

2m11.2590.4

Université de Montréal

Analyse du témazépam racémique et énantiomérique

par

Julie Roy

Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

En Sciences pharmaceutiques

septembre, 1997

©Julie Roy, 1997



QV

705

U58

1998

V.001

Université de Montréal

Université de Montréal

1998

1998

1998

Université de Montréal



Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Analyse du témazépam racémique et énantiomérique

Présenté par:

Julie Roy

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

1/Président du jury: Madame France Varin, Ph.D.

2/Directeur de recherche: Monsieur Jean-Guy Besner, Ph.D.

3/Membre du jury Monsieur Jean-Norbert Mc Mullen, Ph.D.

mémoire accepté le:

Sommaire

Ce projet de recherche avait pour but de mettre au point une méthode de dosage des énantiomères du témazépam pour ensuite étudier la pharmacocinétique différentielle de ses énantiomères chez un animal. L'intérêt de l'étude de la pharmacocinétique différentielle des énantiomères du témazépam réside, tout d'abord, dans le fait qu'il y aurait des évidences de stéréosélectivité pour des composés analogues et dans le fait que personne ne semble avoir effectué une telle étude.

Étant donné que le témazépam est disponible seulement sous forme de racémate, on devait commencer par mettre au point une méthode de dosage plasmatique du témazépam racémique. Une méthode de dosage plasmatique par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) avec détection UV a été développée. La méthode validée est sensible, reproductible, précise et exacte pour des concentrations de 5 à 1000ng/mL de témazépam. L'extraction du témazépam a été effectuée par extraction liquide-liquide.

Ensuite, nos efforts ont porté sur la mise au point d'une méthode d'analyse des énantiomères du témazépam *in vitro*. Nous avons choisi de former des diastéréoisomères à partir du témazépam pour être capable de caractériser chacun des diastéréoisomères sur une colonne non chirale en phase inverse. Deux réactifs ont été testés avec le témazépam ; le menthylchloroformate (MCF) et le naphthyléthylisocyanate (NEI) pour former un carbonate et un carbamate respectivement.

Enfin, nous avons poursuivi notre mise au point dans le plasma. Les résultats obtenus avec les courbes de calibration dans le plasma frais correspondaient aux résultats obtenus *in vitro*. Tandis que les résultats obtenus à l'aide de courbes de calibration congelées n'étaient pas ceux escomptés. Pour mieux comprendre les résultats obtenus, une colonne chirale a été utilisée pour éviter la réaction de couplage entre le témazépam et le naphthyléthylisocyanate (NEI). A l'aide de la colonne chirale, nous nous sommes rendus compte de l'instabilité de la

conformation des énantiomères du témazépam. Un énantiomère pur placé dans un milieu aqueux se racémise plus vite que le temps requis pour l'extraire et le préparer à l'analyse. Ainsi, la racémisation rapide que nous avons observée a rendu irréalisable l'étude de la pharmacocinétique différentielle des énantiomères.

Table des matières

| | |
|--|------|
| SOMMAIRE | III |
| TABLE DES MATIÈRES | V |
| LISTE DES TABLEAUX | VIII |
| LISTE DES FIGURES | IX |
| LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS | XII |
| REMERCIEMENTS | XIII |
| DÉDICACE | XIV |
| INTRODUCTION | 1 |
| STRUCTURE ET RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITÉ | 1 |
| MÉCANISME D'ACTION DES BENZODIAZÉPINES | 5 |
| INDICATION ET RÉPERCUSSIONS LIÉES À L'USAGE DU TÉMAZÉPAM | 6 |
| PHARMACOCINÉTIQUE | 7 |
| STÉRÉOSÉLECTIVITÉ DES BENZODIAZÉPINES APPARENTÉES AU TÉMAZÉPAM | 9 |
| SÉPARATION DES ÉNANTIOMÈRES | 10 |
| HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS VISÉS | 14 |
| MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE ANALYTIQUE PLASMATIQUE DU TÉMAZÉPAM | |
| RACÉMIQUE | 15 |
| MÉTHODE ANALYTIQUE | 15 |
| <i>Matériel</i> | 15 |
| <i>Préparation des solutions</i> | 15 |
| <i>Extraction du Témazépam à partir du plasma humain</i> | 16 |
| <i>Appareils</i> | 16 |
| <i>Conditions chromatographiques</i> | 17 |
| RÉSULTATS | 18 |
| <i>Courbes de calibration</i> | 18 |

| | |
|---|-----------|
| <i>Reproductibilité et sensibilité</i> | 18 |
| <i>Recherche des substances interférentes</i> | 19 |
| <i>Recouvrement observé du témazépam et du diazépam à partir du plasma humain</i> | 19 |
| <i>Stabilité à court terme dans le plasma humain</i> | 20 |
| <i>Stabilité du témazépam et du diazépam extraits placés dans l'auto-injecteur</i> | 20 |
| <i>Stabilité 12 heures (Tableau 7)</i> | 21 |
| <i>Stabilité 24 heures (Tableau 8)</i> | 21 |
| <i>Stabilité du témazépam au gel-dégel dans le plasma humain (Tableau 9)</i> | 21 |
| MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE DE COUPLAGE DU TÉMAZÉPAM AVEC LE MENTHYLCHLOROFORMATE (MCF) | 37 |
| MÉTHODE ANALYTIQUE LORS DE L'ESSAI AVEC LE MCF: | 37 |
| <i>Matériel</i> : | 37 |
| <i>Préparations des solutions</i> | 39 |
| <i>Conditions de réaction entre le TMZ et le MCF</i> | 39 |
| <i>Conditions chromatographiques pour observer le pic de TMZ inchangé</i> | 39 |
| RÉSULTATS DE L'OBSERVATION DU TMZ INCHANGÉ APRÈS RÉACTION AVEC MCF | 40 |
| RÉSULTATS DE LA RÉACTION ENTRE LE TMZ AVEC LE MCF | 42 |
| <i>Identification du pic formé</i> | 42 |
| MÉTHODE ANALYTIQUE AVEC UNE COLONNE C-8 POUR OBSERVER LES PICS DE TMZ-MCF | 44 |
| <i>Conditions chromatographiques avec une colonne C-8 pour observer les pics de TMZ-MCF</i> | 44 |
| RÉSULTATS DE LA SÉPARATION DES PICS DU TMZ-MCF AVEC UNE COLONNE C-8..... | 45 |
| MÉTHODE ANALYTIQUE AVEC UNE AVEC UNE COLONNE β -CYCLOBOND POUR OBSERVER LES PICS DE TMZ-MCF | 47 |
| <i>Conditions chromatographiques pour observer les pics de TMZ-MCF avec une colonne β- Cyclobond</i> | 47 |
| RÉSULTATS DE LA SÉPARATION DES PICS DE TMZ-MCF AVEC UNE COLONNE β -CYCLOBOND | 47 |
| CONCLUSION | 47 |
| MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE DE COUPLAGE DU TÉMAZÉPAM AVEC LE NAPHTHYLÉTHYLISOCYANATE (NEI) | 49 |
| MÉTHODE ANALYTIQUE LORS DE L'ESSAI AVEC LE NAPHTHYLÉTHYLISOCYANATE (NEI) | 49 |
| <i>Matériel</i> | 49 |
| <i>Conditions de réactions préliminaires entre le TMZ et le NEI</i> | 51 |
| <i>Conditions chromatographiques préliminaires pour le TMZ-NEI</i> | 51 |

| | |
|--|-----------|
| RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES DE LA SÉPARATION DES PICS DE TMZ-NEI AVEC LA COLONNE INERTSIL51 | |
| IDENTIFICATION DES SUBSTANCES INTERFÉRENTES ET MESURES PRISES AFIN DE LES CONTRER.... | 53 |
| <i>Conditions de réaction entre le TMZ et le NEI</i> | 61 |
| RÉSULTATS OBSERVÉS EN CONTRÔLANT LES SUBSTANCES INTERFÉRENTES | 61 |
| RECHERCHE D'UN ÉTALON INTERNE..... | 71 |
| <i>Conditions de réaction entre le TMZ et le NEI avec l'étalon interne</i> | 71 |
| <i>Conditions chromatographiques</i> | 71 |
| RÉSULTATS AVEC L'UTILISATION DU LORAZÉPAM COMME ÉTALON INTERNE | 73 |
| MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE DE COUPLAGE DU TÉMAZÉPAM AVEC LE NEI | |
| DANS UNE MATRICE PLASMATIQUE..... | 84 |
| MÉTHODE ANALYTIQUE | 84 |
| <i>Matériel</i> | 84 |
| <i>Méthode</i> | 84 |
| RÉSULTATS ET DISCUSSION..... | 84 |
| <i>Hypothèse pour expliquer les différences de ratio à partir des échantillons qui ont été</i> | |
| <i>congelés</i> | 94 |
| CONCLUSION..... | 95 |
| RÉFÉRENCES | 96 |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| TABLEAU 1 : STRUCTURE DE QUELQUES BENZODIAZÉPINES | 4 |
| TABLEAU 2: RÉSUMÉ DES PARAMÈTRES DES COURBES DE VALIDATION; PRÉCISION ET EXACTITUDE INTER-COURBE; CONCENTRATIONS DE TÉMAZÉPAM RETROUVÉES À PARTIR DE LA COURBE DE CALIBRATION DE LA JOURNÉE EXTRAITE DU PLASMA HUMAIN | 29 |
| TABLEAU 3: RÉSUMÉ DES PARAMÈTRES DE LA COURBE 1; PRÉCISION ET EXACTITUDE INTRA-COURBE À PARTIR DES CONCENTRATIONS DE TÉMAZÉPAM RETROUVÉES GRÂCE À LA COURBE DE CALIBRATION EXTRAITE DU PLASMA..... | 30 |
| TABLEAU 4: RECOUVREMENT OBSERVÉ DU TÉMAZÉPAM RACÉMIQUE À PARTIR DU PLASMA HUMAIN | 31 |
| TABLEAU 5: RECOUVREMENT DU DIAZÉPAM (ÉTALON INTERNE) À PARTIR DU PLASMA HUMAIN | 32 |
| TABLEAU 6: STABILITÉ À COURT TERME (5 HEURES) DU TÉMAZÉPAM DANS LE PLASMA HUMAIN | 33 |
| TABLEAU 7: STABILITÉ DU TÉMAZÉPAM ET DU DIAZÉPAM EXTRAITS LAISSÉS 12 HEURES DANS L'INJECTEUR AUTOMATIQUE À 22± 2°C..... | 34 |
| TABLEAU 8: STABILITÉ DU TÉMAZÉPAM ET DU DIAZÉPAM EXTRAITS LAISSÉS 24 HEURES DANS L'INJECTEUR AUTOMATIQUE À 22± 2°C..... | 35 |
| TABLEAU 9: STABILITÉ AU GEL ET AU DÉGEL DU TÉMAZÉPAM DANS LE PLASMA HUMAIN | 36 |
| TABLEAU 10: EFFET DES TUBES ET DE SON TRAITEMENT SUR LE RENDEMENT DE LA RÉACTION | 60 |
| TABLEAU 11: COMPARAISON DES PENTES DES COURBES DE CALIBRATION NON EXTRAITES DU TMZ- NEI..... | 70 |
| TABLEAU 12: COMPARAISON DES PENTES DES COURBES NON EXTRAITES DU TMZ-NEI AVEC ÉTALON INTERNE..... | 74 |
| TABLEAU 13: COMPARAISON ENTRE TAMPON ACÉTATE ET PHOSPHATE SUR LES RATIOS DES HAUTEURS DE PICS DE TMZ-NEI: 1ER PIC/2E PIC..... | 89 |
| TABLEAU 14: COMPARAISON ENTRE TAMPON PHOSPHATE ET BORATE SUR LES RATIOS DES HAUTEURS DE PICS DE TMZ-NEI: 1ER PIC/2E PIC..... | 90 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| FIGURE 1 : TÉMAZÉPAM | 1 |
| FIGURE 2: EFFET DU PH SUR L'IONISATION DU TÉMAZÉPAM | 3 |
| FIGURE 3 : NOYAU DES BENZODIAZÉPINES..... | 4 |
| FIGURE 4 : CYCLE IMIDAZOLE DU MIDAZOLAM..... | 4 |
| FIGURE 5 : CYCLE TRIAZOLO DU TRIAZOLAM | 4 |
| FIGURE 6 : SCHÉMA MÉTABOLIQUE DU TÉMAZÉPAM..... | 8 |
| FIGURE 7 : TOFIZOPAM | 9 |
| FIGURE 8: NAPHTHYLÉTHYLISOCYANATE | 11 |
| FIGURE 9: COURBE DE CALIBRATION TYPE DU TÉMAZÉPAM DANS LE PLASMA | 22 |
| FIGURE 10: CHROMATOGRAMME D'UN ÉCHANTILLON EXTRAIT DE TÉMAZÉPAM À LA LIMITE DE QUANTIFICATION INFÉRIEURE: 5ng/mL..... | 23 |
| FIGURE 11: CHROMATOGRAMME REPRÉSENTANT UNE INJECTION DES SOLUTION-STOCK DU TÉMAZÉPAM ET DU DIAZÉPAM (ÉTALON INTERNE)..... | 24 |
| FIGURE 12: CHROMATOGRAMME TYPE D'UN BLANC DE PLASMA EXTRAIT..... | 25 |
| FIGURE 13: CHROMATOGRAMME TYPE D'UN ÉCHANTILLON DE CONTRÔLE DE LA QUALITÉ À 10ng/mL..... | 26 |
| FIGURE 14: CHROMATOGRAMME TYPE D'UN ÉCHANTILLON DE CONTRÔLE DE LA QUALITÉ À 150ng/mL..... | 27 |
| FIGURE 15: CHROMATOGRAMME TYPE D'UN ÉCHANTILLON DE CONTRÔLE DE LA QUALITÉ À 800ng/mL..... | 28 |
| FIGURE 16: RÉACTION DE COUPLAGE ENTRE LE TÉMAZÉPAM (TMZ) ET LE MENTHYLCHLOROFORMATE (MCF) | 38 |
| FIGURE 17: CHROMATOGRAMME TYPE D'UNE INJECTION DE 100NG DE TMZ | 41 |
| FIGURE 18: CHROMATOGRAMME TYPE D'UNE INJECTION DE 100NG DE TMZ APRÈS RÉACTION AVEC MCF | 41 |
| FIGURE 19: 2-MÉTHYLAMINO-5-CHLOROBENZOPHÉNONE (MACB) | 43 |
| FIGURE 20: CHROMATOGRAMME TYPE DES DIASTÉRÉOISOMÈRES DU TMZ-MCF SUR COLONNE C-8..... | 46 |
| FIGURE 21: CHROMATOGRAMME TYPE DES DIASTÉRÉOISOMÈRES DU TMZ-MCF SUR COLONNE B- CYCLOBOND | 48 |

| | |
|---|----|
| FIGURE 22: RÉACTION DE COUPLAGE ENTRE LE TÉMAZÉPAM (TMZ) ET LE NAPHTHYLÉTHYLISOCYANATE(NEI)..... | 50 |
| FIGURE 23: CHROMATOGRAMME TYPE DES DIASTÉRÉOISOMÈRES DU TMZ-NEI SUR COLONNE INERTSIL..... | 52 |
| FIGURE 24: RÉACTION ENTRE LE NEI ET L'EAU..... | 54 |
| FIGURE 25: COURBE DE CALIBRATION NON EXTRAITE DU TÉMAZÉPAM AVEC LE NAPHTHYLÉTHYLISOCYANATE (NEI) EN EXCÈS MOLAIRE DE 150 FOIS..... | 56 |
| FIGURE 26: COURBE DE CALIBRATION NON EXTRAITE DU TMZ AVEC LE NEI EN EXCÈS MOLAIRE DE 1500 FOIS..... | 57 |
| FIGURE 27: COURBE DE CALIBRATION STANDARD NON EXTRAITE DU TÉMAZÉPAM (TMZ) AVEC LE NAPHTHYLÉTHYLISOCYANATE (NEI)..... | 63 |
| FIGURE 28: COURBE DE CALIBRATION STANDARD NON EXTRAITE DU TÉMAZÉPAM (TMZ) AVEC LE NAPHTHYLÉTHYLISOCYANATE (NEI)..... | 64 |
| FIGURE 29: COURBE DE CALIBRATION NON EXTRAITE DU TÉMAZÉPAM (TMZ) AVEC LE NAPHTHYLÉTHYLISOCYANATE (NEI)..... | 65 |
| FIGURE 30: COURBE DE CALIBRATION NON EXTRAITE DU TÉMAZÉPAM (TMZ) AVEC LE NAPHTHYLÉTHYLISOCYANATE (NEI)..... | 66 |
| FIGURE 31: COURBE DE CALIBRATION NON EXTRAITE DU TÉMAZÉPAM (TMZ) AVEC LE NAPHTHYLÉTHYLISOCYANATE (NEI)..... | 67 |
| FIGURE 32: COURBE DE CALIBRATION NON EXTRAITE DU TÉMAZÉPAM (TMZ) AVEC LE NAPHTHYLÉTHYLISOCYANATE (NEI)..... | 68 |
| FIGURE 33: COURBE DE CALIBRATION NON EXTRAITE DU TÉMAZÉPAM (TMZ) AVEC LE NAPHTHYLÉTHYLISOCYANATE (NEI)..... | 69 |
| FIGURE 34: RÉSUMÉ DES COURBES DE CALIBRATION NON EXTRAITES DU TMZ-NEI..... | 70 |
| FIGURE 35: LORAZÉPAM..... | 71 |
| FIGURE 36: CHROMATOGRAMME TYPE DU TMZ-NEI AVEC LORAZÉPAM-NEI 2E PIC COMME ÉTALON INTERNE..... | 72 |
| FIGURE 37: RÉSUMÉ DES COURBES DE CALIBRATION NON EXTRAITES DU TMZ-NEI AVEC ÉTALON INTERNE (LORAZÉPAM)..... | 74 |
| FIGURE 38: COURBE DE CALIBRATION NON EXTRAITE DU TMZ AVEC LE NEI..... | 75 |
| FIGURE 39: COURBE DE CALIBRATION NON EXTRAITE DU TMZ AVEC LE NEI ET LE LORAZÉPAM COMME ÉTALON INTERNE..... | 76 |
| FIGURE 40: COURBE DE CALIBRATION NON EXTRAITE DU TÉMAZÉPAM AVEC LE NAPHTHYLÉTHYLISOCYANATE (NEI) ET LE LORAZÉPAM COMME ÉTALON INTERNE..... | 78 |

| | |
|---|----|
| FIGURE 41: COURBE DE CALIBRATION NON EXTRAITE DU TÉMAZÉPAM AVEC LE NAPHTHYLÉTHYLISOCYANATE (NEI) ET LE LORAZÉPAM COMME ÉTALON INTERNE | 79 |
| FIGURE 42: COURBE DE CALIBRATION NON EXTRAITE DU TÉMAZÉPAM AVEC LE NAPHTHYLÉTHYLISOCYANATE (NEI) ET LE LORAZÉPAM COMME ÉTALON INTERNE | 80 |
| FIGURE 43: COURBE DE CALIBRATION NON EXTRAITE DU TÉMAZÉPAM AVEC LE NAPHTHYLÉTHYLISOCYANATE (NEI) ET LE LORAZÉPAM COMME ÉTALON INTERNE | 81 |
| FIGURE 44: COURBE DE CALIBRATION NON EXTRAITE DU TÉMAZÉPAM AVEC LE NAPHTHYLÉTHYLISOCYANATE (NEI) ET LE LORAZÉPAM COMME ÉTALON INTERNE | 82 |
| FIGURE 45: COURBE DE CALIBRATION NON EXTRAITE DU TÉMAZÉPAM AVEC LE NAPHTHYLÉTHYLISOCYANATE (NEI) ET LE LORAZÉPAM COMME ÉTALON INTERNE | 83 |
| FIGURE 46: COURBE DE CALIBRATION EXTRAITE DU TÉMAZÉPAM AVEC LE NAPHTHYLÉTHYLISOCYANATE (NEI) ET LE LORAZÉPAM COMME ÉTALON INTERNE | 85 |
| FIGURE 47: COURBE DE CALIBRATION EXTRAITE, APRÈS AVOIR ÉTÉ CONGELÉE 24 HEURES, DU TÉMAZÉPAM AVEC LE NEI ET LE LORAZÉPAM COMME ÉTALON INTERNE | 86 |
| FIGURE 48: UN MÉCANISME POUR EXPLIQUER LA RACÉMISATION: LA TAUTOMÉRIE | 92 |

Liste des sigles et des abréviations

ACN: Acétonitrile

BZD: Benzodiazépine

C_{max}: Concentration maximale

DMAP: Diméthylaminopyridine

DZP: diazépam

GABA: Acide gamma aminobutyrique

HPLC: Chromatographie liquide à haute performance

MACB: 2-méthylamino-5-chlorobenzophénone

MCF: Menthylchloroformate

NEI: Naphthyléthylisocyanate

qs ad : compléter jusqu'à

QC: Échantillon de contrôle de la qualité

TEA: Triéthylamine

T_{max}: moment où survient la concentration maximale

TMZ: Témazépam

Remerciements

Je tiens à remercier le Professeur Jean-Guy Besner, un mentor, un homme de cœur. Je lui suis à jamais reconnaissante de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Je voudrais également remercier le Professeur Irving.W. Wainer de m'avoir généreusement prêté une colonne chirale pour compléter mes expériences.

Je remercie Madame Rachel Charbonneau de m'avoir initiée aux techniques de laboratoire.

Dédicace

*Je dédie l'ensemble de mes travaux
à la mémoire de mon père Aimé
et à ma mère Marie*

Introduction

Structure et relations structure-activité

Le témazépam (TMZ) est une 1,4-benzodiazépine qui possède un carbone asymétrique en C-3. Le caractère faiblement basique de cette molécule est imputable à l'azote en position 4 qui peut accepter un proton¹. Le pKa du témazépam est de 1,6^{2,7} voir Figure 2.

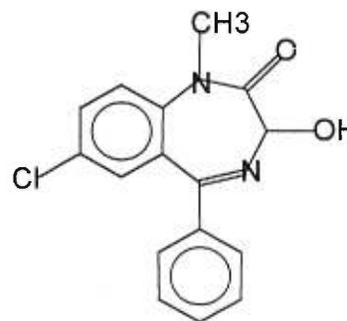


Figure 1 : témazépam

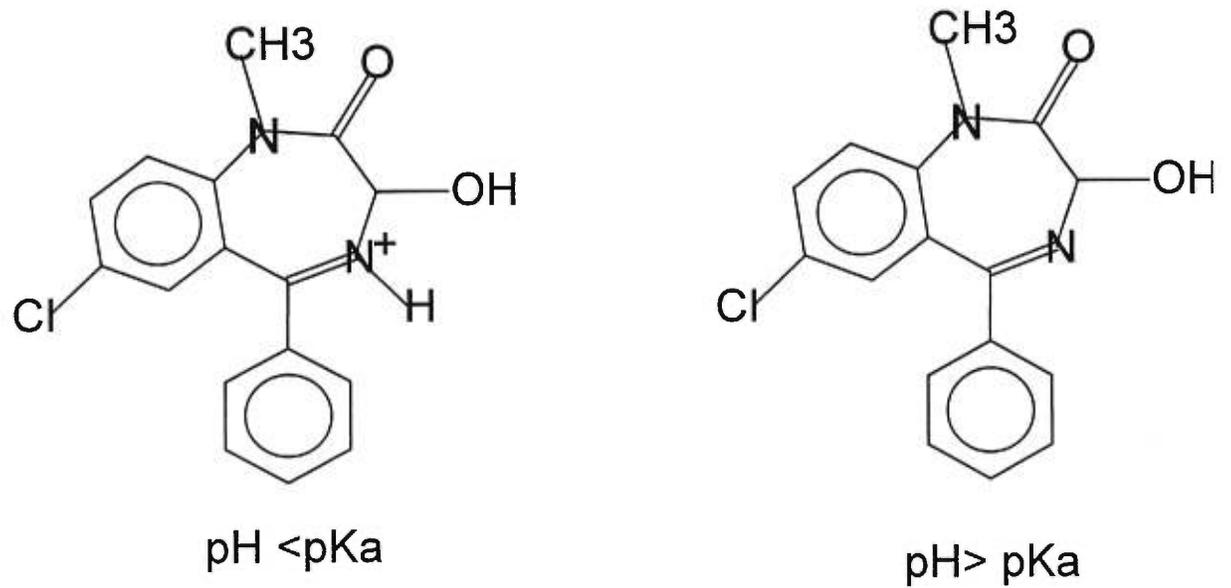
La famille des benzodiazépines (BZD) regroupe les molécules qui sont composées d'un noyau benzo A accolé à un hétérocycle diazépine B à 7 atomes³. Le carbone en C-5 est essentiellement porteur d'un noyau phényle, voir Figure 3.

Étant donné que plusieurs benzodiazépines sont utilisées depuis de nombreuses années les relations structure-activité ont été largement étudiées. Voici un aperçu des relations structure-activité pour les 1,4-benzodiazépinones (i.e. noyau des benzodiazépines qui est substitué par une cétone en R2) telles que définies dans les années 1960 et 1970, voir Tableau 1.

Cycle A : Position 7 : L'activité biologique est augmentée par substitution avec des groupes tireurs d'électrons comme -Cl, -NO₂, -CF₃, et diminuée par substitution avec des groupes donneurs d'électrons comme : -CH₃, -OCH₃. Toute substitution des autres positions du cycle A entraîne une diminution de l'activité.

Cycle B : Position 1 : L'activité est augmentée par substitution avec un groupe méthyl. En allongeant la chaîne, cela amène une diminution de l'activité.

Cycle C : position 2' : Augmentation de l'activité si substitué par des halogènes (-Cl, -F). Activité très amoindrie si substitué en 4' ^{4,5}.



Témazépan: pKa : 1,6

Figure 2: Effet du pH sur l'ionisation du témazépan

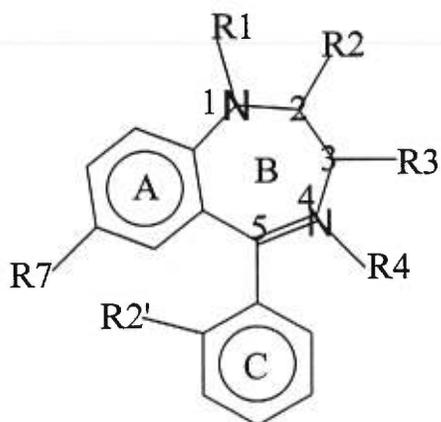


Figure 3: Noyau des benzodiazépines

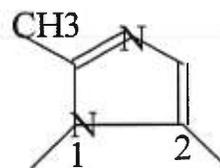


Figure 4: cycle imidazole du midazolam

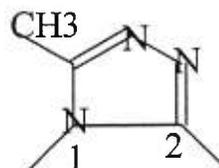


Figure 5: Cycle triazolo du triazolam

Tableau 1: Structure de quelques benzodiazépines

| benzodiazépine | R1 | R2 | R3 | R7 | R'2 |
|----------------|---|--------------------------------|-----|------------------|-----|
| clonazépam | -H | =O | -H | -NO ₂ | -Cl |
| flurazépam | -CH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂ | =O | -H | -Cl | -F |
| midazolam | fusionné au cycle imidazole | fusionné au cycle imidazole | -H | -Cl | -F |
| lorazépam | -H | =O | -OH | -Cl | -Cl |
| diazépam | -CH ₃ | =O | -H | -Cl | -H |
| triazolam | fusionné au cycle triazolo | fusionné au cycle triazolo | -H | -Cl | -Cl |

Mécanisme d'action des benzodiazépines

Les benzodiazépines potentialiseraient l'action inhibitrice de l'acide gamma aminobutyrique (GABA). Le GABA, est un neurotransmetteur inhibiteur important au niveau du système nerveux central qui agit au niveau pré et post synaptique. Lors de la libération de GABA au niveau pré-synaptique d'un neurone exciteur, il y a diminution de la libération du neurotransmetteur exciteur. Lors de la libération de GABA au niveau post-synaptique, l'activation des récepteurs GABA entraîne l'ouverture des canaux chlore, permettant aux ions chlore de migrer du fluide extracellulaire vers le fluide intracellulaire rendant la cellule plus négative. L'hyperpolarisation qui en résulte rend la dépolarisation au-delà du seuil d'excitation plus difficile. Ainsi, les cellules sont moins sensibles aux influx excitants.^{6,7}

Les récepteurs au GABA sont liés à des canaux ioniques et l'activation des récepteurs par le GABA entraîne l'ouverture de ces canaux. Il existe au moins deux types de récepteurs au GABA : GABA_A et GABA_B. Le GABA_B régirait l'activité des canaux calciques et potassiques. Il serait aussi associé à une protéine qui inhiberait la liaison du GTP, ce qui modulerait l'activité de l'adénylate cyclase. Le GABA_A serait surtout impliqué dans la régulation de la conduction des ions chlore. Parmi les canaux ioniques auxquels le GABA peut être lié, le chlore est le plus important.

Dans toutes les régions principales du système nerveux central, il a été démontré que les benzodiazépines augmentaient la transmission du GABA au niveau pré et post synaptique. Deux types de récepteurs aux benzodiazépines auraient été identifiés : BZ₁ et BZ₂. Les récepteurs BZ₁ seraient situés au niveau du cervelet principalement tandis que les récepteurs BZ₂ seraient concentrés au niveau de l'hippocampe et des noyaux gris centraux^{8, 9,10, 11, 12}. Les 1,4-benzodiazépines ne sont pas les seuls ligands aux récepteurs BZ ; d'autres entités chimiques ont démontré une affinité pour ces récepteurs qui peuvent avoir une activité agoniste, antagoniste (flumazénil) ou agoniste inverse.^{13, 14} Parmi les benzodiazépines étudiées, toutes ne démontraient pas une affinité différentielle pour les récepteurs BZ.

Bien que le mécanisme par lequel les benzodiazépines augmenteraient la transmission du GABA ne soit pas totalement expliqué, une hypothèse soutient que les benzodiazépines agiraient au niveau post-synaptique en modulant l'affinité du GABA pour son récepteur ou pour les canaux chlores^{15, 16}. Une autre hypothèse soutient que les benzodiazépines agiraient en plus au niveau pré-synaptique du neurone GABAergique même, en augmentant la libération du GABA.

Ainsi, les benzodiazépines agiraient en augmentant la libération du GABA ou en augmentant l'effet du GABA libéré.

Indication et répercussions liées à l'usage du témazépam

La première benzodiazépine mise sur le marché a été le chlordiazépoxyde à la fin des années 50 par le laboratoire Roche^R. Ensuite, le diazépam, le témazépam et les autres ont suivi. Les benzodiazépines sont utilisées principalement comme anxiolytiques, hypnotiques/sédatifs, anticonvulsivants, relaxants musculaires¹⁷. Leur principal avantage par rapport aux barbituriques réside dans le fait qu'elles soient peu toxiques diminuant ainsi les risques de mortalité au minimum lors de prises accidentelles de grandes quantités.¹⁷ Le TMZ est surtout utilisé pour son activité hypnotique. Généralement, les doses utilisées chez l'homme varient de 15 à 60 mg par jour. Son absorption rapide, son temps de demi-vie intermédiaire(6-8 hres)^{18,19,20,21,36} permettent d'obtenir un effet soutenu pendant toute la nuit, ce qui en fait un médicament fréquemment prescrit pour les troubles du sommeil. Les effets du témazépam se répercutent à toutes les étapes du sommeil ; mais son effet est surtout marqué au niveau de l'augmentation de la durée totale du sommeil.^{20, 21,22,23,24}

La présence d'effets résiduels n'est pas étrangère aux différentes BZD. Plusieurs études ont démontré la présence d'effets résiduels avec le TMZ comparativement à certaines autres BZD au niveau des performances cognitives et psychomotrices^{22,23, 25}. Deux propriétés des BZD semblent être importantes en ce qui a trait aux effets résiduels sur la mémoire et sur les performances psychomotrices : l'affinité du médicament au site d'action et le temps de demi-vie du médicament. Ainsi, les BZD

dont le temps de demi-vie est plus long affectent les performances motrices de façon plus marquée. Par exemple, le nitrazépam avec son temps de demi-vie de 18-34 heures aurait des effets résiduels plus importants que le témazépam. Les BZD ayant une affinité plus grande au récepteur, par exemple triazolam et alprazolam, auraient des effets amnésiques plus marqués que les BZD ayant une affinité moindre pour leur récepteur comme le TMZ et DZP.^{26, 27, 28, 29, 32}

Pharmacocinétique

Le témazépam est un médicament réservé à l'usage oral exclusivement. La cinétique de ce médicament serait bien décrite par un modèle bicompartimental avec absorption monoexponentielle³⁰. En utilisant les capsules formulées par la compagnie Sandoz, une dose de 30 mg entraîne des concentrations maximales (C_{max}) de l'ordre de 670-757 ng/mL après 1,08-1,49 heure (T_{max})³¹. Il est très peu soluble dans l'eau³² et il possède un très grand volume de distribution (1,32 à 1,53 L/kg)³³ incluant le système nerveux central, le placenta et le lait maternel^{32,36}.

