

CHROM. 15,622

Note

Dosage de la chlorhexidine et de la tétracaïne dans des préparations pharmaceutiques par chromatographie liquide de paires d'ions sur phase greffée type nitrile

MICHEL BAUER*, LILIANE MAILHE, DANIÈLE MENARD et JEAN-PIERRE ROUANET

Service de Chimie Analytique, Département de Recherches et Développement Pharmaceutique, Centre de Recherches Pierre Fabre, 17 Avenue Jean Moulin, 81106 Castres Cédex (France)

(Reçu le 3 août 1982; manuscrit modifié reçu le 6 décembre 1982)

La chlorhexidine est un antiseptique dont l'usage s'est largement répandu dans les préparations pharmaceutiques. Aux méthodes colorimétriques¹⁻³, gravimétriques⁴, potentiométriques⁵, et polarographiques⁶, sont venues s'ajouter pour sa détermination des méthodes par chromatographie en phase gazeuse^{7,8} et plus récemment des méthodes par chromatographie liquide haute performance (CLHP). Pour ces dernières, des systèmes utilisant des phases normales⁹ ou des phases greffées C₈-C₁₈ avec ou sans paires d'ions ont été proposées¹⁰⁻¹³. Dans cette note nous décrivons une méthode CLHP par paire d'ions utilisant une phase greffée type nitrile (μ Bondapak-CN) et le lauryl sulfate de sodium (LSS) comme agent tensioactif. Cette méthode a été mise au point à l'origine pour rechercher dans le cas d'une préparation liquide (eau dentifrice) un effet sélectif sur le facteur de capacité de la colonne (k') de la chlorhexidine vis à vis de celui d'un autre constituant de la formule (l'anéthol provenant de l'aromatisant), créant une résolution suffisante pour que le dosage de la chlorhexidine soit possible. Par la suite nous l'avons étendue à une autre préparation liquide (solution à la chlorhexidine) ainsi qu'une préparation solide (tablettes contenant de la chlorhexidine et de la tétracaïne). Dans ce dernier cas, à partir de la même solution servant à la détermination de la chlorhexidine, on peut doser la tétracaïne par simple changement de la longueur d'onde de mesure. Pour ce dernier produit, la méthode proposée ici vient donc en complément des méthode CLHP sur phases apolaires type C₈-C₁₈ préconisées par ailleurs¹⁴⁻¹⁶.

PARTIE EXPERIMENTALE

Appareillage

La méthode a été étudiée sur un appareil Waters 6000 A, couplé avec un détecteur à longueur d'onde variable, Modèle 450 (les longueurs d'onde de mesure seront précisées dans chaque cas), un injecteur automatique WISP 710 B et un enregistreur Omniscrite. La colonne est une μ Bondapak-CN 10 μ m (Waters no. 840042, 30 cm \times 3.9 mm I.D.).

Réactifs

Acétonitrile pour chromatographie (Merck art. 30); lauryl sulfate de sodium

(Prolabo no. 27926); solution tampon pH 3.5 (13.6 g d'acétate de sodium + 800 ml d'eau, ajuster à pH 3.5 par de l'acide acétique glacial + eau quantité suffisante pour (qsp) 1000 ml); dichlorhydrate de chlorhexidine (substance chimique de référence de la Pharmacopée Britanique); parachloroaniline (Hopkin et William, Essex, Grande-Bretagne; chlorhydrate de tétracaïne (Rhône-Poulenc, France). Trois préparations pharmaceutiques ont été étudiées: une forme tablettes contenant 3 mg de digluconate de chlorhexidine et 0.2 mg de tétracaïne par unité; une solution commerciale contenant 100 mg de digluconate de chlorhexidine pour 100 ml; une solution dite "eau dentifrice" contenant 20 mg de digluconate de chlorhexidine pour 100 ml et un arôme à base d'anéthol.

