



**Développement et validation
d'une méthode d'analyse
utilisant l'électrophorèse
capillaire pour le dosage de
principes actifs contenus dans
différentes formulations
pharmaceutiques**

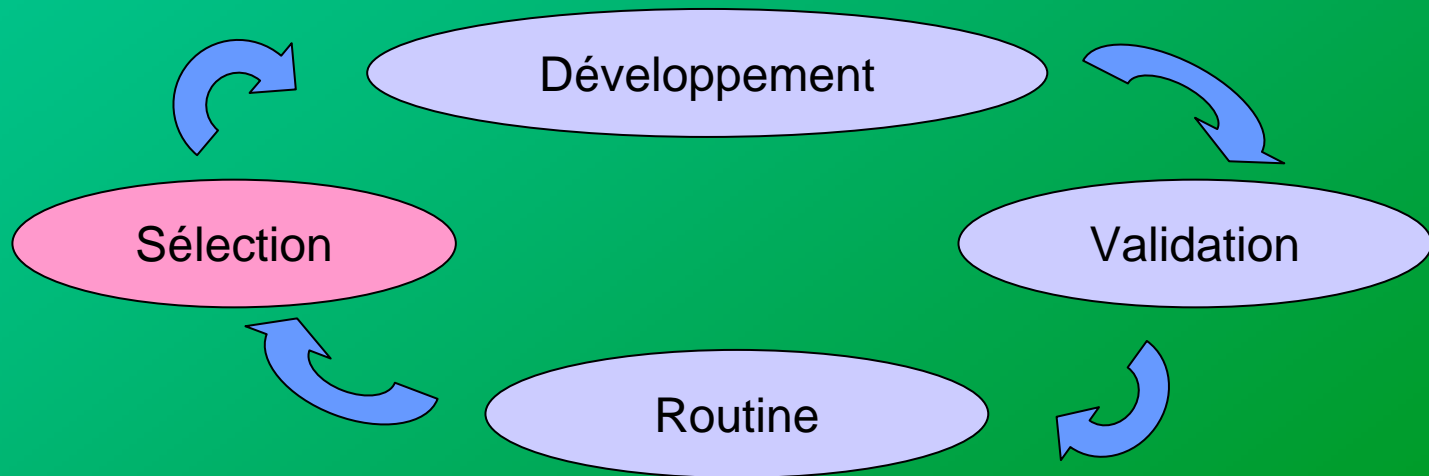
Genève, le 4 juillet 2006 Christina WEBER

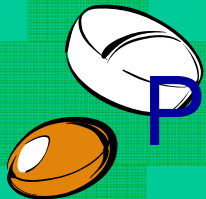
Titre Pharmacie des HUG
Laboratoire de Contrôle Qualité



But :

- ✓ Electrophorèse capillaire
- ✓ Développer une seule méthode CE
- ✓ Valider la méthode proposée
- ✓ Utiliser cette méthode pour l'analyse de routine





Principes actifs (pKa) :



Adrénaline (8.7, 10.2, 12.0)

- Adrénaline 0.1 mg/ml ampoule 10 ml
- Adrénaline 1 mg/ml ampoule 5 ml

Atropine (9.9)

- Atropine sulfate 0.1 mg/ml seringue 10 ml
- Atropine collyre 0.5 % flacon 1 ml

Cocaïne (8.6)

- Cocaïne collyre 5 % flacon 3 ml

Codéine (8.2)

- Codéine phosphate sirop 0.25% bt 100 ml

Ephedrine (9.6)

- Ephédrine HCl 10 mg/ml seringues 2 ml

Homatropine (9.9)

- Homatropine HBr collyre 2 % flacon 3 ml

Injection ophtalmique faible

flacon 2 ml

(phényléphrine + homatropine)

Isoprénaline (8.6, 10.1, 12.0)

- Isoprénaline 0.1 mg/ml seringue 50 ml

Kétamine (7.5)

- Ketamine 1 mg/ml

Lidocaïne (7.9)

- Lidocaïne 4 % bt 100 ml

Morphine (8.0, 9.9)

- Morphine colorée 2%

Oxybuprocaïne

- Novésine collyre 1 % flacon 1 ml

Phényléphrine (8.9, 10.1)

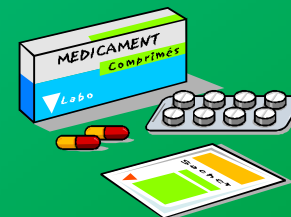
- Phényléphrine HCl 0.1 mg/ml seringue 10 ml

Scopolamine (7.6)

- Scopolamine HBr collyre 0.25 % flacon 3 ml

Tétracaïne (8.5)

- Tétracaïne HCl 5 % bt 30 ml





Etat actuel dans le laboratoire de contrôle qualité des HUG

HPLC :

- ✓ Méthodes pharmacopée utilisent des techniques HPLC traditionnelles (colonne remplie avec phase stationnaire C18/C8, 12 –25 x 4.6 mm x 5 mm, dp 5 µm)
- ✓ Colonnes différentes pour différents PAs
- ✓ Équilibration de la colonne
- ✓ Solvants organiques
- ✓ Prix