Le témazépam est lié à près de 96-97% aux protéines plasmatiques^{34, 35}.

Le témazépam est biotransformé au foie par glucuronoconjugaison surtout et par oxydation (N-déméthylation en position N-1)^{36, 37}. Le produit d'oxydation est l'oxazépam et il est également utilisé en thérapeutique. 86,6% du témazépam est éliminé dans l'urine sous forme de son glucuronide et 5,8% est éliminé sous forme du glucuronide de l'oxazépam tandis que l'excrétion du témazépam est inférieure à 1%³⁸.

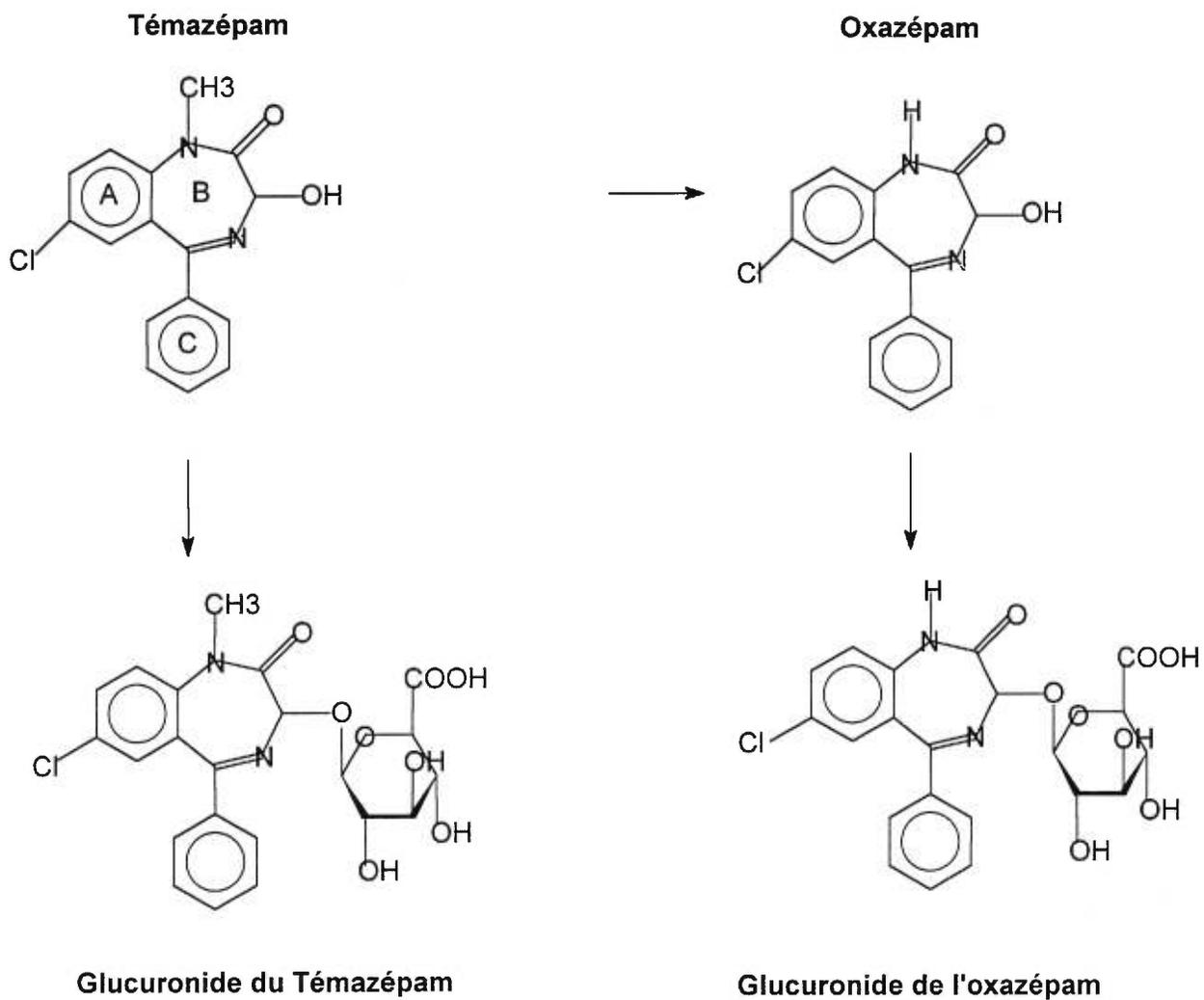


Figure 6: Schéma métabolique du témazépam

Stéréosélectivité des benzodiazépines apparentées au témazépam

Le témazépam, est commercialisé sous sa forme racémique (R et S). C'est en position C-3 qu'on retrouve le carbone asymétrique qui lui confère ses deux énantiomères. Le couplage du groupement hydroxyl du TMZ en C-3 à l'acide D-glucuronique n'affecte pas le centre chiral de la molécule et permet la formation de diastéréoisomères^{39,40,41}.

L'intérêt de la séparation des énantiomères des benzodiazépines ayant un carbone asymétrique en C-3 réside dans la stéréosélectivité qui se manifeste de plusieurs façons. Au niveau des récepteurs dans le cerveau, l'énantiomère S(+) aurait une affinité plus grande et serait majoritairement responsable de l'activité pharmacologique⁴². L'énantiomère S(+) aurait une affinité apparente de 100 à 200 fois supérieure à celle de l'énantiomère pharmacologiquement plus faible: R(-)^{43,44}.

Au niveau de l'albumine plasmatique, il y aurait évidence de liaison stéréosélective pour l'énantiomère S(+) de plusieurs benzodiazépines et 1,4-benzodiazépin-2-ones^{45,67}. La conformation des énantiomères des 1,4 benzodiazépines pourrait aussi jouer un rôle dans la liaison à l'albumine à cause des résultats qui ont été observés pour le tofizopam, une 2,3-benzodiazépine (voir figure 7). En effet, il a été démontré que pour cette molécule ayant un centre asymétrique en C-5, la configuration et la conformation modulaient le degré de liaison à l'albumine^{46,47}.

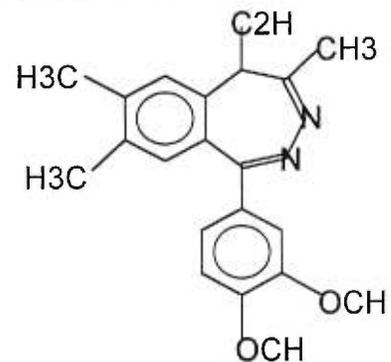


Figure 7 : Tofizopam

Au niveau du métabolisme, il y aurait des différences de vitesses d'hydrolyse enzymatique où l'énantiomère S(+) de l'oxazépam glucuronide serait hydrolysé plus rapidement que le R(-)³⁹. Ceci pourrait avoir des conséquences au niveau de la recirculation entéro-hépatique. Certains ont aussi observé des différences de vitesse pour des mécanismes de phase I, en l'occurrence, l'hydroxylation. Dans ce dernier cas, l'énantiomère S(+) des 1,4benzodiazepine-2-ones subissait plus rapidement la biotransformation par le cytochrome P-450 du foie⁴⁸. Rendic et al.

font aussi allusion à la conformation des énantiomères pour expliquer la stéréosélectivité. Le cytochrome P-450 serait stéréosélectif pour la conformation M. Or, l'énantiomère S-(+) des 1,4benzodiazepine-2-ones étudiées sont plus stables sous la conformation M⁴⁸. La glucuronoconjugaison, mécanisme de phase II, serait aussi stéréosélective, à cause des enzymes impliquées: glucuronyl-transférases⁴⁹. Aussi, malgré l'administration de l'oxazépam racémique, il a été démontré que le ratio S/R de glucuronides était différent de l'unité dans le plasma et dans l'urine et qu'il variait d'une espèce animale à l'autre^{40, 50}. Avec le témazépam le même phénomène a été observé: même en administrant le racémate, la concentration de S(+)-témazépam-glucuronide était supérieure à la concentration de son antipode dans le plasma et dans l'urine³⁸. La vitesse d'hydrolyse de l'oxazépam acétate a été étudiée avec des estérases du foie et du cerveau et l'énantiosélectivité des estérases a été démontrée mais elle s'est exprimée de façon opposée avec les deux fractions^{51, 52}.

Séparation des énantiomères

On peut généralement envisager la séparation des énantiomères de trois façons:

-une séparation sur phase stationnaire optiquement active

-l'ajout d'un agent chiral à la phase mobile suivie d'une chromatographie sur phase stationnaire inactive

-la conversion des énantiomères en des diastéréoisomères à l'aide d'un agent chiral approprié suivie d'une chromatographie sur phase stationnaire^{53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62}.

Généralement, 2 raisons justifient le couplage

-cette technique permet d'analyser des substances qui autrement ne pourraient pas être analysées; dans le cas de composés volatiles ou instables par exemple.

-cela permet aussi d'améliorer la détection des substances et son comportement à la chromatographie⁶³.

Ainsi, en chromatographie liquide, un agent de couplage peut être utilisé pour augmenter la sensibilité de la méthode avec un agent qui possède une absorption ultraviolette (UV). Le naphthyléthylisocyanate, NEI, est un agent qui correspond à cette description et c'est la raison pour laquelle nous l'avons choisi pour effectuer notre réaction de couplage. Figure 8.

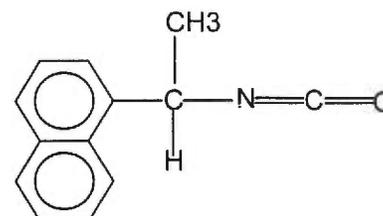


Figure 8:
Naphthyléthylisocyanate

Plusieurs chercheurs ont réussi, avec plus ou moins de succès à séparer les énantiomères du témazépam à l'aide de colonnes chirales:

- AGP: séparation partielle⁴⁴
- Beta-cyclodextrine: aucune séparation des énantiomères⁴¹
- triacétate de cellulose: séparation partielle des énantiomères⁴¹
- PGC: aucune séparation⁴¹
- DNB-DPEDA: (S,S)-N-(3,5- dinitrobenzoyl)-1,2-diphenylethane-1,2-diamine. Dans cette référence, 2 colonnes ont été testées et les auteurs sont arrivés à obtenir les résultats suivants: pour la 1ère colonne, k' :2,46 α : 1,32 et R_s :1,66 2ième colonne: k' :1,50 α :1,18 et R_s :1,00: avec ces résultats, la séparation doit être complète⁶⁴.
- N-formyl phenylalanine :on observe une séparation incomplète à la base des pics⁶⁵
- HSA ou Human Serum Albumin. Ici, la colonne HSA a démontré une grande capacité de ségrégation des énantiomères du TMZ. Cependant, ces résultats sont peu pratiques dans le cadre d'une étude pharmacocinétique à cause des

temps d'élution longs(1er pic sort à 15-20 minutes et le 2e à environ 110 minutes) ^{66, 67}.

- BSA ou Bovin Serum Albumin. On observe dans cet article un α à 3,30 et k'_1 de 1,6 on peut déduire qu'ils obtiennent une séparation complète⁶⁸
- NEA- β -CD, cette colonne S-naphthylethylcarbamate- β -cyclodextrin a été utilisée pour séparer les énantiomères du témazépam mais avec un α à 1,03 et un k' à 5,2; la séparation est sûrement incomplète⁶⁹
- CSP-1: (S)-N-(3,5-dinitrobenzoyl)phenylalanine avec groupes silanols désactivés Avec le type de colonne maison décrit par les auteurs, on observe une séparation quasi complète des pics des énantiomères⁷⁰
- CSP-2: (S)-N-(3,5-dinitrobenzoyl)phenylalanine avec groupes silanols désactivés. Avec cet autre type de colonne maison décrit dans le même article, les auteurs ont obtenu une séparation partielle des énantiomères

Cependant, aucun ne semble avoir essayé de séparer les énantiomères du témazépam, après dérivation, sur une colonne non chirale. Certains auteurs ont réussi à séparer les glucuronides du témazépam en phase inverse sur colonne non polaire où le R-TMZ-glucuronide est élué en premier^{38,70,71}. Le TMZ-hémisuccinate a été séparé sur colonne HSA où le R-TMZ-hémisuccinate est élué en premier⁶⁶.

D'autres chercheurs ont choisi pour séparer les énantiomères de certaines benzodiazépines, dont le TMZ, de faire réagir ces molécules avec des acides pour former des esters. Ces esters étaient ensuite élués sur des colonnes chirales:

- R-DNBPG(R-N-3,5 dinitro benzoyl phénylglycine) et
- S-DNBL (N-3,5 dinitro benzoyl leucine)

Ils ont choisi de faire réagir avec des acides pour éviter la racémisation rapide des benzodiazépines avec le centre chiral en C-3. Les résultats qu'ils ont obtenus en utilisant cette méthode se sont avérés intéressants. Cependant, quand ils ont

essayé d'utiliser une colonne β -Cyclobond, ils n'ont pas connu le même succès. Aussi, sur colonne C-18, après réaction avec un acide sur le centre chiral, les résultats ont été décevants. Enfin, en utilisant le HPLC en phase normale avec une colonne de gel de silice gel, toujours en procédant à la réaction avec un acide au préalable, ils ont obtenu sur la chromatographie une séparation incomplète des pics^{53,72}.

Hypothèse et objectifs visés

Étant donné que le témazépam est un médicament commercialisé sous sa forme racémique et qu'il y aurait évidence de stéréosélectivité à plusieurs niveaux pour des benzodiazépines apparentées, nous croyons que la pharmacocinétique des énantiomères du témazépam est stéréospécifique. Ainsi, nous allons tenter de mettre au point une méthode d'analyse différentielle des énantiomères du témazépam pour observer les variations cinétiques entre les deux isomères.

Pour mettre en évidence une pharmacocinétique différentielle des énantiomères, nous croyons que l'utilisation d'un réactif pour former des diastéréoisomères avant l'élution pourrait faciliter la détection. Aux doses généralement utilisées chez l'humain, soit de 15 à 30 mg, les concentrations plasmatiques détectées varient entre 0 et 800 ng/mL environ. Les diastéréoisomères formés, dont les molécules sont encombrées dans l'espace, risquent d'avoir des propriétés physico-chimiques suffisamment différentes pour qu'on puisse les séparer sur colonne non polaire. C'est en partie ce qui explique le choix de cette méthode. De plus, il nous semble qu'aucun auteur n'ait réussi à séparer le témazépam sur colonne non polaire après formation de dérivés.

Cependant, il faut noter que les énantiomères du témazépam ne sont pas disponibles sur le marché, par conséquent nous avons dû au préalable valider la méthode d'analyse pour le témazépam racémique dans le plasma avant de mettre au point une méthode de séparation de ses énantiomères.

Mise au point d'une méthode analytique plasmatique du témazépam racémique

L'objectif premier était de développer une méthode analytique appropriée pour le témazépam dans le plasma humain. Cette méthode de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été validée dans ce laboratoire. Les résultats concernant la spécificité, la stabilité, la limite de détection, le recouvrement, l'exactitude et la précision y sont présentés. Cet objectif atteint, il nous est possible d'envisager un second volet à notre recherche, à savoir, l'analyse énantiomérique du témazépam.

Méthode analytique

Matériel

Un échantillon de poudre pure a été généreusement octroyé par la compagnie Sandoz. Le méthanol (GD-5730) et l'acétonitrile (GD-0158) de qualité HPLC ont été achetés chez Anachemia. L'acide phosphorique 85% (A260-500) pour HPLC a été commandé chez Fisher Scientific. Tous les autres solvants et réactifs utilisés étaient de qualité analytique. L'eau distillée déionisée (système de purification de l'eau Milli-Q®, Millipore, Maine, Etats-Unis) a été utilisée tout au long de l'étude. Enfin, du plasma humain contrôlé a été obtenu de la Croix-Rouge canadienne.

Préparation des solutions

i) Témazépam

Une solution-stock de témazépam à 10mg% a été préparée en dissolvant le témazépam dans 2 mL de méthanol avant de compléter au titre avec de l'acétonitrile. Les dilutions subséquentes ont été effectuées dans l'acétonitrile. Les solutions sont conservées au réfrigérateur à 4°C.

i) Diazépam

Une solution-stock de l'étalon interne, le diazépam, à 10 mg% a été préparée en dissolvant la poudre dans de l'acétonitrile. Pour la conservation, la solution était mise au réfrigérateur à 4°C.

iii) Tampon borate à 0,06 M

Pour préparer ce tampon, on a pesé 1,8549 g d'acide borique U.S.P. dans 500mL d'eau de qualité HPLC dont on a ajusté le pH à 9,75 à l'aide d'hydroxyde de sodium (NaOH) 10 N.

Extraction du Témazépam à partir du plasma humain

L'extraction plasmatique du témazépam a été effectuée de la façon suivante; dans des tubes vissés en verre de 15mL , on place 1mL de plasma, 100µL de diazépam à 0,1mg% (100ng) suivi de 0,5mL de tampon borate à 0,06M à pH 9,75. Ensuite, les tubes étaient mélangés quelques secondes au vortex. Par la suite, 5mL du mélange d'hexane:acétate d'éthyle dans un rapport de 7:3 ont été ajoutés. Après l'addition des solvants d'extraction, une agitation lente de 10 minutes et une centrifugation de 10 minutes à environ 2500g ont suivi. On prélève la phase organique, on évapore à sec à une température voisine de 37°C sous azote. Enfin, le culot sec est repris avec 200µL de phase mobile et on injecte 50µL dans le système HPLC.

Appareils

Un système HPLC de Hewlett Packard, modèle #1050 a été utilisé au cours de l'étude. Ce système est muni d'un injecteur automatique ainsi que d'un détecteur UV/Visible à longueur d'ondes variables. La longueur d'onde choisie pour effectuer cette étude a été de 238nm. L'intégration des pics est faite avec un appareil Shimadzu modèle #C-R6A Chromatopac.

Conditions chromatographiques

Les échantillons plasmatiques ont été traités de la façon décrite ci-dessus et ont été analysés par chromatographie HPLC en utilisant une colonne Nucleosil 5C18 de 15cm #53798. Les composés d'intérêt, à savoir, le témazépam et le diazépam sont élués sur la colonne avec une phase mobile constituée d'acétonitrile (48%), d'acide phosphorique (0,1%) et d'eau distillée *qs ad* 1L. Le pH de la phase mobile est ajusté à 4,72, à l'aide du NaOH 10N. Le débit de la phase mobile a été ajusté à 1mL par minute et tout le processus d'élution avait lieu à la température de la pièce. Avec ces conditions chromatographiques, les temps de rétention du témazépam et du diazépam ont été de 5,26 et 8,52 minutes respectivement.

Résultats

Courbes de calibration

Les échantillons plasmatiques standards ont été préparés avec des concentrations croissantes de témazépam. Pour chaque mL d'échantillon plasmatique, on a ajouté 100ng de diazépam (100 μ L d'une solution à 0,1mg%). Les ratios des hauteurs des pics de témazépam par rapport à ceux du diazépam ont été rapportés dans des tableaux et des graphiques en fonction de la concentration plasmatique du témazépam correspondante. La linéarité des courbes de calibration a été déterminée par une analyse de régression linéaire. Les coefficients de détermination (r^2) varient de 0,9957 à 0,9973. On peut voir à la Figure 9, une courbe de calibration typique du témazépam extrait.

Reproductibilité et sensibilité

La précision et l'exactitude inter-jour ont été déterminées à partir **d'échantillons de contrôle de la qualité(QC)** contenant trois concentrations connues de témazépam, à savoir 10, 150 et 800 ng/mL. Au total, 11 QC de chaque concentration ont été injectés au cours de cinq journées (Tableau 2). Les concentrations des QC ont été déterminées à l'aide des courbes de calibration de la journée où ils ont été injectés. La précision est exprimée par le **coefficient de variation (C.V.%)** tandis que l'exactitude a été mesurée en pourcentage de la valeur théorique obtenue de la façon suivante:

Pourcentage de la valeur théorique, ou % de la valeur nominale = $(X/C_T) \times 100$

où: **X** = concentration moyenne retrouvée, ou déterminée grâce à la courbe de calibration, pour l'ensemble des QC

C_T = concentration théorique des QC

Les coefficients de variation et les % de la valeur nominale sont présentés dans le Tableau 2. On peut constater que les C.V% oscillent entre 3,14% et 4,4%. Le pourcentage de la valeur théorique obtenu pour le petit, le moyen et le grand QC sont respectivement de 101,0%, 96,0% et 100,1%.

La précision et l'exactitude intra-jour ont été déterminés de façon semblable. En effet, 4 QC de chaque concentration (10,150,800 ng/mL) ont été testés sur la même courbe au cours de la journée du 10 mars 95. Les concentrations retrouvées à partir des QC ont toutes été calculées à partir de la même courbe qui s'échelonnait de 5 à 850ng/mL (Tableau 3). Les coefficients de variation varient entre 2,1 et 8,3% tandis que les % de la valeur nominale sont de 103,0%, 97,5% et 103,6% pour les QC de 10, 150 et 800ng/mL respectivement.

Dans nos conditions, la limite de quantification s'est avérée être de 5ng/mL (Figure 10). Ainsi, nous avons pu établir que la précision et l'exactitude étaient suffisantes pour les besoins de notre étude.

Recherche des substances interférentes

La Figure 11 représente un chromatogramme où on a injecté des solutions-stock de témazépam et de diazépam. Leur temps de rétention respectif sont de 5,2 et de 8,4 minutes. La Figure 12 représente un chromatogramme d'un blanc de plasma humain extrait où on peut voir qu'il y a absence de pics aux temps d'élution du témazépam et du diazépam. Tous les autres pics élués sont étrangers et présents dans tous les extraits plasmatiques.

Recouvrement observé du témazépam et du diazépam à partir du plasma humain

Le recouvrement du témazépam à partir du plasma a été évalué en comparant les hauteurs des pics du témazépam extrait aux pics non extraits de témazépam de la même concentration. On a procédé de la même façon pour le diazépam. Les concentrations de témazépam qui ont été testées sont les suivantes: 10, 150 et 800ng/mL. Un chromatogramme type pour chacune des concentrations des échantillons du contrôle de la qualité est représenté par les figures suivantes: Figure 13, Figure 14, Figure 15 et le recouvrement moyen s'échelonne entre 89,3 et 101,0% (Tableau 4). Pour le diazépam, on a testé 9 fois une concentration de 25ng/50 μ L et le recouvrement moyen se situe à 99,6% (Tableau 5).

Stabilité à court terme dans le plasma humain

La stabilité à court terme (Tableau 6) du témazépam a été évaluée à l'aide de 9 échantillons à 3 concentrations différentes: 10, 150 et 800 ng/mL. Ces échantillons plasmatiques ont été extraits après avoir séjourné pendant 5 heures à température pièce ($22 \pm 4^\circ\text{C}$). Ensuite, on a comparé ces échantillons à des échantillons de contrôle de la qualité (QC) fraîchement dégelés, extraits et injectés. Pour calculer les concentrations retrouvées de témazépam, on s'est servi de la courbe de calibration #1. Les concentrations de témazépam retrouvées dans le plasma après cinq heures sont au moins de 92,5% de la valeur attendue et les coefficients de variations sur les concentrations sont au plus à 5,13%. Ainsi, le témazépam est stable au moins cinq heures dans le plasma.

Stabilité du témazépam et du diazépam extraits placés dans l'auto-injecteur

La stabilité du témazépam et du diazépam extraits a été évaluée en laissant les échantillons extraits dans l'auto-injecteur pour une période de 12 et 24 heures à température pièce ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Les QC de 10, 150 et 800 ng/mL de témazépam ont été testés. Il est à noter que nous avons aussi testé la stabilité du diazépam (étalon interne) qui se retrouve dans les échantillons plasmatiques extraits de contrôle de la qualité (QC). Pour le diazépam, une concentration de 25ng/50 μL a été testée. Pour établir ces stabilités, on a procédé en deux étapes. Premièrement, on a injecté 9 QC au temps 0, et on les a réinjectés 12 heures plus tard (Tableau 7). Les quantités retrouvées en témazépam ont été calculées en utilisant la courbe de calibration #1. En ce qui a trait au diazépam, on a mesuré les différences des hauteurs des pics entre le temps 0 et le temps 12 heures. Deuxièmement, on a injecté 9 autres QC au temps 0 et on les a ré-injectés 24 heures plus tard (Tableau 8). Au temps 0, les concentrations de témazépam retrouvées ont été calculées en utilisant la courbe de calibration #4, tandis que 24 heures plus tard on s'est servi de la courbe de calibration #5 pour les évaluer. En ce qui concerne le diazépam, ici aussi, on a comparé les différences des hauteurs de ses pics entre le temps 0 et 24 heures.

Stabilité 12 heures (Tableau 7)

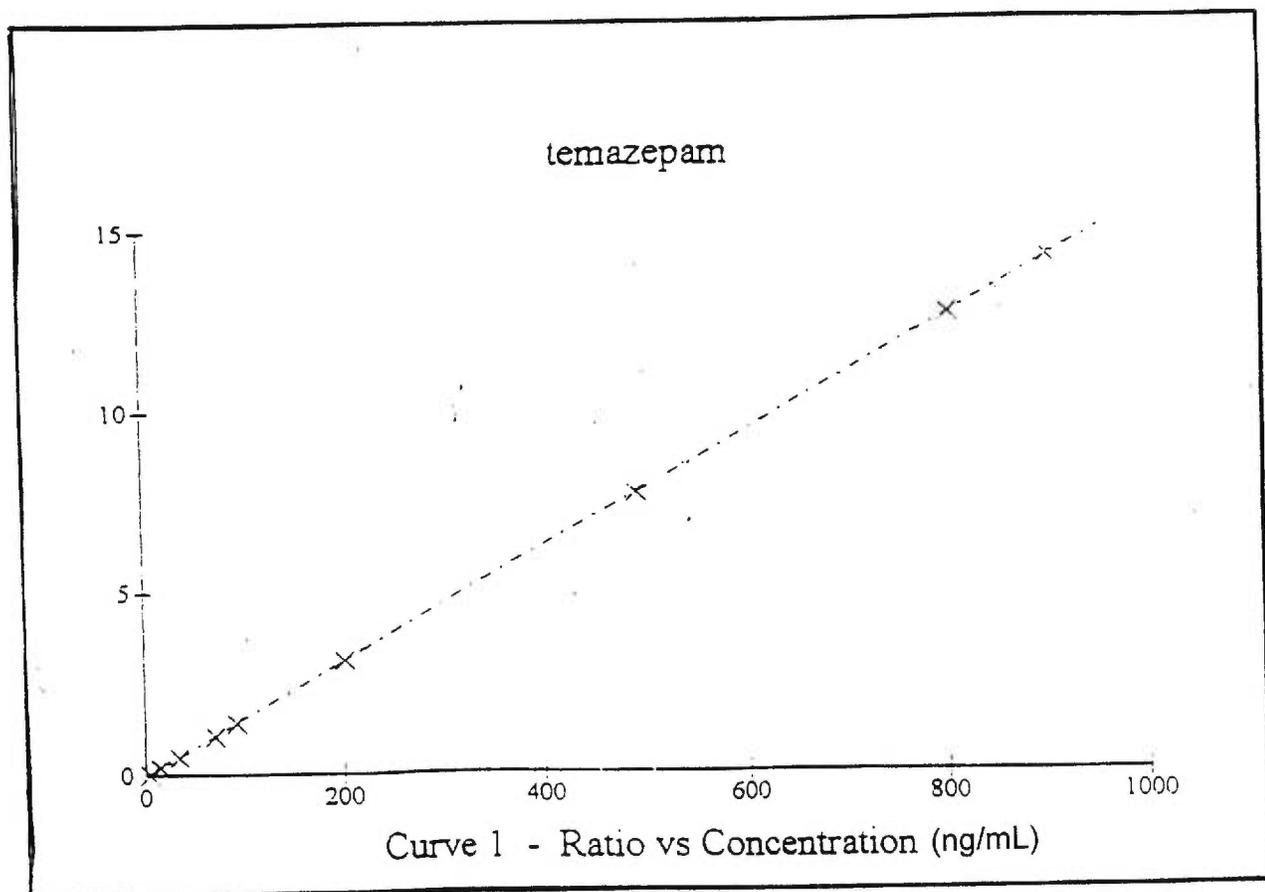
Comme on peut le constater dans le Tableau 7, les différences, en pourcentage, dans les hauteurs des pics du témazépam sont de (-7,67%), (-0,29%) et de (+2,73%) pour les QC de 10,150 et 800ng/mL respectivement. Quant au diazépam, les différences sont de (+2,84%), (-1,00%) et (0,47%) pour les concentrations de diazépam qui se trouvent dans les QC de 10,150 et 800ng/mL respectivement. Soulignons ici aussi, que la concentration en diazépam dans les QC est de 25ng/50 μ L. Ainsi, les extraits plasmatiques sont stables à l'injecteur au moins 12 heures.

Stabilité 24 heures (Tableau 8)

Comme on peut le constater dans le Tableau 8, les différences, en pourcentage, dans les hauteurs des pics du témazépam sont de (-8,89%), (-1,07%) et de (-4,45%) pour les QC de 10,150 et 800ng/mL respectivement. Quant au diazépam, les différences sont de (-1,3%), (-2,99%) et (-3,13%) pour les concentrations de diazépam qui se trouvent dans les QC de 10,150 et 800ng/mL respectivement. Soulignons ici aussi, que la concentration en diazépam dans les QC est de 25ng/50 μ L. Ainsi, les extraits plasmatiques sont stables à l'injecteur au moins 24 heures.

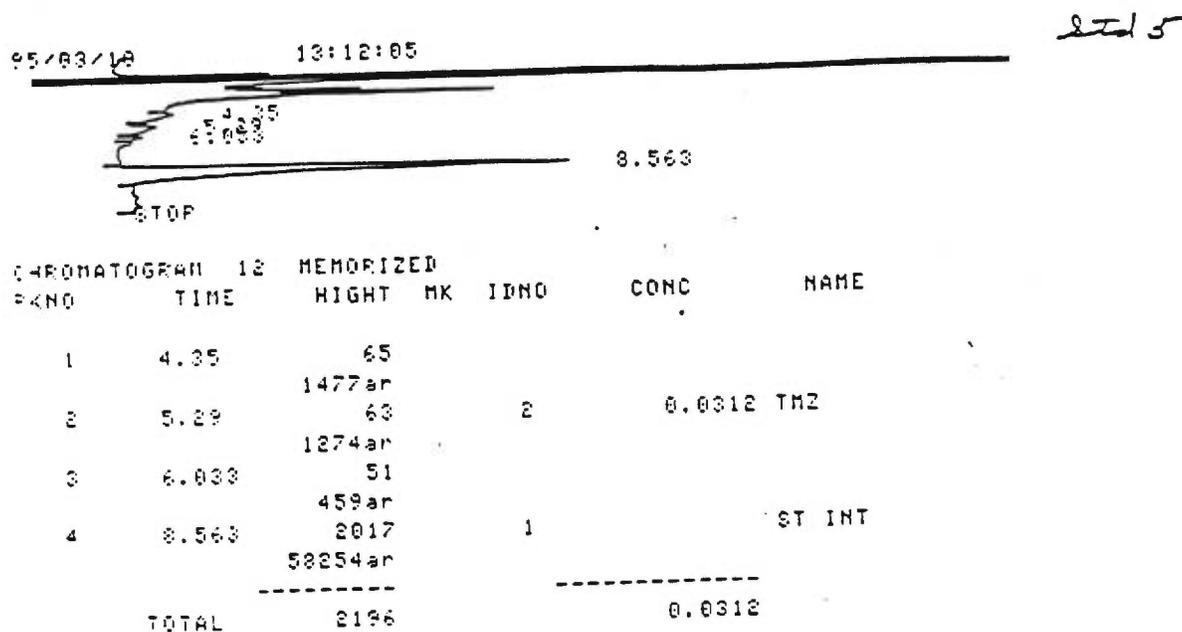
Stabilité du témazépam au gel-dégel dans le plasma humain (Tableau 9)

La stabilité au gel-dégel implique l'analyse d'échantillons semblables; dégelés une, deux et trois fois en comparaison avec des échantillons fraîchement préparés. Les concentrations retenues pour l'expérience sont de 10, 150 et 800ng/mL; ces concentrations correspondent aux QC. Les concentrations des QC sont déterminées à partir d'une courbe fraîche injectée le jour de l'expérience. Après trois dégels, on retrouve au moins 90,7% de la concentration attendue en TMZ et pour l'ensemble des échantillons étudiés, les coefficients de variation sont au plus à 8,59%. Ainsi, avec des concentrations retrouvées d'au moins 90% et avec des coefficients de variation inférieurs à 10%, nous concluons le témazépam est stable aux gels et aux dégels au moins trois fois.



