

2m11. 2777. 4

Université de Montréal

**Étude des dérivés de la chitosane et leur intérêt en technologie
pharmaceutique**

par
Mohammed GUEDDI

Faculté de pharmacie

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures en vue de
l'obtention du grade de
Maîtrise ès sciences (M.Sc)

décembre 1999

© Mohammed GUEDDI



QV

705

U58

2000

v.003

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Étude des dérivés de la chitosane et leur intérêt en technologie
pharmaceutique**

présenté par :

Mohammed GUEDDI

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Professeur J-G. Besner	président rapporteur du jury
Professeur J-N. Mc Mullen	directeur de recherche
Professeur Louis Cartilier	membre du jury

Mémoire accepté le :

SOMMAIRE

Le présent travail s'inscrit dans le domaine de la libération contrôlée des médicaments. Un polymère naturel, la chitosane modifiée par acylation, fait l'objet de l'étude en tant que nouvel excipient pour la fabrication des comprimés à libération prolongée de principe actif.

La chitosane est un polysaccharide préparé chimiquement à partir de la chitine par un traitement alcalin à haute température (Muzzareli, 1977). Elle ne possède pas la propriété de former un gel dans un milieu aqueux, cependant, lorsque les molécules de ce polymère sont substituées par des chaînes carbonées, cela génère des dérivés de chitosane capables de gonfler dans l'eau ou dans un tampon phosphate.

Le mécanisme de gonflement du polymère substitué est dû à l'éloignement des macromolécules les unes des autres entraînant ainsi un espace diffusionnel. Une telle structure est appelée hydrogel.

Les propriétés gélifiantes de ces dérivés de chitosane ont été mises à profit pour l'étude de la cinétique de libération des médicaments.

La première section de ce mémoire est une revue des différentes formes à libération contrôlée. La deuxième section est divisée en deux parties : la première décrit la synthèse de trois dérivés de chitosane. Ces

derniers sont caractérisés par leur capacité à former un gel en milieu aqueux. Dans la deuxième partie, les systèmes réservoir et matriciel ont été choisis comme modèle pour analyser l'influence du poids moléculaire du médicament ainsi que de la géométrie du comprimé sur la cinétique de libération.

Pour déterminer le mécanisme de libération, on a utilisé l'équation de PEPPAS (Peppas, 1987) comme modèle mathématique afin d'interpréter les résultats expérimentaux.

TABLE DES MATIÈRES

page

SOMMAIRE.....	i
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Remerciements.....	x
PARTIE THÉORIQUE.....	1
1. INTRODUCTION.....	2
2. FORMES À LIBÉRATION CONTRÔLÉE.....	2
2.1. Généralités.....	2
2.2. Terminologie des formes à libération contrôlée.....	4
2.3. Avantage des formes à libération contrôlée.....	5
2.4. Inconvénients des formes à libération contrôlée.....	6
3. ASPECTS FONDAMENTAUX DE LA LIBÉRATION CONTRÔLÉE.....	6
3.1. Diffusion.....	6
3.2. Analyse de la cinétique de libération d'un médicament.....	8
4. CLASSIFICATION DES SYSTÈMES DE LIBÉRATION SELON LE MÉCANISME DE TRANSFERT DE MASSE.....	12
4.1. Les systèmes contrôlés par diffusion.....	12
4.1.1. Systèmes réservoirs.....	12
4.1.2. Systèmes matriciels.....	14
4.1.2.1 Matrices hydrophiles.....	15
4.1.2.2 Matrices inertes.....	18
4.1.2.3 Matrices lipidiques.....	20
4.2. Les systèmes à libération contrôlée par le solvant.....	23
4.2.1. Systèmes contrôlés par la pression osmotique.....	23
4.2.2. Système à gonflement contrôlé.....	24
4.3. Systèmes chimiquement contrôlés.....	26
4.3.1. Systèmes biodégradables.....	26
4.3.2. Systèmes à chaînes greffées.....	29
4.4. Systèmes activés par ondes magnétiques.....	30

5.	LA CHITOSANE, MATRICE HYDROPHILE POUR LES SYSTÈMES A LIBÉRATION CONTRÔLÉE.....	32
5.1.	Généralités.....	32
5.2.	Procédé d'extraction du chitosane à partir de la chitine.....	33
5.3.	Utilisation de la chitosane.....	36
PARTIE EXPÉRIMENTALE.....		37
1.	MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	39
1.1.	Réactifs utilisés.....	39
1.2.	Équipements utilisés.....	40
1.3.	Purification de la chitosane.....	41
1.4.	Caractérisation de la chitosane.....	41
1.4.1.	Le poids moléculaire.....	41
1.4.2.	Degré d'acétylation.....	42
2.	SYNTHÈSE DES DÉRIVÉS DE LA CHITOSANE.....	45
2.1.	Principe de la réaction de synthèse.....	45
2.1.1.	N-acétyl chitosane.....	45
2.1.2.	N-butyryl chitosane.....	45
2.1.3.	N-caproyl chitosane.....	46
2.2.	Calcul du pourcentage de substitution.....	46
2.3.	Mode opératoire.....	47
2.4.	Préparation de la poudre et les comprimés.....	48
3.	ÉTUDE DE LA CINÉTIQUE DE GONFLEMENT DES COMPRIMÉS DE DÉRIVÉS DE CHITOSANE.....	49
3.1.	Principe.....	49
3.2.	Analyse d'image des comprimés.....	49
3.3.	Résultats et discussion de la cinétique de gonflement.....	51
3.3.1.	N-acétyl chitosane.....	51
3.3.2.	N-butyryl chitosane.....	51
3.3.3.	N-caproyl chitosane.....	52
3.4.	Analyse d'image.....	62
3.5.	Influence de la force ionique sur le gonflement des comprimés de dérivés de chitosane.....	67
4.	ÉTUDE DE LA CINÉTIQUE DE LIBÉRATION DES MÉDICAMENTS À PARTIR DES COMPRIMÉS DE DÉRIVÉS DE CHITOSANE.....	69

4.1. Évaluation d'un système matriciel.....	70
4.1.1. Influence du poids moléculaire.....	74
4.2. Évaluation d'un système réservoir.....	78
4.2.1. Influence de la géométrie du comprimé.....	81
5. DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION.....	86
BIBLIOGRAPHIE.....	89

Annexe

LISTES DES TABLEAUX

page

Tableau I :	Mode de transport en fonction des valeurs de n.....	8
Tableau II :	Les polymères hydrophiles.....	16
Tableau III :	Classification des polymères lipophiles.....	21
Tableau IV :	Produits utilisés pour la synthèse des dérivés de chitosane.....	39
Tableau V :	Quantité d'anhydride en fonction du degré de substitution.....	47
Tableau VI :	Test de gonflement du comprimé de N-acétyl chitosane dans le tampon phosphate pH 7.4 à 37°C..	53
Tableau VII :	Test de gonflement du comprimé de N-butyryl chitosane dans le tampon phosphate pH 7.4 à 37°C..	55
Tableau VIII :	Test de gonflement du comprimé de N-caproyl chitosane dans le tampon phosphate pH 7.4 à 37°C..	57
Tableau IX :	Indice de gonflement maximal en fonction du degré de substitution.....	60
Tableau X :	Gonflement du comprimé de N-butyryl chitosane dans l'eau distillée et dans le tampon phosphate.....	68
Tableau XI :	Dimensions des comprimés enrobés avec de la chitosane substituée.....	82

LISTE DES FIGURES

page

Figure 1 :	Profil des concentrations plasmatiques obtenues à partir des différentes formes à libération contrôlée.....	3
Figure 2 :	Représentation théorique d'une libération de type Fickien (a), de type anomal (b), de type cas II (c) et de type super cas II (d).....	11
Figure 3 :	Représentation simplifiée de la libération d'un principe actif dispersé dans une matrice hydrophile.....	17
Figure 4 :	Représentation simplifiée de la libération d'un principe actif dispersé dans une matrice.....	19
Figure 5 :	Représentation schématique du mécanisme de bioérosion..	22
Figure 6 :	Pompe osmotique élémentaire orale Système OROS.....	24
Figure 7 :	Représentation simplifiée d'une matrice à gonflement limité.....	25
Figure 8 :	Représentation simplifiée d'une matrice biodégradable.....	26
Figure 9 :	Profil théorique de libération d'un principe actif contrôlé par diffusion (a) et par érosion combinée à la diffusion (b).....	28
Figure 10 :	Schéma de principe d'un système à chaînes greffées.....	29
Figure 11 :	Processus général d'extraction de la chitine.....	35
Figure 12 :	Réaction de déacétylation de la chitine.....	34
Figure 13 :	Protocole de préparation des dérivés de chitosane.....	48
Figure 14 :	Dispositif pour l'analyse d'image.....	50
Figure 15 :	Cinétique de gonflement du N-acétyl chitosane à différents degré de substitution.....	54

Figure 16 :	Cinétique de gonflement de N-butyryl chitosane à différents degrés de substitution.....	56
Figure17 :	Cinétique de gonflement du N-caproyl chitosane à différents degrés de substitution.....	58
Figure18 :	Évolution de l'indice de gonflement maximal des trois dérivés de chitosane à différents degrés de substitution....	60
Figure 19 :	Liaisons hydrogènes, avant et après acylation de la chitosane (schéma de principe).....	62
Figure 20 :	Comprimé de N-butyryl chitosane (à t = 0).....	64
Figure 21 :	Comprimé de N-butyryl chitosane après 6 heures dans le tampon phosphate.....	65
Figure 22 :	Comprimé de N-butyryl chitosane après 24 heures dans le tampon phosphate.....	66
Figure 23 :	Cinétique de gonflement du comprimé de N-butyryl chitosane dans l'eau distillée et dans le tampon phosphate ^{7,4}	68
Figure 24 :	Système matriciel (schéma de principe)	70
Figure 25 :	Cinétique de libération du salicylate de sodium à partir des comprimés de dérivés de chitosane (système matriciel)...	72
Figure26 :	Représentation ln-ln de la cinétique de libération du salicylate de sodium à partir des comprimés de dérivés de chitosane.....	73
Figure 27:	Cinétique de libération de la spiramycine à partir des comprimés de dérivés de chitosane (système matriciel)....	74
Figure 28:	Représentation ln-ln de la cinétique de libération de la spiramycine à partir des comprimés de dérivés de chitosane.....	76

Figure 29 : Vitesse de libération du salicylate de sodium à partir des comprimés de dérivés de chitosane.....	77
Figure 30 : Vitesse de libération de la spiramycine à partir des comprimés de dérivés de chitosane.....	77
Figure 31 : Système réservoir (schéma de principe).....	78
Figure 32 : Cinétique de libération du salicylate de sodium à partir des comprimés de dérivés de chitosane 10mm de diamètre (système réservoir).....	79
Figure 33 : Représentation ln-ln de la cinétique de libération du salicylate de sodium à partir des comprimés de dérivés de chitosane 10 mm de diamètre (système réservoir).....	80
Figure 34 : Comprimé enrobé (schéma de principe).....	81
Figure 35 : Influence de la géométrie du comprimé de chitosane substituée sur la cinétique de libération du salicylate de sodium.....	82

Remerciements

J'adresse mes remerciements au Professeur Jean Nobert McMullen pour m'avoir donné l'occasion de travailler sur ce sujet intéressant, pour sa disponibilité chaque fois que j'ai eu besoin d'éclaircissements durant ce travail.

Je tiens également à remercier le Professeur Jean Guy Besner et le Professeur Louis Cartilier qui ont accepté de faire partie de ce jury.

Je remercie sincèrement tout le personnel du laboratoire pour sa gentillesse et sa sympathie.

Je remercie de tout cœur mon épouse Ouarda Ghennai pour son support et toute sa compréhension, de même que pour avoir donné naissance à notre fille Louisa à l'automne 1997.

SECTION A

PARTIE THÉORIQUE

1) INTRODUCTION

Le contrôle de la libération des principes actifs à partir des formes galéniques repose le plus souvent sur le choix d'un polymère approprié et il est fort probable que l'emploi de ce type de substrat ira en s'amplifiant, en raison de l'éventail de plus en plus large de composés offerts. Un intérêt particulier est porté aux polymères naturels et biodégradables. Parmi ces polymères, la chitosane est introduite comme nouvel excipient pour la libération contrôlée de médicaments.

2) FORMES À LIBÉRATION CONTRÔLÉE

2.1 Généralités

L'intérêt pour le développement des formes à libération contrôlée est apparu suite aux avantages thérapeutiques et économiques qu'elles présentent par rapport aux formes à libération immédiate.

Lors de l'administration d'une dose unique de médicament sous une forme galénique classique ou conventionnelle, nous observons une absorption rapide avec une période initiale où la concentration plasmatique augmente jusqu'à un point maximum, suivi d'une diminution du taux correspondant à l'élimination progressive du principe actif du sang (Élimination urinaire ou autre, métabolisme, dégradation, etc.) (courbe 1, *figure 1*) (Buri P, Doelker E et al, 1990).

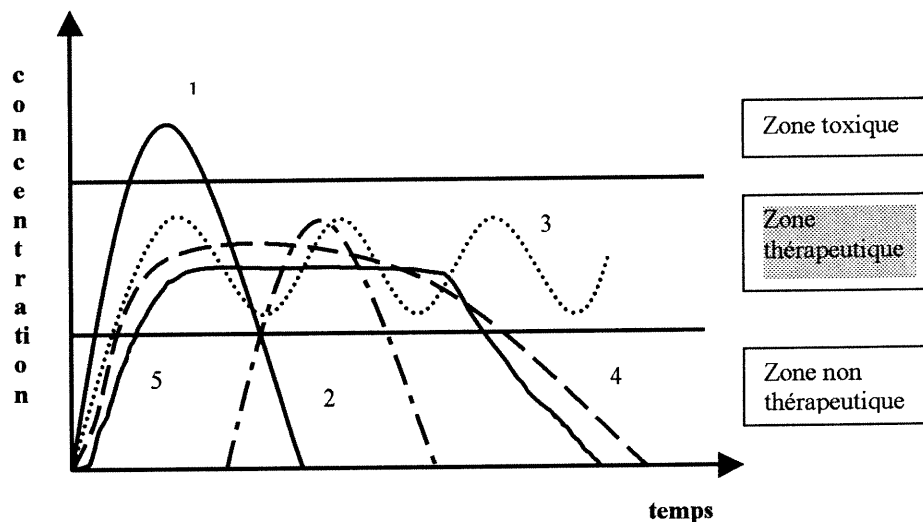


Figure 1 : Profil des concentrations plasmatiques obtenues à partir des différentes formes à libération contrôlée

Pour maintenir une concentration plasmatique située dans la fenêtre thérapeutique, donc pour obtenir une thérapie efficace, il est recommandé de multiplier les prises des doses. Ce type de posologie présente des inconvénients tels que les fluctuations des taux plasmatiques « pic-et-vallée », entraînant des effets secondaires à cause de l'assimilation parfois rapide du médicament ou à des pertes d'efficacité si le principe actif a une demi-vie courte et le taux plasmatique peut chuter rapidement et atteint la zone de concentration inefficace.

C'est pour cela qu'il est très important de contrôler la libération du principe actif de façon à ce que le taux plasmatique soit constant et que l'intervalle entre les prises de médicament s'élargisse. D'où l'avantage

des formes à libération contrôlée qui sont des formes pharmaceutiques où la libération peut durer quelques heures, quelques jours ou bien quelques mois.

2.2 Terminologie des formes à libération contrôlée

Selon le United States Pharmacopeia (USP), on distingue cinq formes :

a) Les formes à **action retardée** ou différée (courbe 2, *figure 1*).

Ce sont des préparations qui libèrent le principe actif à un moment ultérieur à l'administration grâce à une formulation appropriée. Ce sont principalement des formes gastro-résistantes destinées à éviter une mise à disposition du principe actif dans l'estomac.

b) Les formes à **action répétée** (courbe 3, *figure 1*).

Avec une prise unique, on obtient une courbe semblable à celles dues à des prises répétées d'un médicament conventionnel. Deux ou plusieurs doses normales de principe actif sont ainsi libérées l'une après l'autre à partir d'une forme unique.

c) Les formes à **action prolongée** (courbe 4, *figure 1*)

Ce sont des préparations caractérisées par une vitesse de libération lente qui permet de réduire aux moins de deux fois la fréquence d'administration d'un médicament par rapport à une forme conventionnelle.

d) Les formes à **action soutenue** (courbe 5, *figure 1*).

Ici, la concentration plasmatique est maintenue constante pendant un temps nettement plus long que ne le ferait une forme conventionnelle. Après établissement de la concentration plasmatique efficace, les quantités de principe actif apportées au niveau sanguin par unité de temps compensent les quantités métabolisées et éliminées.

e) Les formes à libération **modifiée**

Ce sont des préparations dont la cinétique de libération est liée à la formulation. Ces systèmes sont caractérisés par une vitesse de libération prévisible et reproductible.

2.3 Avantage des formes à libération contrôlée

- La simplification de la posologie mène en général à une amélioration de la fidélité du patient à son traitement.
- L'efficacité du traitement est améliorée par la réduction des profils plasmatiques oscillant entre les zones toxiques et les zones inefficaces.
- Diminution de la toxicité (ou de l'action irritante) de certains principes actifs libérés en forte concentration sur les muqueuses du tractus gastro-intestinal.
- Protection du principe actif face à une éventuelle dégradation par des composants des fluides biologiques.

2.4 Inconvénients des formes à libération contrôlée

- En cas d'intoxication ou d'intolérance, l'interruption rapide du traitement est difficile.
- Risque de surdosage dû à une administration erronée ou à un défaut de fabrication.
- Les coûts élevés de fabrication et la possibilité réduite d'un ajustement des doses.
- Adaptation difficile de la posologie due aux différences pharmacocinétiques interindividuelles.

3) ASPECTS FONDAMENTAUX DE LA LIBÉRATION CONTRÔLÉE

3.1 Diffusion

Le phénomène de diffusion peut être défini comme un processus de transfert de masse (atomes, molécules ou particules) sous l'effet du mouvement Brownien engendré par l'existence d'un gradient de concentration (Doelker, 1985).

La diffusion peut être décrite par les deux équations de Fick.

$$J = - D \frac{dc}{dx} = \frac{dMt}{Sdt} \quad (1)$$

$$\frac{dc}{dt} = D \frac{\delta^2 c}{\delta x^2} \quad (2)$$

Les deux équations décrivent exactement le même phénomène à savoir que les flux diffusionnels sont le résultat du gradient de concentration.

L'équation (1) est utilisée pour décrire une diffusion stationnaire tel que le système réservoir où le gradient de concentration est constant.

J : représente le flux de matière ou vitesse de transfert ($\text{g /cm}^2\text{sec}$) ou vitesse de transfert d'une masse de soluté dM_t / dt à travers une barrière d'une unité de surface et par unité de temps.

D : coefficient de diffusion du principe actif (cm^2/sec).

C : la concentration en substance diffusante (mol/cm^3).

x : correspond à la distance de diffusion (cm).

dc/dx : exprime le gradient de concentration ($\text{mol/cm}^3.\text{cm}$) en principe actif dans la zone diffusionnelle entre deux points distants de dx .

Le signe négatif signifie que le vecteur flux (J) a un sens opposé au vecteur gradient de concentration.

La deuxième équation permet de décrire le régime de diffusion non stationnaire. Par exemple pour les systèmes matriciels le gradient de concentration varie avec le temps, puisque la distance de diffusion croît progressivement au fur et à mesure que le soluté est libéré de la forme médicamenteuse.

Il faut noter que dans ces expressions D (le coefficient de diffusion) est considéré constant, ne dépendant pas de la concentration.

macromoléculaire est beaucoup plus faible que la diffusion des molécules de solvant qui progressent à vitesse constante et délimitent la zone hydratée de la zone non hydratée.

La quantité de substance diffusée au temps (t) est :

$$M_t = K.t \quad (8)$$

Sa vitesse de diffusion :

$$dM/ dt = K \quad (\text{constante}) \quad (9)$$

- Pour n supérieur à 1, le mécanisme de transport est de type super cas II où la vitesse de libération de la molécule médicamenteuse augmente en fonction du temps (Peppas et Bindschaedler, 1986).

Une représentation graphique théorique du profil de libération est donnée par la *figure 2*.

3.2. Analyse de la cinétique de libération d'un médicament

Pour la réalisation des formes pharmaceutiques à libération contrôlée, on fait appel dans la majorité des cas à des matériaux de nature polymériques. Ces composés sont synthétiques, semi-synthétiques ou naturels.

Pour déterminer le type de cinétique de libération d'un principe actif à partir d'un système polymérique on utilise l'équation (3) (Peppas, 1985).

$$M_t / M_\infty = Kt^n \quad (3)$$

Où : M_t = quantité de médicament libérée au temps t .

M_∞ = quantité totale de médicament libérée.

t = temps.

K = constante cinétique.

n = constante caractéristique du type de transport.

La valeur de n (*tableau I*) permet de donner une indication sur le type de transfert de masse s'effectuant à travers le réseau polymérique. (Park and al. , 1993).

Valeur "n"	Type de transport	Cinétique de libération (dMt/dt)
$n = 0.5$	Diffusion fickienne	$t^{-0.5}$
$0.5 < n < 1$	Diffusion anormale	t^{n-1}
$n = 1$	Transport type cas II	t^0 constante «ordre-zéro»
$n > 1$	Transport type super cas II	t^{n-1}

Tableau I : Mode de transport en fonction des valeurs de n

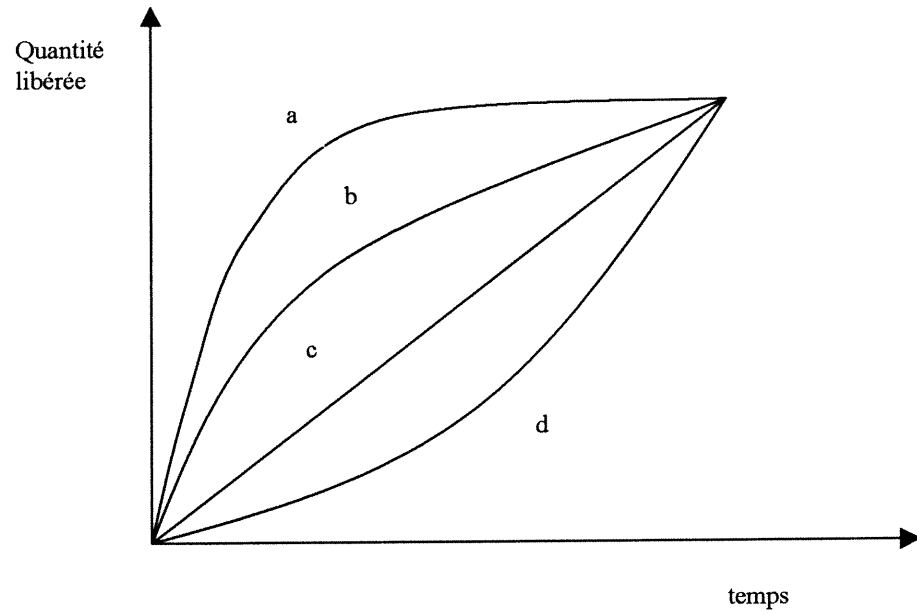


Figure2 : Représentation théorique d'une libération de type Fickien (a), de type anomal (b), de type cas II (c) et de type super cas II (d).