temps d'analyse de **10 - 30 min**



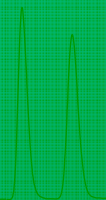
Electrophorèse capillaire: alternative

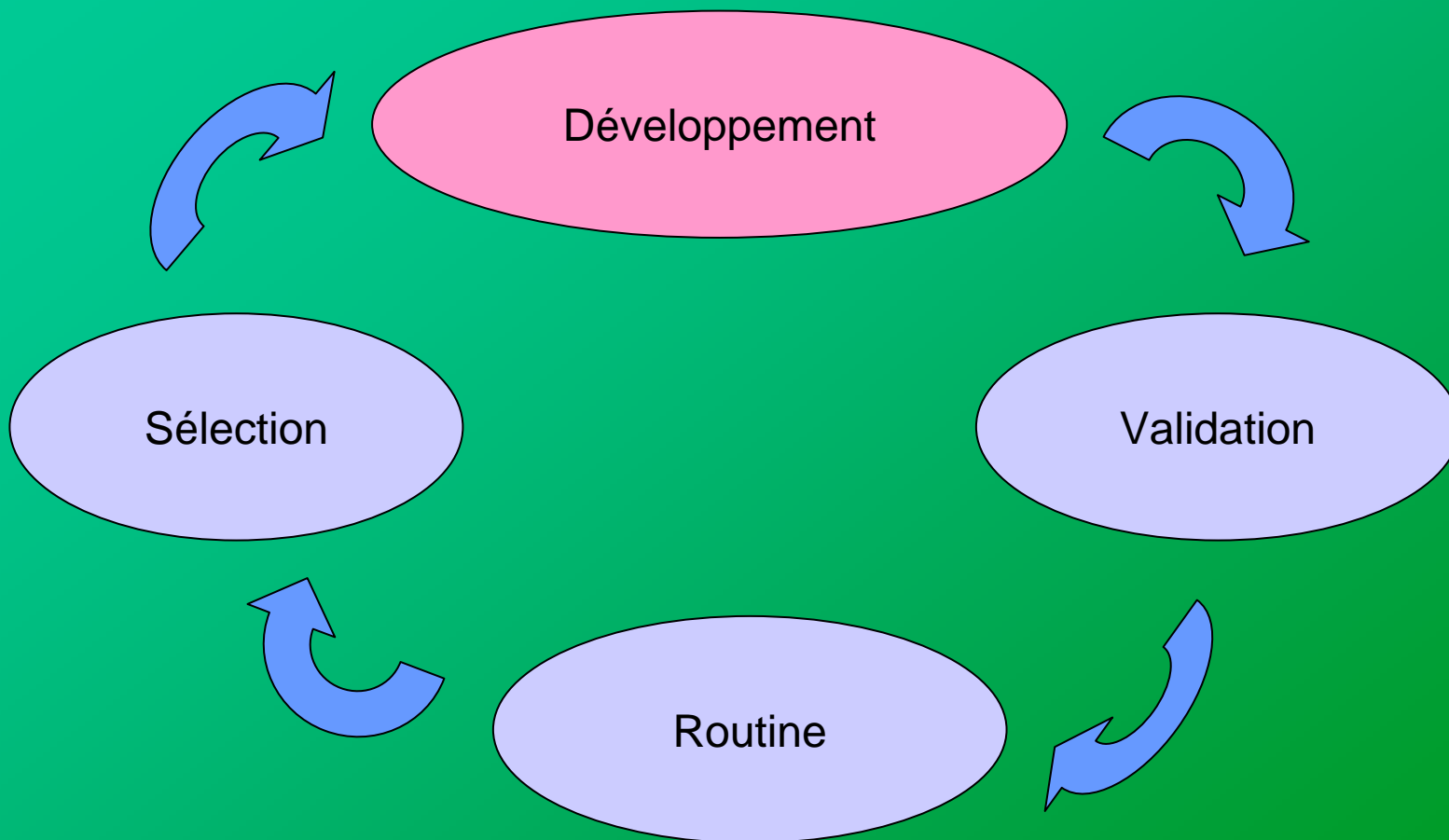


Les PAs analysés ont un caractère basique

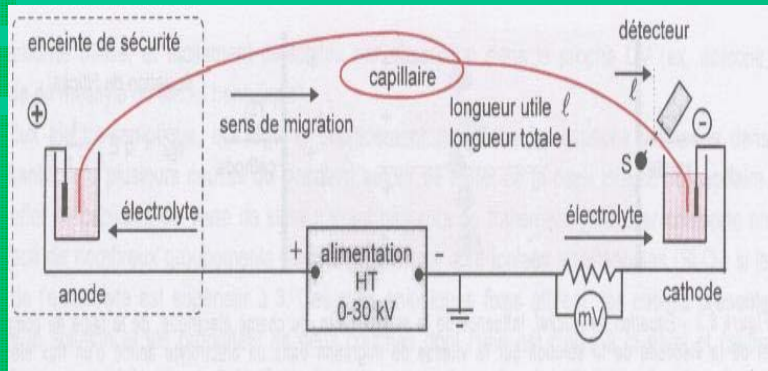
Méthode alternative: CE

- ✓ Permet des analyses plus rapides à moindre coût
- ✓ Est meilleur marché
- ✓ Écologique: peu ou pas de solvant organique
- ✓ Développement rapide de méthode



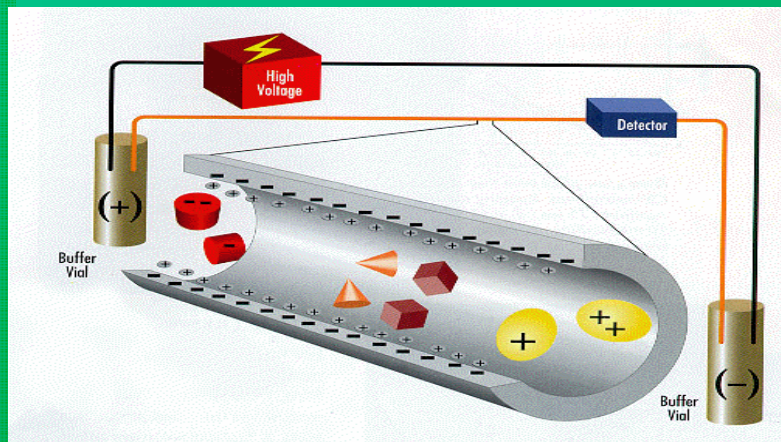


Electrophorèse capillaire conventionnelle

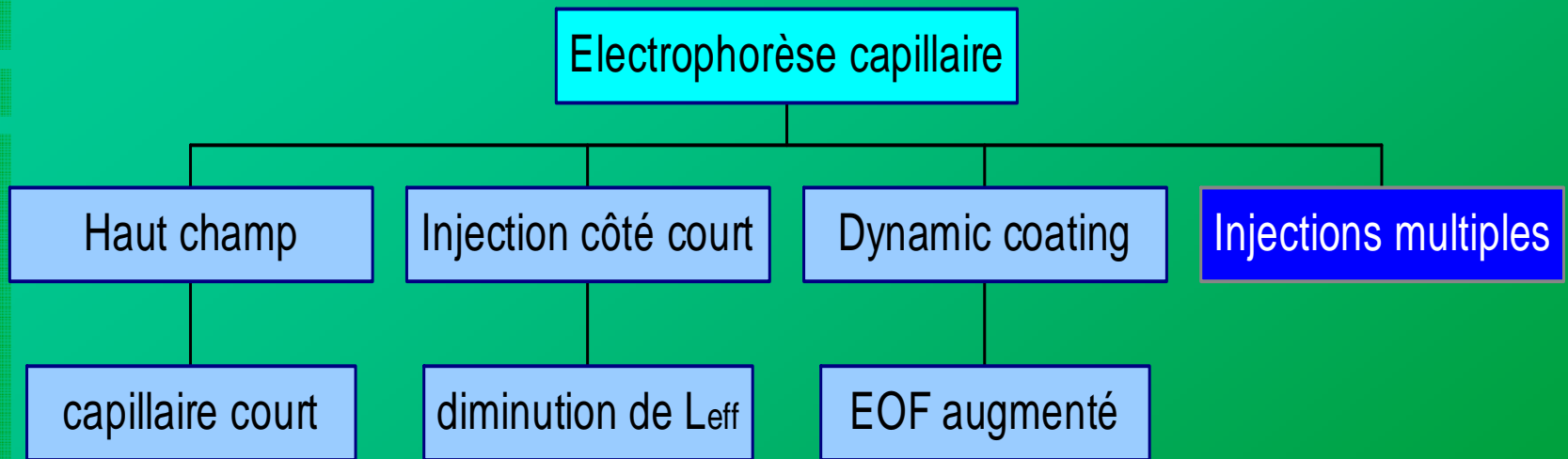


CE conventionnelle:

- ✓ Capillaire: $L_{\text{tot}} = 64.5 \text{ cm}$,
 $L_{\text{eff}} = 56 \text{ cm}$, $50 \mu\text{m}$ de d.i.
- ✓ Voltage: 30 kV (instrumentation)
- ✓ Détecteur: UV-Vis
- ✓ Température: $25 \text{ }^\circ\text{C}$
- ✓ Volume d'injection: 1% de la L_{eff} du capillaire
- ✓ Electrolyte: tampon Tris phosphate, pH acide



La CE rapide



$$t_{mig} = \frac{L_{eff} L_{tot}}{\mu_{app} U}$$

$$\mu_{app} = \mu_{eff} + \mu_{EOF}$$

$$N = \frac{\mu_{app} U L_{eff}}{2D L_{tot}}$$

CE haut champ (HEF)



$$t_{mig} = \frac{L_{eff} L_{tot}}{\mu_{app} U}$$

Réduction de la longueur totale du capillaire à 32.5 cm

- ✓ Diminution du temps de migration

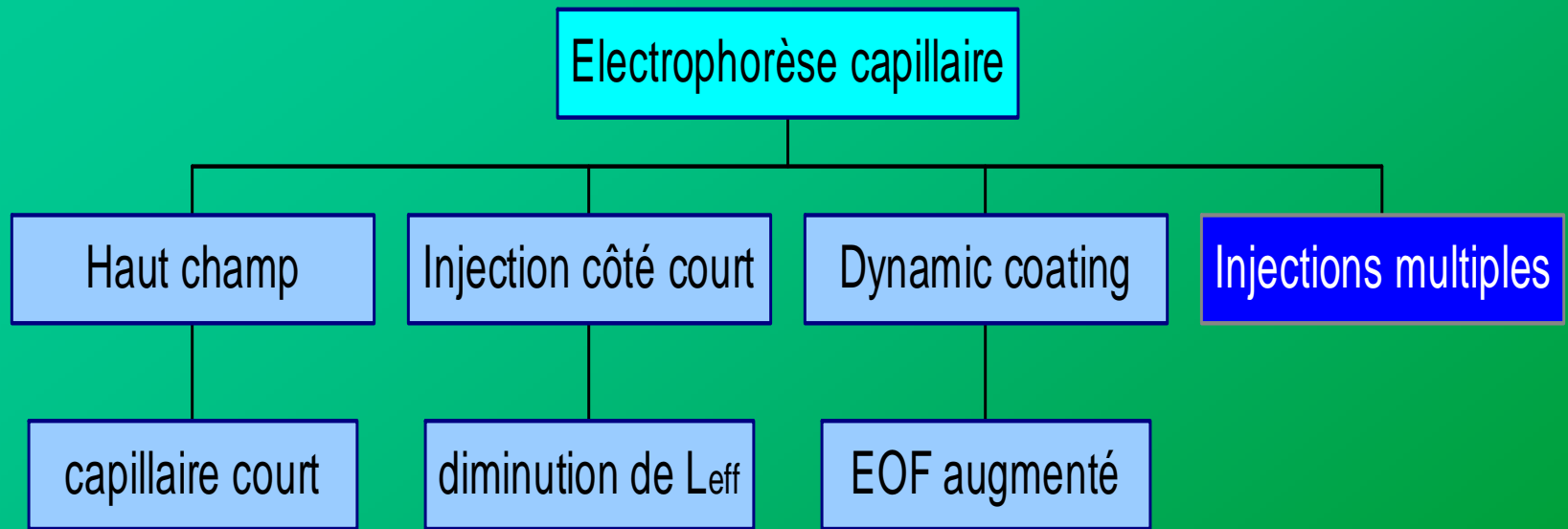


à l'effet Joule

$$N = \frac{\mu_{app} U L_{eff}}{2D L_{tot}}$$

- ✓ Diminution de l'efficacité
- ✓ Diminution de la résolution

La CE rapide



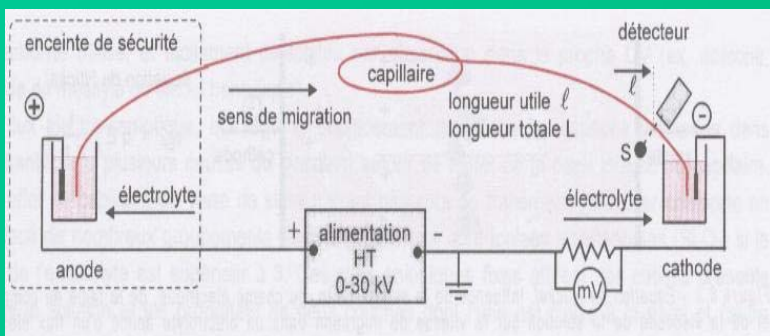
$$t_{mig} = \frac{L_{eff} L_{tot}}{\mu_{app} U}$$

$$\mu_{app} = \mu_{eff} + \mu_{EOF}$$

$$N = \frac{\mu_{app} U L_{eff}}{2D L_{tot}}$$



Injection du côté court (SEI)



Diminution de la longueur effective du capillaire (8.5 cm)