Préparation de la phase éluante

Solution tampon (pH 3.5) 700 ml, acétonitrile 300 ml contenant 0, 0.288, 0.576, 1.440, 2.880, 5.760 g de LSS par litre de phase éluante correspondant à des concentrations molaires de 0, 0.001, 0.002, 0.005, 0.010, 0.020. Conformément aux recommandations de divers auteurs, voir entre autres)^{17,18} après chaque addition de LSS à la concentration souhaitée la concentration totale en ion sodium a été ajustée à 0.13 à l'aide de chlorure de sodium.

Pour le conditionnement correspondant à chacune des concentrations 400 ml d'éluant à la concentration désirée en LSS ont été utilisées. Entre chaque conditionnement à une valeur en LSS déterminée, un retour à l'état initial a été effectué en faisant passer 400 ml de solvant éluant à concentration nulle en LSS.

Mode opératoire

Toutes les solutions témoins de chlorhexidine parachloroaniline, tétracaïne, utilisées pour l'établissement de la Fig. 1 et des droites d'étalonnage ont été préparées dans l'eau. Pour la solution commerciale une dilution aqueuse au 1/50 est effectuée, et au 1/10 pour la préparation "eau dentifrice". Pour les tablettes une prise d'essai exactement pesée voisine de 0.33 g d'un broyat de plusieurs unités est complétée avec de l'eau qsp 50 ml. La solution est agitée mécaniquement pendant 5 min à température ambiante. Les solutions témoins et essais sont stables sur 24 h sauf la solution correspondant au dosage de la chlorhexidine dans les tablettes qui doit être injectée dans les 10 min suivant sa préparation. Dans tous les cas le volume d'injection a été de 50 μ l. La détermination quantitative de la chlorhexidine et de la tétracaïne a été effectuée par standardisation externe par la mesure des hauteurs de pics. Pour l'ensemble des manipulations un débit de 2 ml/min et une sensibilité de 0.04 unité d'absorbance pleine échelle ont été utilisés. La longueur d'onde de mesure est fixée à 262 nm sauf pour le dosage de la tétracaïne où on opère à 310 nm. Les calculs des droites d'étalonnage ont été effectués à l'aide d'une calculatrice HP 41 C. Les k' ont été calculés suivant la formule habituelle¹⁹, en prenant comme temps de rétention d'un composé non retenu T_0 , celui de la perturbation de solvant, ce qui n'est peut être pas tout à fait exact²⁰, mais suffisant pour notre propos.

RESULTATS ET DISCUSSION

Sur la Fig. 1 nous avons représenté la variation du k' de la chlorhexidine, de la tétracaïne, de la parachloroaniline et de l'anéthol en fonction de la concentration

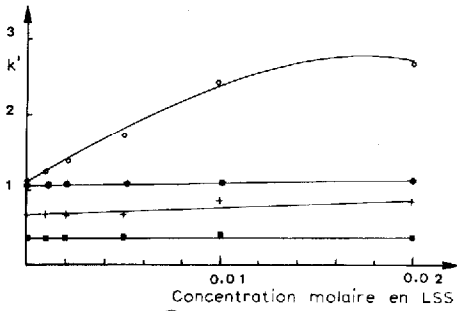


Fig. 1. Influence de la concentration molaire en LSS sur le k' de la chlorhexidine (○), anéthol (●), tétracaïne (+) et de la parachloroaniline (■).

molaire en LSS. La parachloroaniline, produit de dégradation de la chlorhexidine est connue pour sa toxicité²¹. Dans toute mise au point analytique il importe donc de montrer que la méthode distingue bien les deux entités.

L'examen de la Fig. 1 montre qu'on obtient pour la chlorhexidine un effet de paires d'ions classique²², alors que cet effet est faible sur la rétention de la tétracaïne et nul sur celle de la parachloroaniline et de l'anéthol. On dispose ainsi dans le cadre de notre problème, d'un moyen sélectif de séparation de la chlorhexidine. On voit que si l'on veut disposer d'un éluant unique pour l'analyse des trois préparations, c'est la sélectivité du couple chlorhexidine-anéthol (eau dentifrice) qui va fixer la concentration molaire en LSS. Pour une teneur nulle en LSS les Fig. 1 et 2A montrent que la chlorhexidine et l'anéthol sont confondus. Pour une concentration mo-

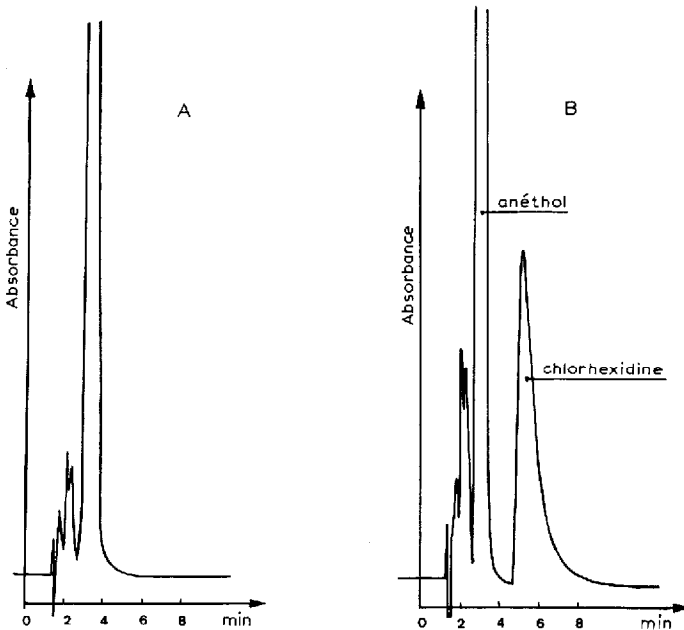


Fig. 2.A, Chromatogramme de la solution eau-dentifrice pour une teneur nulle en LSS de la phase éluante. B, Idem qu'en A mais pour [LSS] = 0.01 M.

laire en LSS de 0.01 *M*, La sélectivité et la résolution obtenues (Fig. 2B) sont suffisantes pour autoriser un dosage quantitatif.

Les Fig. 3 et 4 représentent les chromatogrammes obtenus dans le même solvant pour le dosage de la chlorhexidine dans la solution et les tablettes.

La Fig. 5 représente le chromatogramme obtenu pour le dosage de la tétracaïne dans les tablettes (à 310 nm) à partir de la même solution que celle utilisée Fig. 4.

Pour la chlorhexidine (à 262 nm) nous avons obtenu une réponse linéaire en hauteur de pic (*h* en cm) relativement aux quantités injectées (*q* en μg) comprises entre 0.6 et 1.4 μg : $h = 7.35 q - 0.09$, coefficient de corrélation = 0.9992. Pour la tétracaïne (à 310 nm), pour des quantités injectées comprises entre 0.02 μg et 0.09 μg , la relation obtenue est : $h = 113.8 q + 0.013$, coefficient de corrélation = 0.9992. La reproductibilité de la méthode chromatographique a été étudiée en injectant cinq fois les solutions essais des trois préparations obtenues telles que décrites dans la partie expérimentale. Dans le Tableau I, figurent les hauteurs de pics obtenues dans chaque cas (pour la chlorhexidine, et la tétracaïne), la valeur moyenne, l'écart type et le coefficient de variation. Les résultats obtenus montrent la bonne reproductibilité d'ensemble de la méthode. Nous avons par ailleurs procédé pour chaque type de préparation à des surcharges connues en chlorhexidine et en tétracaïne et mesuré le taux de recouvrement (tableaux II et III), qui dans tous les cas est compris entre 98 et 102%.

