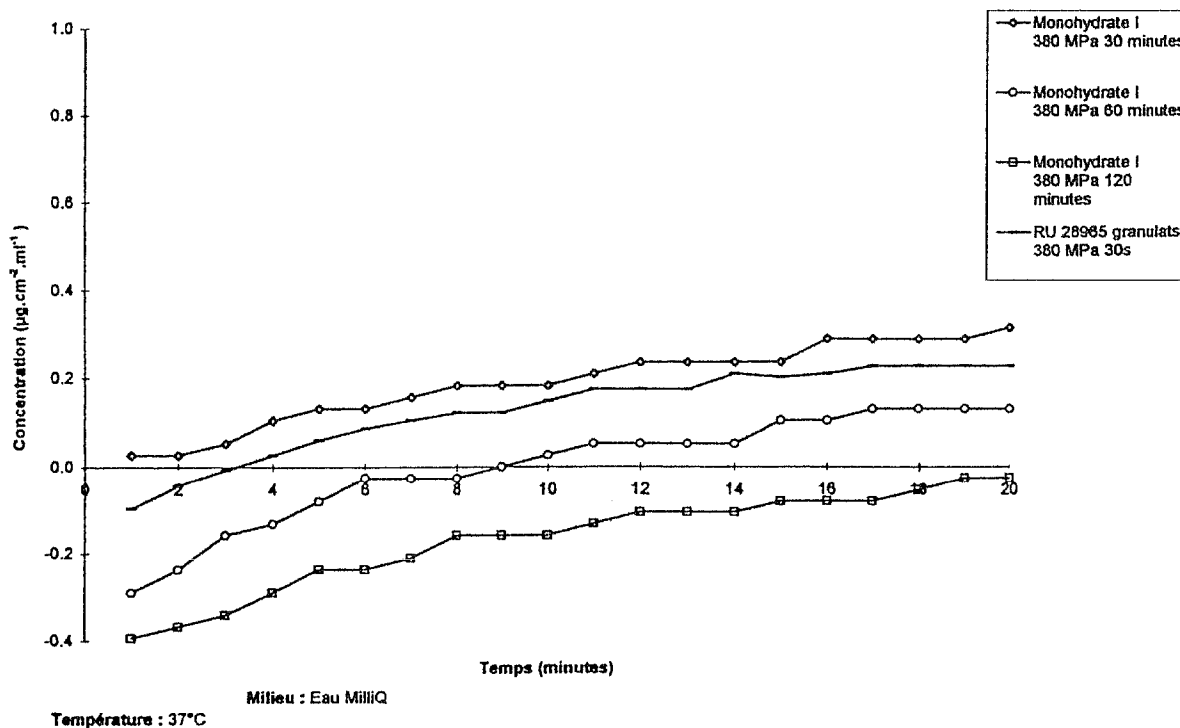


Figure 6 : influence de la compression sur la VDI de la roxythromycine, sur 20 minutes

### 3.2 Analyse Thermogravimétrique (TGA)

Elle montre la perte d'eau pour les différents hydrates, qui correspond à une mole d'eau.

L'analyse réalisée sur un verre montre que la transformation hydrate → amorphe se fait avec une perte d'eau.

Le passage d'un échantillon récupéré en surface d'un verre après une heure de passage dans l'eau. (37°C, 100 tr/min), puis séchage, montre une perte de masse d'environ 2%, ce qui correspond à 1 mole d'eau environ. Cette observation conforte la transformation de l'amorphe en une forme monohydrate observée lors de la mesure de la VDI.

### 3.3 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

La forme amorphe présente une transition vitreuse vers 80 °C.

La forme I compactée pendant 3 heures à 380 MPa présente un épaulement vers 119°C qui pourrait révéler la présence d'un mélange de 2 corps.

Le thermogramme de la forme commerciale granulée-séchée-compactée présente un pic endothermique de fusion décalé vers les plus faibles températures (-6°C). Son enthalpie de fusion est abaissée de 5 J/g. La précision de l'appareil étant de  $\pm 1\%$  pour l'enthalpie et de  $\pm 0.1\%$  pour la température [21], l'écart observé entre les deux thermogrammes est significatif. Une transformation se produirait donc au cours de la fabrication des granulats. Les thermogrammes du verre après VDI ou calorimétrie montrent clairement la transformation de l'amorphe en cristallin en présence d'eau.

Tableau 2 : paramètres thermodynamiques (gradient de 5°C/min)

nd : non définissable.

Echantillon	Onset (°C)	maximum (°C)	enthalpie de fusion (J/g)	T° départ (°C)	T°stop (°C)
Amorphe	56.2	82.49	30.14	27.81	134.74
Hydrate I	117.0 8	123.0	61.75	110.49	130.25
Hydrate II	72.44	77.57	3.519	68.18	86.76
	nd	95.43	nd	88.04	nd
	93.71	104.83	36.23	nd	119.62
Hydrate III	109.8 1	117.27	30.72	103.75	124.45
Hydrate IV	93.03	100.87	34.70	83.39	110.18
Amorphe après VDI		106.94	34.84	95.71	119.82
Amorphe après calorimétrie (1)	108.4 8	114.4	60.64	99.82	127.83
Amorphe après calorimétrie (2)	107.3 5	113.00	nd	100	nd
	nd	117.84	nd	nd	128
Forme I compactée	nd	119.21	nd	101.16	nd
	123.7 3	127.5	61.93	nd	130.96
Forme I séchée sous P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	114.0 9	120.52	60.09	105.55	130.47
Granulats compactés	109.3 9	117.51	56.31	101.43	128.09

Apport de la microcalorimétrie en préformulation galénique. Analyse de trois principes actifs à l'état solide.

Les thermogrammes obtenus pour différents échantillons amorphes après un passage dans l'eau ou sous 100% d'humidité relative tendent à montrer que la transformation n'est pas prévisible.

L'hydrate II montre clairement la présence de trois produits en mélange.

Les hydrates présentent en début de thermogramme un profil qui peut faire penser à :

- la présence d'une partie de produit amorphe qui se retransforme (transition vitreuse - recristallisation - fusion.) Cette observation serait corrélée avec celle faite lors de la mesure de la VDI ;
- et/ou la perte d'eau de l'hydrate.

Donc, la forme commerciale sous l'influence d'une compression avec ou sans granulation, peut subir des transformations détectées en DSC.

