

V.1. DEVELOPPEMENT

V.1.1. INTRODUCTION

Dans le domaine des substances médicamenteuses chirales, la tendance actuelle consiste à développer les nouveaux médicaments chiraux sous forme d'énantiomères purs et à réévaluer les anciens médicaments racémiques en vue d'estimer les avantages potentiels des énantiomères seuls [150]. Par conséquent, il est crucial de développer des méthodes basées sur des techniques analytiques hautement efficaces, telles que l'EC. L'introduction d'un électrolyte non aqueux en EC s'est révélée intéressante pour la résolution énantiomérique de médicaments chiraux [158]. Les solvants ayant des constantes diélectriques relativement faibles, comme le méthanol et l'éthanol, constituent en principe un environnement favorable à la discrimination chirale en raison de leur capacité à promouvoir les interactions intermoléculaires [249]. Certaines CD sulfatées, telles que l'heptakis(2,3-di-*O*-acétyl-6-*O*-sulfo)- β -CD, l'heptakis(2,3-di-*O*-méthyl-6-*O*-sulfo)- β -CD (HDMS- β -CD), l'octakis(2,3-di-*O*-acétyl-6-*O*-sulfo)- γ -CD et l'octakis(2,3-di-*O*-méthyl-6-*O*-sulfo)- γ -CD, sont solubles dans le méthanol et ont été appliquées avec succès comme sélecteurs chiraux pour la séparation d'énantiomères en EC en milieu non aqueux [250-253]. La combinaison de l'HDMS- β -CD et d'un agent d'appariement d'ions, à savoir le camphosulfonate, a également été utilisée pour moduler par un phénomène de compétition l'énantioséparation de médicaments basiques en EC en milieu non aqueux [254, 255].

Il est intéressant de signaler que la détermination de la pureté énantiomérique n'avait jamais été investiguée en EC en milieux non aqueux. Quelques méthodes ont été décrites dans la littérature pour la séparation énantiomérique du timolol en EC en milieux aqueux [256, 257]. Cependant, d'un point de vue qualitatif, l'énantiorésolution observée était très faible et aucun résultat n'a été fourni quant à la pureté énantiomérique.

Dans cette partie du travail, nous allons évaluer la possibilité d'utiliser l'EC en milieu non aqueux pour déterminer la pureté énantiomérique du maléate de S-timolol avec une limite de quantification appropriée (0,1 %) pour l'impureté R-timolol.

V.1.2. PRÉPARATION DES SOLUTIONS

Des solutions mères (0,5 mg/mL) des différentes substances testées comme étalon interne ont été préparées dans du méthanol et diluées avec ce même solvant pour obtenir des solutions filles à des concentrations de 10 µg/mL.

Des solutions mères (0,5 mg/mL) de chaque énantiomère du timolol ont également été préparées dans du méthanol.

Une solution fille contenant un mélange de pyridoxine (5 µg/mL), de S-timolol (10 µg/mL) et de R-timolol (5 µg/mL) a été préparée par dilution, dans du méthanol, de chacune des solutions mères correspondantes.

Une solution d'échantillon à examiner a été préparée en dissolvant environ 20 mg de maléate de S-timolol (lot N°8060) dans 10 mL de méthanol et en ajoutant des volumes appropriés de la solution mère de pyridoxine pour obtenir une concentration de 5 µg/mL et celle de R-timolol pour obtenir une concentration de 2 µg/mL.

V.1.3. RESULTATS ET DISCUSSION

V.1.3.1. OPTIMISATION DES CONDITIONS ELECTROPHORETIQUES

Dans une précédente étude ayant trait à la séparation énantiomérique d'une série de médicaments basiques par association de l'HDMS-β-CD et du camphosulfonate de potassium [255], une stratégie d'optimisation rapide a été développée et appliquée à l'énantioséparation du timolol. Trois conditions expérimentales différentes ont été réalisées et concernaient différentes combinaisons de l'HDMS-β-CD et du camphosulfonate, à savoir :

- (1) 5 mM / 25 mM,
- (2) 30 mM / 10 mM, et
- (3) 30 mM / 30 mM.