Peak Height Ratio = $0.015750 \times \text{Concentration} - 0.046056$
Correlation Coefficient = 0.9973

Figure 9: Courbe de calibration type du temazepam dans le plasma

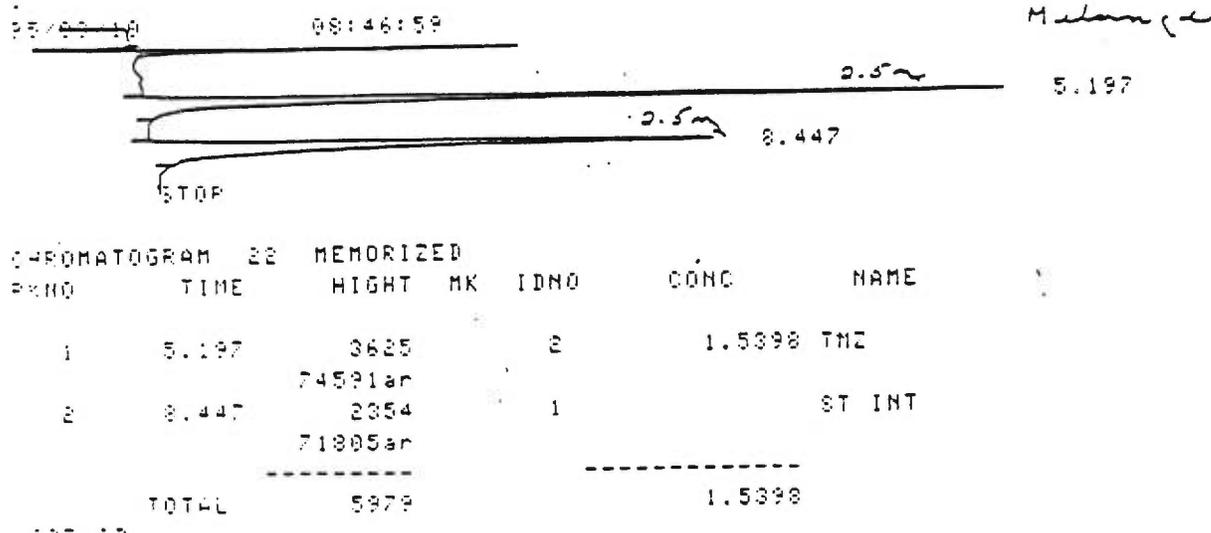


Chromatogramme de la courbe #1

Les temps de rétention sont de 5,29 et de 8,56min
pour le temazepam et le diazepam(std interne) respectivement

Les autres pics élués sont étrangers

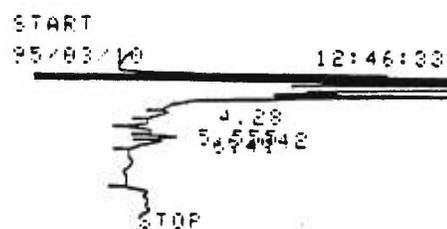
Figure 10: Chromatogramme d'un échantillon extrait de temazepam à la limite de quantification inférieure: 5 ng/mL



Les temps de rétention sont de 5,197 et de 8,44min
pour le temazepam et le diazepam respectivement

Les autres pics élués sont étrangers

Figure 11: Chromatogramme représentant une injection des solutions-stock du temazepam et du diazepam (étalon interne)



B L

CHROMATOGRAM 10 MEMORIZED
19 PEAK NOT FOUND

A partir de la courbe #1

Tous les pics élués à des temps de rétention autres que
 ≈ 5.2 et ≈ 8.4 min. sont étrangers et sont présents dans
tous les échantillons plasmatiques

Figure 12: Chromatogramme type d'un blanc de plasma extrait

95/03/10

11:55:30

QC 10

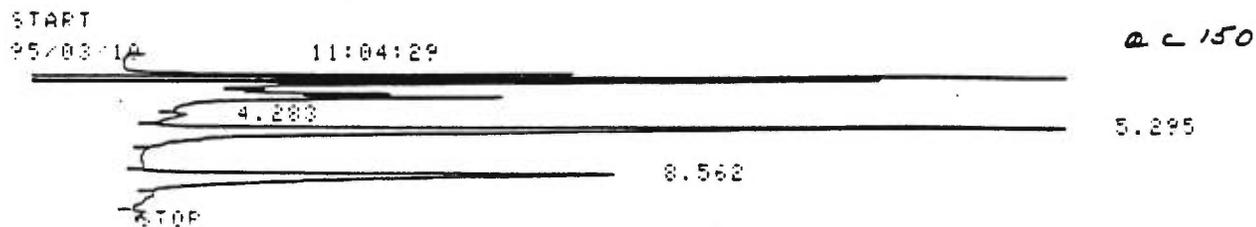


| CHROMATOGRAM PKNO | 6 TIME | MEMORIZED HIGHT | MK | IDNO | CONC | NAME |
|----------------------|-----------|--------------------|----|------|--------|--------|
| 1 | 5.282 | 273 | | 2 | 0.1261 | TMZ |
| | | 6338ar | | | | |
| 2 | 6.048 | 82 | V | | | |
| | | 1456ar | | | | |
| 3 | 6.423 | 56 | V | | | |
| | | 862ar | | | | |
| 4 | 8.567 | 2168 | | 1 | | ST INT |
| | | 6338ar | | | | |
| TOTAL | | 2579 | | | 0.1261 | |

A partir de la courbe #1

Les temps de rétention sont de 5,283 et 8,563min
pour le temazepam et le diazepam(std interne) respectivement

Figure 13: Chromatogramme type d'un échantillon de contrôle de la qualité à 10 ng/mL

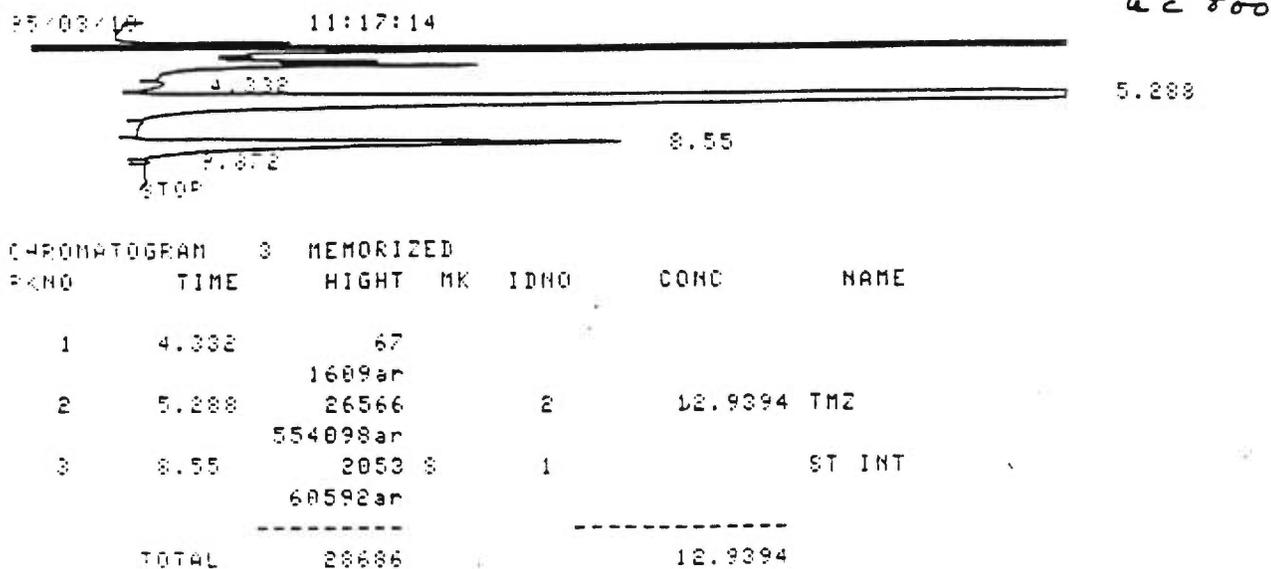


| CHROMATOGRAM | 2 | MEMORIZED | | | | |
|--------------|-------|-----------|----|------|--------|--------|
| RKNO | TIME | HIGHT | MK | IDNO | CONC | NAME |
| 1 | 4.283 | 78 | | | | |
| | | 1610ar | | | | |
| 2 | 5.295 | 4582 | | 2 | 2.2889 | TMZ |
| | | 96556ar | | | | |
| 3 | 8.562 | 2002 | | 1 | | ST INT |
| | | 58485ar | | | | |
| TOTAL | | 6662 | | | 2.2889 | |

A partir de la courbe #1

Les temps de rétention sont de 5,295 et de 8,562min pour le temazepam et le diazepam(std interne) respectivement

Figure 14: Chromatogramme type d'un échantillon de contrôle de la qualité à 150 ng/mL



A partir de la courbe#1

Les temps de rétention sont de 5,288 et de 8,55min pour le
temazepam et le diazepam(std interne) respectivement

Figure 15: Chromatogramme type d'un échantillon de contrôle de la qualité à 800 ng/mL

Tableau 1: Résumé des paramètres des courbes. Précision et exactitude inter-courbe et concentrations de témazépam retrouvées à partir de la courbe de calibration de la journée dans le plasma humain

| Numéro de la courbe et date d'injection | Echantillons de contrôle de la qualité (ng/mL) | | | | | | Concentrations Standards (ng/mL) | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--|--------|--------|--------|-------|-------|----------------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|---|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | 10 | 150 | 800 | 5 | 15 | 35 | 75 | 100 | 200 | 500 | 750 | 850 | 5 | 15 | 35 | 75 | 100 | 200 | 500 | 750 | 850 | |
| 1 03/10/95 | 10,92 | 148,25 | 824,42 | 5,02 | 15,24 | 34,29 | 70,73 | 93,14 | 201,90 | 491,29 | 804,04 | 902,45 | | | | | | | | | | |
| | 10,10 | 146,54 | 845,25 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 10,33 | 143,05 | 801,45 | | 15,46 | 33,63 | 70,78 | 95,77 | 205,66 | 501,16 | 776,26 | 885,14 | | | | | | | | | | |
| | 9,65 | 142,58 | 822,93 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 03/14/95 | 9,86 | 145,01 | 834,21 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 9,77 | 137,13 | 787,75 | 5,14 | 13,96 | 34,13 | 73,05 | 93,22 | 225,20 | 516,93 | 755,62 | 843,51 | | | | | | | | | | |
| 03/15/95 | 10,01 | 140,89 | 803,73 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 9,97 | 138,73 | 781,00 | 5,10 | 14,26 | 34,29 | 72,77 | 96,08 | 221,62 | 517,67 | 739,81 | 840,01 | | | | | | | | | | |
| 03/16/95 | 10,41 | 141,51 | 816,57 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 10,69 | 150,73 | 738,24 | 5,00 | 15,70 | 32,08 | 69,06 | 98,86 | 213,37 | 530,56 | 739,23 | 861,90 | | | | | | | | | | |
| 03/17/95 | 9,45 | 150,30 | 752,22 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 9 | 9 | 9 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | | | | | | | | | | |
| Moyenne | 10,10 | 144,07 | 800,71 | 5,07 | 14,92 | 33,68 | 71,28 | 94,81 | 213,55 | 511,52 | 762,99 | 866,60 | | | | | | | | | | |
| Dév. standard | 0,45 | 4,52 | 33,52 | 0,07 | 0,77 | 0,94 | 1,65 | 2,53 | 9,99 | 15,38 | 27,47 | 26,89 | | | | | | | | | | |
| C.V. (%) | 4,40 | 3,14 | 4,19 | 1,30 | 5,15 | 2,79 | 2,31 | 2,67 | 4,68 | 3,00 | 3,60 | 3,10 | | | | | | | | | | |
| Nom. (%) | 101,00 | 96,00 | 100,10 | 101,40 | 99,50 | 96,20 | 95,00 | 94,80 | 106,80 | 102,30 | 101,70 | 102,00 | | | | | | | | | | |

Equation de régression: $y = m(x) + b$
avec correction pour carrés moyens

Résumé des paramètres des courbes

| Courbe(date) | r ² | m | b |
|--------------|----------------|----------|--------------|
| 03/10/95 | 0,9973 | 0,015750 | (-0,046056) |
| 03/14/95 | 0,9978 | 0,014805 | (-0,020912) |
| 03/15/95 | 0,9957 | 0,016214 | (-0,031360) |
| 03/16/95 | 0,9972 | 0,015828 | (-0,0,36749) |
| 03/17/95 | 0,9964 | 0,016173 | (-0,041868) |

Tableau 3: Résumés des paramètres de la courbe 1. Précision et exactitude intra-courbe à partir des concentrations de témazépam retrouvées grâce à la courbe de calibration dans le plasma humain

| No de la courbe et date | Echantillons de contrôle de la qualité (ng/mL) | | | | | | Concentrations standards (ng/mL) | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|--|--------|--------|------|-------|-------|----------------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--|
| | 10 | 150 | 800 | 5 | 15 | 35 | 75 | 100 | 200 | 500 | 750 | 850 | 5.02 | 15.24 | 34.29 | 70.73 | 93.14 | 201.90 | 491.29 | 804.04 | 902.45 | |
| 1 | 11.62 | 148.25 | 824.42 | 5.02 | 15.24 | 34.29 | 70.73 | 93.14 | 201.90 | 491.29 | 804.04 | 902.45 | 5.02 | 15.24 | 34.29 | 70.73 | 93.14 | 201.90 | 491.29 | 804.04 | 902.45 | |
| 95/03/10 | 10.92 | 146.54 | 845.25 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 10.10 | 142.09 | 846.90 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 9.21 | 143.56 | 814.20 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 9.72 | 146.60 | 792.30 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 10.23 | 150.60 | 849.12 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| n | 6 | 6 | 6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Moyenne | 10.30 | 146.27 | 828.69 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| dév. std (%) | 0.86 | 3.09 | 22.70 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C.V. (%) | 8.3 | 2.1 | 2.7 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Nom. (%) | 103 | 97.5 | 103.6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Equation de régression: $y = m(x) + b$

Résumé des paramètres de la courbe 1

| | | | |
|----------|--------|---------|-------------|
| date | r2 | m | b |
| 03/10/95 | 0.9973 | 0.01575 | (-0,046056) |

Tableau 4: Recouvrement observé du témazépam à partir du plasma humain

| | Concentration (ng/mL) | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|-----------------------|---------|--|-------------|---------|--|-------------|---------|--|-------------|---------|--|
| | 10 | | | 150 | | | 800 | | | 800 | | |
| | Non extrait | Extrait | | Non extrait | Extrait | | Non extrait | Extrait | | Non extrait | Extrait | |
| Hauteur du pic | 309 | 304 | | 4901 | 4533 | | 28280 | 4533 | | 28280 | 23348 | |
| | 306 | 289 | | 4862 | 4631 | | 28857 | 4631 | | 28857 | 29065 | |
| | 279 | 310 | | 4845 | 5018 | | 27786 | 5018 | | 27786 | 23582 | |
| n | 3 | 3 | | 3 | 3 | | 3 | 3 | | 3 | 3 | |
| Moyenne | 298 | 301 | | 4869 | 4727 | | 28374 | 4727 | | 28374 | 25332 | |
| dév. std | 16.5 | 10.8 | | 28.7 | 256.5 | | 443.1 | 256.5 | | 443.1 | 3235.3 | |
| C.V.(%) | 5.5 | 3.6 | | 0.6 | 5.4 | | 1.6 | 5.4 | | 1.6 | 12.8 | |
| Recouvrement moyen(%) | | 101 | | | 97.1 | | | 97.1 | | | 89.3 | |

Tableau 5: Recouvrement observé du diazépam (étalon interne) à partir du plasma humain

| | Concentration de diazépam 25ng/50uL | | Recouvrement (%) |
|----------------------|--|---------|---------------------|
| | Non-Extrait | Extrait | |
| Hauteur du pic | 2130 | 1908 | 89,6 |
| | 2118 | 2065 | 97,5 |
| | 2138 | 2099 | 98,2 |
| | 2227 | 2065 | 92,7 |
| | 2218 | 2211 | 99,7 |
| | 2217 | 2214 | 99,9 |
| | 2033 | 2100 | 103,3 |
| | 2129 | 2534 | 119,0 |
| | 2048 | 1980 | 96,7 |
| n | 9 | 9 | 9 |
| Moyenne | 2139,8 | 2130,7 | 99,6 |
| Dév. Std. | 70,89 | 179,90 | 8,31 |
| C.V. (%) | 3,3 | 8,4 | 8,3 |

Tableau 6: Stabilité à court terme du Témazépam dans le plasma pour 5 heures à 22+/-4C

| Echantillons-contrôle lus sur la courbe No 1 pour 0 heure pour 5 heures | Concentration en témazépam | | | | | |
|---|--------------------------------|----------|--------------------------------|----------|--------------------------------|----------|
| | 10 ng/mL | | 150 ng/mL | | 800ng/mL | |
| | Temps laissé dans le plasma | | Temps laissé dans le plasma | | Temps laissé dans le plasma | |
| | 0 heure | 5 heures | 0 heure | 5 heures | 0 heure | 5 heures |
| Hauteur du pic de Témazépam | 279 | 224 | 4582 | 4757 | 26,566 | 26,532 |
| | 273 | 200 | 4302 | 4779 | 26,459 | 26,263 |
| | 230 | 206 | 4370 | 4495 | 25,863 | 25,010 |
| n | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Moyenne | 260,7 | 210 | 4418 | 4677 | 26,296 | 25,935 |
| Dév. std | 26,73 | 12,49 | 146,0 | 158 | 378,79 | 812,29 |
| C.V. (%) | 10,3 | 5,95 | 3,3 | 3,38 | 1,4 | 3,13 |
| Diff. (%) | | (-16,9) | | (+5,86) | | (-1,37) |

| Echantillons-contrôle lus sur la courbe : No 1 pour 0 heure et pour 5 heures | Concentration en témazépam | | | | | |
|--|--------------------------------|----------|--------------------------------|----------|--------------------------------|----------|
| | 10 ng/mL | | 150 ng/mL | | 800ng/mL | |
| | Temps laissé dans le plasma | | Temps laissé dans le plasma | | Temps laissé dans le plasma | |
| | 0 heure | 5 heures | 0 heure | 5 heures | 0 heure | 5 heures |
| Concentration retrouvée en témazépam(ng/mL) | 10,92 | 9,46 | 148,25 | 134,44 | 824,42 | 745,89 |
| | 10,10 | 9,08 | 146,54 | 142,29 | 845,25 | 815,60 |
| | 9,21 | 9,21 | 142,09 | 140,06 | 846,90 | 817,19 |
| n | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Moyenne | 10,08 | 9,25 | 145,63 | 138,93 | 838,86 | 792,89 |
| Dév. std | 0,86 | 0,19 | 3,18 | 4,05 | 12,53 | 40,71 |
| C.V. (%) | 8,53 | 2,05 | 2,18 | 2,92 | 1,49 | 5,13 |
| Nom. (%) | 100,08 | 92,5 | 97,09 | 92,62 | 104,86 | 99,11 |

| Echantillons-contrôle lus sur la courbe No 1 | Hauteur du pic de diazépam à 25ng/50uL temps laissé dans le plasma | |
|--|---|----------|
| | 0 heure | 5 heures |
| | QC 10ng/mL | 2042 |
| 2168 | | 2067 |
| 2031 | | 2086 |
| QC 150ng/mL | 2002 | 2262 |
| | 1902 | 2177 |
| | 1994 | 2081 |
| QC 800ng/mL | 2053 | 2267 |
| | 1994 | 2052 |
| | 1946 | 1950 |
| n | 9 | 9 |
| Moyenne | 2014,7 | 2123,7 |
| Dév. std | 74,51 | 103,99 |
| C.V. (%) | 3,7 | 4,9 |
| Diff. (%) | | (+5,41) |

Equation de régression: $y = m(x) + b$
avec correction pour carrés moyens

Résumé des paramètres de la courbe #1

| | | | |
|------------|----------------|--------|-------------|
| date | r ² | m | b |
| 1995/03/10 | 0,9973 | 0,1575 | (-0,046056) |

**Tableau 7: Stabilité du témazépam et du diazépam extraits
laissés 12 heures dans l'injecteur automatique à 22+/-2C**

| Echantillons-contrôle lus sur la courbe No 1 pour 0 heure et pour 12 heures | 10 ng/mL | | 150 ng/mL | | 800ng/mL | |
|--|---------------------------------------|-----------|---------------------------------------|-----------|---------------------------------------|-----------|
| | Temps laissé dans l'auto-injecteur | | Temps laissé dans l'auto-injecteur | | Temps laissé dans l'auto-injecteur | |
| | 0 heure | 12 heures | 0 heure | 12 heures | 0 heure | 12 heures |
| Hauteur du pic de Témazépam | 279 | 230 | 4582 | 4472 | 26566 | 27450 |
| | 273 | 290 | 4302 | 4392 | 26459 | 27193 |
| | 230 | 202 | 4370 | 4352 | 25863 | 26406 |
| n | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Moyenne | 260,7 | 240,7 | 4418 | 4405 | 26296 | 27 016,3 |
| Dév. std | 26,73 | 45,0 | 146,0 | 61,10 | 378,79 | 543,96 |
| C.V. (%) | 10,3 | 18,7 | 3,3 | 1,4 | 1,4 | 2,0 |
| Diff. (%) | | (-7,67) | | (-0,29) | | 2,73 |

| Echantillons-contrôle lus sur la courbe : No 1 pour 0 heure et pour 12 heures | 10 ng/mL | | 150 ng/mL | | 800ng/mL | |
|--|---------------------------------------|-----------|---------------------------------------|-----------|---------------------------------------|-----------|
| | Temps laissé dans l'auto-injecteur | | Temps laissé dans l'auto-injecteur | | Temps laissé dans l'auto-injecteur | |
| | 0 heure | 12 heures | 0 heure | 12 heures | 0 heure | 12 heures |
| Concentrations retrouvées en témazépam (ng/mL) | 11,62 | 10,04 | 148,25 | 148,63 | 824,42 | 843,54 |
| | 10,92 | 10,86 | 146,54 | 149,78 | 845,25 | 866,07 |
| | 10,10 | 9,21 | 142,09 | 141,71 | 846,90 | 863,79 |
| n | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Moyenne | 10,88 | 10,04 | 145,63 | 146,71 | 838,86 | 857,80 |
| Dév. std | 0,76 | 0,83 | 3,18 | 4,37 | 12,53 | 12,4 |
| C.V. (%) | 3,66 | 4,18 | 1,49 | 2,29 | 2,34 | 3,16 |
| Nom. (%) | | 100,4 | | 97,8 | | 107,2 |

| Echantillons-contrôle lus sur la courbe No 1 pour 0 heure et pour 12 heures | Hauteur du pic de diazépam à 25ng/mL | |
|--|---|-----------|
| | Temps laissé dans l'auto-injecteur | |
| | 0 heure | 12 heures |
| QC 10ng/mL | 2042 | 2055 |
| | 2168 | 2327 |
| | 2031 | 2036 |
| QC 150ng/mL | 2002 | 1949 |
| | 1902 | 1899 |
| | 1994 | 1991 |
| QC 800ng/mL | 2053 | 2073 |
| | 1994 | 2000 |
| | 1946 | 1948 |
| n | 9 | 9 |
| Moyenne | 2014,67 | 2030,89 |
| Dév. std | 74,51 | 124,29 |
| C.V. (%) | 3,7 | 6,12 |
| Diff. (%) | | (+0,81) |

Equation de régression: $y = m(x) + b$
avec correction des carrés moyens

Résumé des paramètres de la courbe No 1

| | | | |
|----------|----------------|----------|-------------|
| Date | r ² | m | b |
| 03/10/95 | 0,9973 | 0,015750 | (-0,046046) |

**Tableau 8: Stabilité du témazépam et du diazépam extraits
laissés 24 heures dans l'injecteur automatique à 22 +/- 2 C**

| Echantillons-contrôle lus sur les courbes: No 4 pour 0 heure No 5 pour 24 heures | 10 ng/mL | | 150 ng/mL | | 800ng/mL | |
|---|---------------------------------------|-----------|---------------------------------------|-----------|---------------------------------------|-----------|
| | Temps laissé dans l'auto-injecteur | | Temps laissé dans l'auto-injecteur | | Temps laissé dans l'auto-injecteur | |
| | 0 heure | 24 heures | 0 heure | 24 heures | 0 heure | 24 heures |
| Hauteur du pic de Témazépam | 240 | 231 | 4353 | 4249 | 24575 | 24173 |
| | 272 | 249 | 4510 | 4442 | 25681 | 25391 |
| | 264 | 227 | 4269 | 4270 | 27184 | 24429 |
| n | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Moyenne | 258,7 | 235,7 | 4377,3 | 4330,3 | 25813,3 | 24664,3 |
| Dév. std | 16,65 | 11,72 | 122,3 | 123,14 | 1309,52 | 642,20 |
| C.V. (%) | 6,4 | 5,0 | 2,8 | 2,8 | 5,1 | 2,6 |
| Diff.(%) | | (-8,9) | | (-1,07) | | (-4,45) |

| Echantillons-contrôle lus sur les courbes: No 4 pour 0 heure No 5 pour 24 heures | 10 ng/mL | | 150 ng/mL | | 800ng/mL | |
|---|---------------------------------------|-----------|---------------------------------------|-----------|---------------------------------------|-----------|
| | Temps laissé dans l'auto-injecteur | | Temps laissé dans l'auto-injecteur | | Temps laissé dans l'auto-injecteur | |
| | 0 heure | 24 heures | 0 heure | 24 heures | 0 heure | 24 heures |
| Concentrations retrouvées en témazépam(ng/mL) | 9,97 | 9,70 | 138,73 | 139,42 | 781,00 | 756,36 |
| | 10,41 | 10,26 | 141,51 | 141,83 | 816,57 | 796,18 |
| | 10,72 | 9,45 | 137,46 | 135,52 | 789,28 | 752,15 |
| n | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Moyenne | 10,37 | 9,80 | 139,23 | 138,92 | 795,62 | 768,23 |
| Dév. std | 0,38 | 0,41 | 2,07 | 3,18 | 18,61 | 24,30 |
| C.V. (%) | | | | | | |
| Nom .(%) | | 98,0 | | 92,6 | | 96,0 |

| Echantillons-contrôle lus sur les courbes: No 4 pour 0 heure No 5 pour 24 heures | Hauteur du pic de diazépam à 25ng/50uL | |
|---|---|-----------|
| | Temps laissé dans l'auto-injecteur | |
| | 0 heure | 24 heures |
| QC 10 ng/mL | 1990 | 2005 |
| | 2119 | 2017 |
| | 1986 | 2041 |
| QC 150ng/mL | 2017 | 1920 |
| | 2047 | 1973 |
| | 1996 | 1986 |
| QC 800ng/mL | 1994 | 1983 |
| | 1993 | 1978 |
| | 2182 | 2015 |
| n | 9 | 9 |
| Moyenne | 2036,00 | 1991,89 |
| Dév.std | 69,39 | 34,59 |
| Diff (%) | | (-2,16) |

Equation de régression: $y = m(x) + b$
avec correction des carrés moyens

| Courbe et date | r2 | m | b |
|----------------|--------|----------|-------------|
| No 4: 95/03/16 | 0,9972 | 0,015828 | (-0,036749) |
| No 5: 95/03/17 | 0,9964 | 0,016173 | (-0,041868) |

Tableau 9: Stabilité au gel et au dégel du témazépam dans le plasma humain

| Echantillons testés: QC 10ng/mL | QC frais | QC dégelés 1 fois | QC dégelés 2 fois | QC dégelés 3 fois |
|--------------------------------------|----------|-------------------|-------------------|-------------------|
| QC lus sur courbe fraîche du | 95/03/10 | 95/03/14 | 95/03/14 | 95/03/17 |
| Concentration retrouvée en témazépam | 9,21 | 10,33 | 9,92 | 10,01 |
| | 9,91 | 9,65 | 9,31 | 10,01 |
| | 10,92 | 9,86 | 10,60 | 9,51 |
| n | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Moyenne | 10,01 | 9,94 | 9,94 | 9,84 |
| dév. std | 0,86 | 0,35 | 0,65 | 0,29 |
| C.V. (%) | 8,59 | 3,52 | 6,54 | 2,95 |
| Nom. (%) | 100,01 | 99,4 | 99,4 | 98,4 |

| Echantillons testés: QC 150ng/mL | QC frais | QC dégelés 1 fois | QC dégelés 2 fois | QC dégelés 3 fois |
|--------------------------------------|----------|-------------------|-------------------|-------------------|
| QC lus sur courbe fraîche du | 95/03/10 | 95/03/14 | 95/03/14 | 95/03/17 |
| Concentration retrouvée en témazépam | 144,89 | 143,05 | 142,37 | 134,16 |
| | 141,33 | 142,58 | 143,86 | 136,20 |
| | 151,62 | 145,01 | 148,72 | 137,87 |
| n | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Moyenne | 145,95 | 143,55 | 144,98 | 136,08 |
| dév. std | 5,2 | 1,29 | 3,32 | 1,86 |
| C.V. (%) | 3,56 | 0,9 | 2,29 | 1,37 |
| Nom. (%) | 97,3 | 95,7 | 96,7 | 90,7 |

| Echantillons testés: QC 800ng/mL | QC frais | QC dégelés 1 fois | QC dégelés 2 fois | QC dégelés 3 fois |
|--------------------------------------|----------|-------------------|-------------------|-------------------|
| QC lus sur courbe fraîche du | 95/03/10 | 95/03/14 | 95/03/14 | 95/03/17 |
| Concentration retrouvée en témazépam | 798,84 | 801,45 | 754,85 | 740,96 |
| | 851,34 | 822,93 | 860,01 | 792,10 |
| | 831,35 | 834,21 | 833,47 | 788,88 |
| n | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Moyenne | 827,18 | 819,53 | 816,11 | 773,98 |
| dév. std | 26,50 | 16,64 | 54,69 | 28,64 |
| C.V. (%) | 3,2 | 2,03 | 6,7 | 3,7 |
| Nom. (%) | 103,4 | 102,4 | 102 | 96,7 |

Mise au point d'une méthode de couplage du témazépam avec le menthylchloroformate (MCF)

Le MCF, en se couplant à la fonction alcool du carbone 3 asymétrique du témazépam, va former un carbonate: voir Figure 16.

Méthode analytique lors de l'essai avec le MCF:

Matériel:

-Le (-) Menthyl chloroformate (MCF) a été acheté chez Aldrich Chemical Company, Inc.