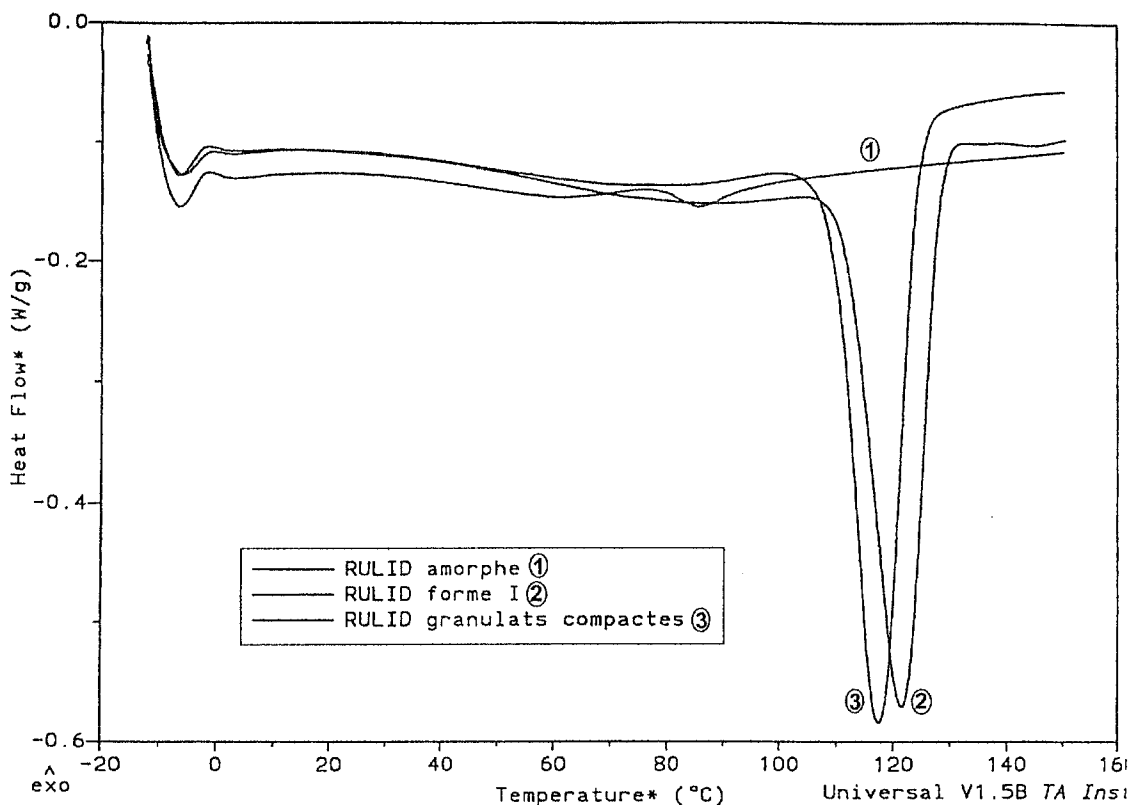


Figure 7 : thermogrammes obtenus par DSC des différentes formes de la roxythromycine (5°C/min)

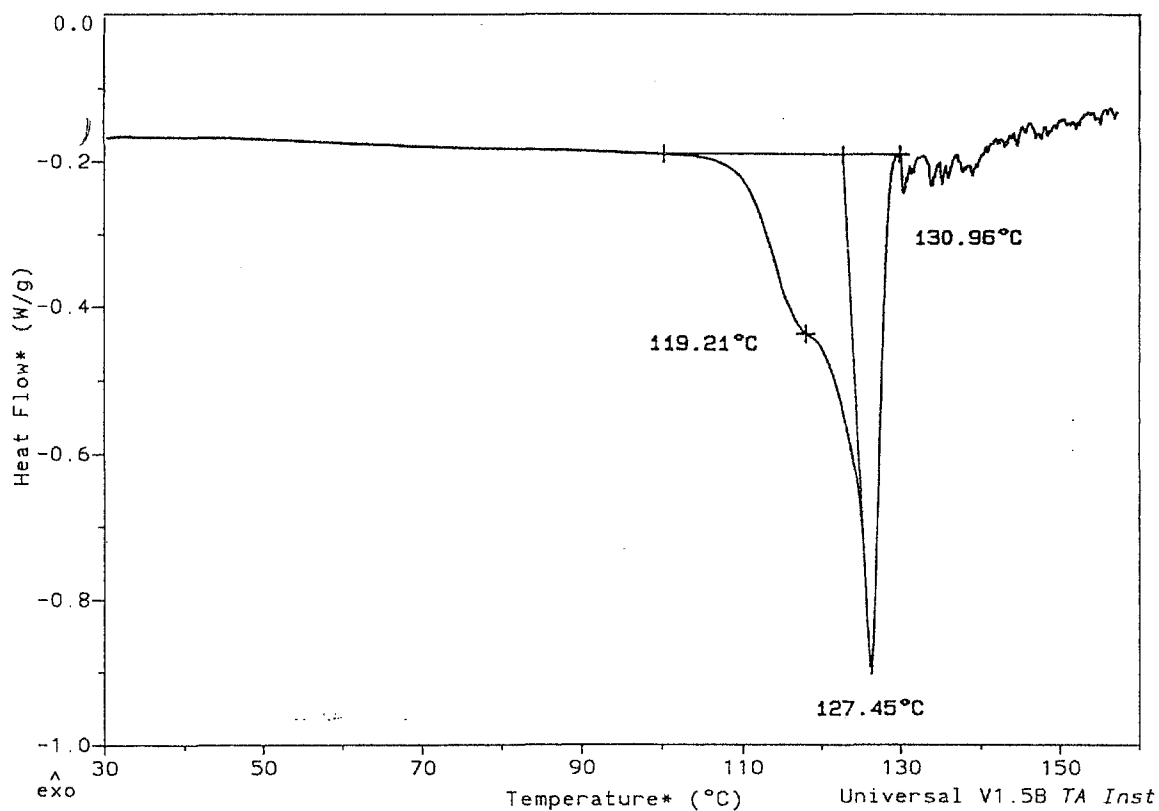


Figure 8 : thermogrammes obtenus par DSC de la roxythromycine compactée pendant 3 heures à 380 MPa (5°C/min)

