

## OBJECTIF

L'objectif principal de cette étude est de développer et de valider une méthode de dosage du fluconazole indicatrice de stabilité par Chromatographie Liquide Haute Performance et détection Ultra-Violette (HPLC-UV) pour l'étude de stabilité et le contrôle d'un médicament expérimental.

## CONTEXTE

La Pharmacie à Usage Intérieur (PUI) du groupement hospitalier centre des Hospices Civils de Lyon est sollicitée pour un essai clinique. Elle est en charge de la production, du contrôle et de la dispensation du médicament expérimental

- Nécessité d'avoir des gélules de fluconazole 50 mg *verum* et *placebo*.
- *Verum* préparé en reconditionnant la spécialité pharmaceutique FLUCONAZOLE ARROW® 50 mg.
- *Placebo* préparé à partir de lactose monohydraté et de gélules vides identiques à celles de la spécialité pharmaceutique.
- Nécessité de disposer d'un outil analytique permettant l'étude de la stabilité du médicament analytique.

**Une méthode de dosage indicatrice de stabilité du fluconazole est nécessaire.**

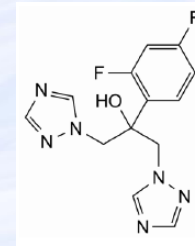


Figure 1:  
Structure du  
fluconazole.

## MATERIELS ET METHODES

### HPLC – Instrumentation et conditions analytiques

Méthode développée sur une 1290 Infinity Agilent Technologies HPLC couplée un détecteur UV. Toutes les données ont été acquises et analysées grâce au logiciel Open Lab Control Panel.

Tableau 1: Conditions chromatographiques retenues.

Condition chromatographique	Paramètres
Phase mobile isocratique	Méthanol : tampon acétate pH 5,0 (40:60, v/v)
Phase stationnaire	Kinetex® 2,6 µm C18 100A 150 x 4,6 mm Liquid Chromatography
Débit	1 mL/min
Volume d'injection	10 µL
Longueur d'onde de détection	261 nm
Température de la colonne	40°C

### Standards de calibration

- Préparés à partir de fluconazole pure dit Chemical Reference Substance (CRS) et de phase mobile.
- 3 niveaux de concentration (bas, moyen, haut): 100, 250 et 500 µg/mL. Répétés 2 fois soit 6 points de calibration par jour.

### Standards de validation

- Préparés à partir du contenu des gélules de FLUCONAZOLE ARROW® 50 mg et de phase mobile.
- 3 niveaux de concentration (bas, moyen, haut): 150, 300 et 450 µg/mL. Répétés 3 fois soit 9 points de validation par jour.

### Procédure de validation de méthode

La méthode analytique a été développée en suivant les recommandations ICH Q2 (R1) et celles de la Société Française des Sciences et Technologies Pharmaceutiques (SFSTP).

#### ➤ Spécificité et sélectivité

- Comparaison des chromatogrammes de (i) fluconazole pure, (ii) de FLUCONAZOLE ARROW® 50 mg gélule et (iii) de phase mobile.
- Sont observés: le temps de rétention, l'air sous la courbe du pic d'élution et la ligne de base du chromatogramme.

#### ➤ Linéarité

- 2 gamme de calibration par jour pendant 3 jours avec un opérateur différent chaque jour.
- Le coefficient de détermination des gammes doit être supérieur à 0,95.

#### ➤ Précision et exactitude

- 3 gammes de validation par jour pendant 3 jours.
- Le biais relatif des concentrations doit être inférieur à ± 10%.
- Les coefficients de variations (CV) intra et inter jour doivent être inférieur à 5% et 8% respectivement.

#### ➤ Profil d'exactitude

### Etude de dégradation forcée

Réalisée en suivant les recommandations du Groupe d'Evaluation et de Recherche sur la Protection en Atmosphère Contrôlée (GERPAC).

- La substance pharmaceutique est soumise à 5 conditions de dégradation: hydrolyse acide ou basique, thermique, photo-oxydation ou oxydation (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).
- Augmentation graduelle de l'intensité des conditions de dégradation jusqu'à ce que (i) 20% du fluconazole de l'échantillon initial soit dégradé ou que (ii) la contrainte de dégradation soit jugée suffisamment importante.

## RESULTATS

### Validation de la méthode

Le temps de rétention (Tr) du fluconazole en utilisant cette méthode est de 3,1 min ± 0,2 min.

#### ➤ Spécificité et sélectivité

- Aucune différence entre les chromatogrammes de (i) fluconazole pure et (ii) de FLUCONAZOLE ARROW® 50 mg gélule.
- Même temps de rétention, même aire sous la courbe et même ligne de base.
- Absence de co-élutions aux temps de rétention du fluconazole et de ses impuretés.

#### ➤ Linéarité

- Toutes les gammes de calibration ont un R<sup>2</sup> supérieur à 0,95.
- La droite de calibration issue de l'intégration de tous les points de calibration a un coefficient de détermination égal à 0,996.

#### ➤ Précision et exactitude

- CV intra jour pour les standards de validation bas moyen et haut : 3,22%, 3,26% et 3,15% respectivement. Limite d'acceptabilité ± 5%.
- CV inter jour pour les standards de validation bas moyen et haut : 3,35%, 2,99% et 3,04% respectivement. Limite d'acceptabilité ± 8%.
- Le biais relatif des valeurs de concentration des standards de validation: 0,22% pour le premier jour, de 1,15% pour le second jour et de 1,57% pour le troisième jour de validation. Limite d'acceptabilité ± 10%.

#### ➤ Profil d'exactitude

Figure 3: Profil d'exactitude de la méthode analytique HPLC-UV.

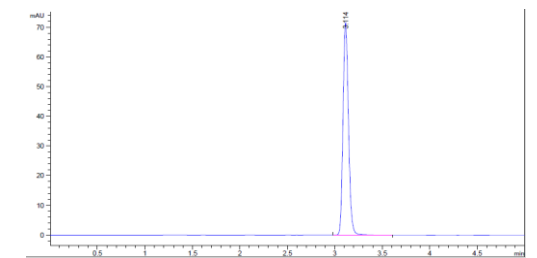
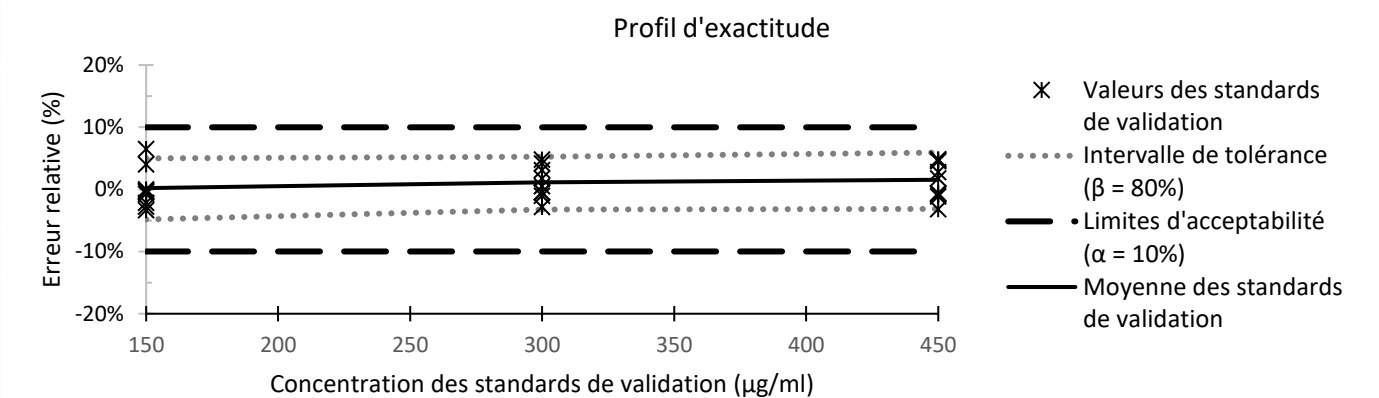


Figure 2: Chromatogramme d'un standard de validation moyen.

### Etude de dégradation forcée

#### ➤ Hydrolyse acide (HCl 1 M pendant 4h à 80°C)

- Aucune dégradation du composé n'est observée.

#### ➤ Hydrolyse basique (NaOH 1 M pendant 4h à 80°C)

- Aucune dégradation du produit n'est observée.
- Le chromatogramme (fig. 4) met en évidence 4 pics d'élution d'impuretés :  
Pic n°1: Tr = 1,275 min avec une AUC = 132,25 mAU  
Pic n°2: Tr = 1,439 min avec une AUC = 39,35 mAU  
Pic n°3: Tr = 1,614 min avec une AUC = 23,49 mAU  
Pic n°4: Tr = 1,892 min avec une AUC = 51,26 mAU

#### ➤ Dégradation thermique (60°C pendant 72h)

- Aucune dégradation du composé n'est observée.

#### ➤ Photo-oxydation (265 nm pendant 3h)

- Aucune dégradation du composé n'est observée.

#### ➤ Oxydation (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% 3:1 (v/v) pendant 4h à 80°C)

- 2,88% du produit est dégradé.

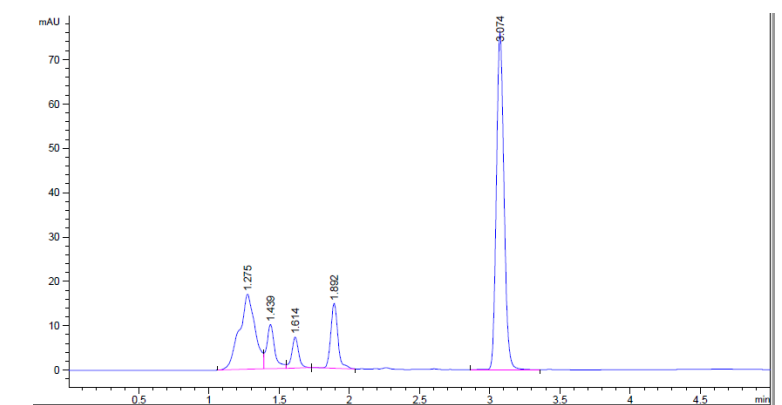


Figure 4: Chromatogramme suite à la dégradation en condition basique.

## CONCLUSION

La méthode de dosage indicatrice de stabilité des gélules de fluconazole par HPLC-UV est validée et permet à la PUI du groupement hospitalier centre des HCL de (i) réaliser l'étude de stabilité des gélules ainsi que de (ii) contrôler la teneur des lots de gélules dans le cadre de cet essai clinique.