

2021-2022

Mémoire du **Diplôme d'études spécialisées de pharmacie hospitalière, pratique et recherche**
tenant lieu de

Thèse

pour le

Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie

**Facteurs influençant la cinétique de
dégradation de l'amoxicilline et de l'acide
clavulanique en solution et en suspension**

--

**Factors influencing the degradation kinetics of
amoxicillin and clavulanic acid in solution and
suspension**

PETIT Maxime

Né le 13 août 1993 à Besançon (25)

Sous la direction de M. le Professeur LAGARCE Frédéric

Membres du jury

Pr DUVAL Olivier | Président

Pr LAGARCE Frédéric | Directeur

Pr DUPUIS Antoine | Membre extérieur

Dr JORDY Arnaud | Membre

Soutenue publiquement le :
3 octobre 2022



**FACULTÉ
DE SANTÉ**

UNIVERSITÉ D'ANGERS

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné **Maxime PETIT**, déclare être pleinement conscient que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.

Signature :





**FACULTÉ
DE SANTÉ**

UNIVERSITÉ D'ANGERS

"La Faculté de Santé déclare que les opinions émises dans les thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation, ni improbation."



LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTÉ DE SANTÉ D'ANGERS

Doyen de la Faculté : Pr Nicolas Lerolle

Vice-Doyen de la Faculté et directeur du département de pharmacie : Pr Frédéric Lagarce

Directeur du département de médecine : Pr Cédric Annweiler

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

ABRAHAM Pierre	Physiologie	Médecine
ANNWEILER Cédric	Gériatrie et biologie du vieillissement	Médecine
ASFAR Pierre	Réanimation	Médecine
AUBE Christophe	Radiologie et imagerie médicale	Médecine
AUGUSTO Jean-François	Néphrologie	Médecine
BAUFRETON Christophe	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire	Médecine
BELLANGER William	Médecine Générale	Médecine
BENOIT Jean-Pierre	Pharmacotechnie	Pharmacie
BIGOT Pierre	Urologie	Médecine
BONNEAU Dominique	Génétique	Médecine
BOUCHARA Jean-Philippe	Parasitologie et mycologie	Médecine
BOUET Pierre-Emmanuel	Gynécologie-obstétrique	Médecine
BOUVARD Béatrice	Rhumatologie	Médecine
BOURSIER Jérôme	Gastroentérologie ; hépatologie	Médecine
BRIET Marie	Pharmacologie	Médecine
CALES Paul	Gastroentérologie ; hépatologie	Médecine
CAMPONE Mario	Cancérologie ; radiothérapie	Médecine
CAROLI-BOSC François-Xavier	Gastroentérologie ; hépatologie	Médecine
CONNAN Laurent	Médecine générale	Médecine
COPIN Marie-Christine	Anatomie et cytologie pathologiques	Médecine
COUTANT Régis	Pédiatrie	Médecine
CUSTAUD Marc-Antoine	Physiologie	Médecine
DE CASABIANCA Catherine	Médecine Générale	Médecine
DESCAMPS Philippe	Gynécologie-obstétrique	Médecine
D'ESCATHA Alexis	Médecine et santé au travail	Médecine
DINOMAIS Mickaël	Médecine physique et de réadaptation	Médecine
DIQUET Bertrand	Pharmacologie	Médecine
DUBEE Vincent	Maladies Infectieuses et Tropicales	Médecine
DUCANCELLE Alexandra	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière	Médecine
DUVAL Olivier	Chimie thérapeutique	Pharmacie
DUVERGER Philippe	Pédopsychiatrie	Médecine
EVEILLARD Mathieu	Bactériologie-virologie	Pharmacie
FAURE Sébastien	Pharmacologie physiologie	Pharmacie
FOURNIER Henri-Dominique	Anatomie	Médecine
FURBER Alain	Cardiologie	Médecine
GAGNADOUX Frédéric	Pneumologie	Médecine
GOHIER Bénédicte	Psychiatrie d'adultes	Médecine
GUARDIOLA Philippe	Hématologie ; transfusion	Médecine
GUILET David	Chimie analytique	Pharmacie
GUITTON Christophe	Médecine intensive-réanimation	Médecine
HAMY Antoine	Chirurgie générale	Médecine
HENNI Samir	Médecine Vasculaire	Médecine
HUNAUULT-BERGER Mathilde	Hématologie ; transfusion	Médecine
IFRAH Norbert	Hématologie ; transfusion	Médecine
JEANNIN Pascale	Immunologie	Médecine
KEMPF Marie	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière	Médecine
LACOURREYE Laurent	Oto-rhino-laryngologie	Médecine
LAGARCE Frédéric	Biopharmacie	Pharmacie
LARCHER Gérald	Biochimie et biologie moléculaires	Pharmacie
LASOCKI Sigismond	Anesthésiologie-réanimation	Médecine
LEGENDRE Guillaume	Gynécologie-obstétrique	Médecine
LEGRAND Erick	Rhumatologie	Médecine
LERMITE Emilie	Chirurgie générale	Médecine



FACULTÉ DE SANTÉ

UNIVERSITÉ D'ANGERS

LEROLLE Nicolas	Réanimation	Médecine
LUNEL-FABIANI Françoise	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière	Médecine
MARCHAIS Véronique	Bactériologie-virologie	Pharmacie
MARTIN Ludovic	Dermato-vénéréologie	Médecine
MAY-PANLOUP Pascale	Biologie et médecine du développement et de la reproduction	Médecine
MENEI Philippe	Neurochirurgie	Médecine
MERCAT Alain	Réanimation	Médecine
PAPON Nicolas	Parasitologie et mycologie médicale	Pharmacie
PASSIRANI Catherine	Chimie générale	Pharmacie
PELLIER Isabelle	Pédiatrie	Médecine
PETIT Audrey	Médecine et Santé au Travail	Médecine
PICQUET Jean	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire	Médecine
PODEVIN Guillaume	Chirurgie infantile	Médecine
PROCACCIO Vincent	Génétique	Médecine
PRUNIER Delphine	Biochimie et Biologie Moléculaire	Médecine
PRUNIER Fabrice	Cardiologie	Médecine
REYNIER Pascal	Biochimie et biologie moléculaire	Médecine
RICHARD Isabelle	Médecine physique et de réadaptation	Médecine
RICHOME Pascal	Pharmacognosie	Pharmacie
RODIEN Patrice	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques	Médecine
ROQUELAURE Yves	Médecine et santé au travail	Médecine
ROUGE-MAILLART Clotilde	Médecine légale et droit de la santé	Médecine
ROUSSEAU Audrey	Anatomie et cytologie pathologiques	Médecine
ROUSSEAU Pascal	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique	Médecine
ROUSSELET Marie-Christine	Anatomie et cytologie pathologiques	Médecine
ROY Pierre-Marie	Médecine d'urgence	Médecine
SAULNIER Patrick	Biophysique et Biostatistiques	Pharmacie
SERAPHIN Denis	Chimie organique	Pharmacie
SCHMIDT Aline	Hématologie ; transfusion	Médecine
TRZEPIZUR Wojciech	Pneumologie	Médecine
UGO Valérie	Hématologie ; transfusion	Médecine
URBAN Thierry	Pneumologie	Médecine
VAN BOGAERT Patrick	Pédiatrie	Médecine
VENARA Aurélien	Chirurgie viscérale et digestive	Médecine
VENIER-JULIENNE Marie-Claire	Pharmacotechnie	Pharmacie
VERNY Christophe	Neurologie	Médecine
WILLOTEAUX Serge	Radiologie et imagerie médicale	Médecine

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

ANGOULVANT Cécile	Médecine Générale	Médecine
BAGLIN Isabelle	Chimie thérapeutique	Pharmacie
BASTIAT Guillaume	Biophysique et Biostatistiques	Pharmacie
BEAUVILLAIN Céline	Immunologie	Médecine
BEGUE Cyril	Médecine générale	Médecine
BELIZNA Cristina	Médecine interne	Médecine
BELONCLE François	Réanimation	Médecine
BENOIT Jacqueline	Pharmacologie	Pharmacie
BESSAGUET Flavien	Physiologie Pharmacologie	Pharmacie
BIERE Loïc	Cardiologie	Médecine
BLANCHET Odile	Hématologie ; transfusion	Médecine
BOISARD Séverine	Chimie analytique	Pharmacie
BRIET Claire	Endocrinologie, Diabète et maladies métaboliques	Médecine
BRIS Céline	Biochimie et biologie moléculaire	Pharmacie
CAPITAIN Olivier	Cancérologie ; radiothérapie	Médecine
CASSEREAU Julien	Neurologie	Médecine
CHEVALIER Sylvie	Biologie cellulaire	Médecine
CLERE Nicolas	Pharmacologie / physiologie	Pharmacie
COLIN Estelle	Génétique	Médecine
DERBRE Séverine	Pharmacognosie	Pharmacie
DESHAYES Caroline	Bactériologie virologie	Pharmacie
FERRE Marc	Biologie moléculaire	Médecine
FORTRAT Jacques-Olivier	Physiologie	Médecine
GUELFF Jessica	Médecine Générale	Médecine



FACULTÉ DE SANTÉ

UNIVERSITÉ D'ANGERS

HAMEL Jean-François	Biostatistiques, informatique médicale	Médicale
HELESBEUX Jean-Jacques	Chimie organique	Pharmacie
HERIVAUX Anaïs	Biotechnologie	Pharmacie
HINDRE François	Biophysique	Médecine
JOUSSET-THULLIER Nathalie	Médecine légale et droit de la santé	Médecine
JUDALET-ILLAND Ghislaine	Médecine générale	Médecine
KHIATI Salim	Biochimie et biologie moléculaire	Médecine
KUN-DARBOIS Daniel	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie	Médecine
LACOEUILLE Franck	Radiopharmacie	Pharmacie
LANDREAU Anne	Botanique/ Mycologie	Pharmacie
LEBDAI Souhil	Urologie	Médecine
LEGEAY Samuel	Pharmacocinétique	Pharmacie
LEMEE Jean-Michel	Neurochirurgie	Médecine
LE RAY-RICHOMME Anne-Marie	Pharmacognosie	Pharmacie
LEPELTIER Elise	Chimie générale	Pharmacie
LETOURNEL Franck	Biologie cellulaire	Médecine
LIBOUBAN Hélène	Histologie	Médecine
LUQUE PAZ Damien	Hématologie biologique	Médecine
MABILLEAU Guillaume	Histologie, embryologie et cytogénétique	Médecine
MALLET Sabine	Chimie Analytique	Pharmacie
MAROT Agnès	Parasitologie et mycologie médicale	Pharmacie
MESLIER Nicole	Physiologie	Médecine
MIOT Charline	Immunologie	Médecine
MOUILLIE Jean-Marc	Philosophie	Médecine
NAIL BILLAUD Sandrine	Immunologie	Pharmacie
PAILHORIES Hélène	Bactériologie-virologie	Médecine
PAPON Xavier	Anatomie	Médecine
PASCO-PAPON Anne	Radiologie et imagerie médicale	Médecine
PECH Brigitte	Pharmacotechnie	Pharmacie
PENCHAUD Anne-Laurence	Sociologie	Médecine
PIHET Marc	Parasitologie et mycologie	Médecine
POIROUX Laurent	Sciences infirmières	Médecine
PY Thibaut	Médecine Générale	Médecine
RAMOND-ROQUIN Aline	Médecine Générale	Médecine
RINEAU Emmanuel	Anesthésiologie réanimation	Médecine
RIOU Jérémie	Biostatistiques	Pharmacie
RIQUIN Elise	Pédopsychiatrie ; addictologie	Médecine
ROGER Emilie	Pharmacotechnie	Pharmacie
SAVARY Camille	Pharmacologie-Toxicologie	Pharmacie
SCHMITT Françoise	Chirurgie infantile	Médecine
SCHINKOWITZ Andréas	Pharmacognosie	Pharmacie
SPIESSER-ROBELET Laurence	Pharmacie Clinique et Education Thérapeutique	Pharmacie
TESSIER-CAZENEUVE Christine	Médecine Générale	Médecine
TEXIER-LEGENDRE Gaëlle	Médecine Générale	Médecine
VIAULT Guillaume	Chimie organique	Pharmacie

AUTRES ENSEIGNANTS

PRCE

AUTRET Erwan	Anglais	Médecine
BARBEROUSSE Michel	Informatique	Médecine
BRUNOIS-DEBU Isabelle	Anglais	Pharmacie
FISBACH Martine	Anglais	Médecine
O'SULLIVAN Kayleigh	Anglais	Médecine

PAST

CAVAILLON Pascal	Pharmacie Industrielle	Pharmacie
DILÉ Nathalie	Officine	Pharmacie
MOAL Frédéric	Pharmacie clinique	Pharmacie
PAPIN-PUREN Claire	Officine	Pharmacie
SAVARY Dominique	Médecine d'urgence	Médecine

PLP

CHIKH Yamina	Economie-gestion	Médecine
--------------	------------------	----------

Remerciements

Monsieur Olivier DUVAL, Professeur des universités et Praticien Hospitalier au CHU d'Angers

Pour avoir accepté de présider ce jury et de juger mes travaux, veuillez accepter toute ma reconnaissance et mes remerciements respectueux.

Monsieur Frédéric LAGARCE, Professeur des universités et Praticien Hospitalier au CHU d'Angers,

Pour avoir été à l'initiative de ce projet d'année-recherche, pour m'avoir fait l'honneur de diriger cette thèse, pour tout le temps que vous m'avez accordé, veuillez accepter toute ma reconnaissance et mes remerciements respectueux.

Monsieur Antoine DUPUIS, Professeur des universités et Praticien Hospitalier au CHU de Poitiers,

Pour avoir accepté de prendre part à ce jury, je vous adresse toute ma gratitude.

Monsieur Arnaud JORDY, Assistant spécialiste au CHU d'Angers,

Pour avoir accepté de prendre part à ce jury, je t'adresse toute ma gratitude.

A toute l'équipe du laboratoire de pharmaco-toxicologie du CHRU de Tours : Merci de m'avoir si bien accueilli. Un merci particulier au Pr. Gilles Paintaud pour m'avoir permis de découvrir le monde de la biologie médicale dans votre service, au Dr François Darrouzain pour ta transmission de connaissances et m'avoir encadré dans le projet pour le master de contrôle qualité, au Dr Olivier le Tilly pour tes cours aux petits oignons, à Laurie Charles pour m'avoir formé sur l'ICP dans la bonne humeur.

A toute l'équipe du préparatoire, du laboratoire de contrôle, de la nutrition parentérale du CHU d'Angers : Merci pour ces années à vos côtés. Je remercie particulièrement Audrey Bourges pour ton aide technique et ta bonne humeur.

Merci aux pharmaciens avec qui j'ai eu la chance de travailler, Dr Vincent Lebreton, Dr Sandy Vrignaud, Dr Stéphanie Provôt, Dr Sonia Mitreski, Dr Julie Forget, pour toutes les connaissances que vous m'avez transmises. Je te remercie particulièrement Vincent, pour m'avoir partagé ta passion pour le contrôle et les études de stabilité, pour ta disponibilité et tes conseils avisés.

Merci aux enseignants-chercheurs de la faculté de pharmacie de Besançon pour m'avoir partagé votre passion pour vos différentes disciplines. Je ne serais pas là sans vous.

Merci à M. Dewilde, professeur de physique-chimie au lycée Edgar Faure, pour avoir été le seul à être confiant en ma réussite en PACES et le premier à m'évoquer les préparations en pharmacie hospitalière. Vous aviez vu clair dans mon avenir.

Aux internes et étudiants des masters de pharmacotechnie de Bordeaux et de contrôle qualité de Nantes, merci pour avoir égayé ces deux années très chargées.

A mes parents, ma sœur et mon frère, merci pour m'avoir soutenu durant ces longues études et pour tous les très bons moments passés ensemble.

A mes grands-parents, oncles et tantes, cousins et cousines.

A tous les co-internes rencontrés durant ces cinq années, aux compagnons de Bucks et aux week-ends chez mamie chat, merci.

A mes amis de longue date, Emeric, Kevin, Brady, Louis, merci pour ces moments mémorables passés ensemble.

Et à toi Lauriane, pour tout ce que tu m'offre en partageant ta vie avec moi, merci. En espérant que l'avenir soit encore meilleur.