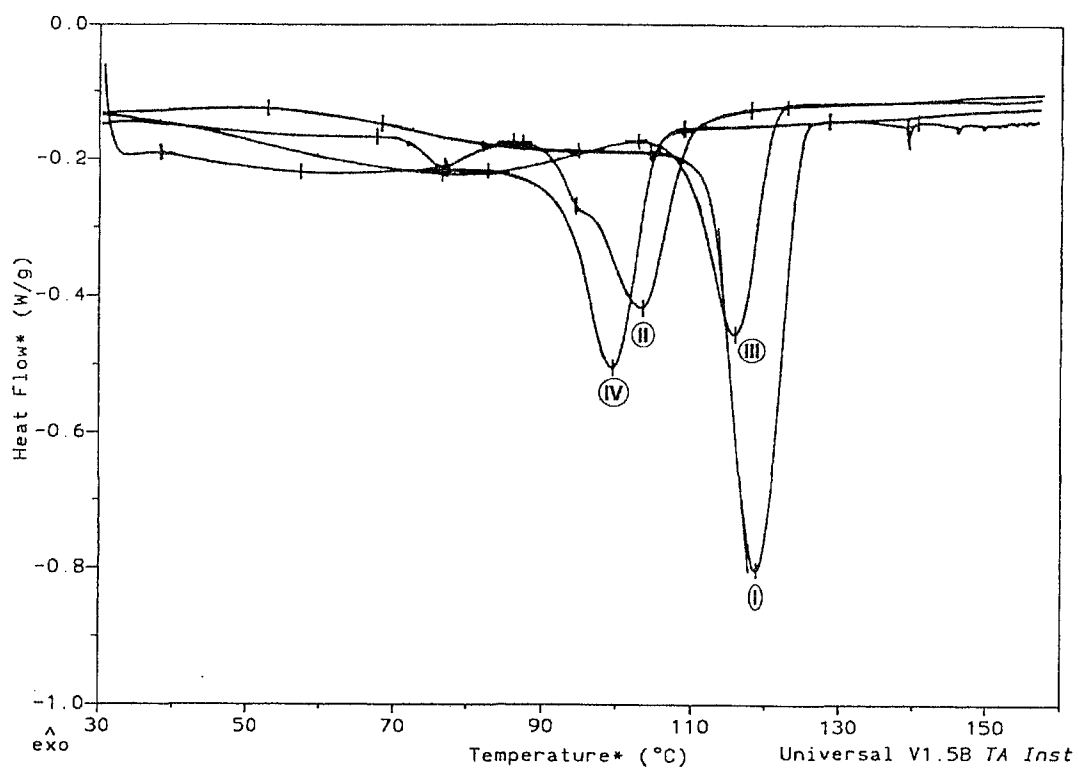


Figure 9 : thermogrammes obtenus par DSC des 4 hydrates de la roxythromycine (5°C/min)

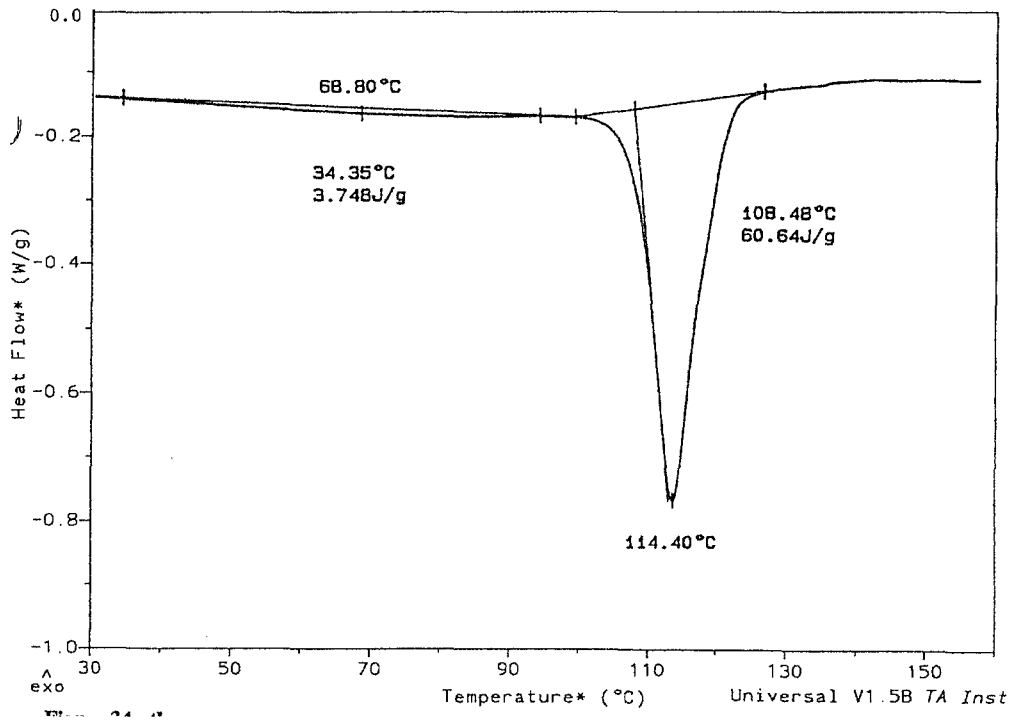


Figure 10 : thermogrammes obtenus par DSC de la roxythromycine amorphe après 60 heures sous 100%HR à 40°C (5°C/min) n°1

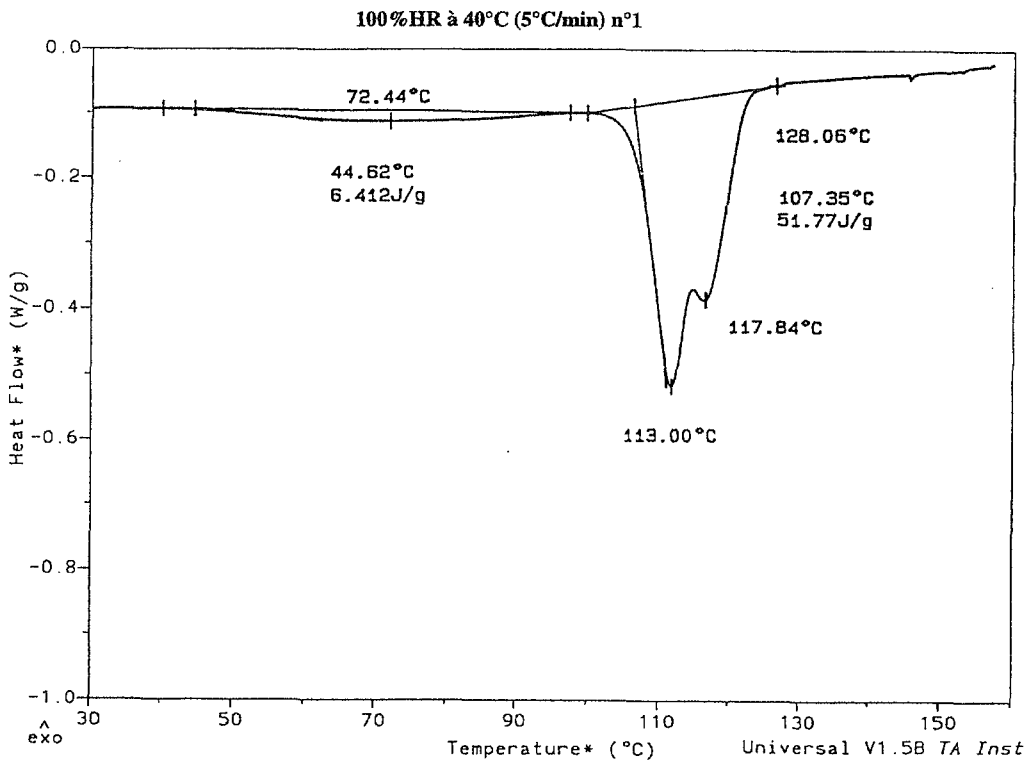


Figure 11 : thermogrammes obtenus par DSC de la roxythromycine amorphe après 60 heures sous 100%HR à 40°C (5°C/min) n°2



