



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIC ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



†.⊙:∞∞.∪ξ†∑:∞∞.†∑∑:∑∑:∑

Université Mouloud MAMMERRI Tizi-Ouzou
Faculté de médecine
Département de Pharmacie

جامعة مولود معمري تيزي وزو
كلية الطب
فرع الصيدلة

N° D'ORDRE :

THEME :

« **METHODES INDICATRICES DE STABILITE :**
CAS DE LA BETAMETHASONE »

Mémoire de fin d'études présenté sous forme d'article

Soutenu publiquement le :

27 Juillet 2023

Réalisé et présenté par :

KHEDDOUCI Nesrine

ROUBACHE Imène

MERZOUG Thileli

TIFOUCHE Katia

Encadré par :

Pr MAMOU Marzouk

Co-encadré par :

Dr CHEKROUN Tassadit

En vue de l'obtention du diplôme de

Docteur en Pharmacie

Devant le jury composé de :

Dr BEN SI SAID Hassan
Dr MECHTOUB Nabila
Pr MAMOU Marzouk
Dr CHEKROUN Tassadit

MAHU Faculté de médecine
MAHU Faculté de médecine
Professeur Faculté de médecine
Résidente Faculté de médecine

Président de jury
Examinatrice
Encadrant
Co-encadrante

Année universitaire : 2022/2023.



Méthodes indicatrices de stabilité : Cas de la bétaméthasone

Stability indicating methods: Case of betamethasone

N.KHEDDOUCI¹, T.MERZOUG², I.ROUBACHE³, K.TIFOUCHE⁴, M.MAMOU^{5*}, T.CHEKROUN^{6*}

*Laboratoire de chimie analytique, Université Mouloud Mammeri - Département de pharmacie

Faculté de médecine - Tizi-Ouzou, Algérie.

¹nesrine.kheddouci@fm.ummo.dz

²thileli.merzoug@fm.ummo.dz,

³imeneroubache03@gmail.com,

⁴katia.tifouche@fm.ummo.dz,

⁵marzouk.mamou@ummo.dz,

⁶drchekroun.tassadit@gmail.com

Année universitaire : 2022/2023

Résumé

La bétaméthasone est un corticostéroïde largement utilisé pour ses propriétés anti-inflammatoires. L'évaluation de sa stabilité est essentielle afin de garantir l'efficacité et la sécurité des produits pharmaceutiques contenant ce principe actif. Pour s'assurer de l'authenticité et de la qualité de la matière première, des identifications par infrarouge et chromatographie sur couche mince ont été effectuées. L'objectif de ce travail est d'étudier la stabilité de la bétaméthasone dans des conditions drastiques par mise au point d'une méthode indicatrice de stabilité par chromatographie liquide haute performance (CLHP). La méthode proposée utilise une colonne TEKNOKROMA Brisa LC² C18 (150 × 0.46mm × 5µm) à température ambiante, avec un mélange d'acétonitrile, eau et acide phosphorique (35 ; 65 ; 0,1 v/v/v) comme phase mobile. Le débit d'élution est de 1 ml/min. La détection a été effectuée grâce à un détecteur UV à 240 nm. Après exposition à des conditions sévères de chaleur (50°C, 80°C), d'acidité (HCl 1 ; 5M), d'alcalinité (NaOH 0.1 ; 1M), d'oxydation (H₂O₂ 3 ; 30%). La dégradation était de 0,42 à 7,43 % en conditions acides, de 82,74 à 95,87 % en conditions alcalines, de 1,72 à 5,76 % en conditions d'oxydation, de 14,42 à 70,40 % et de 0,05 à 8,31 % respectivement pour l'essai de photolyse et de thermolyse. Ces résultats soulignent la sensibilité de la bétaméthasone à la lumière et à l'hydrolyse alcaline. La méthode analytique utilisée s'est révélée convenable pour détecter les produits de dégradation et évaluer la stabilité de la bétaméthasone. La détection par Photodiode Array Detector (PDA) a mis évidence que la majorité des produits de dégradation de la bétaméthasone sont détectables à une longueur d'onde qui avoisine les 240 nm. **Mots clés :** bétaméthasone, étude de dégradation forcée, HPLC-PDA, stabilité.

Abstract

Betamethasone is a corticosteroid widely used for its anti-inflammatory properties. Evaluating its stability is essential to ensure the efficacy and safety of pharmaceutical products containing this active ingredient. In order to ensure the authenticity and quality of the raw material, identification by infrared and thin-layer chromatography was performed. The objective of this work is to study the stability of betamethasone under severe conditions by developing a stability-indicating method using high-performance liquid chromatography (HPLC). The proposed method uses a TEKNOKROMA Brisa LC² C18 column (150 × 0.46 mm × 5µm) at room temperature, with a mobile phase consisting of acetonitrile, water, and phosphoric acid (35; 65; 0.1 v/v/v). The elution flow rate is 1 ml/min. Detection was performed using a UV detector at 240 nm. After exposure to severe conditions of heat (50°C, 80°C), acidity (HCl 1; 5M), alkalinity (NaOH 0.1; 1M), and oxidation (H₂O₂ 3; 30%), degradation ranged from 0.42% to 7.43% under acidic conditions, from 82.74% to 95.87% under alkaline conditions, and from 1.72% to 5.76% under oxidation conditions. For the photolysis and thermolysis assays, degradation percentages ranged from 14.42% to 70.40% and from 0.05% to 8.31%, respectively. These results highlight the sensitivity of betamethasone to light and alkaline hydrolysis. The analytical method used was suitable for detecting degradation products and evaluating the stability of betamethasone. Detection by a Photodiode Array Detector (PDA) revealed that the majority of betamethasone degradation products are detectable at a wavelength near 240 nm. **Keywords:** betamethasone, forced degradation study, HPLC-PDA, stability.

Introduction

La bétaméthasone est un corticostéroïde systémique à action prolongée qui possède des propriétés anti-inflammatoires, antiallergiques et immunosuppressives (1). Elle est largement utilisée comme intermédiaire de synthèse d'autres principes actifs apparentés tel que l'acétate de bétaméthasone, le dipropionate de bétaméthasone, etc. Afin d'assurer la conformité de ces produits aux exigences réglementaires, il est nécessaire d'étudier au préalable la stabilité de la matière première (MP) (2) (3).

