

Bernard Tilquin

Professeur ordinaire, UCL,
Faculté de médecine, Ecole de
pharmacie CHAM

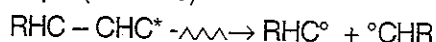
COMPRENDRE LA RADIOSTÉRILISATION

Introduction

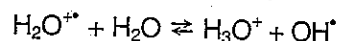
La stérilisation des médicaments par l'action des rayonnements ionisants, rayonnement gamma du ^{60}Co ou faisceau d'électrons accélérés à 10 MeV (10.000.000 eV) a été présentée dans cette revue en insistant sur ses avantages et en précisant la législation (1). Le propos de cet article est d'expliquer les mécanismes radiolytiques; cette connaissance est nécessaire pour développer le procédé de radiostérilisation. Une introduction concise à la chimie des radiations ionisantes a été proposée par un docteur du groupe (2) et diverses méthodes de détection de l'ionisation ont aussi été proposées (3).

Lorsque l'Unité d'Analyse Chimique et Physico-Chimique des médicaments CHAM a entamé en 1989 ses travaux sur l'analyse chimique des produits de la radiolyse de médicaments, l'application de la méthode était freinée par l'absence de détection de ces produits radiolytiques. Des modifications organoleptiques étaient observées, surtout le « jaunissement » de la poudre d'antibiotique (4). Par ailleurs, cette variation de couleur suffisait à écarter toute application en médecine humaine. La méconnaissance du procédé conduisait aussi à de graves inexactitudes comme la possibilité de radioactivité induite. Des normes strictes permettent d'écarter cette éventualité (5). Par opposition aux rayons UV, le rayonnement ionisant est « pénétrant » et peut interagir avec tous les électrons, son interaction n'est pas sélective et limitée en surface. Le rayonnement ionisant, c'est l'électron accéléré (ou l'électron Compton) émis par l'interaction d'un rayon gamma qui cède des petits paquets d'énergie (ca 100 eV) le long de son parcours et génère ainsi des centres d'activation (grappes) avec cinq à six ionisations. L'ionisation est l'acte primaire, il y a formation d'un ensemble « super excité » cation-électron (exciton) qui cède son énergie de diverses manières (relaxation, transfert à distance surtout en phase solide, rupture de liaison,...). Les radicaux sont formés par une deuxième étape, par exemple

1. Rupture homolytique d'une liaison chimique (10^{-12} sec)



2. Réaction ion-molécule (10^{-14} sec)

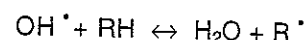


In fine, la radiolyse génère des radicaux, on attend donc des mécanismes radicalaires et ainsi des produits de radiolyse. Un radical peut conduire à des réactions en chaîne ou subir une réaction de terminaison avec un autre radical.

Faisons un calcul très simplifié, en phase aqueuse, il y a environ $6 \cdot 10^{-7}$ mole-radicaux pour 1 joule d'énergie cédée par kilo (Gy ou Gray). Pour 10.000 Gy, la quantité de molécule transformable est de $6 \cdot 10^{-3}$ mole. Un soluté dilué est complètement détruit par la radiolyse dans l'eau qui va générer des radicaux réactionnels (OH^\bullet , H^\bullet , électrons aqueux,...). Mais si un solide est irradié, 1 kg peut contenir 10 moles et une perte de $6 \cdot 10^{-3}$ mole conduit à un taux de transformation faible. En pratique, il est encore beaucoup plus faible (10^{-7} mole) car, dans le solide, le transfert de l'énergie initiale sur des molécules bien ordonnées (excitation d'un ensemble de molécule, essayez de lever un point isolé d'un mouchoir) et le mécanisme d'« effet cage » réduisent la transformation chimique. L'effet cage exprime l'incapacité de fragments de molécules à échapper à l'environnement rigide des autres molécules, ces fragments ne peuvent diffuser et pourront se combiner entre eux. Selon les mesures en Résonance Paramagnétique Electronique, le radical observé résulte de la perte d'un atome H^\bullet qui peut diffuser dans un solide et échapper à l'effet cage.

L'effet biologique de la radio-stérilisation

Pour l'ADN en solution aqueuse, la probabilité d'ioniser une molécule d'eau ou une molécule d'ADN est comparable, dès lors l'eau plus abondante subit l'interaction avec le rayonnement et l'ADN est attaqué par les radicaux produits dans l'eau, on parle d'« effet indirect ». En milieu aérobie, c'est le radical hydroxyle OH^\bullet qui attaque, l'électron aqueux étant éliminé par réaction avec l'oxygène dissous. La réaction dominante est l'oxydation.



Les cibles sont les atomes d'hydrogène des désoxyriboses et des bases ; les radicaux OH^\cdot peuvent aussi s'additionner sur les doubles liaisons $\text{C}=\text{C}$ des bases de l'ADN. Le dommage initial est ainsi un radical porté soit par un sucre soit par une base, une des conséquences sera une coupure de chaîne. Les ruptures sans traitement ultérieur ne sont que pour les sucres ; pour les bases, un traitement alcalin conduit à l'élimination de la base. L'attaque de OH^\cdot est aussi modulée par la structure, les sites doivent être accessibles au radical OH^\cdot en diffusion, les sites à l'intérieur de l'hélice (ADN.B) sont protégés.

Les dégradations radio-induites peuvent être classées en deux catégories :

1/ Les ruptures initiées par l'attaque de OH^\cdot sur les sucres et dont la probabilité est liée à la géométrie. Lorsque la cellule se reproduit, l'ADN est déroulé et plus sensible à l'attaque. Si les ruptures simples sont réparables, les ruptures « doubles brins » sont létales.

2/ Les modifications des bases peuvent induire des altérations du code génétique : cancer radio-induit, instabilité génomique, mort de la cellule,...

Notons que si on considère un noyau cellulaire, la proportion en eau (10%) est faible et un effet direct du rayonnement sur l'ADN ne peut être écarté.

Les cellules vivantes sont beaucoup plus sensibles à l'ionisation que les molécules chimiques, c'est la base de la radio-stérilisation !