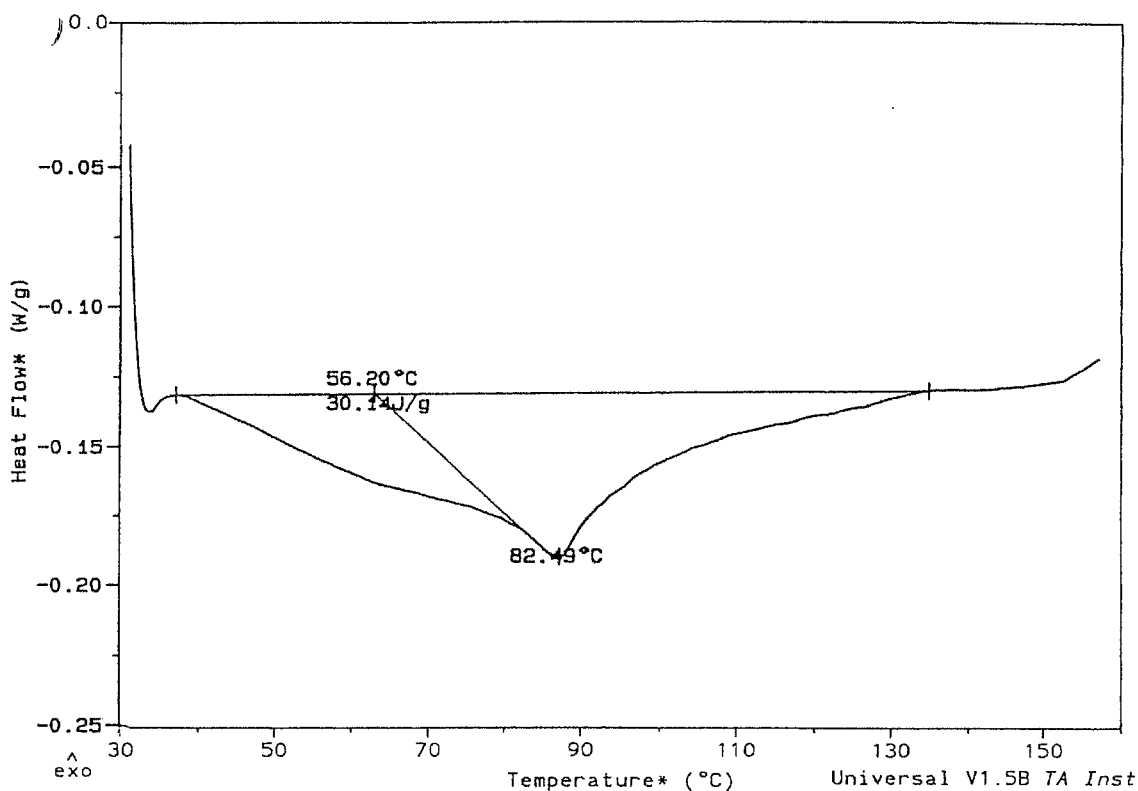


Figure 12 : thermogrammes obtenus par DSC de la roxythromycine amorphe (5°C/min)

### 3.4 Microcalorimétrie

#### 3.4.1 Analyse thermique isotherme en gradient d'humidité relative

Le thermogramme du verre présente un exotherme qui accompagne une prise en eau de la poudre. Aucun pic de désorption d'eau suivant une recristallisation n'est observé. La DSC prouve la transformation de l'amorphe après exposition de la poudre à 100 % HR. L'eau est donc gardée dans la structure (formation d'un hydrate.)

Une DSC est réalisée avant et après l'analyse. Le thermogramme de l'échantillon après le passage sous humidité relative présente un pic de fusion qui prouve une transformation de l'amorphe.

### 3.4.2 Analyse thermique isotherme en incréments d'humidité relative

Cet essai permet de localiser une humidité relative critique si elle existe.

Le thermogramme du verre ne montre aucun pic de désorption d'eau faisant suite à une recristallisation avec expulsion d'eau de la nouvelle structure.

Une DSC réalisée auparavant et à la suite de l'analyse montre qu'une transformation s'est produite suite à l'exposition du verre sous humidité relative.

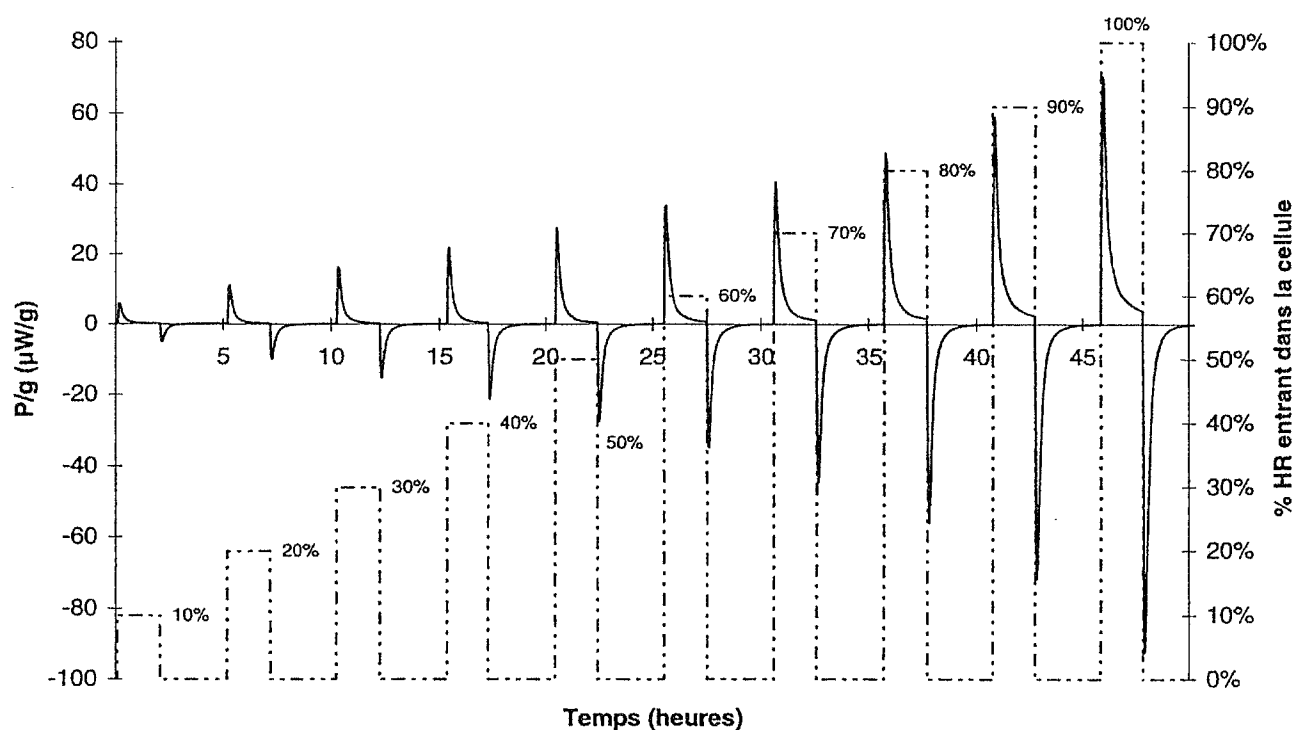


Figure 13 : roxythromycine amorphe analysée par calorimétrie isotherme en incréments d'humidité relative, à 40°C