Les solutions correspondant à ces différentes combinaisons ont été préparées dans du méthanol contenant 0,75 M d'acide formique. La meilleure séparation énantiomérique a été obtenue avec la troisième condition expérimentale pour laquelle une résolution de 8,5 a été observée.

Dans la continuité de cette précédente étude, nous avons évalué la possibilité d'utiliser cette condition expérimentale pour déterminer la pureté énantiomérique du S-timolol. Il est important de préciser que, dans les trois conditions expérimentales testées, le premier pic migrant a été identifié comme étant l'énantiomère S du timolol et le second comme l'énantiomère R.

V.1.3.2. SELECTION DE L'ETALON INTERNE

En électrophorèse capillaire, l'utilisation d'un étalon interne est indispensable pour la quantification et ce, en vue de compenser la variabilité liée à l'injection de faibles volumes de solutions échantillons dans le capillaire. De plus, dans notre cas, l'utilisation d'un étalon interne est aussi nécessaire afin de compenser une éventuelle évaporation du solvant méthanolique servant à la préparation de la solution d'échantillon [258]. Toutefois, pour minimiser ce phénomène, d'autres précautions pratiques ont été prises, telles que l'utilisation d'un système d'air conditionné dans le local de travail, l'utilisation de fioles (vials) hermétiques et l'application d'une température peu élevée au niveau du capillaire afin de contrôler l'effet Joule.

En ce qui concerne la sélection de l'étalon interne, nous avons tenu compte d'un certain nombre de critères en rapport avec les conditions de séparations électrophorétiques, la nature du composé à quantifier (timolol) ainsi que celle de l'étalon interne. Ainsi, le premier critère considéré a été celui de la proximité de l'étalon interne et de la substance d'intérêt (R-timolol) tout en maintenant une résolution convenable entre les deux [259]. D'autres critères élémentaires, mais tout aussi importants, ont également été pris en compte, à savoir la stabilité, la solubilité en solution méthanolique et l'absence de toxicité du composé considéré [258]. Compte tenu des objectifs de la méthode d'EC en milieux non aqueux, un troisième groupe de critères a encore été envisagé, à savoir : l'étalon interne devait être un composé non chiral, basique et présenter une absorptivité comparable à celle du R-timolol à sa longueur d'onde optimale (295 nm). De plus, l'étalon interne devait idéalement migrer avant les énantiomères du timolol pour éviter un allongement du temps d'analyse.

Sur la base de ces exigences, nous avons testé plusieurs composés : la flunarizine, la chlorpromazine, la procaïne, l'oxymétazoline et la pyridoxine (Tableau V.1.). La flunarizine présentait un faible signal à 295 nm, le temps de migration de la chlorpromazine était quant à

lui relativement long et la résolution entre la procaïne et le R-timolol était très faible. Dès lors, il nous restait l'oxymétazoline et la pyridoxine.

Tableau V.1. – Sélection de l'étalon interne adéquat

<u>Composés testés</u>	<u>Temps de migration</u>
Flunarizine	13,8 min (faible signal à 295 nm)
Chlorpromazine	18,0 min
Procaïne	1,0 min
Oxymétazoline	10,4 min (faible signal à 295 nm)
Pyridoxine	10,2 min

Toutefois, l'absorptivité de l'oxymétazoline étant assez faible à 295 nm comparativement à celle de la pyridoxine. Nous avons dès lors retenu cette dernière substance (Figure V.1.) à la concentration de 5 µg/mL. L'électrophérogramme obtenu dans les conditions prescrites (Figure V.2.) montre que les exigences fixées pour la sélection de l'étalon interne ont été parfaitement rencontrées avec la pyridoxine.