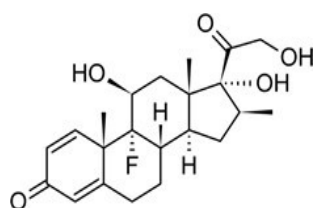


Figure 1 : Structure chimique développée de la bétaméthasone(3).

Les méthodes indicatrices de stabilité offrent la possibilité d'étudier le comportement d'une substance médicamenteuse dans des conditions drastiques, en réalisant des essais de dégradation forcée conformément aux recommandations réglementaires tel que l'International Council for Harmonisation (ICH). Parmi les directives mises en œuvre par l'ICH en termes d'étude de dégradation forcée, nous citons :

L'ICH Q1A « Stability Testing of New Drug Substances and Products », qui définit les normes concernant les essais de stabilité effectués sur une nouvelle substance ou un nouveau produit médicamenteux (4).

L'ICH Q1B « Photostability Testing of New Drug Substances and Products », fournit des recommandations pour la conception des études de stabilité des nouvelles substances actives et des produits médicamenteux (5).

L'ICH Q3A « Impurities in New Drug Substances » et l'ICH Q3B « Impurities in New Drug Products » : exigent l'identification de chaque impureté en tenant compte des aspects de l'innocuité et de l'aspect chimique (6,7).

L'enjeu majeur pour la mise au point d'une méthode indicatrice de stabilité pour la bétaméthasone, est l'existence de nombreux composés apparentés à celle-ci (1,8). De nombreux travaux visant à séparer ces composés ont été entrepris, cependant aucune des méthodes actuellement disponibles ne permet de séparer et de quantifier tous les composés apparentés connus de la bétaméthasone (8). La littérature, quant à elle, ne fournit pas suffisamment d'informations concernant les mécanismes de dégradation de cette dernière (9). Dans le présent travail, des essais de dégradation forcée ont été menés suivant une méthode indicatrice de stabilité par chromatographie liquide haute performance (HPLC) validée conformément aux recommandations de l'ICH, afin de fournir des informations sur la stabilité du produit dans des conditions extrêmes de température, d'acidité, de basicité, d'oxydation et de lumière. L'analyse par Photodiode Array Detector (PDA) effectuée permet de situer la/les longueurs d'onde d'absorption de la majorité des produits de dégradation générés (10).

Objectifs :

- Étudier l'influence de la température, du pH, de l'hydrolyse, de l'oxydation et de la lumière ;
- Générer des produits de dégradation en vue de leur repérage, isolement et/ou identification ;
- Déterminer les voies de dégradation de la matière première ;
- Déterminer les conditions de stockage de la matière première.

Matériel et méthodes

1. Matériel

Le principe actif utilisé est la bétaméthasone matière première (gracieusement fourni par Biopharm Industry). De la bétaméthasone SCR (Substance Chimique de Référence) et de la dexaméthasone SCR ont été également utilisées.

L'acétonitrile, NaOH et l'acide phosphorique sont de la marque Honeywell.

HCl (35-38%) est celui de Biochem Chemopharma, H₂O₂ (33%) de Prolabo et de l'acide formique de Cheminova.

Parmi le matériel utilisé nous citons la verrerie de laboratoire (fioles jaugées, pipettes jaugées, éprouvettes et béchers...), des vials pour HPLC, une plaque pour chromatographie sur couche mince (CCM), des filtres en cellulose et autres.

2. Préparation des solutions

- Diluant : acétonitrile/eau (35:65 v/v) ;
- Phase mobile pour HPLC : acétonitrile/eau/acide phosphorique (35:65:0,1 v/v/v) ;
- Mélange de solvants de reconstitution pour CCM : méthanol R, chlorure de méthylène R (1:9 v/v) ;
- Phase mobile pour CCM : butanol R saturé d'eau R, toluène R, éther R (5:10:85 v/v/v) ;
- Solution alcoolique d'acide sulfurique R pour révélation en CCM : éthanol 96%, acide sulfurique R (80:20 v/v) ;
- Agents dégradants : HCl 1M et 5M, NaOH 0.1M et 1M, H₂O₂ 3% et 30%.

3. Conditions chromatographiques

La Chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur ultraviolet SHIMADZU LC 20 a été utilisée pour la quantification. L'analyse HPLC a été réalisée sur une

colonne TEKNOKROMA BRISA LC² C18 (150 × 0.46mm × 5µm). L'élution est en mode isocratique à un débit de 1mL/min, la température de la colonne est celle de l'air ambiant. La longueur d'onde du détecteur ultraviolet (UV) a été fixée à 240 nm et le volume d'injection est 20 µl. Toutes les données ont été acquises à l'aide du logiciel SHIMADZU LC SOLUTION et l'exploitation des résultats obtenus a été faite avec EXCEL OFFICE 2019.

Pour l'HPLC couplée à un détecteur PDA de la marque Waters 2998, les mêmes conditions chromatographiques ont été appliquées. La détection a été faite par balayage entre 210 et 400 nm.

4. Contrôle qualité

Un essai de perte à la dessiccation ainsi que des identifications par Infra-rouge (IR) et par CCM ont été réalisés conformément à la Pharmacopée européenne 10^{ème} édition.

5. Dégradation forcée

Trois protocoles A, B et C ont été mis en œuvre en utilisant diverses conditions de dégradation.

Pour le protocole A, les solutions de bétaméthasone à 1 mg/ml préparées dans des fioles de 20 ml ont été mises en contact avec des solutions de HCl à 5M, NaOH à 0,5M et de H₂O₂ à 3%. L'échantillon destiné à réaliser l'essai de thermolyse a été conservé à l'étuve portée à 50°C. Une dilution au 1/10^e est effectuée au préalable avant l'injection.

Concernant le protocole B, les essais d'hydrolyse acide et alcaline ainsi que l'oxydation ont été effectués sur des solutions de bétaméthasone à 0.2 mg/ml préparées dans des fioles de 100 ml en utilisant respectivement 5 ml de HCl à 5M ; de NaOH à 1M, et de H₂O₂ à 30%. La thermolyse est réalisée dans un bain marie porté à 80°C pendant 40 minutes.