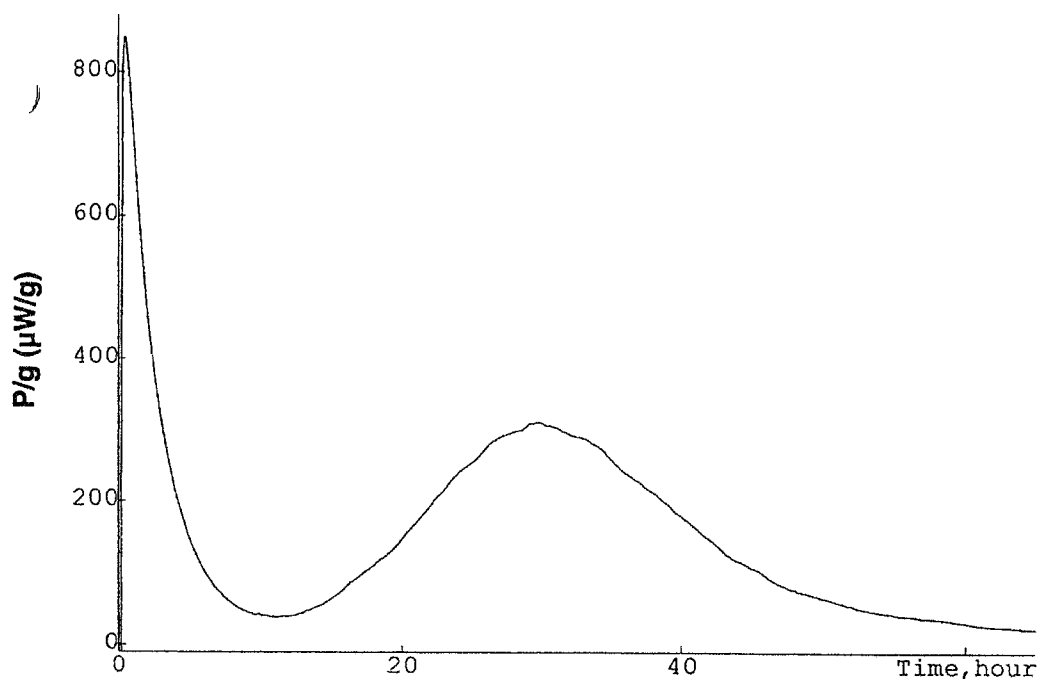


Figure 14 : roxythromycine amorphe analysée par calorimétrie isotherme sous humidité relative fixée à 100%, à 40°C

### 3.4.3 Analyse thermique isotherme en humidité relative fixée à 100% HR (hygrostat rempli d'eau)

Le thermogramme montre un premier pic exothermique dès que l'ampoule est en position de mesure. Un second pic exothermique est visible 15 heures après le début de l'analyse. Il se poursuit pendant 20 heures (phénomène lent.)

Au départ la poudre dans une atmosphère à 100% HR capte de l'eau pour s'équilibrer (phénomène exothermique). Parallèlement une évaporation d'eau depuis l'hygrostat se fait avec une vitesse identique à la vitesse d'adsorption (mais l'enthalpie des deux phénomènes n'est pas forcément identique). Ce phénomène est endothermique. Les deux signaux doivent partiellement se compenser. On observe pourtant un signal élevé ( $>800 \cdot 10^{-6}$  W/g). La poudre se transforme mais ne rejette pas d'eau (pas de pic endothermique). Elle évolue ensuite vers une autre forme de façon lente (second pic exothermique de moindre ampleur.)

Une DSC réalisée sur un échantillon à la fin du premier exotherme ( $t = 15$  heures) présente un thermogramme différent de celui de la forme amorphe sans toutefois laisser apparaître un pic de fusion vers  $110-130^{\circ}\text{C}$  (comme les hydrates.) La même analyse, réalisée en fin du second exotherme, prouve une transformation de l'amorphe par l'apparition d'un endotherme de fusion sur le thermogramme obtenu.

Hypothèse : Il peut s'agir dans un premier temps d'une transformation rapide en surface qui est suivie d'une transformation lente en profondeur.

#### 4. Conclusion

Au cours du mode de fabrication tout ou partie de la surface du monohydrate I serait transformée en forme amorphe. Celle-ci évoluerait vers une forme hydrate.

Cette transformation serait aléatoire et ne conduirait pas vers une forme définie.

La partie de la poudre qui se transforme présenterait un profil de dissolution différent de celui du produit de départ.

Propositions :

L'étape de granulation - séchage est une étape critique qui semble être à l'origine du problème, et qui doit être analysée finement.

Les excipients contenus dans la formule sont hygroscopiques, et donc favorables à la transformation de l'amorphe.

Au niveau de la compression, des excipients plutôt élastiques pour absorber une partie des forces de compression seraient à prévoir.

Pour remédier au problème, une révision de la formule ainsi que du schéma de fabrication serait à envisager, ce qui semble inconcevable sans présenter un nouveau dossier d'A.M.M. impliquant des coûts pouvant dépasser celui de la destruction des lots posant le problème (et ce, sachant que le produit doit arriver prochainement en fin de protection industrielle.)

# SYNTHESE

## Synthèse

Dans ce travail nous avons montré que les champs d'application pour la microcalorimétrie isotherme sont très variés. La technique trouve sa place aussi bien en recherche fondamentale ou appliquée, qu'au sein d'une installation industrielle pour assurer la maîtrise du processus (comme un fermenteur par exemple.) Son intérêt est aussi grand pour les sciences du vivant (médecine, microbiologie, écologie...) que pour les industries chimiques, cosmétiques, agroalimentaires ou pharmaceutiques.

Son arrivée dans le domaine du développement pharmaceutique (plus particulièrement pour les études de stabilité et de compatibilité ou encore l'étude des énergies de surface et phénomène d'amorphisation) a permis un gain de temps non négligeable dans les plannings de gestion de projet.

Toutefois, si la technique apporte des avantages non négligeables pour l'utilisateur, il est à noter quelques inconvénients. Le tableau ci dessous permet d'en faire un bilan comparatif.