-La triéthylamine (TEA) (AC-9421) 99% a été achetée chez Anachemia

-Colonne: Nucleosil 5 C-18 100A, 150x4,6mm de Phenomenex #00f0323EO

-colonne Hichrom C-8 S5C8-1668

-colonne β -cyclobond I de Astec #5714

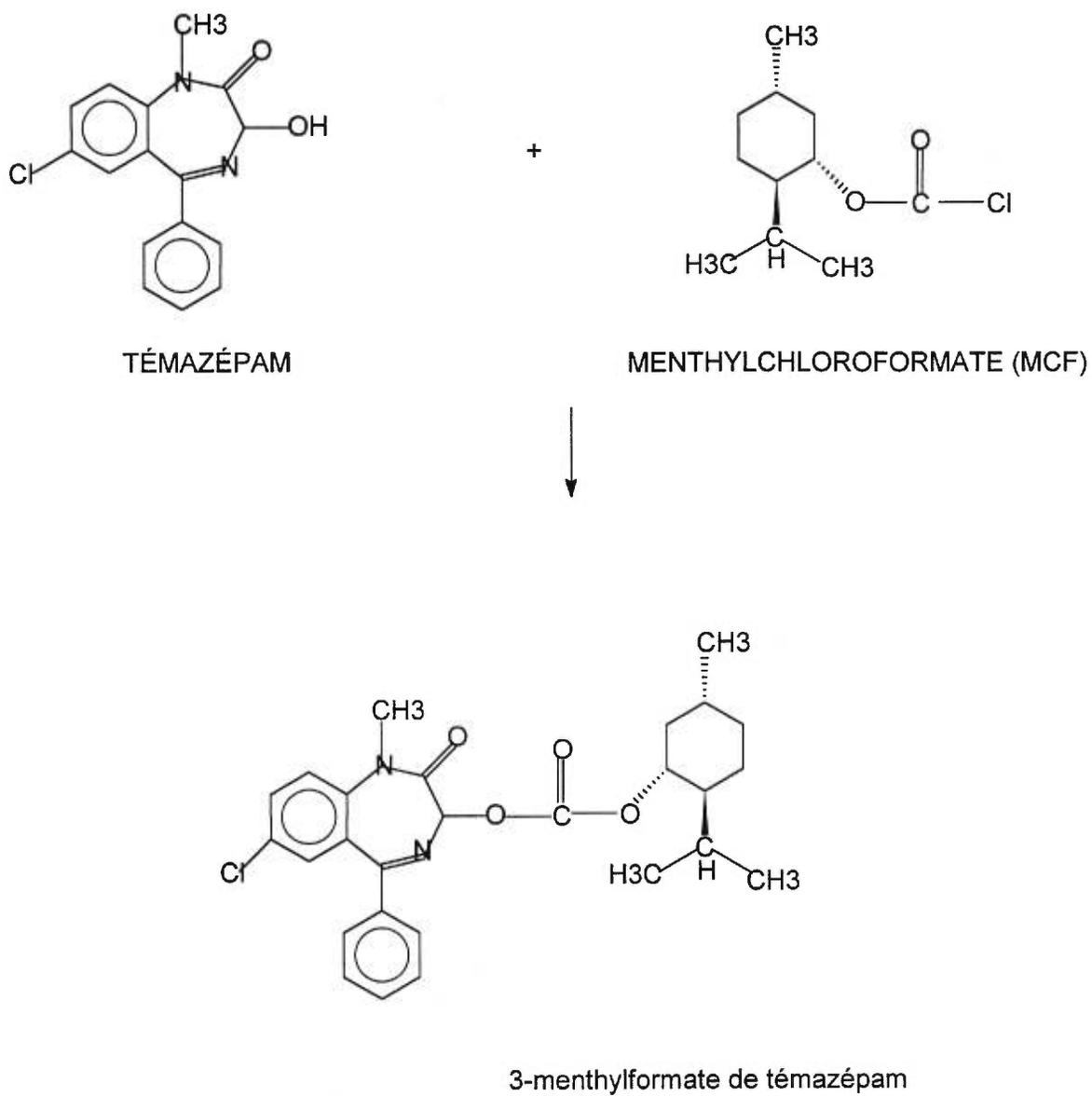


Figure 16: Réaction de couplage entre le témazépan et le menthylchloroformate

Préparations des solutions

Solution de DMAP/pyridine dans ACN:

10mg de DMAP

1ml de pyridine

qs ad 10 ml d'ACN

Conditions de réaction entre le TMZ et le MCF

Les conditions de réaction qui ont donné les plus grands niveaux de réaction du TMZ avec le MCF sont les suivantes;

-5 μ L de MCF pur

-1 mg de TMZ

-145 μ L d'un mélange de DMAP/pyridine dans ACN.

-temps de réaction: 30-60 minutes à 20-70 C.

Conditions chromatographiques pour observer le pic de TMZ inchangé

Phase mobile:

55% d'ACN

0,1% de H₃PO₄ concentré (85%)

qs ad 100% eau distillée

Débit de la pompe: 1mL/min

Temps de rétention du TMZ: 5,4 minutes

Résultats de l'observation du TMZ inchangé après réaction avec MCF

Pour évaluer le niveau de réaction du témazépam avec le MCF, nous avons tout d'abord mesuré la disparition du témazépam inchangé en chromatographie. Avec la colonne Nucleosil, nous avons observé une disparition de l'ordre de 80-90% du pic de TMZ inchangé. Voir Figure 17, Figure 18.

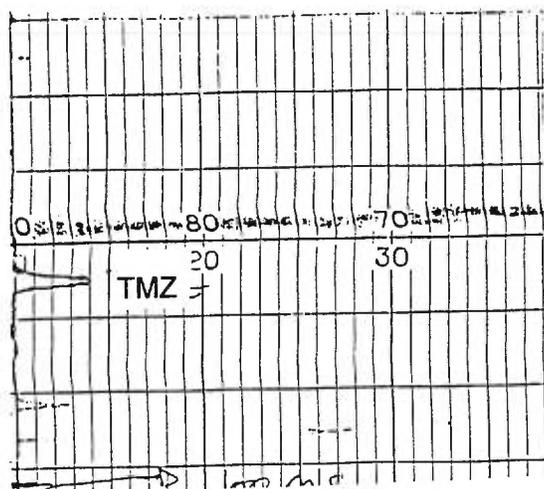


Figure 18: Chromatogramme type d'une injection de 100 ng de TMZ après réaction avec MCF

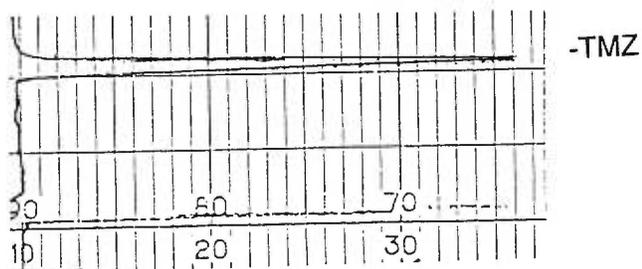


Figure 17: Chromatogramme type d'une injection de 100ng de TMZ

Résultats de la réaction entre le TMZ avec le MCF

Identification du pic formé

Ensuite, nous avons augmenté la teneur en ACN de la phase mobile être en mesure de voir le produit de couplage du TMZ avec le MCF dans des temps raisonnables. En injectant le TMZ après réaction avec le MCF dans une phase mobile contenant 80% d'ACN, un pic unique à 9,4 minutes est élué. Avant de commencer à modifier les conditions chromatographiques afin d'obtenir une séparation des diastéréoisomères probablement contenus sous ce même pic à 9,4 minutes, nous nous sommes assurés qu'il s'agissait bien du pic de témazépam dérivé en le recueillant pour lui faire subir une hydrolyse acide. Une hydrolyse acide, effectuée à l'aide de l'acide chlorhydrique 6 Normal (6N), sur le TMZ ou sur le TMZ-MCF va amener l'ouverture du cycle B du témazépam et la formation de la 2-méthylamino-5-chlorobenzophénone (MACB) tel qu'illustré à la Figure 19.. Or, en injectant, après hydrolyse, le TMZ et le pic à 9,4 minutes, on obtient un pic dont le temps de rétention est identique à celui de la MACB, soit de 4,6 minutes. Ainsi, nous avons conclu que le pic à 9,4 minutes était un pic contenant les diastéréoisomères du TMZ-MCF

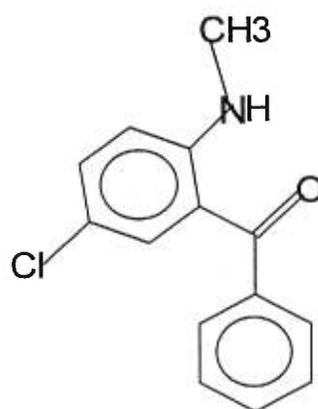


Figure 19: 2-méthylamino-5-chlorobenzophénone (MACB)

Voici, de façon plus détaillée, comment hydrolyser le témazépam

- On hydrolyse à l'aide de l'acide chlorhydrique 6N
- On chauffe à 70°C
- On neutralise avec un excès d'hydroxyde de sodium (NaOH)
- On extrait le témazépam hydrolysé à l'aide du ter butylméthyléther
- On prélève et on évapore la phase organique
- On resuspend le produit évaporé dans de l'acétonitrile (ACN)
- On analyse cette solution en chromatographie HPLC

Sachant que le pic à 9,4 minutes contient les deux diastéréoisomères du TMZ-MCF, nous avons tenté d'obtenir une séparation complète des pics en modifiant les conditions chromatographiques.

Méthode analytique avec une colonne C-8 pour observer les pics de TMZ-MCF

Conditions chromatographiques avec une colonne C-8 pour observer les pics de TMZ-MCF

Phase mobile:

32,5 mL de méthanol
45,5 mL d'ACN
300 µL TEA
qs ad 100 mL avec eau distillée
pH ajusté à 3.7

débit 1,25ml/min

temps de rétention du TMZ-MCF-1^{er} pic: 24,6 minutes

temps de rétention du TMZ-MCF-2^e pic: 26,4 minutes

Résultats de la séparation des pics du TMZ-MCF avec une colonne C-8

Après avoir constaté une séparation des diastéréoisomères pauvre avec la colonne Nucleosil, nous avons opté pour une Hichrom C-8. Avec cette colonne, nous avons réussi à obtenir une séparation des diastéréoisomères de l'ordre de 70 à 80% de la hauteur du pic. Voir Figure 20

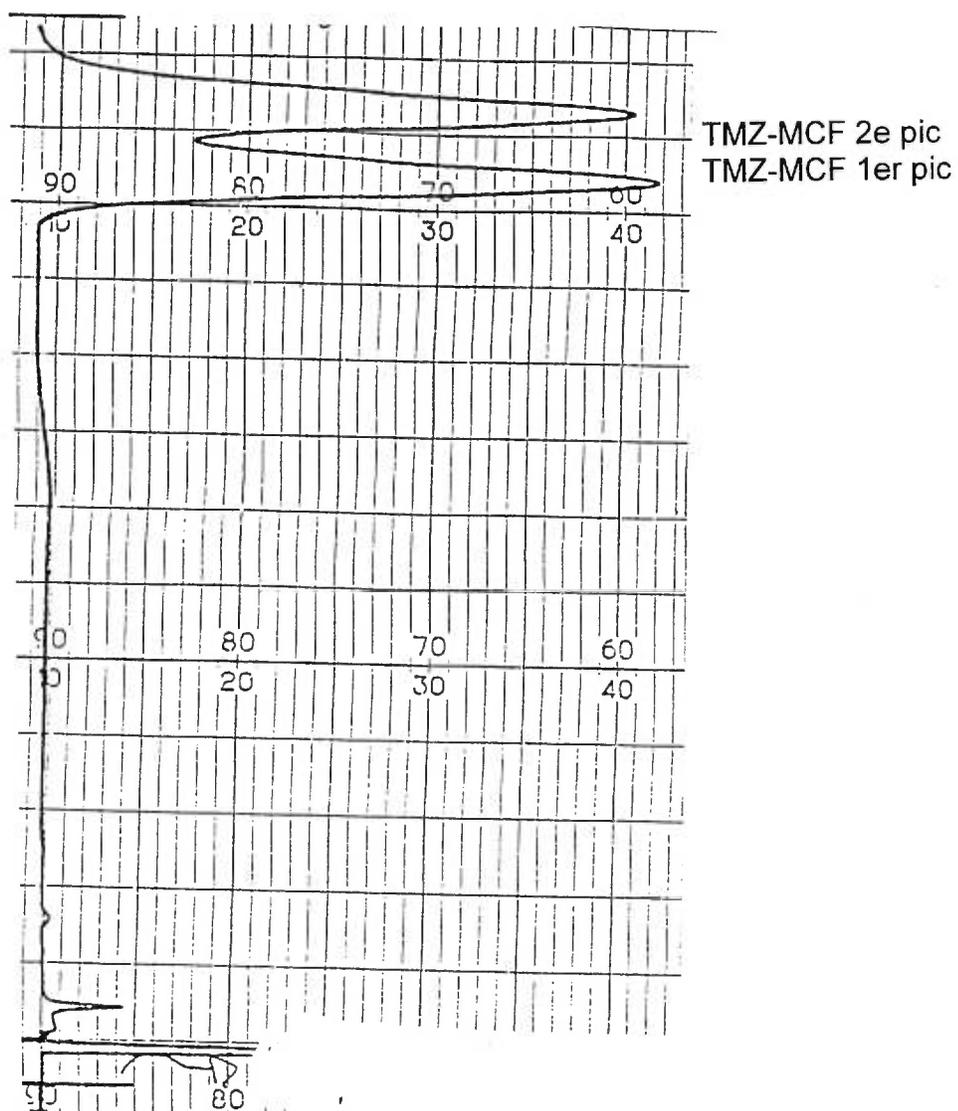


Figure 20: Chromatogramme type des diastéréoisomères du TMZ-MCF sur colonne C-8

Méthode analytique avec une avec une colonne β -Cyclobond pour observer les pics de TMZ-MCF

Conditions chromatographiques pour observer les pics de TMZ-MCF avec une colonne β -Cyclobond

26,9ml d'ACN

14,4ml de MeOH

180 μ L de TEA

qs ad 100 ml eau distillée

pH 4,40

Débit 0,25ml/min

temps de rétention du TMZ-MCF-1^{er} pic: 24,4 min

temps de rétention du TMZ-MCF-2^e pic: 26,6 min

Résultats de la séparation des pics de TMZ-MCF avec une colonne β -Cyclobond

Avec la colonne β -cyclobond, la séparation obtenue était de l'ordre des 80-90%.
Voir Figure 21.

Conclusion

Malgré toutes ces tentatives, nous ne sommes pas parvenus à séparer tout à fait les diastéréoisomères du TMZ-MCF.

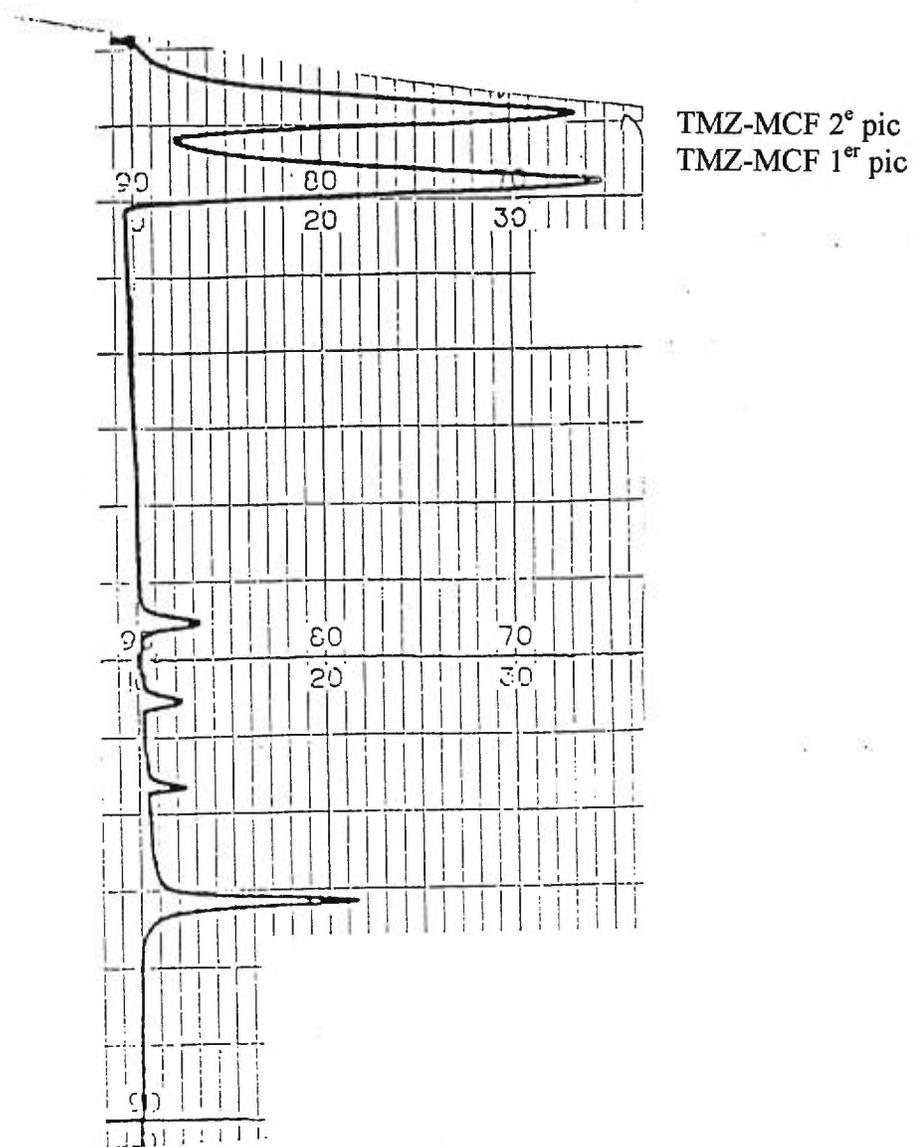


Figure 21: Chromatogramme type des diastéréoisomères du TMZ-MCF sur colonne β -Cyclobond

Mise au point d'une méthode de couplage du témazépam avec le naphthyléthylisocyanate (NEI)

Face à la difficulté de séparer complètement les diastéréoisomères du TMZ-MCF, nous optons pour l'essai d'un nouvel agent pour dériver le témazépam: le naphthyléthylisocyanate (NEI). Le NEI, en se couplant au niveau du carbone 3 asymétrique du témazépam, va amener la formation d'un carbamate, Figure 22. Nos essais ont débuté avec les deux mêmes colonnes que pour le MCF mais se sont poursuivies avec une nouvelle colonne: Inertsil C-18. Cette colonne diffère de l'autre utilisée du fait que ses sites actifs sont doublement neutralisés (*double-end capped*). Le degré de séparation des diastéréoisomères du TMZ diffère également. A l'aide de cette colonne, nous avons été capables d'obtenir une séparation complète des diastéréoisomères élués.

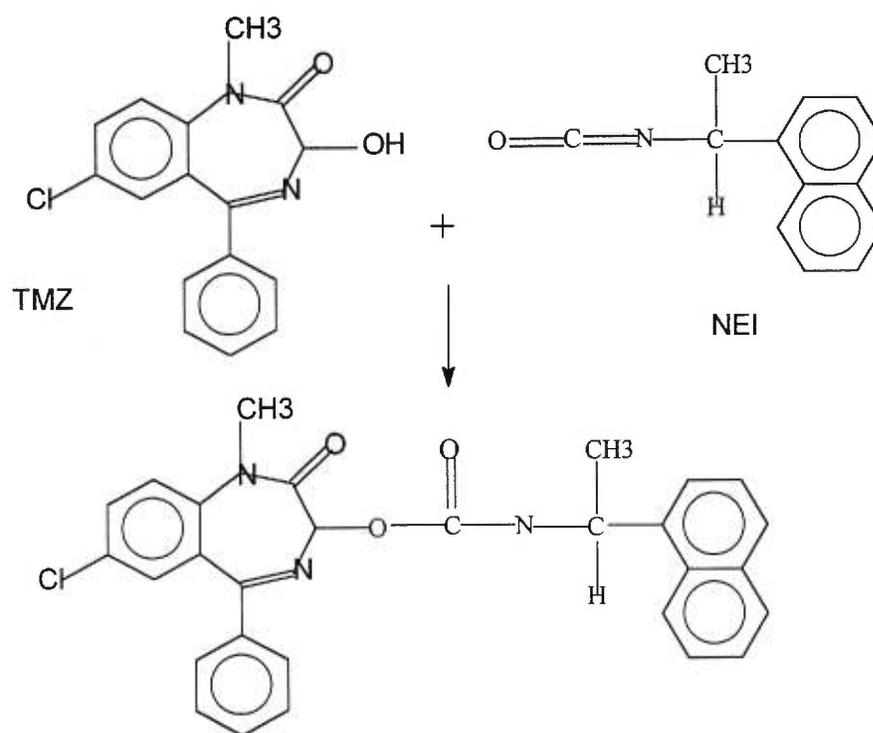
Méthode analytique lors de l'essai avec le naphthyléthylisocyanate (NEI)

Matériel

-colonne Inertsil de CSC: ODS2, #0694102, 15x 0.46cm, 5 μ m

-Le (S)-(+)-1-(1-Naphtyléthylisocyanate(NEI), 99%a été acheté chez Aldrich Chem. Co.

-L'hydrure de calcium a été acheté chez Aldrich



Naphthyléthylcarbamate de temazepam

Figure 22: Réaction de couplage entre le témazépam (TMZ) et le naphthyléthylisocyanate (NEI)

Conditions de réactions préliminaires entre le TMZ et le NEI

800ng de TMZ
100 μ L de DMAP/pyridine/ACN
NEI en excès molaire de 15 fois
 Δ t: 70°C pendant 30 minutes
évaporer
dissoudre et injecter dans la phase mobile

Conditions chromatographiques préliminaires pour le TMZ-NEI

Phase mobile:

163mL ACN
184mL MeOH
153mL eau distillée
500 μ L d'acide phosphorique concentré

débit: 1,5mL/min

temps de rétention du TMZ-NEI-1^{er} pic: 12,6min
temps de rétention du TMZ-NEI-2^e pic: 13,6 min

Résultats préliminaires de la séparation des pics de TMZ-NEI avec la colonne Inertsil

Nous avons réussi à obtenir une séparation complète des pics de TMZ-NEI à l'aide de la colonne Inertsil, voir Figure 23. Ensuite, il nous fallait trouver des conditions optimales quant au rendement de la réaction de couplage et reproductibles dans le temps pour permettre la mise au point d'une méthode de validation in vitro.

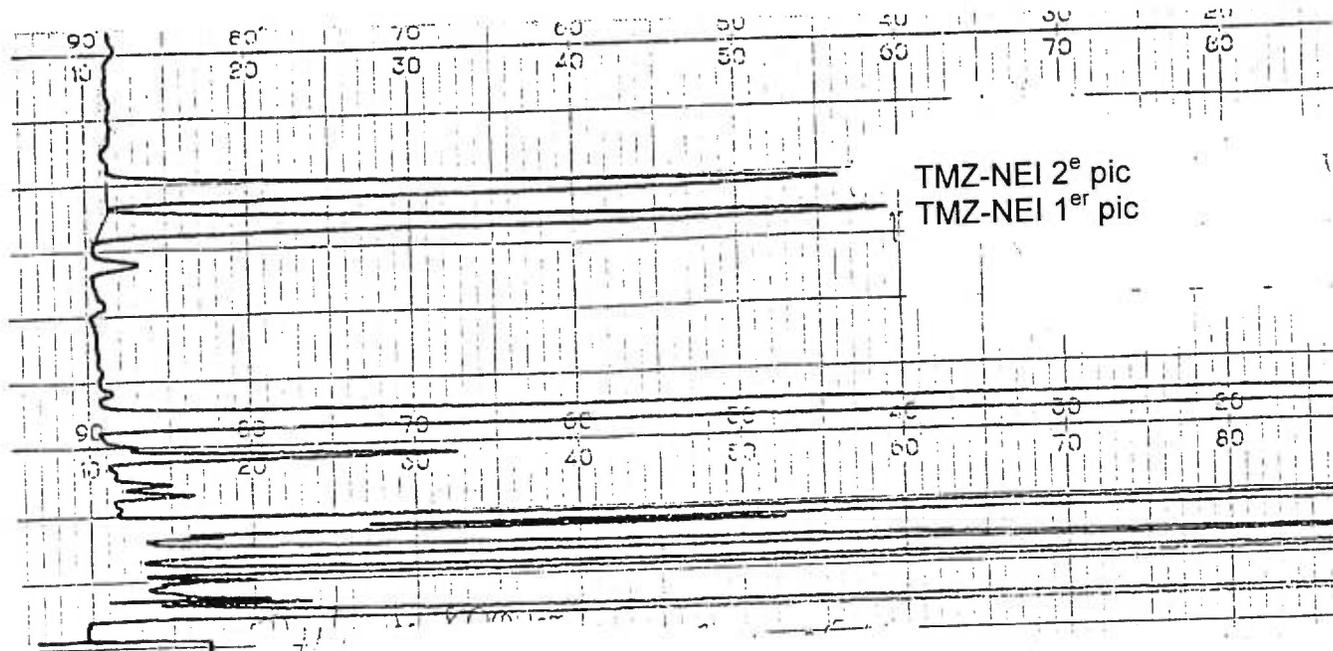


Figure 23: Chromatogramme type des diastéréoisomères du TMZ-NEI sur colonne Inertsil

Identification des substances interférentes et mesures prises afin de les contrer

A l'aide du NEI pour dériver le TMZ, nous nous sommes rendus compte qu'il existait plusieurs sources de variation des résultats. En effet, le NEI peut réagir de façon préférentielle avec plusieurs substances présentes au cours de la réaction plutôt qu'avec le TMZ. Ainsi, il fallait contrôler la quantité de substances interférentes dans notre réaction. Voici les principales substances interférentes que nous avons pu identifier: l'eau présente dans plusieurs solvants et dans l'air ambiant, la diéthylamine. En plus, nous suspicions l'influence du contenant. Plusieurs mesures ont été prises pour amenuiser l'effet de ces substances interférentes.

Pour éviter l'eau et ses groupements -OH: Figure 24

- 1) On se servait toujours du témazépam sec. Donc, après avoir prélevé une quantité de témazépam sous forme de solution, on devait l'évaporer sous azote ultra sec avant de poursuivre la réaction.
- 2) On conservait l'acétonitrile et la TEA utilisées pour effectuer la réaction de couplage sur hydrure de calcium
- 3) On diluait le NEI à partir d'une solution standard de NEI 1 Molaire (1M) quotidiennement avec de l'acétonitrile sec pour obtenir du NEI à 0,1M.

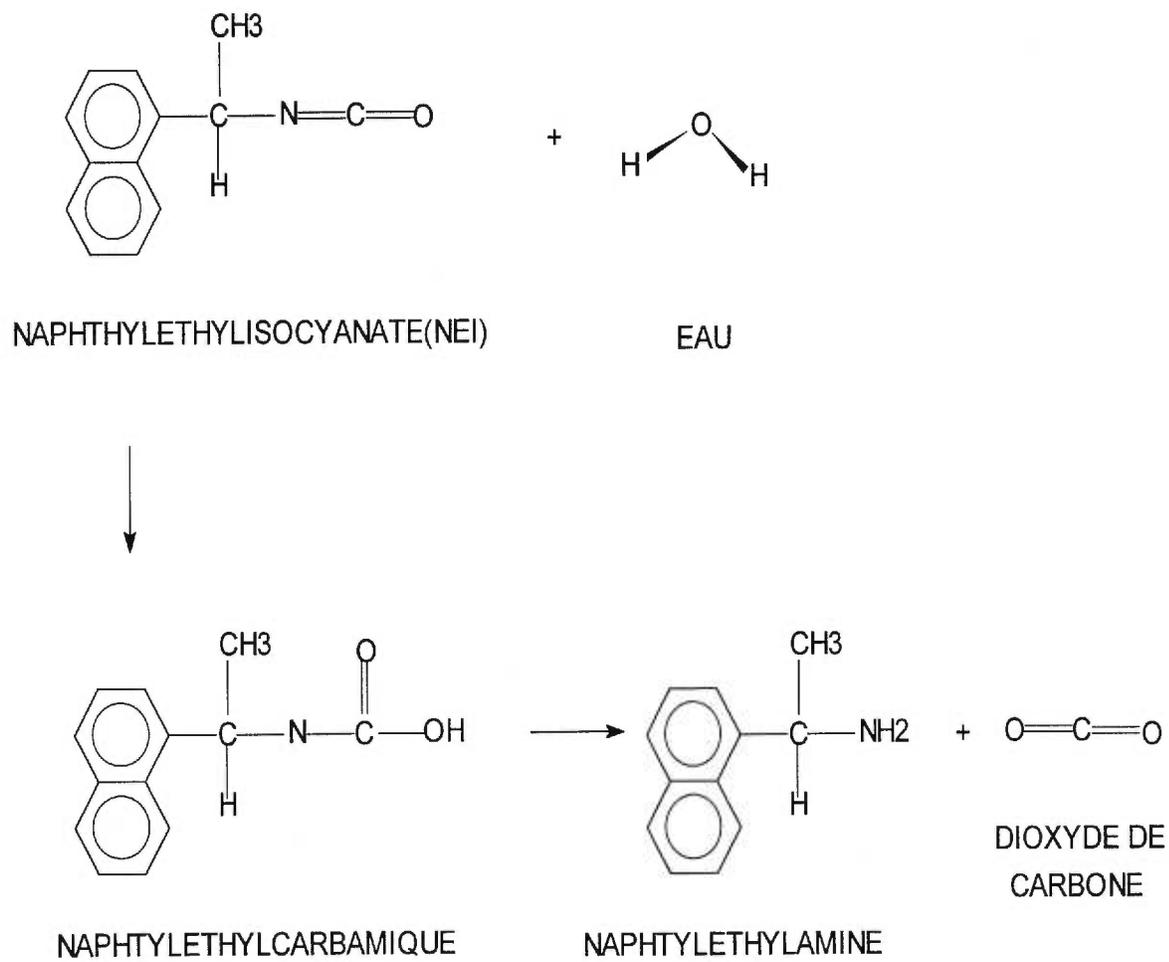


Figure 24: Réaction entre le NEI et l'eau

Pour éviter la diéthylamine et ses groupements -NH:

1) On procédait à la distillation périodique de la triéthylamine

Pour éviter que le NEI réagisse exclusivement avec les groupements silanols du verre des tubes, on effectuait une réaction à blanc au préalable: NEI, TEA dans le tube où avait lieu la réaction de couplage entre le TMZ et le NEI.

Enfin, une façon de minimiser la présence des substances interférentes pouvant réagir préférentiellement avec le NEI est d'augmenter l'excès molaire en NEI. C'est la raison pour laquelle on utilisait un excès de 150 à 300 fois en NEI (rapport molaire entre le TMZ et le NEI). Un excès plus petit amenait des rendements moins bons et des excès plus grands pouvaient amener des pics plus grands mais aussi beaucoup plus d'interférences.

Pour choisir l'excès, nous avons effectué des courbes d'étalonnage de TMZ avec le NEI. Dans la Figure 25 et la Figure 26, nous avons comparé la réactivité du TMZ lors d'un excès de 150 comparé à un excès de 1500 fois. A 150 et à 1500 fois d'excès, on obtient des courbes non extraites linéaires, mais à 1500 fois les interférences sont nombreuses. Ainsi, bien que les résultats semblent indiquer un rendement supérieur lorsqu'on augmente l'excès, un excès de 150 à 300 fois en équivalent molaire nous semble être un compromis acceptable étant donné qu' on peut obtenir des courbes reproductibles.