Enfin pour le protocole C, des solutions de bétaméthasone à 0.2 mg/ml préparées dans des fioles de 100 ml ont été mises en contact avec du NaOH à 0.1M, du HCl à 1M et du H₂O₂ à 3% afin de réaliser respectivement les essais d'hydrolyse alcaline et acide ainsi que l'oxydation. La thermolyse a été effectuée dans une étuve portée à 50°C.

Il est à noter que pour les 3 protocoles, les solutions destinées aux essais de dégradation alcaline, acide, d'oxydation et du témoin ont été conservées à température ambiante, et celles destinées aux essais de photolyse étaient exposées à la lumière du jour.

Les solutions ont été mises en contact avec les agents dégradants pendant 24h pour le protocole A et B, et pendant 5 jours pour le protocole C.

L'analyse quantitative a été effectuée à t₀ et t₂₄ pour les deux premiers protocoles et à j₁ ; j₃ et j₅ pour le troisième.

Après 5 jours de dégradation (protocole C), les solutions ont fait l'objet d'une analyse PDA (balayage sur une gamme de longueurs d'ondes allant de 210 à 400 nm et extraction des maximums d'absorption aux temps de rétention).

6. Etude de l'influence du pH

Des pesées d'environ 20 mg dans des fioles de 100 ml ont été effectuées. L'ajustement des pH des solutions a été réalisé avec un pH-mètre en utilisant différentes solutions, à savoir l'acide phosphorique et l'hydroxyde de sodium afin d'aboutir à des solutions dont les pH avoisinent respectivement 2 et 8. Les solutions ont été ensuite analysées par HPLC-UV à j₁.

Tableau I: Tableau récapitulatif des conditions de dégradation

Essai / Protocole	Témoin	Hydrolyse acide	Hydrolyse alcaline	Oxydation	Photolyse	Thermolyse
Protocole A	Conservation à température ambiante	HCl 5M	NaOH 0.5M	H ₂ O ₂ 3%	Exposition à la lumière du jour	50 °C à l'étuve
Protocole B		HCl 5M	NaOH 1M	H ₂ O ₂ 30%		Bain marie à 80°C pendant 40 minutes
Protocole C		HCl 1M	NaOH 0.1M	H ₂ O ₂ 3%		50 °C à l'étuve

Résultats

1. Contrôle qualité

0,19, 0,14 et 0,17 mg correspondent aux pertes issues de l'essai de perte à la dessiccation. La perte de masse moyenne est égale à 0.16 mg, ce qui correspond à 0,33%.

La première détection par CCM est réalisée en examinant la plaque CCM sous lumière ultraviolette à 254 nm. Le résultat est représenté dans la **figure 2**.



Figure 2 : Plaque CCM sous lumière UV à 254 nm SA : solution à examiner ; Ta : témoin a ; Tb : témoin b.

La **figure 3** ci-dessous représente les spectres obtenus par l'analyse par spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge de la bétaméthasone SCR et bétaméthasone MP.

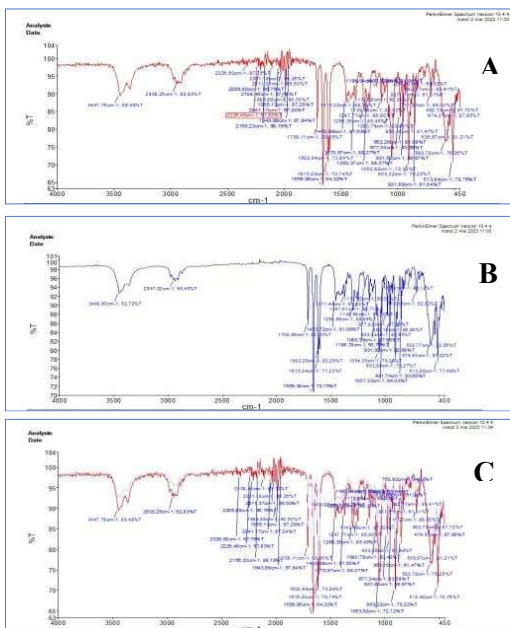


Figure 3 : Spectres infrarouge A : Spectre de la bétaméthasone SCR / B : Spectre de la bétaméthasone MP/ C : spectre de comparaison.

2. Analyse par HPLC-UV Visible

Les résultats de l'analyse par HPLC des solutions à 240 nm, révèlent l'apparition de pics à différents temps de rétention, distincts de celui de la bétaméthasone. Cette observation a été appréciée avec les essais d'hydrolyse alcaline et de photolyse dans les trois protocoles (**figures 4 et 5**).

Il est à noter que les solutions soumises à une dégradation par l'hydroxyde de sodium prennent une coloration jaunâtre qui s'intensifie avec le temps et la concentration de cette base.

Les taux de dégradation obtenus avec les 3 protocoles sont résumés dans les **tableaux II et III**.

3. Analyse par HPLC-PDA

L'analyse par PDA, fournit une représentation tridimensionnelle des pics chromatographiques en fonction des temps de rétention, des longueurs d'ondes et des absorbances. Les résultats de l'analyse par HPLC-PDA des solutions du protocole C après 5 jours de dégradation, sont représentés dans la **figure 6**.

En ce qui concerne l'essai d'hydrolyse alcaline, nous observons que la majorité des produits de dégradation générés absorbent à 240,9 nm, cas des produits de dégradation 1, 2, 4, 5, 6 et 9. Pour les produits 7 et 8 absorbent à 239,8 nm tel que le montre la **figure 7** et le **tableau V**.

Quant à l'essai de photolyse, nous constatons que les longueurs d'ondes d'absorption des produits de dégradation varient entre 223.3 et 245.7 nm. Les résultats sont détaillés dans le **tableau VI**.

4. Influence du pH

Les taux de dégradation des solutions de labétaméthasone à pH 2 et 8 ont été calculés et sont résumés dans le **tableau IV**.