4) CLASSIFICATION DES SYSTÈMES DE LIBÉRATION SELON LE MÉCANISME DE TRANSFERT DE MASSE.

Les systèmes de libération sont classés selon la nature du transport de la molécule médicamenteuse qui s'effectue à partir d'une forme posologique. On retrouve quatre grandes classes (Langer.S et Peppas N.A, 1983).

4.1 Les systèmes contrôlés par diffusion

Les systèmes à diffusion contrôlée sont les plus fréquemment étudiés et utilisés. On distingue deux modes diffusionnels : Le principe actif peut diffuser soit dans la structure du polymère, entre les espaces moléculaires, soit à l'intérieur du réseau poreux rempli par le liquide de dissolution. Il existe deux types de formulation :

- Système réservoir,
- Système matriciel.

4.1.1 Systèmes réservoirs

Dans les systèmes réservoirs, le principe actif est entouré par un film de polymère gonflant ou non gonflant; il peut s'y trouver à l'état solide, en solution ou en suspension concentrée ou encore mélangé à d'autres excipients solides. Ce sont les caractéristiques de la membrane polymérique qui contrôlent la libération.

On distingue trois types de transport de solvant (Vergnaud J.M.1993) :

- Si n est égale à 0.5, la libération suit la loi de Fick. Ce type de transport s'applique aux polymères à l'état caoutchouteux dont les chaînes macromoléculaires sont très flexibles et s'ajustent rapidement à la présence des molécules du solvant. La vitesse de diffusion des molécules de solvant est beaucoup plus faible que la relaxation des chaînes macromoléculaires.

La quantité de substance diffusée (M_t) au temps (t) est exprimée par :

$$M_t = K. t^{0.5} \quad (4)$$

Sa vitesse de diffusion (dérivée de l'équation précédente) est :

$$dM / dt = \frac{1}{2} .K.t^{-0.5} \quad (5)$$

- Si la valeur de n est comprise entre 0.5 et 1, le processus est anomal. Dans ce type de transport, la quantité de substance diffusée est donnée par :

$$M_t = K. t^n \quad (6)$$

Sa vitesse de diffusion est :

$$dM / dt = n. K.t^{n-1} \quad (7)$$

- Lorsque n tend vers 1, la libération s'approche d'une cinétique d'ordre zéro. Dans ce type de transport la relaxation des chaînes

On inclut généralement dans ces systèmes :

- Les comprimés et granules enrobés
- Les macro et microcapsules,
- Les liposomes,
- Les fibres creuses.

L'équation de Fick peut être appliquée pour caractériser la diffusion du principe actif (Krowczynski, 1987(c)).

$$dQ/ dt = D.S.A.(C_1- C_2)/X \quad (10) \quad \text{où :}$$

dQ/dt = quantité de médicament (g) qui diffuse par unité de temps (sec)

D = coefficient de diffusion de la molécule à travers la membrane (cm²/sec)

S = coefficient de partage de la substance entre l'enrobage et la phase aqueuse du tractus gastro-intestinal (TGI)

A = surface de la membrane (cm²)

C_1 = concentration de la solution saturée en principe actif (g/cm³)

C_2 = concentration en principe actif du côté du TGI (g/cm³)

X = épaisseur de la membrane.

La libération de médicament à partir de ces formes est caractérisée par une cinétique d'ordre zéro tant que le compartiment interne est saturé en principe actif. La vitesse de libération est étroitement liée à la solubilité du médicament. La cinétique de diffusion peut être modifiée en changeant l'épaisseur de la barrière ou le coefficient de diffusion du

médicament à travers la membrane. Par exemple, la perméabilité de la membrane peut être modifiée en y ajoutant des polymères de nature plus hydrophobe ou hydrophile.

L'avantage fondamental de ces systèmes réside dans leur capacité à assurer une libération d'ordre zéro, difficile à obtenir avec d'autres dispositifs.

Désavantages des systèmes réservoirs (Doelker, 1985 (a))

- L'éclatement accidentel d'un tel système, peut avoir des conséquences dramatiques en raison de la dose importante de produit contenue dans le réservoir.
- L'ordre zéro est obtenu sur une période de temps limité tant que le compartiment interne demeure saturé en principe actif.
- Le coût de fabrication reste élevé.

4.1.2 Systèmes matriciels

Dans les systèmes matriciels le principe actif est réparti uniformément dans un polymère solide. Celui-ci forme un réseau destiné à piéger le médicament (Salomon et Doelker, 1980). Le solvant d'éluion, pénétrant dans le système, dissout progressivement la substance médicamenteuse

qui va alors diffuser vers l'extérieur soit par le réseau poreux, soit à travers les espaces intermoléculaires.

Le principe actif peut aussi être dispersé ou solubilisé dans une solution de polymère et une matrice peut être obtenue après évaporation du solvant. Le polymère doit s'hydrater ou se dissoudre ou se désintégrer avant que le médicament puisse se dissoudre et diffuser à travers la matrice polymérique.

Dans ces types de systèmes à libération lente, le médicament n'est pas lié chimiquement au polymère. Il demeure donc pleinement actif et peut exercer son activité aussitôt libéré.

En se basant sur la nature du polymère, on peut classer les différents systèmes matriciels comme suit :

- Matrices hydrophiles
- Matrices inertes
- Matrices lipidiques

4.1.2.1 Matrices hydrophiles

Les matrices hydrophiles sont le plus souvent constituées à partir d'un polymère appartenant à l'une de ces trois classes. *Tableau II* (Buri et Doelker, 1980).

Dérivés cellulosiques :

L'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC)
 Carboxyméthylcellulose sodique (CMCNa)
 Hydroxypropylcellulose (HPC)

Dérivés non cellulosiques :

D'origine végétale (les polysaccharides)
 Les gommés végétales
 Les alginates (Na, K)
 Agar-agar
 Amidons modifiés
 D'origine animale (la gélatine et la **chitosane**)

Les autres polymères

Le polyméthacrylate de 2-hydroxyéthyle (PHEMA)
 L'alcool polyvinylique (PVA)
 Le polyéthylène glycol (PEG)
 Polymère de l'acide acrylique (CARBOPOL)

Tableau II : Les polymères hydrophiles

Les polymères hydrophiles polysaccharidiques demeurent très populaires dans la formulation des formes pharmaceutiques pour la libération prolongée de médicaments. Cette popularité est due aux nombreux avantages qu'ils possèdent sur les autres matrices de nature inerte ou lipidique (Melia, 1991).

Avantages des matrices hydrophiles polysaccharidiques

- formulation simple
- possibilité de contenir jusqu'à 80 % p/p de principe actif
- économique et grande disponibilité
- biodégradables
- versatilité (peut être utilisé pour plusieurs types de principes actifs).

Mécanisme de libération :

Au contact du milieu de dissolution, une quantité de médicament est rapidement dissoute et libérée instantanément «burst-effect». L'hydratation des macromolécules composant l'agent gélifiant s'effectue rapidement, générant ainsi une barrière gélifiée qui va progressivement augmenter; en traversant cette barrière le médicament va diffuser vers le milieu de dissolution *figure 3*.

La barrière ainsi formée s'oppose à la libération rapide du médicament et contrôle également la pénétration du solvant de l'extérieur vers l'intérieur du comprimé (Buri et Doelker, 1980).

La vitesse de libération diminue progressivement en fonction de la racine carrée du temps (Lee et Good, 1987).

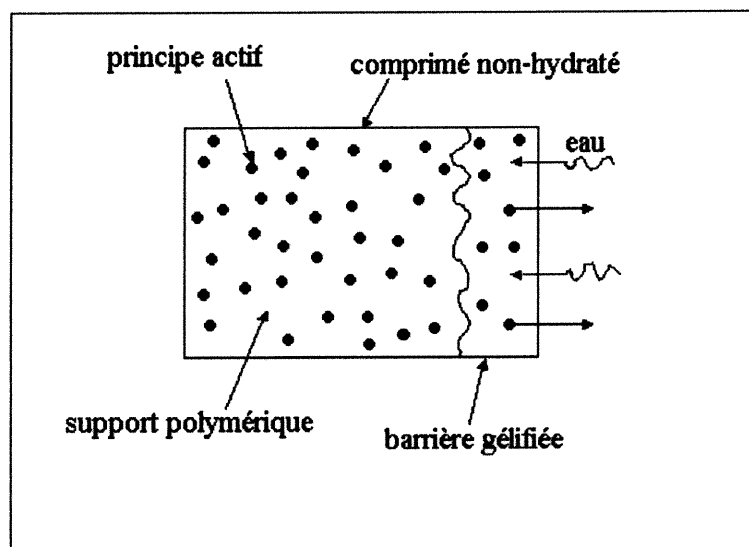


Figure 3: Représentation simplifiée de la libération d'un principe actif dispersé dans une matrice hydrophile

Exemple : Pour une matrice se présentant sous forme d'un disque plat, contenant un médicament dont sa concentration est supérieure à sa solubilité. L'équation de Higuchi peut être appliquée pour analyser la cinétique de libération (Higuchi, 1963).

$$M = [C_s (2A - C_s) D t]^{0.5} \quad (11) \quad \text{où}$$

M : quantité de médicament libérée par unité de surface au temps t (g/cm²)

C_s : solubilité du médicament dans la matrice (g/cm³)

A : concentration du médicament (g/cm³)

t : temps (sec)

D : coefficient de diffusion du médicament (cm²/ sec).

4.1.2.2 Matrices inertes

Les polymères utilisés comme matrices inertes doivent répondre à un nombre de critères parmi lesquels :

- Être totalement inerte du point de vue chimique envers le principe actif.
- Former une structure poreuse.
- Ne pas être toxique.

Les polymères les plus utilisés sont : Le chlorure de polyvinyle, le polyéthylène, l'éthylcellulose, la silicone....

Mécanisme de libération :

Le médicament dispersé dans la matrice se dissout et diffuse à travers des canalicules, suite à la pénétration par capillarité du milieu de dissolution (*figure 4*). La libération du médicament est contrôlée par la structure poreuse d'où la possibilité de moduler la vitesse de libération par le changement du diamètre des pores du réseau (Salomon et Doelker, 1980) ou en modifiant la géométrie du comprimé. (Bechard et Mc Mullen, 1987).

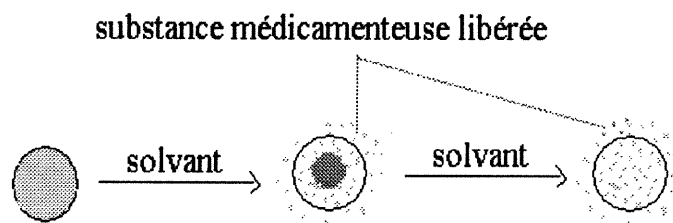


Figure 4: Représentation simplifiée de la libération d'un principe actif dispersé dans une matrice

La quantité libérée est généralement proportionnelle à la racine carrée du temps. Pour caractériser le modèle de libération, on doit tenir compte de la solubilité du principe actif, du coefficient de diffusion, de la porosité et de la tortuosité du système poreux.

- Diffusion du soluté à travers des pores vers le milieu de dissolution (*figure 5*) (Doelker et Buri, 1981).

La libération du principe actif à partir de telles matrices dépend donc de la composition enzymatique des liquides digestifs (Doelker, 1982).

La quantité de médicament libérée est proportionnelle à la quantité d'excipient hydrolysé (Ponomareff-Bauman et al, 1968).

* Les cires (naturelles ou synthétiques) :

Cires d'abeille, cire de Carnauba

* Les acides gras et leurs esters :

Acide stéarique, le stéarate de butyle, monostéarate de saccharose.

* Les alcools gras :

Alcool stéarylique.

* Les huiles hydrogénées :

Huile de ricin hydrogénée.

* Les glycérides (mono, di et surtout triesters) :

* Le palmitostéarate de glycérol (PRECIROL)

Tableau III : Classification des excipients lipophiles

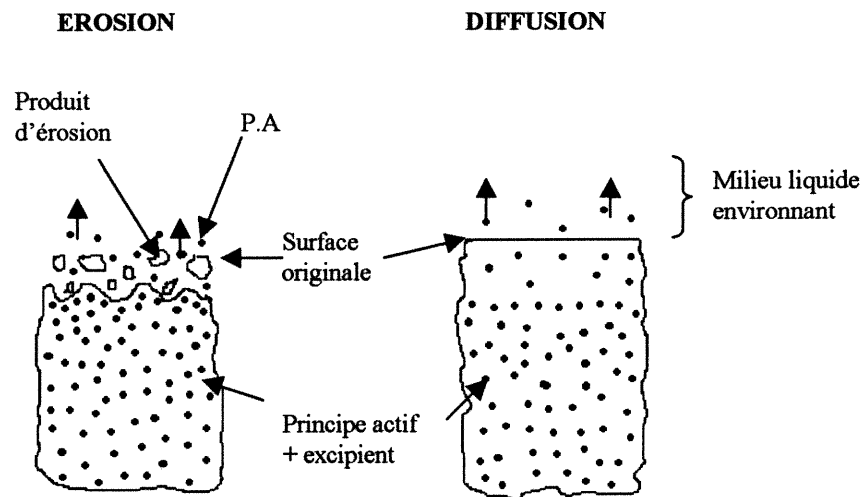


Figure 5 : Représentation schématique du mécanisme de bioérosion

Les avantages des systèmes matriciels :

- La facilité de formulation et de fabrication implique un coût de production raisonnable.
- Absence de tout risque de relargage brusque de la totalité du médicament par suite d'une rupture de l'enrobage.
- Absence d'un temps de latence.
- Ces arguments font des systèmes matriciels le mode de libération contrôlée le plus fréquemment rencontré (Ingani, 1987).

Désavantage :

- Il est souvent illusoire d'espérer une cinétique d'ordre zéro avec ces systèmes, exception faite d'une modification judicieuse de leur géométrie

(Brooke D et Washkuhn R.J, 1977) (Langer et al 1983) (Bechard et al, 1987).

- L'effet « burst » au début de la libération du principe actif.

4.2 Les systèmes à libération contrôlée par le solvant

4.2.1 Systèmes contrôlés par la pression osmotique

La majorité des systèmes osmotiques ont été mis au point par la firme ALZA corporation. Le système le plus simple commercialisé sous le nom OROS[®] (Theeuwes F, 1975) est constitué d'un noyau solide contenant le principe actif mélangé à un agent osmotique (NaCl ou KCl), et d'une membrane polymérique semi-perméable entourant l'ensemble. Cette dernière présente un petit orifice percé au laser destiné au passage du produit dans le milieu extérieur (*figure 6*).

L'eau pénètre donc à travers la membrane par simple appel osmotique. Cet apport de solvant assure la libération d'un volume égal de solution saturée de principe actif à travers l'orifice. La vitesse de libération est contrôlée par les propriétés osmotiques du noyau, la surface de la membrane, son épaisseur et sa perméabilité à l'eau. La libération du principe actif à partir de ce type de système est d'ordre zéro, tant et aussi longtemps que le milieu interne demeure saturé en principe actif.

Exemple : pour une surface plane Higuchi a proposé un modèle mathématique (Higuchi, 1963).

Au temps t la quantité de médicament est exprimée par :

$$M_t = S [D \varepsilon C_s (2C_0 - \varepsilon C_s) t / \tau]^{0.5} \quad (12) \quad \text{où :}$$

S : la surface du disque.

D : coefficient de diffusion du principe actif.

ε : porosité de la matrice.

C_s : la solubilité du principe actif dans l'eau.

τ : tortuosité de la matrice.

C_0 : concentration initiale de principe actif.

L'avantage de ces matrices, c'est que le procédé de fabrication est relativement simple. On peut fabriquer des comprimés par compression directe du mélange de polymère et du principe actif (Carli and Simoni, 1977). D'autre part, la libération à partir de ces matrices est indépendante des conditions extérieures, notamment la composition en suc digestifs.

4.1.2.3 Matrices lipidiques

Les excipients utilisés comme matrices lipidiques sont classés dans le *tableau III*.

La libération de médicaments à partir de ces excipients biodégradables peut se faire selon deux mécanismes :

- Érosion de la matrice par lipolyse enzymatique

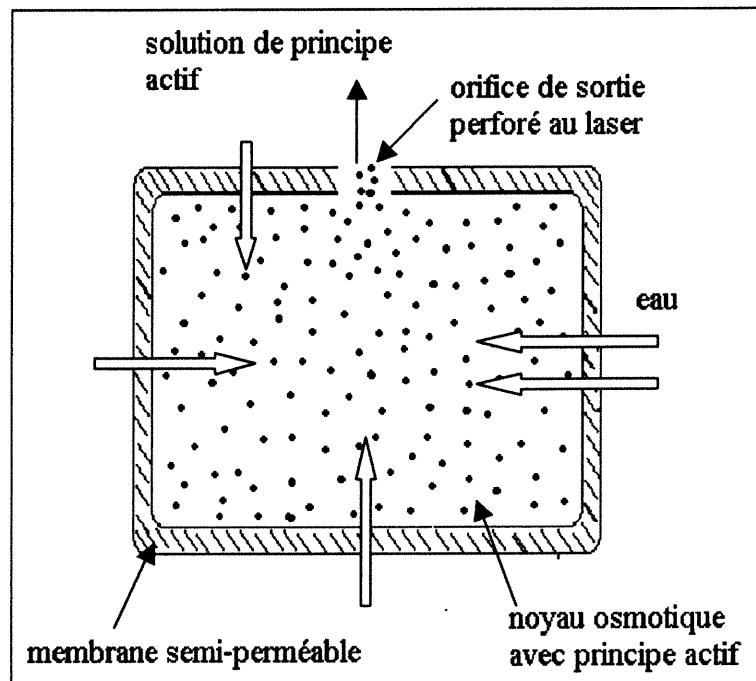


Figure 6 : Pompe osmotique élémentaire orale
Système OROS

4.2.2 Système à gonflement contrôlé

La substance médicamenteuse est dispersée dans un polymère qui s'hydrate très lentement, permettant ainsi un transport contrôlé de l'agent pénétrant (Peppas N.A et Bindshaeldes.C, 1986). Ce gonflement limité est dû à la nature du polymère, en général, et au degré de réticulation, en particulier. Dans la phase initiale, le polymère se trouve sous forme vitreuse. Dans cet état, la diffusion du principe actif est quasiment nulle à cause d'un coefficient de diffusion très faible. La pénétration du solvant dans le système provoque un phénomène de transition de phase à l'interface de gonflement. Le polymère passe à l'état caoutchouteux au

moment où la concentration du solvant atteint une valeur suffisante pour diminuer la température de transition vitreuse sous la température de l'expérience (37°C). Au même moment, le principe actif dissous diffuse à travers la région caoutchouteuse vers le milieu extérieur (*figure7*) (Lee.P, 1986).

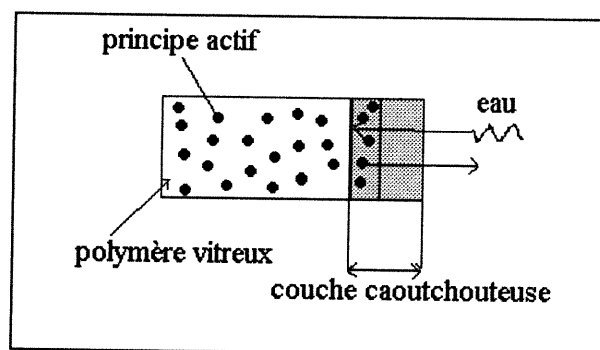


Figure 7 : Représentation simplifiée d'une matrice à gonflement limité

Le processus de libération est contrôlé par l'avancement du front de pénétration. La vitesse et le type de transport dépendent de la température de l'expérience, de la nature du polymère et du degré de réticulation. En effet, durant le gonflement, on observe d'importantes relaxations macromoléculaires dues à la pénétration du solvant, surtout dans la zone séparant les états vitreux et caoutchouteux. Ces relaxations selon leur vitesse et leur amplitude ont un rôle majeur car elles contrôlent le mode de diffusion du principe actif et donc sa libération vers le milieu

extérieur. Dans certaines conditions, cette transition peut assurer une cinétique de libération d'ordre zéro (Krosmeier et Peppas,1983). Le plus difficile consiste à déterminer le système polymérique assurant les conditions optimales de relaxation vis-à-vis d'un principe actif donné.

4.3 Systèmes chimiquement contrôlés

4.3.1 Systèmes biodégradables

Les systèmes biodégradables utilisent le plus souvent une technologie matricielle, mais il existe également des systèmes réservoir biodégradables (microcapsules). Dans le premier cas, les systèmes s'érodent au cours du temps, libérant au fur et à mesure la substance qu'ils renferment (*figure 8*); dans le second cas, l'enveloppe polymérique est dégradée après libération totale du principe actif.

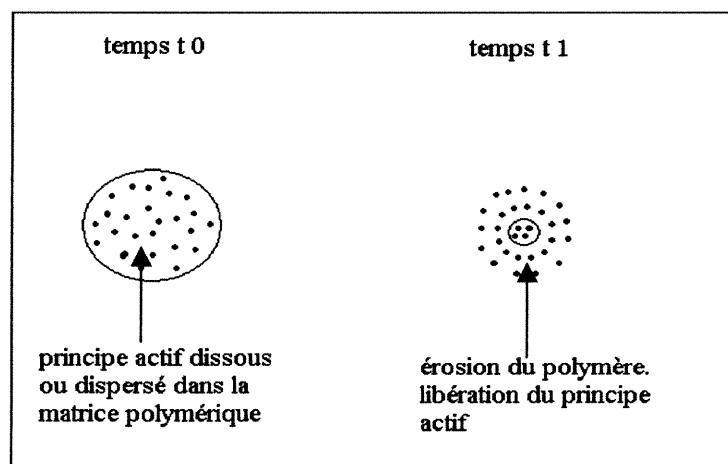
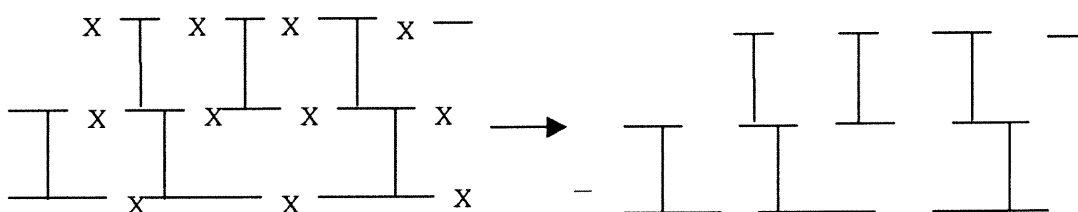


Figure 8: Représentation simplifiée d'une matrice biodégradable

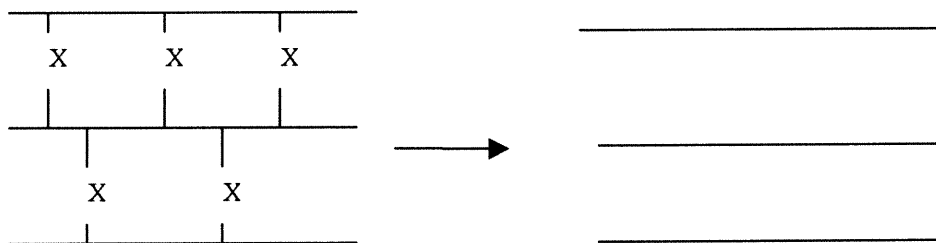
HELLER classe ces systèmes en trois groupes en se basant sur le mécanisme de bioérosion (Heller J, 1984)(Baker R, 1987) :

a) Polymères insolubles, dont la chaîne principale est dégradable.