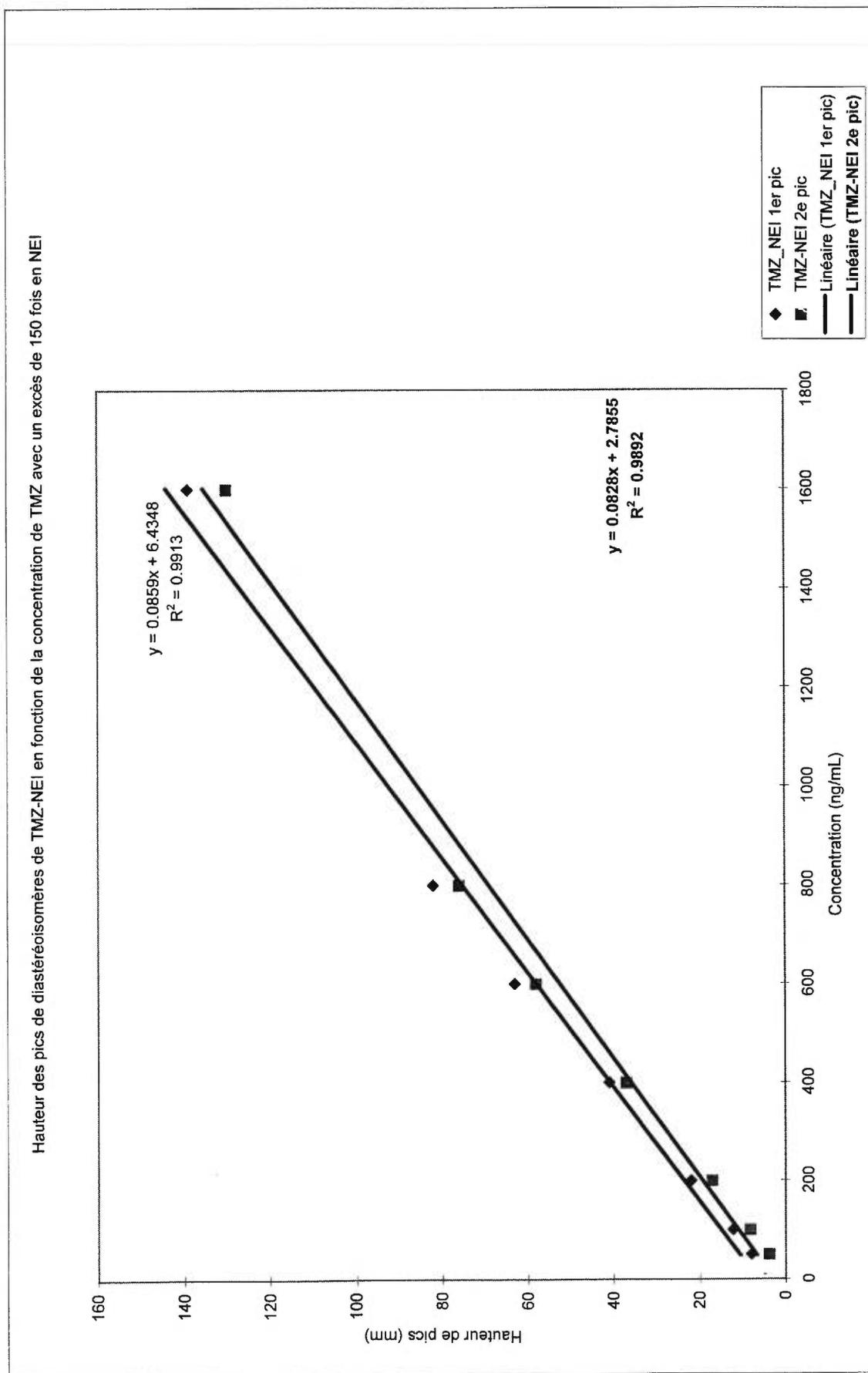


Figure 25: Courbe de calibration non extraite du temazepam avec le naphthyléthylisocyanate en excès molaire de 150 fois

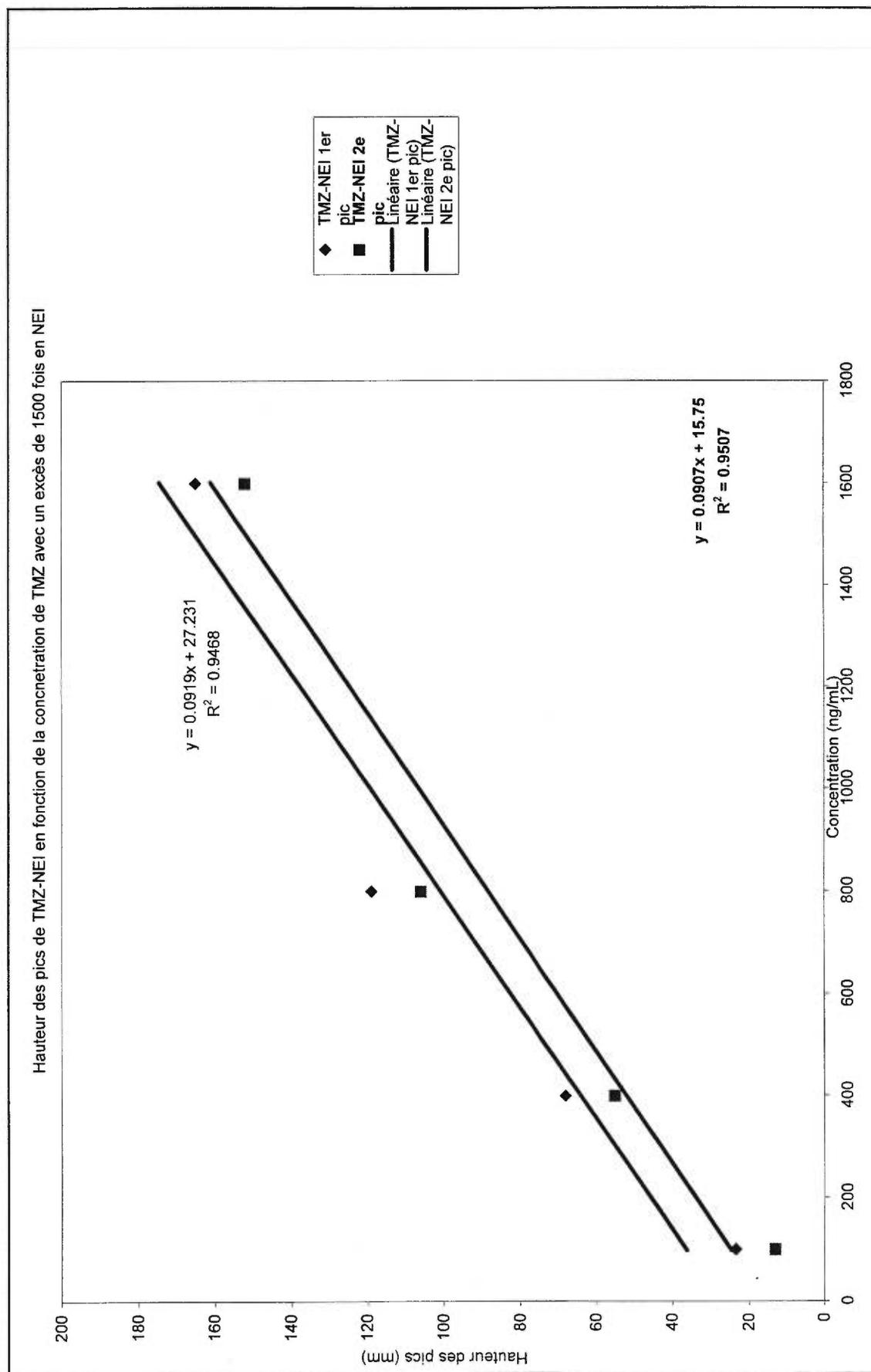


Figure 26: Courbe de calibration non extraite du TMZ avec le NEI en excès molaire de 1500 fois

D'autre part, nous avons suspecté l'influence des tubes sur le rendement de la réaction. Pour comprendre le phénomène et mieux choisir le type de tube à utiliser, des tests comparatifs ont été effectués

On a comparé les résultats obtenus lorsque la réaction était effectuée dans:

- -des tubes de verre lavés à l'acide
- -des tubes de verre traités au silicone
- -des tubes de verre traités au silicone et silanisés
- -des tubes de polypropylène de haute densité
- -des tubes de polyéthylène
- -des tubes pré-traités au NEI et à la TEA

La façon de traiter les tubes de verre semble être un élément important. Pour caractériser l'effet du verre, nous avons effectué deux types d'expériences: une pour tenter de bloquer les sites réactifs du verre et l'autre pour augmenter le nombre de sites réactifs.

En bloquant les sites réactifs du verre, avec du silicone ou par silanisation ou par pré-traitement, on s'est trouvé à augmenter le rendement de la réaction. Et, il s'est avéré que la meilleure façon de bloquer les sites actifs de silanols sur le verre a été de faire une réaction à blanc au préalable dans le tube de verre (Tableau 10). Les conditions de ce pré-traitement avec le réactif (NEI) et le catalyseur (TEA) étaient analogues à celles de la réaction; NEI, TEA, ACN et chauffage. A la suite de quoi, on procédait au rinçage avec de l'acétonitrile et au séchage des tubes sous azote ultra sec avant d'effectuer la réaction.

En augmentant le nombre de sites réactifs du verre par l'addition de fragments de verre au tube contenant les réactifs: TMZ, NEI et TEA; le rendement de la réaction a été beaucoup diminué. Cet ajout a eu pour effet d'inhiber quasi totalement la réaction de couplage entre le TMZ et le NEI. Ainsi, nous croyons que les groupes silanols du verre réduisaient le rendement de la réaction.

A cause de l'interférence causée par les groupes silanols des tubes de verre, on serait porté à croire que des tubes de plastique auraient été plus appropriés. Au contraire, en général, les résultats obtenus à l'aide des tubes de polymères sont quantitativement inférieurs et inconstants par rapport aux réactions effectuées dans les tubes de verre. Il y a lieu de croire qu'il pourrait s'agir d'un phénomène d'adsorption sur la matrice comme cela a été décrit pour d'autres benzodiazépines analogues^{73,74}.

Conditions de réaction entre le TMZ et le NEI

- TMZ: 0 à 1 μ g
- 50 μ L de TEA
- 50 μ L d'ACN sur hydrure de calcium
- 10 μ L de NEI 0,1M
- \Delta t: 30 minutes
- 70°C
- évaporer
- dissoudre dans 200 μ L d'ACN sur hydrure de calcium
- injecter 20 μ L

Résultats observés en contrôlant les substances interférentes

Le contenant choisi, les substances interférentes contrôlées du mieux qu'on pouvait, on a pu effectuer quelques courbes de calibration du TMZ-NEI dont les résultats nous ont fourni des preuves de linéarité, (Figure 27 à Figure 33)

Bien que ces courbes soient linéaires, la variation entre les courbes, effectuées au cours de jours différents, demeure importante. En effet, en comparant les pentes de ces courbes, on observe 22 et 21% de variation sur la valeur de la pente du 1^{er} et du 2^e pic de TMZ-NEI respectivement (Tableau 11 et Figure 34) Ce qui démontre, une variabilité inter-jour appréciable. Cette variabilité, s'explique par la présence de nombreux facteurs interférents. Nous estimons que les interférences sont à peu près constantes à l'intérieur d'une même journée vu que nous obtenons des relations linéaires entre la quantité de TMZ mise à réagir et la hauteur des pics de TMZ-NEI. Cependant, la variabilité inter-jour que l'on constate par la variabilité sur les pentes, nous laisse croire que la quantité de substances interférentes n'est pas constante d'une journée à l'autre ce qui entraîne des degrés de couplage entre le TMZ et le NEI non constants. Par ailleurs, nous avons observé un degré de couplage supérieur pour la concentration la plus élevée, 1000ng de TMZ, dans

quelques cas Figure 32, Figure 33). Ce qui pourrait nous laisser croire que la relation n'est plus linéaire au-delà d'un certain seuil et que l'extrapolation de nos résultats pour des concentrations plus grandes serait hasardeuse.

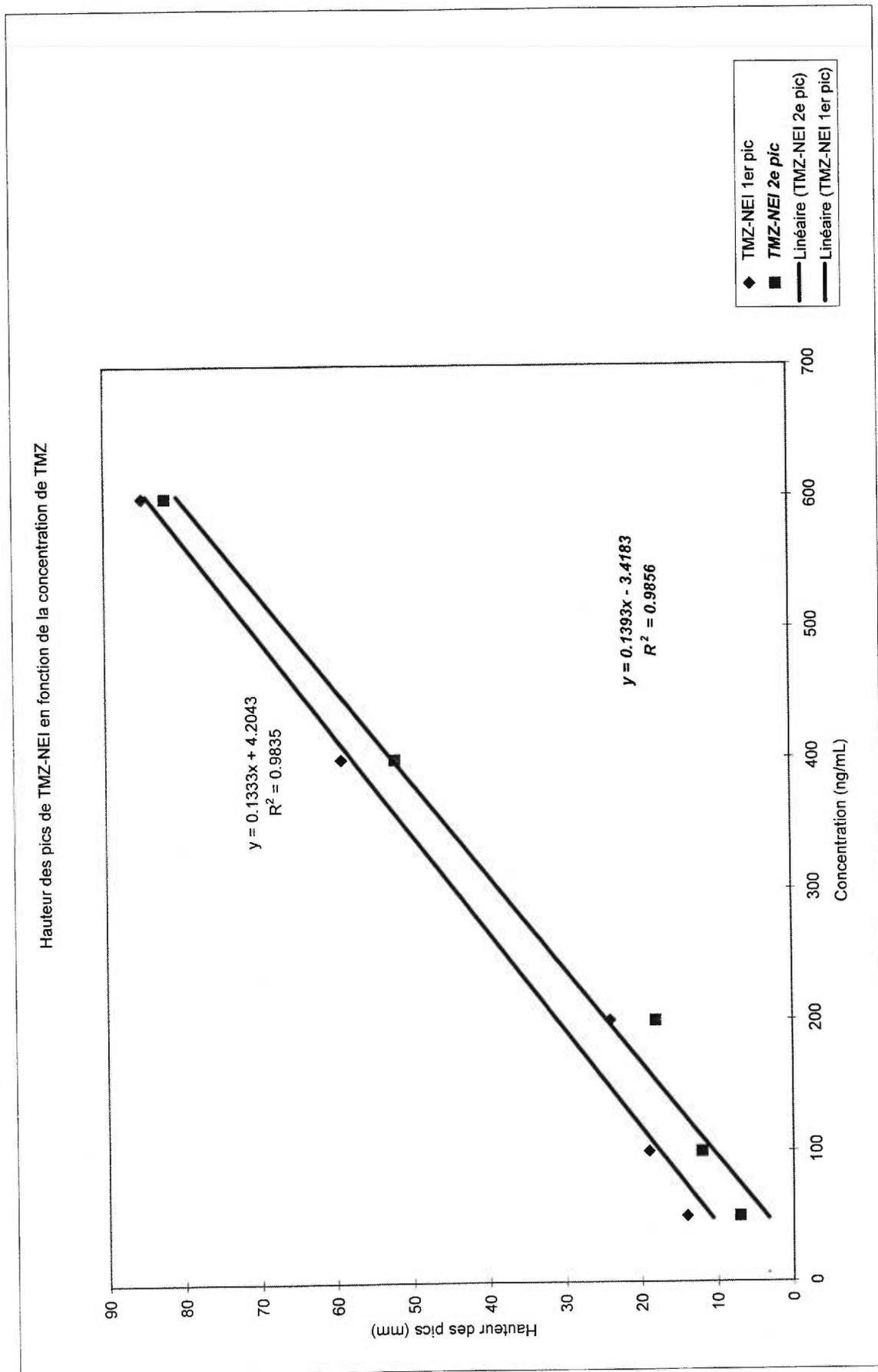


Figure 27: Courbe de calibration non extraite du temazepam (TMZ) avec le naphthyléthylisocyanate (NEI)

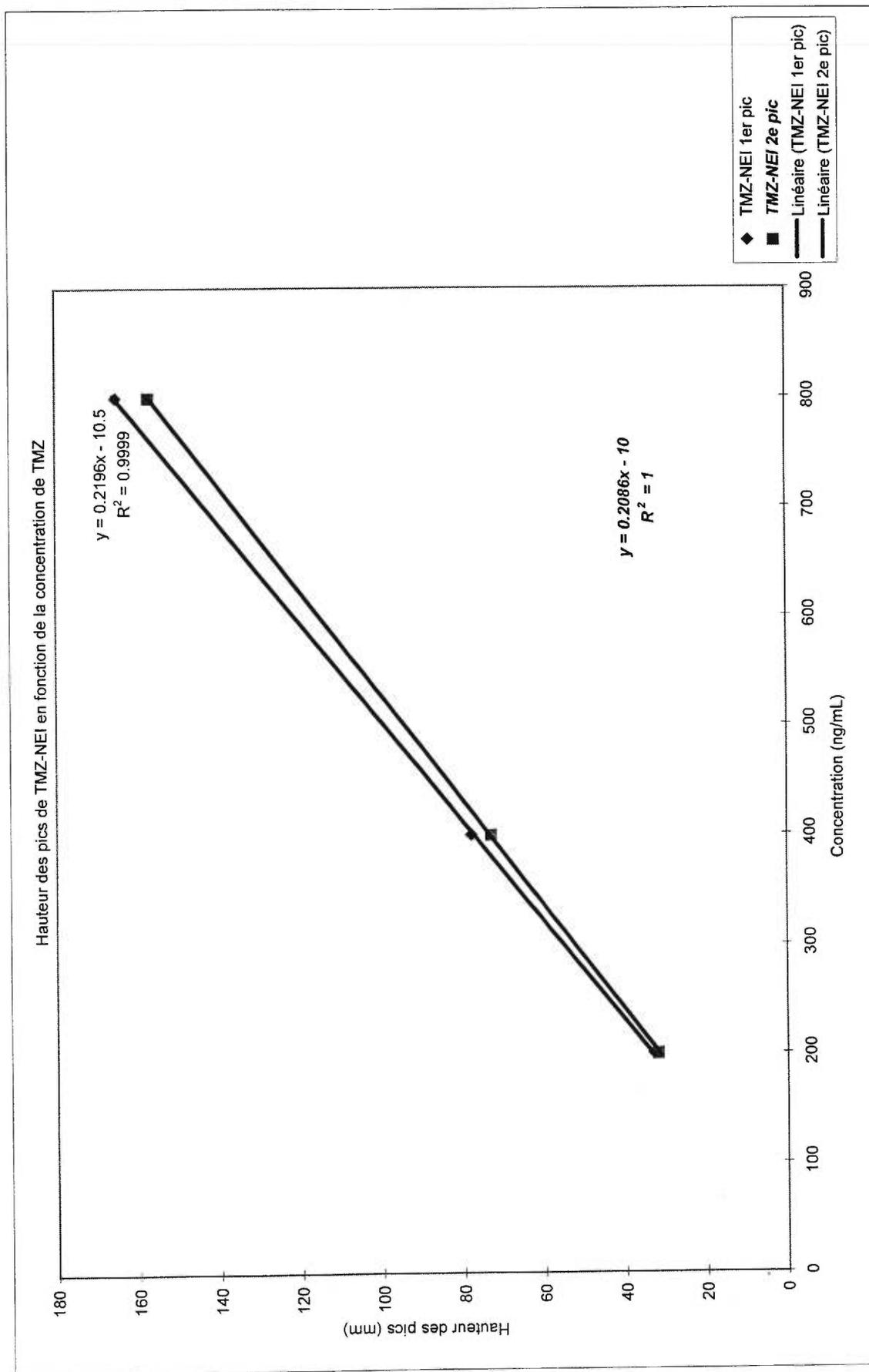


Figure 28: Courbe de calibration non extraite du temazepam (TMZ) avec le naphthyléthylisocyanate (NEI)

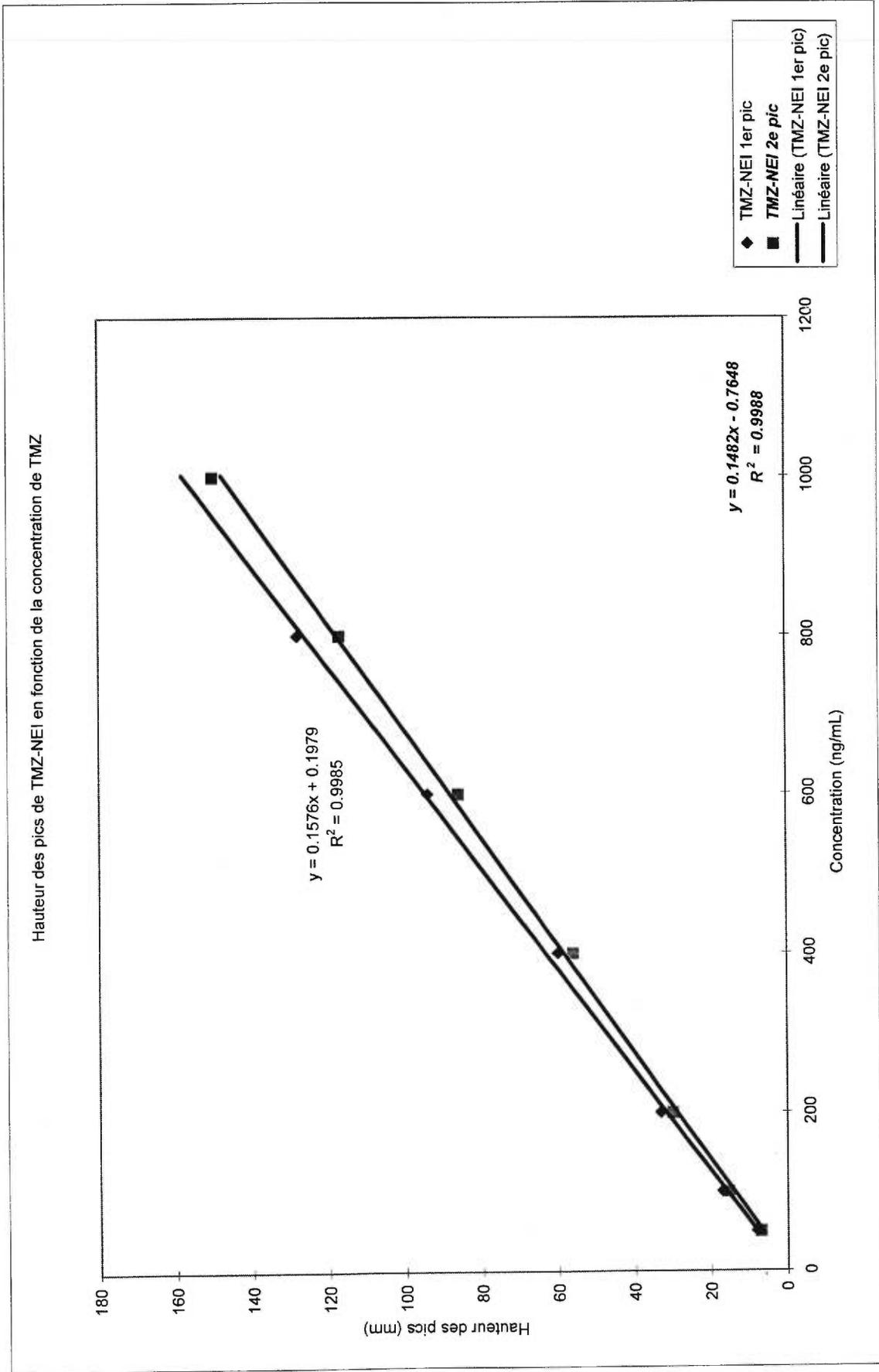


Figure 29: Courbe de calibration non extraite du temazepam (TMZ) avec le naphthyléthylisocyanate (NEI)

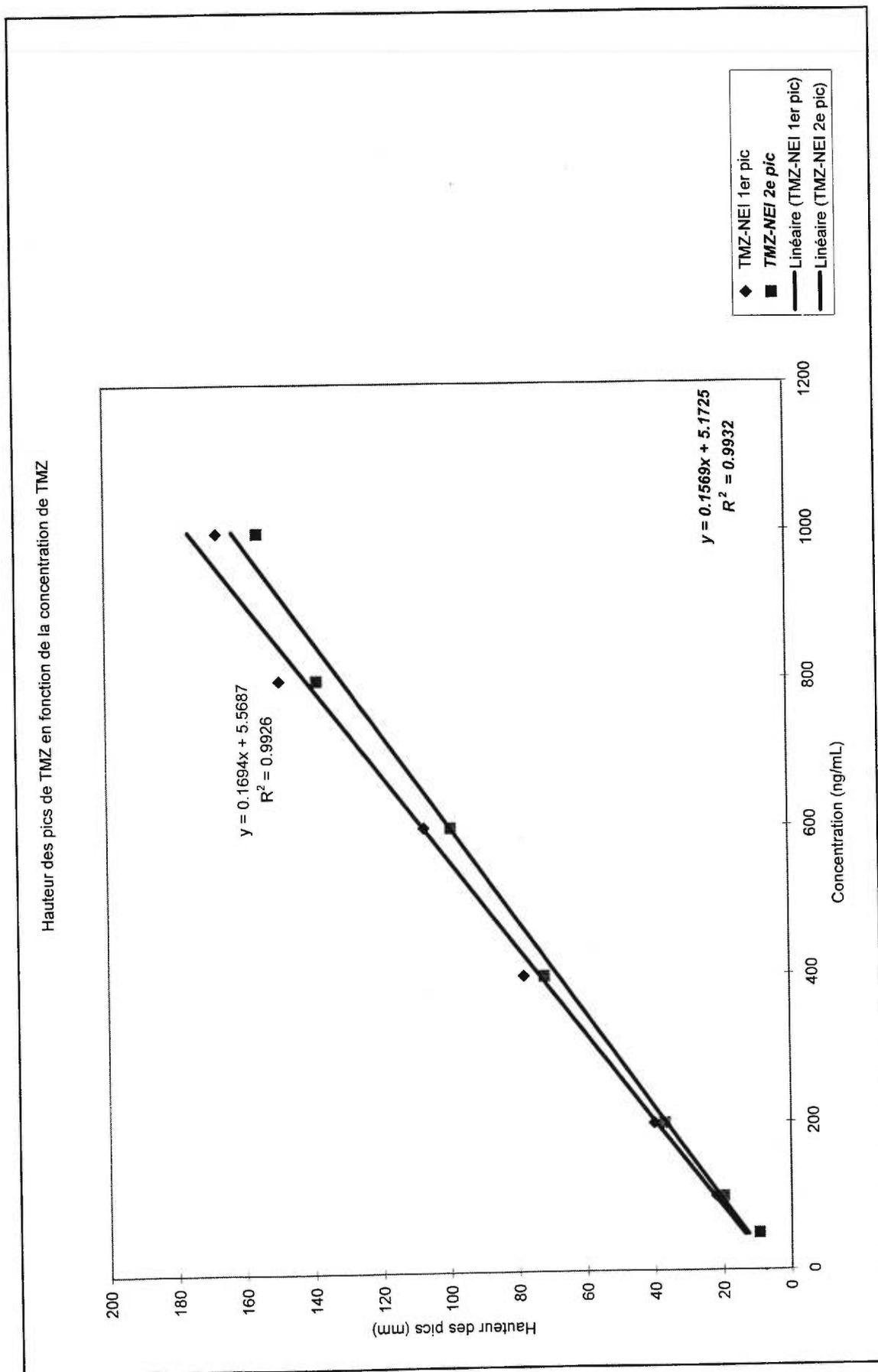


Figure 30: Courbe de calibration non extraite du temazepam (TMZ) avec le naphthyléthylisocyanate (NEI)

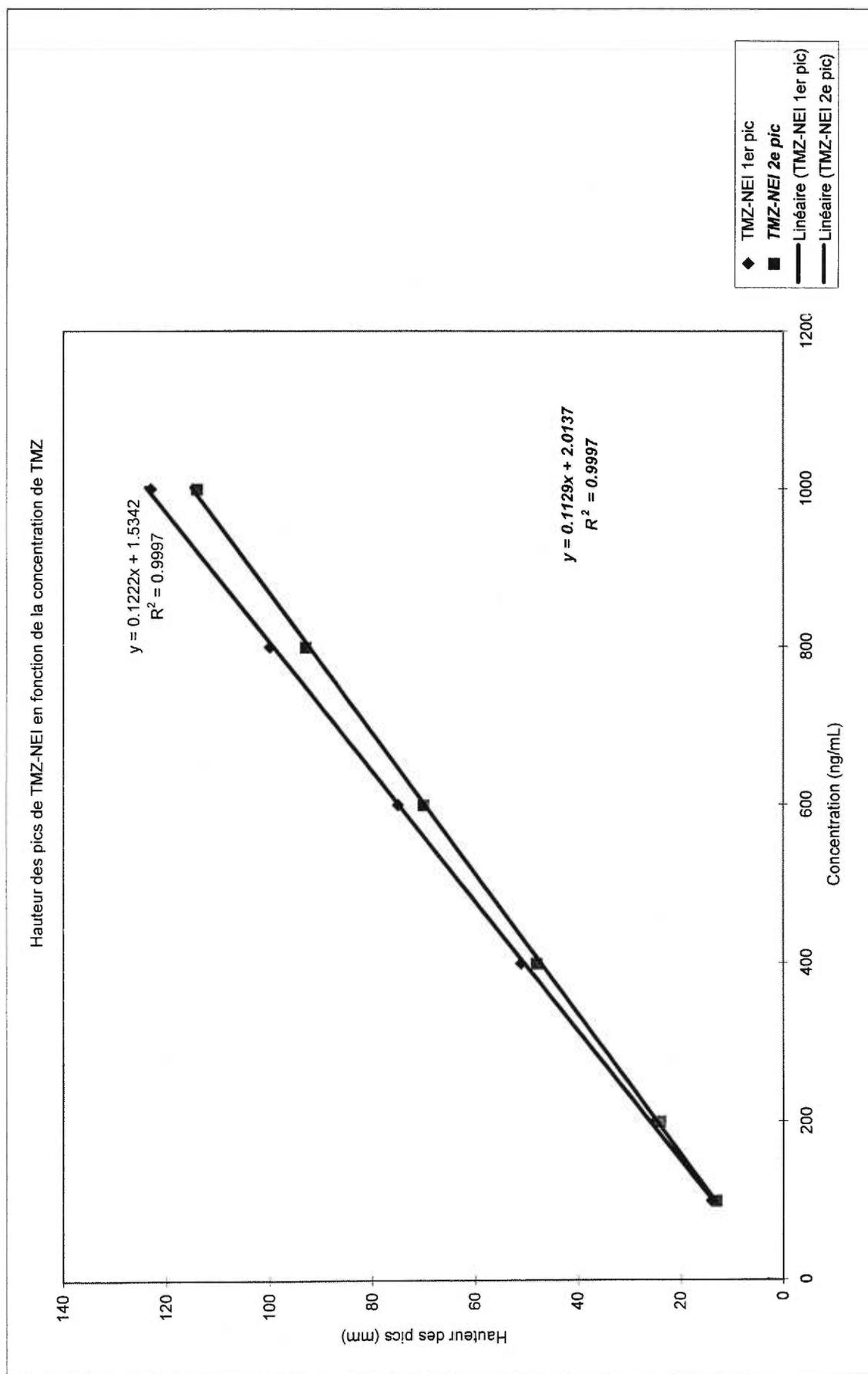


Figure 31: Courbe de calibration non extraite du temazepam (TMZ) avec le naphthyléthylisocyanate (NEI)

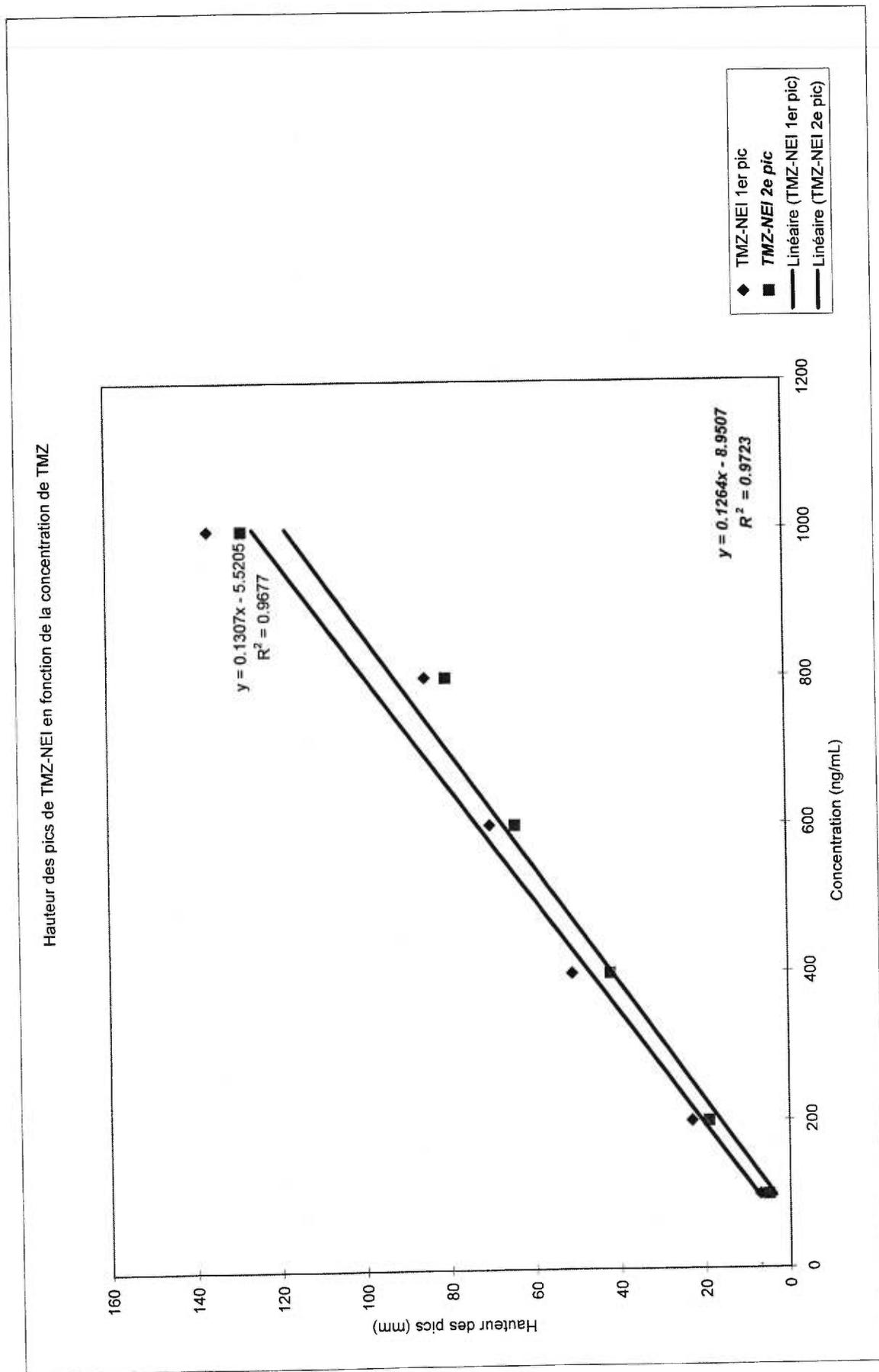


Figure 32: Courbe de calibration non extraite du temazepam (TMZ) avec le naphthyléthylisocyanate (NEI)