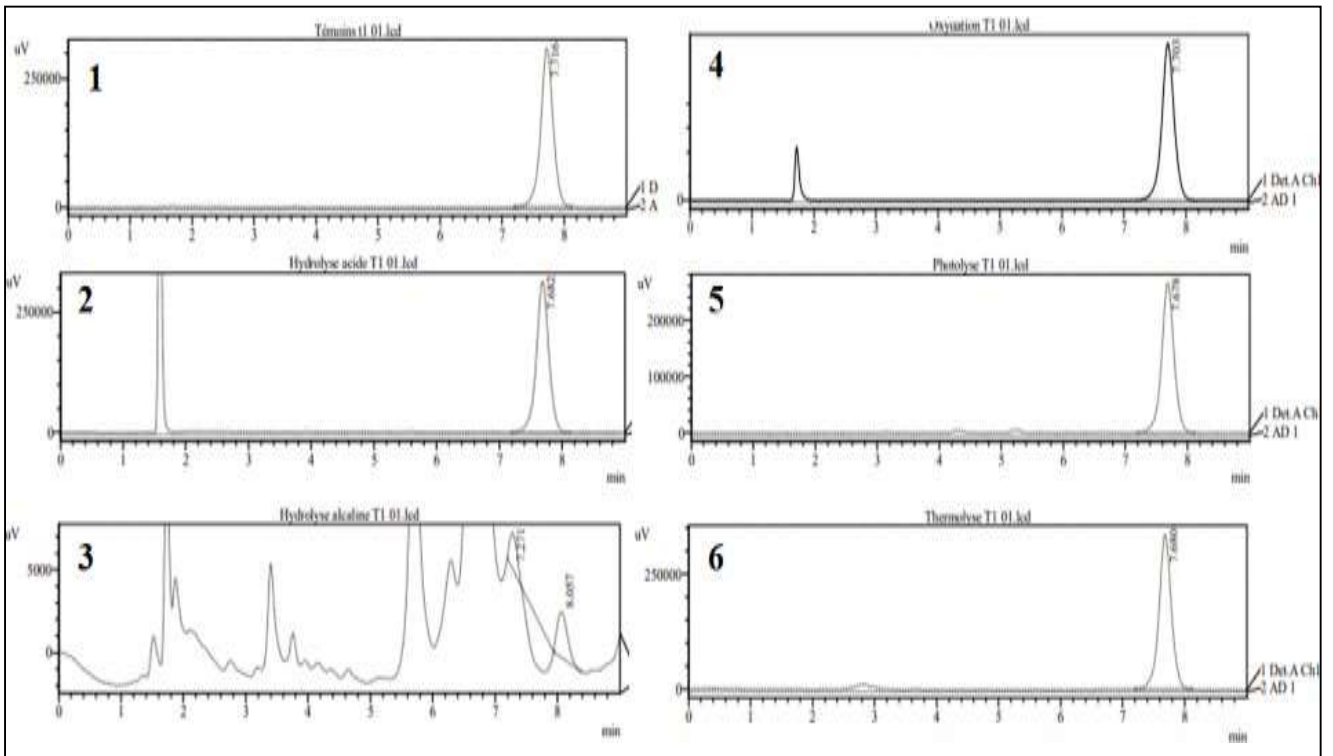


Figure 4 : Pics résultants du protocole A après 24h de dégradation.

1 : témoin ; 2 : hydrolyse acide ; 3 : hydrolyse alcaline ; 4 : oxydation ; 5 : photolyse ; 6 : thermolyse.

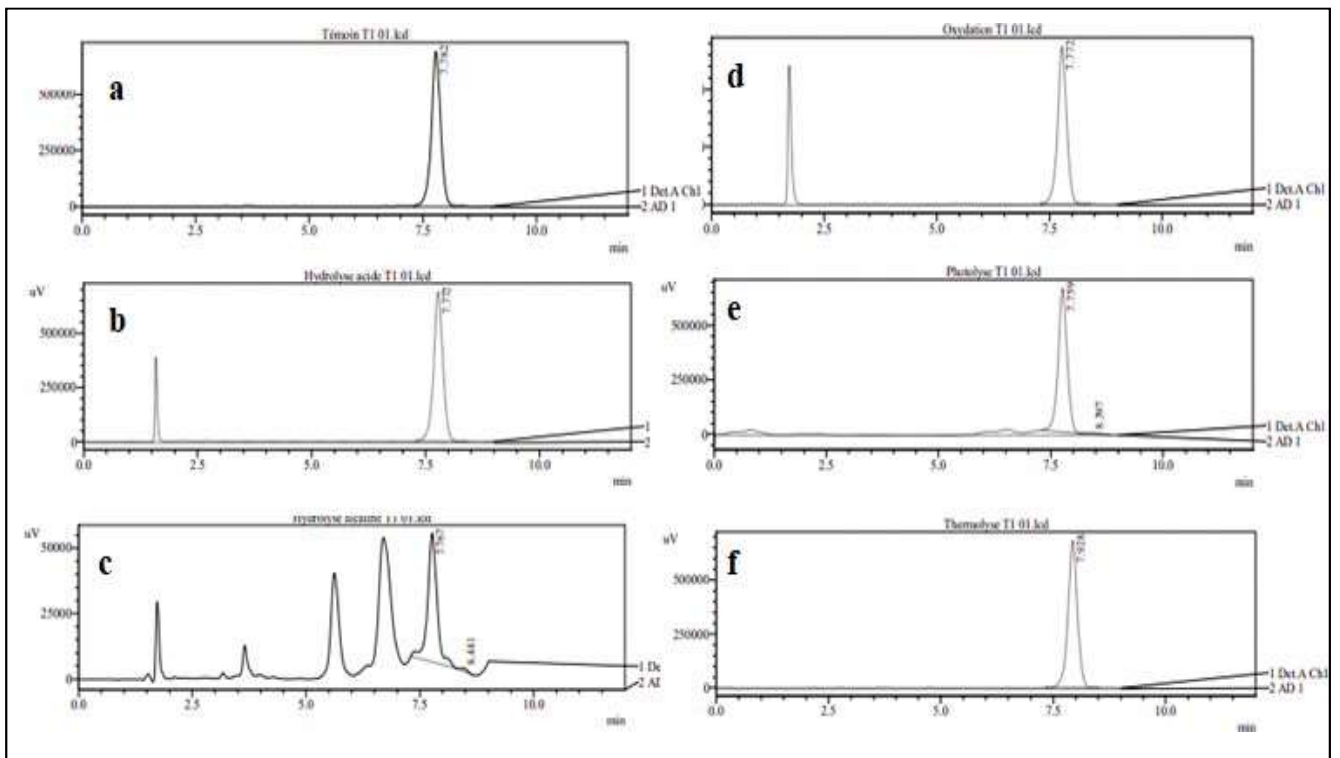


Figure 5 : Pics résultants du protocole B après 24h de dégradation

a : témoin ; b : hydrolyse acide ; c : hydrolyse alcaline ; d : oxydation ; e : photolyse ; f : thermolyse.