✓ Diminution de t_{mig}

$$t_{mig} = \frac{L_{eff} L_{tot}}{\mu_{app} U}$$

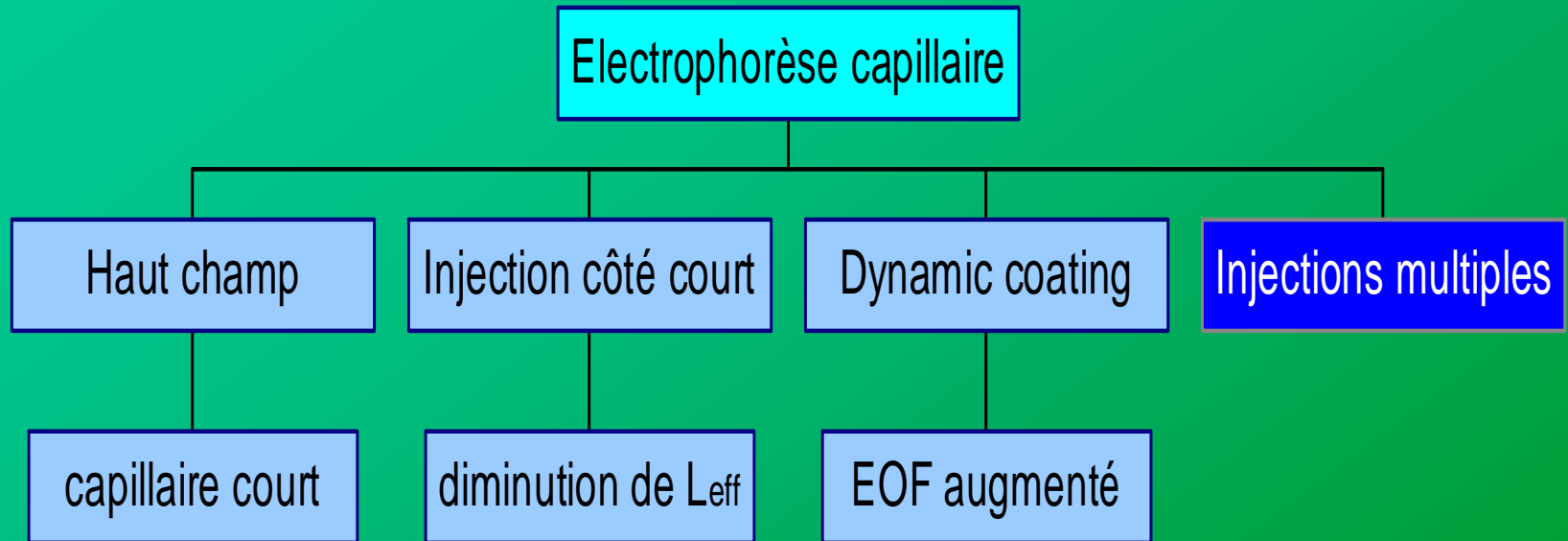
$$N = \frac{\mu_{app} U}{2D} \frac{L_{eff}}{L_{tot}}$$



✓ Diminution de l'efficacité

✓ Diminution de la résolution

La CE rapide



$$t_{mig} = \frac{L_{eff} L_{tot}}{\mu_{app} U}$$

$$\mu_{app} = \mu_{eff} + \mu_{EOF}$$

$$N = \frac{\mu_{app} U L_{eff}}{2D L_{tot}}$$

Dynamic coating: CEofix® (DC)



- ✓ Accélération du flux électroosmotique
- ✓ Stabiliser le temps de migration des PAs
- ✓ Conservation / Augmentation de l'efficacité



✓ Coût

$$t_{mig} = \frac{L_{eff} L_{tot}}{\mu_{app} U}$$

$$\mu_{app} = \mu_{eff} + \mu_{EOF}$$

Conditions opératoires: stratégies rapides

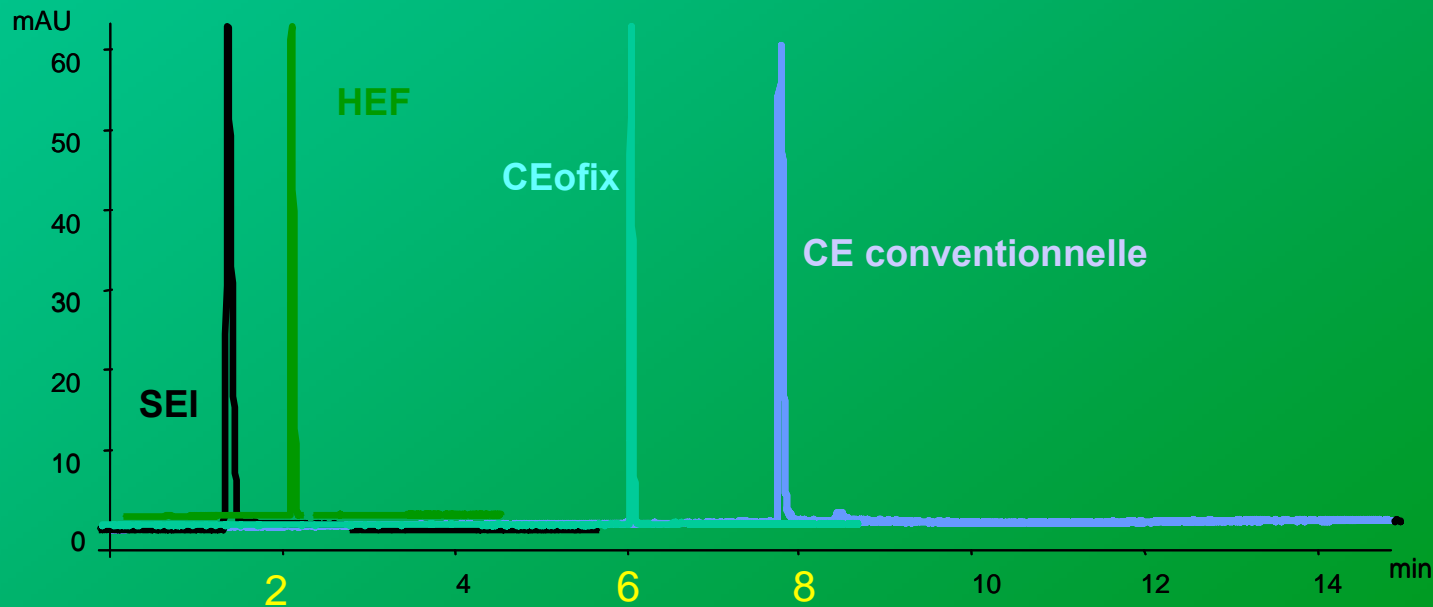


Paramètre	Analyse conventionnelle	Analyse à haut champ	Injection du côté court	Revêtement dynamique
L_{tot} du capillaire	64.5 cm	32.5 cm	✓	✓
L_{eff} du capillaire	56 cm	24 cm	8.5 cm	✓
Diamètre interne du capillaire	50 µm	✓	✓	50 µm – le dynamique coating
Voltage	30 kV avec une rampe de 30	✓	✓	✓
Courant	25 µA	60 µA	✓	✓
Injection	8 sec à 50 mbar (13 nL)	4.5 sec à 20 mbar (4.8 nL)	4 sec à -15 mbar (1.6 nL)	✓
Détection	UV-Vis	✓	✓	✓
Temps de réponse	0.1 à 0.2 sec	✓	✓	✓
Température	25 °C	✓	✓	✓
Electrolyte	Tampon Tris-phosphate, 50 mM, pH 2.5	✓	✓	✓