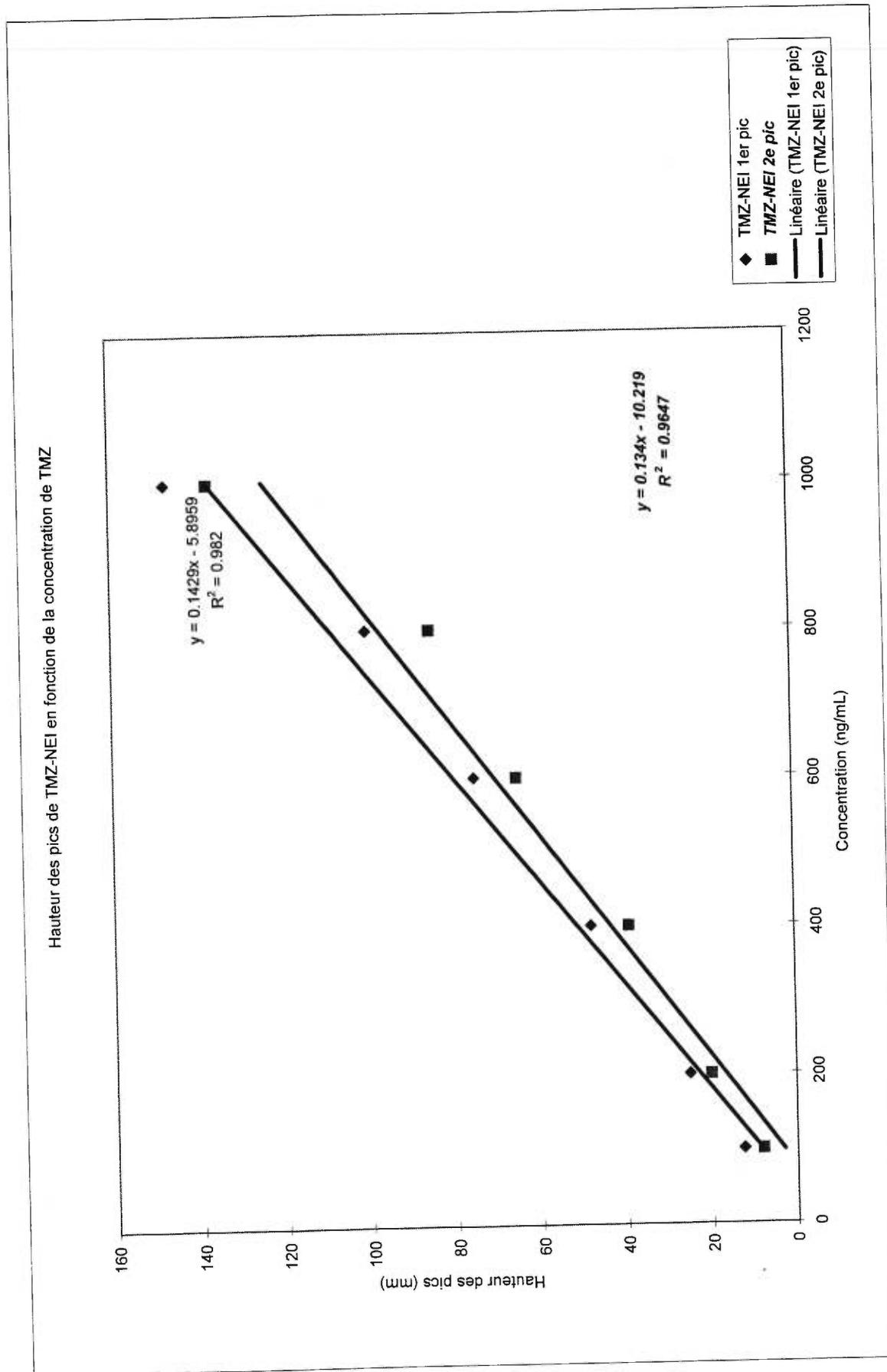
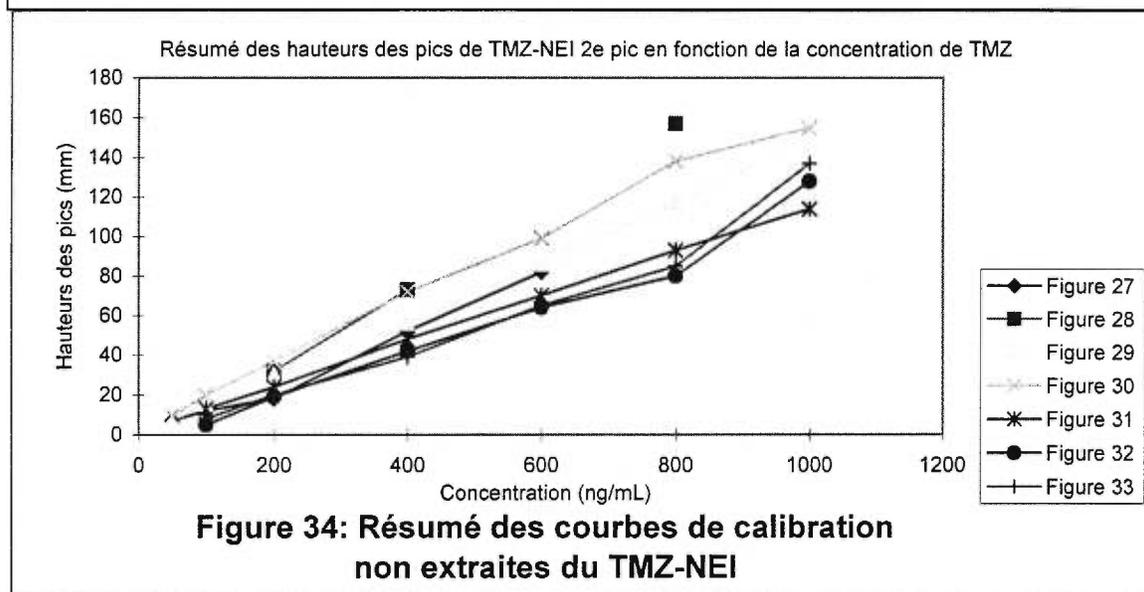
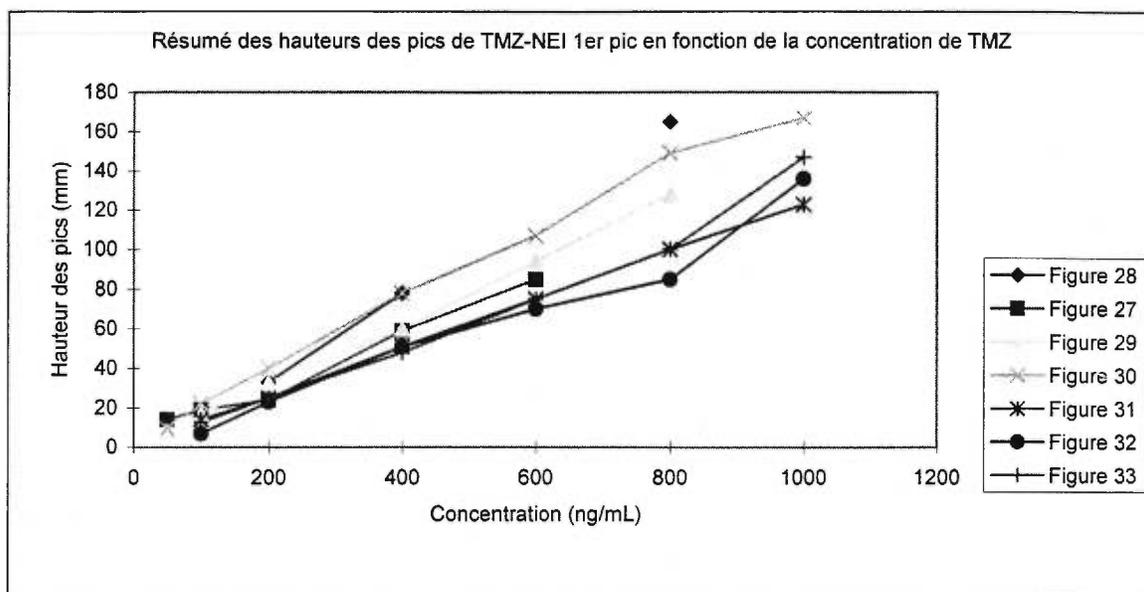


Figure 33: Courbe de calibration non extraite du temazepam (TMZ) avec le naphthyléthylisocyanate (NEI)



| | pentes des courbes | |
|----------------|--------------------|----------------|
| | TMZ-NEI 1er pic | TMZ-NEI 2e pic |
| Figure 27 | 0.1333 | 0.139 |
| Figure 28 | 0.2196 | 0.2086 |
| Figure 29 | 0.1576 | 0.1482 |
| Figure 30 | 0.1694 | 0.1569 |
| Figure 31 | 0.1222 | 0.1129 |
| Figure 32 | 0.1307 | 0.1264 |
| Figure 33 | 0.1429 | 0.134 |
| moy | 0.1537 | 0.1466 |
| dev std | 0.0333 | 0.0309 |
| dev/moy | 0.2168 | 0.2105 |

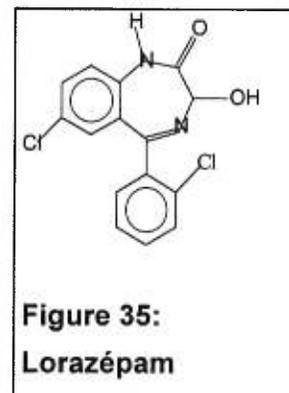
Tableau 11: Comparaison des pentes des courbes de calibration non extraites du TMZ-NEI

Recherche d'un étalon interne

Ensuite, il nous fallait trouver un étalon interne. Or, il nous était impossible d'utiliser le même étalon interne que pour la validation du TMZ racémique étant donné que le diazépam ne peut pas réagir avec le NEI, étant dépourvu d'un groupement hydroxyle en C-3. Le diazépam aurait pu être utilisé comme étalon externe, i.e. comme un indice de l'extraction seulement. L'utilisation d'un étalon interne se trouve à être un indice de l'extraction et de la réaction. Après plusieurs essais, notre choix s'est arrêté sur le lorazépam. L'oxazépam n'aurait pas été un bon choix non plus, car le témazépam est en petite partie métabolisé en oxazépam. ce qui aurait pu fausser les résultats.

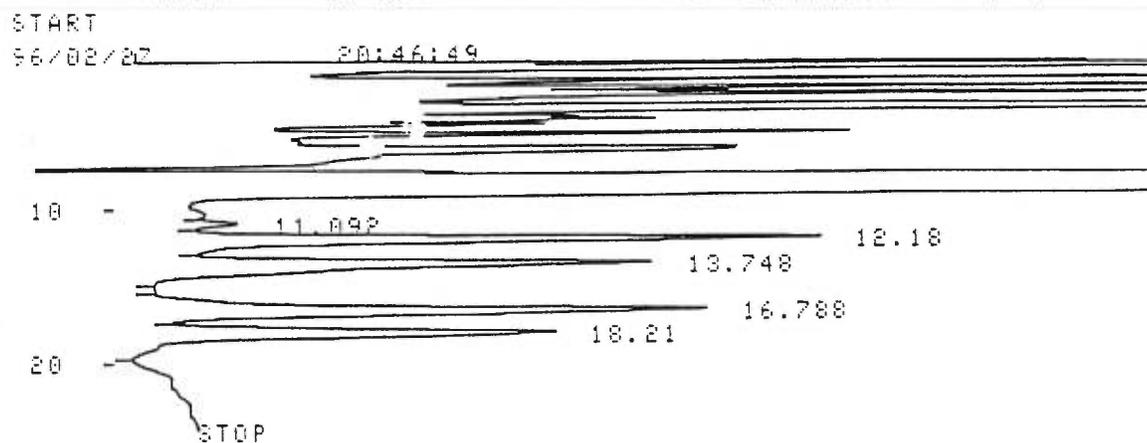
Conditions de réaction entre le TMZ et le NEI avec l'étalon interne

Les conditions de réaction sont les mêmes que celles décrites pour le TMZ et le NEI ci-dessus, en plus, on ajoute 1 µg de lorazépam



Conditions chromatographiques

Les échantillons ont été traités de la façon décrite ci-dessus et ont été analysés par chromatographie HPLC en utilisant la colonne Inertsil. Les composés d'intérêt, à savoir, le témazépam dérivé et le lorazépam dérivé sont élués sur une phase mobile constituée d'acétonitrile (30%), de méthanol (38%), d'acide phosphorique(0,1%) et d'eau distillée pour compléter le tout. Le pH de la phase mobile n'est pas ajusté à un pH précis. Le débit de la phase mobile a été ajusté à 1,5mL/min et tout le processus d'éluion avait lieu à la température de la pièce. Avec ces conditions chromatographiques, les temps de rétention ont été de:16,8 et 18 minutes pour les diastéréoisomères du témazépam; et de 12,2 et 13,7 minutes pour les diastéréoisomères du lorazépam. Il faut cependant noter que seul le 2e-pic de lorazépam-NEI servait pour la calibration (pic à 13,7 minutes). Voir Figure 36.



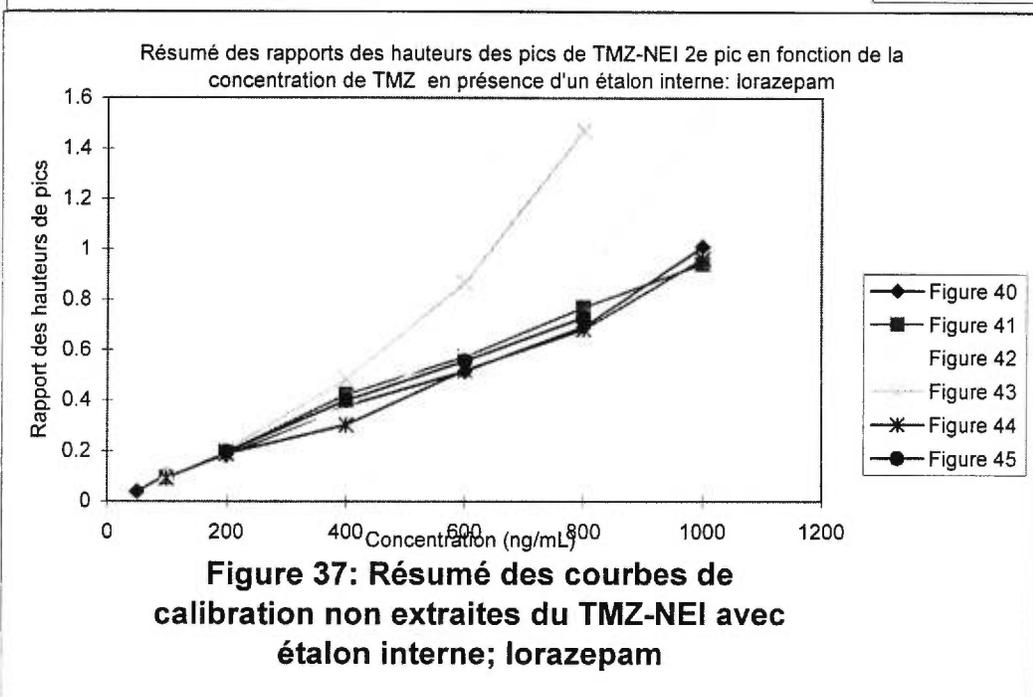
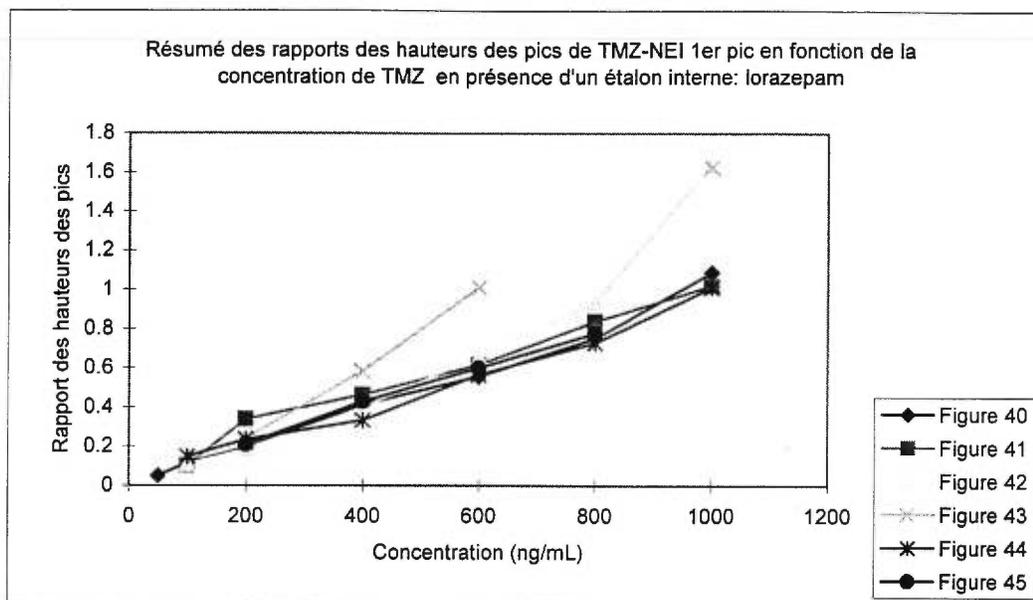
| CHROMATOGRAM | 7 | MEMORIZED | | | | |
|--------------|--------|-----------|----|------|--------|--------|
| PKNO | TIME | HIGHT | MK | IDNO | CONC | NAME |
| 1 | 11.092 | 147 | | | | |
| | | 2982ar | | | | |
| 2 | 12.18 | 2469 | | | | |
| | | 73854ar | | | | |
| 3 | 13.748 | 1874 | V | 1 | | ST INT |
| | | 74406ar | | | | |
| 4 | 16.788 | 2175 | | 2 | 1.1603 | TMZ |
| | | 84848ar | | | | |
| 5 | 18.21 | 1629 | V | 3 | 0.8693 | TMZ2 |
| | | 64474ar | | | | |
| TOTAL | | 8294 | | | 2.0295 | |

Figure 36: Chromatogramme type du TMZ-NEI avec lorazépam-NEI 2^e pic comme étalon interne

Résultats avec l'utilisation du lorazépam comme étalon interne

En introduisant un deuxième type de composé qui doit réagir avec le NEI, la réaction est encore plus difficile à contrôler. En effet, la variation des pentes des courbes de validation du TMZ-NEI avec lorazépam comme étalon interne est de l'ordre de 32 et 29% sur le 1er et le 2e pic de TMZ-NEI respectivement (Tableau 12). Ces variations sur les pentes sont augmentées de façon appréciable par rapport aux courbes de calibration dépourvues d'étalon interne. Voir. Figure 40 à Figure 45

Malgré l'augmentation de la variation entre les pentes des courbes effectuées lors de journées différentes, on observe quand même une relation linéaire entre le rapport des hauteurs de pics et la concentration de TMZ mise à réagir .



| | pentes des courbes | |
|--------------------|--------------------|----------------|
| | TMZ-NEI 1er pic | TMZ-NEI 2e pic |
| Figure 40 | 0.001 | 0.001 |
| Figure 41 | 0.0009 | 0.0009 |
| Figure 42 | 0.0016 | 0.0015 |
| Figure 43 | 0.0017 | 0.0016 |
| Figure 44 | 0.0009 | 0.0009 |
| Figure 45 | 0.0009 | 0.0009 |
| moy | 0.0012 | 0.0011 |
| dév std | 0.0004 | 0.0003 |
| dév std/moy | 0.3238 | 0.2882 |

Tableau 12: Comparaison des pentes des courbes de calibration non extraites du TMZ-NEI avec étalon interne; lorazepam

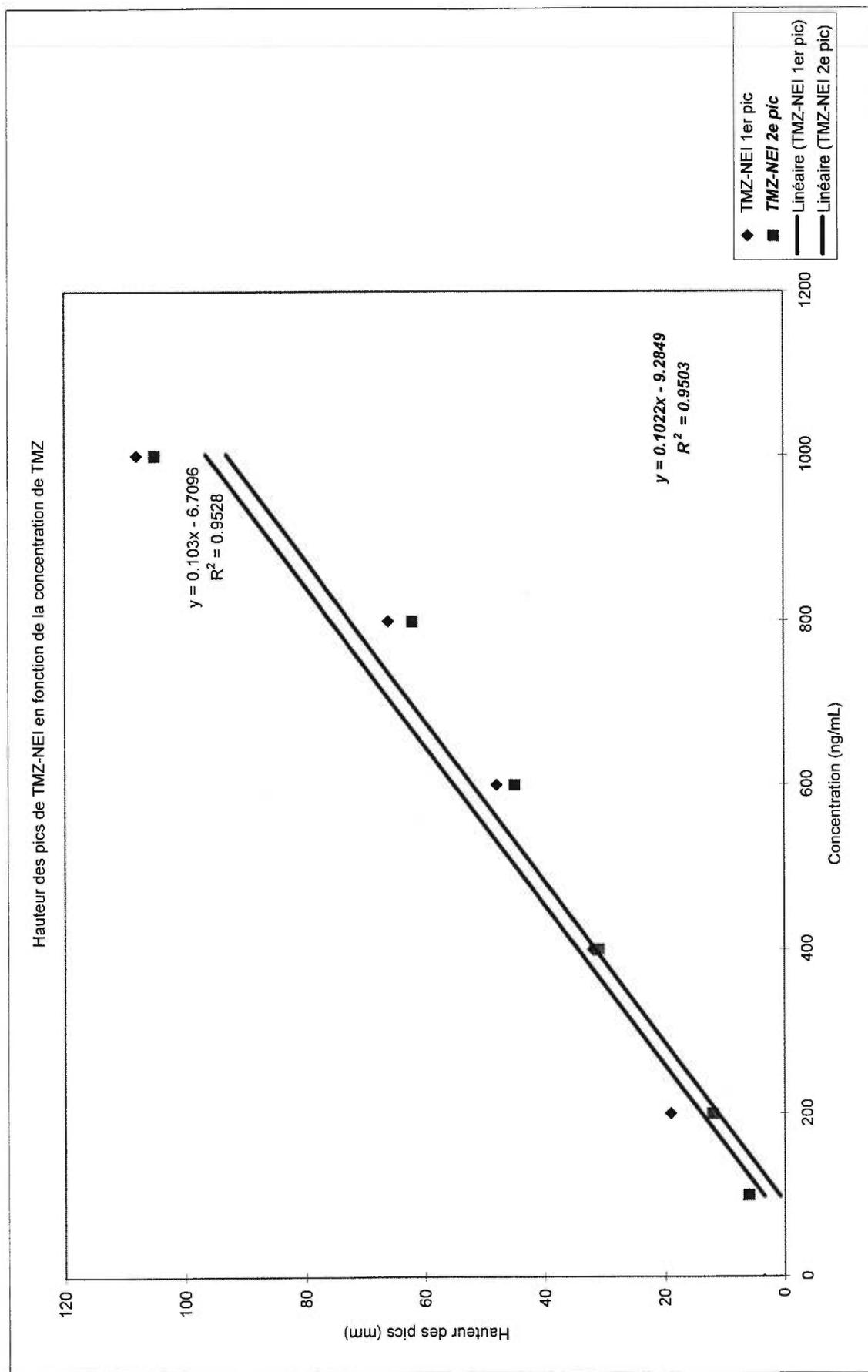


Figure 38: Courbe de calibration non extraite du TMZ-NEI

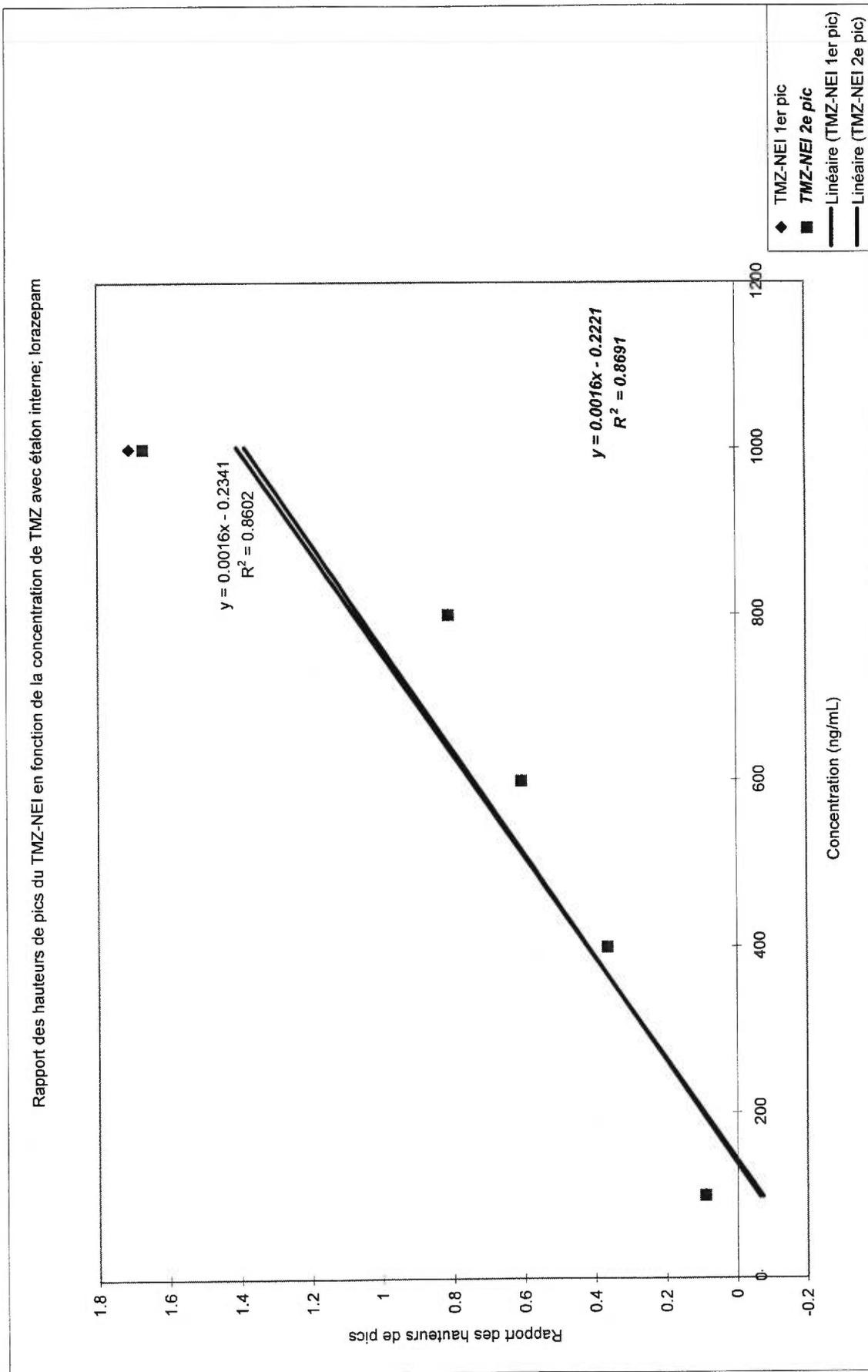


Figure 39: Courbe de calibration non extraite du TMZ-NEI avec étalon interne; lorazepam

L'augmentation de la variation s'explique en partie par l'ajout de l'étalon interne dont la réaction avec le NEI est aussi difficile qu'avec le TMZ. Cette difficulté s'explique par la propension que le NEI a, de se lier plus facilement avec des groupes aminés ou avec des groupes alcools moins encombrés, comme l'eau par exemple; et par la rareté du TMZ et du lorazépam, par rapport à la multitude d'interférences, présents à des concentrations de l'ordre du nanogramme au cours de la réaction. Aussi précédemment, on a démontré qu'en augmentant l'excès de NEI, on augmentait le rendement de la réaction tout en augmentant le nombre d'interférences. Dans les Figure 38 et Figure 39, on se rend compte que plus on diminue l'excès de NEI, plus il devient difficile d'avoir une relation linéaire entre les hauteurs des pics et sa concentration. En effet, lorsqu'on regarde les Figure 38 et Figure 39, où l'excès molaire de la Figure 39 est diminué de moitié par rapport à la Figure 38 à cause de la présence de l'étalon interne, on voit que le coefficient de détermination (r^2) diminue de façon importante.

