

Optimisation et validation d'une méthode chromatographique rapide pour l'identification et le dosage en routine des anthracyclines

INTRODUCTION

La préparation des médicaments anticancéreux est une étape à risque. Dans une démarche d'assurance qualité, le contrôle pré-libératoire des préparations de chimiothérapie assure leur conformité : le bon produit à la bonne dose.

Le contrôle analytique des anticancéreux à l'HEGP s'effectue par FIA et HPLC. Les anthracyclines : doxorubicine (DOXO) et épirubicine (EPIR) sont des isomères et leurs spectres UV (200-400 nm) ne sont pas discriminants; leur identification recourt à une séparation par HPLC.

Objectif : Développer une méthode rapide d'identification et de dosage des anthracyclines dans des conditions analytiques identiques à celles d'une autre famille d'anticancéreux : les vinca-alcaloïdes (même colonne et solution tampon) afin **d'optimiser les ressources du laboratoire**.

MATERIELS ET METHODES

Optimisation

- DOXO : de 0,1 à 1,2 mg/mL et EPIR : de 0,1 à 1,8 mg/mL
- Chaîne HPLC Varian couplée à un détecteur à barrette de diodes
- Injection 3µL
- Phase stationnaire : colonne Polaris C18-A, 50 mm x 4,6 mm
- Phase mobile : Tp phosphate (25mM - pH 7,25) / Acétonitrile (ACN)
- Identification : 200 - 400 nm; quantification : 235 nm

Validation selon les critères ICH

- Gamme d'étalonnage : 5 étalons
- 3 niveaux de CQ répétés 3 fois sur 3 jours consécutifs
- Linéarité, exactitude, fidélité, robustesse, spécificité

RESULTATS ET DISCUSSION

Optimisation

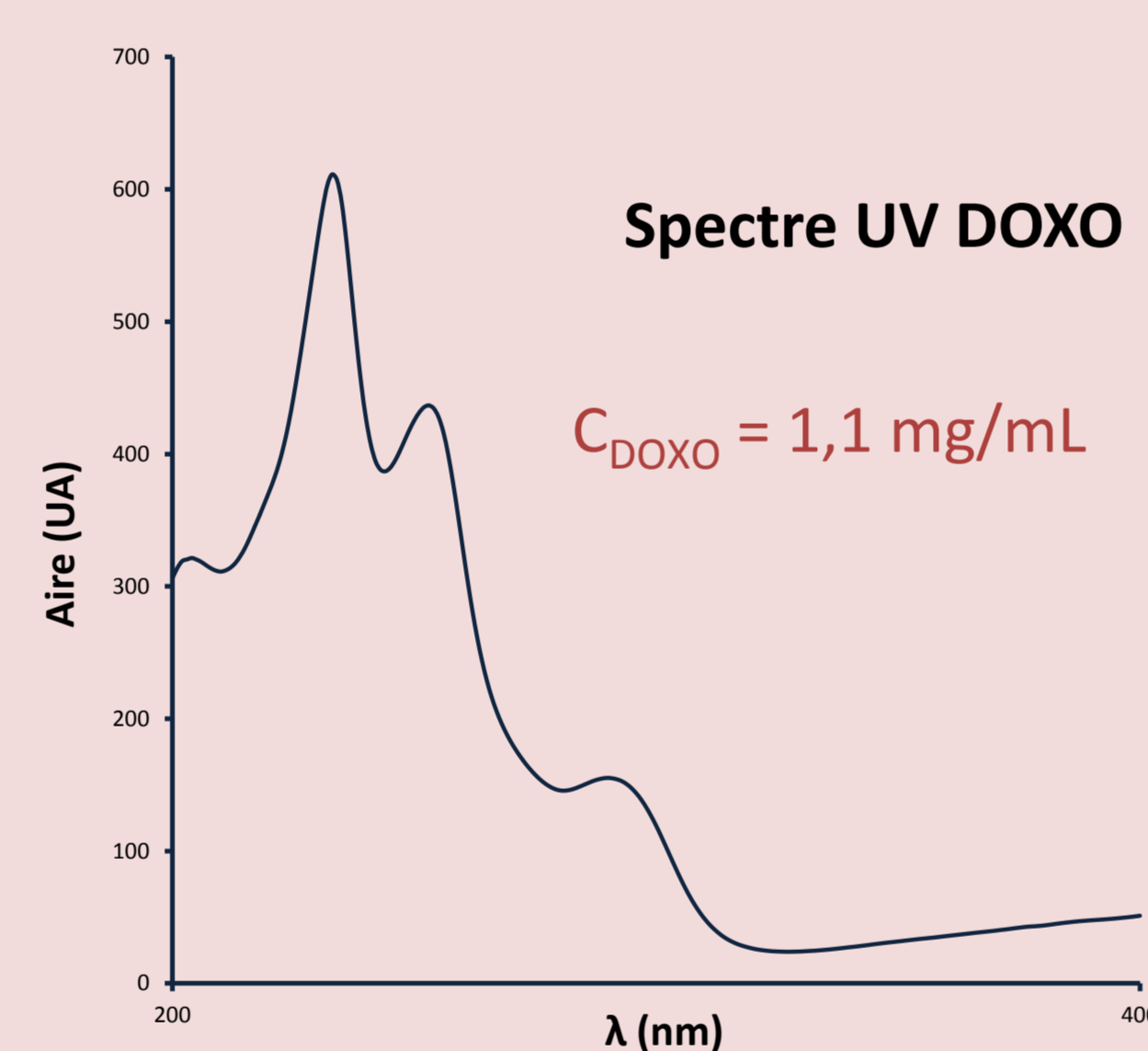
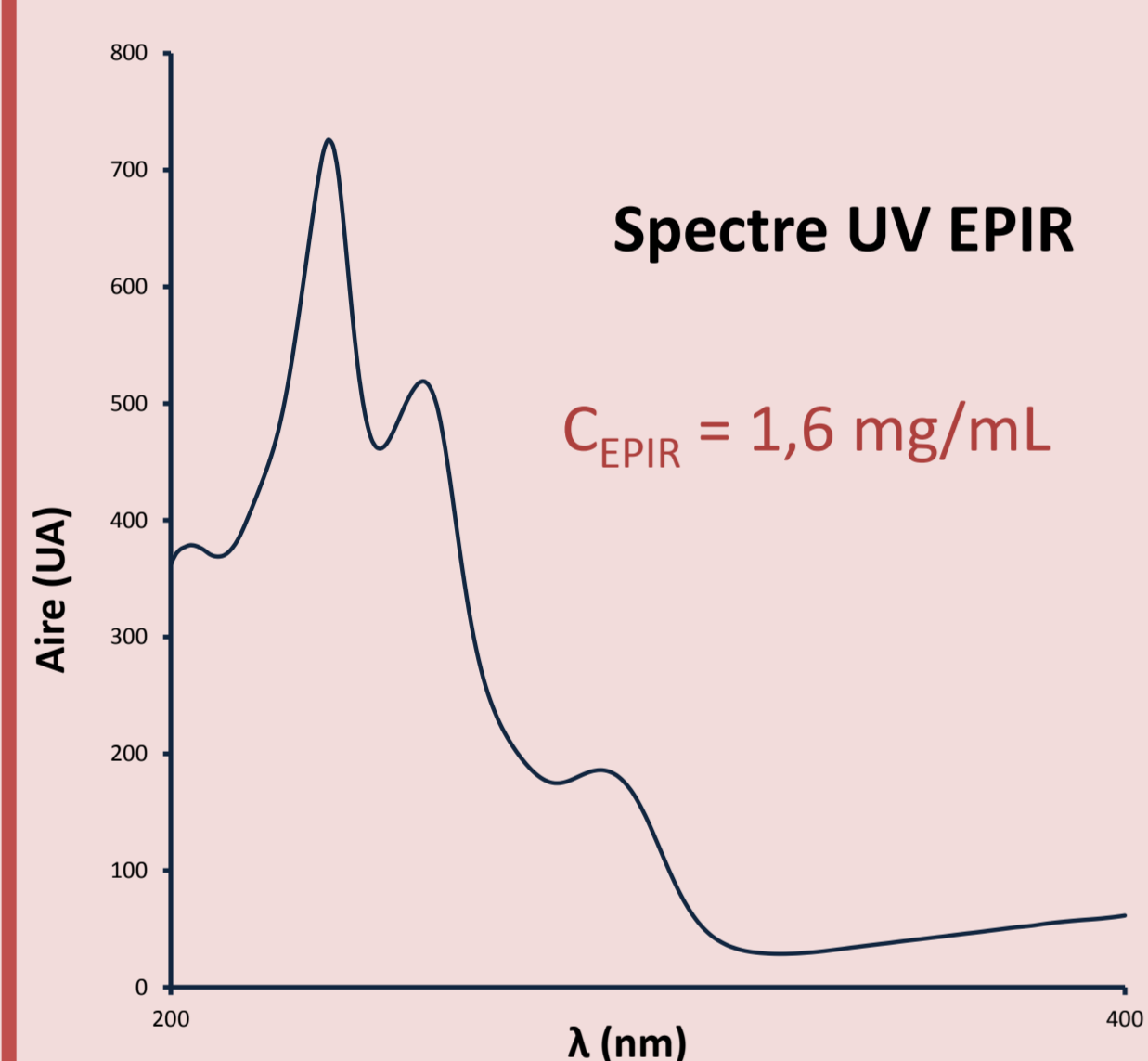
- 2 facteurs d'optimisation : débit et % ACN
- 2 facteurs de réponse : temps de rétention (tr_1 : DOXO, tr_2 : EPIR) et résolution (Rs)

Objectif : Obtenir la meilleure résolution possible avec un temps de rétention le plus court ($tr_2 = tr_{EPIR}$).

Débit (mL/min)	0,8		1,0		1,2		1,4		1,6	
	Rs	tr_2	Rs	tr_2	Rs	tr_2	Rs	tr_2	Rs	tr_2
25	2,47	3,68	2,32	3,08	2,60	2,55	2,18	2,13	2,07	1,9
27	2,21	2,99	2,13	2,22	1,57	1,78	1,47	1,54	1,9	1,39
28	1,52	2,55	1,50	1,99	1,45	1,64	1,39	1,41	1,35	1,25
30	1,25	2,09	1,22	1,64	1,23	1,36	1,11	1,16	1,18	1,05

Rs augmente quand %ACN et débit diminuent.
 Tr diminue quand %ACN et débit augmentent.

Résultat optimal : $Rs = 1,39$ et $tr_2 = 1,41$ min
Conditions : débit = 1,4 mL/min et ACN = 28%



- ★ maximum d'absorption à 235 nm
- ★ spectres superposables
- ★ pas d'identification spectrale possible

→ Séparation chromatographique →

Validation : pondération 1/x

	DOXO			EPIR		
Intervalle de validité (mg/mL)	0,1 – 1,2			0,1 – 1,8		
Linéarité (R^2)	0,998			0,998		
Contrôles Qualités	CQ1	CQ2	CQ3	CQ1	CQ2	CQ3
Répétabilité (CV%)	2,68	2,55	2,00	0,82	1,11	1,83
Fidélité intermédiaire (CV%)	3,67	3,62	2,00	4,03	1,63	1,83
Exactitude (recouvrement moyen %) [écart type]	99,26 [2,98]			101,54 [2,50]		
Spécificité démontrée (test Student : $p < 0,0001$)						

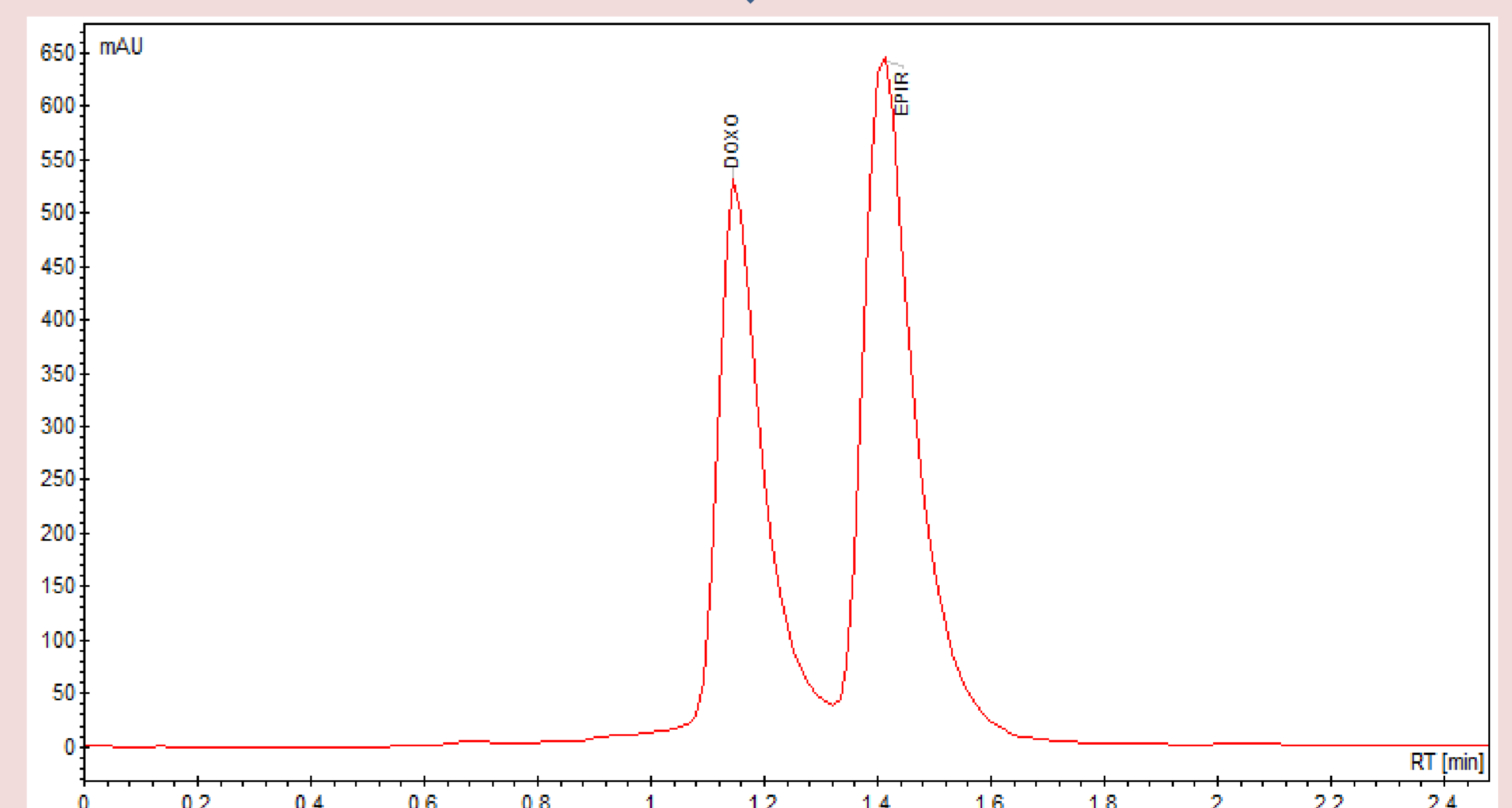


Fig : Chromatogrammes obtenus pour les 2 anthracyclines dans les conditions optimales : pH_{tp phosphate} = 7,25; débit = 1,4 mL/min; acétonitrile = 28%; $\lambda = 235$ nm; mélange DOXO / EPIR (1:1)

$tr_{DOXO} = 1,13 \pm 0,02$ min
 $tr_{EPIR} = 1,39 \pm 0,03$ min
 $Rs_{DOXO/EPIR} = 1,39$

CONCLUSION

La méthode d'identification et de dosage des anthracyclines ainsi optimisée permet un contrôle pré-libératoire rapide (en moins de 2 minutes) des préparations anticancéreuses d'anthracyclines tout en utilisant le même support chromatographique et la même phase mobile que les vinca-alcaloïdes. Elle améliore la productivité en routine ainsi que les ressources du laboratoire.