Sommaire

Liste des abréviations.....	11
1. Introduction générale	12
1.1. Propriétés physico-chimiques	12
1.1.1. Amoxicilline	12
1.1.2. Acide clavulanique.....	14
1.2. Propriétés pharmacodynamiques	15
1.2.1. Amoxicilline	15
1.2.2. Acide clavulanique.....	15
1.3. Propriétés pharmacocinétiques	16
1.4. Posologies.....	16
1.4.1. Amoxicilline seule.....	17
1.4.2. Amoxicilline et acide clavulanique	17
1.4.2.1. Voie orale	17
1.4.2.2. Voie intraveineuse	17
1.5. Place de l'amoxicilline avec ou sans acide clavulanique dans le traitement des infections .	17
1.5.1. Amoxicilline	18
1.5.1.1. Spectre utile	18
1.5.1.2. Indications.....	18
1.5.2. Amoxicilline et acide clavulanique	19
1.5.2.1. Spectre utile	19
1.5.2.2. Indications.....	19
1.6. Stabilité des médicaments à base d'amoxicilline avec ou sans acide clavulanique en solution et suspension.....	20
1.6.1. Suspension buvable.....	20
1.6.2. Solution injectable.....	20
1.6.3. Conclusion	21
1.7. Les préparations	21
1.8. Méthodes d'analyse	22
1.8.1. La chromatographie liquide haute performance	23
1.8.2. La spectrophotométrie UV à barrette de diode.....	24
1.8.3. La spectrométrie de masse	25

2. Submitted original paper : Degradation kinetics of amoxicillin and clavulanic acid in suspension and solution.....	27
2.1. Abstract :	27
2.2. Introduction.....	28
2.3. Materials and methods	29
2.3.1. Materials.....	29
2.3.2. HPLC method parameters	30
2.3.1. Preparation of the mobile phases	30
2.3.2. Preparation of AMX or CLAV or AMX/CLAV solutions.....	30
2.3.3. Preparation of AMX or AMX/CLAV suspensions	31
2.3.4. Sample preparation before analysis.....	32
2.3.5. Analysis and sampling times.....	32
2.3.6. HPLC Method validation.....	33
2.3.6.1. Amoxicillin determination	34
2.3.6.2. Clavulanate determination	34
2.3.6.3. Selectivity	35
2.3.7. Mass detection	38
2.3.8. Analysis of results.....	38
2.4. Results	38
2.5. Discussion	43
2.5.1. Identification of degradation products	43
2.5.2. Kinetic order	45
2.5.3. Degradation speed	46
2.6. Conclusion	47
3. Discussion générale	48
4. Conclusion générale.....	50
Références bibliographiques.....	51
Table des illustrations	55
Table des tableaux.....	55

Liste des abréviations

AMX : amoxicillin

BCS : biopharmaceutics classification system

BPP : bonnes pratiques de préparations

C : concentration

C₀ : initial concentration

CLAV : clavulanate

CV : coefficient of variation

CSP : code de santé publique

DP : degradation product(s)

EP : european pharmacopeia

HPLC : chromatographie liquide haute performance

HPLC-DAD : chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur UV à barrette de diode

HPLC-MS : chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse

IUPAC : international union of pure and applied chemistry

LOD : limit of detection

LOQ : limit of quantification

MS : mass spectrometry

DAD : diode array detector

PLP : protéine liant les pénicillines

pK_a : constante d'acidité

R² : determination coefficient

UV : ultraviolet

1. Introduction générale

Les préparations buvables en solution ou suspension sont très utilisées à l'hôpital chez les patients pour lesquels des formes solides sont inadaptées (troubles de la déglutition, pédiatrie, ...). Les études de stabilité de ces préparations sont longues à mener et il est impossible de prévoir leurs résultats. Réaliser une étude de cinétique de dégradation permet de mieux comprendre les facteurs qui influencent la dégradation d'une substance active et donc de pouvoir prévoir sa stabilité en fonction du milieu voire maîtriser sa stabilité en fonction du choix de la formulation. L'étude réalisée a pu étudier différents de ces facteurs sur la vitesse de dégradation et l'ordre de la cinétique. Aussi, cette étude a permis d'identifier les produits de dégradations obtenus pour connaître les mécanismes réactionnels mis en jeu. L'utilisation d'une chaîne de chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur ultra-violet et un spectromètre de masse a permis de doser les substances actives étudiées et d'identifier les produits de dégradations.

1.1. Propriétés physico-chimiques

1.1.1. Amoxicilline

L'amoxicilline a une fonction base faible (amine) et une fonction acide faible (acide carboxylique). Elle a pour formule brute $C_{16}H_{19}N_3O_5S$. Sa masse moléculaire moyenne est de 365,404g/mol et sa masse monoisotopique de 365,105g/mol, elle a un point de fusion de 194°C, et deux constantes d'acidité (pKa) de 3,23 et 7,22. Son LogP=0,87 donc elle est relativement amphiphile. Son nom IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) est le (2*S*,5*R*,6*R*)-6-[[[(2*R*)-2-amino-2-(4-hydroxyphenyl)acetyl]amino]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid (figure 1)(1,2).

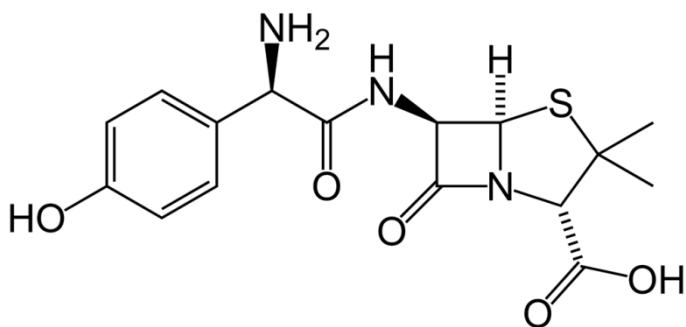


Figure 1 : Structure chimique de l'amoxicilline(1).

C'est un composé organique appartenant à la classe des pénicillines. Leur caractéristique structurelle est le groupement pénème, dérivé du noyau bêta-lactame. La pénicilline G est la première des pénicillines développée. Elle a un cycle benzenique en position latérale et n'agit que sur les bactéries gram positif. L'ajout d'un groupement amine en alpha du carbonyl inter cyclique permet plusieurs améliorations : c'est l'avènement des aminopénicillines ou pénicillines A. L'ampicilline est son premier représentant. Elle a un spectre plus large incluant certaines bactéries gram négatif et sa stabilité en milieu acide est augmentée. La prise d'ampicilline per os est possible contrairement à la pénicilline G. Enfin, l'ajout d'un hydroxyl en para du cycle benzénique aboutit à l'amoxicilline, cette modification entraîne une amélioration de la biodisponibilité par rapport à l'ampicilline(3).

Deux monographies d'amoxicilline se trouvent dans la pharmacopée européenne : une pour la forme d'amoxicilline trihydratée, une pour l'amoxicilline sodique. L'amoxicilline sodique a un aspect de poudre blanche ou sensiblement blanche, elle est très hygroscopique. Elle est très soluble dans l'eau, assez soluble dans l'éthanol anhydre et très peu soluble dans l'acétone. L'amoxicilline trihydratée a un aspect de poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche. Elle est peu soluble dans l'eau, très peu soluble dans l'éthanol à 96%, pratiquement insoluble dans les huiles grasses. Elle se dissout dans les acides dilués et dans les solutions dilués d'hydroxydes alcalins(4).

Le système de classification Biopharmaceutics Classification System (BCS) permet d'estimer la biodisponibilité *in vivo* des substances actives en se basant sur leur solubilité dans l'eau et leur perméabilité intestinale. Il définit 4 classes de substances actives (figure 2). Une substance active est considérée comme ayant une haute solubilité lorsque la dose administrable maximale par libération immédiate est soluble dans 250mL d'un milieu

aqueux avec un pH allant de 1 à 6,8 à $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Quand plus de 85% de la dose de substance active initialement administrée est absorbée à travers la barrière intestinale, elle présente une haute perméabilité(5).



Perméabilité 	Classe II Faible solubilité Haute perméabilité	Classe I Haute solubilité Haute perméabilité
	Classe IV Faible solubilité Faible perméabilité	Classe III Haute solubilité Faible perméabilité
	Solubilité 	

Figure 2 : Représentation du système de classification biopharmaceutique (BCS).

La forme orale d'amoxicilline est l'amoxicilline trihydratée. Elle appartient à différentes classes BCS en fonction de la dose. Jusqu'à 875mg, elle appartient à la classe I, à 1000mg elle appartient à la classe II, tandis qu'au-dessus de 1000mg elle appartient à la classe BCS IV(6).

1.1.2. Acide clavulanique

L'acide clavulanique est un acide faible de formule brute $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_5$ (figure 3). Sa masse moléculaire moyenne est de 199,1608g/mol et sa masse monoisotopique de 199,0481g/mol, il a un point de fusion de $117,5\text{-}188^\circ\text{C}$, et une constante d'acidité (pK_a) de 2,7. Son $\text{LogP} = -2,3$ ou -1,5 selon les sources donc il est plutôt hydrophile. Son nom IUPAC est le ((2R,3Z,5R)-3-(2-hydroxyethylidene)-7-oxo-4-oxa-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid(figure 3)(7,8).

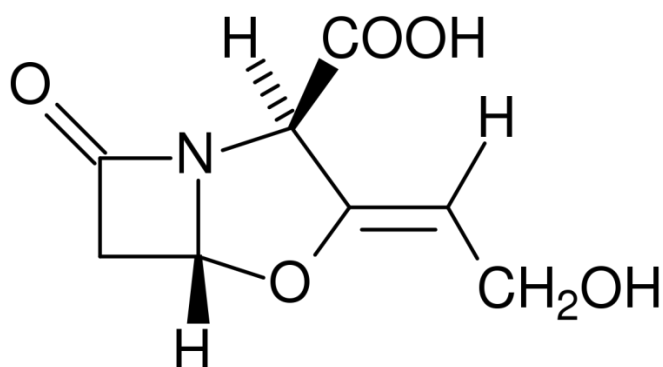


Figure 3 : Structure chimique de l'acide clavulanique(7).

Sa caractéristique structurale est le groupement clavame, dérivé du noyau bêta-lactame.

Dans la pharmacopée européenne la monographie est celle du clavulanate de potassium. Il a un aspect de poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, hygroscopique. Il est facilement soluble dans l'eau, peu soluble dans l'éthanol à 96%, très peu soluble dans l'acétone (4). Le clavulanate de potassium fait partie de la classe BCS III.

1.2. Propriétés pharmacodynamiques

1.2.1. Amoxicilline

L'amoxicilline comme toutes les bêta lactamines, inhibe la synthèse de la paroi bactérienne en entrant en compétition avec la protéine liant les pénicillines (PLP) de la voie de biosynthèse du peptidoglycane, composant essentiel de la paroi bactérienne. Cela va mener à la lyse des bactéries. L'amoxicilline est un antibiotique bactéricide. L'amoxicilline peut être dégradée par des enzymes bactériennes : les bêta-lactamases. Son spectre d'action est donc dépendant de la production ou non de ces enzymes par les bactéries, et de la modification des PLP qui réduit l'affinité de l'amoxicilline pour la cible(9).

1.2.2. Acide clavulanique

L'acide clavulanique inhibe certaines enzymes bêta-lactamases et évite ainsi la lyse de l'amoxicilline. L'acide clavulanique n'a pas d'effet antibiotique utilisé seul.

Lorsqu'elle est co-administrée avec de l'acide clavulanique, le spectre de l'amoxicilline s'étant à certaines bactéries produisant des bêta-lactamases(9).

1.3. Propriétés pharmacocinétiques

D'après les résumés caractéristiques du produit (RCP) des différents médicaments à base d'amoxicilline +/- acide clavulanique disponibles sur le répertoire des spécialités pharmaceutiques de l'ANSM(10), après administration par voie orale, l'amoxicilline et l'acide clavulanique sont rapidement absorbés. L'absorption est d'environ 70% pour les deux principes actifs. Les profils plasmatiques sont proches et la T_{max} est d'environ 1h. Les concentrations sériques d'amoxicilline et d'acide clavulanique avec l'association amoxicilline et acide clavulanique sont similaires à celles après administration de doses équivalente d'amoxicilline ou d'acide clavulanique seuls. L'amoxicilline et l'acide clavulanique sont liés aux protéines plasmatiques à hauteur de 18 et 25% respectivement. Leur volume apparent de distribution est de 0,3 à 0,4L/kg pour l'amoxicilline et 0,2L/kg pour l'acide clavulanique. L'amoxicilline est excrétée dans l'urine sous forme d'acide pénicilloïque inactif à hauteur de 10 à 25%. L'acide clavulanique est largement métabolisé et éliminé dans les urines et les selles. Une partie est éliminée sous forme de dioxyde de carbone dans l'air expiré.

La principale voie d'élimination de l'amoxicilline est rénale, tandis que l'acide clavulanique est éliminé à la fois par des mécanismes rénaux et non rénaux.

L'association amoxicilline/acide clavulanique possède une demi-vie d'élimination moyenne d'environ une heure et une clairance totale moyenne d'environ 25L/h chez les sujets sains.

La demi-vie d'élimination de l'amoxicilline chez les jeunes enfants âgés d'environ 3 mois à 2 ans est semblable à celle des enfants plus âgés et des adultes. Chez les très jeunes enfants (y compris les nouveau-nés prématurés), pendant la première semaine de vie, l'administration doit se limiter à deux fois par jour en raison de l'immaturité de la voie d'élimination rénale.

1.4. Posologies

Les posologies varient en fonction du site de l'infection et la sévérité de l'infection, du germe en cause et de sa sensibilité probable, du contexte local et du patient (âge, poids, fonction rénale).

1.4.1. Amoxicilline seule

Pour le traitement des endocardites infectieuses communautaires en probabliste ou à entérocoques, il est recommandé d'utiliser l'amoxicilline à 12g par jour en association à d'autres antibiotiques(11).

Les posologies issues des RCP des médicaments contenant de l'amoxicilline seule chez l'adulte vont de 250mg 3 fois par jour à 2g 2 à 3 fois par jour en fonction de l'indication. En pédiatrie, la posologie est de 20 à 200mg/kg/jour en 2 à 3 prises par jour(10).

1.4.2. Amoxicilline et acide clavulanique

1.4.2.1. Voie orale

La posologie de l'adulte ou de l'enfant de plus de 40kg est de 1g/125mg d'amoxicilline/acide clavulanique 2 à 3 fois par jour. La posologie de l'enfant de moins de 40kg est de 40mg/5mg d'amoxicilline/acide clavulanique par kilo et par jour à 80mg/10mg d'amoxicilline/acide clavulanique par kilo et par jour en trois prises par jour, selon la sévérité de l'infection(10).

1.4.2.2. Voie intraveineuse

La posologie de l'adulte ou de l'enfant de plus de 40g est de 1g/100mg d'amoxicilline/acide clavulanique 2 à 3 fois par jour ou 2g/200mg d'amoxicilline/acide clavulanique 2 fois par jour. La posologie de l'enfant de moins de 40kg sera de 50mg/5 mg d'amoxicilline/acide clavulanique par kilo toute les 8h chez l'enfant de plus de 3 mois et de 50mg/5mg d'amoxicilline/acide clavulanique par kilo toute les 12h chez l'enfant de moins 3 mois(10).

1.5. Place de l'amoxicilline avec ou sans acide clavulanique dans le traitement des infections

L'amoxicilline seule et l'association d'amoxicilline et d'acide clavulanique font partie de la liste des médicaments essentiels de l'organisation mondiale de la santé (revue en 2019) par voie orale comme par voie parentérale(12).

D'après les données de consommation française et européenne des antibiotiques, l'amoxicilline est l'antibiotique le plus consommé(13,14).

1.5.1. Amoxicilline

1.5.1.1. Spectre utile

Les espèces habituellement sensibles sont *Actinomyces*, *Bartonella*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia*, *Capnocytophaga*, *Clostridium*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Eikenella*, *Enterococcus faecalis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter pylori*, *Leptospira*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Nocardia asteroides*, *Pasteurella multocida*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas orphyromonas*, *Prevotella*, *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus* A, B, C, F, G et non groupables, *Streptococcus pneumoniae*, *Treponema*, *Veillonella*, *Vibrio cholerae/orphyromonas*(15).

Les espèces possiblement sensibles après validation par un antibiogramme sont *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella*, *Shigella*(15).

Une espèce est modérément sensible (*in vitro* de sensibilité intermédiaire) : *Enterococcus faecium*(15).

1.5.1.2. Indications

Les indications suivantes sont valables pour les infections dues aux germes définis comme sensibles.