Si on considère qu'une dose de 10 Gy (10 joule Kg^{-1}) est létale pour l'homme, environ 1 kGy (1000 Gy) est nécessaire pour éliminer des insectes et de 3-4 kGy pour détruire la charge microbienne. Plus la vie est organisée d'une manière complexe, plus elle est sensible au rayonnement ionisant avec une fragilité particulière lors de la reproduction : une dose de 200 Gy suffit à empêcher les mouches de se reproduire et évite la perte du blé dans les silos de l'Inde.*

La dose de stérilisation

Les microorganismes, cellules procaryote (bactérie) ou eucaryote (champignon, algue,...) ont besoin de leur matériel génétique pour se répliquer ; l'énergie pour ce faire est fournie par l'adénosine triphosphate. La stérilisation concerne surtout les bactéries mais aussi les virus (non procaryote) et les

viroïdes mais les prions (sans ADN ou ARN) résistent à la chaleur extrême et à l'ionisation. Une solution aseptique ne produit pas de maladie, en théorie, tous les microorganismes doivent être éliminés. Les tests de contrôle concernent une partie de la production et consistent à faire croître dans un milieu de culture la contamination bactérienne ou fongique. La situation est complexe car les bactéries ont développé des mécanismes de protection et de réparation. Les « spores » qui ne sont pas tuées mais « dorment » peuvent s'ajouter à des cellules végétatives qui fournissent un milieu favorable. Ces considérations expliquent que la stérilisation nécessite une « sur-destruction » théorique (overkill) des microorganismes. En pharmacie, on admet la probabilité d'un échantillon contaminé sur un million d'échantillons stériles soit un niveau d'assurance de sécurité (SAL) de 10^6 (ANSI/AAMI/ISO 11137).

En théorie, on peut utiliser les temps nécessaires (et la dose) pour tuer 90% des microorganismes (D_{10}) et multiplier par 6. En radio-stérilisation, le $6 \times D_{10}$ correspond à une dose de stérilisation. Si on délivre cette dose à l'échantillon, il est stérile. Un seul paramètre doit être vérifié.

Pour comprendre cette théorie, il faut souligner que la fraction de microorganismes survivants en fonction de la dose cédée suit une loi exponentielle ; dans un diagramme logarithmique, la variation est quasi linéaire :

$$\log_{10} \frac{N}{N_0} = -kD$$

avec N survivants à la dose D pour N_0 comme nombre initial. Pour le D_{10} ,

$$\log_{10} \frac{0,1}{1} = -kD_{10}$$

Et $6 \times D_{10}$, donne un rapport de 1.000.000. La surprise, c'est que les D_{10} sont voisins de 1,5 kGy à 1,7 kGy soit 10 ou 15 kGy pour la dose de stérilisation. La dose recommandée de 25 kGy apporte un SAL beaucoup trop élevé. En pratique, dans les conditions de production (assurance qualité) actuelles, des doses de stérilisation sont validées pour quelques kGy (8-10 kGy) voire beaucoup moins.

L'AAMI (association pour l'avancement en instrumentation médicale) a par ailleurs validé des sélections de dose basée sur le bioburden (contamination initiale) (les normes ont été précisées dans l'article précédent (1)).

Les moisissures sont aussi sensibles

* Pour de plus amples informations, consulter les livres ABCRI « Actions biologique et chimique des rayonnements ionisants » (Ed. B.Tilquin, Frison-Roche). 1990 ; 1992 ; 2001.

($D_{10} \approx 5$ kGy) mais pas les virus en coque qui justifient des doses trop élevées (> 50 kGy) que pour préserver le médicament.

La radio-stérilisation n'est pas non plus appropriée pour des échantillons souillés ou « à récupérer », les tests pyrogènes seraient alors positifs.

La dose utilisée est un point important, la dose c'est aussi le coût de l'opération. De plus, une réduction de la dose évite les changements de coloration et maintient la pureté du solide irradié. Les travaux d'analyse chimique utilisent souvent 25 kGy pour détecter les produits qui sont en traces mais s'accumulent avec la dose cédée. Notons que la thèse pionnière de F. Zeegers (UCL, 1992) avait montré que, même à 25 kGy pour un solide, les tests de pureté proposés par la pharmacopée sont vérifiés, exception parfois pour la décoloration et la variation de l'acidité. Le changement de coloration des antibiotiques irradiés n'est pas nécessairement dû à un produit radiolytique très chromophore ; des électrons piégés, à l'origine de la thermoluminescence, peuvent colorer le milieu, la couleur disparaît lors de la mise en solution.

Le verre des ampoules se colore aussi (brunissement) pendant l'irradiation ; la coloration est due à des électrons piégés qui disparaissent lors du recuit thermique du verre. Il existe aussi du verre qui se colore très peu (COC et CZ plastique).

Dose homogène dans le volume irradié

Si l'irradiation par des caissons à électrons (en haut et en bas) est nécessaire pour avoir une dose à répartition régulière dans une boîte de quelques centimètres, l'irradiation gamma peut se réaliser sur de grands échantillons (conteneur), la différence entre D_{\max} et D_{\min} se pose. D_{\max} est la dose maximale sans dégradation et D_{\min} est la dose minimale pour la stérilisation. Le rapport D_{\max}/D_{\min} doit être voisin de 1, un léger écart (1,28) est toutefois accepté.

D_{\max} doit inclure la dose cédée pour « décontaminer » éventuellement un échantillon solide avant de le conditionner et de le stériliser (doses à effet additif pour les mécanismes de radiolyse).

Médicaments à effet retard (polymeric drug delivery systems)

Les médicaments enrobés peuvent être stérilisés par des méthodes thermiques ou préparés d'une manière aseptique. L'usage

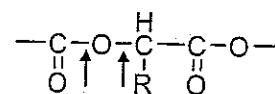
de rayonnement ionisant est une alternative ou parfois aussi le meilleur choix. Le thème est complexe et sera seulement évoqué.

Le milieu à irradier est ainsi hétérogène et la densité en électrons peut être différente entre la substance active et le polymère d'enrobage. C'est un problème supplémentaire pour la répartition régulière de la dose cédée et une adaptation des conditions d'irradiation peut être nécessaire pour vérifier le caractère homogène ($D_{\max}/D_{\min} < 1,28$) de la dose cédée.

Tout polymère soumis à l'irradiation subit deux effets : une dégradation et une augmentation du pontage ; la balance entre les deux processus inverses est fonction de la dose cédée, du type de polymère et des conditions de l'irradiation (6).

Des polymères lactide/glycolide sont proposés comme adaptés à la radiostérilisation (Ferring, Astra Zeneca, Sandoz, Roussel,...). Ils se présentent comme bolus solide ou comme microparticules. Le mécanisme de l'irradiation est décrit avec une étape radicalaire.

Si on examine un module de base,



les flèches indiquent la position des ruptures proposées pour les scissions de chaîne, la rupture de la liaison C-H conduirait plutôt à un pontage. Ces hypothèses ne doivent pas faire oublier que, pour chaque radical, il y a compétition entre les réactions radicalaires de terminaison par dismutation (scission) ou par combinaison (pontage). L'expérience a montré que la vitesse de fourniture du principe actif n'est pas affectée par la radiostérilisation dans certaines conditions. Les polyesters et les polyanhydrides sont dégradés par un phénomène d'érosion dont la vitesse peut être amplifiée par l'irradiation.

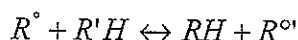
La formation des hydrogels peut être obtenue par l'irradiation, c'est une observation favorable pour la radiostérilisation et de nombreuses variantes sont ouvertes.

En général, pour toutes ces applications, des recherches en formulation sont indispensables dès le début des travaux sur le principe actif. Le succès du développement avec des médicaments à effet retard demande la connaissance des matériaux d'enrobage et de leurs modifications chimiques et physico-chimiques sous irradiation.

LES MÉCANISMES CHIMIQUES DE LA RADIOSTÉRILISATION

Les radicaux

Des radicaux sont observés après la radiolyse de solides moléculaires par Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) en particulier à basse température. Le radical (dit parent après la perte de l'atome H[•]) doit par diffusion trouver un autre radical pour pouvoir réagir dans une réaction de terminaison. A température ambiante, la réaction du radical sur une molécule voisine ($E_a = 12-30 \text{ kJmole}^{-1}$) permettrait de sauter de proche en proche et ainsi de diffuser.

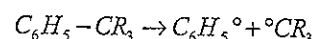
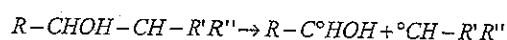
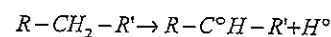


En pratique, l'irradiation du chloramphénicol en phase solide permet d'observer un signal en RPE même des mois après l'irradiation (7). L'énergie d'activation mesurée en phase gazeuse n'est donc pas valable en phase solide (8). De 1988 à ce jour, toutes les expériences indiquent la formation et le piégeage de radicaux à température ambiante dans les médicaments solides irradiés ; c'est un mode de détection de traitement qui pourrait être proposé dans les pharmacopées. La décroissance radicalaire dans les médicaments solides irradiés peut être décomposée en une phase rapide et une quasi stabilité (plusieurs mois voire plusieurs années) ; la première phase est attribuée aux radicaux piégés dans le même centre d'activation (40 à 60%). La deuxième phase indique une répartition spatiale plus homogène ; les radicaux isolés ne rencontrent pas de partenaire lors du « recuit du solide ». Ce « recuit » est un phénomène qui concerne la réorganisation de micro-zones de molécules. Selon l'expression du professeur M. Van Meerssche, « un solide moléculaire vit » !

La qualité des radicaux immobilisés dans le médicament irradié a été simulée par des calculs théoriques (9), le mode d'activation n'est pas sélectif et, a priori, tous les types de radicaux peuvent se former. Comme en phase solide, les raies du spectre RPE sont larges, la reconstruction théorique du spectre expérimental laisse beaucoup de marge d'erreur et ne permet pas de conclure. Nous verrons plus loin que l'analyse des produits finals peut être utile car les produits des réactions radicalaires de combinaison conservent la structure des radicaux parents. De plus, on peut alors proposer divers mécanismes radiolytiques

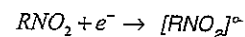
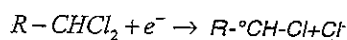
comme hypothèses des réactions de production radicalaire. Ainsi, dans la thèse de F. Zeegers (UCL, 1992), on trouve

1/ La fragmentation



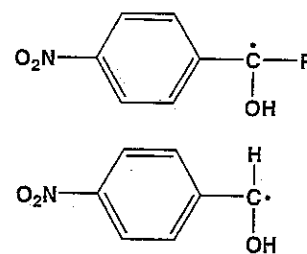
et autres...

2/ l'attachement dissociatif ou non d'un électron.

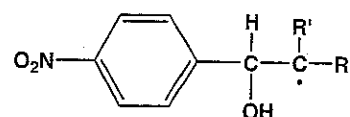


La comparaison entre les radicaux issus du calcul théorique ou de l'analyse des produits finals permet pour le chloramphénicol de sélectionner divers radicaux ; il y a une certaine sélectivité mais pas une spécificité dans la rupture des liaisons.

Ainsi, les radicaux « théoriques »



se retrouvent dans les produits de radiolyse. Par contre, ce radical



est absent. Le plus important est que de nombreuses structures radicalaires non prévisibles en théorie se retrouvent dans les produits finals. On se pose ici la question du « tout radicalaire » ; dans les molécules chimiques « polaires », des mécanismes ions-molécules ne sont pas à exclure.

Des techniques diverses comme les rayons UV sont aussi utilisées dans le cadre de l'asepsie mais les rayons UV ne provoquent des radicaux qu'à la surface du solide et de manière spécifique, le signal RPE est très différent de celui de la stérilisation avec des rayonnements pénétrants et ionisants (10). L'accumulation est rapidement saturée pour une irradiation UV, les sites de « piégeage » étant limités. Par contre, après une irradiation gamma, une accumulation régulière est le plus souvent observée jusqu'à des doses de stérilisation (15 à 25 kGy) à basse température (-196°C). A température

ambiante, un « effet de dose » limite la zone linéaire à 5-10 kGy. Notons que la minocycline sous forme injectable peut contenir des radicaux dus aux rayons UV alors qu'elle n'est pas radiostérilisée en Belgique. Ici, c'est le moment de souligner l'extrême sensibilité de la technique RPE, un signal est détecté pour 10^{-10} M en radicaux, les produits finals issus de ces ultratracés ne sont pas tous détectables en chromatographie à ce jour.

En radiolyse, les rendements caractérisent le nombre de molécules transformées pour une énergie absorbée. Les valeurs sont de l'ordre de 10^{-7} mole kg^{-1} par joule. Pour les radicaux piégés, le rendement observé est plus faible (100 fois) à température ambiante, par contre des valeurs de 0,3-0,5 10^{-7} mole sont calculées à basse température (77K) (11). Une partie importante des radicaux a déjà réagi avant le piégeage à température ambiante.

Les travaux ultérieurs ont montré que les molécules porteuses de noyau aromatique étaient plus radiorésistantes (12,13). On peut commencer à décrire des structures qui devraient être radio-résistantes.

L'utilisation de nouvelles techniques RPE comme la multi-fréquence (34 GHz) apporte peu de données supplémentaires mais la haute fréquence (285 GHz) a permis à A. Engalytcheff (14) de déterminer des valeurs de tenseur g et d'attribuer le signal RPE à des radicaux bien caractérisés. Les recherches technologiques sont souvent utiles car elle fournissent des données nouvelles et contribuent à améliorer les hypothèses de discussion. Ainsi, des formules chimiques voisines (aténolol et esmolol) conduisent à des radicaux différents, la radiolyse est sélective.

En phase fluide, les radicaux diffusent et une observation RPE après l'irradiation n'est pas possible. Le mieux est de recourir à des méthodes impulsives comme la radiolyse pulsée. Des centaines de constantes de vitesse de réactions radicalaires ont ainsi été mesurées mais pour les médicaments, notre laboratoire associé au DRECAM du CEA a fait œuvre de pionnier. Notons que les résultats ne concernent pas la radiostérilisation qui pose problème en phase aqueuse à température ambiante mais les propriétés des radicaux en biologie et en radiobiologie. Ainsi, pour les céphalo-

sporines en solution aqueuse, le radical OH° attaque très vite (ca 10^{10} $\text{mol}^{-1}\text{s}^{-1}$) (oxydation) mais la réduction par l'électron aqueux est aussi rapide.

De très nombreux exemples peuvent être trouvés dans les publications du laboratoire.

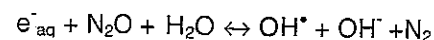
Phase solide ou solution aqueuse

En fait, quelles sont les différences entre le composé pur ou la solution aqueuse?

A priori, le nombre d'espèces réactives formées est semblable et fonction de la dose cédée. Pour un même système d'irradiation, celle-ci dépend de la densité en électrons. En pratique, le nombre de transformations sera plus faible en phase solide (transfert d'énergies avec pertes), de plus les espèces réactives se neutraliseront (effet cage). Une autre grande différence réside dans la quantité de mole (1000 g/PM) élevée pour le composé pur et en faible concentration en solution aqueuse alors que l'eau « activée » produit des espèces réactives (OH° , e^-_{aq} , H°) en grande quantité :

$$5,6 \cdot 10^{-7} \frac{\text{mole}}{\text{joule}} \times \frac{\text{joule}}{\text{kg}}$$

10 kGy correspond ainsi à 5,6 10^{-9} radicaux oxydants et/ou réducteurs. On peut par le choix d'additif sélectionner l'espèce réactive ; ainsi, en présence de N_2O , OH° est formé aux dépens de l'électron :



Le potentiel redox de $\text{OH}^\circ/\text{H}_2\text{O}$ à pH = 0 est de 2,73 V. En pratique, stériliser une solution aqueuse même concentrée (10^{-2} M) n'est pas envisagé ; par contre, les autorités placent la radiostérilisation comme alternative aux méthodes thermiques pour les solides (EMEA 2007) et nous ajouterons les onguents et les liquides purs, et sous certaines conditions, l'insuline et les biomolécules. Un article sera consacré à ces dernières car c'est un procédé d'avenir.

Actuellement, le développement des méthodes chromatographiques couplées (chromatobarettes de diode (DAD), chromatographie spectre de masse (SM)) permet de doser (DAD) et d'identifier (SM) les produits radiolytiques en trace mais aussi de mesurer la pureté résiduelle du composé irradié.

Attaque par le radical OH° (15)			
cefataxime	9.8	10^9	$\text{Mol}^{-1} \text{sec}^{-1}$
cefuroxime	1.4	10^9	$\text{Mol}^{-1} \text{sec}^{-1}$
ceftazidime	7	10^9	$\text{Mol}^{-1} \text{sec}^{-1}$

Pour les solutions aqueuses en pharmacie, en pratique, divers excipients sont ajoutés pour l'isotonie. Si le chlorure de sodium n'a pas d'effet, d'autres co-solvants ou excipients : le propane-diol-1,2 et le mannitol, protègent très bien une solution aqueuse de tartrate de métoprolol. ⁽¹⁶⁾ Le premier co-solvant et préservatif dans des formulations parentérales peut atteindre 60%. La concentration isotonique (2%) suffit à réduire la perte de métoprolol à quelques pourcents à 10 kGy car cet additif réagit très vite avec le radical OH^\bullet ($1,7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$). Le mannitol est aussi très sensible à OH^\bullet , la solution isotonique à 5% conduit au même résultat. Sur 100 radicaux OH^\bullet , 96 réagissent avec l'excipient ! Mais, attention, à 25 kGy, 20% du principe actif sont détruits. Il faudra aussi étudier les produits radiolytiques issus des « intercepteurs ».

Pour les nouveaux médicaments et sans doute pour les génériques, la radiostérilisation mérite d'être étudiée lors de la formulation. En phase solide, c'est presque la règle mais cette stérilisation n'est pas « terminale ». Elle pourrait très souvent remplacer la filtration si coûteuse mais le développement oublie souvent les possibilités des rayonnements ionisants. Pour les solutions aqueuses, c'est une méthode terminale mais une transformation chimique est observée et si un excipient est « sacrifié », encore faut-il que ses produits de radiolyse ne soient pas toxiques.

La FDA et l'EMA s'intéressent à cette technologie, en particulier aux électrons accélérés, qui évitent une source radioactive et qui n'ont pas une image populaire négative. Les électrons accélérés pour rappel permettent de traiter des tonnes de produits par jour mais toujours sur une faible épaisseur. Pour les aliments, la dose requise est toujours faible et des installations radioactives qui émettent des rayons gamma permettent de traiter de gros conditionnements. C'est pourquoi des sources gamma commerciales sont très nombreuses alors que des accélérateurs d'électrons sont rares et réservés à une application industrielle (plastique modifié).

Analyse des produits radiolytiques

Pour rappel, un des freins à l'usage des rayonnements ionisants pour stériliser était l'absence de détection de produits finals, la cible recevait de l'énergie sans transformation chimique ; les tests de pureté de la

pharmacopée avaient une réponse positive. Ceci explique que des médicaments utilisés comme additifs aux aliments pour le bétail étaient ionisés, certains aliments aussi. En pratique, une méthode qui se limite à la détection de 0,1% d'impureté, n'est pas adaptée. De plus, les produits de radiolyse peuvent être de nouvelles impuretés comme les radicaux et les produits d'origine radicalaire.

En toute généralité, le développement des exigences de santé publique (qualité, toxicité) de recherche d'impuretés a conduit à des nouvelles technologies, ainsi pour prévoir des pollutions, des techniques très sensibles permettent d'alimenter les modèles mathématiques par des données préventives.

Certaines de ces techniques sont utilisées en radiostérilisation.

La chromatographie gazeuse de haute performance (à tube ouvert), est couplée à des détecteurs sensibles (ionisation de flamme (FID) ou spectrométrie de masse (SM). En chromatographie liquide-liquide à haute performance, le couplage avec les détecteurs sélectifs (SM-SM) était nettement amélioré ; en routine, 10^{-7} M sont détectables. Pour le dosage, les couplages avec le spectromètre UV ou sa variante à barrettes de diode (DAD) sont sélectionnés (fig 1). Le choix des méthodes analytiques est ainsi :

Analyse (couplée à la chromatographie)	
Produits légers (Chromato gazeuse GC)	
Qualitative	SM
Quantitative	FID
Produits plus lourds (Chromato liquide HPLC haute performance)	
Qualitative	SM-SM
Quantitative	DAD, UV

Le détail des expérimentations est dans la partie expérimentale des nombreux articles du laboratoire (voir site UCL-pharm). Notons que le dosage utilise les méthodes UV pour admettre un facteur de réponse chromatographique de valeur semblable, on ne dispose pas des produits de référence pour étalonner mais bien du spectre d'absorption en DAD pour chaque pic (fig. 2).

Les produits légers en phase solide

Pour analyser ces produits, on a dû munir les appareils GC-Masse d'une trappe de concentration avant l'injection. Après

Figure 1 Exemple de Profils Chromatographiques avec détection UV après une irradiation aux électrons (EB) ou aux rayons gamma (γ), la partie avant le pic principal a été agrandie (zoom).

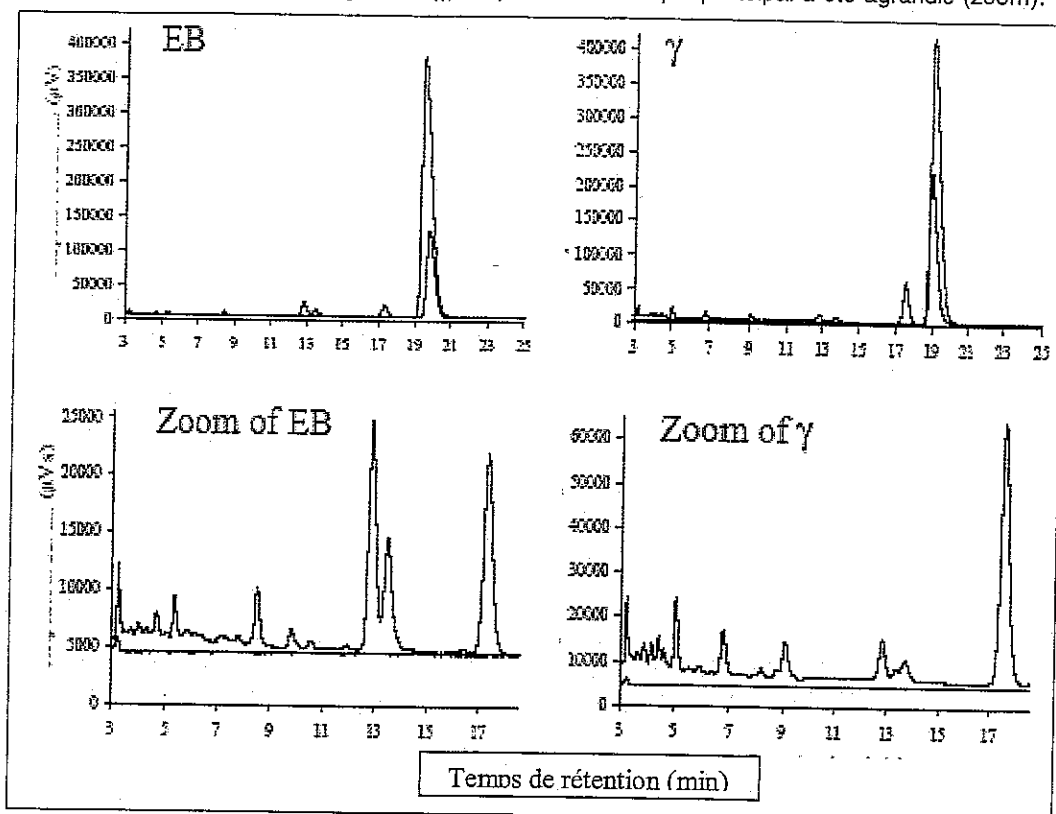
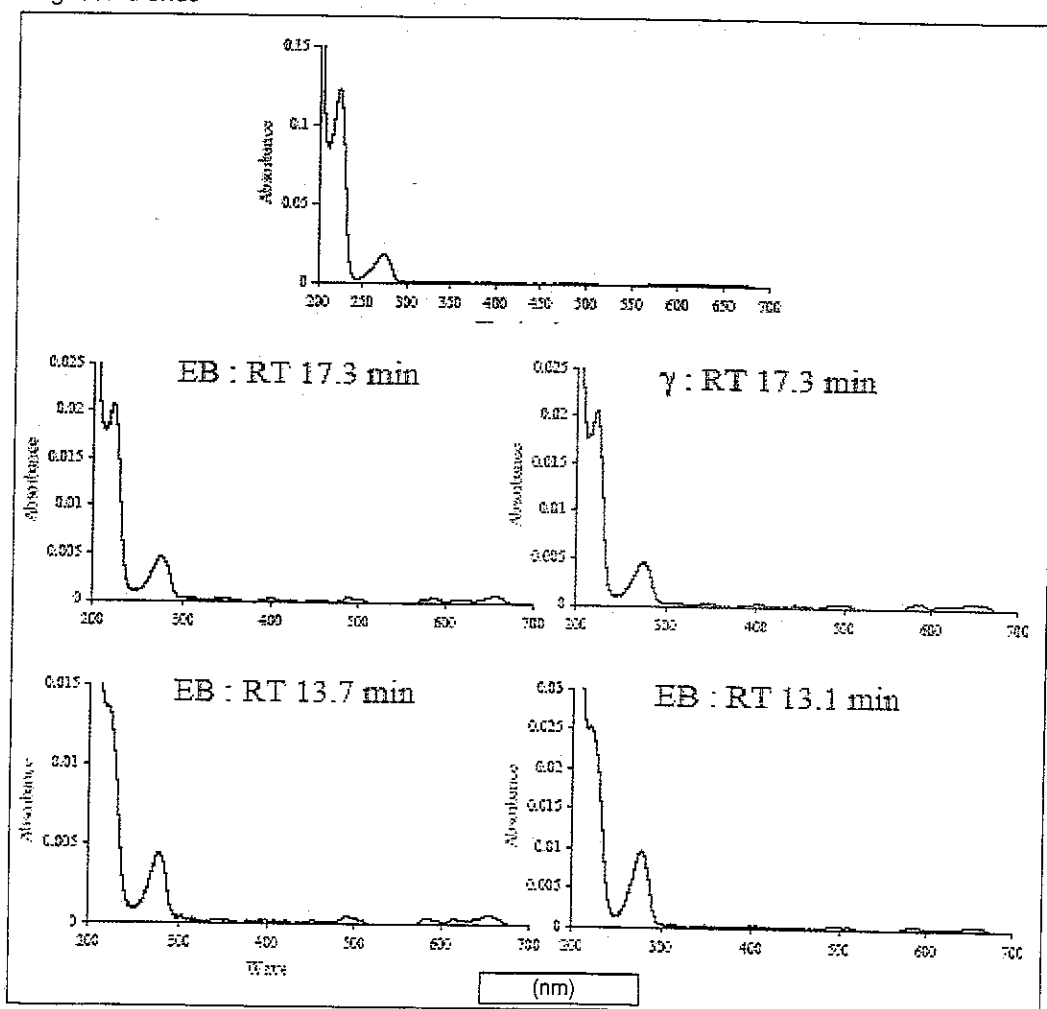


Figure 2 Mesures DAD sur les pics principaux pour comparer l'absorbance en fonction de la longueur d'onde



l'irradiation des solides, de petits fragments (CH_4 , CO , CO_2 ,...) sont détectés et parfois l' H_2S pour les molécules contenant un atome de soufre. On doit souligner une étude particulière où les solvants résiduels ont modifié profondément le schéma radiolytique. Si le solvant est résiduel, sa concentration (relative en électrons) est si faible que l'énergie reçue par interaction directe ne permet pas de l'activer. En phase solide, l'énergie reçue peut se transmettre le long des réseaux et aller activer des molécules de solvant résiduel occluses dans le solide irradié.

Si on consulte le tableau I, des composés dits purs ont été irradiés mais aussi après addition de quelques pour cents d'alcool, pour simuler des composés purs qui détiennent des solvants résiduels.

Le céfotaxime contient au départ du méthanol, de l'éthanol, de l'isopropanol, de l'acétonitrile, de l'acétone, du dichlorométhane,... Les nombreux produits légers sont des sulfures, des esters, des dérivés oximes et de l'acétaldéhyde. Si on élimine les solvants résiduels (sous vide) sauf une trace d'éthanol, les esters et les dérivés oximes ne sont plus détectés. En fait, les deux sulfures ne sont pas affectés et proviennent de la molécule de céfotaxime. Après de multiples « mélanges » divers, on peut avancer l'hypothèse que les esters trouvent leur origine dans une réaction entre l'alcool et des radicaux (formyle, acétyle,...) issus de la molécule, c'est une activation de l'interface molécule irradiée – solvant résiduel. Pour la formation d'oximes, on doit envisager l'interaction avec la fonction oxime de la molécule mère. Dans le tableau, on notera des résultats issus de mécanismes

similaires et aussi la formation d' H_2S qui renforce l'odeur désagréable déjà constatée avec les autres gaz (oximes).

La conférence internationale sur l'harmonisation (17 juillet 1997, ICH) donne les limites acceptables pour les solvants résiduels (exposition journalière admissible). Les médicaments irradiés respectent ces limites. Pour être sur le marché, soulignons que les produits irradiés sont considérés comme nouveaux médicaments. L'étude du laboratoire (Thèse N. Barbarin, UCL, 1999) indique l'importance que pourraient avoir des solvants résiduels, les quantités détectées en produits légers (< 10 ppm) n'excluent pas une odeur désagréable. Les β -lactames ne sont pas de bons candidats à la radiostérilisation, en outre, lors de leur dissolution, les solutions aqueuses sont jaunes. Pour rappel, dans la plupart des principes actifs irradiés en phase solide, il n'y a pratiquement pas de produits légers détectables. De plus, l'addition d'un solvant « résiduel » peut être sans effets.

Analyse de la molécule irradiée (potency) en phase solide

La molécule irradiée doit, après stérilisation, conserver son potentiel (potency). Pour éviter trop de tests en clinique, on peut éclaircir le problème en mesurant la pureté du produit final en analyse chimique. La méthode la plus simple est une mesure UV de dosage avant et après l'irradiation. Comme des produits et des impuretés peuvent présenter des spectres semblables, il est conseillé d'utiliser un détecteur UV après fractionnement chromatographique (HPLC-DAD) et de vérifier en couplage SM, l'unicité de la composition des pics chromatographiques.

Tableau I : Quelques composés volatils radioinduits

	Céfotaxime	Ceftazidime	Ceftazidime + méthanol	Ceftazidime + éthanol
Oxysulfure de carbone	+	+	+	+
Sulfure d'hydrogène	-	-	-	-
Disulfure de carbone	+	-	-	-
Chlorométhane	-	-	-	-
Méthanol	?	-	-	-
Acétaldéhyde	+	-	-	+
Formiate de méthyle	+	-	+	-
Formiate d'éthyle	+	-	-	+
Acétate de méthyle	+	-	+	-
Acétate d'éthyle	?	-	-	+
Formaldéhyde	+	-	-	-
O-méthylloxime				
Acétaldéhyde O-méthylloxime	+	-	-	-

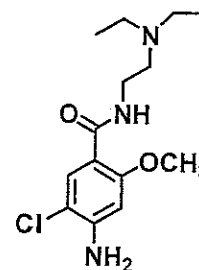
Les résultats indiquent que les variations ne sont pas significatives, elles se situent sous les limites de la précision de mesure. Cette dégradation non mesurable est en accord avec toutes les données de la littérature depuis 1994 (17). Si des produits finals sont détectés, leur quantité formée (ppm) est trop faible que pour induire une modification de la pureté.

La méthode de radiostérilisation est sans doute celle qui protège le mieux la molécule de principe actif mais elle conduit à une grande diversité de produits en ultra-traces.

Analyse des produits finals non volatils en phase solide

Des produits radiolytiques sont formés en faible quantité mais en grand nombre en particulier en phase solide irradiée. Les divers essais d'extraction, de concentration puis d'analyse chromatographique ont posé de gros problèmes et surtout une question : quelle est l'origine de ces impuretés décelées ? Le plus souvent, c'était à l'évidence des impuretés des solvants d'extraction (purs) qui étaient plus contaminés que l'apport de la radiolyse. Le couplage direct spectrométrie de masse (en tandem) et chromatographie liquide-liquide de haute performance a atteint depuis peu d'années une sensibilité suffisante pour l'analyse directe des produits de radiolyse. Les produits observés en spectrométrie UV-visible à longueurs d'onde multiples (DAD couplé au chromato) ont pour la plupart un spectre similaire au produit pur, les groupements chromophores sont préservés (Fig.2). Notons que nous trouvons ici une justification expérimentale de la proposition des pharmacopées de donner à chaque pic chromatographique le même facteur de réponse (la même valeur du coefficient d'absorptivité de la lumière). Dans ce cas, la somme des surfaces des pics vaut 100%. Une mesure quantitative est aussi possible en utilisant le coefficient d'absorptivité mesuré sur la molécule avant d'irradier. Il est exclu d'isoler les produits par des méthodes préparatives mais on peut obtenir des informations sur la structure des molécules (SM-SM). Les masses moléculaires sont une donnée du spectre de masse qui, en tandem, fournit aussi la filière de fragmentation. De multiples expériences au laboratoire ont montré que les produits de radiolyse résultent de perte (et d'addition) de petits fragments conduisant à des structures « filles » de la molécule mère.

Certaines de ces structures hypothétiques ont été confirmées par le recours à des produits de synthèse analysés dans les mêmes conditions. Un exemple très simple est la radiolyse du métoclopramide (18)



pour lequel on a mis en évidence soit :

- la perte de l'atome de chlore
- la perte d'un méthyle ou d'un éthyle du groupement diéthylamino

La phase solide favorise la recombinaison des « gros » fragments ; pour l'atome de chlore, il s'agit d'un attachement dissociatif d'un électron. En outre, il y a une certaine sélectivité, toutes les liaisons ne sont pas rompues. Il est important de souligner que les radicaux libres correspondants à ces structures finales ne sont pas proposés par des études RPE ; la sensibilité de cette dernière méthode est très élevée et les produits issus de certains mécanismes radicalaires ne sont sans doute pas encore détectables en chromatographie. Les contradictions entre les attributions RPE et les analyses de structures des produits finals étaient très nombreuses dans la radiolyse (19) ; il faut donc relire avec discernement les travaux anciens qui voulaient absolument un lien entre les deux observations et noter que des progrès en analyse parviennent à clore de longues controverses.

Stérilisation terminale

Pour les nouveaux médicaments, la recommandation générale des Autorités Pharmaceutiques est une « stérilisation terminale » ; aucune manipulation ne doit suivre la procédure de stérilisation. Le rayonnement ionisant pénètre la matière irradiée et peut stériliser des injectables déjà dans leur forme finale, les rayons UV ne pénètrent pas et ne peuvent être utilisés que pour des surfaces. L'objet de la radiostérilisation, ce sont les solutions aqueuses prêtes à être injectées, mais le rayonnement ionisant transforme l'eau irradiée en espèces réactives qui détruisent le soluté. Des solutions de tartrate de métoprolol (1 mg ml⁻¹) sont complètement détruites à des

doses de 25 kGy (en pratique) et de 10 kGy (en théorie) en l'absence d'oxygène. En pratique, le soluté irradié produit divers composés qui s'accumulent dans le milieu. Ces produits secondaires sont aussi attaqués par les espèces réactives de l'eau et protègent ainsi la molécule mère. Ces produits secondaires en fonction de la dose cédée augmentent puis eux aussi diminuent en concentration. Et progressivement, le soluté initial n'est plus détecté, ni les produits secondaires, ni les produits tertiaires,...le nombre de produits augmente et la concentration de chacun diminue. A 50 kGy, tout signal analytique chromatographique disparaît. Une des causes peut aussi être la destruction des centres chromophores (détecteur UV-DAD) ou une ionisation plus difficile (détecteur SM). Mais une radioprotection partielle a été observée ; pour l'amplifier, on doit ajouter des substances anti-radicalaires (intercepteurs) et en concentration plus élevée.

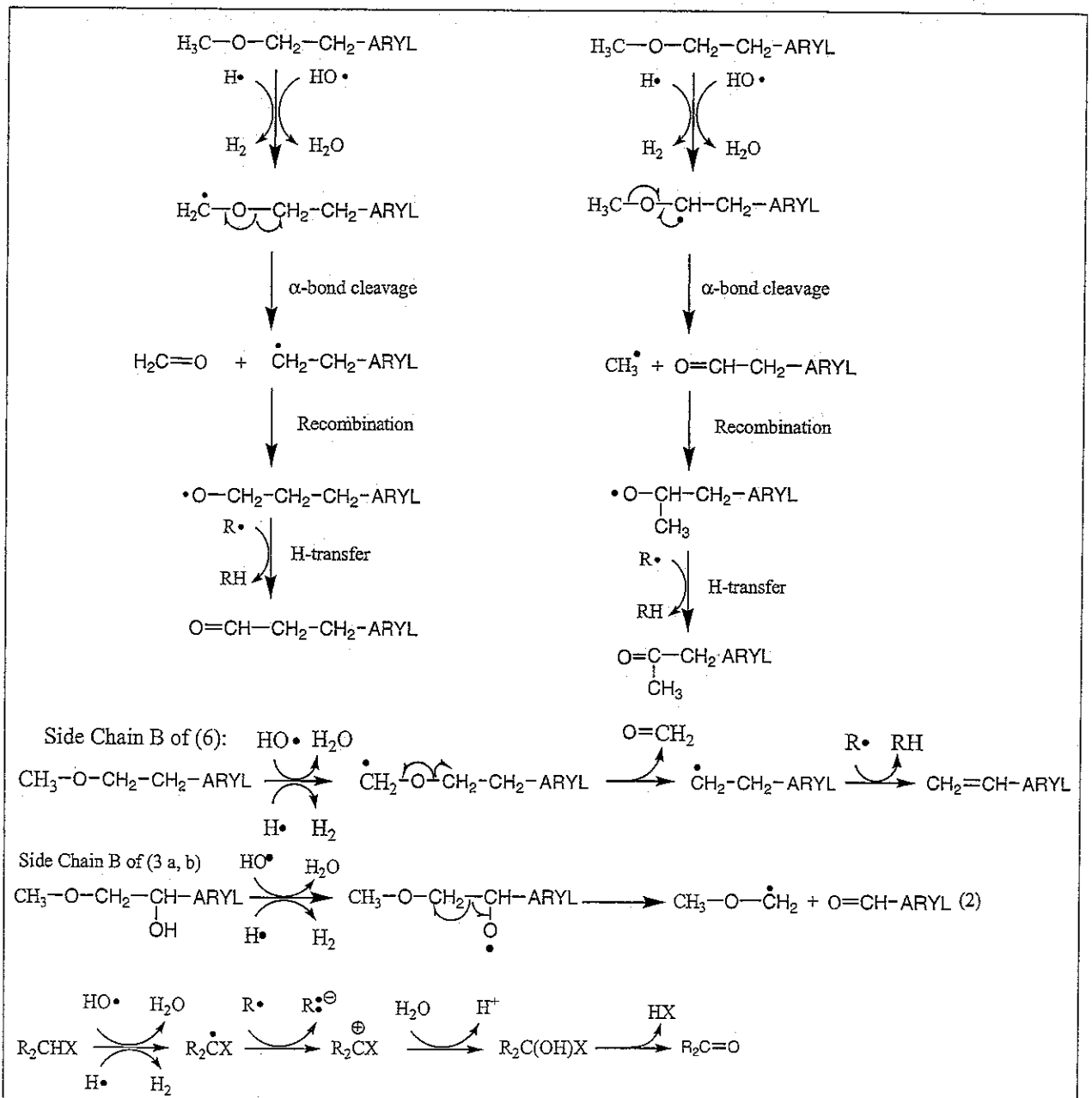
En particulier, $K_{inter} [OH^*] [Inter] \gg k_{med} [OH^*] [Med]$

La constante de vitesse plus élevée ($k_{inter} > k_{med}$) et une concentration plus élevée ($inter > med$) doivent protéger le médicament (méd) pendant l'irradiation. L'excipient usuel du tartrate de métoprolol est du NaCl (0,154M), agent isotonique (0,9%), mais en rien radioprotecteur.

Nous avons vu que des excipients intercepteurs permettent de réduire la perte de potency, la destruction est ainsi limitée mais pas au niveau souhaité.

La conclusion est inverse, le rayonnement ionisant détruit les médicaments dissous dans les eaux usées et pourrait trouver des applications en attaque de la pollution. Pour celles-ci, il faut étudier le rôle des radioprotecteurs qui sont aussi dans les eaux ou qui sont produits par la radiolyse.

En radiolyse de solutions aqueuses, des schémas cinétiques de simulation sont aussi possibles car des mécanismes sont décrits (16). Ainsi avec la participation du Prof. E. Sonveaux, une relation est proposée entre la molécule initiale et un produit de la radiolyse :



Ces équations à titre d'exemples doivent être adaptées à chaque molécule cible et ne considèrent pas l'auto-protection par les produits de la radiolyse.

Conclusion

Pour stériliser au stade terminal, la solution viendra du froid, congeler les solutions aqueuses avant de les irradier, un effort de formulation est exigé mais aussi un complément de recherche dans l'industrie. On peut imaginer que les espèces réactives oxydantes de l'eau ne peuvent pas diffuser dans la glace, ce qui laisserait un rôle particulier aux réducteurs (électron ou atome H). Toutefois, le solide irradié n'est pas un liquide refroidi ; la radiolyse des solides est particulière et les mécanismes sont encore à définir si le milieu n'est pas homogène.

Ce sont les études en cours, la radio-stérilisation détruit moins le soluté dans une solution congelée ; c'est une observation qui ouvre un réel champ de recherche.

Bibliographie

- (1) Radiostérilisation de médicaments : Intérêt, Législation et Travaux à entreprendre. P. Piccerella, J.P. Regnier, J. Joachim, B. Tilquin et J. Raffi. *J. Pharm. Belg.* 55 (2000): 182-186
- (2) A Concise Introduction on Radiation Chemistry, C. Slegers, *Chimie Nouvelle* 91 (2006): 14-25
- (3) Méthodes de détection de la radio-stérilisation, A. Engalytcheff, *Chimie Nouvelle* (2007) : accepté
- (4) A review: Radiation Sterilization of Pharmaceuticals, G.P. Jacobs, *Rad. Phys. Chem.* 26 (1985): 133-142
- (5) Radiostérilisation des médicaments: de la matière première au produit fini: aspects techniques et réglementaires, P. Sebert, *STP Pharma Pratiques* 8 (1998): 214-232
- (6) Influence of irradiation sterilization on polymers used as drug carriers : A review, Sintzel M. B.; Merkli A.; Tabacabay C.; Gurny R., *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 23 (1997): 857-878
- (7) ESR applications in organic and biorganic material, F. Zeegers, B. Tilquin, Ed. E. Catoire *Springen-Verlag – Berlin* (1992) : 292-305
- (8) Radio-stérilisation de médicaments, B. Tilquin, *J. Pharm. Belg.* 46 (1991) : 396-398
- (9) Actions biologiques et chimiques des radiations ionisantes, F. Zeegers, B. Tilquin, M. Sana, *Académie LLN* (1992) : 127-161
- (10) Etude RPE de médicaments ionisés et photolysés, M. Gibella, Th. Pronce, B. Tilquin *J.Chim.Phys.* 90 (1993): 1041-1053,
- (11) Estimation of irradiation dose of radio-sterilized antibiotics by Electron Spin Resonance : Ampicillin; T.Miyazaki, J.Arai, T.Kaneko K.Yamamoto, M.Gibella and B.Tilquin, *J. Pharm.Sci.*, 83 (1994):1643-1644,
- (12) Determination of Radical Yield in Solid-state Drugs, A.Engalytcheff, V. Deridder, R. Debuyst, B. Tilquin, *Rad. Res* 160 (2003): 103-109
- (13) HPLC detection and quantification of radiolytic products, A. Engalytcheff, J.P. Vanhelleputte, B. Tilquin, *Pharm. Res.* 21 (2004) :1103-1108
- (14) Attempts at correlation of the radiolytic species of irradiated solid-state captopril by multi-frequency EPR and HPLC, A. Engalytcheff et al., *Radiat. Res.*162(2004) : 616-622
- (15) Radical mechanisms of cephalosporins : a pulse radiolysis study. A.-S.Crucq, B.Tilquin, B. Hickel, *Free Radic. Biol. Med* 5 (1995): 841-847 - 21(1996) : 827-832
- (16) LC-MS analysis in the e-beam and gamma radiolysis of metoprolol tartrate in aqueous solution : Structure elucidation and formation mechanism of radiolytic products. C.Slegers, A.Maquille, V.deridder, E.Sonveaux, J-L Habib Jiwan, B.Tilquin, *Rad. Phys. Chem.* 75 (2006): 977-989.
- (17) ICH. Impurities in new drug substances 1994 Step 2 of the ICH process.
- (18) Electron-beam and gamma radiolysis of solid-state metoclopramide, A. Maquille, C. Slegers, J.L. Habib Jiwan, B. Tilquin, *Pharm Res*, 23 (2006): 1343-1344
- (19) Thèse d'agrégation : «Mécanismes radicalaires radio-induits dans des alcanes à 77 K », B. Tilquin UCL 1985 *Academia.LLN.*

Remerciements

Ces quelques commentaires sont extraits des travaux des chimistes et pharmaciens : F. Zeegers, B. Rollmann, A-S.Crucq, M.Gibella, N.Barbarin, A.Engalytcheff, C.Slegers, H.Terryn, A.Maquille et les techniciens V.Deridder, M.Tassin, J-P. Vanhelleputte, R.Colak. La présentation est assurée par F. Gelders. La relecture a été assurée par le Dr. M.-F. Hérent.