

OBJECTIF

L'objectif principal de cette étude est de développer et de valider une méthode de dosage du clomifène citrate 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

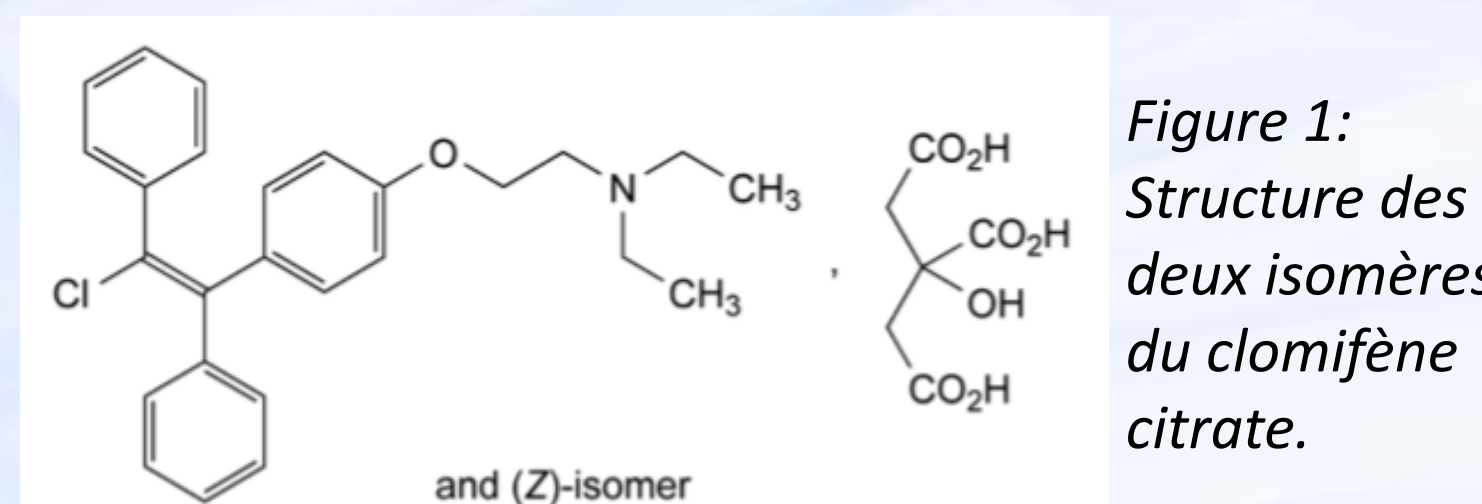
La Pharmacie à Usage Intérieur (PUI) du groupement hospitalier centre des Hospices Civils de Lyon est sollicitée pour un essai clinique.

→ Nécessite des gélules de clomifène citrate 50 mg *verum* et *placebo*, stable 18 mois.

PUI en charge de la production, du contrôle et de la dispensation du médicament expérimental.

- *Verum* préparé à partir d'une poudre obtenue par broyage de la spécialité CLOMID® 50 mg.
- *Placebo* préparé à partir de cellulose microcristalline.

Une méthode de dosage indicatrice de stabilité du clomifène citrate est nécessaire, conformément aux recommandations ICH.



MATERIELS ET METHODES

HPLC – Instrumentation et conditions analytiques

Méthode développée sur une 1290 Infinity Agilent Technologies UHPLC couplée un détecteur UV à barrette de diode. 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 phosphate (1,8 g/L) pH 8,0 (88:12, v/v)
Phase stationnaire	Kinetex® 2,6 µm EVO C18 100A 100 x 4,6 mm Liquid Chromatography
Débit	1 mL/min
Volume d'injection	10 µL
Longueur d'onde de détection	290 nm
Température de la colonne	40°C

Standards de calibration

- Préparés à partir de clomifène citrate pure dit Chemical Reference Substance (CRS) et de phase mobile.
- 3 niveaux de concentration (bas, moyen, haut): 20, 50 et 100 µg/mL. Répétés 2 fois soit 6 points de calibration par jour.

Standards de validation

- Préparés à partir de CLOMID® broyé et de phase mobile: 30, 60 et 90 µg/mL.
- 3 niveaux de concentration (bas, moyen, haut): 30, 60 et 90 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) clomifène citrate pure, (ii) de comprimé CLOMID® 50 mg broyé et (iii) de phase mobile.
- Sont observés: le temps de rétention, l'air sous la courbe du pic d'éluion 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'Évaluation 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 (H₂O₂).
- Augmentation graduelle de l'intensité des conditions de dégradation jusqu'à ce que (i) 20% du clomifène citrate 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 du clomifène citrate en utilisant cette méthode est de 2,3 min ± 0,2 min.

➤ Spécificité et sélectivité

- Aucune différence entre les chromatogrammes de (i) clomifène citrate pure et (ii) de comprimé CLOMID® 50 mg broyé.
- Même temps de rétention, même aire sous la courbe et même ligne de base.
- Absence de co-élutions aux temps de rétention du clomifène citrate et de ses impuretés.

➤ Linéarité

- Toutes les gammes de calibration ont un R² 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 0,992.

➤ Précision et exactitude

- CV intra jour pour les standards de validation bas moyen et haut: 0,94%, 1,67% et 1,04% respectivement. Limite d'acceptabilité ± 5%.
- CV inter jour pour les standards de validation bas moyen et haut: 1,00%, 1,52% et 0,97% respectivement. Limite d'acceptabilité ± 8%.
- Le biais relatif des valeurs de concentration des standards de validation: 4,14% pour le premier jour, de 5,00% pour le second jour et de 4,74% pour le troisième jour de validation. Limite d'acceptabilité ± 10%.

➤ Profil d'exactitude

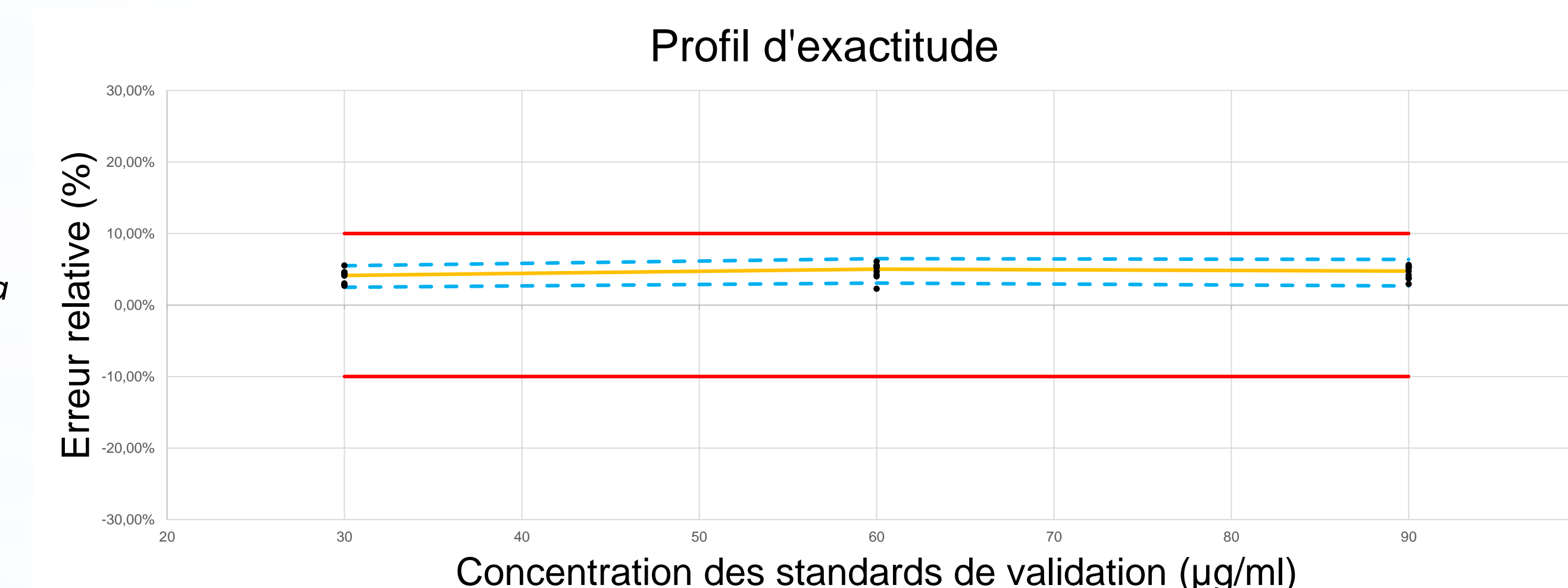


Figure 3: Profil d'exactitude de la méthode analytique HPLC-UV.

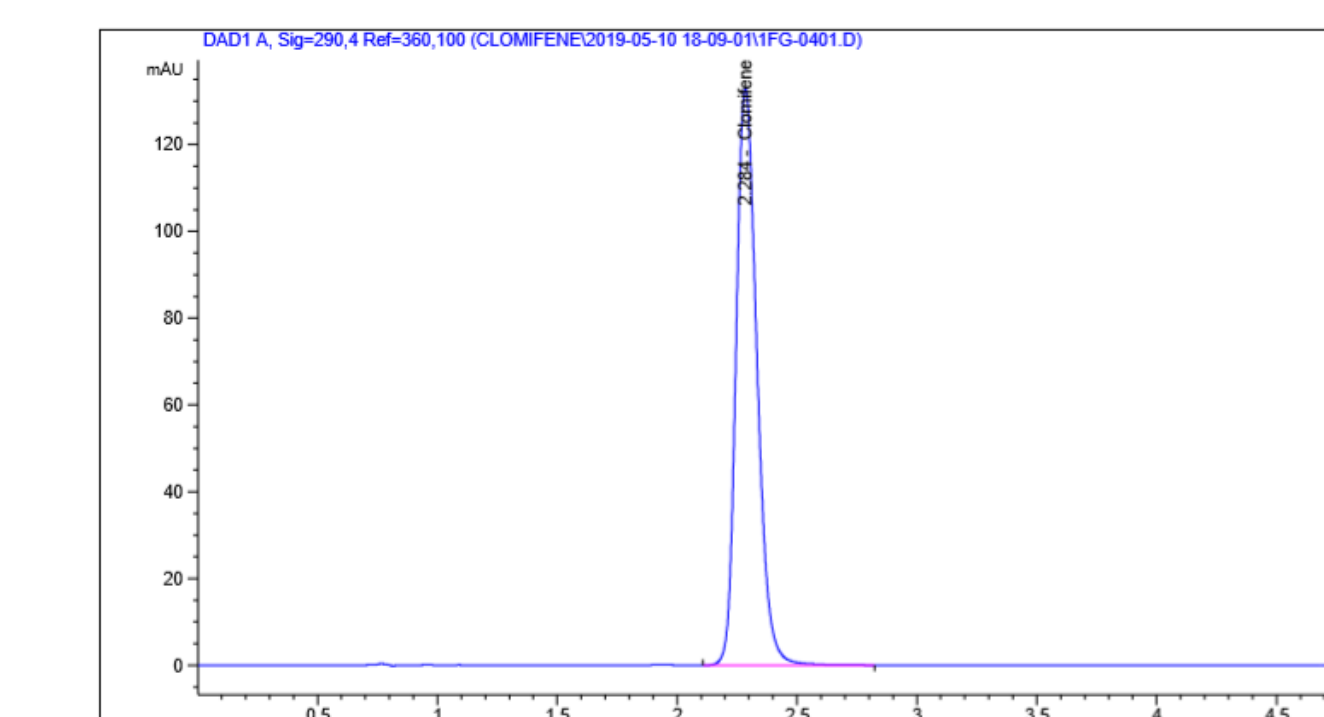


Figure 2: Chromatogramme d'un standard de validation moyen.

Etude de dégradation forcée

➤ Hydrolyse acide (HCl 2 M pendant 5h)

- 10,05% du produit est dégradé.
- Phénomène de séparation des deux isomères du clomifène citrate (dédoublage du pic d'éluion).

➤ Hydrolyse basique (NaOH 2 M pendant 5h)

- 19,41% du produit est dégradé.
- Phénomène de séparation des deux isomères du clomifène citrate (dédoublage du pic d'éluion).

➤ Dégradation thermique (80°C pendant 3h)

- 1,73% du produit est dégradé.
- Le chromatogramme met en évidence 3 pics d'éluion d'impuretés à 0,73 min, 0,81 min et 1,94 min.

➤ Photo-oxydation (265 nm pendant 30min)

- 38,71% du produit est dégradé.
- Le chromatogramme met en évidence une seule impureté au temps de rétention 1,94 min.

➤ Oxydation (H₂O₂ 3% 9:1 (v/v) pendant 24h)

- 4,57% du produit est dégradé.
- Phénomène de séparation des deux isomères du clomifène citrate (accouplement sur le pic d'éluion).

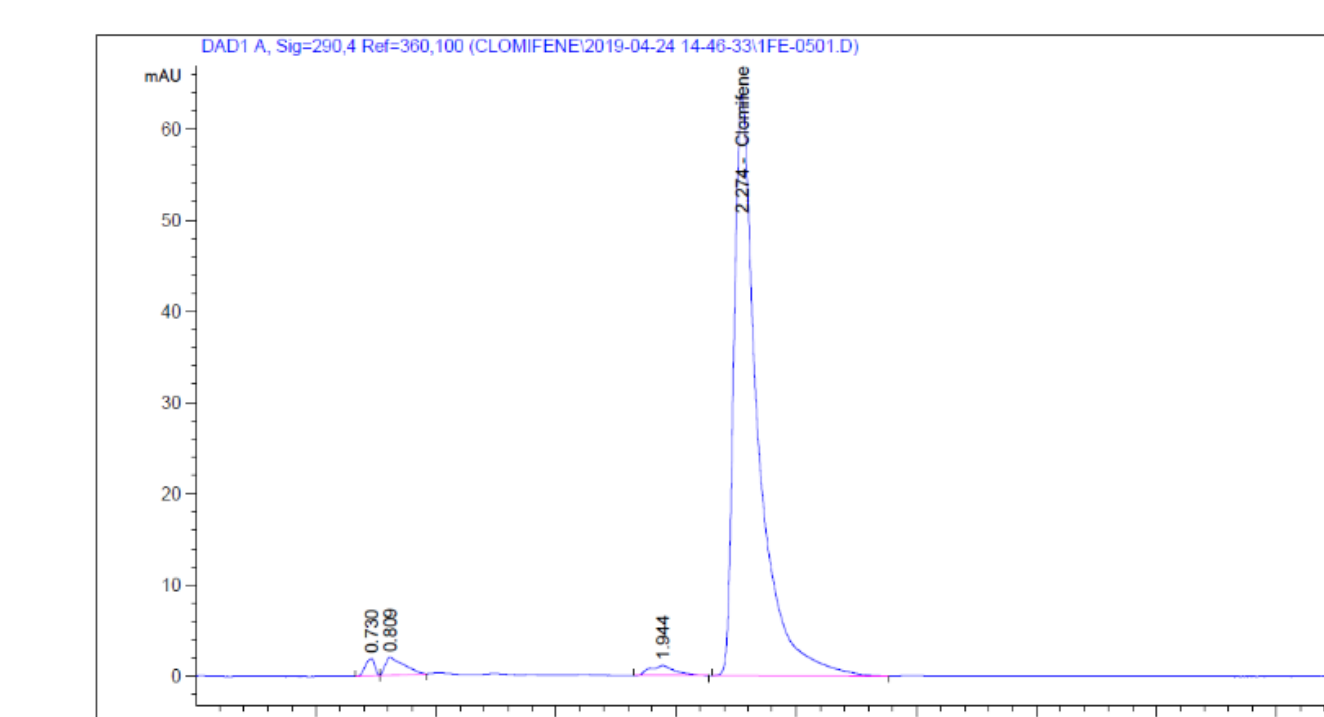


Figure 4: Chromatogramme suite à la dégradation thermique.

CONCLUSION

La méthode de dosage indicatrice de stabilité des gélules de clomifène citrate 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.