L'amoxicilline est indiquée dans les pneumopathies aiguës, surinfections de bronchites aiguës et exacerbation de bronchites chroniques, infections ORL (otite, sinusite, angine documentée à streptocoque A bêta-hémolytique) et stomatologiques, infections urinaires, infections génitales masculines et infections gynécologiques, infections digestives et biliaires, en association à un autre antibiotique (clarithomycine ou imidazolé) et à un antisécrétoire dans l'éradication de *Helicobacter pylori* en cas de maladie ulcéreuse gastro-duodénale, endocardites, septicémies, méningites, de maladie de Lyme : traitement de la phase primaire (érythème chronique migrant) et de la phase primo-secondaire (érythème chronique migrant associé à des signes généraux : asthénie, céphalées, fièvre, arthralgies...) et comme traitement prophylactique de l'endocardite bactérienne(15,16).

1.5.2. Amoxicilline et acide clavulanique

1.5.2.1. Spectre utile

L'association permet l'élargissement du spectre de l'amoxicilline sur les germes suivants : Staphylocoques méticilline-sensibles, *Moraxella catarrhalis*, *Salmonella*, *Shigella*, *Bacteroides* sp, Gram (-) sécréteurs de β -lactamases, sur données de l'antibiogramme : *Haemophilus*, entérobactéries (*E.coli*, *Klebsiella pneumoniae/oxytoca*, *Proteus mirabilis/vulgaris*)(17).

L'association amoxicilline/acide clavulanique est inefficace sur les bacilles Gram (-) non fermentants (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*)(17).

L'association amoxicilline/acide clavulanique n'apporte pas d'avantage sur les streptocoques, les entérocoques et *listeria* par rapport à l'amoxicilline. Il n'est pas plus efficace que l'amoxicilline sur le pneumocoque(17).

1.5.2.2. Indications

L'association d'amoxicilline avec acide clavulanique est indiquée dans les otites moyennes aiguës en cas d'échec d'un traitement par amoxicilline, sinusites maxillaires aiguës si échec de l'amoxicilline ou sinusite maxillaire d'origine dentaire ou autres formes de sinusites (frontales, ethmoïdales, sphénoïdales), surinfections de bronchites aiguës du patient à risque, notamment éthylique chronique, tabagique, âgé de plus de 65 ans, en cas de risque évolutif ou en seconde intention, exacerbations de bronchopneumopathies chroniques, pneumopathies aiguës non graves du sujet avec comorbidités ou présentant des troubles de déglutition ou en contexte grippal chez un patient à risque, cystites à risque de complication dues à des germes sensibles et pyélonéphrites aiguës à des germes sensibles, en traitement de relais, cystites du nourrisson et de l'enfant (après réalisation de l'examen cytobactériologiques des urines), infections gynécologiques hautes en association à un autre antibiotique actif sur les Chlamydiae, infections stomatologiques sévères : abcès, phlegmons, cellulites, parodontites, infections ostéoarticulaires, infections cutanées et des tissus mous, septicémies, endocardites, infections digestives et intra-abdominales, en particulier péritonites, prophylaxie des infections post-opératoires(16,17).

1.6. Stabilité des médicaments à base d'amoxicilline avec ou sans acide clavulanique en solution et suspension

D'après les RCP des médicaments à base d'amoxicilline +/- acide clavulanique, Il n'y a aucune donnée de durée de conservation concernant les suspensions résultantes de la dispersion des sachets dose d'amoxicilline/acide clavulanique et des suspensions résultantes de la dispersion des comprimés dispersibles(10).

1.6.1. Suspension buvable

La suspension reconstituée d'amoxicilline trihydratée à une concentration de 25 à 100mg/mL est stable 14 jours au réfrigérateur (entre 2°C et 8°C).

A une concentration de 100mg/mL d'amoxicilline et 12,5mg/mL d'acide clavulanique, la suspension reconstituée d'amoxicilline trihydratée et clavulanate de potassium est stable 7 jours au réfrigérateur (entre 2°C et 8°C) (10).

1.6.2. Solution injectable

La solution reconstituée d'amoxicilline sodique de 10 à 50mg/mL est stable 6h dans du sérum physiologique et 1h dans une solution glucosée, à température ambiante.

A une concentration de 10 ou 20mg/mL d'amoxicilline et 2mg/mL d'acide clavulanique, la solution reconstituée d'amoxicilline sodique et clavulanate de potassium est stable 5h à température ambiante ou 10h au réfrigérateur (entre 2°C et 8°C) dans du sérum physiologique, lactate de sodium ou Ringer ou 4h à température ambiante ou 10h au réfrigérateur (entre 2°C et 8°C) dans une solution de Hartmann.

A une concentration de 10mg/mL d'amoxicilline et 1mg/mL d'acide clavulanique, la solution reconstituée d'amoxicilline sodique et clavulanate de potassium est stable 2h à température ambiante ou 4h au réfrigérateur (entre 2°C et 8°C) dans du sérum physiologique, lactate de sodium ou Ringer(10).

1.6.3. Conclusion

Ces deux principes actifs sont peu stables en milieu aqueux. Cela a mené à conditionner les médicaments sous forme de poudre à reconstituer pour suspension buvable ou pour solution injectable et à conserver la suspension après reconstitution au réfrigérateur. Ceci est expliqué par une hydrolyse facile du cycle pename ou clavame en milieux aqueux, qui inactive les substances actives(18,19).

1.7. Les préparations

Les missions des PUI sont définies dans le décret numéro 2019-489 du 21 mai 2019(20).

En plus de l'approvisionnement et de la dispensation des médicaments et dispositifs médicaux, les PUI doivent réaliser des préparations magistrales et hospitalières à partir de matières premières ou de spécialités pharmaceutiques. Toutes les dispositions relatives à ces préparations figurent dans le guide des Bonnes Pratiques de Préparation (BPP) de 2007 (en cours de révision)(21).

Les préparations magistrales sont définies dans l'article L.5121-1 du Code de la Santé Publique (CSP): il s'agit de «tout médicament préparé selon une prescription médicale destinée à un malade déterminé en raison de l'absence de spécialité pharmaceutique disponible disposant d'une autorisation de mise sur le marché, de l'une des autorisations mentionnées aux articles L. 5121-9-1 et L. 5121-12, d'une autorisation d'importation parallèle ou d'une autorisation d'importation délivrée à un établissement pharmaceutique dans le cadre d'une rupture de stock d'un médicament, soit extemporanément en pharmacie, soit dans les conditions prévues à l'article L. 5125-1 ou à l'article L. 5126-2 »(22).

Les préparations hospitalières, également définies dans l'article L.5121-1 du CSP, consistent en «tout médicament, à l'exception des produits de thérapies génique ou cellulaire, préparé selon les indications de la Pharmacopée et en conformité avec les bonnes pratiques mentionnées à l'article L. 5121-5, en raison de l'absence de spécialité pharmaceutique disponible ou adaptée disposant d'une autorisation de mise sur le marché, de l'une des autorisations mentionnées aux articles L. 5121-9-1 et L. 5121-12, d'une autorisation d'importation parallèle ou d'une autorisation d'importation délivrée à un établissement pharmaceutique dans le cadre d'une rupture de stock d'un médicament, par une pharmacie à usage intérieur d'un établissement de santé, ou par l'établissement pharmaceutique de cet

établissement de santé autorisé en application de l'article L. 5124-9 ou dans les conditions prévues à l'article L. 5126-2. Les préparations hospitalières sont dispensées sur prescription médicale à un ou plusieurs patients par une pharmacie à usage intérieur du dit établissement. Elles font l'objet d'une déclaration auprès de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé, dans des conditions définies par arrêté du ministre chargé de la santé »(22).

La réalisation de préparation hospitalière permet d'atteindre plusieurs objectifs par rapport à la préparation magistrale. Tout d'abord, comme elle peut être préparée à l'avance et stockée dans les conditions appropriées, elle permet de répondre sans délai et à toute heure aux demandes urgentes d'un service de soins. Cela permet un gain de qualité de prise en charge et un gain organisationnel. Ensuite, la préparation hospitalière permet un gain de qualité pharmaceutique car elle nécessite de réaliser un plus grand nombre de contrôles avant la libération d'un lot comme la teneur en principe actif, des contrôles pharmacotechniques et/ou microbiologiques.

Ces préparations réalisées en séries peuvent être effectuées si un système d'assurance de la qualité a été mis en place dans le cadre des BBP et pour des échelles de production compatibles avec les moyens humains et techniques dont la pharmacie dispose. La taille des lots doit être compatible avec la quantité de médicament consommé.

Un échantillon de chaque lot de préparations terminées est conservé dans l'échantillonnage d'une quantité minimale permettant de réaliser au moins une analyse complète (21).

1.8. Méthodes d'analyse

L'analyse a été réalisée par chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à deux détecteurs : un spectromètre ultraviolet(UV) à barrette de diode (HPLC-DAD) et un spectromètre de masse simple quadripôle (HPLC-MS). Les concentrations en amoxicilline et acide clavulanique ont été déterminées grâce au détecteur DAD. En effet l'avantage de ce détecteur est une grande reproductibilité. Il est adapté lorsque l'on a identifié préalablement les analytes d'intérêt grâce à leur temps de rétention et leur spectre UV/visible. L'identification des produits formés au cours de la dégradation a été réalisée grâce au spectromètre de masse. Dans le cas d'études de dégradation, la détection par

spectrométrie de masse permet d'identifier les produits formés en utilisant le rapport masse/charge (m/z) obtenu, sans devoir analyser des substances de références séparément, comme on devrait le faire en utilisant uniquement le détecteur UV. Ces m/z obtenus devront être comparé à ceux obtenus dans la bibliographie pour identifier un composé.

1.8.1. La chromatographie liquide haute performance

L'HPLC est une technique de séparation analytique de composés permettant de conduire à leur identification et/ou leur quantification. L'échantillon à analyser est introduit par un système d'injection sur une phase solide appelée phase stationnaire parcourue de façon permanente par un liquide appelé phase mobile qui est amené par une pompe fonctionnant en continue (figure 4)(23).

La phase inverse est la plus utilisée. Dans ce cas la phase mobile est composée d'un ou plusieurs solvants polaires (eau, méthanol, acétonitrile,...) et de sels (tampons, réactif ionique...) et la phase stationnaire est apolaire, constituée de silice greffée par des chaînes linéaires de huit ou dix-huit atomes de carbones (C8 et C18). Le mode isocratique correspond à une composition de phase mobile constante au cours du temps, le mode gradient correspond à une modification de la composition de la phase mobile au cours du temps. Le gradient peut être linéaire ou non. Dans le cas d'un gradient linéaire, le changement de composition est constant au cours de l'analyse(23).

Selon la composition de la phase stationnaire et de la phase mobile, les analytes du mélange à analyser sont plus ou moins retenus par la phase stationnaire et éluent les uns après les autres(23).

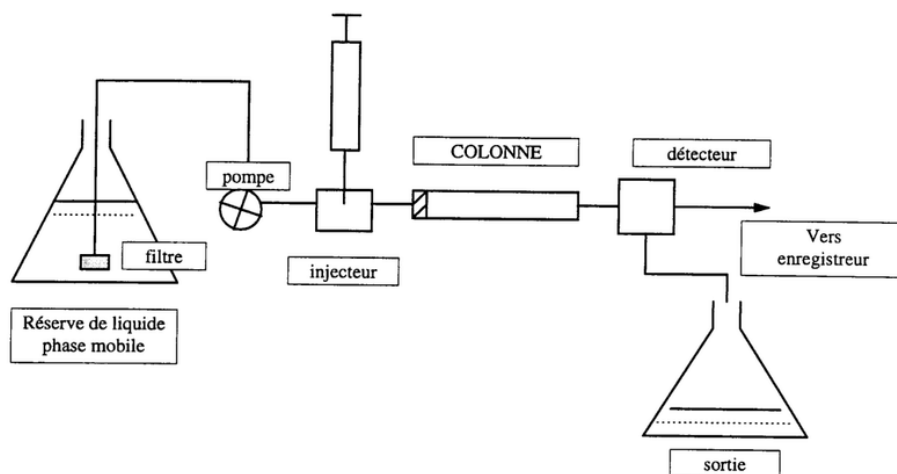


Figure 4 : Schéma d'une chaîne HPLC (24).

Un ou plusieurs détecteurs, choisis en fonction des composés à analyser et du but de l'analyse, sont placés à la sortie de la colonne et sont couplés à un système d'acquisition informatique qui pilote l'ensemble et recueille les informations. Le détecteur conduit à l'obtention d'un tracé appelé chromatogramme avec le temps en abscisse et le signal en ordonnée, il est constitué d'une ligne de base, générée par l'enregistrement continu du signal de la détection de la phase mobile et d'un ou plusieurs pics chromatographiques obtenus au passage de chaque composé retenu puis élué et enfin détecté(23).

Dans des conditions chromatographiques données, le temps de rétention, temps au bout duquel un composé est élué de la colonne et détecté, caractérise qualitativement une substance. L'aire des pics permet de mesurer la concentration de chaque composé constitutif du mélange injecté(23).

Une bonne séparation chromatographique doit conduire à l'obtention d'un chromatogramme constitué de pics bien distincts (bonne résolution) et parfaitement reproductibles d'une injection à l'autre(23).

1.8.2. La spectrophotométrie UV à barrette de diode

L'absorption du rayonnement UV par les molécules permet de mesurer la concentration de ces molécules présentes dans le trajet du rayonnement. On ne mesure pas directement cette concentration, mais on procède à un étalonnage en utilisant des mélanges étalons de concentrations connues des molécules que l'on veut doser. À une longueur d'onde où la molécule absorbe, il existe une loi simple entre quantité de rayonnement transmis par le milieu et concentration des molécules qui absorbent, la loi de Beer-Lambert. L'absorbance A est donc proportionnelle à la concentration c des molécules de l'espèce qui absorbe à cette longueur d'onde λ . Il est alors possible de construire une droite d'étalonnage en utilisant plusieurs concentrations connues de la molécule à doser et en mesurant les absorbances correspondantes à la longueur d'onde λ . Cette droite d'étalonnage permet le calcul de ϵ , coefficient spécifique d'absorbance molaire, pour une longueur d'onde λ donnée. En plaçant dans le milieu un échantillon dont on veut connaître la concentration, l'absorbance mesurée permet le calcul direct de cette concentration. On peut aussi utiliser la droite d'étalonnage pour déterminer la concentration(25).

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

A absorbance du milieu à la longueur d'onde λ , exprimée en nm dans l'UV, ϵ coefficient spécifique d'absorbance molaire en $L \cdot \text{mole}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, l trajet optique de la cellule en cm, c concentration en $\text{mole} \cdot L^{-1}$ des molécules qui absorbent à la longueur d'onde λ (25).

Les spectrophotomètres sont très utilisés comme détecteurs pour l'HPLC. Ce sont généralement des appareils à barrettes de photodiodes bien adaptés à ce type de détection : les espèces séparées par la colonne de chromatographie passent individuellement devant le détecteur qui peut acquérir le spectre complet pendant le temps de passage du constituant. Même si les espèces ne sont pas complètement séparées, l'analyse multivariable permet le dosage simultané ou le contrôle de la pureté de l'espèce éluée(23,25).

Les spectrophotomètres à barrette de diodes permettent un enregistrement en trois dimensions absorbance - longueur d'onde - temps, ce qui permet la mise en œuvre d'un critère de pureté du soluté correspondant à un pic d'élution. Ce dernier est fondé sur une combinaison des absorbances mesurées à différents endroits du pic d'élution et à différentes longueurs d'onde. Des solutés transparents peuvent subir une réaction de dérivation pour absorber dans l'UV-Visible(23,25).

Ce mode de détection est très utilisé dans la mesure où un grand nombre de solutés absorbent dans l'ultraviolet et où les phases mobiles demeurent transparentes jusqu'à des longueurs d'onde de 200nm. La sensibilité de ce détecteur est bonne, il peut détecter des concentrations de l'ordre de $1 \cdot 10^{-8} \text{mol/L}$. La spécificité vient du couplage avec l'HPLC grâce au temps de rétention et aussi de la comparaison de spectre UV si l'analyse est faite avec une barrette de diode. Ce détecteur est parmi les plus reproductible, cela est très utile pour la quantification : il ne sera pas nécessaire de réaliser des gammes à chaque analyse comme pour le spectromètre de masse(23,25).

1.8.3. La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique analytique permettant d'identifier et de quantifier des composés grâce à leur masse moléculaire. Le principe nécessite de transformer les molécules dans leur état naturel en ions à l'état gazeux et permet d'obtenir leur masse moléculaire en analysant leur rapport de m/z (26,27).

Un spectromètre de masse est constitué des parties suivantes (figure 5) :

- Une source d'ions dans laquelle se produit le passage en phase gazeuse de l'échantillon à analyser, ainsi que l'ionisation des molécules. Dans notre cas il s'agit d'un electro-spray.
- Une interface qui permet le passage d'une pression atmosphérique dans la source à une pression proche du vide (de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-7} mbar) dans l'analyseur grâce à un système de pompe(26,27).
- Un analyseur qui permet de trier les ions en fonction de leur rapport m/z . Dans notre cas il s'agit d'un simple quadripôle.
- Un détecteur qui compte les ions en leur associant leur rapport m/z .

