



# Validation d'une méthode de dosage de l'Amphotéricine B par Chromatographie Liquide Haute Performance

Z. KILIC, ML TALL, C. SIMON; M. LENFANT, EH DIOUF, D SALMON, C PIVOT, F PIROT  
SERVICE PHARMACEUTIQUE - GROUPEMENT HOSPITALIER ÉDOUARD HERRIOT – HOSPICES CIVILS DE LYON

## INTRODUCTION

La Pharmacie à Usage Intérieur réalise en moyenne par an 500 collyres et 74500 gélules d'Amphotéricine B. Les collyres dosés à 5 mg/ml sont utilisés en association avec d'autres collyres antibiotiques (vancomycine, ceftazidime, gentamicine) dans le traitement des kératites et endophtalmies microbiennes et les gélules d'Amphotéricine B (125 mg) sont indiquées dans la prévention des candidoses digestives chez les patients immunodéprimés, Actuellement la détermination de la teneur du principe actif dans le cadre du contrôle qualité libératoire de chaque lot est effectuée par spectrophométrie dans l'ultra-violet. Face à l'augmentation de la production de ces deux préparations hospitalières et pour une optimisation des analyses, une nouvelle méthode de dosage par chromatographie liquide haute performance a été mise au point et validée.

## MATERIELS ET METHODE

La validation analytique a été réalisée selon les recommandations de la Conférence Internationale d'Harmonisation (CIH) dans l'intervalle de mesure situé entre 2,25 et 5,25 µg/ml. Elle a consisté en la détermination de la spécificité (interférences des excipients), de la linéarité (n=5), de la fidélité (répétabilité, fidélité intermédiaire), de l'exactitude, des limites de détection et de quantification. La séparation chromatographique a été obtenue sur une colonne C 18, 2,6 µm, 100 mm x 4,6 mm, thermostatée à 40°C. La phase mobile était composée d'eau acidifiée avec l'acide orthophosphorique (pH : 3.0) et de l'acétonitrile (20/80, v/v). Le débit de la pompe était fixé à 1,2 ml/min et la détection a été effectuée à 405 nm pour un volume d'injection de 10 µl.

## RESULTATS ET DISCUSSION

La méthode de dosage a montré une bonne linéarité entre 2,25 µg/ml et 5,25 µg/ml (entre 60% et 140% par rapport à la concentration cible) avec un coefficient de corrélation moyen  $r = 0,992$ , une fidélité satisfaisante avec un coefficient de variation  $< 2\%$  et une exactitude avec des taux de recouvrement situés entre 98 et 101 %. Les limites de détection et de quantification sont respectivement de 0,46 µg/ml et 1,4 µg/ml. Les temps de rétention ont été stables pour toutes les injections à  $0,7 \text{ min} \pm 5\%$ . Le temps de rétention de l'Amphotéricine B préparé à partir de la spécialité Fungzone® et celui de la matière première de grade pharmaceutique étaient identiques. Aucun effet matrice dû aux excipients de la spécialité Fungzone® ou aux étapes de préparation des échantillons n'a été mis en évidence.

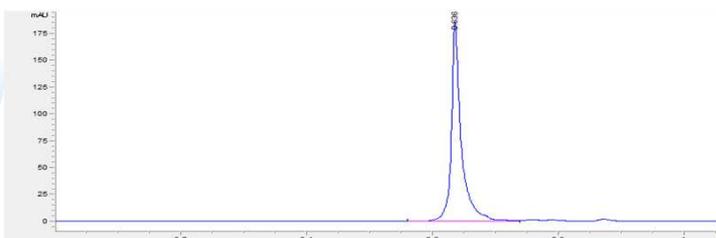


Figure 1 : Chromatogramme obtenu à partir d'un échantillon du collyre à 3,75 µg/ml

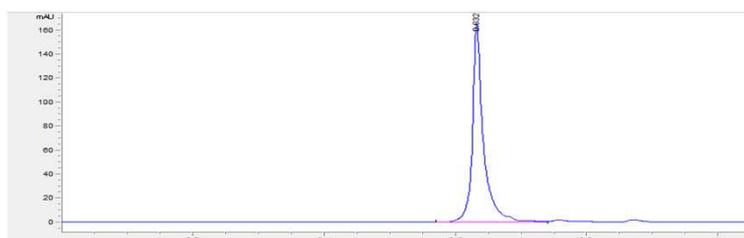


Figure 2 : Chromatogramme obtenu à partir de l'Amphotéricine B matière première à 3,75 µg/ml

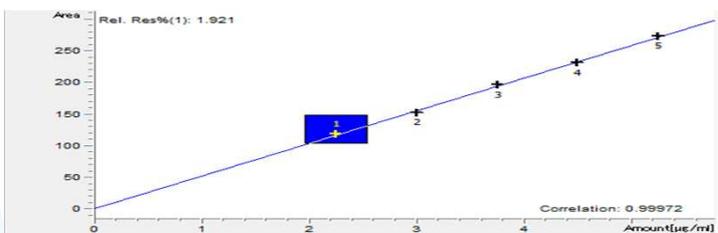


Figure 3 : Droite de calibration réalisée à partir du collyre

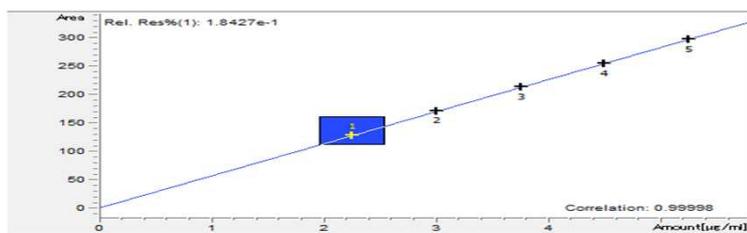


Figure 4 : Droite de calibration réalisée à partir de l'Amphotéricine B matière première

Tableau 1 : Résultats de la validation de la méthode de dosage

PARAMÈTRES		RESULTATS		CRITERES D'ACCEPTATION
Linéarité (p < 0,05)	Domaine de linéarité	[2,25 et 5,25 µg/ml]		Intervalle de mesure encadrant les dosages
	Droite de régression	$y = 54,70x + 6,10$		Validité de la droite de régression : test de Cochran Test de l'ordonnée à l'origine : test de Student Existence d'une pente significative
	Coefficient de corrélation	$r = 0,992$		$r \geq 0,99$
Exactitude	Taux de recouvrement	[98%;101%]		[95%;105%]
Fidélité	Fidélité intermédiaire	Coefficient de variation	1,97%	$\leq 5\%$
	Répétabilité		1,67%	
Limite de détection		0,46 µg/ml		NA
Limite de quantification		1,40 µg/ml		NA

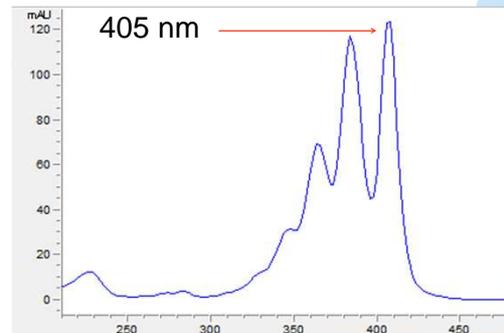


Figure 5 : Spectre d'absorption de l'Amphotéricine B

## CONCLUSION

La méthode de dosage a été validée selon les recommandations de la CIH et cette technique spécifique, simple, rapide et précise permet d'optimiser le contrôle qualité libératoire des préparations tout en réduisant le temps technique par l'analyse simultanée de plusieurs lots de collyres et /ou de gélules.