

La stérilisation des médicaments par des rayonnements ionisants est-elle détectable ?

B. Tilquin, S. Talbi, A. Maquille, A. Chamayou, J. Raffi, M. Baron

Cet article constitue la première partie d'une étude consacrée à l'ionisation des médicaments. Il a pour but d'éclairer le lecteur sur les possibilités souvent mal connues et pourtant fort utiles d'utilisation dans le domaine pharmaceutique des techniques d'irradiation et de leur contrôle. Ce premier article, après une introduction montrant l'intérêt de l'irradiation, s'intéresse plus particulièrement aux méthodes permettant de contrôler l'ionisation utilisée pour les traitements de décontaminations ou pour la stérilisation de médicaments : résonance paramagnétique électronique (RPE), thermoluminescence, chromatographie liquide de haute pression, couplée à l'UV ou à la spectrométrie de masse, etc. Il sera suivi d'un second article consacré à l'explication des mécanismes de radiolyse à laquelle les molécules de principe actif sont soumises.

Mots clés : Irradiation – Médicament – Principe actif – Décontamination – Stérilisation – RPE – Thermoluminescence – CLHP.

INTÉRÊT DE L'IRRADIATION ET DE SON CONTRÔLE

La stérilisation par irradiation (rayons gamma ou X, faisceaux d'électrons) du matériel médical est utilisée depuis de très nombreuses années. L'irradiation stérilisante des médicaments et produits parapharmaceutiques est beaucoup plus récente et ne concerne depuis quelques années qu'encore peu de produits [1-3]. Son plus gros avantage est d'être un « traitement à froid », et donc recommandé par les autorités [4] dans le cas des produits thermolabiles ; de plus, par opposition à la filtration stérilisante, la radiolyse permet d'atteindre un degré de sécurité de 10^{-6} pour la stérilité à une dose d'irradiation généralement inférieure à 25 kGy (dose de référence), si la biocharge initiale est maîtrisée. Pour les solides, il n'est pas exclu de préférer l'ionisation aux méthodes thermiques. En effet, elle peut remplacer avantageusement les gaz toxiques comme l'oxyde d'éthylène. En

Is sterilization by ionizing radiation detectable?

This paper is the first part of a study dedicated to drug ionisation. The aim of this series is to provide information about the very useful possibilities of using irradiation and its control, for pharmaceutical applications. This first article shows why irradiation is a useful technique for decontamination treatments and sterilisation, and how it is possible to monitor it by: electron spin resonance (ESR), thermoluminescence, high pressure liquid chromatography (HPLC), coupled with UV detection or mass spectrometry, etc. Second article will follow, dealing with the explanation of radiolysis mechanisms on active ingredients.

Key words: Irradiation – Drug – Active ingredient – Decontamination – ESR – Thermoluminescence – HPLC.

INTEREST OF IRRADIATION AND OF ITS CONTROL

Medical material sterilization by irradiation (gamma or X rays, electron beams) has been used for many years. Drugs and para-pharmaceutical products sterilizing irradiation is much more recent and has still concerned, for some years, only few products. [1-3]. Its major advantage is to be a "cold treatment" and, thus, recommended by the Authorities [4], in the case of thermolabile products, in addition, as opposed to sterilizing filtration, radiosterilization allows to reach a 10^{-6} sterility assurance level, at an irradiation dose generally lower than 25 kGy dose (reference dose), providing the initial bioburden has been controlled. For solids, it is not excluded to perform ionization rather than thermal methods. Actually, it can advantageously replace toxic gases, such as ethylene oxide. More over, it can be preferably applied in the case of new, particularly complex, or original galenic

outre, elle peut s'appliquer préférentiellement dans le cas de nouvelles formes galéniques particulièrement complexes ou originales comme les médicaments à libération contrôlée (*drug delivery systems*, DDS) [5-10], si leur stabilité n'est pas altérée et si aucune dégradation des matières premières constitutives et des structures n'intervient.

Sur le plan toxicologique, rappelons tout d'abord que ce traitement ne peut induire de radioactivité dans le médicament ; les mêmes règles, très strictes, que celles érigées dans le cas des aliments sont exigées par l'OMS (Organisation mondiale de la santé), tant en ce qui concerne les isotopes radioactifs des irradiateurs gamma (cobalt 60 et césium 137) qu'en ce qui concerne la conception et la fabrication des machines à rayons X ou à faisceaux d'électrons. Une potentialité toxique du médicament irradié ne peut venir que de ses produits de dégradation, dits de « radiolyse » ; mais, contrairement au cas des aliments où l'innocuité du traitement hygiénique a été prouvée et reconnue à deux reprises par l'OMS [11, 12], il faudra démontrer l'innocuité de chaque médicament stérilisé au cas par cas, ce qu'imposent de toutes façons les dossiers d'autorisation de mise sur le marché (AMM) du médicament.

La faisabilité de contrôle des médicaments ionisés est très importante, tant sur le plan de l'assurance qualité que sur celui de l'information du médecin prescripteur et/ou du patient. S'il n'existe actuellement aucun protocole reconnu de détection de l'irradiation des médicaments, contrairement au cas des aliments [13], nous allons montrer qu'un certain nombre de méthodes doivent néanmoins pouvoir s'appliquer facilement pour autant que l'on fasse les efforts de recherche nécessaires.

En agro-alimentaire, on a généralement l'habitude de distinguer les méthodes de routine (« *screening* »), rapides et reposant sur des techniques facilement accessibles aux industriels et laboratoires de contrôle, aux méthodes généralement plus complexes aboutissant à une « véritable preuve » : dans ce dernier cas, on a une preuve d'ionisation comme de non-ionisation ; ceci est très important afin que l'on puisse vérifier le « non-étiquetage » d'un produit ionisé (contrôle des fraudes à l'information) comme la bonne application du traitement ionisant (contrôle qualité). Ce sont ces dernières méthodes dont nous étudierons entre autres la pertinence dans le secteur pharmaceutique. Il est à noter que les méthodes développées en agro-alimentaire sont uniquement qualitatives (le produit a été ou non ionisé) : on ne peut en déduire la dose de traitement car la quantité de modifications radio-induites dépend en particulier de la température d'irradiation et ainsi de l'état physique (solide, liquide ou gaz), facteurs supposés inconnus dans le cas de la recherche d'une fraude. Dans le domaine pharmaceutique, l'utilisation des bonnes pratiques de fabrication (BPF), et en particulier de la PAT [14], pourrait ouvrir la voie à une approche quantitative.