Dans notre cas, le système d'introduction de la substance à analyser est l'HPLC. Le système de traitement des données permet de traiter le signal et visualiser les spectres(26,27).

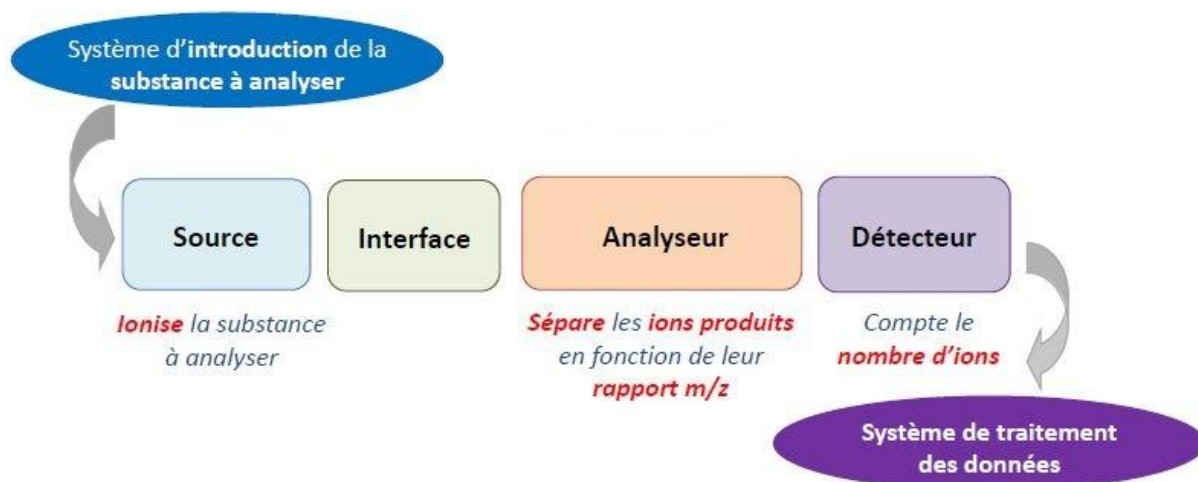


Figure 5 : Schéma du principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse, issu du cours de spectrométrie de masse du Pr. C. Herrencknecht(26).

Le chromatogramme habituel présente le nombre de coups (intensité) en ordonnée et le temps en abscisse. Les spectrophotomètres de masse permettent une saisie en trois dimensions avec en plus un axe de m/z (26,27).

2. Submitted original paper : Degradation kinetics of amoxicillin and clavulanic acid in suspension and solution

2.1. Abstract :

Degradation kinetics of amoxicillin and clavulanic acid in suspension has not been studied yet. The objective of this study is to investigate the factors influencing the degradation kinetics of amoxicillin and clavulanate in solution or suspension to model their instability. A stability-indicating method for the coupled determination of amoxicillin and clavulanate was developed by high-performance liquid chromatography-photodiode array/mass spectrometer. Experiments were performed with the single molecules amoxicillin, clavulanate and combined. The samples were incubated at 3 temperatures and 2 pH values and assayed at least 5 different times. We discovered that amoxicillin in suspension at pH 3.5 with or without clavulanate has a pseudo zero order degradation kinetic. At pH 9, it has a higher order degradation kinetic. The influence of different factors on the stability has been studied: pH, concentration, physical form of the molecule, presence of another molecule, temperature.

Key words : Degradation product(s), Hydrolysis, Antiinfective(s), Mass Spectrometry (MS), UV/Vis spectroscopy, Suspension(s), Chromatography, HPLC (high-performance/pressure liquid chromatography), Kinetics, Analysis, Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS).

2.2. Introduction

The combination of amoxicillin (AMX) and clavulanate (CLAV) is still widely used as an antibiotic of choice for numerous clinical conditions(14). In pediatrics, when no potentially harmful excipient can be tolerated by the patients, hospital or magistral preparations based on AMX and CLAV can be prescribed(28,29). Various studies of the hydrolysis kinetics of AMX and CLAV have been carried out previously(30,31). They have established that CLAV catalyzes the hydrolysis of AMX and that the degradation of AMX alone and CLAV alone or in combination with AMX follow first-order kinetics. Some authors were able to show that a polymerization reaction of AMX occurs in addition to hydrolysis at basic pH and at a high concentration and that this increases the kinetic order of the reaction(32). To our knowledge, no study has been published on the degradation kinetics of AMX and/or CLAV in suspension. Oral suspensions are a pharmaceutical form widely used as hospital and magistral preparations in hospitals(33–35). They are simple to administer and allow adaptation of the administered dose. As they contain a majority of the active ingredient in solid form, they are generally more stable than solutions. In a suspension there is an equilibrium between the solid and the dissolved form of the active drug, thus one can expect some difference in terms of degradation kinetics of the drug between a solution and a suspension(36).

In terms of identified degradation products, there are numerous data concerning AMX applied to wastewater (37–39). Concerning CLAV, data are less available and are older(40,41).

The objective of this study is to investigate the factors influencing the degradation kinetics of amoxicillin (AMX) and clavulanate (CLAV) in solution or suspension to model their instability. This study is seen as an example of a systematic study and modelling of drug instability in mixtures which constitutes the first step to be able to predict an expiry date without long studies.

2.3. Materials and methods

2.3.1. Materials

Table 1 summarises the materials used and specifies the suppliers and batches/models of the materials used.

Table 1 : Materials.

Chemicals/Material	Supplier	Model/batch(es)
high-performance liquid chromatography device	Waters MS Technologies, Manchester, UK	Alliance e2695
PhotoDiode Array Detector		2998 PDA Detector
Mass Spectrometry Detector		Acquity QDA
HPLC software		Empower 3
Column	Phenomenex, Torrance, USA	Kinetex 2.6µm PS C18 100 Å – LC column 100x3mm
Magnetic stirrer	PROLABO, Nantes, France	SR100
pH meter	Mettler Toledo, Columbus, USA	Five easy FP20
pH electrode		LE 438
UV lamp	Ultra-violet products, inc, San Gabriel, USA	Chromato-vue model CC-20
Ultrapure water generator	Merck, Darmstadt, Germany	Direct-Q® 3UV
Oven	Memmert, Schwabach, Germany	U25
Climatic chambers		HPP 108
		HPP 110
Refrigerator	Liebherr	SN-ST 2 6184 4
20mL syringe	B-Braun, Melsungen, Germany	Lot 21D08C8
5mL syringe		Lot 20M23C8
Obturator	Vygon, Ecouen, France	Lot 170521FD
0.45µm filter	Phenomenex, Torrance, USA	RC membrane 15mm Syringe filters non sterile. PP Housing. Luer/Slip Lot 91492103
Vial	Waters MS Technologies, Manchester, UK	9mm Screx top vial. 12x32mm with cap & PTFE/Silicone septa Lot 02072511130
Ammonium formate	Sigma-aldrich, Saint Louis, USA	Lot BCBN3247V
Sodium Amoxicillin	GSK, Brentford, UK	Clamoxyl 500mg lot 2022002A
	Panpharma, Luitre-Dompierre, France	Amoxicilline 1g lot 306857
Potassium clavulanate	Sigma-aldrich, Saint Louis, USA	VETRANAL® analytical standard Lot STBJ6404
Sodium Amoxicillin + potassium clavulanate	Sandoz, Levallois-Perret, France	AMX/CLAV 1g/200mg lot KS5982 + LD8787 + KT0131
Acetonitrile	VWR, Radnor, USA	For HPLC. Super gradient reagent Lot 21E052058
Methanol	Fischer scientific, Waltham, USA	≥99.8% HPLC Grade lot 2179621
Sodium hydroxyde	Inresa, Bartenheim, France	Pelletes lot 17362304
Formic acid	Sigma-aldrich, Saint Louis, USA	Reagent grade ≥ 95% Lot 5H8L7977

2.3.2. HPLC method parameters

Table 2 summarises the chromatographic conditions used in this study, Table 3 details the gradient program of the method.

Table 2 : Chromatographic conditions.

Flow rate	0.4mL/min
Wavelength for Amoxicillin	250nm
Wavelength for Clavulanate	220nm
Column Temperature	27°C
Chamber temperature	10°C
Injection volume	10µL

Table 3: Gradient program of the method.

Time (min)	Mobile Phase A (%)	Mobile Phase B (%)
0	100	0
4	100	0
9	90	10
20	60	40
24	5	95
25	100	0
50	100	0

2.3.1. Preparation of the mobile phases

Mobile phase A was an ammonium formate buffer at 10mM at pH=3.5. 315mg of ammonium formate were weighed and transferred to a 500mL beaker to which approximately 400mL of ultrapure water was added. The volume was adjusted to 500mL in a graduated cylinder. The mix was homogenised and adjusted to pH=3.5 with formic acid.

Mobile phase B was Acetonitrile.

2.3.2. Preparation of AMX or CLAV or AMX/CLAV solutions

First, the 20mM ammonium formate buffer at pH 3.5 or 9 was prepared. 63 mg of ammonium formate were weighed and transferred to a 50mL beaker to which about 40 mL of ultrapure water was added. The volume was adjusted to 50mL in a volumetric flask. The

mix was homogenized and adjusted to $\text{pH}=3.5 \pm 0.02$ with formic acid or to $\text{pH}=9 \pm 0.02$ with 0.5M sodium hydroxide.

A vial of AMX 1g or AMX/CLAV 1g/200mg was reconstituted with 20mL of ultrapure water. A dilution to the target concentration was made in a 50mL volumetric flask of buffer at pH 3.5 or 9. For CLAV alone, the weighed CLAV powder was put directly into the 50mL vial and dissolved at the desired concentration with the buffer at pH 3.5 or 9. The target concentrations were 1600/320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ or 800/160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in AMX/CLAV combined or alone. Then the vials were filled to the top and closed to prevent air from coming into contact with the solution. The vials were placed either in the refrigerator at $5.8 \pm 0.2^\circ\text{C}$ or in an environmental chamber at 30 or 40°C .

2.3.3. Preparation of AMX or AMX/CLAV suspensions

The buffer was first prepared at pH 3.5 or 9. A saturation buffer was used to obtain maximum buffering capacity in this highly concentrated medium. Approximately 6g of ammonium formate was weighed and placed in a 50mL beaker, about 20mL of ultrapure water was poured in, mixed and the pH was adjusted to $\text{pH}=3.5 \pm 0.05$ with formic acid or $\text{pH}=9 \pm 0.05$ with 5M sodium hydroxide. The beaker was placed in the refrigerator for at least 2h, then filtered with a 0.45 μm filter and adjusted once again to $\text{pH}=3.5 \pm 0.05$ or 9 ± 0.05 to ensure that the prepared buffer has an ammonium formate concentration below its solubility at refrigerator temperature.

The vials of AMX or AMX/CLAV powder were poured directly into the mortar. Then the buffer was added at pH 3.5 or 9 little by little while mixing until a viscous texture was obtained. The contents of the mortar were poured into a volumetric flask to adjust the volume. Syringes were filled, taking care not to leave any air, and closed with a stopper. The syringes were placed either in a refrigerator at $5.8 \pm 0.2^\circ\text{C}$ or in a climatic chamber at 30 or 40°C . The target concentrations are 200mg/mL as AMX or 200/40mg/mL as AMX/CLAV at pH 3.5 and 500mg/mL as AMX or 500/100mg/mL as AMX/CLAV at pH 9.

2.3.4. Sample preparation before analysis

The vials corresponding to solution were placed directly into the HPLC for analysis at the determined time.

For the suspension, at the determined time, each syringe was mixed and a small volume was taken from each syringe before it was brought to room temperature. Using a positive pressure pipette, 50 μ L of the suspension at pH=9 or 125 μ L of the suspension at pH=3.5 were taken and placed in a 5mL volumetric flask and filled with ultrapure water while mixing. Ultrasounds were applied for 10min to solubilise, and the content was transferred to haemolysis tubes for 15min of centrifugation at 4000rpm. The same theoretical concentration of 5mg/mL of AMX or 5/1mg/mL of AMX/CLAV was obtained whatever the pH. Then, 320 μ L of the supernatant was diluted in 680 μ L of mobile phase A in a vial to give a maximum initial concentration of 1600 μ g/mL of AMX or 1600/320 μ g/mL of AMX/CLAV for analysis. The resulting vials were placed in the HPLC. The AMX suspension alone at pH=9 gradually solidifies. The density of the mixture was calculated to correct the concentration result obtained.

2.3.5. Analysis and sampling times

The two detectors have been put in series so all samples separated in the chromatographic column pass first in the DAD and then in the MS.

The long analysis time of 50 minutes made necessary to implement several actions to reduce the waiting time before analysis and its impact.

The sampling times are summarized in the table 4. The differences are due to the high cost of CLAV alone and its faster degradation and the slower degradation in the refrigerator.

Table 4 : Sampling times.

30°C and 40°C		5.8°C	
CLAV alone	AMX +/- CLAV	CLAV alone	AMX +/- CLAV
0-150-250-350-450min	0-150-250-350-450min then 24-48-72-96h	0-7.5-24-48-72h	0-7.5-24-48-72-96h

2.3.6. HPLC Method validation

A coupled assay method by HPLC-DAD/MS) for AMX and CLAV was developed. DAD detector was used to quantify the molecules and to set up the stability indicating method, MS detector was used to identify the degradation products and therefore to elucidate the reaction mechanisms of degradation. In this goal, m/z obtained were compared to the ones found in the bibliography to be able to identify the degradation products. Indeed, the MS detector used in this study is an electrospray ionization-simple quadrupole: its resolution is low and does not permit ion filiation. Moreover, nuclear magnetic resonance has not been used in this study.

Method validation has been investigated during 3 days. Each day, linearity, precision and accuracy were studied. Linearity was determined by assaying 6 vials: 1 blank containing only the mobile phase A and 1 vial for each point of the range. The method was considered linear if the correlation coefficient (r^2) was over 0.99 for a mean standard curve, residues had a random distribution and analysis of variance showed the linearity. The accuracy was studied on three points of the range: the centre and the two extremes. The dosed vials are the same as those for linearity but are dosed three times each. The accuracy was calculated as the difference between the mean and the accepted true value. Then the percentage of accuracy was calculated from the ratio of the difference between true and observed value over the true value. Accuracy, for each concentration, had to be less than 5% to be accepted. The repeatability was assessed by measuring the centre of the range six times. The intermediate precision was evaluated by measuring this concentration six times a day for three days this concentration. Repeatability and intermediate precision were determined using the standard deviation of the repeated assays, the threshold value of acceptability was 5%. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated as follows.

$$\text{LOD} = 3.3 \times (\text{Sa}_0) / a_1$$

$$\text{LOQ} = 10 \times (\text{Sa}_0) / a_1$$

With Sa_0 Standard deviation of the ordinate at the origin of the calibration curve and a_1 the sensibility.

AMX/CLAV SANDOZ 1g/200mg was used to prepare solutions for method validation so the ratio AMX/CLAV is 5/1.

2.3.6.1. Amoxicillin determination

The 5 concentrations of the range were 160-400-800-1280-1760 μ g/mL. The table 5 summarizes the parameters obtained during the method validation. Matrix effect has not been studied as no excipients are present.

Table 5 : Parameters of amoxicillin method validation.

Linearity			Precision		Accuracy			LOD	LOQ
analysis of variance	r^2		CV intra-day	CV over the three days (intermediate precision)	CV of the lowest point	CV of the centre of the range	CV of the highest point		
correlation between concentrations and area under the curve (AUC)	0.9999		<1%	<2%	<5%	<2%	<2%	1.3 μ g/mL	17.1 μ g/mL

The figure 6 shows that the residues have a random distribution. This is compliant with a linear model.

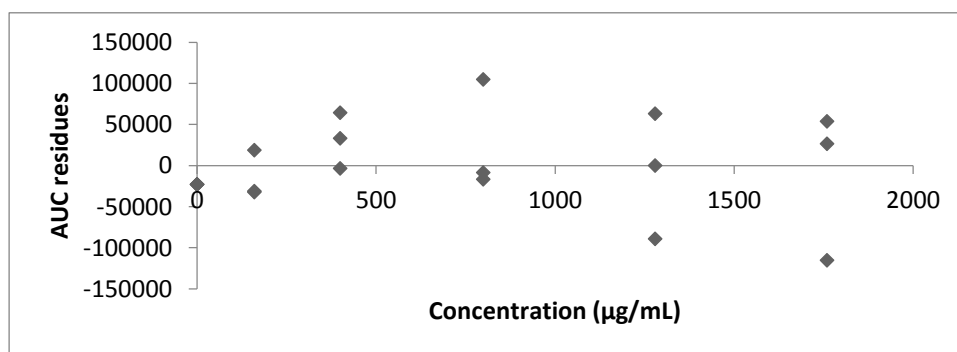


Figure 6 : Residues graphic of amoxicillin.