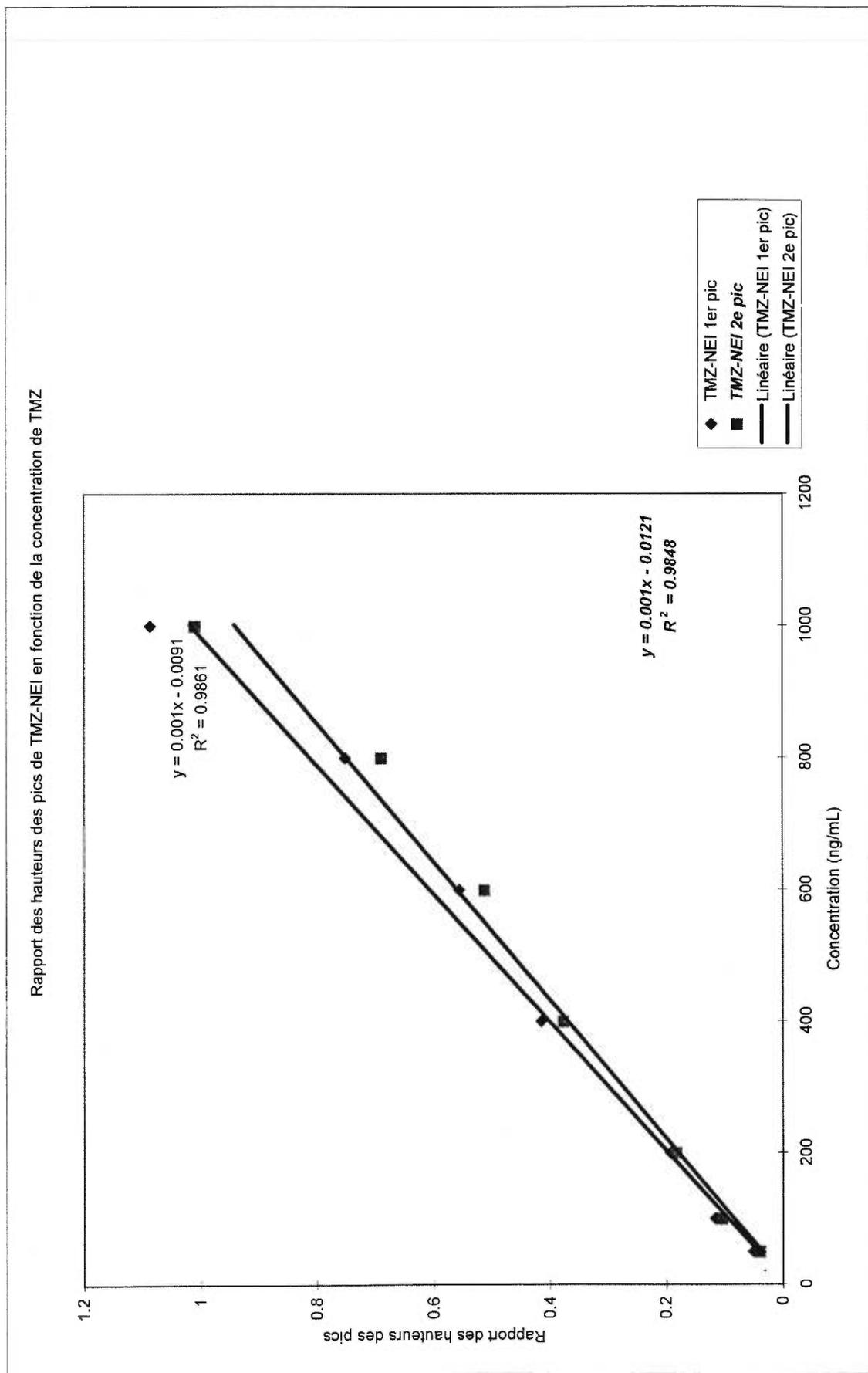


Figure 40: Courbe de calibration du TMZ-NEI non extraite avec étalon interne; lorazepam

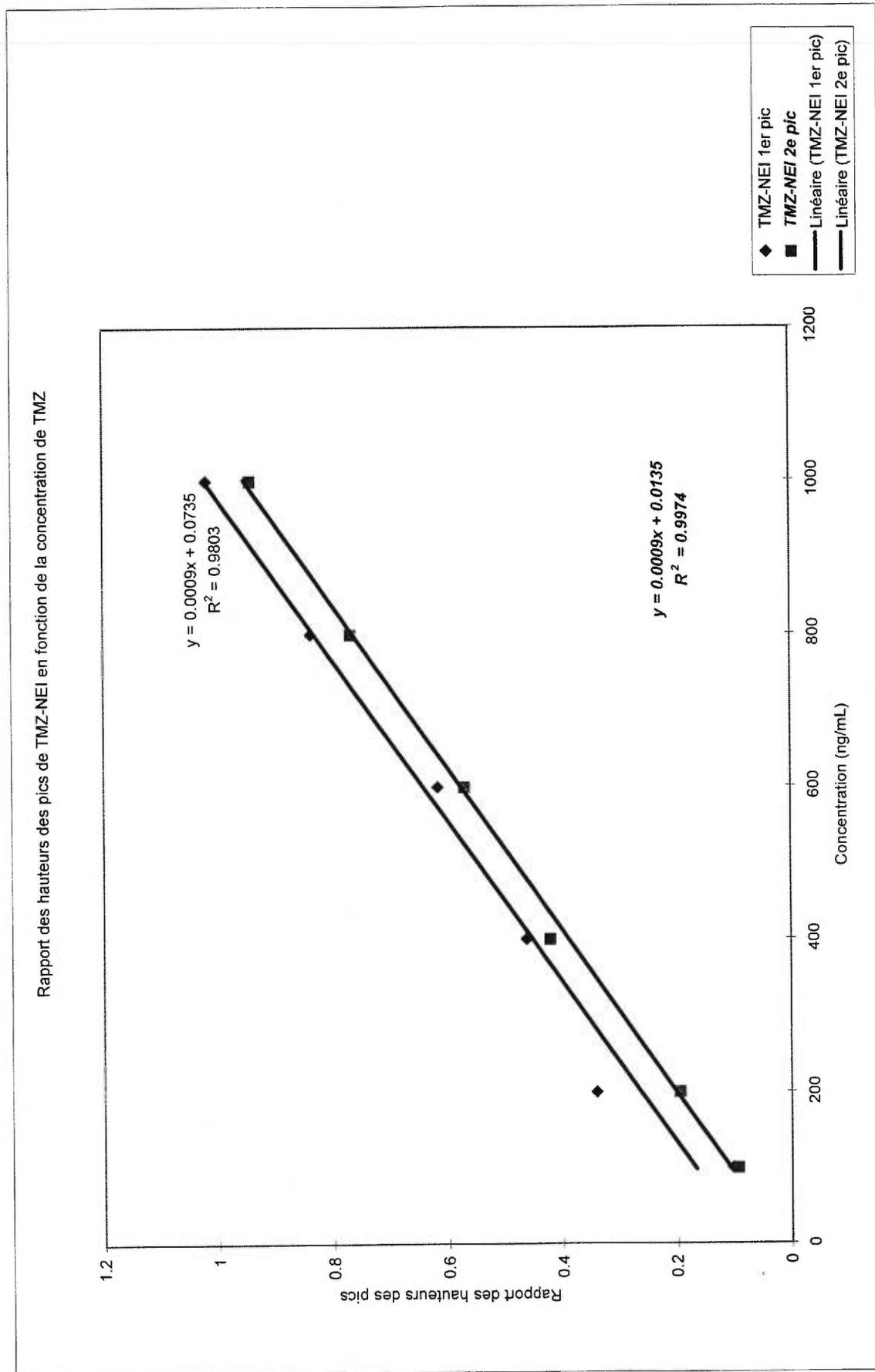


Figure 41: Courbe de calibration non extraite du TMZ-NEI avec étalon interne; lorazepam

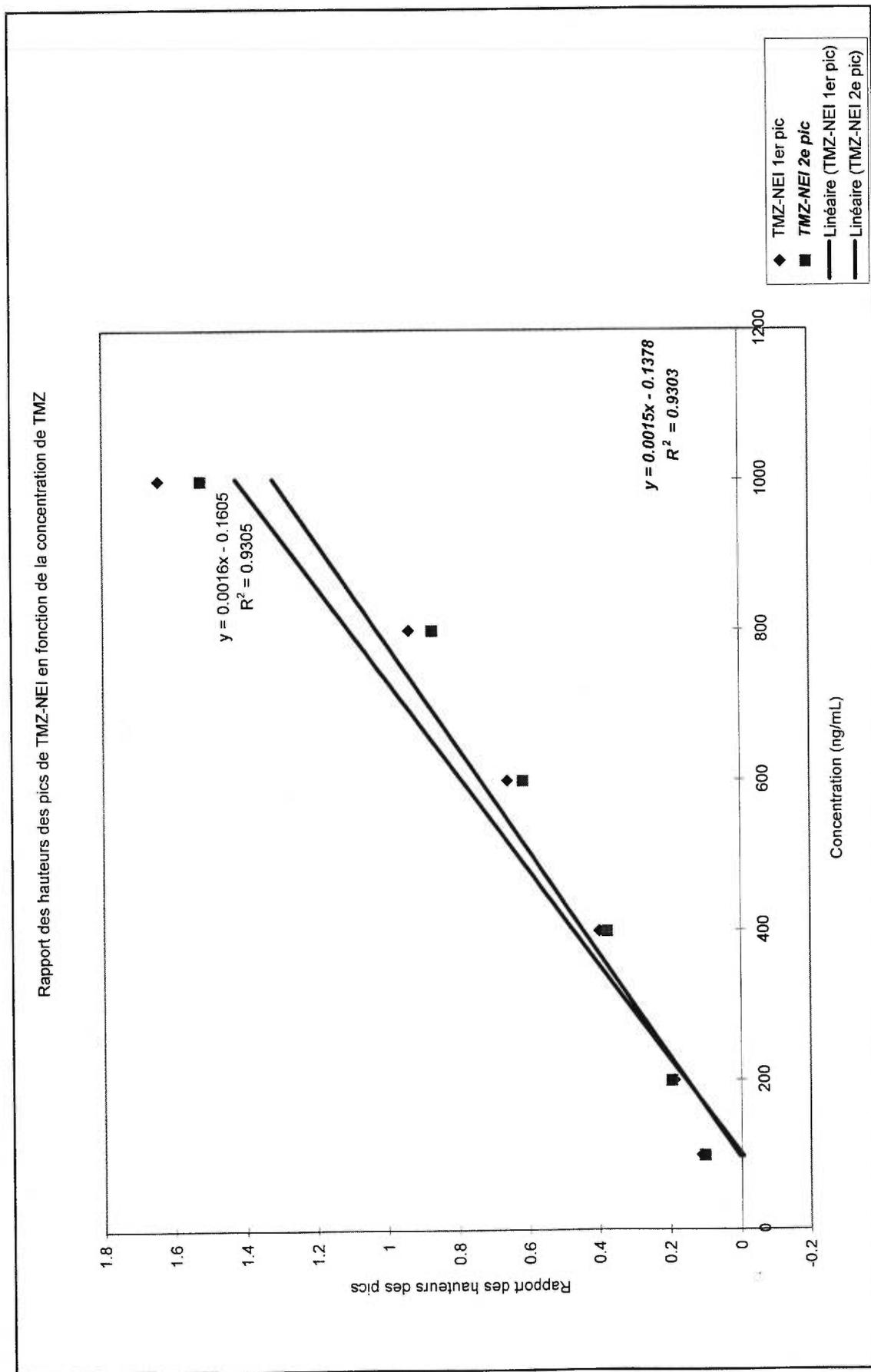


Figure 42: Courbe de calibration non extraite du TMZ-NEI avec étalon interne; lorazepam

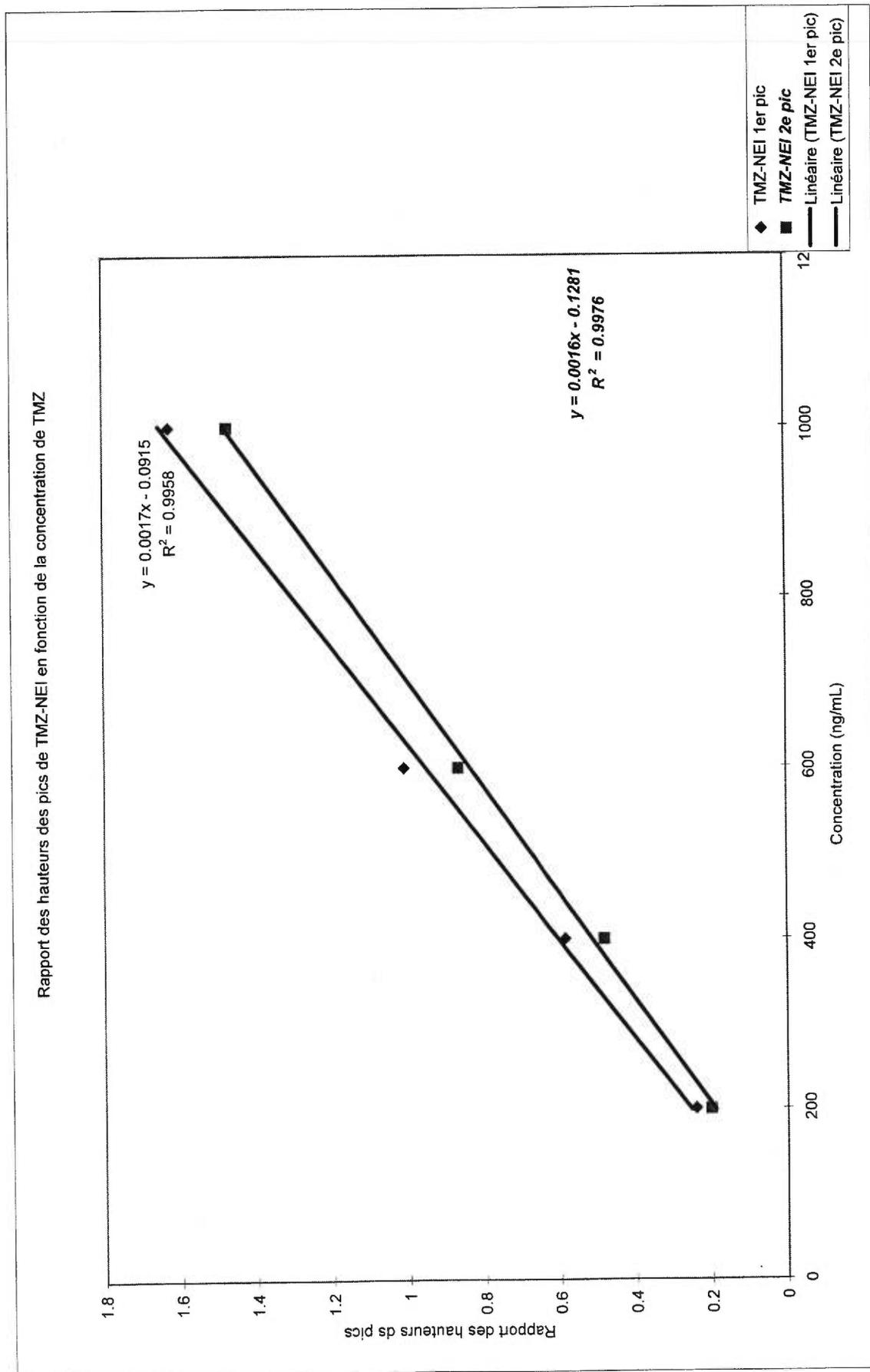


Figure 43: Courbe de calibration non extraite du TMZ-NEI avec étalon interne; lorazepam

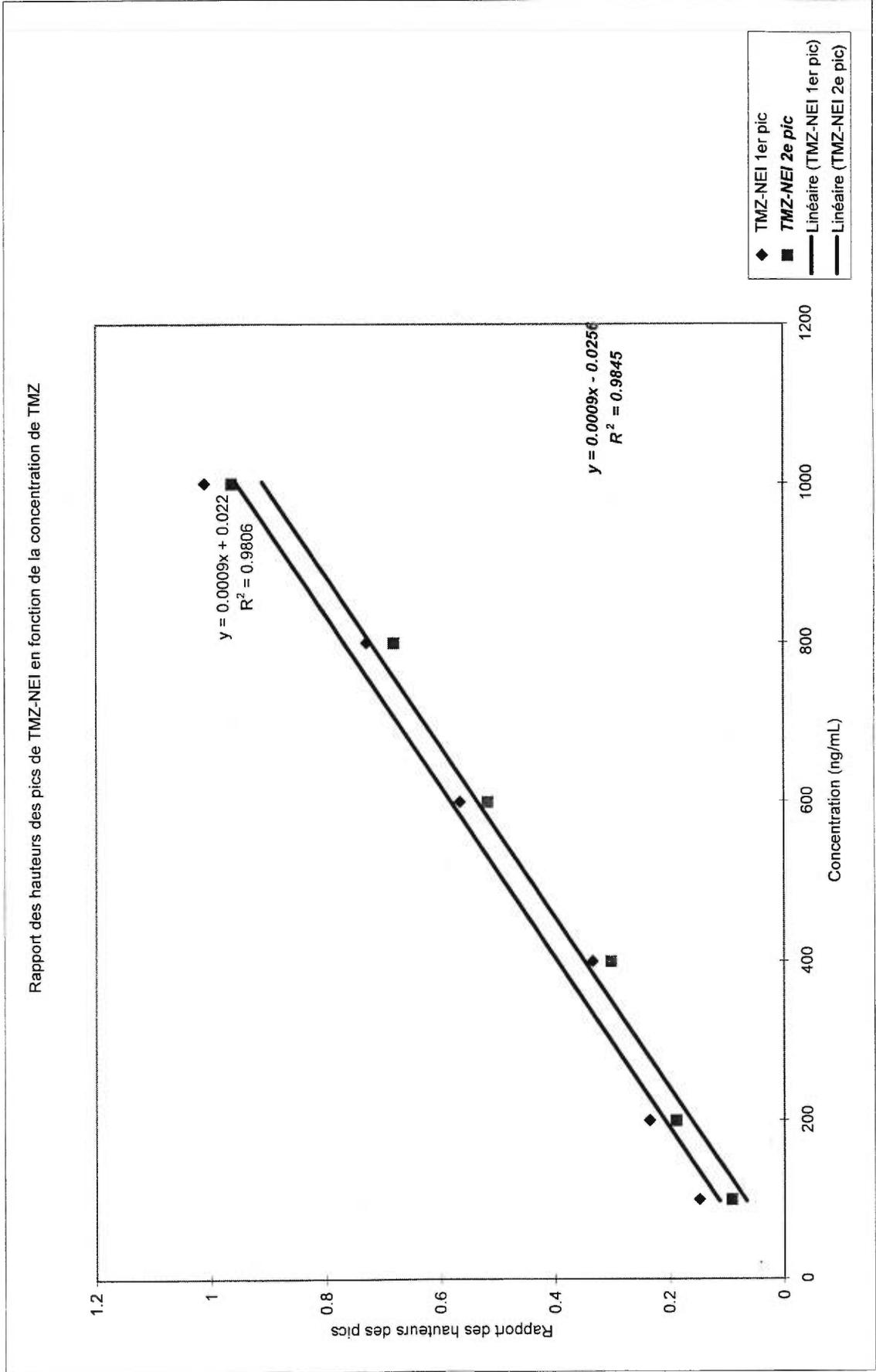


Figure 44: Courbe de calibration non extraite du TMZ-NEI avec étalon interne; lorazepam

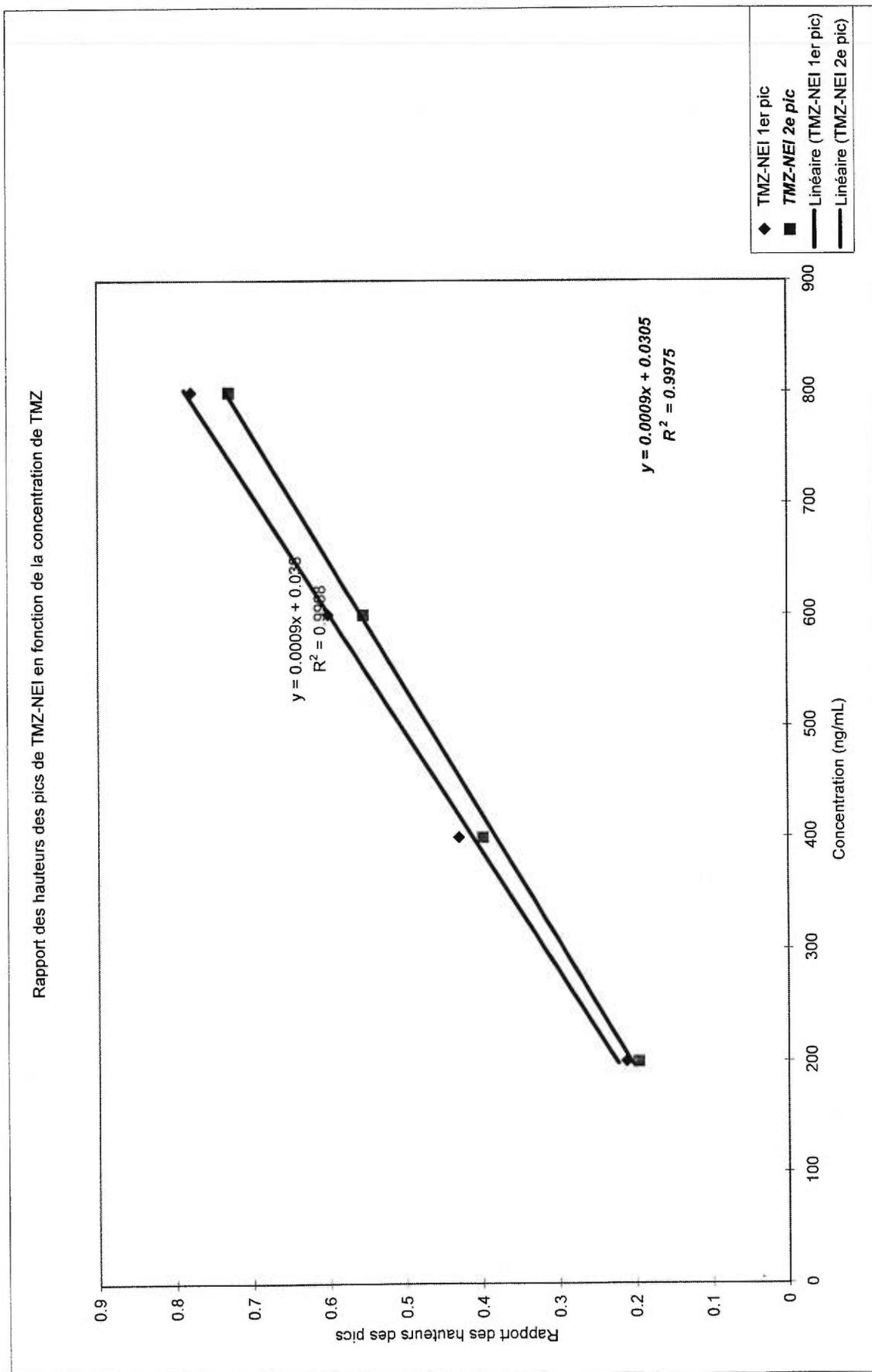


Figure 45: Courbe de calibration non extraite du TMZ-NEI avec étalon interne; lorazepam

Mise au point d'une méthode de couplage du témazépam avec le NEI dans une matrice plasmatique

Méthode analytique

Matériel

- Le plasma humain contrôlé a été obtenu de la Croix-Rouge canadienne
- membrane de dialyse: hémodialyseur/filtre Crystal AN69XS Hospal industrie, Meyzieu, France
- colonne Chirex de Phenomenex: S-Leucine et R-naphthyléthylamine #87645, 250 x 4,60mm

Méthode

- extraction utilisée lors de la mise au point de l'analyse du témazépam inchangé
- méthode de couplage TMZ-NEI décrite ci-dessus

Résultats et discussion

Après plusieurs essais, il nous a été possible d'obtenir une bonne régression linéaire pour nos 2 pics d'intérêt à partir d'une matrice plasmatique. La validation à l'aide de courbes congelées pouvait commencer. La première journée, le plasma est frais et les résultats obtenus ont été ceux que nous avons prédits, voir Figure 46. Le lendemain, avec la première courbe congelée, nous avons obtenu des résultats que nous n'avions pas prévus, voir Figure 47. En effet, la pente de la courbe du TMZ-NEI-1^{er} pic n'est pas parallèle à celle du TMZ-NEI-2^e pic.

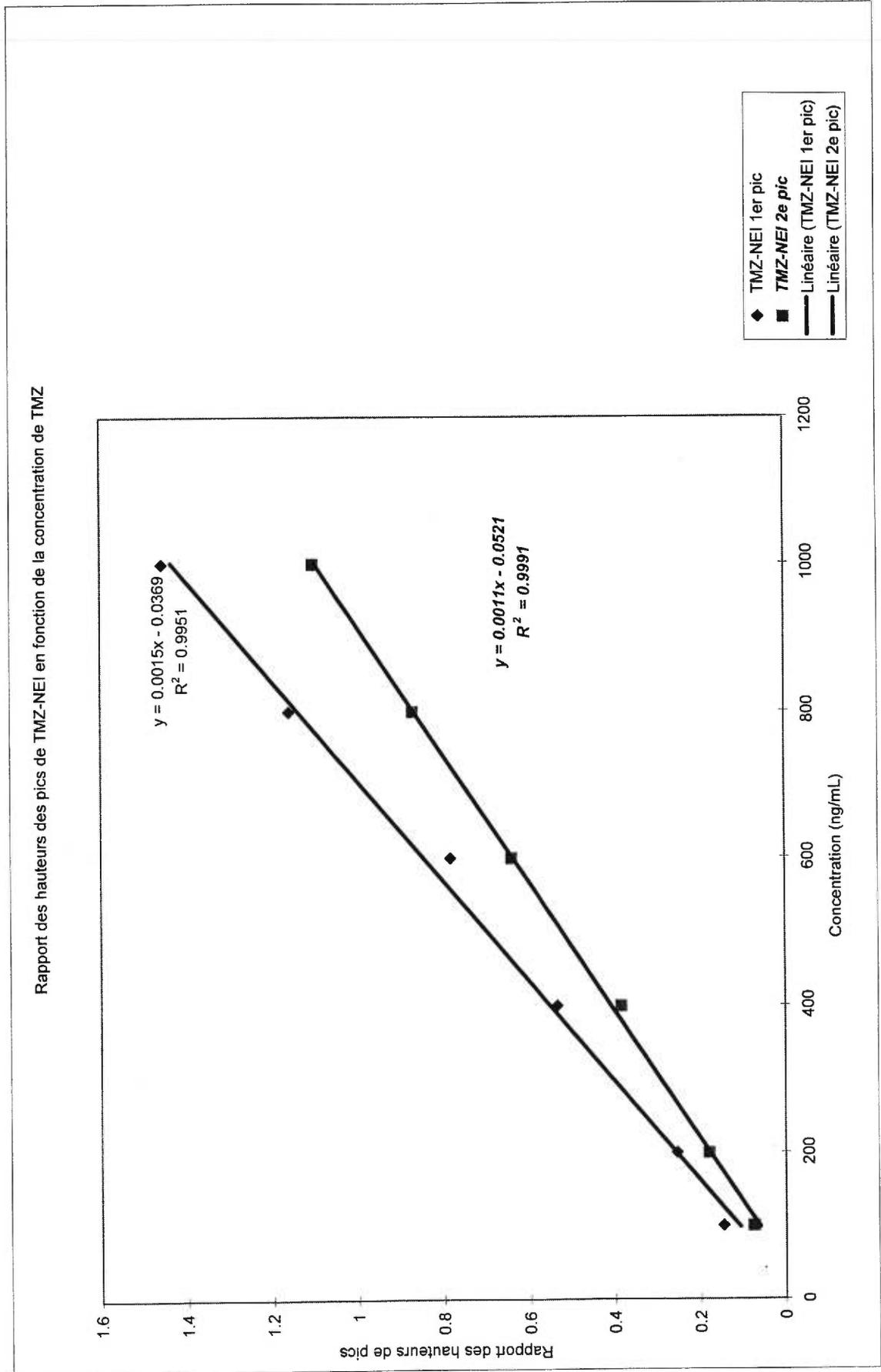


Figure 46: Courbe de calibration extraite, du plasma, du TMZ-NEI avec étalon interne; lorazepam

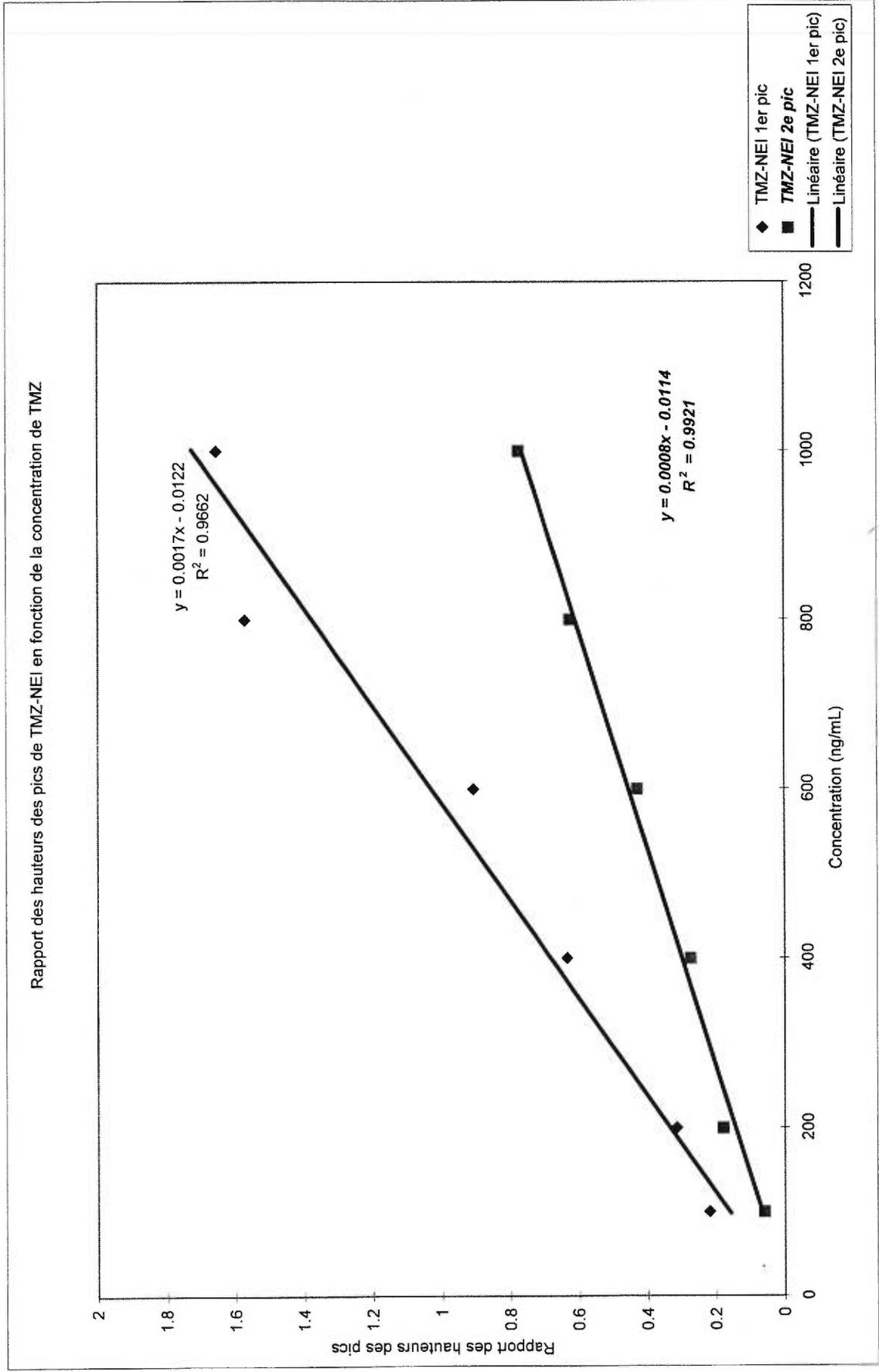


Figure 47: Courbe de calibration extraite après avoir été congelée 24 heures, du TMZ-NEI avec étalon interne; lorazepam

C'est à partir de ce moment que nous avons évalué plusieurs hypothèses pour solutionner ce problème. Tout d'abord, nous avons supposé qu'il s'agissait d'une extraction stéréosélective causée par une liaison aux protéines différente pour chacun des deux énantiomères et qui serait mise en évidence dans le temps ou dans le plasma congelé.

Étant donné que notre méthode d'extraction avait démontré un recouvrement de plus de 89% pour le témazépam, en augmentant ce recouvrement jusqu'à l'unité, les variations liées à une extraction stéréosélective disparaîtraient du même coup. Or, en changeant les solvants d'extraction, en modifiant leur teneur respective, le recouvrement n'a pas été augmenté. Ensuite, nous avons essayé d'extraire par une précipitation des protéines avec des solvants organiques, d'abord et ensuite avec de l'acide perchlorique. Ici, encore, aucune méthode d'extraction nous a permis d'obtenir un recouvrement de 100%. Au mieux, nous avons obtenu des résultats semblables.

Étant dans l'impossibilité d'augmenter de façon significative le recouvrement plasmatique du témazépam, nous avons abordé l'hypothèse de la liaison protéique stéréosélective d'un autre point de vue. Nous avons décidé d'observer le comportement du témazépam à travers une membrane de dialyse où seul le témazépam libre traverse la membrane. Certains auteurs ont déterminé la fraction libre du témazépam plasmatique à $5,4 \pm 2.5\%$. Ainsi, en mettant d'un côté de la membrane du plasma frais ou ayant été congelé contenant du TMZ et de l'autre une solution saline isotonique dépourvue de TMZ, on peut effectuer des prélèvements de part et d'autre pour suivre les vitesses de transfert de chacun des isomères. Cette technique implique tout de même la réaction des énantiomères avec le NEI.

Après 3 heures de dialyse, 88% de l'état d'équilibre est atteint; i.e. concentration en TMZ inchangé à la sortie/concentration en TMZ à l'entrée lors de l'utilisation d'une matrice NaCl isotonique. D'après les premières données de Badcock, l'état d'équilibre est atteint après 18 heures de dialyse⁷⁵. Avant d'atteindre l'équilibre de part et d'autre de la membrane de dialyse, nous nous sommes intéressés au comportement de chacun des isomères dans le temps (3,5,16,20 hres). Lorsque l'on regarde le rapport des hauteurs du 1er pic de TMZ-NEI/2e pic de TMZ-NEI, on

remarque qu'avant la membrane de dialyse le rapport est supérieur à l'unité et qu'après la membrane, le rapport est inférieur à l'unité 3 fois sur 4. Cette variabilité de part et d'autre de la membrane de dialyse est peut-être causée par une liaison aux protéines préférentielle qui entraînerait à son tour des niveaux de réaction, avec le NEI, différents pour chacun des énantiomères du témazépam.