L'hydrolyse de cette chaîne conduit à la production de molécules de poids moléculaire faible qui sont solubles



b) Érosion par l'hydrolyse des ponts de réticulation du polymère.



c) Polymères insolubles dans l'eau qui se solubilisent suite à l'hydrolyse, l'ionisation ou la protonation d'un groupement latéral.



B → C = hydrolyse, ionisation ou protonation.

Pour la plupart des systèmes érodables, la cinétique de libération résulte de la combinaison de la diffusion du principe actif et de l'érosion du polymère (*figure 9*)(Sinko and Kohn, 1993).

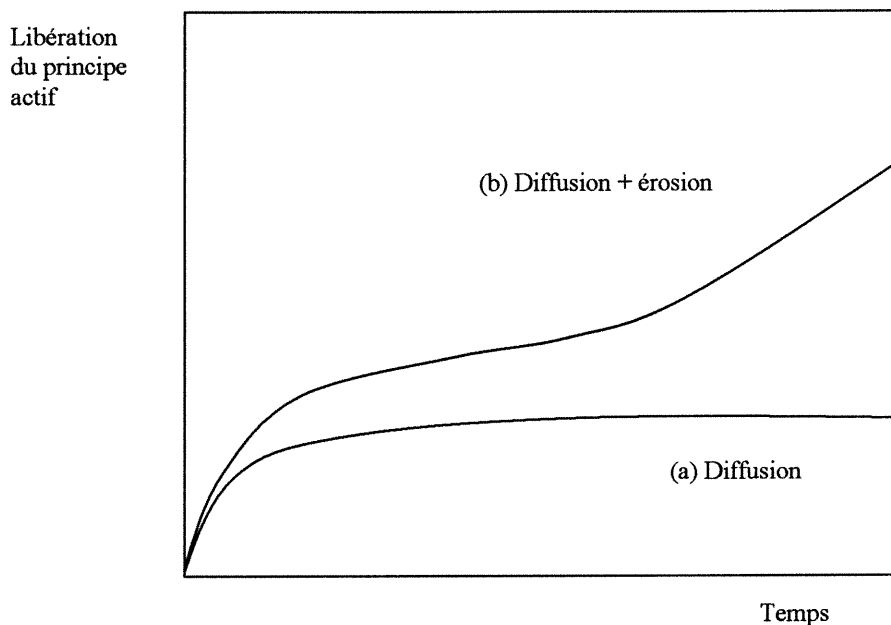


Figure 9 :
Profil théorique de libération d'un principe actif contrôlé par diffusion (a) et par érosion combinée à la diffusion (b).

Selon la nature du polymère, l'érosion peut-être homogène ou hétérogène (Rosen et al, 1988).

- Pour les polymères hydrophiles, c'est le mécanisme d'érosion homogène qui est favorisé : la dégradation est le résultat de l'hydrolyse de toute la masse de l'échantillon polymérique hydraté.

- Les polymères hydrophobes ont plutôt tendance à subir une érosion hétérogène où la dégradation reste un phénomène de surface, le front du solvant ne pénètre pas à l'intérieur.

L'avantage de ce type de formulation est intéressant pour les implants. Étant dégradables, il ne nécessite pas d'intervention chirurgicale pour les retirer. Ceci exige néanmoins que les produits formés lors de la désagrégation du système ne soient ni toxiques, ni immunogéniques, ni carcinogéniques ou mutagéniques.

4.3.2 Systèmes à chaînes greffées

Dans les systèmes à chaîne greffée, le principe actif fixé chimiquement sur un squelette polymérique, est libéré par clivage hydrolytique ou enzymatique. Le squelette lui-même peut être biodégradable ou non. La fixation du principe actif pourra être soit directe, soit réalisée par l'intermédiaire d'un chaînon, pouvant affecter l'hydrophilie du système et aussi la vitesse de libération du principe actif (*figure 10*)

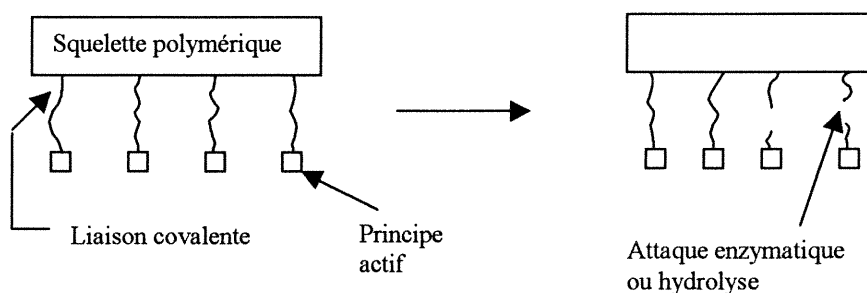


Figure 10 : Schéma de principe d'un système à chaînes greffées

Lorsque le squelette polymérique est dégradable et soluble, on peut envisager l'utilisation de ces dispositifs comme vecteurs de principe actif vers les cellules ou organes cibles. S'ils restent intacts, ils sont intéressants en tant qu'implants pour couvrir une libération sur une très longue période (Peppas et al, 1984).

En effet, leur avantage principal est l'importante proportion de substance médicamenteuse que l'on peut y incorporer (jusqu'à 80 %). On peut donc envisager une action thérapeutique à très long terme.

Enfin en variant les groupes de liaisons, voire les méthodes de fixation des principes actifs sur le polymère, des conditions et des cinétiques de libération très différentes peuvent être obtenues.

4.4 Systèmes activés par ondes magnétiques

Le principe actif et des petites billes magnétiques sont dispersés uniformément dans la matrice polymérique. Placé dans un milieu aqueux, le principe actif est libéré selon un mécanisme diffusionnel classique déjà évoqué pour les matrices. Exposé à un champ magnétique extérieur oscillant, le principe actif est alors libéré beaucoup plus rapidement .

Ce phénomène peut-être expliqué par une éventuelle augmentation du diamètre des canalicules poreux due à l'attraction et répulsion alternatives des billes les unes vers les autres. Cette agitation subie par le

Le système permettrait une meilleure évacuation du principe actif dans le milieu de dissolution. C'est donc un des rares cas où l'on peut volontairement augmenter la vitesse de libération.

Une des applications est le traitement du diabète. La libération d'insuline, assurée par diffusion simple en période de repos, pourra être augmentée par le patient lors d'un besoin accru, notamment au moment des repas.

5) LA CHITOSANE, MATRICE HYDROPHILE POUR LES SYSTÈMES A LIBÉRATION CONTRÔLÉE

5.1 Généralités

La chitosane ou (1→4) 2-amino-2-déoxy-β-D-glucan a été découverte pour la première fois par Rouget en 1859 (Muzzarelli, 1977), lorsqu'il chauffa la chitine dans une solution concentrée d'hydroxyde de potassium, cependant la recherche fondamentale sur la chitosane n'a débuté qu'un siècle après cette découverte. Depuis, de nombreux articles sont apparus à travers le monde concernant l'utilisation de la chitosane.

La chitosane est un polysaccharide cationique naturel obtenu par déacétylation de la chitine (Li Q, and al, 1992). On extrait la chitine des résidus de carapace des crustacés (crabes, crevettes, homards...) (Goswami T et Mahfoud A, 1992). La chitine est le polymère naturel le plus abondant après la cellulose (Park K and Shalaby S W, 1993) (Claesson and Ninham, 1992), elle est non toxique, biodégradable et biocompatible. Il existe d'autres polysaccharides commercialement disponibles, comme par exemple l'amidon, la pectine, l'agar-agar, la cellulose, etc. , qui sont neutres ou acides, tandis que la chitine et son dérivé la chitosane sont les seuls polysaccharides ayant des propriétés basiques, ce qui leur attribue des propriétés chimiques uniques (Muzzarelli and al 1986), (Zikakis J.P, 1984).

La chitine est insoluble dans l'eau et presque dans tous les solvants organiques. On l'utilise en général sous forme de chitosane pour sa solubilité dans les solutions aqueuses des acides organiques. La chitosane est aussi une polyamine aliphatique primaire qui peut subir toutes les réactions typiques des amines; la valeur de son pK_a intrinsèque est voisine de 6,5. La chitosane donne des viscosités élevées à une faible concentration et génère facilement des liaisons hydrogènes (Domard A, 1991) (Hayes E, Rands D, 1978) (Muzzarelli et al 1986).

5.2 Procédé d'extraction de la chitosane à partir de la chitine

La chitine représente 25 % de la composition globale de la carapace sèche des crustacés. Le reste étant le calcium 50 % et les protéines 25 %. Le procédé de séparation de la chitine à partir des carapaces de crustacés se fait en deux étapes. La première étape consiste à éliminer les protéines à l'aide d'une solution diluée d'hydroxyde de sodium (NaOH). La deuxième étape, est la séparation des carbonates de calcium à l'aide d'une solution diluée d'acide chlorhydrique (HCL). Lors de la séparation des carbonates de calcium, la concentration de la solution acide, le temps de réaction ainsi que la température affectent l'hydrolyse des chaînes polymériques, d'où les différents poids moléculaires de la chitine. Après un tel traitement, la chitine est légèrement déacétylée, mais le taux

d'acétylation reste néanmoins supérieur à 90 % (figure 11). La chitosane est produite à partir de la chitine par un procédé de déacétylation utilisant une solution concentrée d'hydroxyde de sodium à haute température (100 - 150° C) (figure 12)

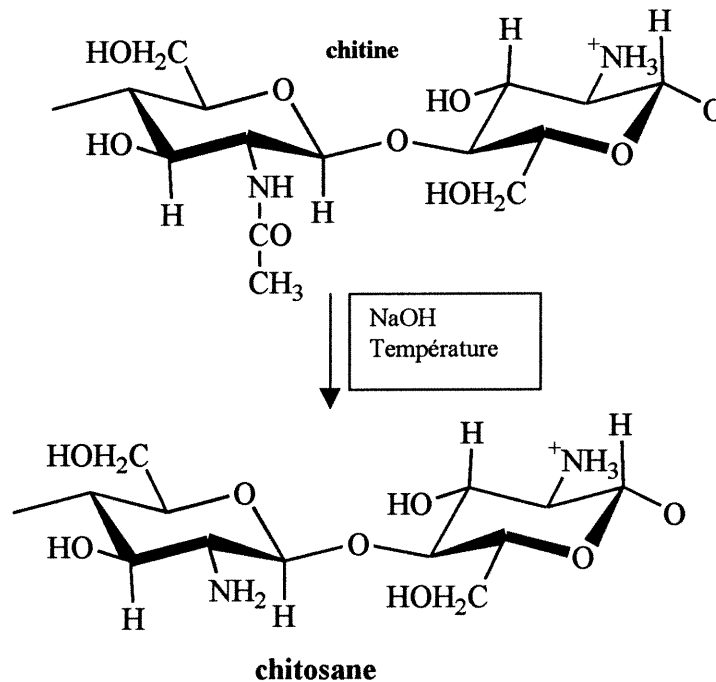


Figure 12 : Réaction de déacétylation de la chitine

Au cours de cette étape, le degré de déacétylation peut-être contrôlé par la concentration de la solution d'hydroxyde de sodium, le temps de la réaction et la température. (Johnson E, Lee Q, 1982) (Muzzarelli and al, 1986) (Zikakis J P, 1984).

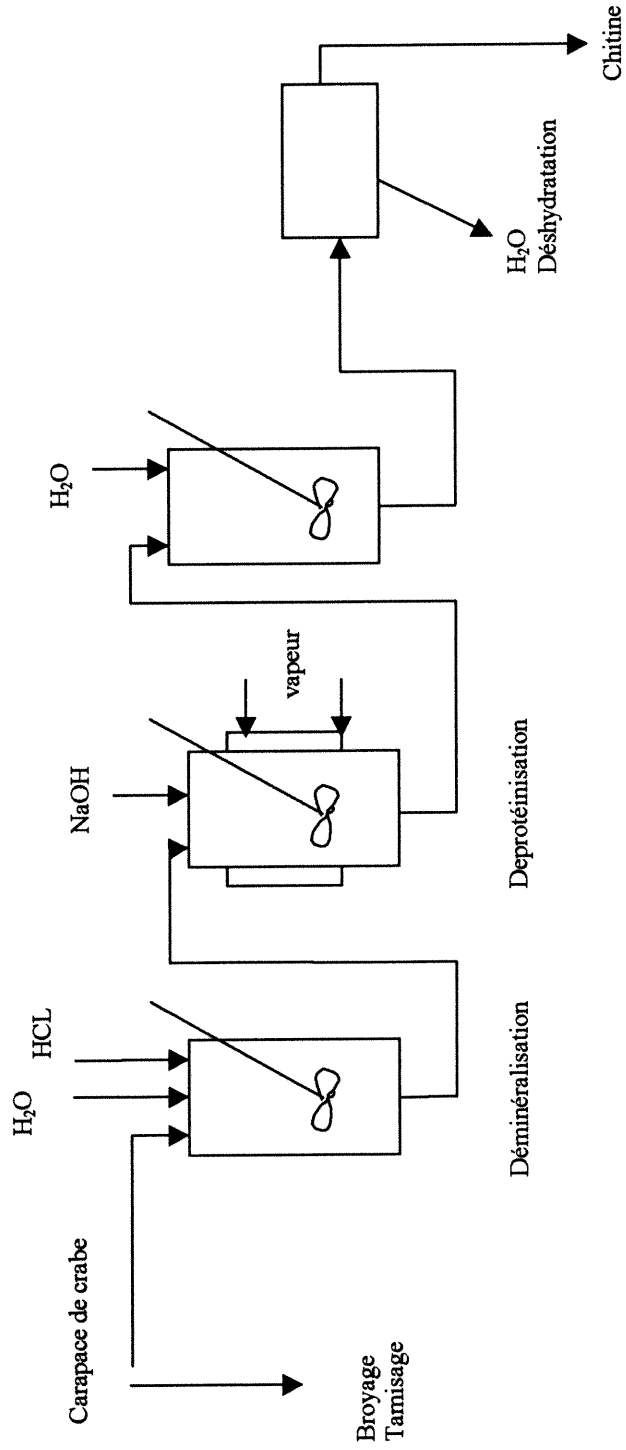


Figure 11 : Processus général d'extraction de la chitine

5.3 Utilisation de la chitosane

La chitosane possède des propriétés attrayantes pour diverses applications :

**Traitements des eaux usées*

Comme flocculant pour les particules colloïdales en suspension.

**Agriculture*

Effet nématocide par la stimulation de la croissance des micro-organismes producteurs d'enzymes qui détruisent les œufs des nématodes.

**Industrie du papier*

Permet d'augmenter la résistance du papier à l'humidité.

**Cosmétique*

Dans les crèmes complexes où elle est associée à des extraits d'algues. Elle agit comme agent humidifiant, revitalisant et raffermissant.

**Biomédicale*

Agent hémostatique : réagit avec les hématies pour engendrer la coagulation.

**Recherche pharmaceutique*

Utilisée comme excipient dans la formulation des systèmes à libération contrôlée des médicaments.

SECTION B

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Rappel de l'objectif du travail :

Le premier objectif est de synthétiser trois dérivés de chitosane, en greffant sur la chaîne principale (polyglucosamine) des petites molécules aliphatiques, différentes par le nombre de carbone. Ensuite, ces dérivés sont caractérisés par leur pouvoir à former un gel en milieu aqueux.

Le deuxième objectif consiste à utiliser ces dérivés de chitosane comme excipient pour la formulation des comprimés à libération prolongée suivi d'une étude de la cinétique de libération de médicament.

1) MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1 Réactifs utilisés

Tous les produits utilisés dans cette partie expérimentale ont un grade réactif et sont consignés dans le *tableau IV*.

NOM	LOT :	FOURNISSEUR
Chitosane 70000 da (15% acétylée)	334707/ 1 794	Fluka biochemika
Acide acétique glacial	594123	Anachemia
Anhydride acétique	M490413	Sigma
Anhydride butyrique	17H3474	Sigma
Anhydride caproïque	10H3424	Fisher scientific comp.
Salicylate de sodium	737013	Rhone-Poulenc
Spiramycine	CA 82 344 00	Sigma
Sulfate de sodium	51H05942	Anachemia
Anhydride de phosphore	490715	Anachemia
Méthanol	C2141	Université de Montréal
Ethanol anhydre	1170	Anachemia
Éther	890629-Y8	Anachemia

Tableau IV : Produits utilisés pour la synthèse des dérivés de chitosane

1.2 Équipements utilisés

- Évaporateur rotatif BUCHI 461
- Agitateur mécanique à hélice de marque CAFRANO
- Spectrophotomètre infrarouge à transformé de Fourier, marque NICOLET
- Spectrophotomètre à résonance magnétique nucléaire (RMN), marque BRUKER AMX-300.
- Appareil de dissolution USP (Distek Dissolution System 2100A) avec spectrophotomètre de marque HEWLETT PACKARD (modèle 8452 A)
- Presse hydraulique C-30 de marque SPECAC.
- Broyeur à marteau A10 TEKMAR
- Tamis 80 mesh ou de 180 μm série numéro 111050
- Étuve thermostatée de marque THELCO 10
- Centrifugeuse de marque BHG.HERMELE ZK 380

1.3 Purification de la chitosane

La chitosane a été purifiée par la méthode de John DOCZI brevetée en 1957 (Doczi J, 1957).

Une quantité de 16 grammes de chitosane est solubilisée avec 88 ml d'acide acétique 1N. La solution visqueuse obtenue est diluée avec 500 ml d'eau, chauffée à 50°C pendant 20 minutes et filtrée afin d'éliminer toutes les particules solides insolubles. On ajoute au filtrat 560 ml d'une solution aqueuse de salicylate de sodium à 10% et le mélange est placé à 4°C sous agitation mécanique pendant douze heures. Le culot est récupéré par centrifugation puis alcalinisé entre pH 8 et 9 avec du triéthylamine. Le précipité de chitosane est lavé deux fois avec 300 ml de méthanol puis avec 300 ml d'éther et séché à 70°C sous vide.

Le rendement massique de cette opération est d'environ 75%.

1.4 Caractérisation de la chitosane

1.4.1 Le poids moléculaire :

Le poids moléculaire peut être déterminé par viscosimétrie en utilisant un viscosimètre de type Cannon-Fenske. La procédure est décrite par les normes ASTM standard D445-72 (annual book of ASTM). Cette méthode est basée sur l'équation de Mark-Houwink :

$$[\eta] = K M^a \quad \text{où}$$

- **K** et **a** sont des constantes du polymère qui dépendent de la température et des solvants utilisés.
- $[\eta]$ = la viscosité intrinsèque.
- **M** = la masse moléculaire.

Principe de la méthode (Prud'homme, 1981)

Si l'on désigne par η la viscosité de la solution et par η_0 celle du solvant pur. La viscosité relative = $\eta/\eta_0 = \eta_r$

La viscosité spécifique $\eta_{sp} = \eta - \eta_0 / \eta_0 = \eta_r - 1$.

Pour les solutions infiniment diluées, la viscosité spécifique est directement proportionnelle à la concentration et l'on peut écrire :

La viscosité intrinsèque = $[\eta] = (\eta_{sp} / c)_{c \rightarrow 0}$.

Dans la pratique, on obtient $[\eta]$ par l'extrapolation de (η_{sp} / c) à concentration nulle.

1.4.2 Degré d'acétylation :

Pendant le traitement alcalin, la déacétylation de la chitine conduit à sa transformation en chitosane, cependant, elle n'est jamais complète.

Il existe plusieurs méthodes pour déterminer le degré d'acétylation ou de substitution :

Méthode par titration : (Rutherford F A, Austin P R, 1978)

Cette méthode est basée sur l'hydrolyse complète de la chitosane. L'acide acétique résultant de cette hydrolyse est dosé par titration à l'aide d'une solution de NaOH, en utilisant la phénolphthaléine comme indicateur.

Le degré d'acétylation est calculé par la relation suivante :

$$\% \text{ d'acétyl} = V.43.100 / M \quad (12) \quad \text{où}$$

V = volume de NaOH en ml

M = masse de la chitosane en grammes

43= la masse moléculaire du groupement acétyl (CH₃-CO).

Méthode par analyse infrarouge

Une quantité de 20 mg de chitosane ou de ses dérivés est mélangée avec 150 mg de KBr sec. Le mélange est comprimé à l'aide d'une presse hydraulique. La pastille transparente obtenue est analysée au spectrophotomètre infrarouge.

La bande d'absorption à 1560 cm⁻¹ correspond au groupement amine de l'unité glucosamine. En établissant une droite d'étalonnage à l'aide d'un standard connu, on peut estimer le degré de substitution en fonction de l'intensité du pic d'absorption (Domszy J, Roberts G, 1985) (Muzzarelli et al, 1980)

Méthode par résonance magnétique nucléaire :RMN(Varum 1991)

La chitosane ou ses dérivés sont dissous dans l'oxyde de deutérium (D₂O) acidifié avec du HCL concentré. Les échantillons sont analysés par un appareil Bruker AMX à 300 MHz à 25°C.

Le principe est basé sur le rapport des intensités des signaux des groupements méthyles de la chaîne à substituer et méthylène de l'unité glucosamine.

Premièrement le dérivé de chitosane 100% substitué est préparé en faisant réagir un excès d'anhydride approprié. Ensuite le rapport suivant est déterminé:

$$R_1 = \text{intensité du pic CH}_3 / \text{intensité du pic CH}_2$$

Le rapport R₂ pour les échantillons est déterminé de la même façon et finalement le degré de substitution (ds) se calcule par :

$$d.s = (R_2 / R_1) 100$$

(Les spectres infra-rouge et RMN des trois dérivés sont représentés en annexe à titre indicatif).