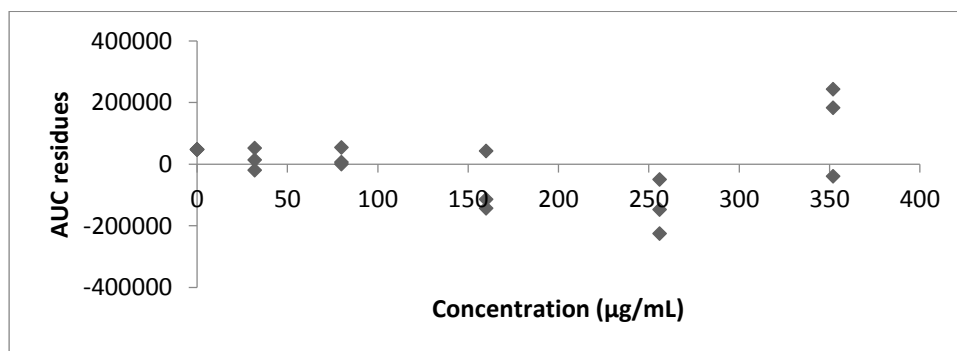
2.3.6.2. Clavulanate determination

The 5 concentrations of the range were 32-80-160-256-352 μ g/mL. The table 6 summarizes the parameters obtained during the method validation. Matrix effect has not been studied as no excipients are present.

Table 6 : Parameters of clavulanate method validation.

Linearity			Precision		Accuracy			LOD	LOQ
analysis of variance	r^2		CV intra-day	CV over the three days (intermediate precision)	CV of the lowest point	CV of the centre of the range	CV of the highest point		
correlation between concentrations and AUC	0.9997		<2%	<3%	<5%	<5%	<5%	3.9µg/mL	8.0µg/mL

The figure 7 shows that the residues have a random distribution. This is compliant with a linear model.

**Figure 7 : Residues graphic of clavulanate.**

2.3.6.3. Selectivity

To prove that the analytical method is stability indicating, a forced degradation was performed in different media with the objective of a degradation of about 20% of each API. Tables 7 and 8 show the different percentages of degradation of AMX and CLAV according to the conditions applied and the incubation time. The percentage of degradation was calculated according to the AUC of an undegraded standard.

For acidic and basic degradation, after the determined reaction time, the reaction was stopped by neutralisation.

Table 7 : Forced degradation of amoxicillin.

	Presence of CLAV	Media	Incubation time	Incubation temperature	AUC at 250nm	%remaining	%degraded
Standard					736304	100.0%	0.0%
NaOH	NO	NaOH 0.05M	5min	ambient	561611	76.3%	23.7%
	YES	NaOH 0.05M	5min	ambient	546518	74.2%	25.8%
		NaOH 0.025M	2min	ambient	699480	95.0%	5.0%
HCl	YES	HCl 0.1M	15min	ambient	716729	97.3%	2.7%
		HCl 0.1M	1h35	50°C	568281	77.2%	22.8%
	NO	HCl 0.1M	1h35	50°C	588553	79.9%	20.1%
H2O	YES	H2O	1h30	80°C	542245	73.6%	26.4%
	NO	H2O	2h	80°C	562646	76.4%	23.6%
H2O2	YES	H2O2 0.015%	15min	ambient	577415	78.4%	21.6%
	NO	H2O2 0.015%	10min	ambient	595002	80.8%	19.2%
UV	YES	UV	24h	ambient	584955	79.4%	20.6%
	NO	UV	72h	ambient	552776	75.1%	24.9%

Table 8 : Forced degradation of clavulanate.

	Media	Incubation Time	Incubation Temperature	AUC at 220nm	%remaining	%degraded
Standard				1956438	100.0%	0.0%
NaOH	NaOH 0.05M	5min	Ambient	247364	12.6%	87.4%
	NaOH 0.025M	2min	Ambient	1515666	77.5%	22.5%
HCl	HCl 0.1M	15min	Ambient	1369132	70.0%	30.0%
	HCl 0.1M	1h35	50°C	0	0.0%	100.0%
H2O	H2O	1h30	80°C	1240183	63.4%	36.6%
H2O2	H2O2 0.015%	15min	Ambient	1493825	76.4%	23.6%
UV	UV	24h	Ambient	1394554	71.3%	28.7%

Figure 8 shows the 3D UV chromatograms of AMX/CLAV from 210 to 400nm obtained from the forced degradation. The separation of the different peaks of degradation products with the AMX and CLAV peaks was satisfactory: the assay method is selective. 3D UV chromatograms of AMX alone are not shown.

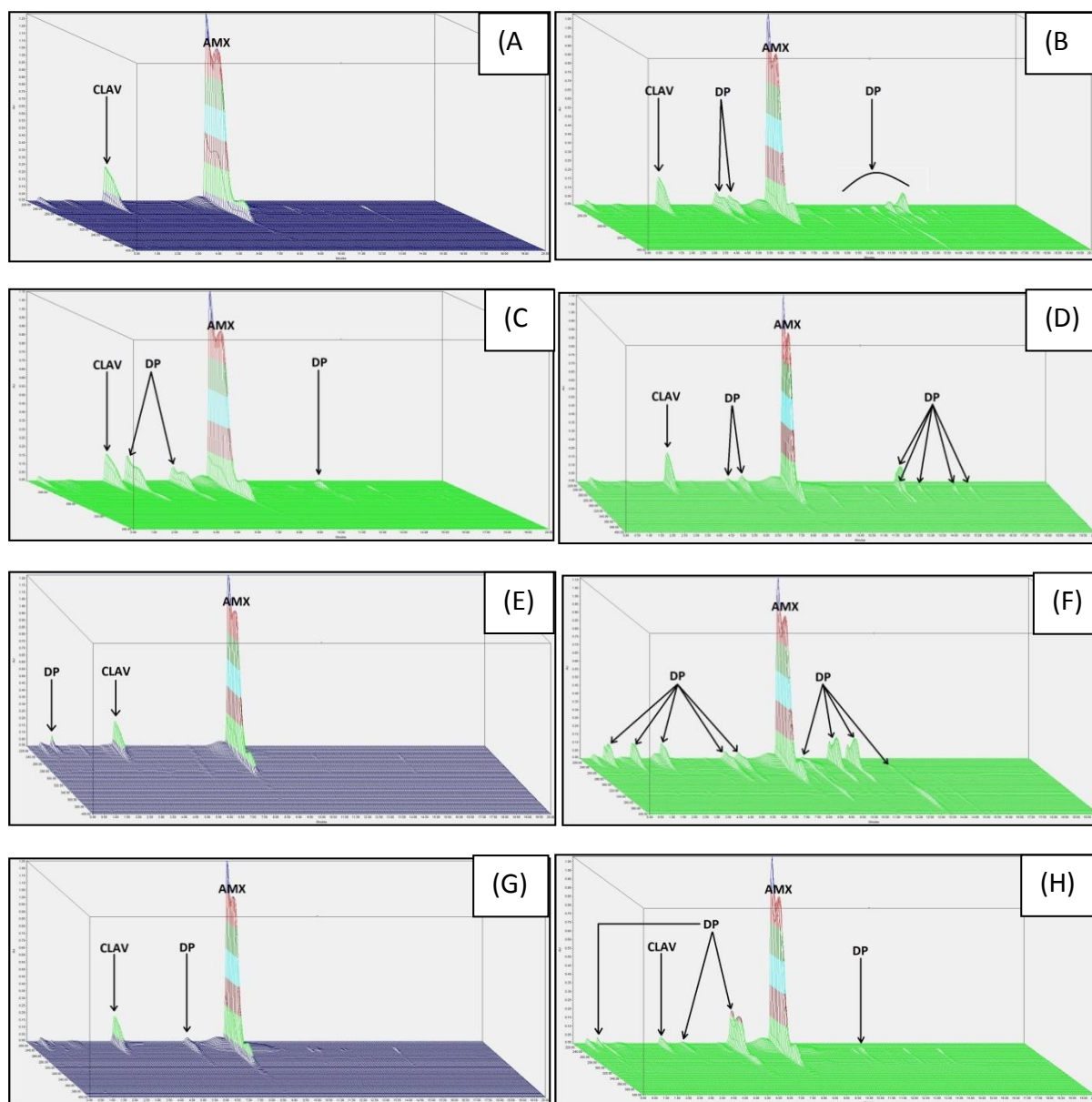


Figure 8 : 3D chromatograms of forced degradation of AMX and CLAV obtained from DAD.
 (A) with no degradation. (B) in water at 80°C during 1h30. (C) in Hydrogen Peroxyde 0.015% during 15min. (D) exposed to UV during 24h. (E) in Chlorydric acid 0.1M during 15min. (F) In chlorydric acid 0.1M during 1h35 at 50°C. (G) In sodium hydroxyde 0.025M during 2min and (H) In sodium hydroxyde 0.05M during 5min. DP means Degradation Product(s).

2.3.7. Mass detection

The recording was done in full scan mode from 50 to 1200 m/z with an electrospray ionization interface. MS detector has been set in positive mode, with a capillary voltage of 0.8kV and a probe temperature of 600°C. To focus on the main degradation products, only the m/z with intensity greater than 10^6 in at least one condition were recorded.

2.3.8. Analysis of results

Different curves were plotted to represent the decrease in the concentration of AMX and CLAV as a function of time. The order of the degradation kinetics was determined by the linearity of the curves obtained. If the curve representing the concentration as a function of time was linear, it was of order 0 and the rate coefficient k is expressed in $\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. If the curve representing the Neperian logarithm of the remaining fraction as a function of time was linear, it was of order 1 and the rate coefficient k was expressed in h^{-1} . If the curve representing the inverse of the concentration as a function of time was linear, it was of order 2 and the rate coefficient k was expressed in $\text{mol}^{-1}.\text{L}.\text{h}^{-1}$. The directing coefficient of this line is then the constant k (or the opposite if the directing coefficient is negative as in the case of order 0 or 1).

2.4. Results

The table 9 shows the different m/z obtained during the study and according to the condition applied.

Figures 9 and 10 show that the degradation of AMX alone followed a degradation of order 1 by forming a regression line in logarithmic representation just like CLAV in the absence or presence of AMX. Their R^2 are all very close to 1. The degradation of AMX in the presence of CLAV was different, it was faster in the presence of CLAV than when CLAV was totally degraded. The R^2 were less close to 1.

Table 9 : Identified degradation products in each condition according to the references.

A to J correspond to the different conditions. A : Solution AMX pH=3.5 ; B : Solution AMX pH=9 ; C : Solution CLAV pH=3.5 ; D : Solution CLAV pH=9 ; E : Solution AMX+CLAV pH=3.5 ; F : Solution AMX+CLAV pH=9 ; G : Suspension AMX pH=3.5 ; H : Suspension AMX pH=9 ; I : Suspension AMX+CLAV pH=3.5 ; J : Suspension AMX+CLAV pH=9. Letter in bold corresponds to an intensity $>10^6$. a normal letter corresponds to an intensity from 10^5 to 10^6 . EP means European Pharmacopeia.

Parent molecule	m/z	Fragment	Identification	Reference	Condition
AMX	150	M+H ⁺	Hydrolysis product	(38)	A, B, E
	189	M+H ⁺	PP-2-OH-3-(4-OH)phenylpyrazine	(4,38)	A, B, E, F
	217	M+H ⁺	6-Aminopenicillanic acid	(4,42)	F
	253	M+H ⁺	Amoxicillin penaldic acid	(42)	E, F
	297	M+H ⁺	Penicillamine disulfide	(38)	A, B, E, F
	335	M+K ⁺			
	340	M+H ⁺	Amoxicillin penilloic acid	(4,38,42–45)	A, I
	378	M+K ⁺			
	323	M-OH+H ⁺			
	366	M+H ⁺	Diketopiperazine amoxicillin	(4,38,42–45)	A, B, F, G, H, I
	388	M+Na ⁺			
	404	M+K ⁺			
	383	M+H ⁺	Photolysis product VI	(42)	B, F, H, I, J
	421	M+K ⁺			
	384	M+H ⁺	Amoxicillin penicilloic acid	(4,38,42–45)	A, B, E, F, G, H, I, J
	422	M+K ⁺			
	378	M-COO+K ⁺			
	367	M-NH ₃ +H ⁺			
	340	M-COO+H ⁺			
	323	M-NH ₃ -COO+H ⁺	Photolysis product XII	(42)	A, E, G, I
	412	M+H ⁺			
	450	M+K ⁺			
	823	2M+H ⁺			
	515	M+H ⁺	4 hydroxy phenylglycyl amoxicillin	(4,42)	B
	553	M+K ⁺			
	731	M+H ⁺	Amoxicillin-amoxicillin penicilloic acid dimer	(4,38)	B, E, F, H, J
	769	M+K ⁺			
	749	M+H ⁺	Amoxicillin penicilloic acid dimer	(4)	B, H
	787	M+K ⁺			
	1096	M+H ⁺	Amoxicillin-amoxicillin penicilloic acid trimer	(4,46)	G, H, J
	1118	M+Na ⁺			
	1134	M+K ⁺			
	1113.5	M+H ⁺	Amoxicillin penicilloic acid trimer	(4,46)	H, J
	1135.5	M+Na ⁺			
	1151.5	M+K ⁺			
CLAV	104	M+H ⁺	1-amino-2-oxo-butan-4-ol	(40,41)	C, D, E, F, I, J
	156	M+H ⁺	4-(2-hydroxyethyl)-1H-pyrrole-3-carboxylic acid	(4)	C, E, I
	169	M+H ⁺	2.5-bis(2-hydroxyethyl)pyrazine	(4,40,41)	D, F, J
	171	M+H ⁺	2.5-bis(2-hydroxyethyl)dihydropyrazine	(40,41)	D, F
	174	M+H ⁺	8-hydroxy-6-oxo-4-aza-2-octenoic acid	(40,41)	C, E, I
	183	M+H ⁺	3-methyl-2.5-bis(2-hydroxyethyl)pyrazine	(41)	F
	197	M+H ⁺	3-ethyl-2.5-bis(2-hydroxyethyl)pyrazine	(4,40,41)	D, F, J
	215	M+H ⁺	3-(1'-hydroxyethyl)-2.5-bis(2-hydroxyethyl)-dihydropyrazine	(40)	D
	241	M+H ⁺	3-carboxyethyl-2.5-bis(2-hydroxyethyl)pyrazine	(4,41)	D, F, J