Tableau II : Les taux de dégradation résultant des protocoles A et B

Protocole	Protocole A			Protocole B		
	m(mg)	J ₁		m(mg)	J ₁	
		Aire	%		Aire	%
Essai						
Témoins	20,19	4337050		20,05	9885165	
Hydrolyse acide	20,00	4319186	0,42	20,09	9770857	1,15
Hydrolyse alcaline	20,01	780467	82,74	20,06	525685	94,63
Oxydation	20,00	4539884	-4,72	20,01	9715013	1,72
Photolyse	20,00	3717559	14,42	20,03	6765717	31,59
Thermolyse	20,02	4694331	-8,31	20,05	9880028	0,05

Tableau III : Les taux de dégradation résultant du protocole C

Essai	m(mg)	Protocole C					
		J ₁		J ₃		J ₅	
		Aire	%	Aire	%	Aire	%
Témoins	20,05	10143022		10168322		10101548	
	20,18	9640542	4,92	9560455	5,94	9346048	7,43
Hydrolyse alcaline	20,04	983258	90,35	702907	93,14	421501	95,87
Oxydation	20,07	9807290	3,31	9688026	4,72	9518720	5,76
Photolyse	20,03	6765717	33,33	4986871	51,01	2996585	70,41
Thermolyse	20,24	9950646	1,88	9814644	3,45	9666408	4,27

Tableau IV. Les taux de dégradation résultants des modifications du pH

Essai	m(mg)	J ₁	
		Aire	%
Témoins	20,1	8191654	
pH = 2	20,05	8881587	-8,443393
pH = 8	20,02	8662646	-5,772633

La formule de calcul des taux de dégradation : (à J1)

$$\% = \frac{A(\text{essai } J1) + A(\text{tém } J1)}{A(\text{tém } J1)} \times 100 \times \frac{m(\text{tém})}{m(\text{tém}) - m(\text{essai})}$$

Tel que : *A* : aire de pic
tém : témoin
m : masse de bétaméthasone

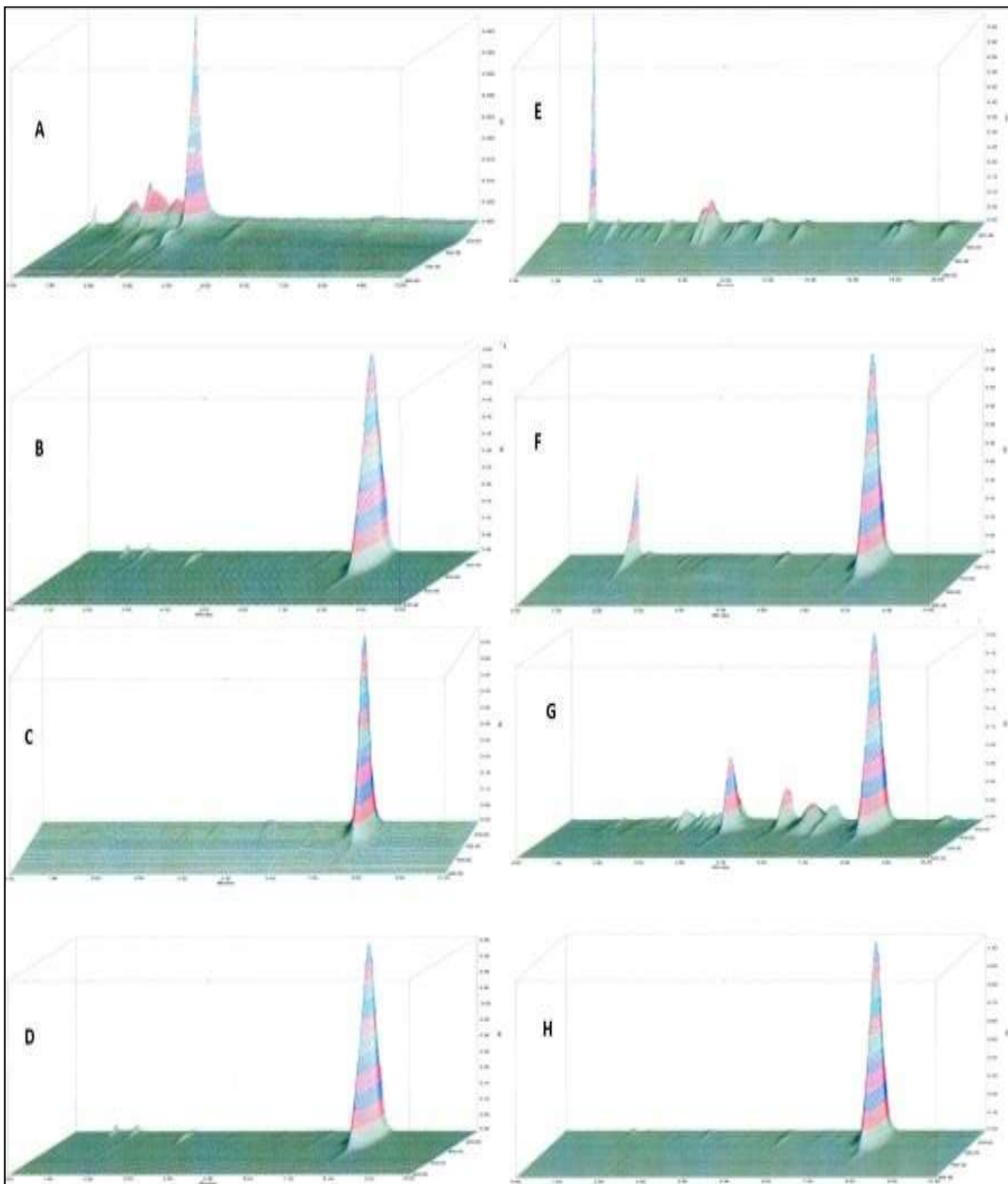


Figure 6 : Pics résultants de l'analyse PDA. A : blanc ; B : témoin à J0 ; C : témoin à J5 ; D : hydrolyse acide ; E : hydrolyse alcaline ; F : oxydation ; G : photolyse ; H : thermolyse.