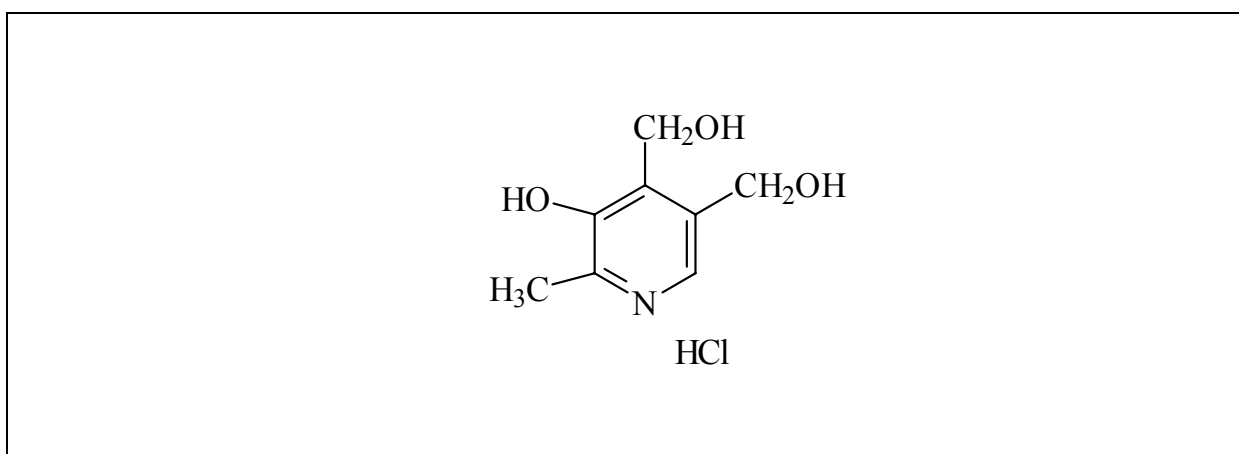


Figure V.1. – Structure chimique du chlorhydrate de la pyridoxine

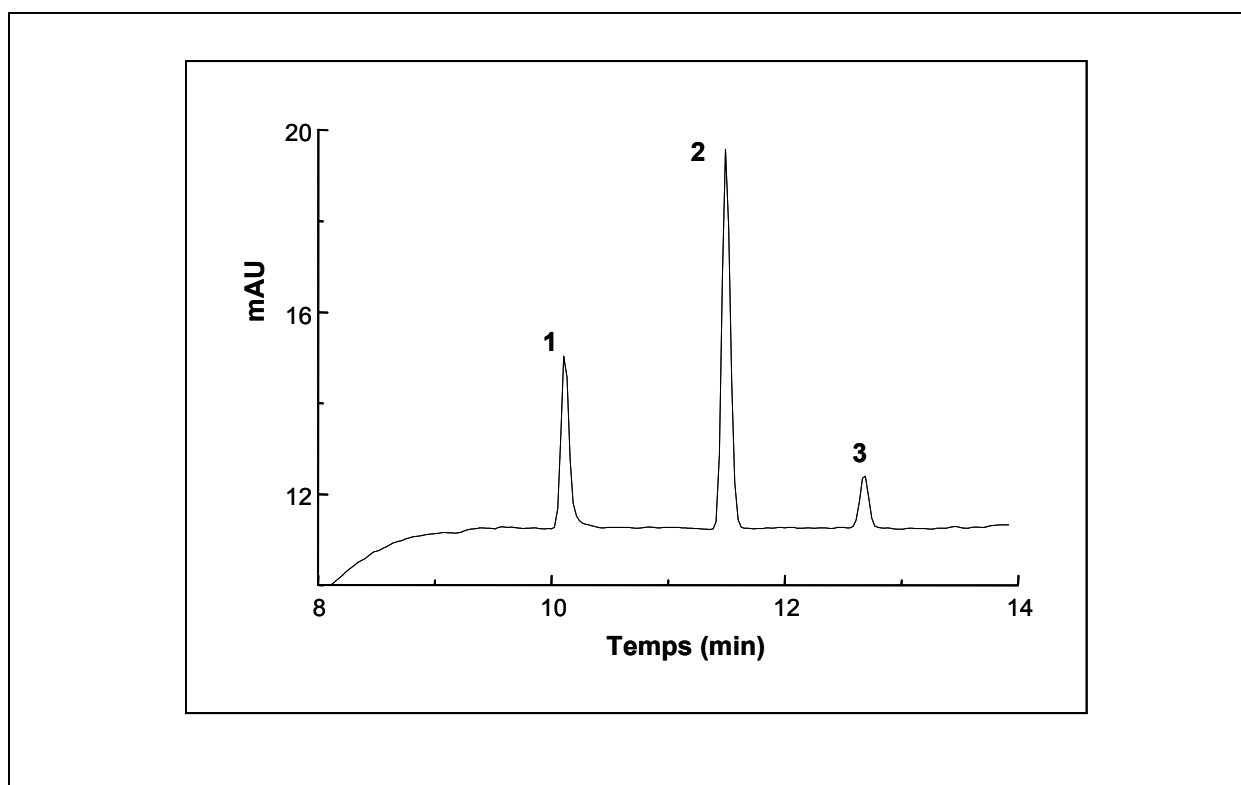


Figure V.2. – Electrophérogramme d'une solution contenant la pyridoxine, le S-timolol et le R-timolol.

Pics et concentrations: 1.- pyridoxine (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 2.- S-timolol (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et 3.- R-timolol (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). $R_{s_{1-2}} = 9,2$ et $R_{s_{2-3}} = 8,5$; $\alpha_{1-2} = 1,137$ et $\alpha_{1-3} = 1,254$

V.1.3.2. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DE LA SOLUTION ECHANTILLON ET DU TEMPS D'INJECTION

Ayant sélectionné un étalon interne, nous nous sommes ensuite intéressé à l'étude de l'influence d'une part, de la concentration de la solution de S-timolol aux niveaux habituellement utilisés pour la détermination des impuretés et d'autre part, à celle du temps d'injection sur la sensibilité de la détection. En EC, il est important de choisir judicieusement la concentration en analyte puisque les faibles diamètres internes des capillaires conduisent souvent à des effets de surcharge entraînant une perte d'efficacité engendrant elle-même des

difficultés lors de la quantification. Par ailleurs, le temps d'injection, qui conditionne le volume de solution injectée, est important à tester.