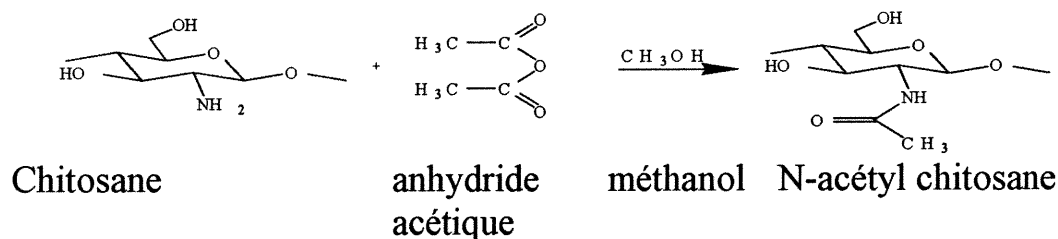
2) SYNTHÈSE DES DÉRIVÉS DE LA CHITOSANE

2.1 Principe de la réaction de synthèse

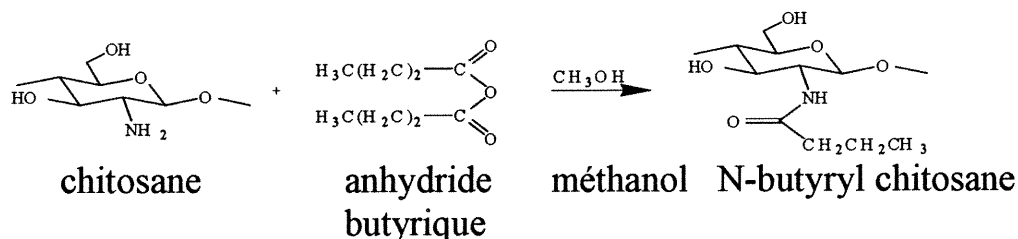
La fixation de chaînes aliphatiques sur le groupement glucosamine de la chitosane permet de rompre les liaisons hydrogènes et la réduction des interactions entre les chaînes macromoléculaires du polymère, créant ainsi, un espace diffusionnel à travers le polymère. D'après la structure chimique de la chitosane, il y a deux possibilités pour fixer une molécule sur celle-ci : soit du côté de l'amine, soit du côté de l'alcool. Il est plus facile de faire une N-acylation que de faire une o-acylation à cause de la plus grande réactivité de l'azote.

Pour préparer les dérivés de chitosane, on a utilisé trois anhydrides : l'acétique, le butyrique et le caproïque.

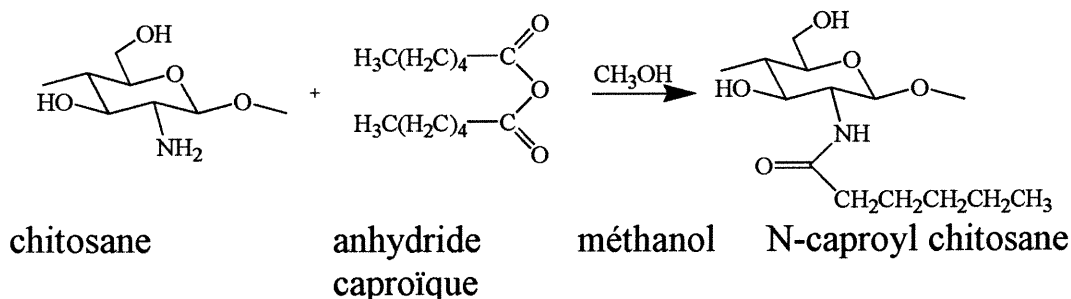
2.1.1 N-acétyl chitosane



2.1.2 N-butyryl chitosane



2.1.3 N-caproyl chitosane



2.2 Calcul du pourcentage de substitution

La chitosane est un polymère constituée d'une succession de monomères ou d'unités identiques dont le poids est de 161 daltons; ainsi une mole de polymère contient 435 unités(70000/161). Or la chitosane utilisée est à 15% acétylée, soit 85% des unités sont libres. Pour préparer les dérivés de chitosane, 5 grammes de polymère (soit l'équivalent de 0.026 monomères de libres) ont été utilisés.

Selon le principe de la réaction chimique ci-dessus, une unité de polymère agit avec une mole d'anhydride. Donc 0.026 unités agiront avec 26 millimoles d'anhydride.

Sachant que la densité = masse / volume et connaissant les poids moléculaires de chaque anhydride. Le volume d'anhydride à rajouter à 5 grammes de chitosane est ainsi calculé pour obtenir le degré de substitution voulu, *tableau V*.

% de Substitution	Nombre de millimoles d'anhydride nécessaire	Volume d'anhydride nécessaire		
		Anhydride-acétique	Anhydride-butyrique	Anhydride-caproïque
20	5.2	0.5ml	0.85ml	1.2ml
50	13	1.23ml	2.2ml	3ml
80	20.8	2ml	3.4ml	4.8ml
100	>26	>2.5ml	>4.3ml	>6ml

Tableau V : Quantité d'anhydride en fonction du degré de substitution

2.3 Mode opératoire

Préparation des dérivés de la chitosane selon la technique de HIRANO

(Hirano S et al, 1976).

Un poids de 5 grammes de chitosane purifiée est solubilisé dans 100 ml d'une solution aqueuse d'acide acétique à 10% et maintenue sous agitation à l'aide d'un agitateur à hélice pendant 3 heures à température ambiante.

Un volume de 300ml de méthanol est ajouté pendant l'agitation à la solution de chitosane. Après 15 minutes une quantité d'anhydride approprié est ajoutée selon le degré de substitution voulu. Le mélange est agité toute la nuit à température ambiante.

Pour évaporer le solvant, le mélange est mis dans un rotavapeur sous vide, à une température de 45°C et à 90 tours minute. Le précipité est récupéré et lavé deux fois avec 300 ml d'éthanol anhydre et deux fois avec 300 ml d'éther, puis séché sous vide à 60°C en présence de P₂O₅

pour éliminer toute trace d'humidité (figure 13). Le rendement massique de cette opération est d'environ 35 %.

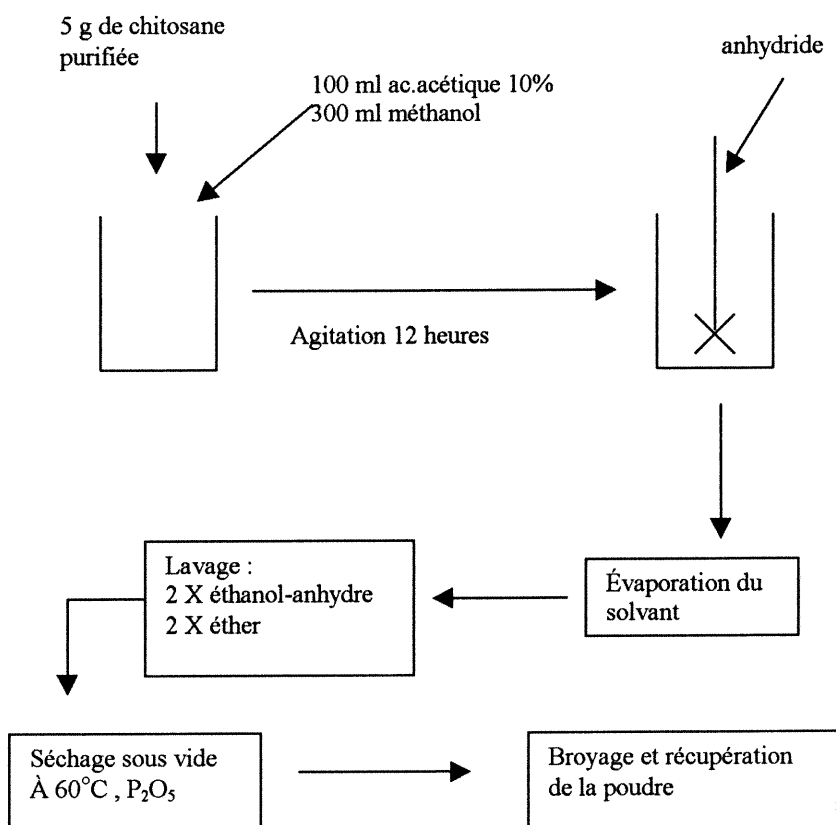


Figure 13 : Protocole de préparation des dérivés de chitosane

2.4 Préparation de la poudre et des comprimés

La chitosane ou ses dérivés sont broyés à l'aide d'un broyeur à marteau et tamisés avec un tamis de 80 mesh. La fraction des particules dont le diamètre est inférieur à 180 μm est retenue.

Les comprimés sont obtenus par la compression directe de la poudre à une pression de 10 tonnes à l'aide d'une presse hydraulique équipée de poinçon plat de 12,9 mm de diamètre.

3) ÉTUDE DE LA CINÉTIQUE DE GONFLEMENT DES COMPRIMÉS DE DÉRIVÉS DE CHITOSANE

3.1 Principe

Un comprimé de 200 mg de dérivé de chitosane est placé dans une solution tampon phosphate pH 7.4 thermostatée à 37°C. A intervalle de temps de 60 minutes, sur une période de 24 heures, le comprimé est retiré du bécher. Le diamètre est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse et une photo est prise pour une analyse d'image. L'indice de gonflement γ de l'hydrogel est déterminé selon la relation suivante (Hosaka et al, 1979):

$$\gamma = \frac{(\text{diamètre du comprimé hydraté} - \text{diamètre du comprimé sec}) 100}{\text{diamètre du comprimé sec}}$$

3.2 Analyse d'image des comprimés : (figure 14)

Le comprimé est déposé sur une plaque en verre, en dessous de laquelle se trouve une lampe de 75 watts. Une caméra est placée à une distance fixe au-dessus du comprimé. Un moniteur est relié à la caméra permet de visualiser l'image. Après la mise au point, l'image est digitalisée par ordinateur. Le procédé de traitement consiste à quantifier l'image du comprimé en nombre de pixels à l'aide du logiciel ImageGraber (Moussa I, Cartilier L, 1996).

Le pixel est une valeur numérique attribuée à un point donné de l'image pour traduire le niveau de gris (grey level) ou l'intensité lumineuse qui traverse ce point précis du comprimé. Sa valeur est comprise entre 0 et 255. Le niveau de gris est fonction de l'hydratation du comprimé. Il est égal à zéro lorsque le comprimé est à l'état sec.

Un autre logiciel Ultimage™ permet de tracer une courbe de diffusion du solvant dans le comprimé qui traduit l'état de gonflement de la matrice (ou la formation du gel).

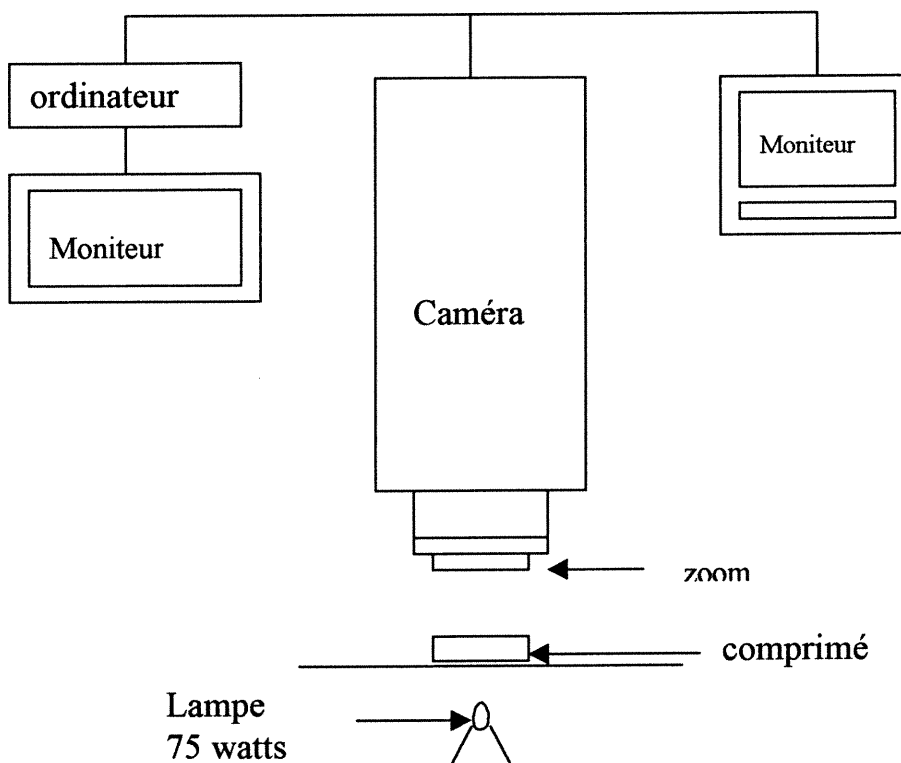


Figure 14 : Dispositif pour l'analyse d'image

3.3 Résultats et discussion de la cinétique de gonflement

3.3.1 N-acétyl chitosane

La chitosane est substituée avec de petites chaînes de deux carbones et l'étude de l'absorption de l'eau par les comprimés de N-acétyl chitosane a été menée dans le tampon phosphate pH 7,4 à 37°C avec des degrés de substitution de 20%, 50%, 80% et 100%. L'indice de gonflement a été calculé sur une période de 24 heures. Les résultats sont présentés dans le *tableau VI* et dans la *figure 15*.

Pour les quatre degrés de substitution, l'indice de gonflement (γ) est nul à $t = 0$. Au fur et à mesure que le solvant diffuse dans le comprimé, le diamètre et l'indice de gonflement augmentent pour atteindre après 24 heures une valeur maximale de 76, 102, 109 et 125 correspondant respectivement aux degrés de substitution de 20%, 50%, 80% et 100%.

Ces résultats montrent que le gonflement du comprimé de N-acétyl chitosane dépend du degré de substitution.

3.3.2 N-butyryl chitosane

Ici, le dérivé de chitosane est substitué avec une chaîne de quatre carbones et l'étude de la cinétique de gonflement a été menée dans les mêmes conditions que précédemment. Les résultats sont présentés dans le *tableau VII* et sous forme de graphique (*figure 16*). On remarque que

l'indice de gonflement à la fin de l'expérience est égal à 101, 129, 148 et 200 pour des degrés de substitution de 20%, 50%, 80% et 100% respectivement. Là aussi, l'évolution de l'indice de gonflement est proportionnelle au degré de substitution. Sauf que, le gonflement est plus important par rapport au N-acétyl chitosane.

3.3.3 N-caproyl chitosane

La chaîne aliphatique de ce dérivé est constituée de six carbones et le test de gonflement a été fait dans les mêmes conditions que les précédents. Les résultats sont regroupés dans le *tableau VIII* et présentés sous forme de graphique (*figure 17*). On constate que l'indice de gonflement maximal est égal à 105, 82, 60 et 0 pour des degrés de substitution de 20%, 50%, 80% et 100% respectivement. Contrairement aux deux autres dérivés, le gonflement du N-caproyl chitosane diminue au fur et à mesure qu'on augmente le degré de substitution.

a) 20 % de substitution			b) 50 % de substitution		
Temps (h)	Diamètre (mm)	Indice de gonflement %	Temps (h)	Diamètre (mm)	Indice de gonflement %
0	12.9	0	0	12.9	0
1	18.6	44	1	17	31
2	20.1	56	2	19.1	48
3	22	70	3	19.6	52
4	22	70	4	22	70
5	22.3	72	5	23.2	80
20	22.7	75	20	26.1	102
24	22.8	76	24	26	101

c) 80 % de substitution			d) 100 % de substitution		
Temps (h)	Diamètre (mm)	Indice de gonflement %	Temps (h)	Diamètre (mm)	Indice de gonflement %
0	12.9	0	0	12.9	0
1	18.4	42	1	18.8	45
2	20.3	57	2	20.5	59
3	21.9	70	3	22.9	77
4	23.3	80	4	23.3	80
5	24	86	5	25	93
20	26.4	104	20	29	124
24	27	109	24	29.1	125

Tableau VI :

Test de gonflement du comprimé de **N-acétyl chitosane** dans le tampon phosphate pH 7.4 à 37°C

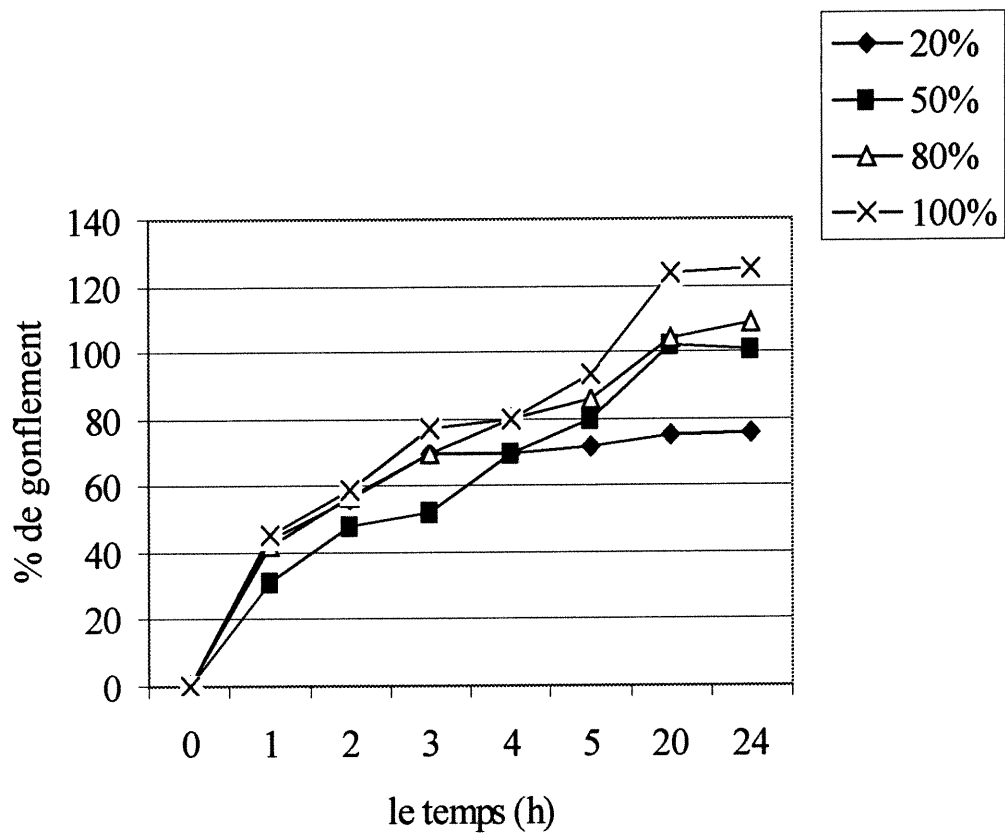


Figure 15 : Cinétique de gonflement du N-acétyl chitosane à différents degrés de substitution

a) 20 % de substitution			b) 50 % de substitution		
Temps (h)	Diamètre (mm)	Indice de gonflement %	Temps (h)	Diamètre (mm)	Indice de gonflement %
0	12.9	0	0	12.9	0
1	19.6	51	1	20	55
2	22.4	73	2	22.9	77
3	25	93	3	24.4	89
4	25.5	97	4	25	93
5	26	101	5	26.3	103
20	26	101	20	29.6	129
24	26	101	24	29.5	128

c) 80 % de substitution			d) 100 % de substitution		
Temps (h)	Diamètre (mm)	Indice de gonflement %	Temps (h)	Diamètre (mm)	Indice de gonflement %
0	12.9	0	0	12.9	0
1	21	62	1	21.5	66
2	24.5	89	2	25	93
3	27	109	3	27	109
4	28	117	4	28.5	120
5	29.6	129	5	30	132
20	32	148	20	33	156
24	32	148	24	33.5	200

Tableau VII :

Test de gonflement du comprimé de **N-butryl chitosane** dans le tampon phosphate pH 7.4 à 37°C

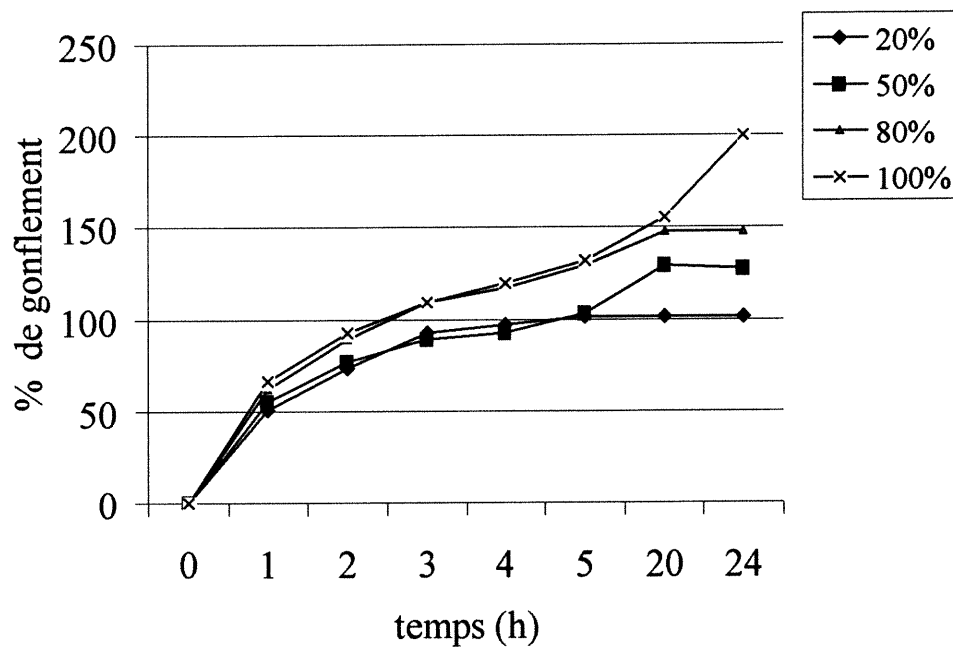


Figure 16 : Cinétique de gonflement du N-butyl chitosane à différents degrés de substitution

a) 20 % de substitution			b) 50 % de substitution		
Temps (h)	Diamètre (mm)	Indice de gonflement %	Temps (h)	Diamètre (mm)	Indice de gonflement %
0	12.9	0	0	12.9	0
1	20.9	62	1	17.1	33
2	23.4	81	2	19.2	49
3	25.6	98	3	21.6	67
4	26	101	4	22.3	72
5	26.2	103	5	23	78
20	26.5	105	20	23.5	82
24	26.5	105	24	23.5	82

c) 80 % de substitution			d) 100 % de substitution		
Temps (h)	Diamètre (mm)	Indice de gonflement %	Temps (h)	Diamètre (mm)	Indice de gonflement %
0	12.9	0	0	12.9	-
1	18	40	1	0	-
2	19.1	48	2	0	-
3	19.3	50	3	0	-
4	20.5	59	4	0	-
5	20.6	60	5	0	-
20	20.6	60	20	0	-
24	20.6	60	24	0	-

Tableau VIII:

Test de gonflement du comprimé de **N-caproyl chitosane** dans le tampon phosphate pH 7.4 à 37°C.