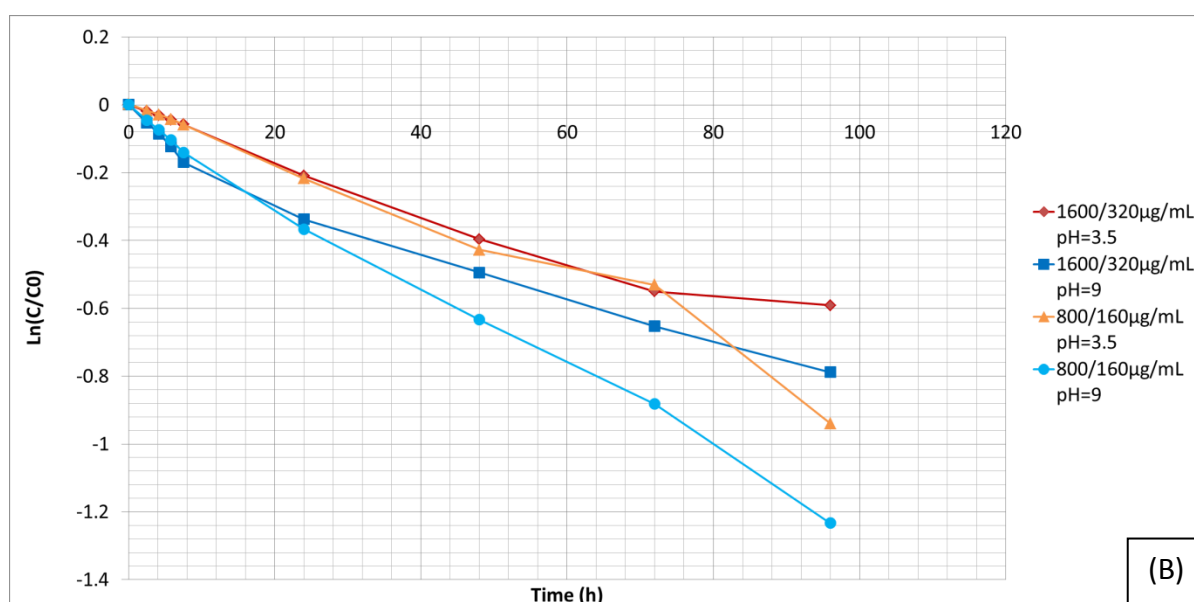
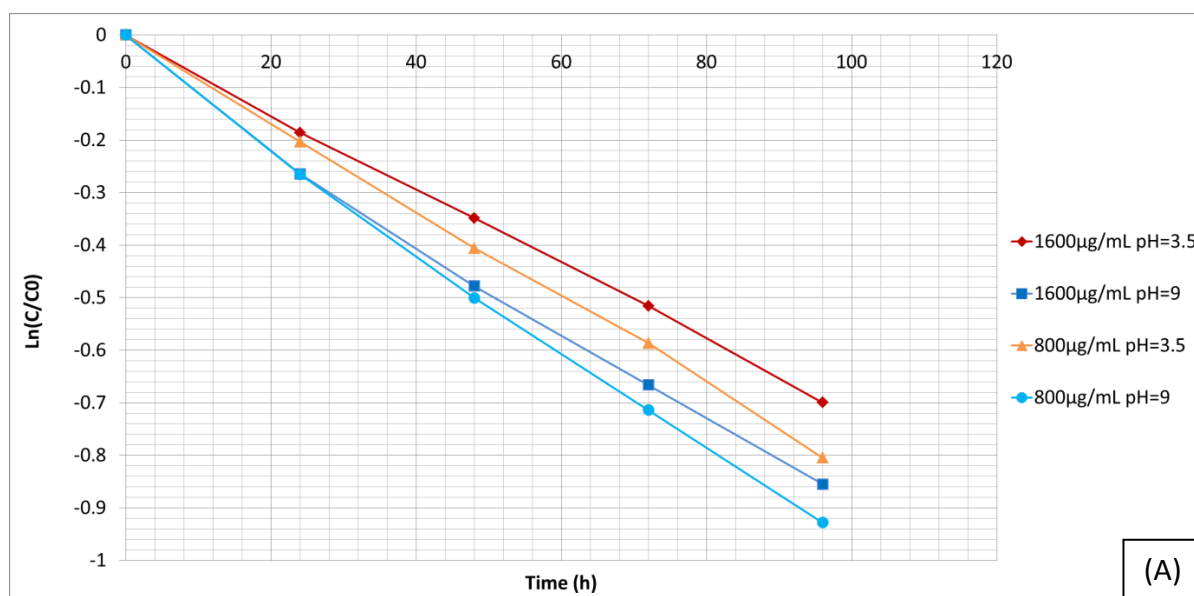


Figure 9 : $\ln(C/C_0)$ of AMX in solution at 30°C as a function of time, according to the C_0 . (A) AMX alone. R^2 obtained are 0.9995, 0.9944, 0.9994 and 0.9978. (B) AMX in the presence of CLAV. R^2 obtained are 0.9727, 0.9719, 0.9773 and 0.9968. C means concentration. C_0 means initial concentration.

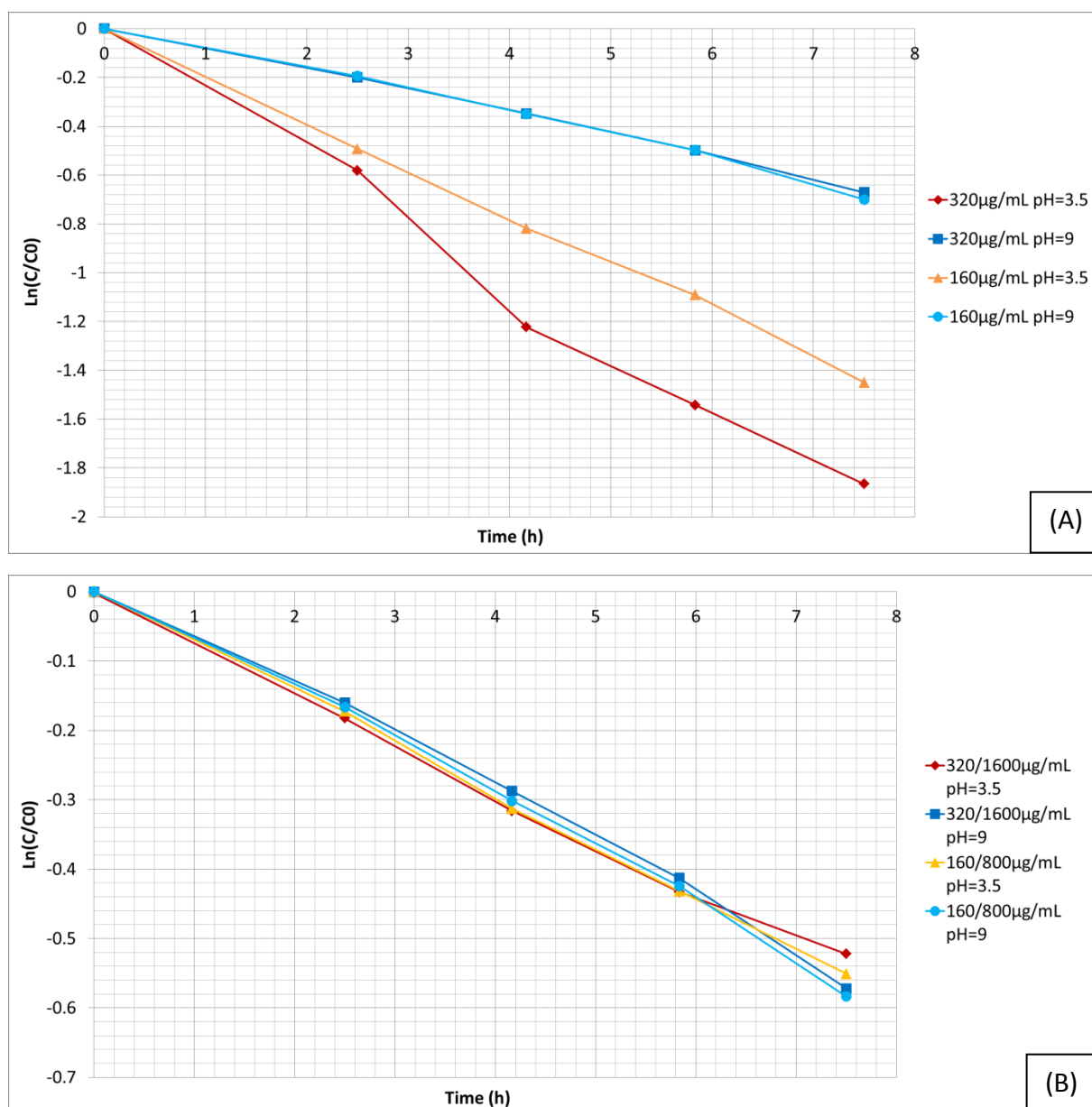


Figure 10 : $\ln(C/C_0)$ of CLAV in solution at 30°C as a function of time, according to the C_0 . (A) CLAV alone. R^2 obtained are 0.9860, 0.9974, 0.9989 and 0.9927. (B) CLAV in the presence of AMX. R^2 obtained are 0.9963, 0.9941, 0.9992 and 0.9957.

Figure 11 shows that the degradation of AMX in suspension was linear at pH=3.5: the R^2 at this pH were very close to 1. This suggests that the degradation kinetics were of order 0 under these conditions. At pH=9 this was not the case, the R^2 were far from 1. In these conditions, the degradation kinetics had a higher order of 1 or 2 (data not shown). CLAV shows too fast degradation under these experimental conditions, it was not possible to interpret on the reaction order and degradation kinetics.

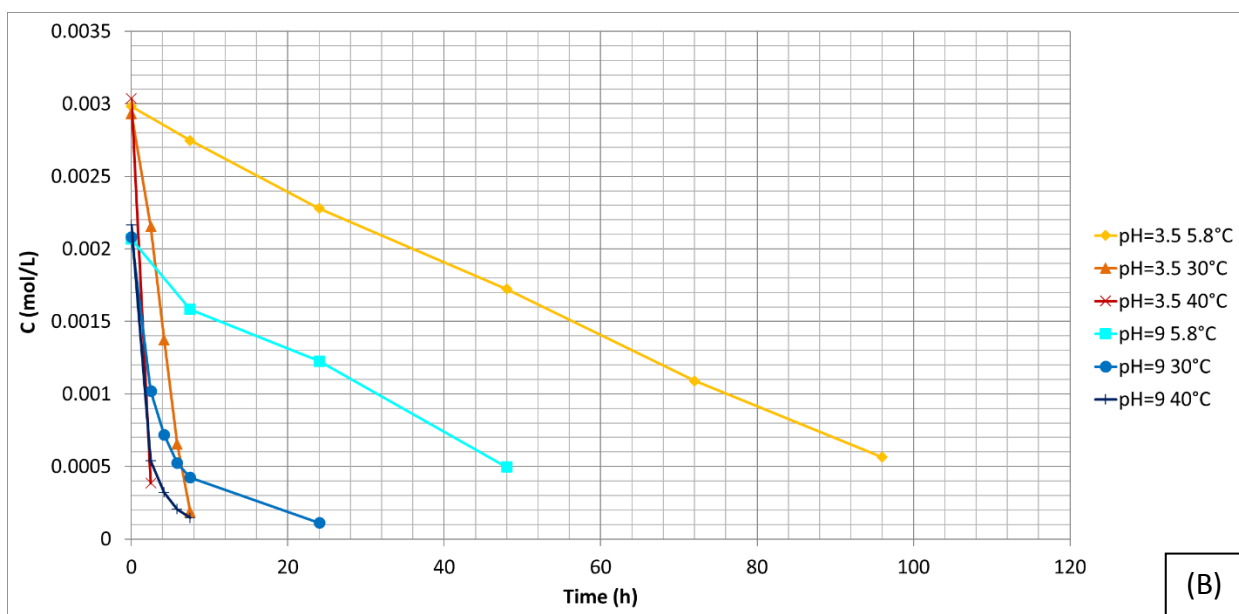
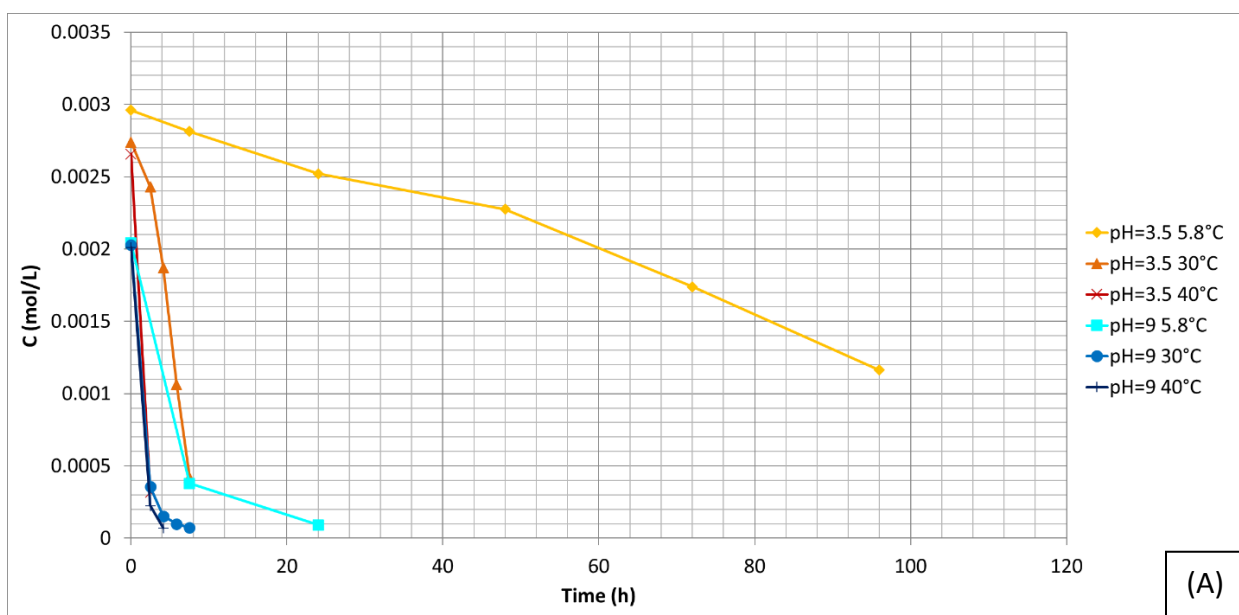


Figure 11 : Concentration of AMX in suspension as a function of time.

The curves of pH=3.5 at 40°C has only two points each so no R^2 can be calculated. (A) AMX alone. By ascending temperature, R^2 obtained are 0.9839 and 0.9461 at pH=3.5 and 0.6808, 0.7029 and 0.8906 at pH=9. (B) AMX in the presence of CLAV. By ascending temperature, R^2 obtained are 0.9982 and 0.9932 at pH=3.5 and 0.9749, 0.5183, and 0.7492 at pH=9.

2.5. Discussion

2.5.1. Identification of degradation products

From the masses identified according to the degradation conditions and thanks to the references listed in Table 9, 16 degradation products of AMX and 9 degradation products of CLAV were identified. This allowed to adapt a degradation scheme of Hirte et al.(38) for AMX (Figure 12) and Haginaka et al. and Finn et al.(40,41) for CLAV (Figure 13) according to results.

For both AMX and CLAV, many of the degradation products correspond to impurities in PE 10th(4).

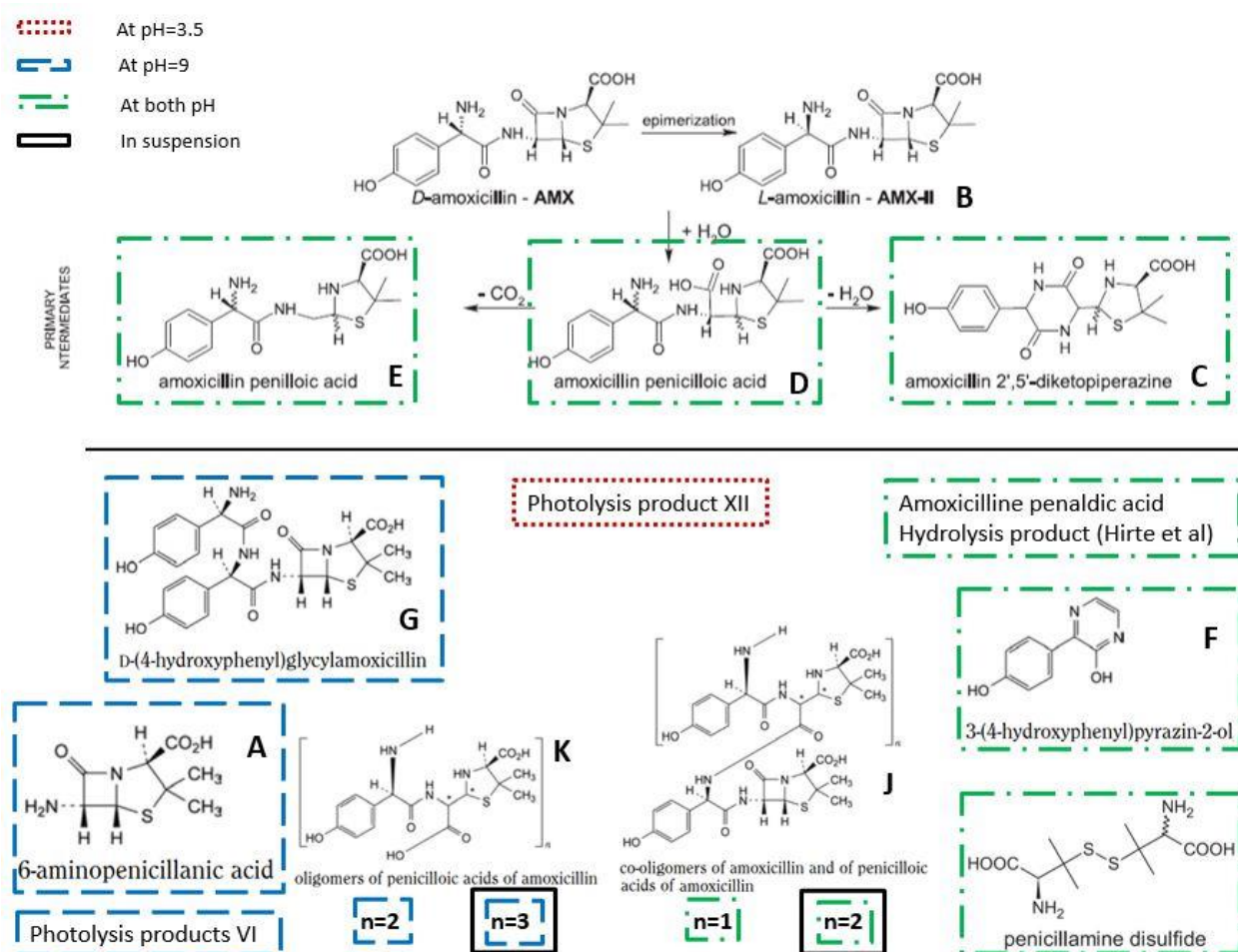


Figure 12 : Degradation products of amoxicillin at different pH-values. adapted from Hirte et al.(38).