A cette fin, nous avons fait varier la concentration de la solution échantillon dans un intervalle allant de 0,5 mg/mL à 3,0 mg/mL ainsi que le temps d'injection de 6 sec à 60 sec. Ces tests ont été réalisés en considérant une limite de quantification minimale de 0,1 % en R-timolol.

Les concentrations inférieures à 1,5 mg/mL ne permettaient pas d'atteindre facilement la limite de quantification attendue alors que celles supérieures à 2,5 mg/mL saturaient le capillaire conduisant à des blocages fréquents. En ce qui concerne le temps d'injection, nous avons constaté qu'à partir de 10 sec, la ligne de base de l'électrophérogramme était perturbée et qu'au-delà de 30 sec, il y avait une diminution de courant avec déformation du pic du R-timolol (pic arrondi) suite à la diminution de l'effet de stacking.

Les meilleurs résultats ont été obtenus en utilisant une solution à la concentration de 2 mg/mL introduite à l'aide d'une pression de 5 kPa pendant 8 sec. Dans ces conditions, les énantiomères du timolol sont toujours bien séparés tout comme l'étalon interne et le S-timolol. La figure V.3. montre l'électrophérogramme d'une solution de maléate de S-timolol à 2 mg/mL enrichie à l'aide de 0,1 % de R-timolol et contenant l'étalon interne.