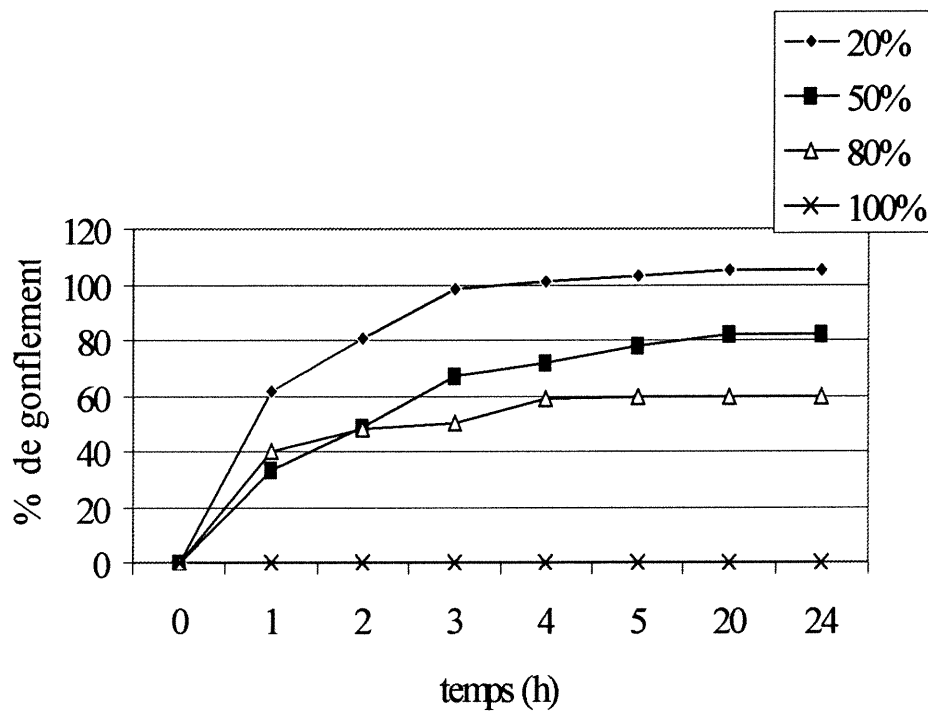


Figure17 : Cinétique de gonflement du N-caproyl chitosane à différents degrés de substitution

Discussion

La chitosane **pure** (c'est à dire degré de substitution égal à zéro) ne gonfle pas dans la solution tampon (pH 7.4) *tableau IX*. Après dix minutes d'incubation, les comprimés s'ouvrent en deux parties. Ceci est dû aux chaînes polymériques qui sont fortement liées entre elles par des liaisons de type hydrogène et Van der wals.

Lorsque la chitosane est substituée avec de l'anhydride acétique (2 carbones) ou avec de l'anhydride butyrique (4 carbones), un phénomène de gonflement est observé. En effet, les résultats montrent que plus on augmente le degré de substitution pour ces dérivés, plus le degré de gonflement augmente. Par ailleurs, le gonflement est plus significatif dans le cas du dérivé butyrique.

Par contre, pour le dérivé caproïque (6 carbones) un phénomène inverse est observé, à savoir plus on augmente le degré de substitution plus le gonflement du comprimé diminue, ceci sans érosion du comprimé. Pour une substitution de 100% le comprimé se désintègre instantanément en petits granules, visiblement non gonflables.

Le *tableau IX* et la *figure 18* montrent l'évolution de l'indice de gonflement maximal pour chaque dérivé.

% de substitution	Indice de gonflement maximal du dérivé		
	acétique	butyrique	caproïque
0	0	0	0
20	76	101	105
50	102	128	82
80	109	148	60
100	125	200	0

Tableau IX: Indice de gonflement maximal en fonction du degré de substitution

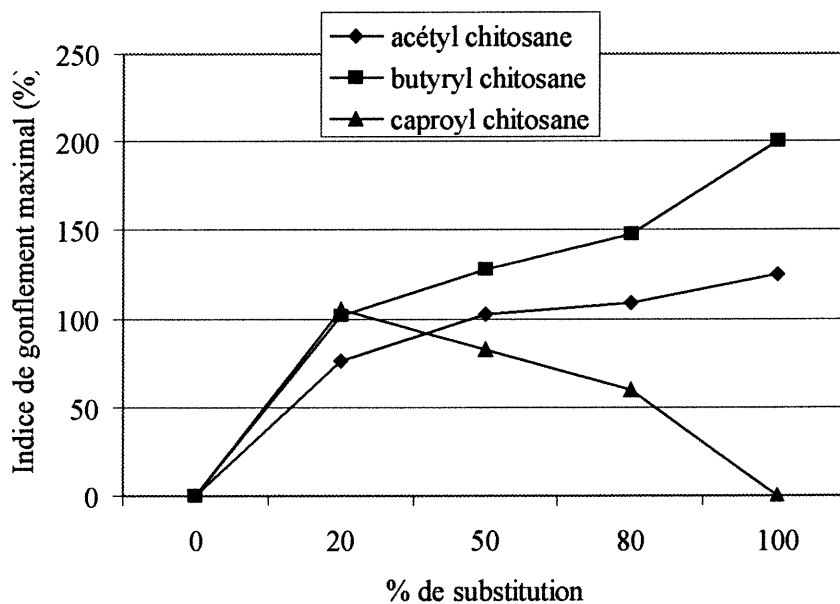


Figure18: Évolution de l'indice de gonflement maximal des trois dérivés de chitosane à différents degrés de substitution

Il semble que la fixation de chaînes carbonées sur l'azote de l'unité glucosamine a pour conséquence une diminution des interactions entre les chaînes macromoléculaires, permettant ainsi la diffusion du solvant dans le polymère. En effet, lorsque la chitosane est substituée par des groupements acétiques ou butyriques, les chaînes polymériques sont éloignées les unes des autres entraînant une rupture des liaisons hydrogènes et une augmentation de l'espace de diffusion du solvant, d'où le gonflement (*figure 19*).

En revanche, dans le cas du dérivé caproïque, on observe un gonflement optimal autour de 20 % de substitution, puis il diminue au fur et à mesure que la substitution augmente. Il semble que le rapport hydrophilie et hydrophobie de ce dérivé de chitosane dépend du degré de substitution. L'explication probable est que les chaînes d'anhydride caproïque fixées sur les macromolécules de chitosane interagissent entre elles et réduisent les interactions entre les chaînes du polymère. En conséquence, l'aire de diffusion du solvant se trouve réduite ou quasiment nulle.

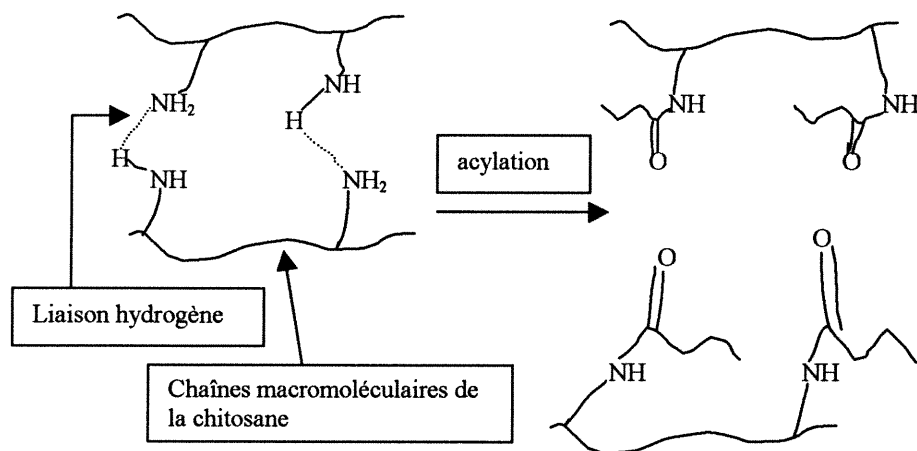


Figure 19 : Liaisons hydrogènes, avant et après acylation de la chitosane (schéma de principe)

3.4 Analyse d'image

L'analyse d'image est basée sur la mesure de l'intensité de la lumière qui traverse le comprimé. Cette mesure est exprimée en niveau de gris (grey level) ou pixel.

Dans le cas des dérivés acétique et butyrique, le niveau de gris augmente parallèlement avec le gonflement du comprimé pour atteindre des valeurs de pixel proche de 255, ceci pour tous les degrés de substitution.

En revanche, dans le cas du dérivé caproïque et pour des substitutions supérieures à 50 % l'intensité lumineuse qui traverse le comprimé est faible.

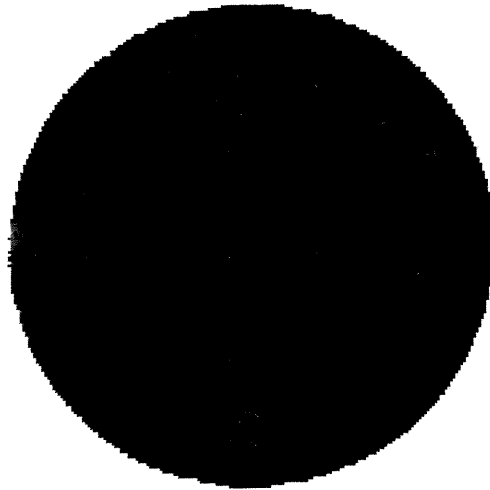
Par ailleurs, ce procédé d'analyse d'image a permis de mettre en évidence un front net de pénétration du solvant qui sépare le polymère

vitreux de la zone extérieure gonflée. Pour illustration, les images des pages 64, 65 et 66 représentent respectivement l'état du comprimé de dérivé de N-butyryl chitosane à $t = 0$ heure, à $t = 6$ heures et à $t = 24$ heures.

Le mécanisme de pénétration du solvant :

Dans un premier temps, seule une couche extérieure du film est atteinte par les molécules du solvant qui pénètrent dans les espaces libres (mailles) du réseau macromoléculaire. Le gonflement du polymère est fortement limité en raison des contraintes mécaniques du corps vitreux adjacent qui ne se laisse pas déformer facilement. Seule la déformation de la couche extérieure permet d'augmenter le volume du polymère afin de laisser pénétrer davantage le solvant. Cette expansion volumique implique au niveau moléculaire une relaxation et une réorientation des chaînes polymériques.

a) Comprimé à l'état sec



b) La lumière ne traverse pas le comprimé, le niveau de gris est égal à zéro pixel et le profil se confond avec l'axe des abscisses.

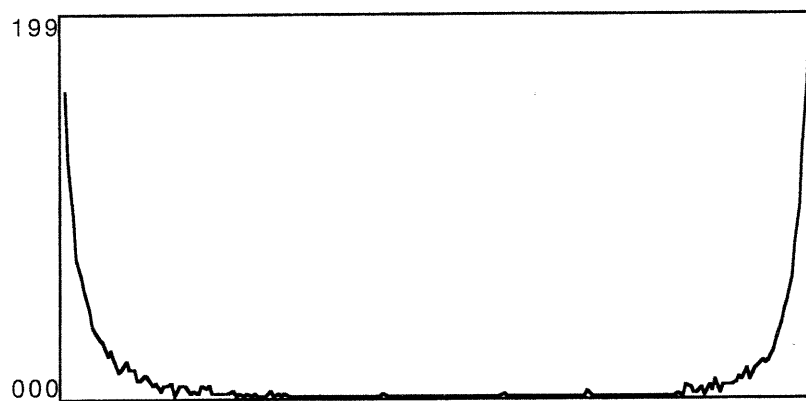
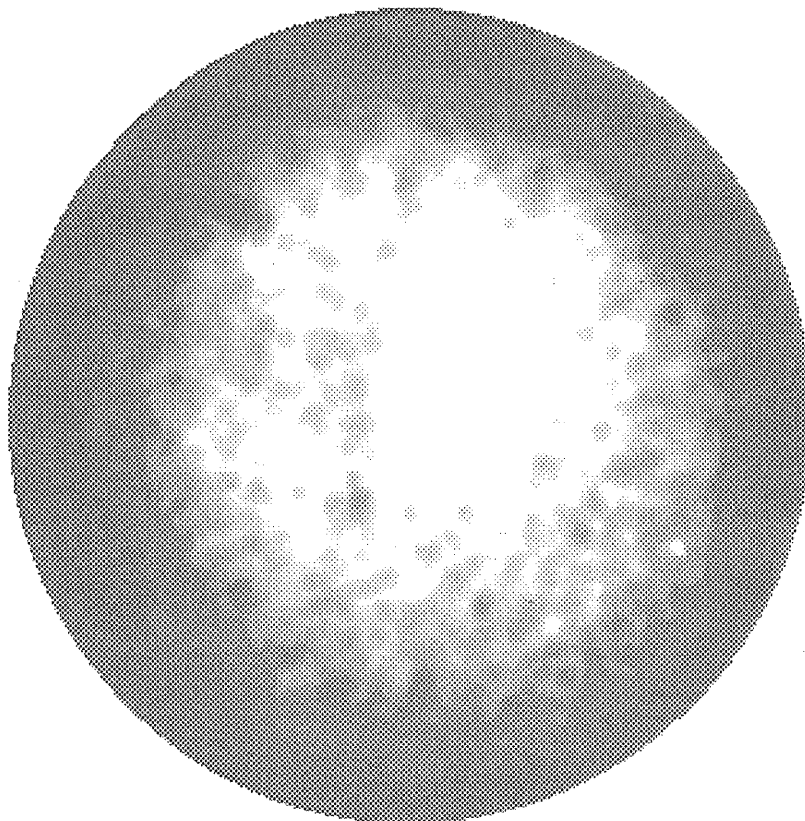


Figure 20 : Comprimé de N-butyryl chitosane (à $t = 0$)

a) Comprimé partiellement gonflé



b) L'intensité lumineuse est égale à 171 pixels à la périphérie du comprimé. Une partie du profil se confond avec l'axe des abscisses, ce qui correspond à une zone vitreuse du polymère.

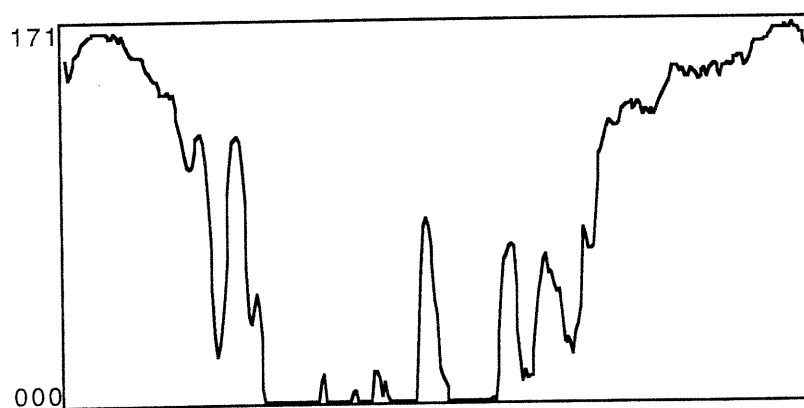
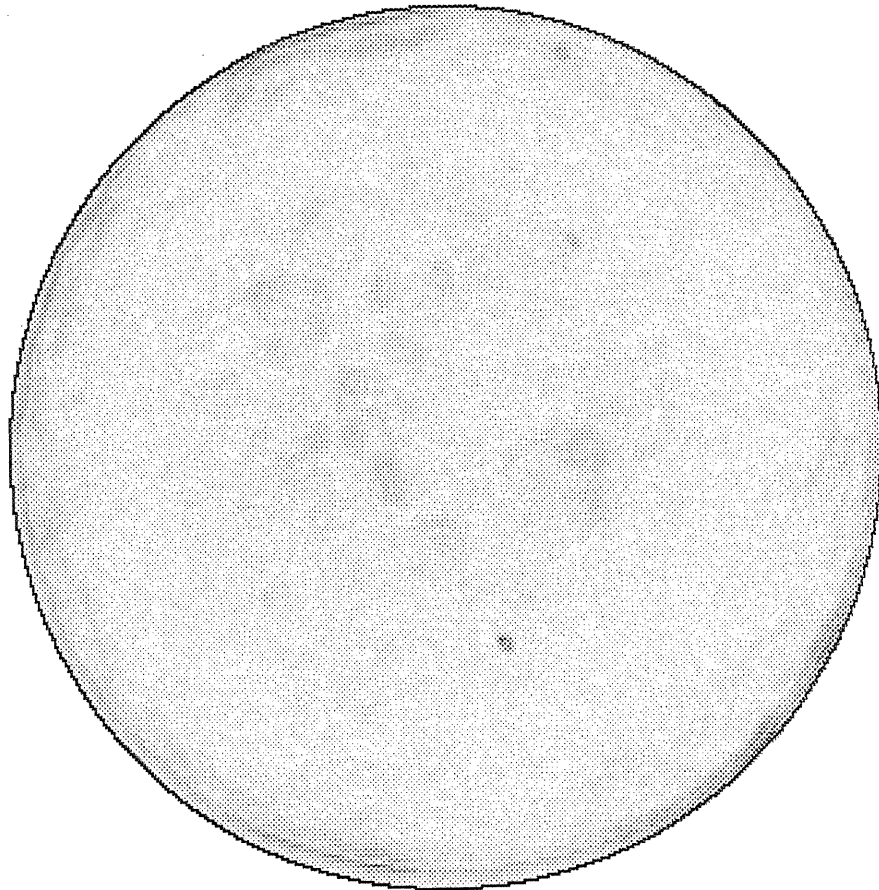


Figure 21 : Comprimé de N-butyryl chitosane après 6 heures dans le tampon phosphate

a) Gonflement total du comprimé



b) L'intensité de la lumière ou le niveau de gris est compris entre 173 et 246 pixels. Le profil correspond à un état caoutchouteux du polymère.

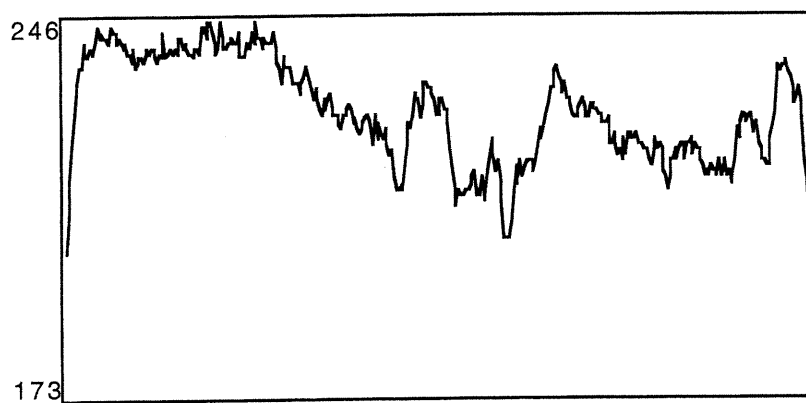


Figure 22 : Comprimé de N-butyryl chitosane après 24 heures dans le tampon phosphate

3.5 Influence de la force ionique sur le gonflement des comprimés de dérivés de chitosane

Une cinétique de gonflement des comprimés de N-butyryl chitosane a été réalisée dans l'eau distillée où la force ionique est égale à zéro. Le diamètre du comprimé est mesuré toutes les heures pendant 24 heures. Ensuite, ces résultats sont comparés avec ceux obtenus dans le tampon phosphate *tableau X et figure 23*.

Lorsque le comprimé est mis dans l'eau distillée, le processus de gonflement est plus important et plus rapide que dans le tampon phosphate. En effet, après 5 heures d'incubation dans l'eau distillée, le comprimé atteint un degré de gonflement maximal puis se dissout graduellement. Or dans le tampon phosphate où la force ionique est supérieure à zéro, le gonflement se fait lentement et l'intégrité du comprimé est maintenue. Ceci peut s'expliquer par la présence dans la solution tampon des ions tels que HPO_4^- , PO_4^{2-} et CL^- qui interagissent avec les groupements OH et NH_2 libres du polymère, entraînent ainsi des liaisons hydrogènes indispensables au maintien du gel (Sturgeon,1988) (Bodmeir et al,1989).

Temps (h)	Diamètre du comprimé de N-butyryl chitosane (mm)	
	Eau distillée	Tampon phosphate
0	12,9	12,9
1	25,5	21,5
2	29	25
3	34,5	27
4	40	28,5
5	43	30
20	-	33
24	-	33,5

Tableau X : Gonflement du comprimé de N-butyryl chitosane dans l'eau distillée et dans le tampon phosphate

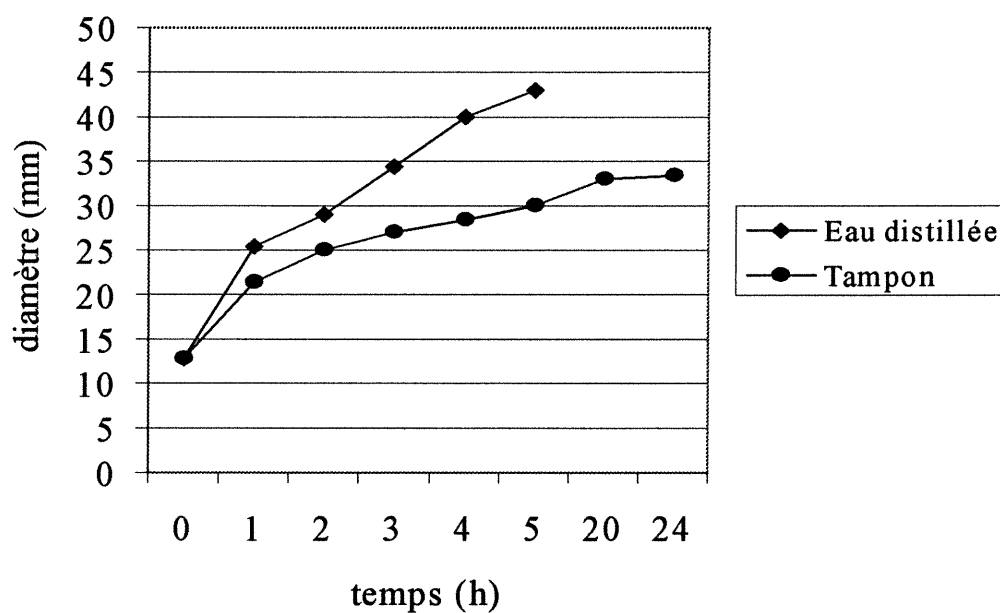


Figure 23 : Cinétique de gonflement du comprimé de N-butyryl chitosane dans l'eau distillée et dans le tampon phosphate 7,4

4) ÉTUDE DE LA CINÉTIQUE DE LIBÉRATION DES MÉDICAMENTS À PARTIR DES COMPRIMÉS DE DÉRIVÉS DE CHITOSANE

Pour évaluer l'influence de la masse moléculaire sur la cinétique de libération, on a choisi le salicylate de sodium et la spiramycine comme principe actif pour leur très grande solubilité et pour leur poids moléculaire de 160 et 850 daltons respectivement.

L'étude de la cinétique de libération des principes actifs à partir des comprimés est réalisée selon les normes USP, en utilisant un appareil de dissolution muni d'un agitateur à pale tournant à 50 rpm. Chaque comprimé est placé dans un bain de dissolution (tampon phosphate pH 7,4) à une température de 37°C.

La libération des médicaments a été suivie de manière continue à une longueur d'onde de 296 nm pour le salicylate de sodium et 234 nm pour la spiramycine. Une courbe de calibration linéaire a été réalisée entre les concentrations 0.012 et 0.2 mg/ml.

Les résultats de la libération ont été analysés à l'aide de l'équation de Peppas citée dans la section A.

L'étude de gonflement des comprimés a montré que le N-caproyl chitosane substitué à 100% ne gonfle pas dans le tampon, d'où le choix

des dérivés de chitosane substitués à 20 % et à 80 % (deux valeurs extrêmes) pour l'étude de la cinétique de libération de principe actif.

4.1 Évaluation d'un système matriciel

Une quantité de 100 mg de principe actif est mélangée avec 200 mg de chitosane substituée dans une capsule en cristal. Le mélange est comprimé à une pression de dix tonnes à l'aide d'une presse hydraulique équipée d'un poinçon de 10 mm de diamètre, afin d'assurer une porosité minimale.