Avantages	Inconvénients
Rapidité de la mesure Expériences courtes → information rapide Limite la mise en œuvre d'essais de stabilité ou de compatibilité en temps réel pour une analyse par HPLC, souvent coûteux.	Investissement lourd
Non destructif pour l'échantillon et non invasif.	Non spécificité Signal = somme des chaleurs (endothermiques et exothermiques) des différents processus concomitants. D'où, une difficulté d'interprétation éventuelle pour des phénomènes très complexes. Toutefois, un signal significativement différent de la ligne de base indique le déroulement d'un processus (destructif ou non)

Avantages	Inconvénients
<p>Pas de spécificité de la mesure (uniquement enregistrement de variation de températures) Permet de suivre des phénomènes complexes.</p>	<p>Quand le flux de chaleur enregistré ne permet pas de comprendre le mécanisme directement, il faudra faire appel à des techniques analytiques complémentaires.</p>
<p>Informations à la fois thermodynamiques et cinétiques ( = traduisent l'ampleur des réactions et la vitesse à laquelle elles se déroulent).</p>	<p>Lors d'une étude de décomposition par exemple, il n'est pas impossible que des réactions en cascade se déroulent à l'intérieur du calorimètre. La chaleur enregistrée est la somme de toutes ces réactions ce qui affectera la valeur de l'enthalpie de transformation.</p>
<p>Études menées pour des températures « ambiantes. » En effet, en DSC par exemple, l'utilisation de températures élevées dépasse souvent les points de fusion/ transition(s) et peu même parfois inverser le signe des <math>\Delta G</math> de réactions impossibles, du point de vue thermodynamique, à des températures « ambiantes »</p>	<p>La grande sensibilité de la méthode peut être à la source d'une erreur dans les calculs. Un bruit de fond ou un signal parasite (une évaporation de la phase aqueuse servant à diluer l'échantillon par exemple) pouvant être confondu avec un échange thermique résultant d'un phénomène lié au produit testé.</p>
<p>Pas de nécessité d'avoir un échantillon optiquement transparent ( bonne méthode pour un corps opaque)</p>	
<p>Tous les types d'échantillons organiques ou inorganiques ; vivants ou non, sous toute forme possible (solides, liquides, suspensions...) On pourra donc analyser des poudres, des solutions, des suspensions de cellules vivantes... A l'inverse, seuls des échantillons liquides peuvent être analysés par HPLC, par exemple.</p>	

Apport de la microcalorimétrie en préformulation galénique. Analyse de trois principes actifs à l'état solide.

Avantages	Inconvénients
Sensibilité de l'appareil (Détection de taux d'amorphe de l'ordre de 1%, non détectable par des méthodes classiques, comme la diffraction aux rayons X, ou la DSC, qui elle, entraîne en plus la dégradation de l'échantillon)	
Ne nécessite pas le développement d'une méthode analytique (à la différence de l'HPLC par exemple)	



# **DEFINITIONS**

## Définitions

### Calorimétrie (calorimetry) :

Etude et mesure des quantités de chaleur dégagées ou absorbées lors de phénomènes physiques (changement d'états,..) ou lors de réactions chimiques (endothermiques ou exothermiques).

### Capacité calorifique (heat capacity) :

Rapport de la quantité de chaleur apportée à un corps à la différence de température liée à cet apport calorifique.

On a  $Q = C \cdot \Delta T$ ,

où C est la capacité calorifique. Unité le joule par kelvin (J/K).

On distingue la capacité calorifique à pression constante CP de la capacité calorifique à volume constant CV. ( relation de Mayer).

La capacité calorifique est le produit de la masse et de la chaleur spécifique.

### Chaleur (heat) :

(Notion à ne pas confondre avec celle de **température**.)

Forme d'énergie liée sur le plan microscopique à l'énergie cinétique des molécules.

La chaleur fournie à un corps, un système peut provoquer une augmentation de température, un changement d'état physique.

### Chaleur latente (latent heat)

Quantité de chaleur à fournir à une quantité de matière unitaire pour la faire changer d'état (par fusion, sublimation, vaporisation) ou, par exemple, pour la dissoudre (chaleur latente de dissolution.)

Plus généralement, c'est la variation d'enthalpie accompagnant une transition de phase.

### Chaleur spécifique (ou massique) (specific heat) :

Capacité calorifique spécifique, c'est à dire par unité de quantité de matière. Quantité de chaleur à fournir (dans une transformation réversible) à un corps de masse unitaire pour élever sa température de 1° C.

On distingue la capacité calorifique à pression constante  $C_p = (\partial H/\partial T)_p$  et la capacité calorifique à volume constant  $C_v = (\partial H/\partial T)_v$ . Unité le J/kg/°C.

### Constante des gaz parfaits

$$R = 8,3145 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} = h \mathcal{N} \quad \text{où } h = \text{constante de Boltzmann} = 1,38066 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$$

et  $\mathcal{N} = \text{nombre d'Avogadro} = 6,02 \cdot 10^{23}$

### Effet Joule (Joule effect)

La puissance calorifique dégagée par le passage d'un courant d'intensité I dans un conducteur de résistance R vaut  $P = R \cdot I^2$

(ou  $dP = j \cdot E \cdot dv$  où j est la densité volumique de courant circulant au sein d'un conducteur volumique, dans un élément de volume dv, E étant le champ électrique).

Cet effet correspond à la résistance qu'offre le matériau au mouvement des électrons, responsable du courant électrique. C'est ce phénomène qui est utilisé dans les systèmes de chauffage électrique. Une des caractéristiques des supraconducteurs est l'absence d'effet Joule.

---

Apport de la microcalorimétrie en préformulation galénique. Analyse de trois principes actifs à l'état solide.

### **Effet Peltier (1834)**

Production ou absorption de chaleur proportionnelle à la quantité d'électricité traversant la jonction (soudure, par exemple) de deux semi-conducteurs de type différents (n ou p) ou de deux métaux, sous l'effet d'une force électromotrice (f.é.m.).

L'effet inverse existe également et consiste dans l'apparition par apport de chaleur au niveau d'une jonction, d'une f.é.m. dépendant de la nature des conducteurs et provoquant le passage du courant. cf. effet Seebeck.

Les modules à effet Peltier consistent en plusieurs alternances de matériaux en série servant à chauffer ou refroidir avec une faible inertie thermique.

### **Effet Seebeck (Seebeck effect)**

Apparition d'une force électromotrice à l'interface de deux métaux ou de deux semi-conducteurs (l'un n, l'autre p) entre lesquels une différence de température est maintenue (ou pour une barre métallique dont les extrémités sont à des températures différentes).

Pour mesurer la différence de potentiel, il faut réaliser un montage avec deux métaux différents ou utiliser un matériau supraconducteur à l'intérieur duquel cet effet ne se manifeste pas.

Cet effet est utilisé pour la constitution de thermocouples ou pour détecter de faibles énergies rayonnées.

### **Formule de Mayer**

Formule reliant les chaleurs spécifiques à pression et à volume constant d'un gaz parfait :

$$C_p - C_v = R,$$

où R est la constante des gaz parfaits.

### **Loi de Hess (Hess' law)**

L'enthalpie d'une réaction chimique est égale à la somme des enthalpies de formation des corps du second membre de l'équation représentant la réaction diminuée de la somme des enthalpies de formation des corps du premier membre.

Application du premier principe de la thermodynamique.

### **Phlogistique (phlogiston theory)**

Théorie décrivant l'existence d'un fluide hypothétique inventé par Becher et développé par Stahl. Ce fluide était sensé être libéré lors des réactions de combustion. Cette théorie a été supplantée par la théorie de la combustion oxygénée de Lavoisier.

### **Thermodynamique (thermodynamics) :**

Branche de la physique et de la chimie liée à l'étude du comportement thermique des corps, à l'étude de l'énergie et de ses transformations (en particulier de l'énergie interne).