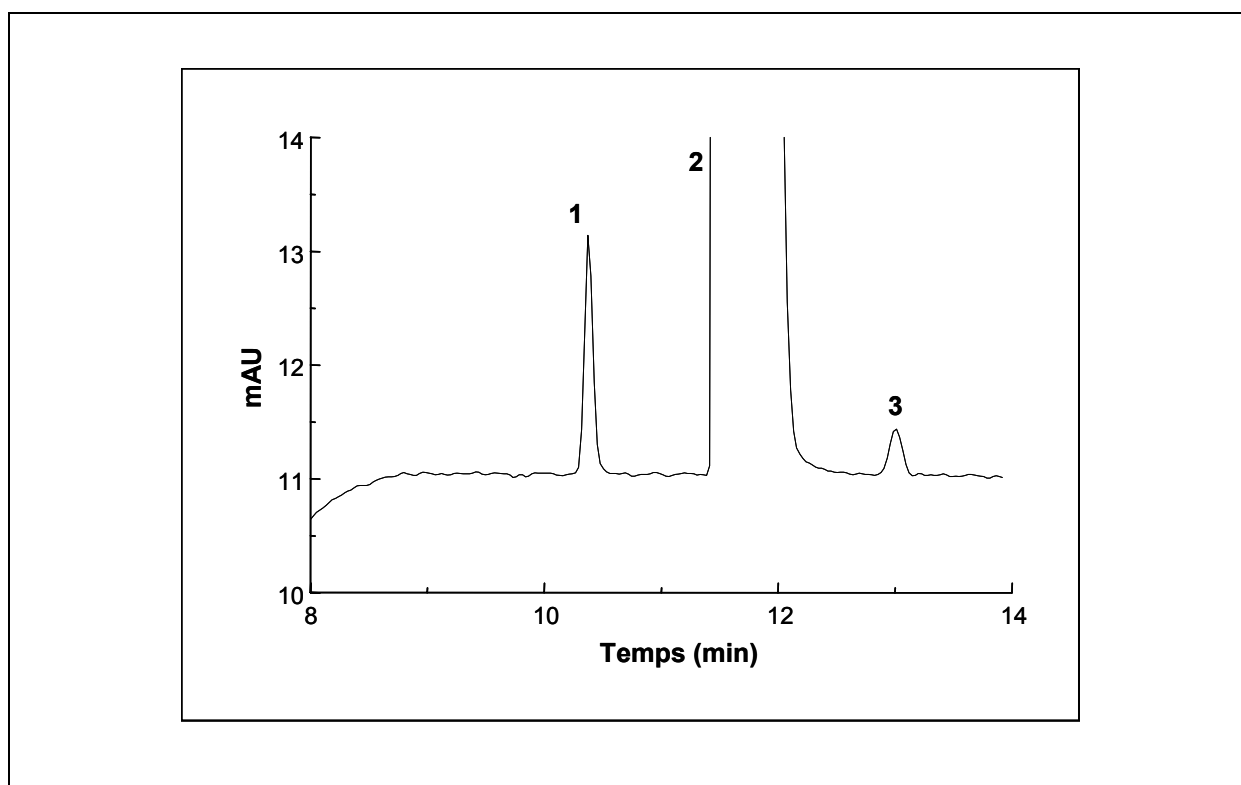


Figure V.3. – Electrophérogramme d'une solution échantillon contenant 0,1 % de R-timolol

Pics et concentrations: 1.- pyridoxine (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 2.- S-timolol (2 mg/mL) et 3.- R-timolol (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Il est important de noter que dans ces conditions et en dépit de la forte concentration de la solution du produit parent injectée (S-timolol), le pic correspondant n'en demeure pas moins symétrique. Le R-timolol est donc toujours bien détecté. En effet, le phénomène de surcharge du capillaire due à cette forte concentration est peu prononcé par rapport à ce que l'on observe habituellement en milieux aqueux. Ceci pourrait être lié aux mobilités plus faibles observées en milieux non aqueux.

V.1.4. CONCLUSION

Dans cette partie de notre travail, nous avons sur la base des travaux de A.C. Servais et coll. [255] rapidement mis au point les conditions expérimentales pour la détermination de la pureté énantiomérique du maléate de S-timolol par électrophorèse capillaire en milieux non aqueux.

Nous avons obtenu une énantiomérisation très élevée ainsi qu'une résolution suffisante entre le S-timolol et la pyridoxine, sélectionnée comme étalon interne.

Enfin, signalons que la méthode ainsi développée s'est révélée très intéressante puisqu'elle permet d'observer 0,1 % de R-timolol dans le maléate de S-timolol.