Ensuite, on a tenté de voir l'effet d'un changement de pH des solutions tampon sur le rapport des hauteurs de pics. On a changé le type de tampon lors de l'extraction. On a utilisé un tampon phosphate à pH 7,4 plutôt qu'un tampon borate à pH 9,75. Nous avons fait des essais avec des concentrations de 150, 500 et 900ng de TMZ dans le plasma. Nous avons comparé des échantillons frais à des échantillons qui ont été congelés.

D'abord, on s'est rendu compte que dans le plasma frais, les résultats étaient généralement plus stables que dans le plasma congelé quoique pour les petites concentrations, on a aussi remarqué de la variation. En ce qui a trait à la différence entre les différents tampons, on croit remarquer que le tampon phosphate a moins de ratios déviant de la moyenne pour les échantillons congelés par rapport au tampon borate.

Avec une diminution du pH du tampon (de borate à phosphate: pH 9,75 à 7,4), nous avons observé une diminution de l'occurrence de résultats déviants sans toutefois les exclure totalement dans le plasma congelé. Nous avons poursuivi avec le tampon acétate 0,2M à pH 4,8 et nous avons comparé à des échantillons qui ont été extraits avec le tampon phosphate.

Il semble y avoir peu de résultats déviants et en même temps, presque tous les ratios pour le tampon phosphate sont inférieurs à l'unité, ce qui diffère des résultats précédents obtenus pour la même analyse. Devant autant de variation, nous nous devons de tenter de cerner les mécanismes qui influencent la réaction.

Tableau 13: Comparaison entre les tampons d'extraction acétate et phosphate sur les ratios des hauteurs des pics de TMZ-NEI: 1er pic/ 2e pic

| concentration (ng/mL) de TMZ et type de plasma | tampon acétate: pH: 4,8 (1er pic / 2e pic) | tampon phosphate pH: 7,4 (1er pic / 2e pic) |
|---|--|---|
| 150: plasma congelé | 1.13 | 0.91 |
| 150: plasma congelé | 1.26 | 0.88 |
| 150: plasma frais | - | 0.87 |
| 150: plasma frais | 1.09 | 0.94 |
| 500: plasma congelé | 1.05 | 0.97 |
| 500: plasma congelé | 1.09 | 0.99 |
| 500: plasma frais | 0.97 | 0.99 |
| 500: plasma frais | 0.98 | 0.97 |
| 900: plasma congelé | 1.04 | 1.00 |
| 900: plasma congelé | 1.01 | 1.02 |
| 900: plasma frais | 1.00 | 0.98 |
| 900: plasma frais | 0.97 | 0.98 |

Tableau 14: Comparaison entre les tampons d'extraction phosphate et borate sur les ratios des hauteurs des pics de TMZ-NEI: 1er pic / 2e pic

| concentration(ng/mL) de TMZ et type de plasma | tampon phosphate pH: 7,4 (1er pic / 2e pic) | tampon borate pH: 9.75 (1er pic / 2e pic) |
|--|---|---|
| 150: plasma congelé | 1.06 | 2.30 |
| 150: plasma congelé | 1.43 | 1.87 |
| 150: plasma frais | 1.15 | 1.23 |
| 150: plasma frais | 1.12 | 1.25 |
| 500: plasma congelé | 1.12 | 1.90 |
| 500: plasma congelé | 2.16 | 1.75 |
| 500: plasma frais | 1.10 | 1.12 |
| 500: plasma frais | 1.10 | 1.09 |
| 900: plasma congelé | 1.86 | 1.13 |
| 900: plasma congelé | 1.36 | 1.16 |
| 900: plasma frais | 1.09 | 1.08 |
| 900: plasma frais | 1.06 | 1.11 |

Bien que nos objectifs de départ impliquaient l'utilisation d'une colonne non chirale et d'un dérivé, l'utilisation d'une colonne chirale pourrait nous donner de précieuses informations. En éluant le témazépam sur colonne chirale, cela nous a permis d'éviter de dériver. Ainsi, il nous a été impossible d'obtenir une séparation complète mais en recueillant la première et la dernière portion du pic élué, la pureté des pics était supérieure à 95%. Ensuite, une fois les énantiomères purs en main, nous leur avons fait subir différents traitements apparentés aux étapes de l'analyse décrites précédemment. Ainsi, en mettant un énantiomère pur du témazépam dans 1mL d'eau, 0,5mL de tampon (acétate pH: 4,5 ou tampon phosphate pH: 7,4), agitation 10min et centrifugation 10min, et évaporation à l'azote à température pièce ou à l'aide d'un bain chauffant à 55°C; lors de la réinjection des énantiomères, on se rend compte que le ratio entre le premier et le deuxième pic est quasiment identique. Or, ce changement de configuration suggère que les conditions d'analyse choisies soient propices à la racémisation. En mettant en évidence une vitesse de racémisation plus rapide que la vitesse d'analyse, nous démontrons que ce projet n'est pas réalisable. En effet, si nous tentons de mesurer des différences pharmacocinétiques entre les deux énantiomères et qu'il existe une racémisation imputable à l'analyse, les résultats obtenus ne pourront pas être interprétés comme étant le reflet de la réalité in vivo. Il s'agira plutôt d'un artefact d'analyse. Ces résultats surprenants nous ont amenés à aller voir à nouveau ce qui a été publié à ce sujet pour des produits analogues.

Tout d'abord, plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la racémisation des 1,4 benzodiazépines: échange nucléophile, tautomérie^{72,76}

La difficulté de déterminer le mécanisme de racémisation réside dans le fait qu'il est difficile d'obtenir des énantiomères purs. Parmi les 1,4 benzodiazépines, la tautomérie est possible seulement pour les molécules possédant un groupe hydroxyl en C-3, comme le témazépam.

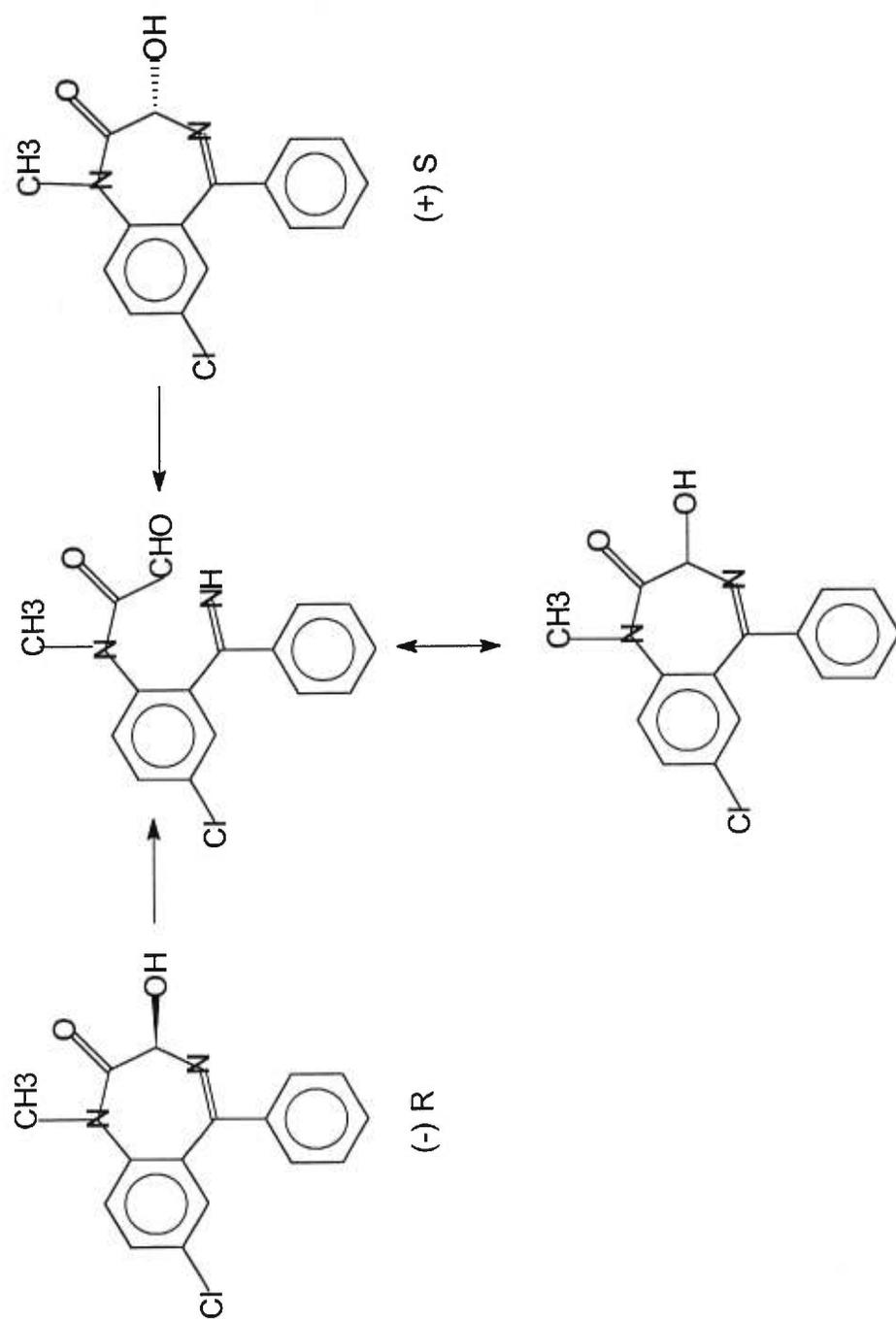


Figure 48: un mécanisme pour expliquer la racémisation: la tautomérie

Lorsqu'on étudie la racémisation, la vitesse de racémisation est souvent déterminée. En effet, si la vitesse de racémisation est lente *in vivo*, on pourra étudier la pharmacocinétique de chacun des énantiomères séparément. Tandis que si la vitesse de racémisation est rapide, l'équilibre entre les énantiomères sera tel, qu'il nous sera impossible de prévoir leur influence individuelle dans leur disposition. Ainsi, certains ont été capables de déterminer la vitesse de racémisation de l'oxazépam en hydrolysant l'oxazepam-3-acétate car ils ont trouvé des conditions où la vitesse d'hydrolyse est supérieure à la vitesse de racémisation. A zéro degré Celcius, ils ont déterminé un $t_{1/2}$ de 430min. et à 20°C, un $t_{1/2}$ d'environ 15,8min⁷⁷. D'autres, ont déterminé un $t_{1/2}$ de racémisation de l'ordre de 28 min pour l'oxazépam⁷⁸. Ils ont aussi rapporté que lors de l'évaporation à chaud, ils avaient observé beaucoup de racémisation et que la présence d'alcool favorisait la racémisation rapide des énantiomères⁷⁸. Le solvant d'élution des énantiomères du témazépam favorisait aussi la racémisation lors de l'évaporation à chaud tel que nous avons été en mesure de l'expérimenter, d'autant plus que notre phase mobile contenait une petite quantité d'éthanol. Ainsi, il devient difficile de trouver des solvants qui permettent la séparation des énantiomères tout en permettant leur stabilité une fois élués. Un mélange de dioxane:2-propanol:hexane a permis de déterminer le $t_{1/2}$ de racémisation de plusieurs benzodiazépines dont l'oxazépam et le témazépam avec la colonne chirale R-DNPG⁷⁸. Le pH est un autre facteur qui peut influencer la vitesse de racémisation. Ainsi, pour l'oxazépam, un pH alcalin(pH>10) augmente la vitesse de racémisation tandis qu'un pH acide(pH<2) stabilise les énantiomères⁷⁸. Ces données sont contradictoires avec nos résultats étant donné que les rapports des hauteurs de pic (1er pic/2epic) étaient les plus instables lorsque nous utilisons un tampon borate à pH 11,2 alors que ce dernier de par sa nature basique aurait dû favoriser la racémisation des énantiomères. En plus d'étudier la racémisation de plusieurs dérivés de benzodiazépines, la vitesse de racémisation de chacun des énantiomères a été comparée. Ainsi, pour certains dérivés de l'oxazépam, la vitesse de racémisation est semblable pour les deux énantiomères.^{79, 80,81}

Hypothèse pour expliquer les différences de ratio à partir des échantillons qui ont été congelés

Si la racémisation pour les 1,4-benzodiazépines prédit un ratio entre les énantiomères près de l'unité, comment expliquer, des ratios différents de l'unité et inconstants pour les échantillons congelés étudiés? Peut-être s'agit-il d'un changement au niveau de la conformation.

On a déjà discuté de la stéréosélectivité de l'énantiomère S des 1,4-benzodiazépines pour l'albumine. Certains chercheurs ont décrit une sélectivité du conformère M pour la liaison à l'albumine. Or, il se trouve que pour les benzodiazépines étudiées, l'énantiomère S serait plus abondant sous la conformation M tandis que l'énantiomère R serait plutôt sous la conformation P. Ici, le point de vue des conformères est compatible avec les énantiomères. Aussi, un changement de conformation serait possible du M vers le P et probablement pas l'inverse.⁴⁵ La racémisation seule ne réussit pas à expliquer les résultats obtenus dans le plasma congelé, c'est pourquoi on pourrait supposer que la congélation aurait un effet sur la conformation des énantiomères. Cependant, pour que cette hypothèse soit compatible avec la racémisation, il faudrait supposer que ce changement de conformation ou la congélation aurait un effet sur la vitesse de racémisation ce qui nous a permis de constater des ratios différents.

Conclusion

Plusieurs aspects ayant trait au témazépam n'auront été qu'un leurre. Au niveau chimique, le fait que ce médicament possède un carbone asymétrique rendait l'étude cinétique de chacun des énantiomères intéressante. Au niveau biologique, le fait qu'il y ait des évidences de stéréosélectivité pour des molécules analogues avait consolidé nos espoirs. Enfin, au niveau analytique, le fait que plusieurs colonnes chirales puissent séparer des énantiomères de benzodiazépines avait donné le coup d'envoi à ce projet. A posteriori, il est facile d'affirmer que ce projet n'était pas réalisable dès le départ à cause de la racémisation rapide des énantiomères du témazépam. Cependant, aucun chimiste rencontré tout au long de ce projet n'a pu nous prévenir de ce phénomène. Aussi, ce n'est que lorsque nous avons consulté la revue *Chirality*, qui n'est pas répertoriée dans le *Medline* que nous avons pris conscience de la racémisation de quelques 1,4-benzodiazépines analogues.

Au cours de la validation, nous avons obtenu des résultats différents dans le plasma congelé par rapport aux résultats *in vitro* et à ceux dans le plasma frais. C'est à cause de ces résultats que nous avons emprunté une colonne chirale. Ironie du sort, la colonne chirale nous a permis de constater la racémisation rapide du témazépam mais ne nous a pas permis d'expliquer les résultats dans le plasma congelé. Qui plus est, ces résultats sont en contradiction avec la racémisation. La racémisation rapide implique des concentrations de témazépam égales en tout temps et nous avons observé des rapports de hauteurs de pics des diastéréoisomères du témazépam très variables dans le plasma congelé malgré l'utilisation du racémate. Un changement de conformation pourrait peut-être tenir lieu de clef de voûte dans cette affaire de ratios variables dans le plasma congelé.

Références

- ¹ Berruta LA, Gallo B, Vincente F. Biopharmacological data and high-performance liquid chromatographic analysis of 1,4-benzodiazepines in biological fluids: a review. *J Pharmaceutical and Biomed Anal* 1992;10(2/3):109-36.
- ² Hansh C, Sammes PG, Taylor JB, Drayton CJ, eds. *Comprehensive medicinal chemistry. The rational design, mechanistic study and therapeutic application of chemical compounds, vol.6: Cumulative subject index and drug compendium.* Oxford: Pergamon Press, 1990
- ³ Rall TW. Hypnotics and sedatives; ethanol. In: Goodman Gilman A, Rall TW, Nies AS, Taylor P eds. *Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics.* eight ed. Toronto: Pergamon Press; 1990:345-82.
- ⁴ Sternbach LH. The benzodiazepine story. In: Priest RG, Vianna Filho U, Amrein R, Skreta M, eds. *Benzodiazepines Today and Tomorrow.* Baltimore: University Park Press; 1980:5-17.
- ⁵ Sternbach LH, Randall LO, Banziger LH. Structure-activity relationships in the 1,4-benzodiazepine series. In: Burger A. ed. *Drugs affecting the central nervous system, 2.* New York: Marcel Dekker Inc; 1968:237-64.
- ⁶ Haefely W, Polc P, Pieri L, et al. Neuropharmacology of benzodiazepines: synaptic mechanisms and neural basis of action. In: Costa EC, ed. *The benzodiazepines: from molecular biology to clinical practice.* New York: Raven Press; 1983:21-66.
- ⁷ Haefely WE. Biological basis of the therapeutic effects of benzodiazepines. In: Priest RG, Vianna Filho U, Amrein R, Skreta M, eds. *Benzodiazepines today and tomorrow.* Baltimore: University Park Press; 1980:19-45.
- ⁸ Bailey L, Ward M, Musa MN. Clinical pharmacokinetics of benzodiazepines. *J Clin Pharmacol* 1994;34:804-11.

-
- ⁹ Braestrup C, Nielsen M, Honore T, Petersen EN, Jensen LH. Benzodiazepine receptor ligands with positive and negative efficacy. *Neuropharmacology* 1983; 22: 1451-7.
- ¹⁰ Klepner C, Lippa AS, Benson DI, Sano MC, Beer B. Resolution of two biochemically and pharmacologically distinct benzodiazepine receptors. *Pharmac Biochem Behav* 1979; 11: 457-62.
- ¹¹ Sieghart W, Karobath M. Molecular heterogeneity of benzodiazepines receptors. *Nature* 1980; 286: 285-7.
- ¹² Sieghart W, Eichinger A, Riederer P, Jellinger K. Comparison of benzodiazepinesreceptor binding in membranes from human or rat brain. *Neuropharmacology* 1985; 24: 751-9.
- ¹³ DeSarro GB, Zappala M, Grasso S, Chimiri A, DeSarro A.. Molocular requirement for anticonvulsant activity in a series of thiazolo-1,4-benzodiazepine derivatives and comparison with classical benzodiazepines. *Gen Pharmac* 1993; 24(4):877-84.
- ¹⁴ Polc P, Bonetti EP, Schaffner R, Haefely W. A three state model of the benzodiazepine receptor explains the interaction between the benzodiazepine antagonist Ro 15.1788, benzodiazepines tranquilizers, β -carbolines and phenobarbitone. *Naunyn-Schmiedeberg's Archs Pharmac* 1982; 321: 260-4.
- ¹⁵ Schofield PR, Darlison MG, Fujita N, Burt DR, Stephenson FA, Rodriguez H, Rhee LM, Ramachadran J, Reale V, Glencorse TA. Sequence and functional expression of the GABA receptor shows a ligand-gated recoptor superfamily. *Nature* 1987; 328: 221-7.
- ¹⁶ Stephenson FA,. Understanding the GABA-receptor: A chemically gated ion channel. *Biochem* 1988; 249: 21-32.
- ¹⁷ Baldessarini RJ. Drugs and the treatment of psychiatric disorders. In: Goodman Gilman A, Rall TW, Nies AS, Taylor P. eds. *Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*. eight ed. Toronto: Pergamon Press;1990:383-435.

-
- ¹⁸ Fucella LM, Bolcioni G, Tamassia V, Ferrario L, Tognoni G. Human pharmacokinetics and bio-availability of temazepam administered in soft gelatin capsules. *Eur J Clin Pharmacol* 1977;12:383-6.
- ¹⁹ Fucella LM, Bolcioni G, Tamassia V, Ferrario L, Tognoni G. Human pharmacokinetics and bio-availability of temazepam administered in soft capsules. *Eur J Clin Pharmacol* 1977;12:383-6.
- ²⁰ Briggs RS, Castleden M, Kraft CA. Chlormethiazole and temazepam. *Br Med J* 1980;280:1085-6.
- ²¹ Huggett A, Flanagan RJ, Cook P, Crome P, Corless D. . Chlormethiazole and temazepam. *Br Med J* 1981; 282:475.
- ²² Mc Elnay JC, Jones ME, Alexander B. Temazepam. *Drug Intell Clin Pharm* 1982;16:650-6.
- ²³ Heel RC, Brogden RN, Speight TM, Avery GS. Temazepam: A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy as an hypnotic. *Drug* 1981;21:321-40.
- ²⁴ Greenblatt DJ, Shader RI. Benzodiazepines in clinical practice. New York: Raven Press, 1974;12,191.
- ²⁵ Haefely W, Pieri L, Polc P, Schaffner R. General pharmacology and neuropharmacology of benzodiazepines derivatives. In: Hofmeister F, Stille G eds. *Psychotropic Agents, Handbook of experimental pharmacology*, vol 55,II. Berlin:Springer 1981:13-262.
- ²⁶ Gamzu ER,. The role of benzodiazepines in amnesia: laboratory predictors. *J Clin Psychiatry Monogr* 1987;5:8-13.
- ²⁷ Scharf MB, Saskin P, Fletcher K. Benzodiazepines-induced amnesia: clinical and laboratory findings. *J Clin Psychiatry Monogr* 1987;5:14-7.

-
- ²⁸ Scharf MB, Fletcher K, Graham JP. Comparative amnestic effects of benzodiazepine hypnotic agents. *J clin Psychiatry* 1988;49:134-7.
- ²⁹ Food and Drug Administration. FDA adverse experiences spontaneous reporting system: Compararison of restoril, dalmane and halcion. Washington: US Government Printing Office, 1985.
- ³⁰ Bittencourt P, Richens A, Toseland PA, Wicks JFC, Latham AN. Pharmacokinetic of the hypnotic benzodiazepine, temazepam. *Br J Pharmac* 1979; 8:37S-38S.
- ³¹ Abolin C, Hwang DS, Mazza F. Bioavailability of temazepam: comparison of four 7,5mg capsules with a single 30mg capsule. *The Annals of Pharmacotherapy* 1993;27:695-9.
- ³² Fraschini F, Stankov B, Temazepam: pharmacological profile of a benzodiazepine and new trends in its clinical application. *Pharmacological Research* 1993;27(2):97-113.
- ³³ Divoll M, Greenblatt DJ, Harmatz JS, Shader RI. Effect of age and gender on disposition of temazepam. *J Pharm Sci* 1981;70:1104-7.
- ³⁴ Greenblatt DJ, Divoll M, Abernethy DR, Ochs HR. Benzodiazepine kinetics: implications for therapeutics and pharmacogeriatrics. *Drug Metab Rev* 1983; 14(2):251-92.
- ³⁵ Moschitto LJ, Greenblatt DJ. Concentration-independant plasma protein binding of benzodiazepines. *J Pharm Pharmacol* 1985; 35(3): 179-80.
- ³⁶ Schwarz HJ. Pharmacokinetics and metabolism of temazepam in man and several animal species. *Br J clin Pharmacol* 1979;8:23S-29S.
- ³⁷ Locniskar A, Greenblat DJ. Oxidative versus conjugative biotransformation of temazepam. *Biopharmaceutics and drug disposition* 1990;11:499-506.

-
- ³⁸ Vree TB, Baars AM, Hekster YA, Van Der Kleijn E. Simultaneous determination of diazepam and its metabolites N-desmethyldiazepam, oxydiazepam and oxazepam in plasma and urine of man and dog by means of high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1979;162:605-14
- ³⁹ Ruelius HW, Tio CO, Knowles JA, McHugh SL, Schillings RT, Sisenwine SF. Diastereoisomeric glucuronidation of oxazepam. Isolation and stereoselective enzymatic hydrolysis. *Drug Metab Dispos* 1979;7:40-3.
- ⁴⁰ Masher H, Nitshe V, Schütz H. Separation, isolation and identification of optical isomers of 1,4-benzodiazepine glucuronides from biological fluids by reversed phase high performance liquid chromatography. *J Chromatogr Biomed Appl* 1984;306:231-9.
- ⁴¹ Fell AF, Noctor TAG, Mama JE, Clark BJ. Computer-aided optimisation of drug enantiomer separation in chiral high performance liquid chromatography. *J Chromatogr Biomed Appl* 1988;434:377-84.
- ⁴² Möhler H, Okada T. Benzodiazepine receptor: demonstration in the central nervous system. *Science* 1977;198:849-51.
- ⁴³ Möhler H, Okada T. Biochemical identification of the site of action of benzodiazepines in human brain by ³H-Diazepam binding. *Life Sciences* 1978;22:985-96.
- ⁴⁴ Vree TB, Baars AM, Wuis EW. Direct high pressure liquid chromatographic analysis and preliminary pharmacokinetics of enantiomers of oxazepam and temazepam with their corresponding glucuronide conjugates. *Pharmaceutisch Weekblad Scientific edition* 1991;13(2):83-90.
- ⁴⁵ Bertucci C, Domenici E, Salvadori P. Stereochemical features of 1,4-Benzodiazepin-2-ones bound to human serum albumin. *Chirality* 1990;2:167-74.

-
- ⁴⁶ Simonyi M, Fitos I. Stereoselective binding of a 2,3-benzodiazepine to human serum albumin: Effect of conformation on tofisopam binding. *Biochem Pharmacol* 1983;32(12):1917-20.
- ⁴⁷ Visy J, Simonyi M. The role of configuration and conformation in the binding of 2,3-benzodiazepines to human serum albumin. *Chirality* 1989;1:271-5.
- ⁴⁸ Rendic S, Kajfez F. Stereochemical characterization of interactions of chiral 1,4-benzodiazepine-2-ones with liver microsomes. *E J Drug Metab and Pharmacokinetics* 1982;7(2):137-46.
- ⁴⁹ Yost GS, Finley BL. Stereoselective glucuronidation as a probe of induced forms of UDP-glucuronyltransferase in rabbits. *Drug Metab and Dispos* 1984;13(1):5-8.
- ⁵⁰ Sisenwine SF, Tio CO, Hadley FV, et al. Species related differences in the stereoselective glucuronidation of oxazepam. *Drug metab and dispos* 1982; 10(6): 605-8.
- ⁵¹ Yang SK, Liu K, Guengerich FP. Enantioselective hydrolysis of oxazepam-3-acetate by esterases in human and rat liver microsomes and rat brain S9 fraction. *Chirality* 1990;2:150-5.
- ⁵² Maksay G, Tegye Z, Otvos L. Stereospecificity of esterases hydrolyzing oxazepam acetate. *J Pharm Sci* 1978;67:1208-10.
- ⁵³ Azzolina O, Ghislandi V, Vercesi D. Optical resolution of benzodiazepines esters by HPLC. *II pharmaco* 1990;45(6):603-615.
- ⁵⁴ Gil-Av E, Nurok D. Resolution of optical isomers by gas chromatography of diastereoisomers. *Adv Chromatogr* 1974;10:99-140.
- ⁵⁵ Krull IS. The liquid-chromatographic resolution of enantiomers. *ADV Chromatogr* 1978; 16:175-210.

⁵⁶Petterson C, Schill G. Separation of enantiomeric amines by ion-pair chromatography. *J Chromatogr* 1981; 204:179-183.

⁵⁷Hermansson J. Direct liquid chromatographic resolution of racemic drugs by means of α_1 -acid glycoprotein as the chiral complexing agent in the mobile phase. *J Chromatogr* 1984;361:537-46.

⁵⁸Wilson MJ, Walle T. Silica gel high-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of propranolol and 4-hydroxypropranolol enantiomers after chiral derivatization. *J Chromatogr* 1984;310:424-30.

⁵⁹Bahr CV, Hermansson J, Taurara K. Plasma levels of (+) and (-)-Propranolol and 4-hydroxypropranolol after administration of racemic (\pm)-Propranolol in man. *Br J Clin Pharmacol* 1982;14:79-82.

⁶⁰Hermansson J, Bahr CV. Simultaneous determination of d- and l-propranolol in human plasma by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1980;221:109-17.

⁶¹Lochmüller CH, Souter RW. Direct gas chromatographic resolution of enantiomers on optically active mesophases. II. Effects of stationary phase structure on selectivity. *J Chromatogr* 1974;88:41-54.

⁶²Lochmüller CH, Souter RW. Chromatographic resolution of enantiomers. Selective review. *J Chromatogr* 1975;113:2283-302.

⁶³Knapp DR. Handbook of analytical derivatization reactions. New York: A Wiley-Interscience publication, John Wiley and Sons Inc, 1979.

⁶⁴Uray G, Lindner W. (S,S)-Diphenyl-ethanediamine(DPEDA) Derivatives as Chiral Selectors. Part I. Undecenoyl bound dinitrobenzoyl-DPEDA as a broadly applicable chiral stationary phase. *Chromatographia* 1990(sept);30(5-6):323-27.

⁶⁵Blaschke G. Chromatographic resolution of chiral drugs on polyamide and cellulose triacetate. *J Liq Chromatogr* 1986;9(2-3): 341-368.

⁶⁶Domenici E, Bertucci C, Salvadori P, Felix G, Cahagne I, Motelier, Wainer IW. . Synthesis and chromatographic properties of an HPLC chiral stationary phase based upon human serum albumin. *Chromatographia* 1990(fev.);29(3-4):170-6.

⁶⁷Chosson E, Uzan S, Gimenez F, Wainer IW, Farinotti R.. Influence of specific albumin ligand markers used as modifiers on the separation of benzodiazepines enantiomers by chiral liquid chromatography on human serum albumin column. *Chirality* 1993;5:71-7.

⁶⁸Allenmark SG, Anderson S. Optical resolution of some biologically active compounds by chiral liquid chromatography on BSA-Silica(Resolvosil) columns. *Chirality* 1989;1:154-60.

⁶⁹Armstrong DW, Chang GD, Lee SH. (R)- and (S)-Naphthylethylcarbamate-substituted β -cyclodextrin bonded stationary phases for the reversed-phase liquid chromatographic separation of enantiomers. *J Chromatogr* 1991;539:83-90.

⁷⁰Oliveros L, Minguillon C, Billaud C. Resolution of several racemic 3-hydroxy-1,4-benzodiazepi-2-ones by high-performance chromatography on a chiral silica-bonded stationary phase. *J Pharmaceutical and Biomed Anal* 1992;10(10-12):925-30.

⁷¹Franzelius C, Besserer K. Identification and quantification of intact diastereoisomeric benzodiazepine glucuronides in biological samples by high-performance liquid chromatography. *J of Chromatogr* 1993;613:162-67.

⁷²Sunjic V, Oklobdzija M, Lisini A, Kajfez F. Chiral 1,4-benzodiazepines-XI. Kinetics of degenerate nucleophilic exchange of C(3)-Hydroxy group. *Tetrahedron* 1979;35:2531-7.

⁷³Nation RL, Hackett LP, Dusci LS. Uptake of clonazepam by plastic intravenous infusion bags and administration sets. *Am J Hosp Pharm* 1983; 40: 1692-3.

-
- ⁷⁴ Arnaud Y, Dauphin A, Mignot A. Interactions matières plastiques/médicaments dans: Postaire E. coordonateur. Les matières plastiques à usage pharmaceutique. Paris, Editions médicales internationales; 1991: 330.
- ⁷⁵ Badcock NR, Osborne GA, Nyman TLM, et al. Plasma and cerebrospinal fluid concentrations of témazépam following oral drug administration. *Eur J Clin Pharmacol* 1990; 38:153-5.
- ⁷⁶ Sunjic V, Dejanovic R, Klasinc L, Kajfez F. Configurational stability of the chiral centre C(3) in some 1,4-benzodiazepin-2-ones. *Tetrahedron letters* 1976;49:4493-6.
- ⁷⁷ Aso Y, Yoshioka S, Shibazaki T, Uchiyama M. The kinetics of the racemisation of oxazepam in aqueous solution. *Chem. Pharm. Bull.* 1988;36(5):1834-40.
- ⁷⁸ Yang SK, Lu XL. Resolution and stability of oxazepam enantiomers. *Chirality* 1992;4:443-6
- ⁷⁹ Yang SK, Lu XL. Stereoselective homonucleophilic substitution of 3-O-methyl and 3-O-ethyloxazepam enantiomers by chiral stationary phase by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1993;11(11/12):1181-8.
- ⁸⁰ Yang SK. Acid-catalyzed stereoselective heteronucleophilic substitution and racemization of 3-O-Methyloxazepam and 3-O-Ethyloxazepam. *Chirality* 1994;6:175-84.
- ⁸¹ Yang SK, Lu XL. Acid-catalyzed nucleophilic substitution and racemization of 3-Methoxy-N-Desmethyldiazepam enantiomers in Methanol. *Chirality* 1993;5:91-6.