La thermodynamique étudie les transformations des systèmes (ensembles de corps séparés par une frontière matérielle ou non) ouverts ou fermés (selon qu'ils échangent ou non de la matière avec l'extérieur) isolés ou non (selon qu'ils échangent ou non de l'énergie avec l'extérieur) représentés par des variables d'état (intensives ou extensives).

)

## **REFERENCES**

## Références

[1]: **Ahmed Humera, Buckton Graham, Rawlins David A.** ; The use of isothermal microcalorimetry in the study of small degrees of amorphous content of a hydrophobic powder ; *Int. J. Pharm.* ; 130 ; (2) ; 195-201 ; (1996).

[2]: **Allen P.V, Rahn P.D., Sarapu A.C, Vanderwielen A.J.** ; Physical characterization of erythromycin : anhydrate, monohydrate, and dihydrate crystalline solids ; *J. Pharm. Sci.* ; 67 ; (8) ; 1087-1093 ; (1978).

[3]: **Angberg M.** ; Evaluation of heat-conduction microcalorimetry in pharmaceutical stability studies ; *Acta Univ. Ups. Comprehensive summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy 94.* 86 pp. Uppsala ; (1992).

[4]: **Angberg M., Nystroem C., Castensson S.** ; Evaluation of heat-conduction microcalorimetry in pharmaceutical stability studies. VII. Oxidation of ascorbic acid in aqueous solution ; *Int. J. Pharm.* ; 90 ; (1) ; 19-33 ; (1993).

[5]: **Angberg M., Nystroem C., Castensson S.** ; Evaluation of heat-conduction microcalorimetry in pharmaceutical stability studies. I. Precision and accuracy for static experiments in glass vials ; *Int. J. Pharm.* ; 25 ; (6) ; 307-320 ; (1988).

[6]: **Angberg M., Nystroem C., Castensson S.** ; Evaluation of heat-conduction microcalorimetry in pharmaceutical stability studies. II. Methods to evaluate the microcalorimetric response ; *Int. J. Pharm.* ; 61 ; (1, 2) ; 67-77 ; (1990).

[7]: **Angberg M., Nystroem C., Castensson S.** ; Evaluation of heat-conduction microcalorimetry in pharmaceutical stability studies. III. Crystallographic changes due to water vapor uptake in anhydrous lactose powder ; *Int. J. Pharm.* ; 73 ; (3) ; 209-220 ; (1991).

[8]: **Angberg M., Nystroem C., Castensson S.** ; Evaluation of heat-conduction microcalorimetry in pharmaceutical stability studies. IV. The influence of microcrystalline

cellulose on the hydration rate of anhydrous lactose ; *Int. J. Pharm.* ; 77 ; (2, 3) ; 269-277 ; (1991).

)

[9] : **Angberg M., Nystroem C., Castensson S.** ; Evaluation of heat-conduction microcalorimetry in pharmaceutical stability studies. V. A new approach for continuous measurements in abundant water vapor ; *Int. J. Pharm.* ; 81 ; (2, 3) ; 153-167 ; (1992).

[10] : **Angberg M., Nystroem C., Castensson S.** ; Evaluation of heat-conduction microcalorimetry in pharmaceutical stability studies. VI. Continuous monitoring of the interaction of water vapor with powders and powder mixtures at various relative humidities ; *Int. J. Pharm.* ; 83 ; (1, 3) ; 11-23 ; (1992).

[11] : **Angberg M., Nyström ., Castensson S.** ; Evaluation of heat-conduction in pharmaceutical stability studies. (1) Precision and accuracy for static experiments in glass vials ; *Thermometric, Application note N 22005* ; (1990).

[12] : **Angberg M., Nyström ., Castensson S.** ; Evaluation of heat-conduction in pharmaceutical stability studies. (2) Method to evaluate the microcalorimetric response ; *Thermometric, Application note N 22006* ; (1990).

[13] : **Aso Yukio, Yoshioka Sumie, Otsuka Tomoko, Kojima Shigeo** ; The physical stability of amorphous nifedipine determined by isothermal microcalorimetry ; *Che. Pharm. Bull.* ; 43 ; (2) ; 300-303 ; (1995).

[14] : **Bakri A., L.H.M. Jansen and J. Wilting** ; Determination of reaction rate parameters using heat conduction microcalorimetry ; *J. Thermal Anal.* ; vol. 33 ; 185-190 ; (1988).

[15] : **Bakri A., L.H.M. Jansen and J. Wilting** ; Flow microcalorimetry applied to the study of chemical of organic compounds ; *J. Thermal Anal.* ; vol. 33 ; 1193-1199 ; (1988).

[16] : **Bakri A.** ; Design, testing and pharmaceutical applications of a gas pressure controller device for solid-gas microcalorimetric titration ; *Thermometric, Application note N 22021* ; (1993).

---

Apport de la microcalorimétrie en préformulation galénique. Analyse de trois principes actifs à l'état solide.



[17] : **Briggner L.E.** ; A test reaction for titration with a Thermal Activity Monitor ; *Thermometric, Application note N° TM003* ; (1989)

[18] : **Briggner Lars Erik, Buckton Graham, Brystrom Katarina, Darcy Patricia** ; The use of isothermal microcalorimetry in the study of changes in crystallinity induced during the processing of powders ; *Int. J. Pharm.* ; 105 ; (2) ; 125-135 ; (1994).

[19] : **Buckton Graham** ; Application of isothermal microcalorimetry in the pharmaceutical sciences ; *Thermochim. Acta* ; 248 ; 117-129 ; (1995).

[20] : **Chen A-t., Wadsö I.** ; A test calibration process for microcalorimeters used as thermal power meters ; *J. Bioch. & Biophys. Meth.* ; 6 ; 297-306 ; (1982).

[21] : **Chowdhry B.Z., Beezer A.E., Greenhow E.J.** ; Analysis of drugs by microcalorimetry. Isothermal power-conduction calorimetry and thermometric titrimetry ; *Talanta* ; 30 ; (4) ; 209-243 ; (1983).

[22] : **Díaz Esquivel, Bardon J., Rollet M.** ; Phénomènes thermiques lors de la compression des poudres pharmaceutiques. II. Influence du matériel de compression ; *Pharm. Acta Helv.* ; 66 ; (5-6) ; 141-150 ; (1991).

[23] : **Ford J.L., Timmins P.** ; Pharmaceutical thermal analysis, techniques and applications ; *Pub. by Ellis Horwood Limited, dist. by Halted Press a division of John Wiley & sons* ; (1989).

[24] : **Hallén Dan** ; The role of titration microcalorimetry in the drug design process ; *Thermometric, Application note N 22024* ; (1997).

[25] : **Hansson Hans** ; Testing propellants by calorimetry ; *Thermometric, Application note N 337* ; (1983).

[26] : **Hanus E.J., King L.D.** ; Thermodynamic effects in the compression of solids ; *J. Pharm. Sci.* ; 57 ; (4) ; 677-684 ; (1968).