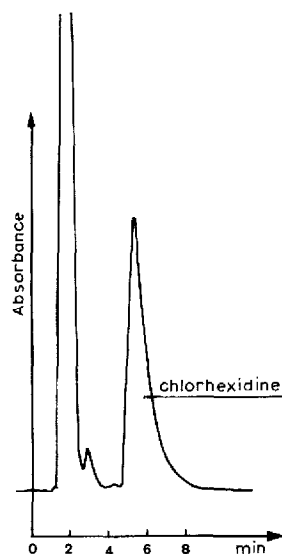
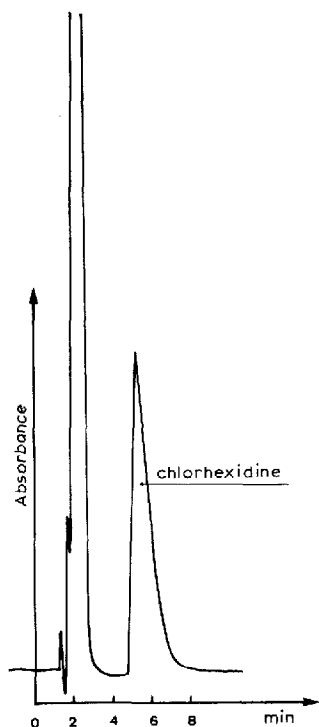


Fig. 3. Chromatogramme obtenu pour la solution commerciale de chlorhexidine.

Fig. 4. Chromatogramme obtenu pour le dosage de la chlorhexidine (à 262 nm) dans les tablettes.

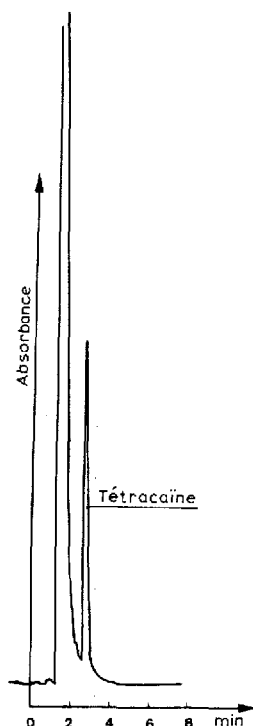


Fig. 5. Chromatogramme obtenu pour le dosage de la tétracéine (à 310 nm) dans les tablettes.

Pour clore cette note nous évoquerons brièvement le problème de la désorption du LSS, autrement dit de la possibilité pour la phase stationnaire de pouvoir être débarrassée du tensioactif. Cette question, d'intérêt pratique important, a été entre autres traitée par Knox *et al.*¹⁸, qui ont souligné le caractère irréversible de la fixation du lauryl sulfate dans le cas d'une phase greffée type C₁₈, rendant impossible une utilisation ultérieure. Dans notre cas, (utilisation d'une phase type nitrile) un lavage par 400 ml de solvant à teneur nulle en LSS a toujours permis de retrouver des k' semblables pour la chlorhexidine et voisins de 1.1 (*cf.* Fig. 1) suggérant le caractère réversible de l'absorption du LSS par un greffon relativement court type nitrile.

TABLEAU I

REPRODUCTIBILITE DE LA HAUTEUR DE PIC (cm) DE LA CHLORHEXIDINE ET DE LA TETRACAINE POUR 5 INJECTIONS SUCCESSIVES DE LA MÊME SOLUTION

Préparation	Injection					Moyenne (cm)	Écart type (cm)	Coefficient de variation (%)
	1	2	3	4	5			
Eau dentifrice	7.45	7.40	7.30	7.30	7.50	7.39	0.089	1.20
Solution	6.16	6.0	6.0	6.0	5.95	6.02	0.075	1.25
Tablettes								
Chlorhexidine	7.20	7.10	7.20	7.20	7.15	7.17	0.045	0.62
Tétracéine	8.55	8.55	8.55	8.60	8.60	8.57	0.027	0.32

TABLEAU II

ÉTUDE DU RECOUVREMENT DE LA CHLORHEXIDINE PAR LA MESURE DE LA QUANTITE RETROUVEE APRES SURCHARGE.

	Quantité initiale injectée, Q_i (μg)	Quantité retrouvée, Q_r (μg) après sur- charge, S , de 0.2 μg	Q_r (μg) après S de 0.4 μg
Eau dentifrice	0.94	1.15	1.32
Recouvrement (%)		100.9	98.5
Solution	0.95	1.13	1.34
Recouvrement (%)		98.3	100.0
Tablettes	0.60	0.795	0.99
Recouvrement (%)		99.4	99.0

$$\text{Recouvrement} = \frac{Q_r \times 100}{Q_i + S} \%$$

$S = 0.2$ ou $0.4 \mu\text{g}$

TABLEAU III

ETUDE DU RECOUVREMENT DE LA TETRACAINE PAR LA MESURE DE LA QUANTITE RETROUVEE APRES SURCHARGE

	Q_i (μg)	Q_r (μg) S de 0.0132 μg	Q_r (μg) après S de 0.0264 μg
Tablettes	0.084	0.099	0.109
Recouvrement (%)		101.8	99.0

$$\text{Recouvrement} = \frac{Q_r \times 100}{Q_i + S} \%$$

$S = 0.0132 \mu\text{g}$ ou $0.0264 \mu\text{g}$

REMERCIEMENTS

Nous remercions Monsieur Fauran, Directeur du Centre de Recherches Pierre Fabre pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail. Nous remercions le Docteur Mayne, Directeur du Département Recherches et Développement Pharmaceutique, Messieurs Dupinay et Leverd et l'ensemble des personnes du département qui nous ont aidés dans la réalisation de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 A. Holbrook, *J. Pharm. Pharmacol.*, 10 (1958) 370.
- 2 W. T. Robinson, L. Cosyns et M. Kramel, *Clin. Biochem.*, 10 (1977) 197.
- 3 G. Andermann, M. O. Buhler et M. Erhart, *J. Pharm. Sci.*, 69 (1980) 215.
- 4 S. Pinzauti, V. Dal Piaz et E. La Porta, *J. Pharm. Sci.*, 65 (1976) 1251.
- 5 S. Pinzauti et E. La Porta, *Pharm. Acta Helv.*, 56 (1981) 155
- 6 E. Jacobsen et B. Glyseth, *Talanta*, 22 (1975) 1001.
- 7 K. Seifert, D. Casagrande et H. Silberman, *J. Chromatogr.*, 109 (1975) 193

- 8 E. Cropper, P. Platt et N. A. Puttnam, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 26 (1975) 355.
- 9 F. Bailey, P. N. Brittain et B. F. Williamson, *J. Chromatogr.*, 109 (1975) 305.
- 10 A. J. Collins, A. T. Campbell et R. Bain, *J. Clin. Pharm.*, 4 (1979) 205.
- 11 B. Stuber et K. H. Müller, *Pharm. Acta Helv.*, 55 (1980) 171.
- 12 R. L. Perez, *J. Chromatogr. Sci.*, 19 (1981) 570.
- 13 C. Huston, P. Wainwright, M. Cooke et R. Simpson, *J. Chromatogr.*, 237 (1982) 457.
- 14 T. Daldruf, F. Susanto et P. Mischalke, *Z. Anal. Chem.*, 308 (1981) 413.
- 15 G. N. Menon et B. J. Norris, *J. Pharm. Sci.*, 70 (1981) 569.
- 16 B. Stuber et K. H. Müller, *Pharm. Acta Helv.*, 55 (1980) 173.
- 17 R. Rosset, M. Caude et A. Jardey, *Manuel Pratique de Chromatographie en Phase Liquide*, Masson, Paris, 2ème ed., 1982, p. 2.
- 18 J. H. Knox et R. A. Hartwick, *J. Chromatogr.*, 204 (1981) 3.
- 19 L. R. Snyder et J. J. Kirkland, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, Wiley, New York, 2nd ed., 1979, p. 24.
- 20 R. E. Kaiser et E. Oelrich, *Optimierung in der HPLC*, Dr. Alfred Hüthig Verlag, Heidelberg, 1979, p. 102.
- 21 H. S. Rosenkranz et L. A. Poirier, *J. Natl. Cancer Inst.*, 62 (1979) 873.
- 22 W. R. Melander et Cs. Horváth, dans Cs. Horváth (Rédacteur), *High Performance Liquid Chromatography*, Vol. 2, Academic Press, New York, 1980, pp. 240-260.