Le solvant d'éluion, pénétrant dans le comprimé, dissout progressivement la substance médicamenteuse qui va alors diffuser vers l'extérieur (*figure 24*).

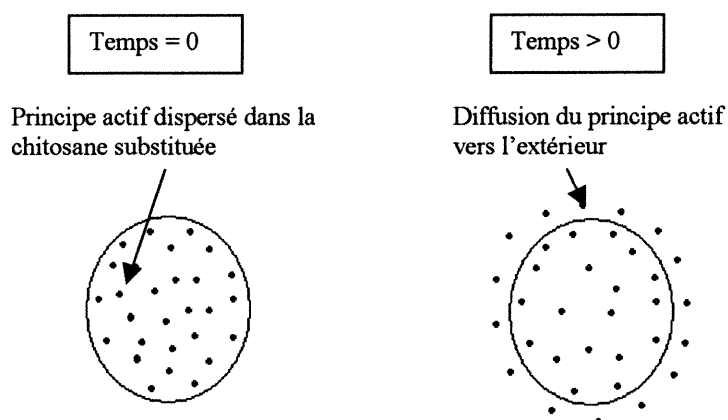


Figure 24 : Système matriciel
(Schéma de principe)

L'équation de **Peppas** a été appliquée pour tous les profils de dissolution afin de déterminer le type de libération.

$$\text{*Fraction libérée} = M_t/M_\infty = Kt^n$$

Après avoir transformé l'équation de Peppas sous forme de logarithme népérien (équation de type $y = ax + b$), la valeur de n est déterminée par régression entre 0 et $\approx 80\%$ de libération.

$$\ln (M_t/M_\infty) = \ln K + n \ln t$$

La vitesse de libération (ou fraction du médicament libérée par heure) a été calculée à l'aide de la dérivée par rapport au temps de l'équation de Peppas :

$$V = d(M_t/M_\infty)/dt = Knt^{n-1}$$

Les profils obtenus *figure 25* montrent que tous les dérivés de chitosane ont une libération progressive du principe actif. Cette libération s'étend sur une période de temps allant jusqu'à 20 heures.

Environ 50% de la quantité du médicament est libérée après 4 heures, malgré la forte solubilité du salicylate de sodium dans le milieu de dissolution. Ces résultats permettent de dire que la vitesse de libération du médicament est ralentie par le gonflement du polymère. En effet, le processus de libération du principe actif se déroule en deux phases. D'abord, le solvant pénètre à travers les chaînes du polymère entraînant

ainsi son gonflement et la formation d'une zone gélifiée. Ensuite le salicylate de sodium se dissout dans cette zone hydratée puis diffuse vers l'extérieur. La libération du médicament dépend donc de la vitesse de formation de gel.

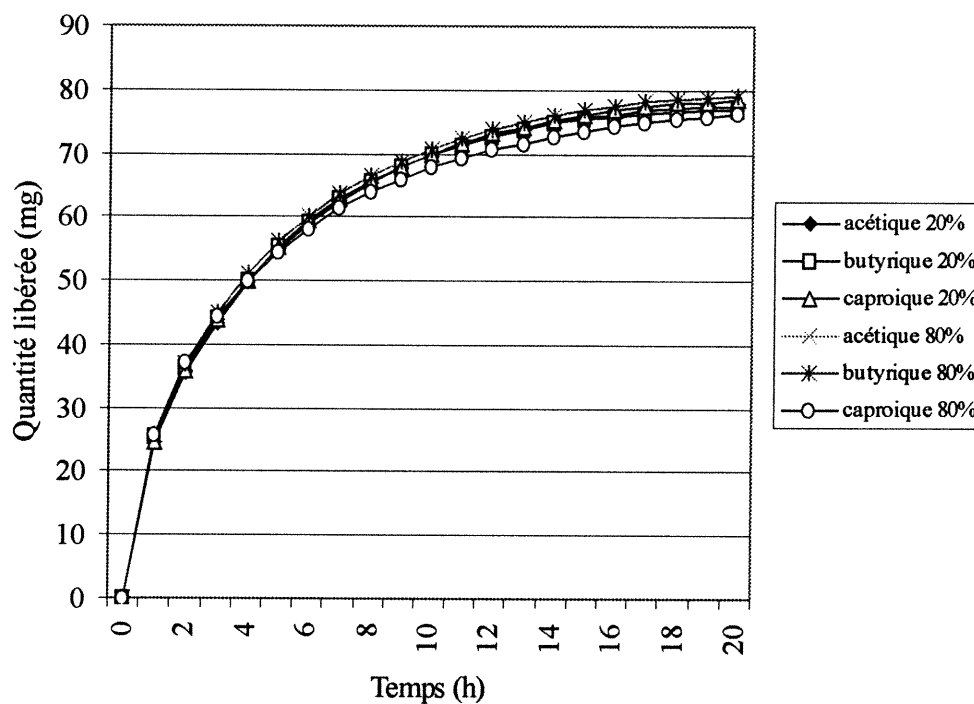


Figure 25 : Cinétique de libération du salicylate de sodium à partir des comprimés de dérivés de chitosane (système matriciel).

La *figure 26* montre une représentation ln-ln des profils de dissolution. L'équations des droites présentent des valeurs de n voisines de 0.5 et des coefficients de régression proche de 1, ceci, pour tous les dérivés et pour

tous les degrés de substitution. On peut conclure que dans le cas du système matriciel, la cinétique de libération du salicylate de sodium à partir des comprimés de dérivés de chitosane suit une cinétique de type Fickienne.

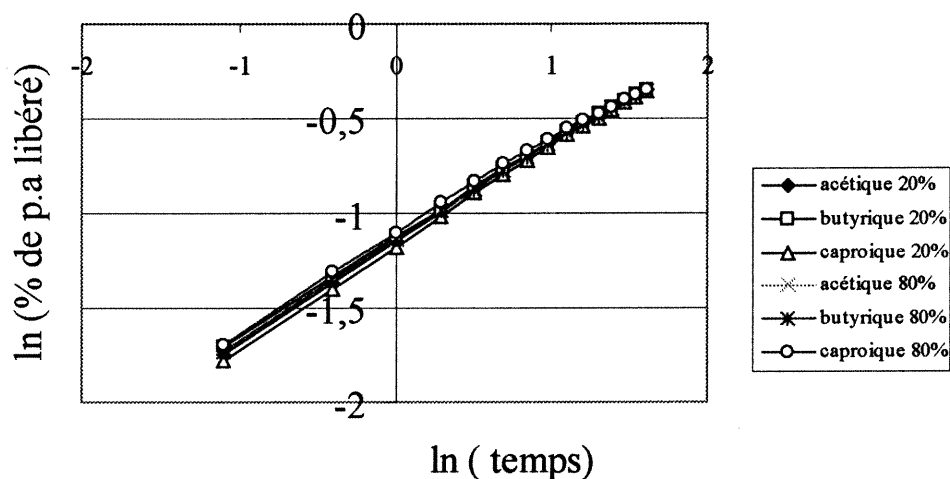


Figure26 : Représentation ln-ln de la cinétique de libération du salicylate de sodium à partir des comprimés de dérivés de chitosane

Équations des droites :

	n	K	coefficient de régression
Série 1		$y = 0.51 x + 0.31$	$(R^2 = 0.998)$
Série 2		$y = 0.50 x + 0.32$	$(R^2 = 0.998)$
Série 3		$y = 0.52 x + 0.30$	$(R^2 = 0.998)$
Série 4		$y = 0.50 x + 0.32$	$(R^2 = 0.997)$
Série 5		$y = 0.49 x + 0.33$	$(R^2 = 0.996)$
Série 6		$y = 0.55 x + 0.31$	$(R^2 = 0.985)$

4.1.1 Influence du poids moléculaire

L'influence du poids moléculaire sur la cinétique de libération, a été étudiée, en comparant la diffusion du salicylate de sodium et celle de la spiramycine à partir des comprimés de dérivés de chitosane.

Deux cents mg de chitosane substituée sont mélangés avec 100 mg de spiramycine dans une capsule en cristal puis comprimés à une pression de 10 tonnes. Le test de dissolution est réalisé dans les mêmes conditions que le salicylate de sodium.

Les profils de libération de la spiramycine sont regroupés dans la *figure 27*

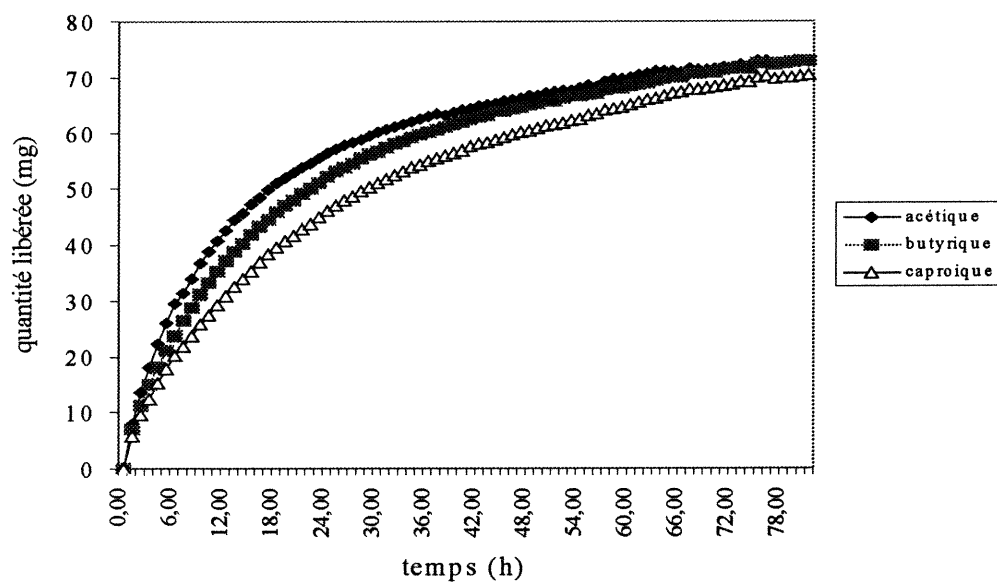


Figure 27: Cinétique de libération de la spiramycine à partir des comprimés de dérivés de chitosane (système matriciel).

Les graphiques montrent que la spiramycine se libère plus lentement que le salicylate de sodium. Plus de 50% de la charge est libérée après 20 heures et 80% après 72 heures alors que la totalité du salicylate de sodium est libérée après 20 heures. Par ailleurs, les profils ne montrent aucune différence significative entre les trois dérivés.

La linéarisation des profils *figure 28* permet de conclure que le mécanisme de libération de la spiramycine à partir d'un système matriciel suit une cinétique de type fickienne. (Les équations des droites donnent des valeurs de n proche de 0,5).

D'autre part, l'analyse des profils de vitesse de libération (*figure 29* et *30*) montre que le salicylate de sodium se libère plus facilement que la spiramycine avec une vitesse maximale de 25 mg/h et 8 mg/h respectivement.

Ces résultats démontrent que la libération du principe actif à partir des comprimés de dérivé de chitosane est retardée suite au gonflement du polymère, spécialement dans le cas de principe actif à poids moléculaire élevé. Lorsque le polymère s'hydrate, les chaînes polymériques se relaxent et forment un réseau d'où la difficulté pour les molécules de grandes tailles telle que la spiramycine à diffuser à travers les mailles.

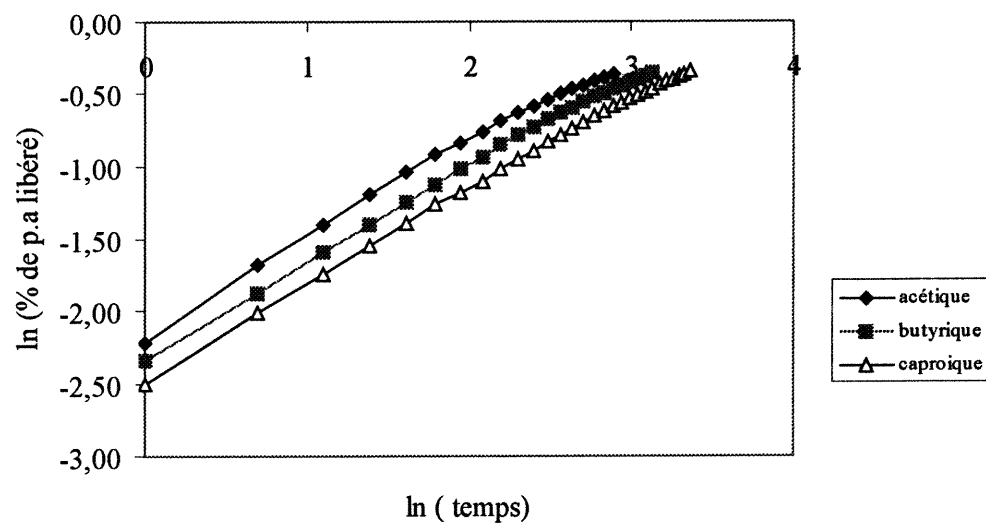


Figure 28: Représentation ln-ln de la cinétique de libération de la spiramycine à partir des comprimés de dérivés de chitosane

Équation des droites :

	n	k	coefficient de régression
Série 1		$y = 0.63 x + 0.12$	$(R^2 = 0.99)$
Série 2		$y = 0.63 x + 0.10$	$(R^2 = 0.99)$
Série 3		$y = 0.64 x + 0.08$	$(R^2=0.99)$

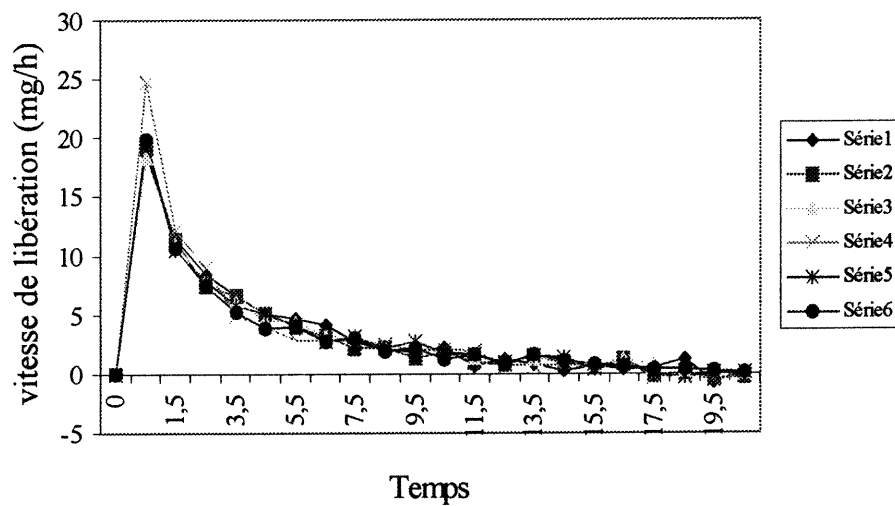


Figure 29 : Vitesse de libération du salicylate de sodium à partir des comprimés de dérivés de chitosane.

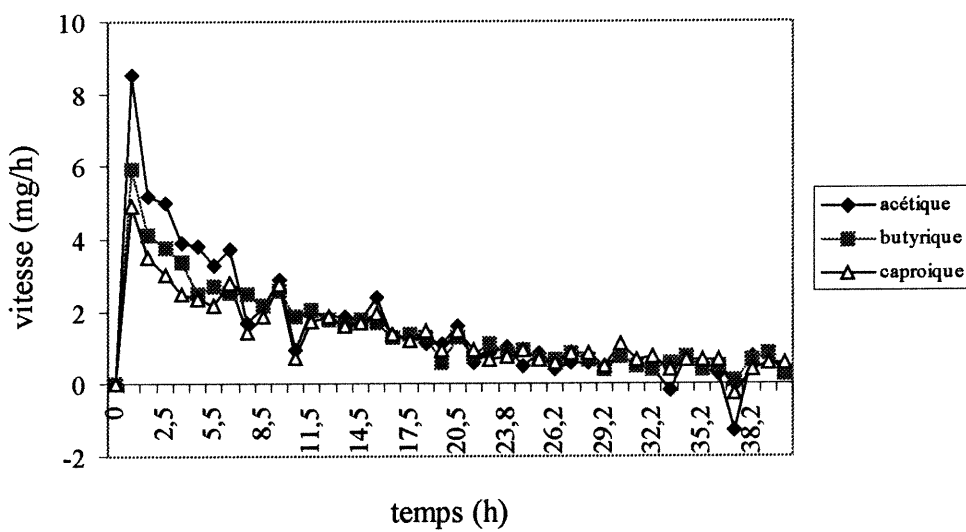


Figure 30 : Vitesse de libération de la spiramycine à partir des comprimés de dérivés de chitosane.

4.2 Évaluation d'un système réservoir

Une pastille de 100 mg de principe actif et de 7 mm de diamètre est déposée entre deux couches de 100 mg de poudre de chitosane substituée (*figure 31*). Le tout est comprimé à une pression de dix tonnes à l'aide d'une presse hydraulique équipée d'un poinçon de 10 mm de diamètre.

Dans ce système, un temps de latence caractérise la cinétique de libération du médicament. Il dépend de la structure et de l'épaisseur de l'enrobage.

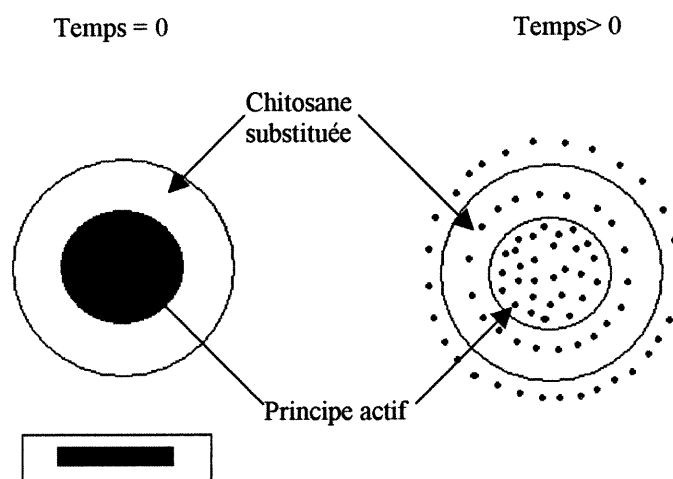


Figure 31 : Système réservoir
(schéma de principe)

L'étude de la cinétique de libération du principe actif a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. Les profils de dissolution sont représentés dans la *figure 32*. On constate là aussi une libération lente du salicylate de sodium, environ 50% de la quantité est libérée en 5 heures et 100% en 20 heures. Ici, un temps de latence d'environ 2 heures est nécessaire pour que le médicament soit libéré dans le milieu de dissolution. Tous les profils sont semblables. Il semble que le degré de substitution et la longueur de la chaîne greffée sur la chitosane n'affecte pas la cinétique de libération du médicament.

Ces résultats démontrent bien la diffusion du principe actif et la vitesse de diffusion du solvant à travers le polymère se fait lentement.

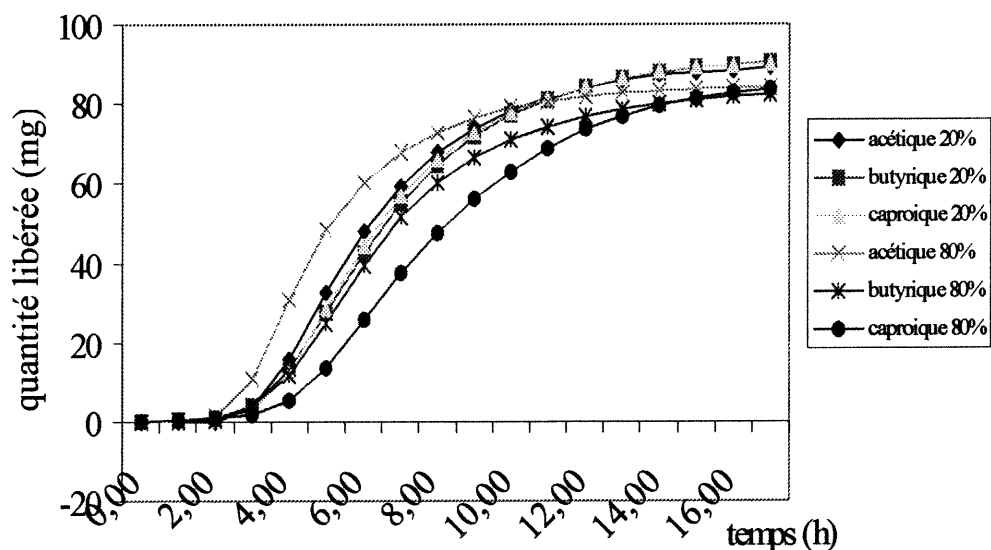


Figure 32 : Cinétique de libération du salicylate de sodium à partir des comprimés de dérivés de chitosane 10mm de diamètre (système réservoir)

Après linéarisation des profils de dissolution, les équations des droites montrent des valeurs de n voisines de 1. Ce qui correspond à une libération de type cas II ou d'ordre zéro (figure 33).

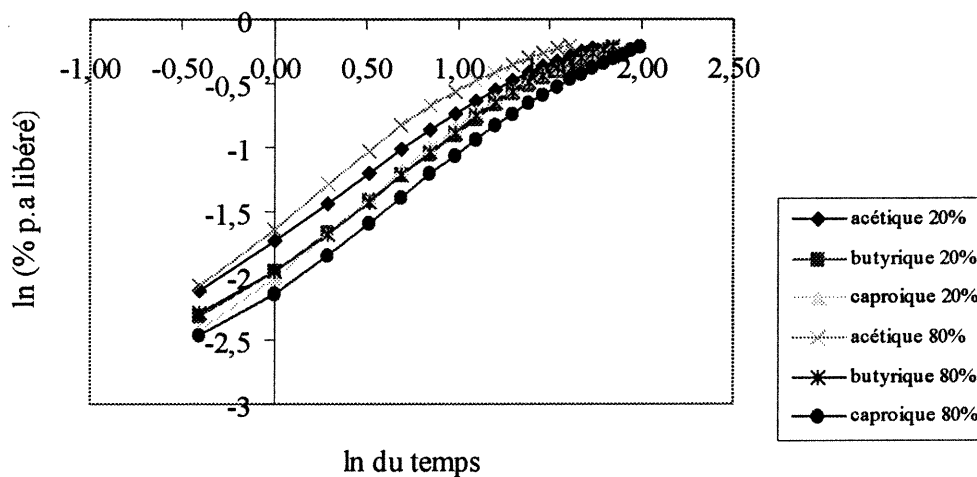


Figure 33 : Représentation ln-ln de la cinétique de libération du salicylate de sodium à partir des comprimés de dérivés de chitosane 10 mm de diamètre (système réservoir)

Équations des courbes :

	n	K	coefficient de régression
Série 1	0.91	0.18	$(R^2 = 0.99)$
Série 2	0.97	0.15	$(R^2 = 0.99)$
Série 3	1.00	0.14	$(R^2 = 0.98)$
Série 4	0.90	0.21	$(R^2 = 0.97)$
Série 5	0.98	0.15	$(R^2 = 0.99)$
Série 6	0.97	0.13	$(R^2 = 0.99)$

4.2.1 Influence de la géométrie du comprimé

Une expérience a été réalisée avec le système réservoir, pour mettre en évidence l'effet de la géométrie du comprimé sur la cinétique de libération du principe actif. Pour cela, on a préparé deux comprimés de 10 mm et de 13 mm de diamètre contenant une pastille de 100 mg de salicylate de sodium (7mm de diamètre et 2 mm d'épaisseur) et enrobée avec 200 mg de dérivés de chitosane (*figure 34*).