)

[27] : **Ito S., Nishimura M., Kobayashi Y., Itai S., Yamamoto K.** ; Characterization of polymorphs and hydrates of GK-128, a serotonin receptor antagonist ; *Int. J. Pharm.* ; 151 ; 133-143 ; (1997).

[28] : **Khankari Rajendra K., Grant David J.W.** ; Pharmaceutical hydrates ; *Thermochim. Acta* ; 248 ; 61-79 ; (1995).

[29] : **Mourik J., Bakri A.** ; Application of microcalorimetry to plant technology : germination and initial growth ; *Thermometric, Application note N 22017* ; (1991).

[30] : **Murthy K.S., Turner N.A., Nesbitt N.A., Fawzi M.B.** ; Characterization of commercial lots of erythromycin base ; *Drug. Dev. Ind. Pharm.* ; 12 ; (5) ; 665-690 ; (1986).

[31] : **Nelson E., Busse L.W., Higuchi T.** ; The physics of tablet compression. VII. Determination of energy expenditure in the tablet compression process ; *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.* ; 44 ; (4) ; 223-225 ; (1955).

[32] : **Nyqvist H.** ; Saturated salt solutions for maintaining specified relative humidities ; *Int. J. Pharm. Tech. & Prod. Mfr.* ; 4 ; (2) ; 47-48 ; (1983).

[33] : **Paulsson L.E., Svensson L.G., Forsgrren C.K.** ; Microcalorimetric methods for corrosion rate measurement ; *Thermometric, Application note N TM001* ; (1989).

[34] : **Phipps Mark A., Mackin Lesley A.** ; Application of isothermal microcalorimetry in solid state drug development ; *P.S.T.T.* ; 3 ; (1) ; 9-17 ; (2000).

[35] : **Russel S.** ; A review of the applications of the Thermal Activity Monitor (TAM) in metabolism, growth and the effects of stimulants and inhibitors on biological systems ; *Thermometric, Application note N 22020* ; (1993).

[36] : **Schön Arne** ; A fast bioassay for the evaluation of anticancer drug ; *Thermometric, Application note N 22025* ; (1997).

[37] : **Svensson Lars-Gunnar** ; Ampoule microcalorimetry for stability and compatibility testing of explosives and materials ; *Thermometric, Application note N 332* ; (1983).

[38] : **Svensson Lars-Gunnar** ; Ampoule microcalorimetry for the observation of curing process of an acrylate binder in a pyrotechnic composition ; *Thermometric, Application note N 334* ; (1983).

[39] : **Travers D.N., Merriman M.P.H.** ; Temperature changes occurring during the compression of solids ; *J. Pharm. Pharmac.* ; 22 (Suppl.) ; 11-S-16-S ; (1970).

[40] : **Ward Gary H., Schultz Robert K.** ; Process-induced crystallinity changes in albuterol sulfate and its effect on powder physical stability ; *Pharm. Res.* ; 12 ; (5) ; 773-779 ; (1995).

[41] : **Wilson Richard J., Beezer Anthony E., Mitchell John C.** ; Solid state reactions studied by isothermal microcalorimetry; the solid state oxidation of ascorbic acid ; *Int. J. Pharm.* ; 132 ; (1, 2) ; 45-51 ; (1996).

[42] : **Wurster D.E., Creekmore J.R.** ; Measurement of the energy involved upon tablet compression ; *Drug. Dev. Ind. Pharm.* ; 12 ; (10) ; 1511-1528 ; (1986).

## LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

)

DCA : développement chimique et analytique

DSC : differential scanning calorimetry

Ea : énergie d'activation

HR : humidité relative

Mpa : méga Pascal

PA : principe actif

Pf : point de fusion

Tg : transition vitreuse (*glass transition*)

VDI : vitesse de dissolution intrinsèque



# Serment des Apothicaires

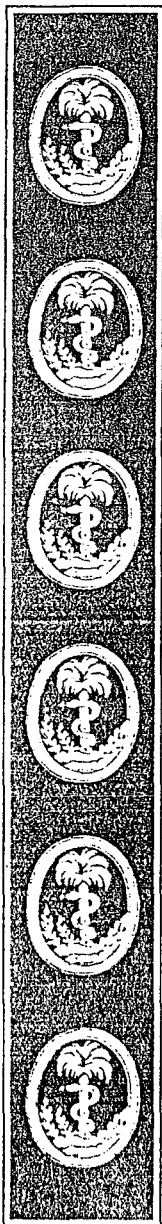
Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



THESE SOUTENUE PAR : Gilles DUCRET

**APPORTS DE LA MICROCALORIMETRIE ISOTHERME EN  
PREFORMULATION GALENIQUE.  
ANALYSE DE TROIS PRINCIPES ACTIFS A L'ETAT SOLIDE.**

**Conclusions :**

Technique d'enregistrement d'infimes variations de températures (de l'ordre du millionième de degré), la **microcalorimétrie isotherme** permet de suivre la plupart des phénomènes physiques ou chimiques. Elle apporte une information à la fois sur les paramètres **thermodynamiques** et **cinétiques** du processus étudié.

Dans ce travail, nous avons présenté les potentialités du **B.A.M, calorimètre à conduction de chaleur** développé dans les années 80.

Son principe de mesure est le suivant : La majorité des phénomènes physiques ou chimiques s'accompagne d'un échange de chaleur avec l'environnement. L'instrument se propose de suivre un processus en enregistrant le flux de chaleur qui l'accompagne. La chaleur absorbée ou générée par l'échantillon étudié est échangée à travers des thermocouples avec l'environnement thermostaté du calorimètre. Les courbes obtenues sont appelées des **thermogrammes** et présentent l'évolution du flux de chaleur en fonction du temps. La microcalorimétrie isotherme fournit une information directe sur l'ampleur du phénomène étudié et la vitesse avec laquelle il se déroule. Les caractéristiques des appareils sont leur grande sensibilité et la stabilité de la ligne de base. Non spécifique, la technique offre des domaines d'applications multiples. Nous avons listé les possibilités d'études dans des domaines aussi varié que l'écologie, les biotechnologies, la biologie cellulaire, la bio compatibilité, les études de thermodynamiques classiques, les sciences des matériaux dans **l'industrie chimique et pharmaceutique**. Nous avons plus particulièrement développé cette dernière partie.

Cette thèse présente les résultats obtenus après l'analyse de trois principes actifs à l'état solide dans un laboratoire de préformulation pharmaceutique.

Dans un premier temps nous avons étudié la **compatibilité** d'un **antiprogestatif** avec ses excipients. Puis, nous avons observé l'influence de **l'humidité relative** sur un **kétolide**. Enfin, nous avons cherché à comprendre l'influence des processus de fabrication d'un comprimé sur la **forme cristalline** d'un **macrolide**. Pour ces trois cas, la microcalorimétrie isotherme a été employée seule ou complétée par d'autres techniques analytiques telle que **l'HPLC**, la **DSC** ou la **vitesse de dissolution intrinsèque (VDI)**.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le

LE DOYEN

LE PRESIDENT DE THESE

P. DEMENGE

PROFESSEUR A. BAKRI