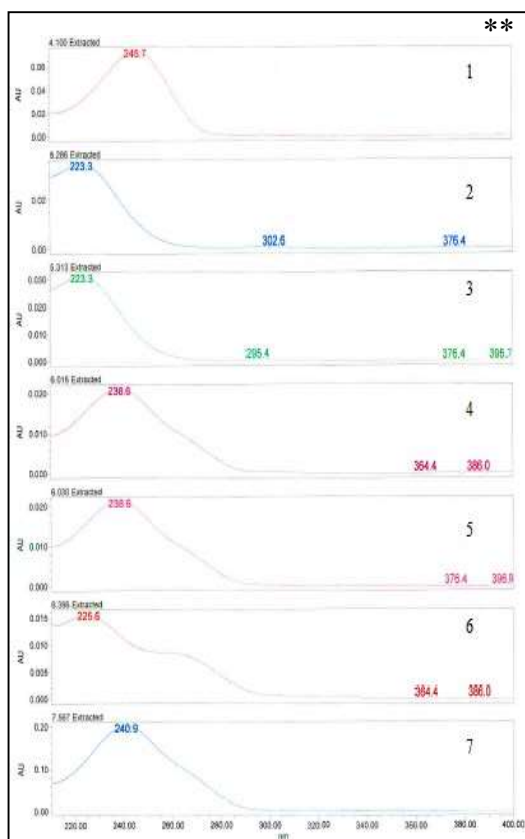
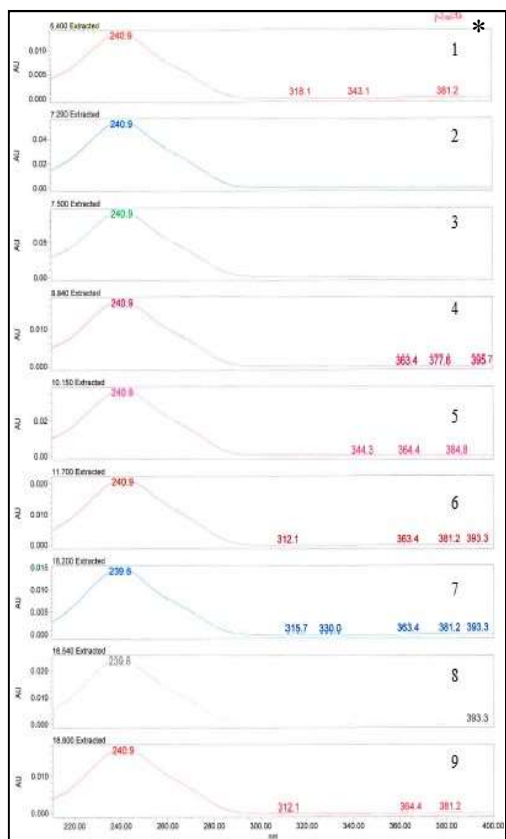


Figure 7 : Chromatogrammes extraits aux maximums d'absorption aux temps de rétention.

*Essai de photolyse / **Essai de thermolyse

Tableau V. Les résultats de l'extraction des pics PDA de l'essai de la dégradation alcaline

Pic	t_R (min)	λ_{max}	Maximum d'absorption
Témoin	7,5	240,9	0,95
1	5,4	240,9	0,01
2	7,29	240,9	0,05
3	7,5	240,9	0,09
4	8,84	240,9	0,02
5	10,15	240,9	0,04
6	11,7	240,9	0,02
7	16,2	239,8	0,02
8	16,54	239,8	0,02
9	18,6	240,9	0,02

Tableau VI. Les résultats de l'extraction des pics PDA de l'essai de la photolyse

Pic	t_R (min)	λ_{max}	Maximum d'absorption
Témoin	7,5	240,9	0,95
1	4,1	245,7	0,07
2	5,3	223,3	0,03
3	5,3	223,3	0,03
4	6,0	238,6	0,02
5	6,0	238,6	0,02
6	6,4	225,6	0,02

Discussion

Après avoir soumis trois échantillons aux conditions requises par l'essai de perte à la dessiccation, la perte moyenne est de 0,33%, ce qui est inférieur à la limite de 0,50% spécifiée. Par conséquent, notre matière première est conforme aux critères établis.

L'interprétation de l'essai d'identification par infrarouge réside dans la comparaison du spectre de la bétaméthasone MP à celui de la bétaméthasone SCR. Le spectre de notre matière première se superpose sur le spectre de la bétaméthasone SCR, ce qui signifie que notre matière première utilisée est bien de la bétaméthasone. En effet, le spectre met en évidence les différentes fonctions organiques de la molécule, à savoir les groupements carbonyles (C=O : à 1659 cm⁻¹ et 1709 cm⁻¹), les groupements alkyles (C-H à 2938 cm⁻¹) et les groupements hydroxyles (-C-OH à 3447 cm⁻¹).

Dans le cas de l'analyse par chromatographie sur couche mince, nous notons la présence de tâches de migration pour chaque solution déposée. La conformité du système est approuvée par l'apparition de deux tâches sur le chromatogramme pour la solution témoin (b), qui correspondent à la bétaméthasone et à la dexaméthasone. La tâche obtenue avec notre solution à examiner et celle du témoin (a) se trouvent alignées avec la tâche du témoin (b) qui correspond à la bétaméthasone. La tâche principale du chromatogramme obtenue avec la solution à examiner est semblable quant à sa position et ses dimensions à la tâche principale du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a).

Essai de dégradation

Les dégradations les plus notables ont été obtenues avec les essais d'hydrolyse alcaline et de photolyse. Les valeurs négatives des taux de dégradation obtenues avec l'essai d'oxydation, de thermolyse et les essais de l'influence du pH laissent penser à une concentration de l'échantillon.

Concernant les essais de l'influence du pH et l'essai d'oxydation, cette concentration pourrait être due à un changement de la structure électronique de la substance suite aux variations du pH. Les formes résultantes auraient des absorbances spécifiques supérieures à celle de la bétaméthasone.

À noter que ces formes pourraient être co-éluées dans le même pic. Il est donc recommandé de réaliser une pureté spectrale du pic obtenu.

Quant à l'essai de thermolyse, cela résulterait de l'évaporation de l'échantillon.

La pharmacopée européenne 10^{ème} édition (3), spécifie une limite d'impuretés de 2 % qui indique la quantité maximale tolérée d'impuretés dans un échantillon de bétaméthasone. Cette limite peut stipuler que les impuretés totales ne doivent pas dépasser 2 % de la quantité totale de la substance active. Cependant dans le présent travail, le but était d'évaluer la sensibilité de la bétaméthasone dans des conditions défavorables, pour avoir un aperçu de sa stabilité.

Selon l'ICH, une limite de dégradation de 5 à 20 % est préconisée pour la validation des essais chromatographiques et la quantification ultérieure des produits de dégradation (11). Les essais d'hydrolyse acide, d'oxydation et de thermolyse dans les trois protocoles, ont montré des taux de dégradation dans la limite de 5 à 20 %. Cela suggère qu'on pourrait procéder à une quantification des produits de dégradation. Vu l'importance de la dégradation obtenue avec les essais de photolyse et d'hydrolyse alcaline, la quantification des produits de dégradation générés impliquerait la réduction du temps de contact ou de l'intensité des conditions de stress afin de limiter les taux de dégradation à un maximum de 20 %.

Mécanismes de dégradation

La dégradation par photolyse peut être expliquée par le réarrangement du cycle A vers les dérivés

"lumi-" et "photolumi-" qui est typique des corticostéroïdes possédant le groupement cyclohexadiénone et la perte de la chaîne latérale dans C17 consiste en une scission de type Norris (figure 8) (12).

Les changements induits entraînent la baisse de l'activité anti-inflammatoire (12). De ce fait, il est important de respecter les recommandations de la pharmacopée européenne concernant la conservation de la bétaméthasone à l'abri de la lumière lors de sa fabrication et sa conservation (3).

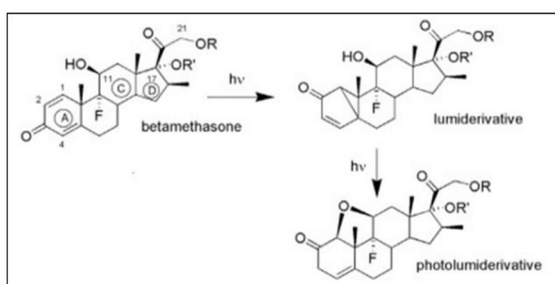


Figure 8 : Voie de dégradation de la bétaméthasone par photolyse (12).

Tandis que la formation des produits de dégradation par hydrolyse alcaline peut être expliquée par un réarrangement suite à l'attaque des OH⁻ sur le site électrophile (carbone 21) tel que le montre la figure 9 (13).

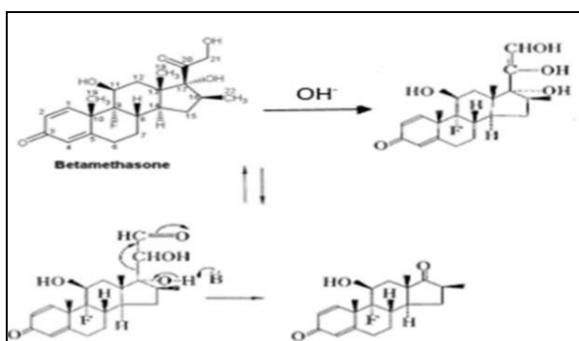


Figure 9 : Voie de dégradation de la bétaméthasone en milieu alcalin (13).

Les taux de dégradation du témoin et ceux résultant de l'hydrolyse acide et de l'oxydation étaient beaucoup moins importants que ceux résultant de l'hydrolyse alcaline et de la photolyse. La chaîne latérale de 1,3-dihydroxyacétone du noyau D de la bétaméthasone subit une déshydratation pour former l'aldéhyde énol correspondant qui

présente des isomères Z et E. C'est un processus connu sous le nom de réarrangement de Mattox. Cette voie de dégradation peut être proposée afin de justifier la dégradation de la BM en milieu acide (14,15).

Sachant que le pH du témoin est d'environ 8,3 ; sa dégradation peut être expliquée par une éventuelle oxydation en milieu alcalin par l'oxygène dissout dans l'échantillon. Le même raisonnement est suggéré pour expliquer l'oxydation du PA par le H₂O₂ (16).

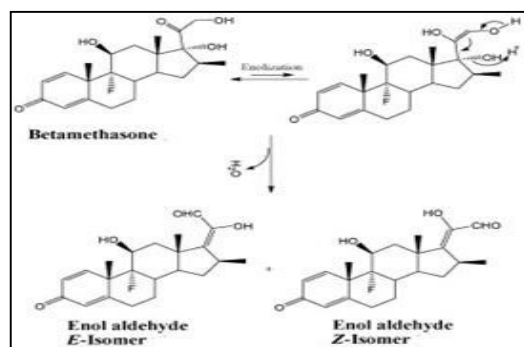


Figure 10 : Voie de dégradation de la bétaméthasone en milieu acide (14).

HPLC-PDA

L'extraction des maximums d'absorption aux temps de rétention a concerné uniquement l'essai d'hydrolyse alcaline et de photolyse, du fait que ces deux essais ont été ceux qui ont générés le plus de produits de dégradation.

A l'issue de cette analyse, nous constatons que la majorité des produits de dégradation issus de l'hydrolyse alcaline et de la photolyse de la bétaméthasone, sont détectables à une longueur d'onde qui avoisine les 240 nm ; la longueur d'onde à laquelle notre étude a été réalisée.

Ce qui signifie que la méthode utilisée dans ce travail, pourra servir à l'identification des produits de dégradation de la bétaméthasone à une longueur d'onde qui avoisine les 240 nm.

Influence du pH

Les taux de dégradation de la bétaméthasone à pH 2 et à pH 8 ont montré des taux de dégradation dans la limite de 5 à 20 %. Cela suggère qu'une quantification des produits de dégradation pourrait être envisagée.

Bien que l'instabilité en milieu acide n'ait pas été reflétée par les essais d'hydrolyse acide, une dégradation à pH = 2 supérieure à celle résultant avec le pH = 8 a été constatée. De plus, les chromatogrammes obtenus par ces essais montrent l'apparition de produits de dégradations aux pH acides comme indiqué dans la **figure 11**.

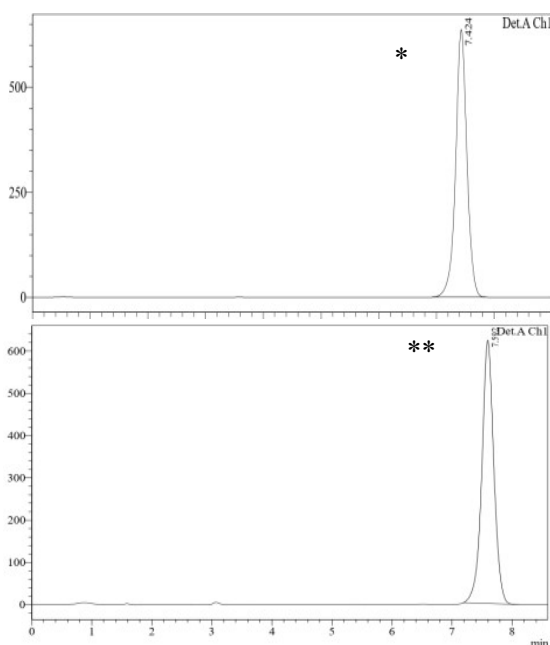


Figure 11 : Résultats de l'influence du pH sur la dégradation de la Bétaméthasone, * pH = 2 ; ** pH = 8

Conclusion

La méthode décrite dans cet article s'est révélée être convenable pour l'analyse de la stabilité de la bétaméthasone et pourrait servir comme point de départ pour la validation des méthodes pour la quantification de ses produits de dégradation. Cette étude a également mis en évidence la sensibilité de la bétaméthasone en milieu acide et alcalin ainsi qu'à l'exposition à la lumière. Par conséquent, la conservation de la bétaméthasone MP devra être effectuée à l'abri de la lumière et de l'humidité et les solutions à base de bétaméthasone devront être préparées extemporanément comme préconisé par la Pharmacopée. Ces recommandations sont à prendre en compte au cours de la synthèse des produits pharmaceutiques apparentés à la bétaméthasone.

Références bibliographiques

1. Xiong Y, Xiao KP, Rustum AM. Development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method to separate low levels of dexamethasone and other related compounds from betamethasone. *J Pharm Biomed Anal.* avr 2009;49(3):646-54.
2. Fu Q, Shou M, Chien D, Markovich R, Rustum AM. Development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method for assay of betamethasone and estimation of its related compounds. *J Pharm Biomed Anal.* févr 2010;51(3):617-25.
3. European pharmacopoeia. Tenth edition. Strasbourg: Council of Europe: European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare; 2019.
4. Ligne directrice à l'intention de l'industrie. Essais de stabilité de nouveaux produits et substances médicamenteuses, ICH thème Q1A(R2). Ottawa, Ontario: Santé Canada, Direction générale des produits de santé et des aliments; 2003.
5. Essais de stabilité: essais de photostabilité des nouveaux produits et substances médicamenteuses. Ottawa: Programme des produits thérapeutiques, Santé Canada; 1998.
6. Tietje C, Brouder A, éditeurs. International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. In: Handbook of Transnational Economic Governance Regimes [Internet]. Brill | Nijhoff; 2010 [cité 18 juill 2023]. p. 1041-53. Disponible sur: https://brill.com/view/book/edcoll/9789004181564/Bej.9789004163300.i-1081_085.xml
7. Tietje C, Brouder A, éditeurs. International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. In: Handbook of Transnational Economic Governance Regimes [Internet]. Brill | Nijhoff; 2010 [cité 18 juill 2023]. p. 1041-53. Disponible sur: https://brill.com/view/book/edcoll/9789004181564/Bej.9789004163300.i-1081_085.xml
8. Fu Q, Shou M, Chien D, Markovich R, Rustum AM. Development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method for assay of betamethasone and estimation of its related compounds. *J Pharm Biomed Anal.* févr 2010;51(3):617-25.
9. Li M, Wang X, Chen B, Chan TM, Rustum A. Forced Degradation of Betamethasone Sodium Phosphate under Solid State: Formation, Characterization, and Mechanistic Study of All Four 17,20-Diastereomers of Betamethasone 17-Deoxy-20-Hydroxy-21-Oic Acid. *J Pharm Sci.* mars 2009;98(3):894-904.
10. Letter W. Peak Purity Determination by HPLC Diode Array Chromatography Software (Limitations and Uses):
11. Ngwa G. Forced Degradation as an Integral Part of HPLC Stability-Indicating Method Development. 2010;10(5).
12. Miolo G, Gallochio F, Levorato L, Dalzoppo D, Beyersbergen Van Henegouwen GMJ, Caffieri S. UVB photolysis of betamethasone and its esters: Characterization of photoproducts in solution, in pig skin and in drug formulations. *J Photochem Photobiol B.* juill 2009;96(1):75-81.
13. Teturo H, Sachiko H, Satoko T, Masami S, Hitoshi M. Studies on Betamethasone: Behavior of Betamethasone in Acid or Alkaline Medium, Photolysis, and Oxidation. *YAKUGAKU ZASSHI.* juill 1979;100:72-80.
14. Chen B, Li M, Lin M, Tumambac G, Rustum A. A comparative study of enol aldehyde formation from betamethasone, dexamethasone, beclomethasone and related compounds under acidic and alkaline conditions. *Steroids.* janv 2009;74(1):30-41.
15. Li M, Chen B, Lin M, Chan TM, Fu X, Rustum A. A variation of Mattox rearrangement mechanism under alkaline condition. *Tetrahedron Lett.* mai 2007;48(22):3901-5.
16. Hansen J, Bundgaard H. Studies on the stability of corticosteroids V. The degradation pattern of hydrocortisone in aqueous solution. *Int J Pharm.* sept 1980;6(3-4):307-19.