Résultats (substance modèle tetracaïne)

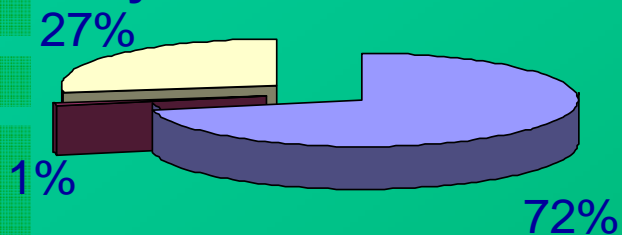
Méthode	Temps de migration [min]	Efficacité [plateaux]	Coût [Frs] / analyse
Analyse conventionnelle	7.773	209179	0.26
Haut champ	2.072	105700	0.26
Injection du côté court	1.734	39945	0.26
Revêtement dynamique	5.973	376411	1.20



Résultats (substance modèle tetracaïne)



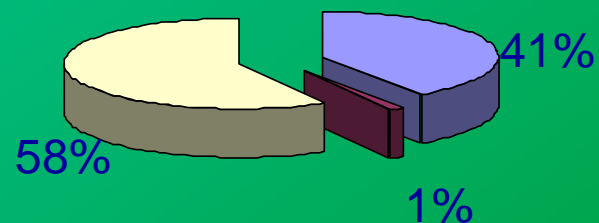
Analyse conventionnelle



TAT = 10.93 min

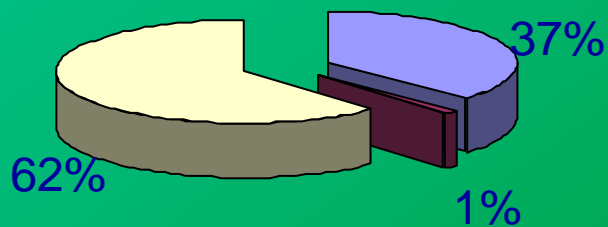
- Préconditionnement
- Temps d'analyse réel
- Injection

Analyse à haut champ



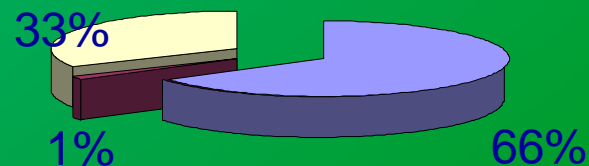
TAT = 5.18 min

Injection du côté court



TAT = 4.87 min

Revêtement dynamique



TAT = 9.13 min

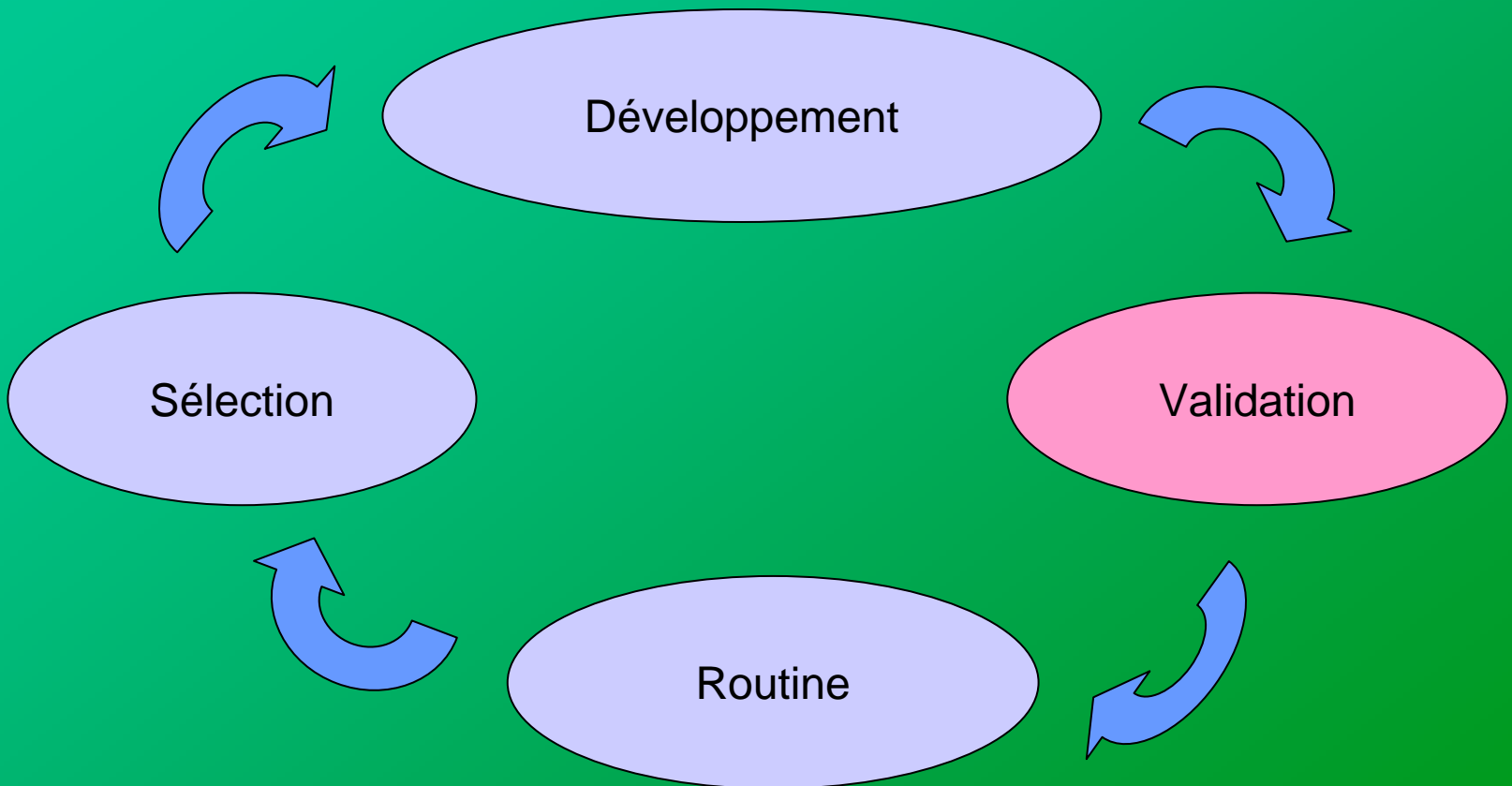
Méthode choisie



Injection du côté court

- ✓ Effet Joule négligeable
- ✓ Diminution du t_{mig} d'un facteur de 4.5
- ✓ Perte en efficacité acceptable
- ✓ Perte en résolution acceptable
- ✓ Facile à manipuler
- ✓ Configuration instrumentale flexible
- ✓ Bon marché

Validation de la méthode injection du côté court



Validation de la méthode injection du côté court: Critères de validation* et limites autorisés (LCQ)



- ✓ Justesse: entre 95 - 105 %
- ✓ Répétabilité et fidélité intermédiaire: $CV < 3\%$
- ✓ Résolution: > 1.5
- ✓ Linéarité: $r^2 > 0.9900$
- ✓ Spécificité de la méthode: dégradation accélérée

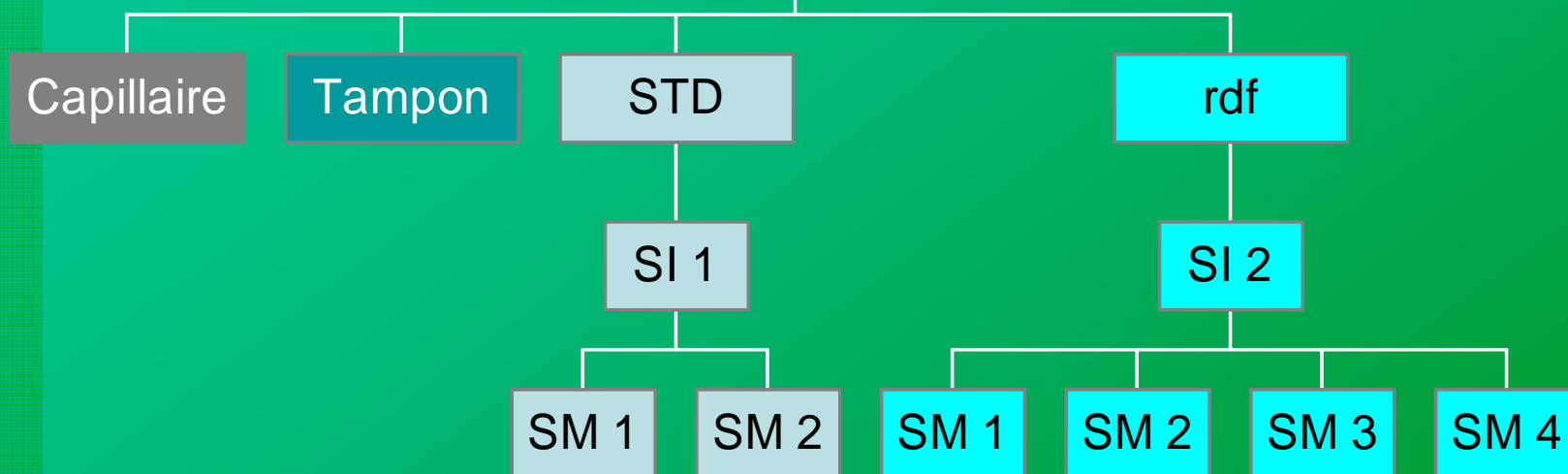
*Comission SFSTP (Ph. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewe, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L.Valat), STP Pharma Pract., 13, 2003, pages 101-138



Validation conventionnelle:

3 x

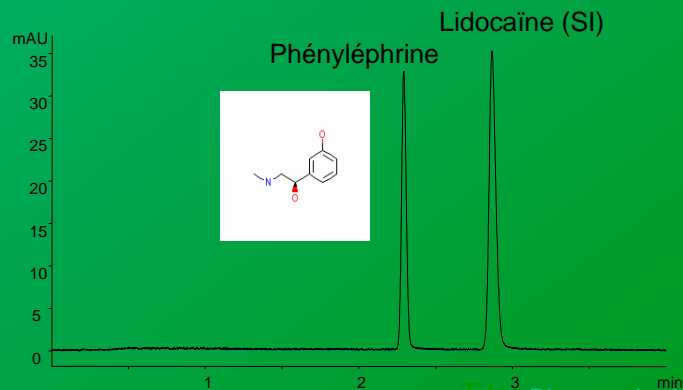
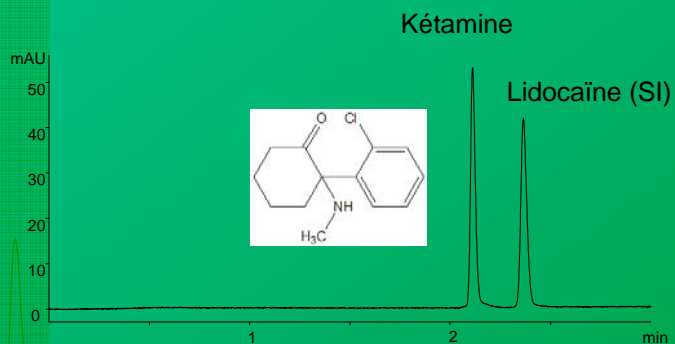
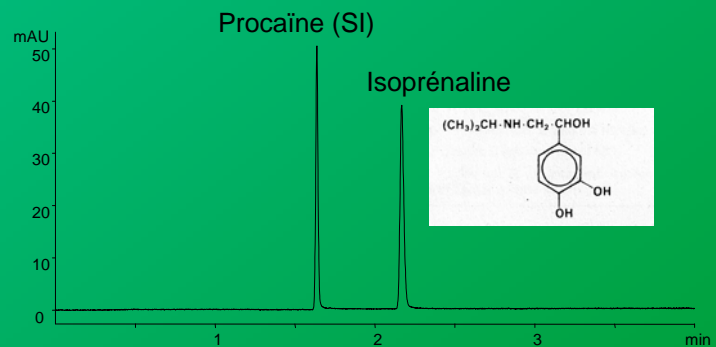
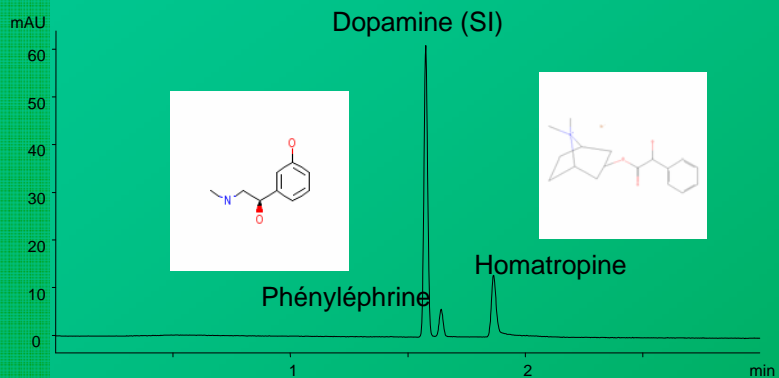
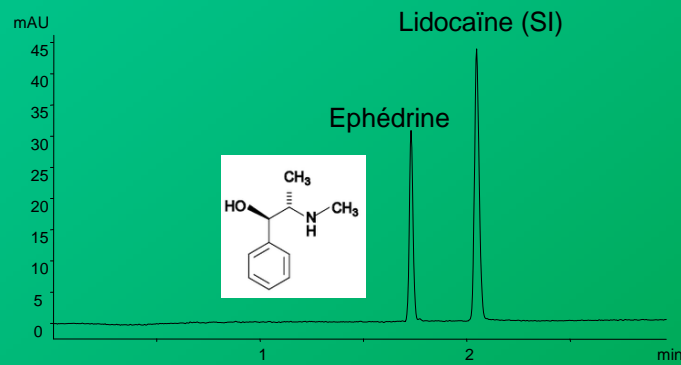
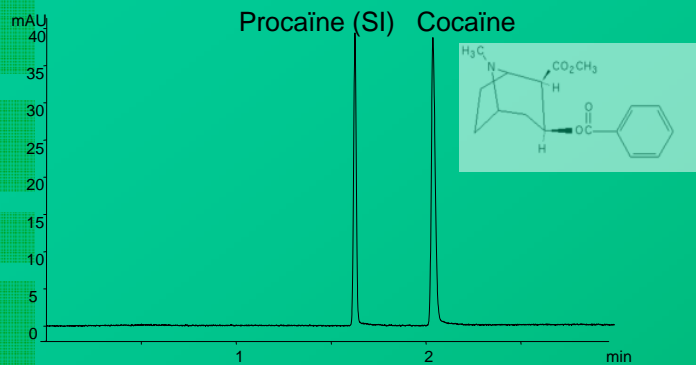
Validation conventionnelle (1 jour)



Dilutions (80%, 100%, 120%)



Méthode validée pour:



Résultats :

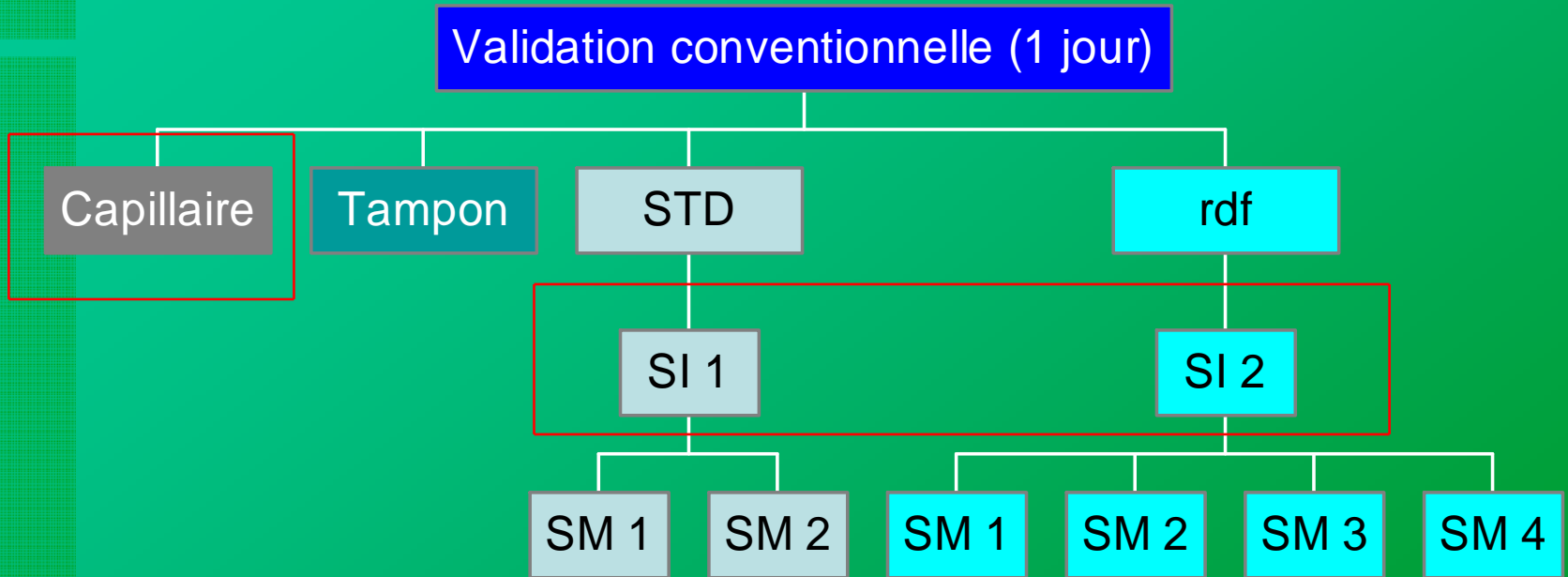


- ✓ Justesse : entre 95 – 105 %
- ✓ CV_R : < 3 % (excepte la phényléphrine)
- ✓ CV_r : < 3 % (excepte l'isoprénaline à 120 %)
- ✓ Linéarité: $r^2 > 0.9900$ (excepte l'injection ophtalmique faible jour 3)

➔ Injection du côté court simplifiée

➔ Injection du côté court en „sandwich“

Validation conventionnelle versus validation simplifiée:



Dilutions (80%, 100%, 120%)

Injection du côté court simplifiée:



Méthodologie	Concentration	Justesse	Intervalle de confiance	Répétabilité	Fidélité
Injection du côté court conventionnelle	80%	101.6%	6.3%	3.4%	3.4%
	100%	100.5%	8.0%	4.4%	4.4%
	120%	101.6%	8.8%	4.8%	4.8%
Injection du côté court simplifiée	80%	100.1%	11.0%	1.9%	5.9%
	100%	97.4%	4.8%	2.9%	2.6%
	120%	100.5%	5.7%	3.4%	3.2%