Par contre, l'efficacité et donc le choix des méthodes de détection envisageables va dépendre de

forms, such as controlled release drugs (*drug delivery system*, DDS) [5-10], if their stability is not impaired and no degradation of constituent raw materials and structures occurs.

On the toxicological level, it must first be reminded that this treatment cannot induce radioactivity inside the drug: the same very strict rules, as those set up in the case of food, are required by WHO, concerning both gamma irradiators radioactive isotopes (cobalt 60 and cesium 137) and X rays or electron beams machines designing and manufacturing. The toxic potential of an irradiated drug can only come from its degradation products, called "radiolysis products". However, unlike food, for which hygienic treatment harmlessness has been proved twice and recognized by the World Health Organization (WHO) [11, 12] innocuousness must be demonstrated for every sterilized drug, on case to case basis, as required, by the medicinal product marketing authorization (MA) dossiers.

Ionized drug control feasibility is very important as regards both quality assurance and prescribing physician and/or patient information. Currently, there is no recognized protocol for the detection of irradiated drugs, unlike food [13]. However, we will show that some methods could nevertheless easily be applied, provided that necessary research efforts are made.

In general, as far as food processing sector is concerned, routine ("screening") methods, rapid and based upon easily accessible to industrialists and control laboratories techniques, are usually distinguished from methods generally more complex, leading to a "true evidence" - in that latter case, evidence of ionization and non ionization alike is available, this is very important in order for a ionized product "non labelling" (information cheating control), as well as a ionizing treatment good application (quality control) to possibly be checked. Those latter methods are the ones whose reliability in the pharmaceutical sector will be studied, among others. Of note: the methods developed in the food processing sector are solely qualitative (the product has been ionized or not): the treatment dose cannot be deduced from them because radio-induced alterations quantity depends, in particular, on the irradiation temperature and thus, on the physical state (solid, liquid or gas), these factors being supposed to be unknown in the event of a fraud investigation. In the pharmaceutical field, using good manufacturing practices (GMP), and, in particular, PAT [14] could pave the way for a quantitative approach.

In contrast, the efficacy and thus, the choice of conceivable detection methods, will depend on many

plusieurs facteurs, et notamment de l'état physique du médicament (solide ou liquide), de la dose utilisée et de la quantité de produits de dégradation formés. De plus, cela va également dépendre de la charge microbienne des produits concernés (« *bioburden* »). Nous allons donc envisager successivement le cas de la décontamination de certaines matières premières, celui de la stérilisation de solides et liquides purs et aussi le futur de ce traitement, à savoir la stérilisation terminale des préparations injectables.

II TRAITEMENTS DE DÉCONTAMINATION

Un produit pharmaceutique est souvent complexe et peut contenir divers principes actifs et matières premières susceptibles d'être traités avant la formulation finale, afin d'avoir une qualité microbiologique suffisante. Dans ce cas, des doses de 5 à 10 kGy sont souvent suffisantes, équivalentes à ce qui est utilisé en radiopasteurisation alimentaire.

Ces produits sont le plus souvent à l'état solide et avec un taux d'humidité faible ; on peut alors espérer pouvoir appliquer les deux techniques que sont la résonance paramagnétique électronique (RPE) et la thermoluminescence (TL).

1. RÉSONANCE PARAMAGNÉTIQUE ÉLECTRONIQUE (RPE)

1.1. Principes

L'irradiation de n'importe quel produit y induit des radicaux qui peuvent être relativement stables lorsqu'ils sont formés dans les parties solides et sèches de celui-ci ; un radical est une « molécule » oxydée possédant un électron « célibataire » (non apparié). Ces radicaux peuvent alors être étudiés par RPE : c'est une technique spectroscopique qui utilise la différence d'énergie ΔE entre deux populations d'électrons célibataires soumis à un champ magnétique ; lorsque l'on envoie une onde électromagnétique de fréquence n sur celles-ci, à la résonance on a la relation :

$$\Delta E = h\nu = g\beta H$$

la différence d'énergie étant proportionnelle au champ magnétique H . Un spectre de RPE se présente sous la forme de la dérivée de l'intensité d'absorption de l'onde en fonction du champ magnétique. Chaque radical présente un spectre de forme plus ou moins caractéristique.

1.2. Remarques préalables

En fait, la RPE permet de voir tous les électrons célibataires ; c'est le cas de semi-conducteurs, des radicaux (en particulier induits par irradiation) et de certains ions de transition (souvent présents dans de nombreux produits d'origine végétale ou animale). Ceci demande une vigilance toute particulière ; l'observation d'un signal de RPE n'est jamais une preuve

factors and, in particular, drug physical state (solid or liquid), applied dose and yielded degradation products quantity. In addition, it is also depending on the concerned products microbial burden (« *bioburden* »). We are thus going to successively consider the case of some raw material decontamination, of pure liquids and solids sterilization and, equally, the future of this treatment, i.e. the terminal sterilization of injectable preparations.

II DECONTAMINATION TREATMENTS

A medicinal product is often complex and may contain various active ingredients and raw materials likely to be treated prior to the end formulation, in order to achieve a sufficient microbiological quality. In this case, doses from 5 to 10 kGy are often sufficient, equivalent to those used in food radio-pasteurization.

Most often, these products are in solid state with a low humidity level, so that both electron spin resonance (ESR) and thermoluminescence (TL) techniques could be applied.

1. ELECTRON SPIN RESONANCE (ESR)

1.1. Principles

Irradiating any product induces in it radicals that can relatively be stable when formed in its solid and dry parts, a radical being an oxidized "molecule" owning a "single" (non-coupled) electron. These radicals may then be studied by ESR: it is a spectroscopic technique using the difference of energy ΔE between two single electrons populations subject to a magnetic field, when a frequency electromagnetic wave is sent on these populations, at resonance, the relationship:

$$\Delta E = h\nu = g\beta H$$

is achieved, the difference of energy being proportional to the magnetic field H . A ESR spectrum presents in the form of the wave absorption intensity derivative, depending on the magnetic field. Each radical presents a more or less characteristically shaped spectrum.

1.2. Preliminary remarks

Actually, ESR makes it possible to see all the single electrons: it is the case of semi-conductors, radicals (in particular irradiation induced) and some transition ions (often present in many products of vegetal or animal origin). This requires a highly particular vigilance; actually, observing a ESR signal does never constitute an evidence of treatment. Its shape and

de traitement. Il faut que sa forme et son intensité correspondent effectivement à des radicaux radio-induits [13].