Deux autres comprimés sont préparés de la même manière mais en doublant la quantité de chitosane substituée.

Les dimensions des comprimés sont regroupées dans le *tableau XI*.

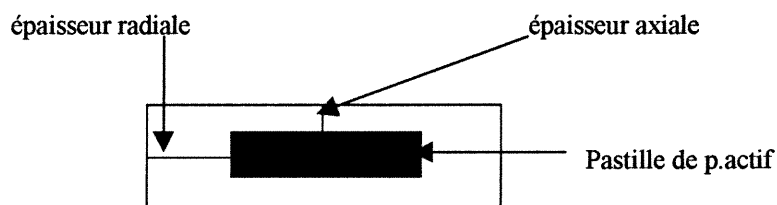


Figure 34 : Comprimé enrobé
(schéma de principe)

	Formulation 1	Formulation 2	Formulation 3	Formulation 4
Diamètre (mm)	10	13	10	13
Quantité de chitosane (mg)	200	200	400	400
Poids total (mg)	300	300	500	500
Épaisseur totale (mm)	3,8	2,2	6,3	3,2
Épaisseur axiale du film (mm)	0,9	0,1	2,15	0,6
Épaisseur radiale du film (mm)	1,5	3	1,5	3

Tableau XI: Dimensions des comprimés enrobés avec de la chitosane substituée

Le test de dissolution a été mené dans le tampon phosphate pH 7,4. Les profils de dissolution de chaque formulation sont regroupés dans la figure 35.

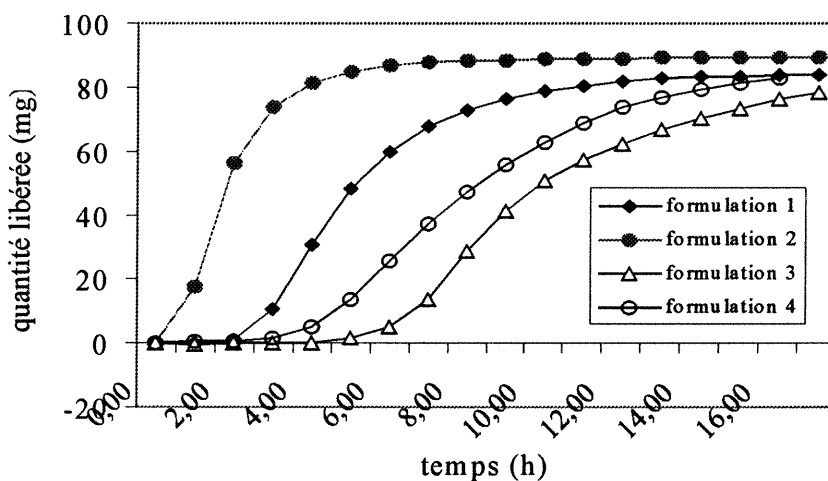
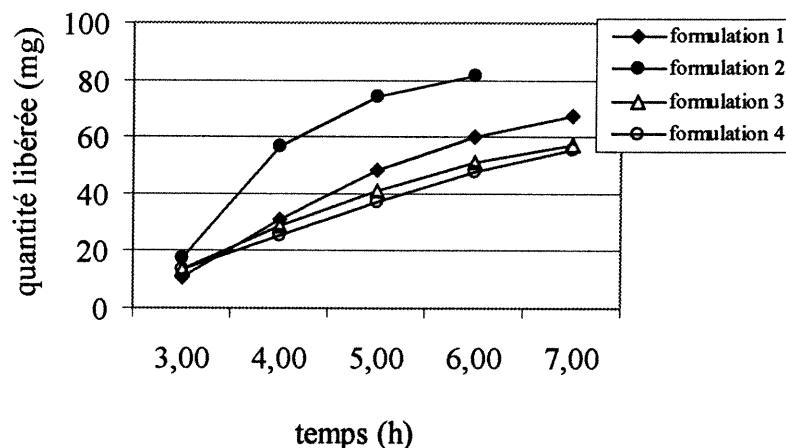


Figure 35 : Influence de la géométrie du comprimé de chitosane substituée sur la cinétique de libération du salicylate de sodium.

Les vitesses de libération du principe actif sont déterminées par le calcul des pentes de la partie linéaire des courbes de dissolution.



	Pente (vitesse)	coefficient de régression
Formulation 1	$y = 12 x + 5$	$R^2 = 0,95$
Formulation 2	$y = 28 x + 5,1$	$R^2 = 0,96$
Formulation 3	$y = 10 x + 5,4$	$R^2 = 0,97$
Formulation 4	$y = 10 x + 3,9$	$R^2 = 0,99$

Discussion

L'analyse des résultats montre que les dimensions de l'enrobage jouent un rôle important dans la libération du médicament. En effet, les formulations 1 et 3 qui ont une même épaisseur radiale, présentent une cinétique de libération du salicylate de sodium différente (*figure 35*). Le temps de latence de la première formulation est deux fois plus court que

celui de la seconde formulation. La charge maximale du médicament est libérée après 11 heures et 18 heures respectivement. Par ailleurs, la vitesse de libération du salicylate de sodium dans la formulation 1 est sensiblement supérieure à celle de la formulation 3.

Le même phénomène est observé dans le cas des formulations 2 et 4 où l'épaisseur radiale est de 3 mm, on constate que le temps de latence, et la vitesse de libération du médicament sont 3 fois plus élevés dans la formulation 2 que dans la formulation 4.

Il semble que le prolongement du temps de libération entre les formulations 1 et 3 d'une part et les formulations 2 et 4 d'autre part est dû à la différence des **épaisseurs axiales** du film polymérique (*tableau XI*). Donc, plus l'épaisseur de l'enrobage augmente, plus la libération est retardée.

La comparaison des formulations 1 et 4 où les épaisseurs axiales sont légèrement différentes, montre que le principe actif se libère plus lentement dans la deuxième formulation. Ceci peut s'expliquer par la différence significative au niveau de l'**épaisseur radiale** (1,5 mm et 3 mm respectivement) qui semble influencer la libération du médicament.

En conclusion, ces expériences menées dans le système réservoir démontrent bien que le temps de libération du salicylate de sodium à

partir des comprimés de dérivés de chitosane est conditionné non seulement par le gonflement du polymère mais aussi par la dimension des épaisseurs axiales et radiales de l'enrobage.

Ces observations, nous permettent de suggérer l'utilisation de la chitosane substituée comme excipient dans les formes chronodosées.

5) DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Cette étude a démontré que la chitosane pure ne possède pas des propriétés gélifiantes qui lui permettent d'être utilisée comme matrice hydrophile gonflable. Par contre, la fixation de chaînes carbonées sur le groupement glucosamine de la chitosane engendre le gonflement de ce polymère.

On a comparé trois dérivés de chitosane (N-acétyl chitosane, N-butyryl chitosane et le N-caproyl chitosane). Ils sont différents par la longueur de la chaîne greffée (2 carbones, 4 carbones et 6 carbones). Il s'avère que le gonflement du N-butyryl chitosane et du N-acétyl chitosane dans le tampon phosphate augmente au fur et à mesure qu'on augmente le degré de substitution. L'indice de gonflement maximal est égal à 200% et 125% respectivement. Il semble que les chaînes macromoléculaires de la chitosane s'écartent les unes des autres, entraînant ainsi, l'accroissement de l'aire de diffusion du solvant et la formation du gel.

En revanche, un phénomène inverse est observé dans le cas du N-caproyl chitosane. En effet, à 100% de substitution, le polymère ne gonfle pas. On observe une désintégration instantanée du comprimé en petits granules, visiblement non gonflables. Ces résultats démontrent qu'à partir d'un certain degré de substitution et pour une longueur de chaîne

de 6 carbones, le phénomène de gonflement disparaît. On suppose que cela est dû à un encombrement entre les chaînes macromoléculaires du polymère. Cette conclusion préliminaire demande naturellement à être confirmée par une étude plus approfondie, en utilisant des substituants de plus de 6 carbones.

Dans un deuxième temps, on a mis à profit les propriétés gélifiantes des dérivés de chitosane, afin de formuler des comprimés à libération contrôlée.

Le gel formé par le gonflement de ces matrices hydrophiles, constitue une barrière diffusionnelle que le principe actif doit franchir afin d'être libéré et dont la vitesse de formation du gel contrôle la cinétique de libération du médicament. Pour illustrer ce phénomène, on a étudié l'effet du poids moléculaire du principe actif et la géométrie du comprimé.

Dans le cas du système réservoir, le changement de la dimension de l'épaisseur radiale et axiale de l'enrobage a engendré la variation du temps de libération du médicament.

D'autre part, la libération totale du salicylate de sodium et de la spiramycine à partir d'un système matriciel a nécessité 20 heures et 72 heures respectivement malgré leur forte solubilité dans le milieu de

dissolution. Ces observations prouvent que c'est le gel formé qui retarde la libération. On peut conclure que ce processus de libération est régi par une relaxation macromoléculaire du polymère.

L'interprétation des résultats de dissolution, en utilisant l'équation de Peppas comme modèle mathématique, nous a permis de mettre en évidence un mécanisme de libération de type fickien dans le cas du système matriciel et un mécanisme de libération d'ordre zéro dans le cas du système réservoir.

Par ailleurs, l'allongement des chaînes carbonées substituées sur le groupement glucosamine n'affecte pas la libération. Les profils de dissolution des principes actifs n'ont montré aucune différence significative entre les dérivés de chitosane.

En conclusion, le but de ce travail était de préparer des dérivés de chitosane et d'étudier la cinétique de libération d'un médicament à partir de ces comprimés gonflables.

D'après les résultats obtenus, il est raisonnable de penser que la chitosane modifiée ou substituée peut être utilisée comme excipient dans la formulation des formes à libération contrôlée des médicaments et de jouer un rôle d'avenir dans l'industrie pharmaceutique.

BIBLIOGRAPHIE

Baker R., « Controlled Release of Biologically Active Agents » chapter 4 Edt by John Wiley & Sons New york (1987).

Bécharde S., « Conceptualisation, modélisation et développement d'implants polymériques poreux pour la libération prolongée de médicaments par diffusion », Thèse de Doctorat, Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, Québec, Canada, (1987).

Brooke D., and Washkuhn R.J., « Zero order drug delivery system » J. Pharm. Sci, 66, (1977) p. 159-162.

Buri P. et Doelker E., « Formulation des comprimés à libération prolongée. II. Matrices hydrophiles », *Pharma. Acta Helv.*, 55, (1980), p. 189-197.

Buri P. « Aspects biopharmaceutiques des médicaments à libération contrôlée » *J. Suisse Pharm.* 114 (1976) p. 405-411.

Buri P. et Doelker E., « La mise à disposition de l'organisme aux principes actifs – voie orale- » dans *Traité de Biopharmacie et Pharmacocinétique*. Éditions. les presses de l'université de Montréal (1990) p 67-95.

Carli F. and Simoni L., « Permeability and penetrability of solid beds in dosage form design and development », *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 53 (1977), p. 1-21.

Claesson P.M., and Ninham B.W., « pH-Dependent Interaction between Adsorbed Chitosan Layers » *Langmuir*, 8 (1992) p 1406-1412.

Doelker E., « Systèmes matriciels et libération d'ordre zéro : Le rôle de l'excipient », *Bull. Tech.*, 78, (1985) (a), p. 51-60.

Doelker E. et Buri P., « Formulation des comprimés à libération prolongée, III. Matrices lipidiques », *Pharm. Acta Helv.*, 56, (1981), p. 111-118.

Doelker E., Buri P, Puisieux F. et Benoit J.P., « Cinétique et mécanismes de la libération contrôlée à partir des systèmes polymériques » dans *Formes Pharmaceutiques Nouvelles : aspects technologique, biopharmaceutique et médical*. Eds, Lavoisier, Paris, (1985) p. 65-174.

Doczi J., « Process for purification of chitosan by means of the salicylic acid salt there-of » U.S. 2.795.579. (1957).

Domard A., « Chitine, chitosane, production, propriétés physico-chimiques et applications » in *INFERMER, 2ième colloque biotechnologie marine*.(1991) p 194-199.

Domszy J.G., and Roberts G.A.F «Physiochemical properties of chitosan » *Macromol. Chem.*,186 (1985) p 1671-1677.

Goswami T et Mahfoud A., « La validation des résidus de crustacés. Synthèse d'informations sur la chitine et la chitosane » Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation. Direction de la recherche scientifique et technique. Gaspé, Québec, Canada (1992).

Hayes E., Rand Davis D.H., « Characterization of chitosan. II : The determination of the degree of acetylation of chitosan and chitin » in : *Proceedings of the first international conference on chitin/ chitosan*. (1978) p 406.

Heller J. « Controlled release of biologically active compounds from bioerodible polymers » *Biomaterials* 1 (1980) p 51-57.

Heller J, Langer R.S., and Wise D.L., « Bioerodible System » in *Medical Applications of Controlled Release*. Chapter 3. Eds Boca Raton, FL : CRC Press (1984).

Higuchi T., « Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices », *J. Pharm. Sci.*, 52, (1963), p 1145-1149.

Hirano S., Ohe Y. and Ono H. « Selective N-acylation of chitosan » *Carbohydrate Research* 47 (1976) p 315-320.

Hosaka S, Ozawa T, Tanzawa H. *J. Appl. Polym.Sci* 23 (1979) p 2089.

Hsieh D.S.T., Folkman J, and Langer R., « Magnetic modulation of release of macromolecules from polymers ». Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78 (1981) p 1863-1867.

Ingani H., « Études des paramètres de formulation influençant les caractéristiques de libération de principes actifs à partir des matrices hydrophiles à base de gomme xanthane et conception de comprimés matriciels à bicouche flottants », Thèse de doctorat, Université libre de Bruxelles, (1987).

Johnson E., Lee Q. and Peniston P., « Utilization of shellfish waste for chitin and chitosan production » in : Chemistry and biochemistry of marine food products (eds) Martin R., (1982) p 415-422.

Krowczynski L., « Theoretical principles applied in various extended release dosage formulation » in Extended- Release Dosage Forms, chap. III, ed. by L. Krowczynski, CRC Press, Boca Raton, (1987) (c).

Krosmeier R.W and Peppas N.A., « Macromolecular and modeling aspects of swelling controlled systems ». in Controlled release delivery systems. Roseman T.J, Mansdorf S.Z, Eds, Dekker, New York (1983) p 77-90.

Langer R. and Peppas N., « Chemical and physical structure of polymers as carriers for controlled release of bioactive agents : A review » in JMS-REV. Macromol. Chem. Phys., C23, chap. III, ed. by G. B. Butler, K. F. O' Driscoll and G. L. Wilkes, Marcel Dekker, New York and Basel, (1983), p 61-126.

Langer R., Hsieh D.S.T. and Rhine W.D « Zero order controlled release polymer matrices for micro and macromolecules.» J. Pharm. Sci. 72, (1983) p 17-22

Lee P., « Kinetics of drugs release from hydrogel matrices » in Advances Drug Delivery Systems, Elsevier, Amsterdam, (1986) p. 277-288.

Lee P. I. and Good W.R., « Overview of controlled-release drug delivery » in Controlled- release technology – Pharmaceutical

Applications, chap. I, ed. by P.I. Lee and W. R. Good, ACS Symposium series 348, (1987).

Li Q, Dunn E.T, Grandmaison E.W and Goosen M.F.A., « Applications and properties of chitosan » Journal of bioactive and compatible polymers. 7 (1992) p 370-397.

Melia C.D., « Hydrophilic matrix sustained release systems based on polysaccharide carriers », Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems, 8, (1991), p 395-421.

Muzzarelli R., « Chitin. The polysaccharide » chap.3 Pergamon Press. Oxford, UK (1977) p 417-445.

Muzzarelli R, Jeuniaux C, Gooday G., « Chitin in nature and technology » Plenum Press, N.Y. (1986).

Moussa I.S., Cartilier L. « Characterization of moving fronts in cross-linked amylose matrices by image analysis ». Journal of Controlled Release 42 (1996) p 47-55.

Park K, Shalaby S.W. and Park. H, «Biodegradable drug delivery systems », in biodegradable hydrogels for drug delivery, chap 8, ed. By K. Park, W.S.W. Shalaby and H. Park, Technomic publication, Lancaster, Pennsylvania, (1993), p 189-232.

Park K, Shalaby S.W and Park H.,« Biodegradable hydrogels for drug delivery » Technomic publication, Pennsylvania (1993) p 1-14

Peppas N.A « Analyse of fickian and non-fickian drug release from polymers », Pharma. Acta Helv , 60, (1985) p. 110-111.

Peppas N. et Bindschaedler C, « Les dispositifs à libération contrôlée pour la délivrance des principes actifs médicaux. IV, Système à gonflement contrôlé », S.T.P. Pharma, 2, (1986), p 38-46.

Peppas N.A. et Korsmeyer R.W., « Dynamically swelling hydrogels in controlled release applications » in: Hydrogels in medicine and pharmacy. Vol III (1987) p 110-131.

Peppas N.A et Segot-Chicq S., « délivrance des principes actifs médicamenteux. II. Aspects fondamentaux de la diffusion des principes actifs dans les polymères ». S.T.P pharma 2 (1984) p 121-127.

Ponomareff-Bauman M., Soliva M. and Speiser P., « Fat homologs as adjuvants for oral depot drug preparation », Pharm. Acta Helv., 43, (1968), p 158-176.

Prud'homme J., «Synthèse et caractérisation des macromolécules ».Manuel de travaux pratiques. Presses de l'université de Montréal (1981)

Rosen H.B., Kohn J., Leong K. and Langer R., « Bioerodible polymers for controlled release systems » in Controlled Release Systems : Fabrication Technology, vol. II, chap.5, ed. by D.S.T. Hsieh, CRC Press, Boca Raton, (1988).

Rutherford F.A., Austine P.R.,« Proceedings of the 1 st international conference on chitin and chitosan ». Eds. Muzzarelli R and Parisier E. (1978) p 182-183.

Slomon J.L. et Doelker E., « Formulation des comprimés à libération prolongée. Partie I. Matrices inertes », Pharma. Acta Helv., 55, (1980), p. 174-182.

Sinko P. and Kohn J., « Polymeric drug delivery systems » in Polymeric Delivery Systems- Properties and applications, chap.II, ed. by A.M.El-Nokaly, D.M. Piatt and B.A. Charpentier, ACS Symposium series 520, Washington, (1993).

Theeuwes F. « Elementary osmotic pump » J. Pharm. Sci 64 (1975) p 1987-1991.

Vergnaud J.M., « Controlled drug release of oral dosage forms » Eds, Ellis horwood series in pharmaceutical technology. (1993) p 2-3.

Varum M, Anthonsen M.W., Grasdalen H and Smidsrod O « Determination of the degree of N-acetylation and the distribution of N-

acetyl groups in partially N-deacetylated chitins (chitosans) by high-field n.m.r spectroscopy » Carbohydrate Research 211 (1991) p 17-23.

Zikakis J.P., « Chitin, chitosan and related enzymes. Eds. Academic Press, N.Y. (1984).

ANNEXE

SPECTRES INFRA-ROUGE ET RMN

DE

N-acétyl chitosane,
N-butyryl chitosane et
N-caproyl chitosane.

File # 1 : CHITBUTY

Mode = 2 (Mid-IR)

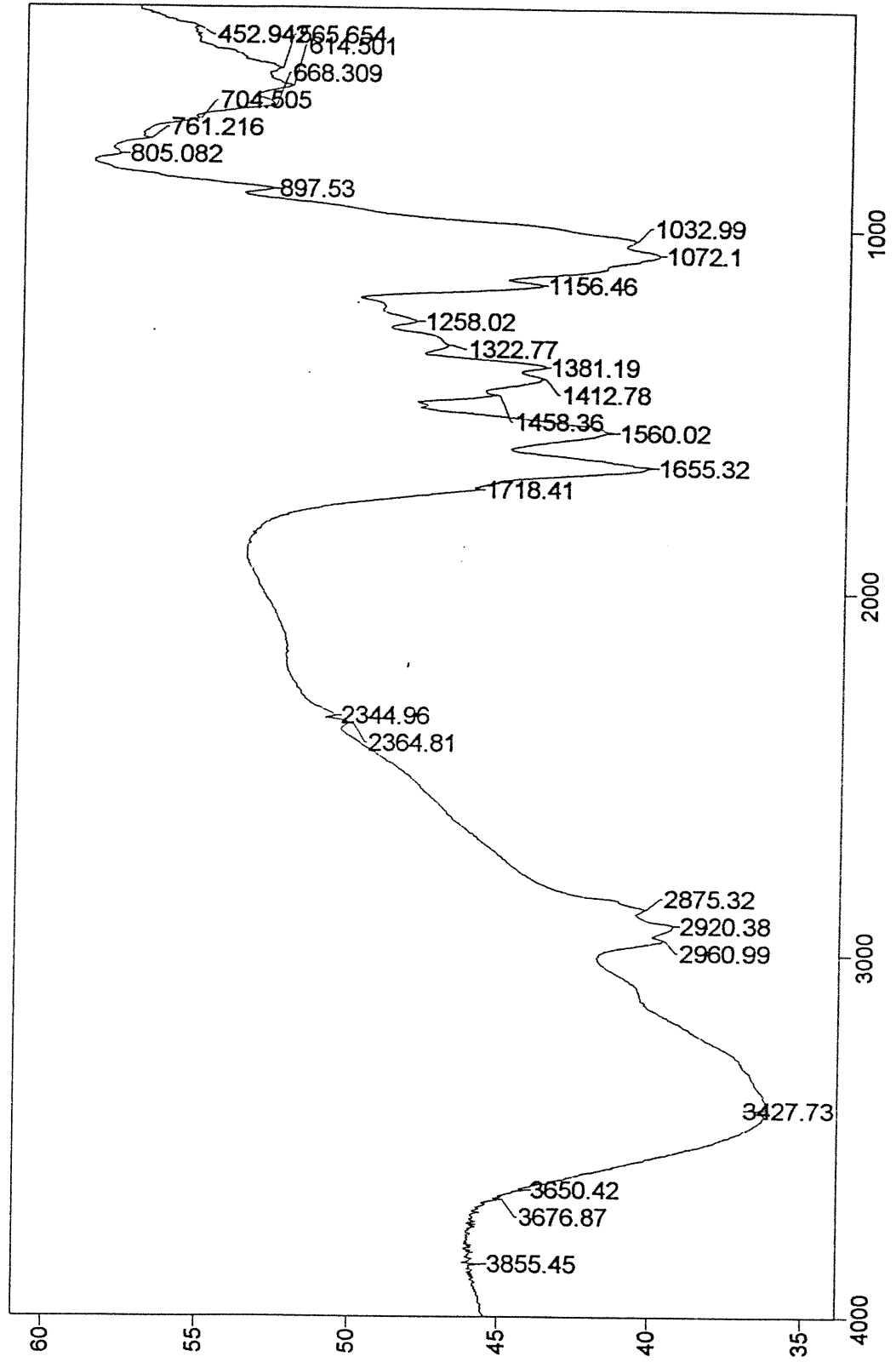
99-01-05 14:22

Sample Description: [AOT]=0.2M, [ROH]=0.2M, W=12, D%=20 no WASH

Scans = 10

Res = 4 cm⁻¹ 21 scans/min

Apod = Cosine



Transmittance / Wavenumber (cm-1)

File # 1 : CHITOACE

Mode = 2 (Mid-IR)

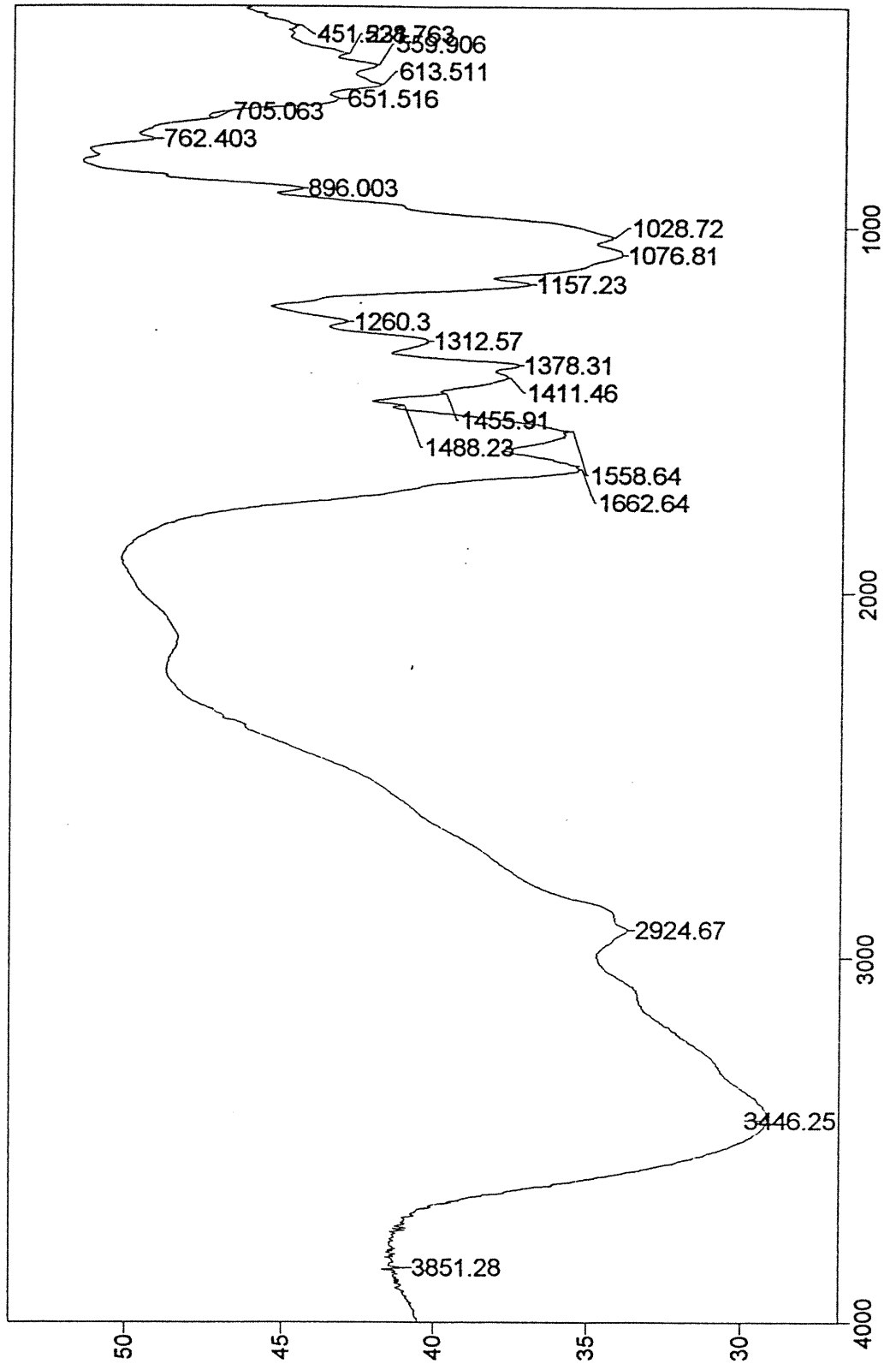
99-01-05 14:02

Sample Description: [AOT]=0.2M, [ROH]=0.2M, W=12, D%=20 no WASH

Scans = 10

Res = 4 cm-1 21 scans/min

Apod = Cosine



Transmittance / Wavenumber (cm-1)

File # 1 : CHITOCAP

Mode = 2 (Mid-IR)

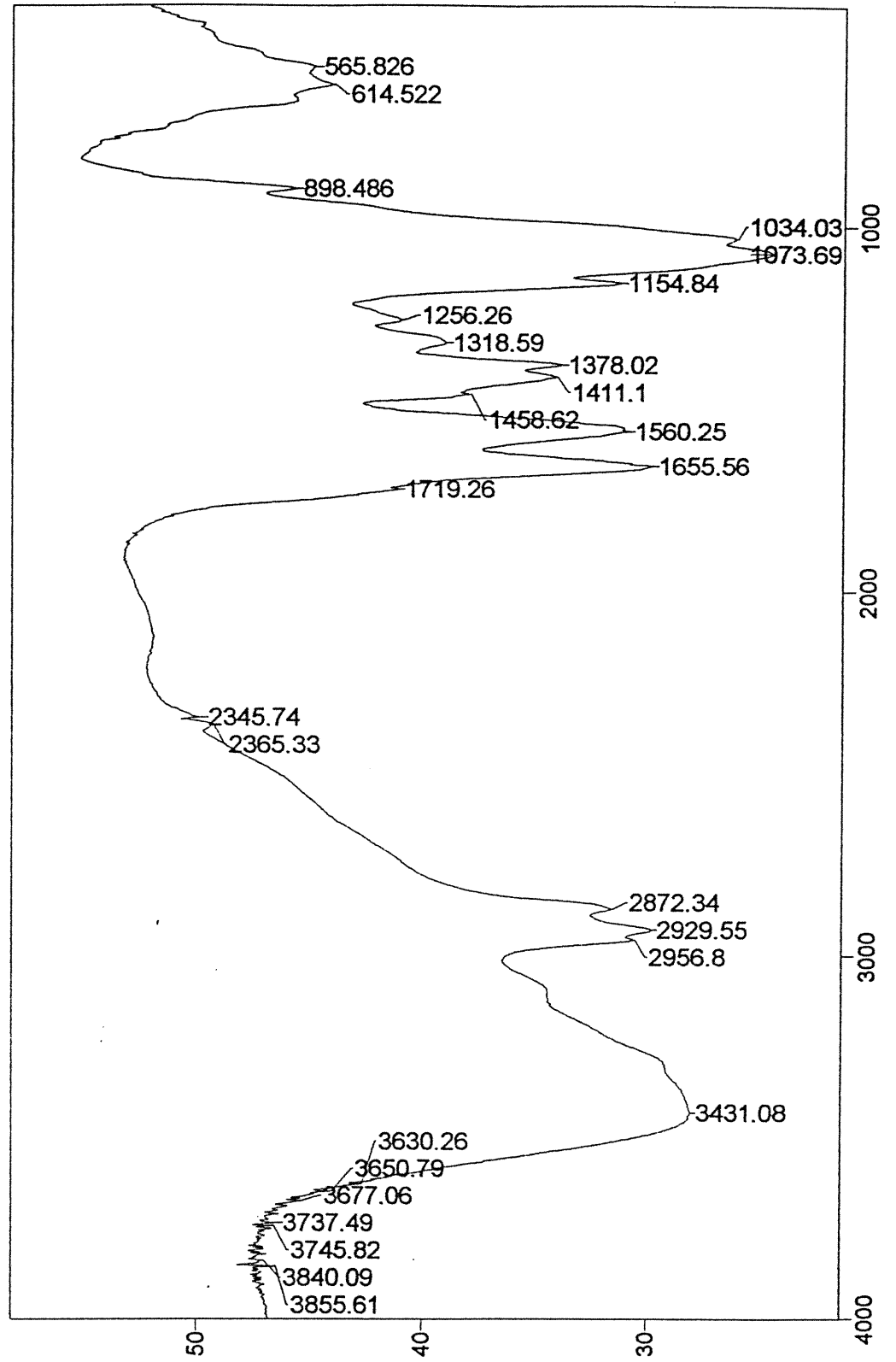
99-01-05 14:39

Sample Description: [AOT]=0.2M, [ROH]=0.2M, W=12, D%=20 no WASH

Scans = 10

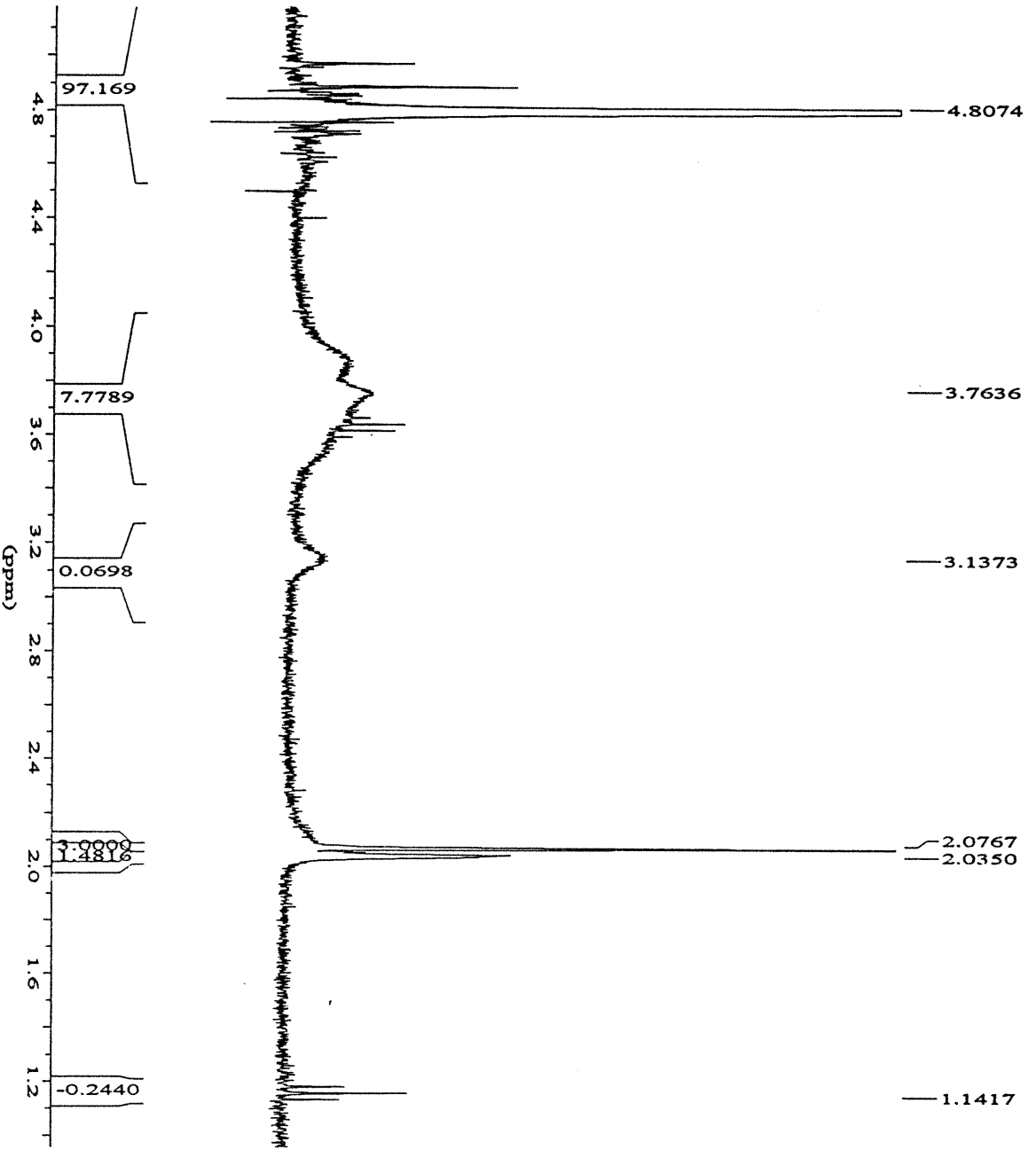
Res = 4 cm-1 21 scans/min

Apod = Cosine



Transmittance / Wavenumber (cm-1)

Chitoacétique



*** Current Data Parameters ***

NAME : phanaco
 EXPNO : 2
 PROCNO : 1

*** Acquisition Parameters ***

D[1] : 4.0000000 sec
 D[10] : 0.0000000 sec
 DATE_d : Dec 12 1998
 INSTRUM : amx300
 NS : 24
 SOLVENT : D2O

*** Processing Parameters ***

PHC0 : 111.644 degree
 PHC1 : 16.800 degree
 PPARAMOD : -ID

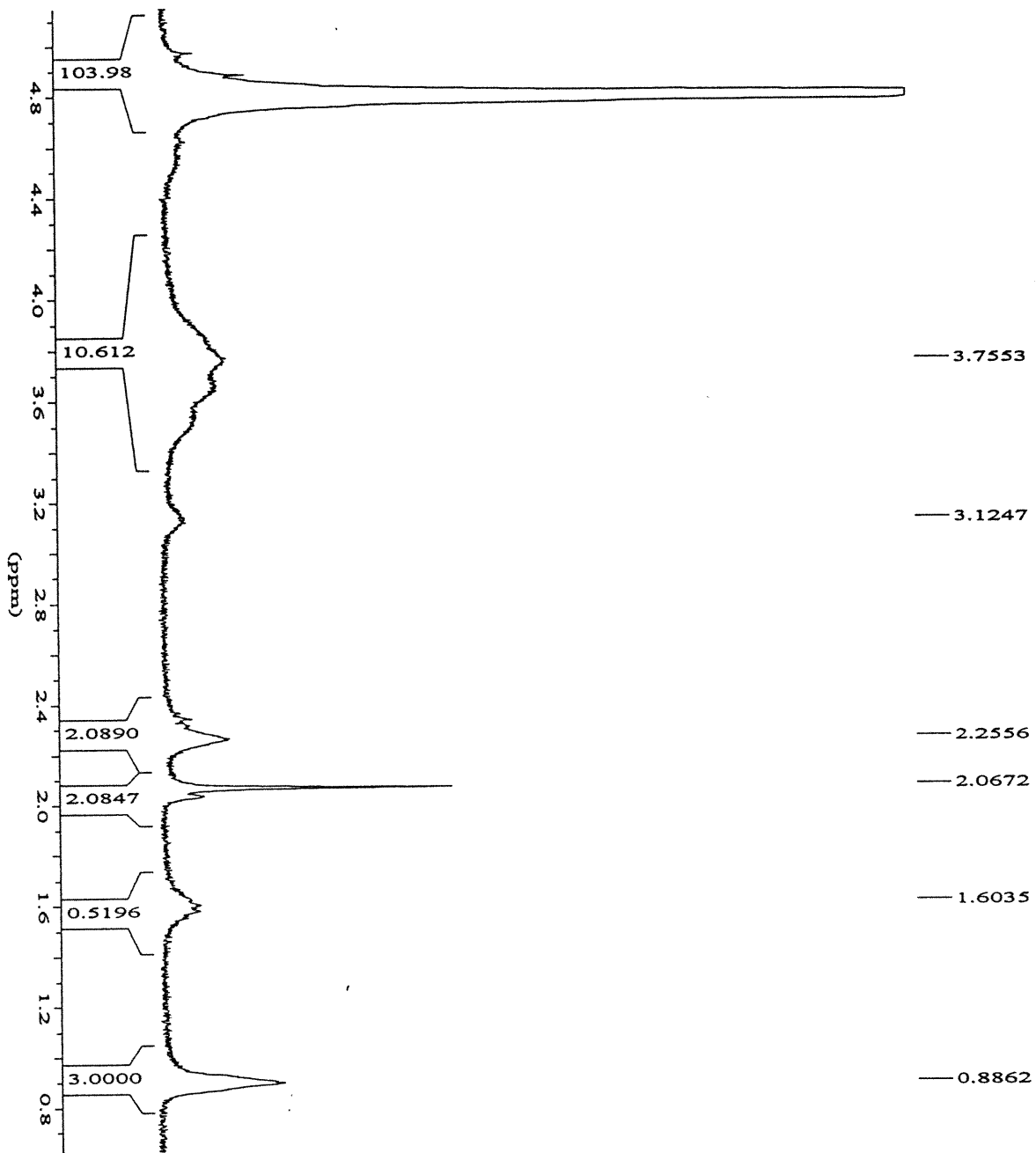
SF : 300.1340940 MHz

*** 1D NMR Plot Parameters ***

Height : 13.52 cm
 Width : 19.10 cm
 XOffset : 1.00 cm
 YOffset : 3.50 cm
 Start : 5.18 ppm
 Stop : 0.96 ppm
 Offset : 20.19 %
 YScale : 0.80 %
 SR : 4094.03 Hz
 Vay : 2275962.50
 xstart : 14156
 xstop : 27945
 BaseInt : 3080156280



chitosane-butyrrique



*** Current Data Parameters ***

NAME : phanaco
 EXPNO : 4
 PROCNO : 1

*** Acquisition Parameters ***

D[1] : 4.0000000 sec
 D[10] : 0.0000000 sec
 DATE_d : Dec 12 1998
 INSTRUM : amx300
 NS : 24
 SOLVENT : D2O

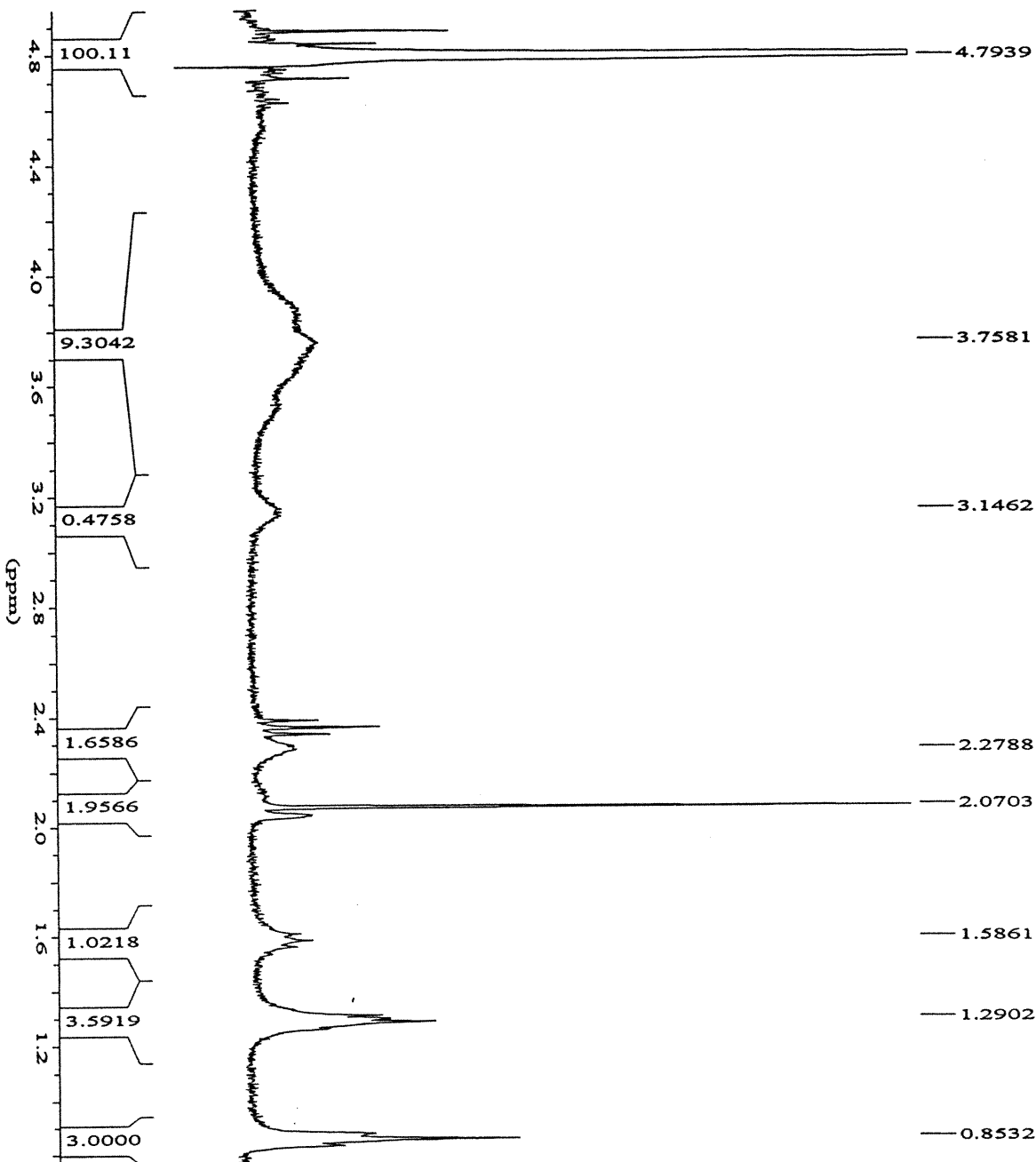
*** Processing Parameters ***

PHC0 : 111.356 degree
 PHC1 : 16.800 degree
 PPARMOD : ID
 SF : 300.1340940 MHz

*** ID NMR Plot Parameters ***

Height : 13.52 cm
 Width : 19.10 cm
 XOffset : 1.00 cm
 YOffset : 3.50 cm
 Start : 5.15 ppm
 Stop : 0.62 ppm
 Offset : 2.73 %
 YScale : 6.49 %
 SR : 4094.03 Hz
 vxy : 19717746.00
 xstart : 14261
 xstop : 29046
 Baseint : 14403681464

chitosane-caproïque



*** Current Data Parameters ***

NAME : phamaco
 EXPNO : 3
 PROCNO : 1

*** Acquisition Parameters ***

D[1] : 4.0000000 sec
 D[10] : 0.0000000 sec
 DATE_d : Dec 12 1998
 INSTRUM : amx300
 NS : 24
 SOLVENT : D2O

*** Processing Parameters ***

PHC0 : 111.356 degree
 PHC1 : 16.800 degree
 PPRMOD : ID

SF : 300.1340940 MHz

*** 1D NMR Plot Parameters ***

Height : 13.52 cm
 Width : 19.10 cm
 XOffset : 1.00 cm
 YOffset : 3.50 cm
 Start : 4.96 ppm
 Stop : 0.76 ppm
 Offset : 14.25 %
 YScale : 1.52 %
 SR : 4094.03 Hz
 vav : 6734272.00
 xstart : 14863
 xstop : 28586
 Baseline : 6332944575