Résultats :



- ✓ Justesse : entre 95 – 105 %
- ✓ CV_R : < 3 % (excepte la phényléphrine)
- ✓ CV_r : < 3 % (excepte l'isoprénaline à 120 %)
- ✓ Linéarité: $r^2 > 0.9900$ (excepte l'injection ophtalmique faible jour 3)

➔ Injection du côté court simplifiée

➔ Injection du côté court en „sandwich“

Injection du côté court en sandwich:



Méthodologie	Concentration	Justesse	Intervalle de confiance	Répétabilité	Fidélité
Injection du côté court conventionnelle	80%	101.6%	6.3%	3.4%	3.4%
	100%	100.5%	8.0%	4.4%	4.4%
	120%	101.6%	8.8%	4.8%	4.8%
Injection du côté court simplifiée	80%	100.1%	11.0%	1.9%	5.9%
	100%	97.4%	4.8%	2.9%	2.6%
	120%	100.5%	5.7%	3.4%	3.2%
Injection du côté court « sandwich »	80%	100.0%	3.7%	1.4%	2.0%
	100%	97.6%	4.0%	1.8%	2.2%
	120%	96.8%	4.8%	2.5%	2.7%



✓ Avec la stratégie injection du côté court en „sandwich“ des meilleurs résultats sont obtenus

→ Cette stratégie est appliquée aux futures validations



à l'intégration des pics

Intégration: scopolamine

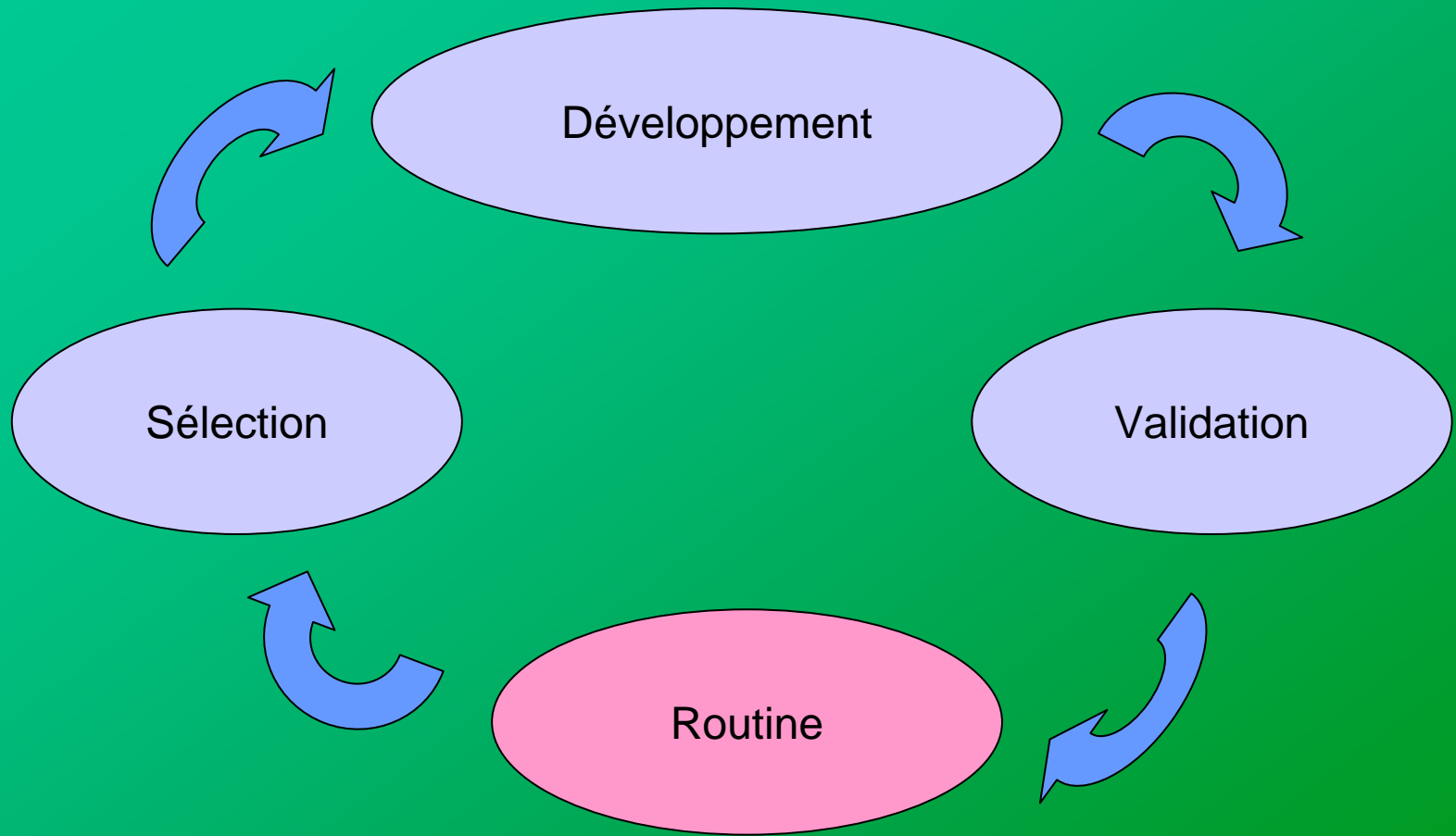


Individu 1:

	Justesse	Répétabilité	Fidélité
80%	101.6%	1.1%	1.5%
100%	100.9%	1.0%	1.4%
120%	100.1%	1.2%	2.3%

Individu 2:

	Justesse	Répétabilité	Fidélité
80%	103.8%	1.9%	3.2%
100%	102.0%	1.1%	2.5%
120%	100.5%	1.3%	2.7%



Analyse de routine:



Principe actif	Valeur obtenue avec la méthode développée	Dosage de référence	Valeur obtenue avec la méthode de référence
Cocaïne	103%	UV	101%
Kétamine	99%	CE conventionnelle	99%
Injection ophtalmique faible : Homatropine	96%	CE conventionnelle	99%
Injection ophtalmique faible : Phényléphrine	100%	CE conventionnelle	97%
Phényléphrine	87%	CE conventionnelle	88%
Ephédrine	107%	HPLC	104%
Isoprénaline	103%	HPLC	105%



Conclusion:

- ✓ Méthode développée
- ✓ Validation pour 6 formulations
- ✓ Analyse de routine



futures validations



Merci pour votre attention

Christina WEBER