Les médicaments et produits parapharmaceutiques de synthèse ne posent généralement pas de problème ; le produit non traité n'a aucune raison de présenter un signal de RPE et, outre l'irradiation, seuls les UV ou une action mécanique comme le broyage [15, 16] peuvent induire des radicaux, mais leur quantité est généralement très faible.

Il en est autrement des médicaments et excipients d'origine naturelle. Beaucoup peuvent présenter soit un signal central dû à un radical porté par un chromophore de type quinone (initialement intégré dans les centres photosynthétiques) ou un ensemble de six raies très caractéristiques dues à l'ion Mn^{2+} présent dans de nombreux systèmes enzymatiques d'origine animale ou végétale [13].

intensity must really correspond to radio-induced radicals [13].

Generally speaking, synthetic medicinal and para-pharmaceutical products do not pose any problem: actually, there is no reason, for the non treated product, to present a ESR signal and, in addition to irradiation, only UV rays or a mechanical action, such as grinding [15, 16], are able to induce radicals; but their quantity is generally low.

It is not the same with drugs and excipients of natural origin. Actually, many of them may present either a central signal due to a quinone type chromophore borne radical (initially integrated into the photosynthetic centres) or a set of six very specific lines due to the Mn^{2+} ion, present in many enzymatic systems of animal or vegetal origin [13].

1.3. Quelques exemples

La RPE va pouvoir s'appliquer, *a priori*, à tous les produits solides, sous réserve d'avoir vérifié au cas par cas que le signal du produit irradié soit différent de celui d'un témoin.

Nous allons prendre comme premier exemple les antibiotiques de la figure 1. Ceux-ci ne présentent pas, avant traitement, de signal de RPE ; l'irradiation y induit des signaux relativement intenses (figure 2) et qui sont relativement stables au cours du temps ; six mois après, leur intensité a décliné de 10 à 50% selon les propriétés physiques du solide et dans les conditions normales de stockage [17, 18]. La détection de l'ionisation de tels médicaments sera donc aisée. Des familles chimiques relativement proches conduisent à des spectres de formes et de stabilités très différentes [19-21]. Des substituants aromatiques réduisent l'intensité des signaux obtenus [22]. Si de nombreux autres produits peuvent être ainsi étudiés [9], il sera par contre impossible d'établir un protocole général, et des études au cas par cas seront nécessaires.

Il en sera de même de nombreux excipients [23,

1.3. Some examples

ESR may *a priori* apply to any solid products, provided that it has been checked, on a case by case basis, that the irradiated product signal is different from the control one.

We are going to take, as first example, the antibiotics of Figure 1. Before treatment, they do not present a ESR signal, but irradiation induces in them relatively intense (Figure 2) and relatively stable over time signals; six months later, their intensity has decreased by 10 to 50%, depending on the solid physical properties and under normal storage conditions [17, 18]. Detecting such drugs ionization will thus be easy. Relatively close chemical families lead to spectra whose shapes and stability are very different [19-21]. Aromatic substituents reduce the achieved signals intensity [22]. If many other products may be studied this way [9], it will be, in contrast, impossible to draw up a general protocol and studies on a case by case basis will be necessary.

It will be the same for many excipients [23, 24],

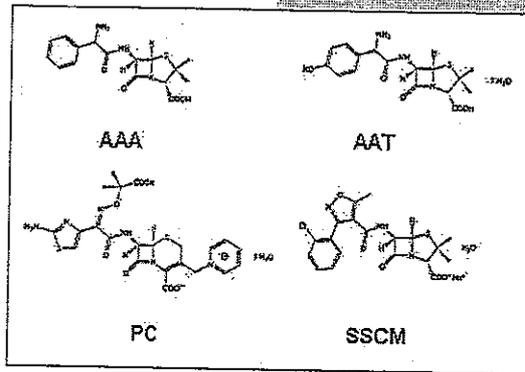


Figure 1. Structures chimiques de l'ampicilline acide anhydre (AAA), de l'ampicilline acide trihydratée (AAT), du pentahydrate de cefazidime (PC) et du sel de sodium de cloxacilline monohydratée (SSCM).

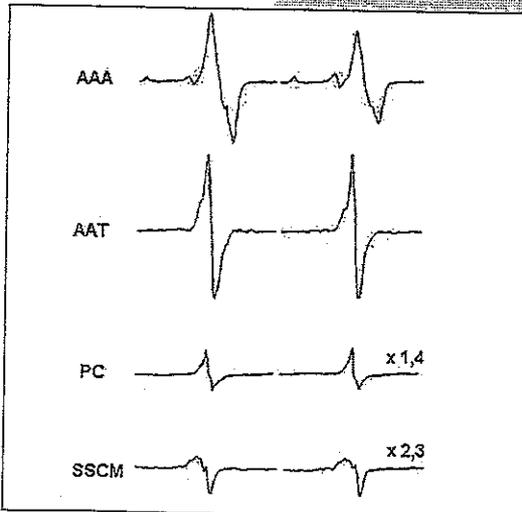


Figure 2. Spectres de RPE des quatre antibiotiques juste après une irradiation sous 25 kGy (colonne de gauche) et six mois après (colonne de droite). Champ : 348 ± 10 mT (3480 ± 100 G).

Figure 2. The four antibiotics ESR spectra, right after a 25-kGy irradiation (left column) and six months later (right column). Field: 348 ± 10 mT (3480 ± 100 G).

24] dont certains auront toutefois été déjà étudiés dans le cadre des recherches sur le traitement ionisant des aliments (lactose, polysaccharides divers, acides aminés). Certains systèmes intégrés dans la libération du médicament (DDS) [5] pourront le cas échéant, et en fonction de leurs structures, être également détectés. Tous ces produits peuvent par contre avoir un taux d'humidité non négligeable, diminuant la durée de vie des radicaux ; il faudra donc vérifier au cas par cas que cette durée est supérieure à la durée commerciale de vie du médicament.

À noter que la RPE, permettant de suivre les propriétés anti-oxydantes de certains produits alimentaires [25], pourrait être utilisée de même pour certains médicaments et produits parapharmaceutiques.

2. THERMOLUMINESCENCE (TL)

2.1. Principes

Lors de l'irradiation, des ions positifs sont formés par éjection d'électrons ; ceux-ci peuvent être piégés dans la matrice solide et être très stables dans le temps. Si l'on chauffe ensuite très rapidement le solide, les électrons vont neutraliser les cations, former des molécules excitées et se relaxer en émettant de la lumière (luminescence) mesurable à l'aide d'un photomultiplicateur.

Un appareil de TL est constitué d'une « chambre noire » contenant une nacelle où quelques milligrammes de produit sont chauffés très rapidement (de la température ambiante à 300 ou 400°C en 30 ou 40 s). Un enregistrement de TL représente l'intensité recueillie par le photomultiplicateur en fonction du temps.

À noter que le signal peut provenir non seulement du produit lui-même mais aussi de ses impuretés ; ce sera par exemple le cas d'ingrédients d'origine végétale contenant des silicates qui donnent après irradiation un signal de TL de très forte intensité.

2.2. Quelques exemples

Si nous reprenons les mêmes antibiotiques, on constate que les échantillons témoins comme irradiés présentent un signal (figure 3) ; à partir d'une certaine température, la matière organique se décompose et les réactions qui s'ensuivent peuvent également donner naissance à une émission de lumière. Toutefois, les enregistrements de TL ont des formes et des évolutions très différentes :

- deux signaux distincts, dont c'est le premier (AAA) ou le second (AAT) qui diminue avec l'irradiation ;
- deux signaux très proches (PC) ou très différents (SSCM) qui évoluent peu ou pas avec l'irradiation.

Donc, sur les quatre antibiotiques, seule l'irradiation des deux premiers pourra être détectée par TL. Mais, dans le cas de AAA, le rapport des aires des deux pics pourra être utilisé pour estimer la dose de traitement appliquée (figures 4 et 5).

De la même façon, de nombreux excipients

some of them having already been studied in the framework of the research on food ionizing treatment (lactose, various polysaccharides, amino acids). Some systems integrated into drug delivery (DDS) [5] could, if need be, and depending on their structure, be equally detected. In contrast, all these products may have a significant humidity level, reducing radicals life time: it must therefore be checked, on a case by case basis, that this life time is higher than the drug commercial shelf life.

Of note: as ESR allows following up some food antioxidant properties [25], it could equally be used for some medicinal and parapharmaceutical products.

2. THERMOLUMINESCENCE (TL)

2.1. Principles

During irradiation, positive ions are generated by ejection of electrons that can be trapped in the solid matrix and be very stable over time. Then, if the solid is very quickly heated up, the electrons will neutralize the cations, yield excited molecules and relax by emitting light (luminescence) measurable by a photomultiplier.

A TL apparatus is composed of a "darkroom" containing a cupel where a few mg of the product are heated up very rapidly (from ambient temperature to 300 or 400°C in 30 or 40 s). A TL recording represents the intensity collected by the photomultiplier depending on time.

Of note: the signal may come not only from the product itself, but equally from its impurities: this will, for instance, be the case of ingredients of vegetal origin containing silicates that emit, after irradiation, a very highly intensive TL signal.

2.2. Some examples

Should we come back to the same antibiotics, we observe that control samples and irradiated ones alike present a signal (Figure 3); from a certain temperature, organic material decomposes and the resulting reactions can equally generate an emission of light. However, TL recordings have very different shapes and evolutions:

- two distinct signals: the first (AAA) or the second (AAT) of them being the one which decreases with irradiation;
- two very close (PC) or very different (SSCM) signals evolving little or not with irradiation.

Thus, of the four antibiotics, only the first two ones irradiation could be detected by TL. But in the case of AAA, the two peaks area ratio could be used in order, for the applied treatment dose (Figure 4 and 5) to be assessed.

Similarly, many excipients could be detected

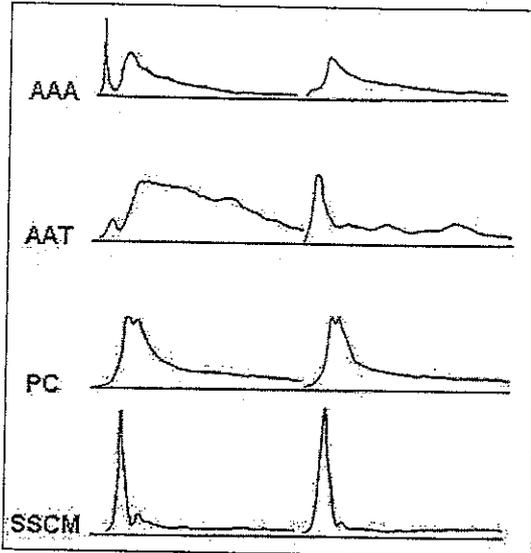


Figure 3. Intensités de TL (en nC/s enregistrés sur 150 s) des quatre antibiotiques témoins (colonne de gauche) ou juste après une irradiation sous 25 kGy (colonne de droite).
Figure 3. The four control antibiotics TL intensities (in nC/s recorded over 150 s) (left column) or right after a 25-kGy irradiation (right column).

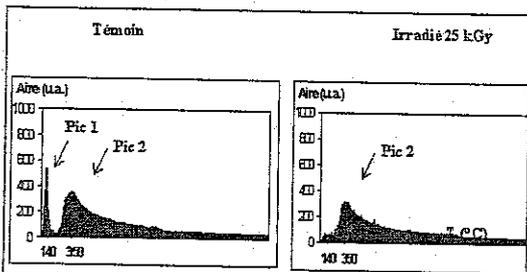


Figure 4. Intensités de TL (en nC/s enregistrés sur 150 s) pour l'ampicilline AAA.
Figure 4. AAA ampicillin TL intensities (in nC/s recorded over 150 s).

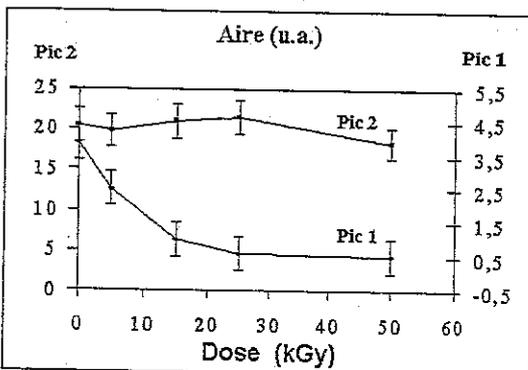


Figure 5. Évolution, en fonction de la dose d'irradiation (kGy) des aires (nC) des deux pics principaux du signal de TL de l'ampicilline AAA.
Figure 5. Evolution, depending on the irradiation dose (kGy), of the two main peaks areas (nC) of AAA ampicillin TL signal.

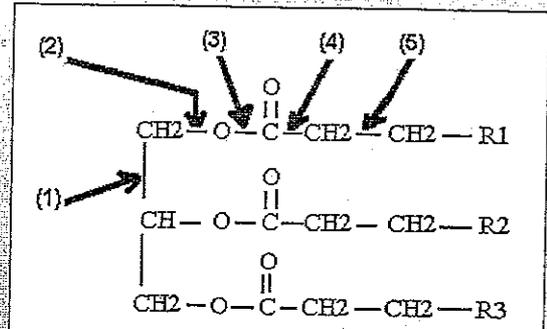


Figure 6. Coupures radio-induites dans un triglycéride donnant naissance à: (1) des esters méthyliques d'acides gras, (2) des acides gras libres, (3) des aldéhydes ou des alkyl-cyclobutanones et (4 et 5) à des hydrocarbures.
Figure 6. Radio-induced cuts in a triglyceride, generating (1) fatty acids, methylic esters, (2) free fatty acids, (3) aldehydes or alkyl-cyclobutanones and (4 and 5) hydrocarbons.

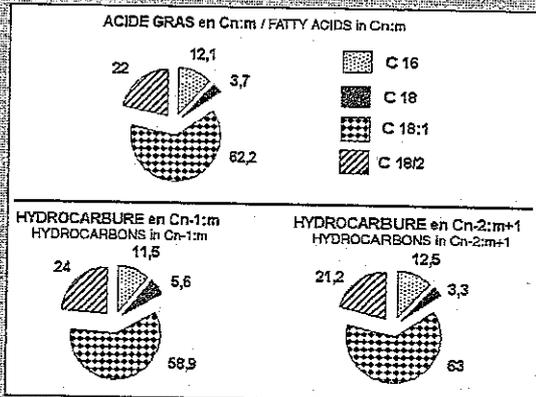


Figure 7. Composition en acide gras et en hydrocarbures radio-induits d'une crème cosmétique riche en huile d'arachide.
Figure 7. Radio-induced fatty acids and hydrocarbons composition of a cosmetic rich in peanut oil cream.

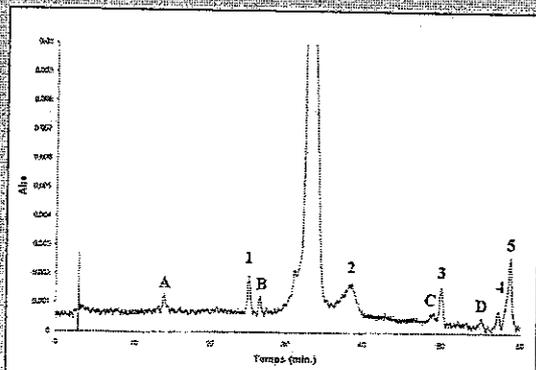


Figure 8. Chromatogramme à 350 nm de la céfotaxime irradiée à 25 kGy sous forme solide. Les pics désignés par des lettres sont déjà présents avant irradiation.
Figure 8. Chromatogram at 350 nm of 25 kGy irradiated solid-state cefotaxime. The peaks designated by letters were already present before irradiation.

pourront être détectés par TL [23] après des études préalables.

3. AUTRES TECHNIQUES

3.1. Méthode des lipides

Lorsqu'un lipide est irradié (figure 6), il se forme un certain nombre de produits (aldéhydes, hydrocarbures, cyclobutanones, etc.) qui peuvent également être formés lors d'autres traitements (thermiques en particulier) ou par auto-oxydation naturelle : ils ne sont donc pas caractéristiques du traitement ionisant car déjà présents (et en quantités faibles mais très variables) dans le produit témoin ; mais, alors que dans le cas du traitement thermique, les coupures sont relativement aléatoires, les coupures radio-induites se situent essentiellement au voisinage du carbonyle $-C(=O)-$ de la fonction ester. Par exemple si la chaîne $-O-C(=O)-CH_2-CH_2-R_1$ (figure 6) possède n atomes de carbone (y compris ceux de R_1), les deux coupures 4 et 5 (figure 6) conduiront à la formation de deux hydrocarbures possédant respectivement $n-1$ et $n-2$ atomes de carbone. Comme la dégradation des lipides est relativement faible, le produit (traité ou non) peut servir de témoin. En agro-alimentaire, deux protocoles ont été reconnus par le CEN consistant à comparer par chromatographie en phase gazeuse (CPG) la composition en lipides du produit à celle de ses hydrocarbures ou à celle de ses cyclobutanones ; les aldéhydes ne sont pas utilisés car présents en quantités trop variables dans le témoin. Dans le cas d'un médicament riche en lipides et, surtout, dans celui d'une crème (cosmétique ou non), on peut espérer utiliser les trois types de produits de radiolyse.

C'est ainsi que dans une crème cosmétique riche en huile d'arachide, la méthode s'est avérée utilisable (figure 7). Une limitation de la méthode sera plutôt la complexité de telles substances qui rend la recherche des « produits de radiolyse caractéristiques » de plus en plus difficile. Notons que de tels produits gras sont également utilisés dans les DDS [5].

3.2. Méthode des gaz radio-induits

Lorsque le solide irradié comporte des solvants résiduels même à l'état de traces, l'irradiation peut générer des produits légers caractéristiques de ces solvants et de l'interaction des espèces réactives de ces solvants sur la molécule de principe actif. L'origine de cette particularité est une « activation chimique » des traces par transfert dans le solide, l'énergie reçue directement par les solvants résiduels étant négligeable.

Un exemple très favorable a été rencontré lors de la radiolyse du céfotaxime solide et d'autres céphalosporines. Outre des gaz provenant de la fragmentation de la molécule (CO_2 , CS_2 , COS , acétaldéhyde *o*-méthylxine, etc.), on trouve de l'acétaldéhyde provenant de l'éthanol résiduel et divers esters formés par l'attaque de molécules de solvants résiduels par des impuretés acides [26]. Cependant, cette méthode

through TL [23] after previous studies.

3. OTHER TECHNIQUES

3.1. Lipids method

When a lipid is irradiated (Figure 6), some products form (aldehydes, hydrocarbons, cyclobutanones, etc.) that can equally form during other treatments (thermal, in particular) or by natural self oxidation. Consequently, they are not specific to the ionizing treatment as already present (and in small, but very variable quantities) in the control product, but while in the case of a thermal treatment cuts are relatively random, radio-induced cuts stand essentially in proximity to the ester function carbonyl $-C(=O)-$. For example, if the $-O-C(=O)-CH_2-CH_2-R_1$ chain (Figure 6) owns n carbon atoms (those of R_1 included), cuts 4 and 5 (Figure 6) will both lead two hydrocarbons to be generated, respectively owning $n-1$ and $n-2$ carbon atoms. As lipids degradation is relatively low, the product (whether treated or not) may be used as control product. In food processing sector, two protocols have been ECN (European Standards Commission) recognized, consisting in comparing, through gas phase chromatography (GPC), the product lipid composition to its hydrocarbons or cyclobutanones one, aldehydes are not used as present in too variable quantities in the control. In the case of a lipid rich medicinal product and, above all, in the case of a cream (whether cosmetic or not), the three types of radiolysis products are expected to possibly be used.

It is the reason why, in a cosmetic, peanut oil rich cream, the method has proved to be usable (Figure 7). A limit of the method will rather lie in such substances complexity, as making search for "characteristic radiolysis products" increasingly difficult. Of note, such fatty products are equally used in DDS [5].

3.2. Radio-induced gases methods

When the irradiated solid contains residual solvents, even in trace level, irradiation may generate low molecular weight products arising either from these solvents or from the interaction of these solvents reactive species with the active ingredient molecule. This occurs from the "chemical activation" of the traces by energy transfer into the solid, the energy directly received from the residual solvents being insignificant.

A very valuable example was encountered during the solid cefotaxime and other cephalosporins radiolysis. In addition to gases coming from the molecule fragmentation (CO_2 , CS_2 , COS , *o*-methylxine acetaldehyde, etc.), acetaldehyde coming from residual ethanol and various esters formed through the attack of residual solvents molecules by acid impurities were found [26]. However, this method is not always very

n'est pas toujours très sensible sauf si un atome de soufre est présent dans la molécule, la détection de H_2S étant très aisée sans appareil adapté.

3.3. Cas des huiles essentielles

Pour conserver les plantes médicinales, on peut avoir recours à une irradiation à faible dose comme pour les aliments. Le problème est différent pour un état liquide où la radiolyse attaque les composés en phase pure (concentration élevée) et une solution aqueuse où les espèces réactives formées dans l'eau (OH^\bullet , e_{aq}^- , H^\bullet , etc.) détruisent tout soluté (concentration faible) bien avant des doses de stérilisation. Expérimentalement, des mesures chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse ont révélé la radioresistance des huiles essentielles même à des doses de stérilisation (15 à 25 kGy ou 15 000 à 25 000 joule kg^{-1}). L'irradiation n'est pas détectable facilement !

III STÉRILISATION DE MÉDICAMENTS PURS IRRADIÉS EN PHASE SOLIDE OU LIQUIDE

1. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE DE HAUTE PERFORMANCE (CLHP)

1.1. CLHP-UV

Le couplage de la CLHP à la spectrométrie UV ou à barrettes de diodes (DAD) permet la détection de nouveaux produits caractéristiques de la radiolyse. De plus, cette méthode est recommandée pour le dosage, les molécules de produits de radiolyse conservant le plus souvent le chromophore de la molécule parent. La figure 8 montre le chromatogramme de la cefotaxime irradiée sous forme solide. On peut remarquer que certains pics sont « caractéristiques » de l'irradiation. La CLHP peut être appliquée à de nombreux autres produits [20].

1.2. CLHP-MS

Les progrès du couplage chromatographique liquide avec la spectrométrie de masse (MS) ouvrent la porte à des nouvelles applications pour la détection de l'irradiation de médicaments solides. La comparaison des chromatogrammes des traces (impuretés) avant et après l'addition des produits de radiolyse (aussi en traces pour un solide irradié) est déjà une méthode sensible. De plus, l'attribution aux nouveaux pics dus à la radiolyse d'une structure chimique est aujourd'hui possible en routine [27].

La méthode de l'analyse des produits non volatils est aussi applicable aux solutions aqueuses irradiées mais à 25 kGy (dose de stérilisation), le soluté actif a depuis longtemps été détruit. Les mécanismes radiolytiques sont bien décrits et permettent de prévoir la faisabilité [28] dans diverses conditions. Des exemples peuvent être trouvés dans la littérature [29, 30]. Ainsi, le recours au froid (carboglace, azote liquide,

sensitive, except if a sulphur molecule is present in the molecule, detecting H_2S being very easy without an adapted apparatus.

3.3. Essential oils

In order for medicinal herbs to be preserved, a low dose irradiation can be used, like for food. In the liquid state, radiolysis attacks the components in pure phase (high concentration) and the radiolysis species are able to diffuse and react. In aqueous solutions the reactive species, generated by water radiolysis (OH^\bullet , e_{aq}^- , H^\bullet , etc.) destroy any solute (in low concentration), for doses far below the sterilizing doses. Essential oils do not contain water and are pure liquids. Experimentally chromatographic measurements, coupled with mass spectrometry, have revealed the radioresistance of essential oils, even at sterilizing doses (15 to 25 kGy or 15 000 to 25 000 joules kg^{-1}). Irradiation is not easily detected!

III STERILIZING PURE DRUGS IRRADIATED IN SOLID OR LIQUID PHASE

1. HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

1.1. HPLC-UV

Coupling HPLC (high performance liquid chromatography) to UV or diode array detector (DAD) spectrometry makes it possible to detect new products characteristic of radiolysis. In addition, this method is recommended for quantitative analysis, as radiolysis products molecules most often have a similar chromophore than the parent molecule. Figure 8 shows the chromatogram of irradiated solid state cefotaxime. One can observe that some peaks are 'unique' to the irradiation process. HPLC may be applied to many other products [20].

1.2. HPLC-MS

Liquid chromatography coupled to mass spectrometry (MS) has evolved so that it allows new applications for the detection of irradiated solid state drugs. The comparison of the trace chromatograms (impurities) before and after the formation of radiolysis products (generated in low amounts, for an irradiated solid) already constitutes a sensitive method. Moreover, ascribing a chemical structure to radiolysis induced peaks is now possible in routine [27].

The non-volatile products analysis method is also applicable to irradiated aqueous solutions, but at 25 kGy (sterilizing dose) the active solute has already been destroyed for a long time. Radiolysis mechanisms are well described and allow foreseeing feasibility [28] under various conditions. Examples may be found in the literature [29, 30]. For instance, lowering the temperature (dry ice, liquid nitrogen,

etc.) et à des intercepteurs (excipients) choisis est nécessaire pour préserver le principe actif dissous dans l'eau [7, 31]. Des voies nouvelles s'ouvrent à la stérilisation de solution aqueuse directement injectable ; une méthode de stérilisation terminale est un maître choix.

2. SPECTROMÉTRIE

Si la radiostérilisation des médicaments a été écartée, c'est souvent en partie à cause de la coloration du solide irradié. Cette coloration peut être due à un produit de radiolyse, la couleur persistant lorsque le solide irradié est dissous dans l'eau [32]. La coloration initiale peut aussi être attribuée à la présence d'électrons piégés (voir thermoluminescence) et la solution obtenue est alors transparente. Dans le premier cas, un simple spectrophotomètre UV-visible permet de moduler la dose d'irradiation en vue d'obtenir une coloration acceptée par la Pharmacopée européenne, à condition d'atteindre la stérilité. Pour rappel, la dose de stérilisation peut être adaptée au mode de production (\rightarrow 5 kGy). Dans le second cas, la méthode UV-visible n'est pas applicable sur la solution : la coloration initiale du produit solide irradié n'est pas liée à la pureté chimique.

D'autres techniques spectroscopiques telles que l'infrarouge ou le proche infrarouge par transformée de Fourier pourraient également être utilisées comme on le fait par ailleurs pour l'étude de traitements micro-ondes [33].

IV CONCLUSIONS

Les perspectives de contrôle de la radiolyse sont excellentes car elles sont liées au progrès des méthodes analytiques particulièrement en sensibilité. On pourrait affirmer que le couplage CLHP-MS est apte à tout détecter si chaque composé est analysable. En mettant en série un détecteur (DAD ou UV) classique et un spectromètre de masse, on note le plus souvent qu'un produit de radiolyse n'est pas détectable par les deux méthodes, le couplage multiple est encore utile car tout produit dont le taux dépasse 0,1% doit être identifié, selon la Pharmacopée européenne.

Dans le cas particulier des irradiations en phase solide, la thermoluminescence et, surtout, la résonance paramagnétique électronique devraient pouvoir être utilisées ; leur seul véritable inconvénient est qu'il ne s'agit pas d'appareillages que possèdent habituellement les laboratoires de contrôle.

Pour la pratique courante, il est aisé d'appliquer la (ou les) méthode(s) usuelle(s) du laboratoire interne de contrôle au type de molécule irradiée, le choix est vaste et la validation de la méthode peut être réalisée dans un laboratoire de contrôle externe.

Dans tous les cas, cela suppose que des laboratoires se lancent dans une série d'études systématiques ; cela sera d'ailleurs peut-être un jour exigé au niveau des dossiers d'AMM, d'où un problème de

etc.) and adding selected interceptors (excipients) is necessary to preserve the water dissolved active ingredient [7, 31]. New ways are being paved to the sterilization of injectable aqueous solutions: a terminal sterilization method is a master choice.

2. SPECTROMETRY

If drugs radiosterilization has been turned down, it is often partly because of the irradiated solid colouring. This colouring may either be due to the formation of a radiolysis product (the colour persists when the irradiated product is dissolved in water [32]) or to the presence of trapped electrons (see thermoluminescence) and then the obtained solution is transparent. In the first case, a simple UV-visible spectrophotometer allows to modulate the irradiation dose so that a colour accepted by the European Pharmacopoeia may be obtained, provided that sterility is reached. Reminder: the sterilizing dose may be adapted to the production method (\rightarrow 5 kGy). In the second case, the UV-visible method is not applicable to the solution since the colour of the irradiated solid product is not related to its chemical purity.

Other spectroscopic techniques, such as infrared or near infrared by Fourier transform could also be used as, in other cases, for microwave treatments study [33].

IV CONCLUSIONS

The prospects of monitoring radiolysis are excellent because they depend on the advances of analytical methods especially in sensitivity. One could state that HPLC-MS is suited to detect anything, should every compound be analysable. However, when putting in a series a standard detector (DAD or UV) and a mass spectrometer, it can be observed in some cases that a radiolysis product may not be detected by both methods: multiple coupling is still useful because any product which level exceeds 0,1%, must be identified according to the European Pharmacopoeia.

In the particular case of solid state irradiations, thermoluminescence and, above all, electron spin resonance, could possibly be used: their only real drawback being that, generally speaking, such equipments are not commonly found in control laboratories.

For the common practice, it is easy to apply the internal control laboratory usual method(s) to the type of irradiated molecule: the choice is vast and method validation can be carried out in an external control laboratory.

In any case, laboratories are supposed to launch out into a series of systematic studies: this could anyway be possibly required, in the future, at the MA dossiers level and, as a result, pose a problem of

financement pour lequel les services compétents de l'Union européenne pourraient avoir un rôle moteur (d'initiateur) comme ce fut le cas précédemment pour l'agro-alimentaire.

Notons enfin que l'avenir de la pharmacie et de la thérapeutique réside probablement en grande partie dans le développement des molécules d'origine biologique, mais aussi dans celui des *drug delivery systems* originaux. Le contrôle de l'irradiation devra donc inclure ces nouvelles techniques.

funding for which the European Union competent services could have to play a driving role (initiator), as it was previously the case for the food processing sector.

Of note: the future of pharmacy and therapeutics is likely coming, in great part, from molecules of biologic origin development but, equally, from original "drug delivery systems" development. Consequently, irradiation control will have to include these new processes.

Références/References

- 1/ P. Sébert, P. Arnaud, D. Catteau, J.C. Darbord, J.C. Gallié, M. Gominet, A. Guichon, Y. Hénon, E. Le Huédé, N. Mondoly et E. Zerbid. - Radiostérilisation des médicaments : de la matière première au produit fini. I. Aspects techniques et réglementaires. - *STP Pharma Pratiques*, 1998, 8 (3), 214-232.
- 2/ P. Piccerelle, J.-P. Reynier, J. Joachim, B. Tilquin et J. Raffi. - Radio-stérilisation de médicaments : intérêt, législation et travaux à entreprendre. - *J. Pharma. Belg*, 2000, 55(5), 131-136.
- 3/ P. Sébert, P. Arnaud, J.C. Darbord, J.C. Gallié, M. Gominet, A. Guichon, Y. Hénon, E. Le Huédé, N. Mondoly et E. Zerbid. - Détermination des doses en radiostérilisation : concepts de base et étude expérimentale. - *STP Pharma Pratiques*, 2000, 10 (3), 127-136.
- 4/ The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA). *Decisional Trees for the Selection of Sterilization Methods (CPMP/QWP/054/98)*, EMA, London, 1999.
- 5/ E. Memisoglu-Bilensoy, A.A. Hincal. - Sterile, injectable cyclodextrin nanoparticles: effects of gamma irradiation and autoclaving. - *Int. J. Pharma.*, 311 (2006) 203-208.
- 6/ K. Matthews, H. Stevens, A. Auffret, M. Humphrey, G. Eccleston. - Gamma-irradiation of lyophilized wound healing wafers. - *Int. J. Pharma.*, 313, 2006, 78-86.
- 7/ A. Fernandez-Carballido, P. Puebla, R. Herrero-Vanrell, P. Pastoriza. - Radiostérilisation of indomethacin PLGA/PEG-derivative microspheres: protective effects of low temperature during gamma-irradiation. - *Int. J. Pharma.*, 313, 2006, 129-135.
- 8/ W. Friess, M. Schlapp. - Sterilization of gentamicin containing collagen/PLGA microparticle composites. - *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 63, 2006, 176-187.
- 9/ M. Polat, M. Korkmaz. - Effect of gamma radiation on amlodis and its potential for radiosterilization. - *J. Pharma. Biomed. Analysis*, 40 (2006), 882-888.
- 10/ S. Rogero, J. Sousa, D. Alario Jr, L. Lopérgolo, A. Lugao. - Silicone crosslinked by ionizing radiation as potential polymeric matrix for drug delivery. - *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res.*, B 236, 2005, 521-525.
- 11/ Comité mixte d'experts OMS/FAO/IAEA. - *Salubrité des aliments irradiés*. - *Ser. Rap. Techn.* n°659, OMS, Genève, 1981.
- 12/ Joint FAO/IAEA/WHO Study Group. - *High-Dose Irradiation : Wholesomeness of Food irradiated with Doses above 10 kGy*. - *WHO Techn. Rep. Ser.*, 890, Genève, 1999.
- 13/ J. Raffi. - The state of food irradiation and of detection of irradiated foodstuffs. - *Res. Adv. in Food Science*, 2002, 3, 11-19.
- 14/ C. Watts. - PAT, A framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance. - *FDA* (<http://www.fda.gov/cder/OPS/watts.pdf>).
- 15/ M. Baron, A. Chamayou, J. Raffi et C. Muñle. - Stress et mémoire des poudres pharmaceutiques : utilisation de la RPE pour quantifier l'énergie absorbée lors de traitements physiques de divers carbohydrates. - *STP Pharma Pratiques*, 2006, 16 (2), 159-172.
- 16/ M. Gibella, Th. Ponce, B. Tilquin. - Etude RPE des médicaments ionisés et photolysés. - *J. Chim. Phys.*, 1994 (91) 1686-1872.
- 17/ M. Gibella, A.S. Cruca, B. Tilquin. - Détection RPE de l'irradiation de médicaments. - *J. Chim. Phys.*, 1993, 90, 1041-1053.
- 18/ M. Gibella, A.S. Cruca, B. Tilquin, P. Stocker, C. Lesgards and J. Raffi. - Electron Spin Resonance Studies of some irradiated Pharmaceuticals. - *Radiat. Phys. Chem.*, 2006, 58(1), 69-76.
- 19/ A.S. Cruca, V. Derrière, A. Engalytcheff, C. Slegers, B. Tilquin. - Effect of gamma irradiation on drugs. - *CRP Report IAEA 6-16, 2005*, Vienne.
- 20/ J.P. Basly, I. Longy, M. Bernard. - Influence of radiation treatment on theodrenaline. ESR and HPLC study. - *Int. J. Pharma.*, 152, 1997, 201-206.
- 21/ J.P. Basly, I. Longy, M. Bernard. - Radiation effects on dopamine and norepinephrine. - *Pharma. Res.*, 14 (9), 1997, 1192-1196.
- 22/ A. Engalytcheff, B. Tilquin. - Determination of radical yield in solid state drugs as one technique to identify drugs that will withstand radiosterilization. - *Rad. Res.* 2003 (160) : 103-109.
- 23/ J. Raffi, S. Gelly, P. Piccerelle, P. Prindette, A. Chamayou and M. Baron. - Electron spin resonance - thermoluminescence studies on irradiated drugs and excipients. - *Radiat. Phys. Chem.*, 2002, 63, 705-707.
- 24/ H. Williams, M. Claybourn. - The power of EPR spectroscopy in pharmaceutical analysis. - *Spectroscopy Europe*, 2006, 18 (1), 10-16.
- 25/ M. Suhaj, J. Racova, M. Polovka, V. Brezova. - Effect of gamma-irradiation on antioxidant activity of black pepper (*Piper nigrum* L.). - *Food Chem.*, 97, 2006, 696-704.

26 / N. Barbarin, A.S. Cruq, B. Tilquin. - Study of volatile compounds from the radiosterilization of solid aphalosporins. - *Rad. Phys. Chem.* 1996 (48): 787-799.

27 / N. Barbarin, E. de Hoffmann, B. Tilquin. - Radiosterilization of cefotaxime : investigation of potential degradation compounds by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. - *J. Chromatogr. A* 2001 (929) 51-61.

28 / A. Slegers, A. Maquille, V. Deridder, E. Sonveaux, J.L. Habib Jiwan, B. Tilquin. - LC-MS analysis in the e-beam and gamma radiolysis of metroprobol tartrate in aqueous solution : structure elucidation and formation mechanism of radiolytic products. - *Rad. Phys. Chem* 2006 (75): 977-979.

29 / Ph. Horsch, L. Bigler, H. Altorfer. - Influence of radiation sterilization on the stability of trifluorothymidine. - *Int. J. Pharma.*, 222, 2001, 205-215.

30 / B. Marciniak, M. Ogradowczyk, K. Dettlaff. - Search for the effect of E-beam irradiation on some steroids. - *Rad. Phys. Chem.*, 72, 2005, 517-524.

31 / H. Terryn, A. Maquille, C. Houée-Levin, B. Tilquin. - Irradiation of human insulin in aqueous solution, first step towards radiosterilization. - *Int. J. Pharm.*, accepté.

32 / M. Gibella, B. Tilquin. - Detection of the radiolysis of solid ampicillin by UV-spectroscopy. - *Analisis*, 1999 (27): 657-662.

33 / S. Nurjaya, T.W. Wong. - Effects of microwave on drug release properties of matrices of pectin. - *Carbohydr. Polym.* 62, 2005, 245-257.

Adresses des auteurs/Authors' addresses

■ Bernard Tilquin, Aubert Maquille, Université catholique de Louvain, Analyse des médicaments, CHAM 72-30, avenue Mounier 72, B-1200 Bruxelles

■ Saad Talbi, Jacques Raffi, Laboratoire de Radiolyse de la matière organique, UMR CNRS 6171 & CEA, Faculté de Saint-Jérôme, F-13397 Marseille Cedex 20

■ Alain Chamayou, Michel Baron*, Laboratoire Rapsodee, UMR CNRS 2392, Ecole des Mines d'Albi-Carmaux, F-81013 Albi CT Cedex 09

*baron@enstima.fr