A to K refers to impurities of the European Pharmacopeia 10th edition(9).

As according to Bundgaard et al.(32) AMX trimers J and K were only formed at high concentration (here saturation as suspension). In this study the J-trimer was detected at both pH's which was not observed by Bundgaard et al.(32) The K-trimer was only detected in basic medium. As the MS detector only goes up to m/z of 1200, it was not possible to detect polymers from 4 units. As Bundgaard et al. (46) showed, under similar conditions, more polymers are formed with an even number of monomers (dimer, tetramer, hexamer) than with an odd number (trimer, pentamer,...). As trimers can be detected with an intensity $>10^6$ in this study, it is supposed that in our experimental conditions' other polymers such as tetramers and hexamers could have been formed. Dimers are also formed in dilute solution (table 9, figure 12). Globally, some degradation products were common to both pH, and others were specific to each pH, for both API.

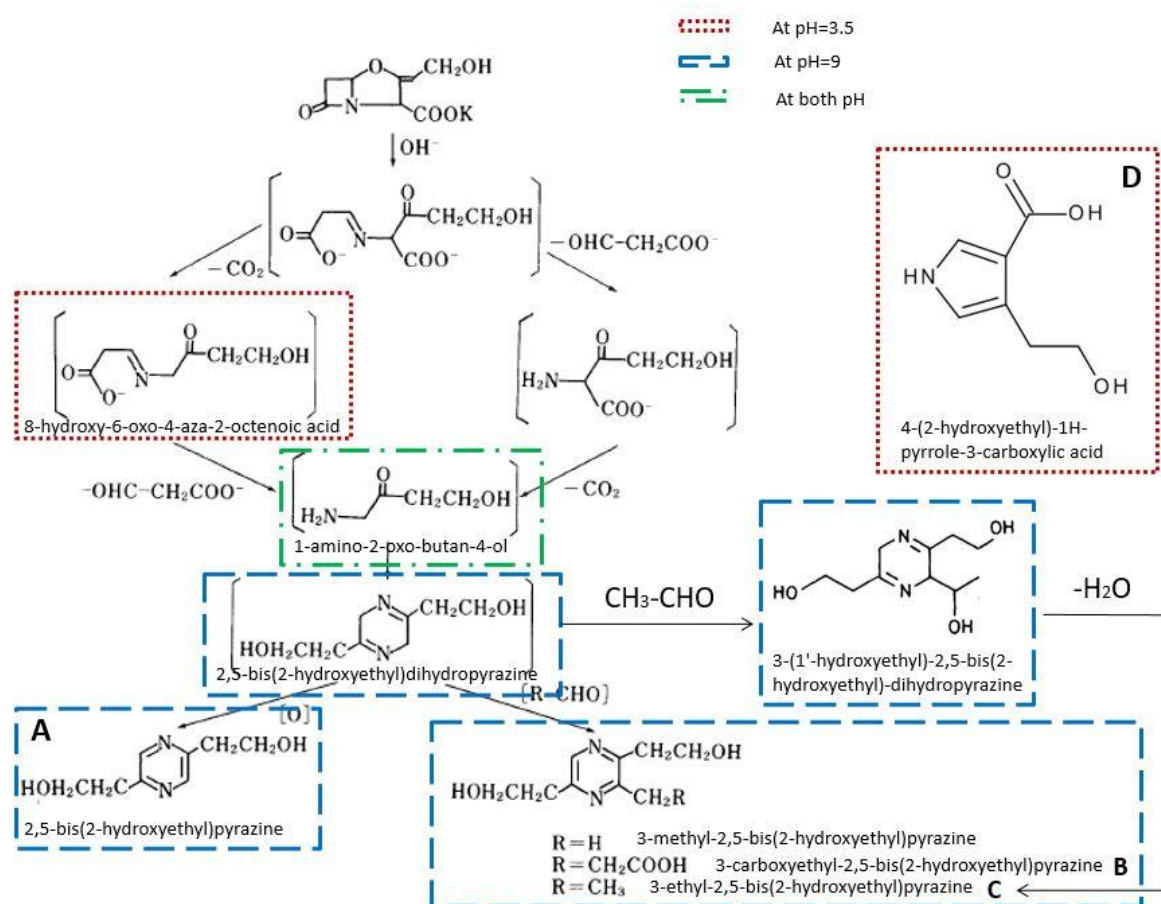


Figure 13 : Degradation products of clavulanate at different pH-values. adapted from Haginaka et al.(41) and Finn et al.(40).

A to D refers to impurities of the European Pharmacopeia 10th edition(9).

2.5.2. Kinetic order

Different kinetic orders have been observed in this study.

The first order kinetics is the general case in solution(36). This is what we obtained experimentally in the case of the degradation of AMX alone, CLAV in the presence or absence of AMX and also Vancomycin and Aspirin (data not shown). The equation is of the type: $C(t) = C_0.e^{-k_e.t}$ with $C(t)$: concentration at a given time, C_0 = initial concentration, k_e rate constant and t the time. The decay is monoexponential.

The degradation reaction of AMX was faster in the presence of CLAV than in the absence of CLAV: this means that CLAV catalyses the degradation of AMX. This is consistent with the literature (30). Using the residue method, the two rate coefficients and the two intercepts were isolated. The equation is of the type: $C(t) = A.e^{-\alpha.t} + B.e^{-\beta.t}$ with $C(t)$: concentration at a given time, A and B : intercept of each term, α and β rate constants and t the time. The decay is therefore bi-exponential.

The degradation of AMX in suspension in an acidic medium followed a degradation of order 0. The equation is of the type: $C(t) = C_0.k_e.t$ with $C(t)$: concentration at a given time, C_0 = initial concentration, k_e rate constant and t the time. The decrease is linear. If it is compared with the AMX solution alone, the kinetic order goes from 1 to 0, i.e. it decreases by one unit. In suspension, the solution concentration is at saturation and there is continuous dissolution from the solid form into suspension as the AMX in solution degrades. The solution concentration is therefore held constant at solubility. By eliminating a variation factor from the kinetic order calculation, the kinetic order decreases by one.

The degradation of AMX in suspension in basic medium followed a degradation of order 1 or 2 (data not shown). Bundgaard et al. demonstrated that an additional polymerization reaction was added to the classical hydrolysis of AMX under specific conditions: a high concentration up to 22.6mg/mL and a pH between 8.6 and 10(32). Experimental conditions of this study are in agreement with these conditions. Several data confirm this hypothesis. Macroscopically, the viscosity of AMX suspension alone at pH=9 increased over time to solidify. In terms of identified masses, the mass intensities of the AMX dimers were larger at basic pH in solution and the trimers were identified only in suspension and mostly at basic pH (table 9).

2.5.3. Degradation speed

Since it was difficult to compare rate constants with different units depending on the kinetic order and to be able to compare the reaction rate, results were expressed in time needed to degrade the first 50% of the active substance in Table 10.

According to Table 10, AMX is more sensitive at pH 9 than at pH 3.5 and the opposite phenomenon is observed for CLAV, an increase in temperature increases the degradation but increases it more at pH 3.5 than at pH 9 for both AMX and CLAV, the presence of CLAV causes little change in the rate of degradation of AMX, contrary to what Vadhat et al. have shown with higher CLAV/AMX ratio (4 concentrations of CLAV from 106 to 630 µg/mL for one concentration of AMX of 471 µg/mL) (30), the presence of AMX protects against the degradation of CLAV, especially at pH 3.5, the initial concentration in solution has little impact on the half-life for both APIs: this is due to the first-order kinetics, the degradation rate is much higher in suspension: the assumption is that the concentrated buffer can catalyze the degradation because it is proved that there is catalysis of AMX by the phosphate and citrate buffers (18,47) and catalysis of CLAV by the acetate, phosphate and borate buffers (19).

Table 10 : Time needed to degrade the first 50% of the active substance (h) of AMX and CLAV according to the conditions.

pH	T(°C)	Amoxicillin						Clavulanate				
		AMX alone in solution		AMX/CLAV in solution		in suspension		CLAV alone in solution		CLAV/AMX in solution		In suspension
		1600 µg/mL	800 µg/mL	1600/320 µg/mL	800/160 µg/mL	Alone	with CLAV	320 µg/mL	160 µg/mL	320/1600 µg/mL	160/800 µg/mL	with AMX
3.5	5.8	2705	2939	2780	1140	83	58	48	78	112	90	<6
	30	96.2	83.5	100	84	4.7	4	2.7	3.63	9.8	9.4	<1
	40	37.7	32.2	32	31	1.6	1.8	0.8	1.6	4	4.3	<1
9	5.8	402	388	258	211	5	30	20.5	18.3	42.4	23.3	<1
	30	78.8	72.2	80	54	1.6	2.3	7.8	7.5	9.2	9.2	<1
	40	45	39.6	32	25.3	1.3	1.9	5.4	5.1	6.6	7	<1

2.6. Conclusion

The influence of different factors on the stability has been studied: pH, concentration, physical form of the API, presence of another API, temperature. This study is the first step towards stability prediction based on a given formulation, it is the first study to examine the degradation kinetics of AMX and/or CLAV with a formate buffer, and to examine the degradation kinetics of these molecules in suspension.

We could pursue this study in several ways. Firstly, it would be interesting to identify precisely the apparently new degradation products detected in this study. Indeed, the number of detected masses unknown from the bibliography is important (data not shown). Secondly, it would be interesting to make solutions with several concentrations of CLAV for the same concentration of AMX to better understand the catalysis phenomenon. Thirdly, we could carry out this study directly on powdered AMX/CLAV to see if there are differences in terms of kinetics or identified degradation products. Finally, of course we could carry out this kind of study on other APIs.

Funding : This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

3. Discussion générale

Cette étude présente certaines limites. Tout d'abord le temps d'analyse très conséquent n'a pas permis de répéter l'analyse pour un même échantillon ou de multiplier les échantillons dans les mêmes conditions. Ainsi, comme les données sont peu nombreuses, aucun test statistique n'a pu être réalisé pour vérifier la linéarité des courbes. Ensuite, il aurait été plus adapté de réaliser les expériences en étant guidé par la méthode des plans d'expérience. Cela aurait minimisé le nombre de conditions d'expériences à réaliser pour obtenir les résultats. Enfin dans cette étude, de nombreuses molécules dont les m/z ne sont pas répertoriés dans la bibliographie ont été détectées mais l'utilisation d'un spectromètre de masse simple quadripôle ne permet pas l'identification de nouveaux produits de dégradation. Une analyse par spectromètre de masse en tandem ou par RMN aurait permis d'identifier ces probables nouveaux produits de dégradation et de confirmer l'identification des produits de dégradations connus faite par spectromètre simple quadripôle de façon certaine.

La figure 14 détaille le mécanisme de dimérisation majoritaire entre deux molécules d'amoxicillines. Elle aboutit à un dimère composé d'une unité d'amoxicilline et une unité d'acide pénicilloïque d'amoxicilline(48).

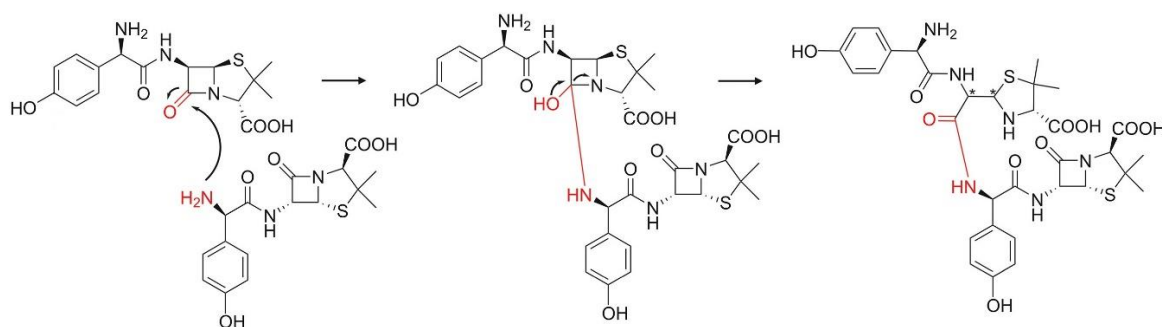


Figure 14: Dimérisation de l'amoxicilline, d'après Wu et al.(48).

La figure 15 schématise le lien réactionnel entre les différents monomères et oligomères détectés dans cette étude selon le mécanisme majoritaire de dimérisation de la figure 14.

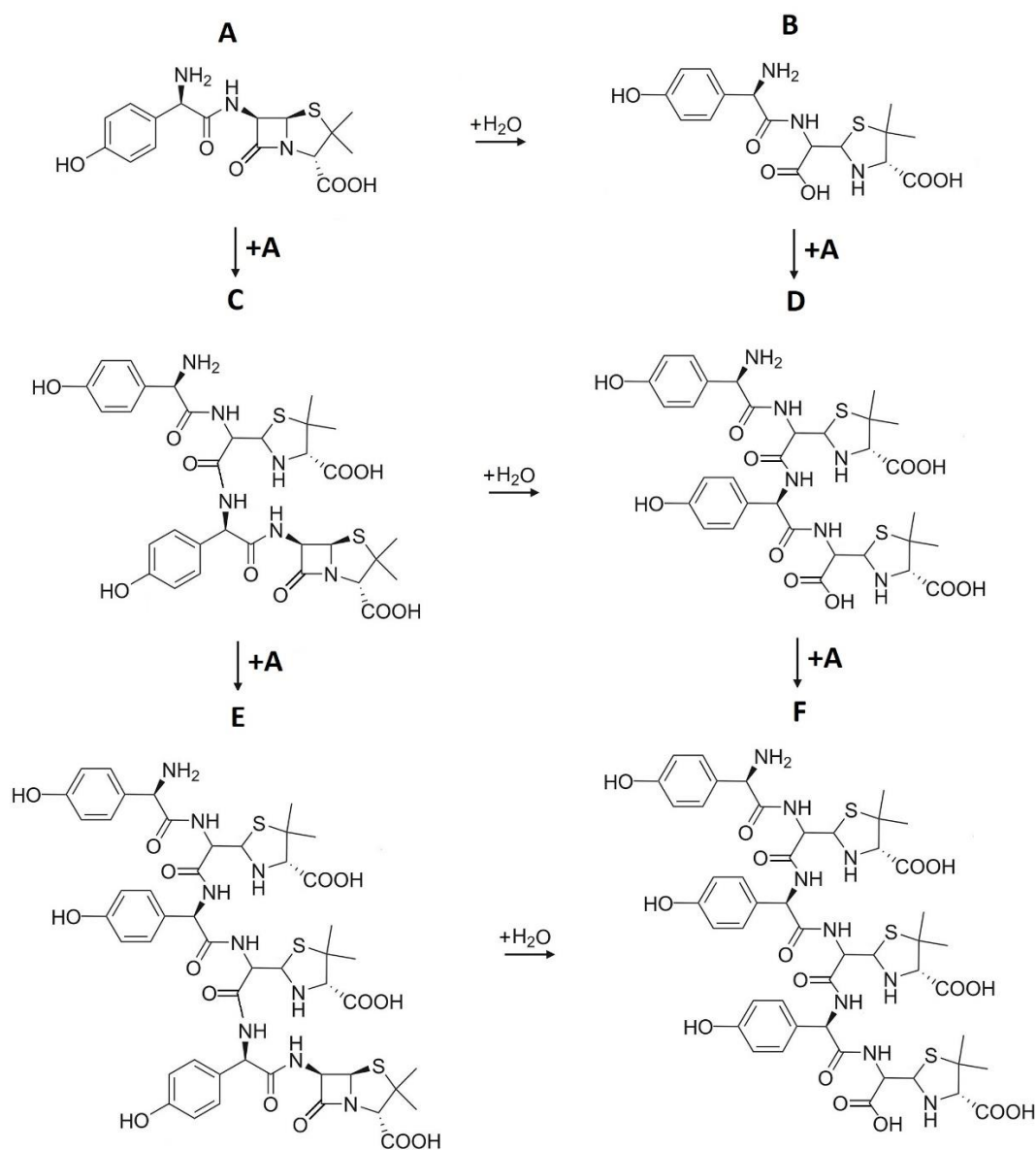


Figure 15 : Polymérisation de l'amoxicilline et de ses dérivés et hydrolyse du cycle pénème.

A : amoxicilline ; B : acide pénicilloïque d'amoxicilline ; C : Dimère d'amoxicilline et d'acide pénicilloïque d'amoxicilline ; D : Dimère d'acide pénicilloïque d'amoxicilline ; E : Trimère composé de deux unités d'acide pénicilloïque d'amoxicilline et une unité d'amoxicilline ; F : Trimère d'acide pénicilloïque d'amoxicilline.

A pH inférieur au pKa de l'amine lié au carbone 6 de la chaîne latérale, l'amine est sous forme $R-NH_3^+$ majoritairement. Il n'y a pas de doublet libre disponible, l'azote est peu réactif. A pH supérieur au pKa de l'amine, l'amine est sous forme $R-NH_2$ majoritairement. Le doublet libre de l'azote permet l'attaque nucléophile. C'est pourquoi le mécanisme dominant de la polymérisation des aminopénicillines est favorisée par un milieu basique.

Un autre mécanisme de dimérisation a été décrit concernant les aminopenicillines avec attaque nucléophile du même azote sur le carbone de l'acide carboxylique de la chaîne latérale de l'amoxicilline(48). D'après les m/z détectés, ce mécanisme de dimérisation n'a pas été mis en évidence dans cette étude.

4. Conclusion générale

De plus en plus d'études visent à anticiper la stabilité d'une préparation hospitalière.

Les études de cinétiques de dégradation sont chronophages mais permettent de gagner du temps dans la formulation d'une préparation et dans l'étude de stabilité en elle-même. L'étude des facteurs d'instabilité permet de mettre en évidence les paramètres qui sont nécessaires à contrôler pour optimiser la stabilité des substances actives. La formulation prendra en compte ces paramètres pour réaliser une préparation avec la meilleure stabilité. Ensuite les résultats de l'étude de stabilité pourront être extrapolés grâce aux premiers points de contrôle en prenant en compte les données de cinétique récoltées pendant l'étude de dégradation.

A la PUI du CHU d'Angers, ce sont les premiers travaux de cinétique de dégradation. Ce type de projet pourrait se généraliser par la suite.

Références bibliographiques

1. PubChem. Amoxicillin [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/33613>
2. Amoxicillin [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01060>
3. Reeves DS, Bullock DW. The aminopenicillins: development and comparative properties. *Infection*. 1979;7 Suppl 5:S425-433.
4. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 10th Edition | EDQM - European Directorate for the Quality of Medicines [Internet]. [cited 2021 Sep 13]. Available from: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur-10th-edition>
5. FDA Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System - ECA Academy [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://www.gmp-compliance.org/guidelines/gmp-guideline/fda-guidance-for-industry-waiver-of-in-vivo-bioavailability-and-bioequivalence-studies-for-immediate-release-solid-oral-dosage-f>
6. Thambavita D, Galappatthy P, Mannapperuma U, Jayakody L, Cristofolletti R, Abrahamsson B, et al. Biowaiver Monograph for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms: Amoxicillin Trihydrate. *J Pharm Sci*. 2017 Oct;106(10):2930–45.
7. PubChem. Clavulanic acid [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280980>
8. Clavulanic acid [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00766>
9. Bêta-lactamines (pénicillines - céphalosporines) [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/beta-lactamines-penicillines-cephalosporines>
10. ANSM. Répertoire des Spécialités Pharmaceutiques [Internet]. [cited 2022 Sep 7]. Available from: <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/index.php>
11. Habib G, Lancellotti P, Antunes MJ, Bongiorno MG, Casalta JP, Del Zotti F, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis: The Task Force for the Management of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM). *Eur Heart J*. 2015 Nov 21;36(44):3075–128.
12. eEML - Electronic Essential Medicines List [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://list.essentialmeds.org/>
13. ANSM. La consommation d'antibiotiques en France en 2016. 2017.

14. Antimicrobial consumption in the EU/EEA (ESAC-Net) - Annual Epidemiological Report for 2020 [Internet]. European Centre for Disease Prevention and Control. 2021 [cited 2022 Jul 11]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-consumption-europe-2020>
15. Antiinfectieux :: Amoxicilline :: ePOPI [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: https://www.epopi.fr/?page=fiche&id=653&cat_id=347
16. Recommandations [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: <https://www.infectiologie.com/fr/recommandations.html>
17. Antiinfectieux :: Amoxicilline-acide clavulanique :: ePOPI [Internet]. [cited 2022 Sep 6]. Available from: https://www.epopi.fr/?page=fiche&id=654&cat_id=348
18. Zia H, Shalchian N, Borhanian F. Kinetics of amoxicillin degradation in aqueous solutions. *Can J Pharm Sci.* 1977 Jan 27;12(3):80–3.
19. Haginaka J, Nakagawa T, Uno T. Stability of Clavulanic Acid in Aqueous Solutions. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1981;29(11):3334–41.
20. Décret n° 2019-489 du 21 mai 2019 relatif aux pharmacies à usage intérieur. 2019-489 May 21, 2019.
21. AFSSAPS. Bonnes Pratiques de Préparation. 2007.
22. Article L5121-1. Dec 25, 2021.
23. Caude M, Jardy, Alain. Chromatographie en phase liquide - Appareillage et applications. *Techniques de l'ingénieur.* 1995 Apr 10;
24. Boudehenn J, Gambier F. Influence des finitions poudres sur l'impact environnemental du MDF [Internet] [other]. UHP - Université Henri Poincaré; 2011 [cited 2022 Sep 6]. p. 88. Available from: <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01880918>
25. Di Benedetto D, Breuil P. Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible. *Techniques de l'ingénieur.* 2007 Mar 10;
26. Herrencknecht C. Spectrométrie de masse. 2022; Nantes.
27. Arpino P. Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse. *Techniques de l'ingénieur.* 2007 Sep 10;
28. Mori F, Barni S, Pucci N, Rossi ME, de Martino M, Novembre E. Cutaneous adverse reactions to amoxicillin-clavulanic acid suspension in children: the role of sodium benzoate. *Curr Drug Saf.* 2012 Apr;7(2):87–91.
29. EMA. Formulations of choice for the paediatric population [Internet]. European Medicines Agency. 2006 [cited 2022 Jul 10]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/formulations-choice-paediatric-population>

30. Vahdat L, Sunderland B. The influence of potassium clavulanate on the rate of amoxicillin sodium degradation in phosphate and acetate buffers in the liquid state. *Drug Dev Ind Pharm*. 2009 Apr;35(4):471–9.
31. Vahdat L, Sunderland VB. Kinetics of amoxicillin and clavulanate degradation alone and in combination in aqueous solution under frozen conditions. *Int J Pharm*. 2007 Sep 5;342(1–2):95–104.
32. Bundgaard H. Polymerization of penicillins. II. Kinetics and mechanism of dimerization and self-catalyzed hydrolysis of amoxycillin in aqueous solution. *Acta Pharm Suec*. 1977;14(1):47–66.
33. Dooms M, Carvalho M. Compounded medication for patients with rare diseases. *Orphanet J Rare Dis*. 2018 Jan 4;13(1):1.
34. Pereira AC de S, Miranda ES, Castilho SR de, Futuro DO, Teixeira LA, Paula GR de. Magistral drugs in hospitalized newborns and children. *Rev Paul Pediatr Orgao Of Soc Pediatr Sao Paulo*. 2016 Dec;34(4):403–7.
35. Lam MSH. Extemporaneous compounding of oral liquid dosage formulations and alternative drug delivery methods for anticancer drugs. *Pharmacotherapy*. 2011 Feb;31(2):164–92.
36. Florence AT, Attwood D. Drug Stability. In: *Physicochemical Principles of Pharmacy - Sixth edition*. Pharmaceutical Press;
37. Nägele E, Moritz R. Structure Elucidation of Degradation Products of the Antibiotic Amoxicillin with Ion Trap MSn and Accurate Mass Determination by ESI TOF. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2005 Oct 1;16(10):1670–6.
38. Hirte K, Seiwert B, Schüürmann G, Reemtsma T. New hydrolysis products of the beta-lactam antibiotic amoxicillin, their pH-dependent formation and search in municipal wastewater. *Water Res*. 2016 Jan 1;88:880–8.
39. Arsand JB, Hoff RB, Jank L, Meirelles LN, Silvia Díaz-Cruz M, Pizzolato TM, et al. Transformation products of amoxicillin and ampicillin after photolysis in aqueous matrices: Identification and kinetics. *Sci Total Environ*. 2018 Nov 15;642:954–67.
40. Finn MJ, Harris MA, Hunt E, Zomaya II. Studies on the hydrolysis of clavulanic acid. *J Chem Soc Perkin 1*. 1984 Jan 1;(0):1345–9.
41. Haginaka J, Yasuda H, Uno T, Nakagawa T. Degradation of Clavulanic Acid in Aqueous Alkaline Solution : Isolation and Structural Investigation of Degradation Products. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1985;33(1):218–24.
42. Trovó AG, Pupo Nogueira RF, Agüera A, Fernandez-Alba AR, Malato S. Degradation of the antibiotic amoxicillin by photo-Fenton process – Chemical and toxicological assessment. *Water Res*. 2011 Jan 1;45(3):1394–402.

43. Frański R, Czerniel J, Kowalska M, Frańska M. Electrospray ionization collision-induced dissociation tandem mass spectrometry of amoxicillin and ampicillin and their degradation products. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2014;28(7):713–22.
44. Junza A, Montané A, Barbosa J, Minguillón C, Barrón D. High resolution mass spectrometry in the identification of transformation products and metabolites from β -lactam antibiotics in thermally treated milk. *J Chromatogr A.* 2014 Nov 14;1368:89–99.
45. Pérez-Parada A, Agüera A, Gómez-Ramos M del M, García-Reyes JF, Heinzen H, Fernández-Alba AR. Behavior of amoxicillin in wastewater and river water: identification of its main transformation products by liquid chromatography/electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom RCM.* 2011 Mar 30;25(6):731–42.
46. Bundgaard H, Larsen C. Polymerization of penicillins. IV. Separation, isolation and characterization of ampicillin polymers formed in aqueous solution. *J Chromatogr.* 1977 Feb 1;132(1):51–9.
47. Tsuji A, Nakashima E, Hamano S, Yamana T. Physicochemical properties of amphoteric beta-lactam antibiotics I: Stability, solubility, and dissolution behavior of amino penicillins as a function of pH. *J Pharm Sci.* 1978 Aug;67(8):1059–66.
48. Wu Q, Zhang X, Du J, Hu C. Discussion on the dimerization reaction of penicillin antibiotics. *J Pharm Anal.* 2022 Jun;12(3):481–8.

Table des illustrations

Figure 1 : Structure chimique de l'amoxicilline(1).	13
Figure 2 : Représentation du système de classification biopharmaceutique (BCS).	14
Figure 3 : Structure chimique de l'acide clavulanique(7).....	15
Figure 4 : Schéma d'une chaîne HPLC (24).....	23
Figure 5 : Schéma du principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse, issu du cours de spectrométrie de masse du Pr. C. Herrencknecht(26).....	26
Figure 6 : Residues graphic of amoxicillin.	34
Figure 7 : Residues graphic of clavulanate.	35
Figure 8 : 3D chromatograms of forced degradation of AMX and CLAV obtained from DAD. 37	
Figure 9 : Ln(C/C0) of AMX in solution at 30°C as a function of time, according to the C0.....	40
Figure 10 : Ln(C/C0) of CLAV in solution at 30°C as a function of time, according to the C0. .	41
Figure 11 : Concentration of AMX in suspension as a function of time.	42
Figure 12 : Degradation products of amoxicillin at different pH-values. adapted from Hirte et al.(38).....	43
Figure 13 : Degradation products of clavulanate at different pH-values. adapted from Haginaka et al.(41) and Finn et al.(40).	44
Figure 14: Dimérisation de l'amoxicilline, d'après Wu et al.(48).	48
Figure 15 : Polymérisation de l'amoxicilline et de ses dérivés et hydrolyse du cycle pénème.	49

Table des tableaux

Table 1 : Materials.....	29
Table 2 : Chromatographic conditions.	30
Table 3: Gradient program of the method.....	30
Table 4 : Sampling times.	32
Table 5 : Parameters of amoxicillin method validation.	34
Table 6 : Parameters of clavulanate method validation.	35
Table 7 : Forced degradation of amoxicillin.	36
Table 8 : Forced degradation of clavulanate.....	36
Table 9 : Identified degradation products in each condition according to the references.	39
Table 10 : Time needed to degrade the first 50% of the active substance (h) of AMX and CLAV according to the conditions.	46

Facteurs influençant la cinétique de dégradation de l'amoxicilline et de l'acide clavulanique en solution et en suspension

RÉSUMÉ

A. Introduction

L'amoxicilline, une pénicilline A, a une place centrale parmi les antibiotiques, qu'elle soit associée à l'acide clavulanique ou non. Elle est peu stable en milieux aqueux dans lequel le cycle péname s'hydrolyse facilement. Les études de stabilité sont longues à réaliser et ne permettent pas de prévoir une stabilité. La cinétique de dégradation de l'amoxicilline et de l'acide clavulanique en suspension n'ayant pas été étudiée à ce jour, l'objectif de cette étude est de rechercher les facteurs influençant la cinétique de dégradation de l'amoxicilline et de l'acide clavulanique en solution ou en suspension afin de modéliser leur instabilité.

B. Sujets et Méthodes

Une méthode indicatrice de stabilité pour la détermination couplée de l'amoxicilline et de l'acide clavulanique a été développée par chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur UV à barrette de diode et un spectromètre de masse. Les expériences ont été réalisées avec les molécules seules amoxicilline, acide clavulanique et combinées. Les échantillons ont été incubés à 3 températures et 2 valeurs de pH et ont été analysés à au moins 5 temps différents.

C. Résultats

Nous avons découvert que l'amoxicilline en suspension à pH 3,5 avec ou sans acide clavulanique a une cinétique de dégradation d'ordre pseudo zéro. A pH 9, elle présente une cinétique de dégradation d'ordre supérieur à cause de l'ajout d'un autre mécanisme de dégradation en plus de l'hydrolyse, la polymérisation.

D. Conclusion

L'influence de différents facteurs sur la stabilité a été étudiée : pH, concentration, forme physique de la molécule, présence d'une autre substance active, température. Grâce aux produits de dégradations identifiés, le mécanisme de polymérisation majoritaire des pénicillines A a été confirmé parmi les différents mécanismes décrits dans la bibliographie.

Mots-clés : Produit(s) de dégradation, Hydrolyse, Anti-infectieux, Spectrométrie de masse (MS), Spectroscopie UV/Vis, Suspension(s), Chromatographie, HPLC (chromatographie liquide haute performance/pression), Cinétique, Analyse, Chromatographie liquide-Spectrométrie de masse (LC-MS).

Factors influencing the degradation kinetics of amoxicillin and clavulanic acid in solution and suspension

ABSTRACT

A. Introduction

Amoxicillin, a penicillin A, has a central place among antibiotics, whether or not it is associated with clavulanic acid. It is not very stable in aqueous media in which the penam ring is easily hydrolyzed. Stability studies are long to perform and do not allow to predict stability. The degradation kinetics of amoxicillin and clavulanic acid in suspension having not been studied to date, the objective of this study is to investigate the factors influencing the degradation kinetics of amoxicillin and clavulanic acid in solution or in suspension in order to model their instability.

B. Materials and Methods

A stability indicator method for the coupled determination of amoxicillin and clavulanic acid was developed using high performance liquid chromatography coupled with a diode array UV detector and a mass spectrometer. Experiments were performed with the single molecules amoxicillin, clavulanic acid and combined. The samples were incubated at 3 temperatures and 2 pH values and analysed at least 5 different times.

C. Results

We found that amoxicillin in suspension at pH 3.5 with or without clavulanic acid has pseudo-zero order degradation kinetics. At pH 9, it has higher order degradation kinetics due to the addition of another degradation mechanism besides hydrolysis, polymerization.

D. Conclusion

The influence of different factors on the stability was studied: pH, concentration, physical form of the molecule, presence of another active substance, temperature. Thanks to the degradation products identified, the main polymerization mechanism of penicillin A was confirmed among the different mechanisms described in the literature.

Keywords : Degradation product(s), Hydrolysis, Antiinfective(s), Mass Spectrometry (MS), UV/Vis spectroscopy, Suspension(s), Chromatography, HPLC (high-performance/pressure liquid chromatography), Kinetics, Analysis, Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS).