



Available online at <http://www.ifgdg.org>

Int. J. Biol. Chem. Sci. 10(5): 2331-2340, October 2016

ISSN 1997-342X (Online), ISSN 1991-8631 (Print)

**International Journal
of Biological and
Chemical Sciences**

Original Paper

<http://ajol.info/index.php/ijbcs>

<http://indexmedicus.afro.who.int>

Validation d'une méthode de dosage CLHP de l'anticancéreux chlorhydrate de doxorubicine dans des poudres lyophilisées pour préparation injectable

André Sawa KPAIBE*, Christophe N'cho Amin, Esaie Basile SOUMAHORO,
Michèle AKE et Anglade Kla MALAN

*Département de Chimie Analytique, Bromatologie, Chimie Générale et Minérale,
UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Félix Houphouët-Boigny,
BPV 34 Abidjan, Côte d'Ivoire.*

**Auteur correspondant; E-Mail: andresawa@yahoo.fr / BPV 34 Abidjan, Cote d'Ivoire.
Tel: +33753042886 / +22540774954.*

RESUME

En Côte d'Ivoire, plus de 12000 cas de cancer ont été enregistrés avec près de 500 nouveaux cas chaque année. Un programme national de lutte contre le cancer a développé des stratégies permettant aux patients de disposer de traitements efficaces et à moindres coûts. Un accent a été mis sur l'approvisionnement des pharmacies hospitalières en médicaments génériques anticancéreux à base de chlorhydrate de doxorubicine, utilisé en polychimiothérapie avec d'autres médicaments dans les protocoles thérapeutiques en vigueur en Côte d'Ivoire. Une méthode de dosage du chlorhydrate de doxorubicine par chromatographie liquide a été validée. Les résultats des critères de validation ont été définis. C'est une méthode simple à mettre en œuvre pour le dosage de routine du chlorhydrate de doxorubicine. Elle a été appliquée au dosage du chlorhydrate de doxorubicine dans 77 médicaments génériques anticancéreux. La teneur en chlorhydrate de doxorubicine dans ces médicaments a été conforme aux spécifications des fabricants.

© 2016 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés : Chlorhydrate de Doxorubicine, anticancéreux, validation, chromatographie liquide.

A validated HPLC assay method for doxorubicin hydrochloride cancer drug in lyophilised powder for injection preparation

ABSTRACT

In Côte d'Ivoire, more than 12000 cancer cases have been recorded, with almost 500 new cases each year. A national program develops strategies for patients to have effective and cheap treatments. Particular emphasis was placed on supplying hospitals with doxorubicin hydrochloride based cancer drugs, used in chemotherapy with other drugs in the therapeutic protocols of Côte d'Ivoire. A doxorubicin hydrochloride

© 2016 International Formulae Group. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v10i5.30>

2764-IJBCS

dosage method by liquid chromatography was developed and validated. The results of the validation criteria have been defined. The developed method is simple to implement in routine control. It has been applied to the determination of doxorubicin hydrochloride in 77 anti-cancer generic drugs. The content of these pharmaceuticals formulation (lyophilised Powder Injection) of doxorubicin hydrochloride determined was in good agreement with the manufacturers' specifications.

© 2016 International Formulae Group. All rights reserved.

Keywords: Doxorubicin hydrochloride, Anticancer, Validation, Liquid chromatography.

INTRODUCTION

Depuis plusieurs années, le cancer demeure un véritable problème de santé publique. Il constitue l'une des principales causes de mortalité dans le monde (Jaryum, 2008). En 2012, les maladies cancéreuses ont fait près de quatorze (14) millions de nouveaux cas et 8,2 millions de décès. Plus de 60% des nouveaux cas de cancer sont retrouvés en Afrique, en Asie, en Amérique centrale et latine, (Stewart, 2015). En Côte d'Ivoire, plus de 12000 cas de cancer ont été enregistrés avec plus de 500 nouveaux cas chaque année (Echimane et al., 2000 ; Effi et al., 2013). Les coûts élevés des traitements anticancéreux ont pendant plusieurs années rebuté les malades de sorte que les traitements étaient dans la plupart des cas amorcés à des stades très avancés de la maladie (Toure et al., 2013). Plus de 70% de cas de cancer sont dépistés tardivement (Stewart, 2015), entraînant de graves conséquences cliniques. De fait, pour améliorer les conditions de prise en charge de la maladie cancéreuse, un programme national de lutte contre le cancer (PNLCa) a été mis en place depuis juin 2007 par le ministère en charge de la santé de Côte d'Ivoire. Ce programme a élaboré des stratégies permettant aux patients de disposer de traitements efficaces à moindre coût (Touré et al., 2013).

C'est ainsi qu'une politique d'approvisionnement des centres de traitement en médicaments génériques a été mise en place. Elle a rendu disponibles et accessibles les médicaments anticancéreux dans les centres hospitaliers. L'accent a été mis sur le chlorhydrate de doxorubicine (Figure1) qui est utilisé dans le traitement de manifestations néoplasiques (Lucas et al., 2016) de différentes sortes, seule ou en polychimiothérapie dans les protocoles thérapeutiques en vigueur. Plusieurs médicaments génériques à base de chlorhydrate de doxorubicine ont été mis à la disposition des malades dans les centres de soins en Côte d'Ivoire. Cependant, la qualité des médicaments génériques dispensés aux malades demeure une nécessité à considérer. En effet, l'OMS a rapporté qu'un quart des médicaments distribués dans les pays en développement sont de mauvaises qualités (WHO, 2003; Almuzaini et al., 2013). Ces médicaments sont des spécialités pharmaceutiques et des génériques contrefaits (Ba, 2006). Dans ce contexte, il apparaît indispensable d'effectuer un contrôle de conformité de la substance active (chlorhydrate de doxorubicine) avant l'administration aux malades.

Cet article décrit une méthode d'analyse chromatographique de routine du chlorhydrate de doxorubicine validée pour un

contrôle de routine des lots de médicaments disponibles en milieu hospitalier.

MATERIEL ET METHODES

Réactifs, substances de référence et échantillons

L'acétonitrile, et l'acide acétique provenaient d'ACI chemicals (Asie). La poudre de chlorhydrate de doxorubicine provenait de Sigma-Aldrich (France). L'eau désionisée a été utilisée. Tous les réactifs utilisés étaient de qualité analytique. L'étude a porté sur deux marques de médicaments anticancéreux à base de chlorhydrate de doxorubicine, présentés sous forme de lyophilisats micronisés pour préparation injectable. Les deux marques ont été codifiées échantillon A et échantillon B au cours de l'étude. Deux (02) lots (lot 1 et lot 2) pour l'échantillon A dosé à 50 mg/ml et un (01) lot pour l'échantillon B dosé à 10 mg/ml ont été obtenus. Soixante-dix-sept (77) échantillons dont 47 flacons pour l'échantillon A (17 flacons du lot 1 et 30 flacons du lot 2), et 30 flacons pour l'échantillon B ont été analysés.

Equipements et solutions

Le matériel était composé d'une chaîne de chromatographie liquide haute performance (Waters, USA), d'une étuve (Prolabo, France), d'une balance de précision (Sartorius, France), d'un agitateur magnétique (Bioblock Scientifique, France), d'un pH-mètre (Metler Toledo, France), d'un spectrophotomètre d'absorption UV (Schimadzu, France) et de verreries classiques de laboratoire.

La solution de référence du chlorhydrate de doxorubicine a été préparée en dissolvant 50 mg de poudre de chlorhydrate de doxorubicine dans une fiole jaugée de 50 ml avec une solution de dissolution constituée du mélange

eau/acétonitrile/acide acétique (75/24/1 v/v/v). Le mélange a été effectué à l'aide d'un agitateur magnétique à 400 tours/min pendant 15 minutes. Une solution concentrée contenant 1 mg/ml de chlorhydrate de doxorubicine a été obtenue. Ensuite une gamme étalon de chlorhydrate de doxorubicine à 5 niveaux de concentration (8 µg/ml, 9 µg/ml, 10 µg/ml, 11 µg/ml, 12 µg/ml) a été obtenue par dilution de la solution de chlorhydrate de doxorubicine concentré à 1 mg/ml avec la solution de dissolution.

Les échantillons A et B dosés à 50 mg/ml et à 10 mg/ml ont été dissous respectivement dans 50 ml et dans 10 ml de la solution de dissolution. Les solutions obtenues ont été agitées à 400 tours/min pendant 15 minutes, puis diluées au 100^{ème} avec la solution de dissolution pour obtenir une concentration de 10 µg/ml en chlorhydrate de doxorubicine.

Conditions opératoires

Les conditions d'analyse chromatographique ont été définies et optimisées. La longueur d'onde d'absorption a été obtenue par spectrophotométrie d'absorption UV suite à un balayage de longueur d'onde d'absorption entre 200 nm et 600 nm réalisé sur la solution de référence dosée à 1 mg/ml de doxorubicine. La phase stationnaire était constituée d'une colonne C18 (245 mm×4 mm, 5 µm). La phase mobile a été obtenue en comparant deux solutions du mélange eau/acétonitrile/acide acétique de différentes proportions. Une solution de proportion 80/19/1 v/v/v (Ping et al., 1999) et une solution de proportion 75/24/1 v/v/v, à pH 3. Le débit a été fixé à 1 ml/min.

Validation de la méthode

Les critères de validation de la

méthode pour l'analyse des échantillons de chlorhydrate de doxorubicine ont été la linéarité, la répétabilité, l'exactitude, la limite de détection et la limite de quantification (Badea et al., 2005 ; ICH Harmonised Tripartite, 2005; Briot et al., 2016). La linéarité a été déterminée (n=3) sur une gamme d'étalons de solution de référence de concentration en chlorhydrate de doxorubicine comprise entre 8 µg/ml et 12 µg/ml. La répétabilité (n=6) sur la solution de référence de chlorhydrate de doxorubicine et sur un échantillon de générique de chlorhydrate de doxorubicine concentré à 10 µg/ml a été réalisée. L'exactitude (n=3) a été déterminée par la méthode des ajouts dosés sur la solution de référence concentrée à 8 µg/ml. Les limites de détection et de quantification ont été évaluées à partir de dilutions successives de solutions de référence de chlorhydrate de doxorubicine.

Application de la méthode

La méthode validée a été appliquée au dosage des échantillons de chlorhydrate de doxorubicine dans les échantillons prélevés. Chaque échantillon a été analysé en double dans les conditions fixées. Les valeurs moyennes des concentrations de chlorhydrate de doxorubicine obtenues ont été comparées aux spécifications des fabricants.

RESULTATS

L'analyse de la solution de référence de chlorhydrate de doxorubicine au spectrophotomètre UV, a révélé des maxima d'absorbance entre 200 nm et 300 nm (Figure 2). La longueur d'onde de 254 nm a été retenue pour la suite de l'étude. Concernant le choix de la phase mobile, l'analyse de la solution de référence avec pour phase mobile le mélange eau/acétonitrile/acide acétique (80/19/1 v/v/v) à pH 3 a révélé sur le chromatogramme obtenu le pic du chlorhydrate de doxorubicine à 12,234 min.

En outre L'analyse de la solution de référence avec pour phase mobile le mélange eau/acétonitrile/acide acétique (75/24/1 v/v/v) à pH 3 a révélé sur le chromatogramme obtenu, le pic du chlorhydrate de doxorubicine à 7,776 minutes (Figure 3). La phase mobile constituée du mélange eau/acétonitrile/acide acétique (75/24/1 v/v/v) à pH 3 a été retenue pour la suite des analyses. En ce qui concerne la validation de la méthode, le domaine de linéarité a porté sur des concentrations en chlorhydrate de doxorubicine comprises entre 8 µg/ml et 12 µg/ml avec une droite de régression $Y=53367X-3365,8$ (Figure 4) et un coefficient de détermination de $r^2=0,997$. Les coefficients de variations obtenus à l'issue de l'étude de répétabilité sur les concentrations de 9 µg/ml, 10 µg/ml et 11 µg/ml de la solution de référence ont rapporté des coefficients de variation (CV) de 0,70%, 0,50% et 0,45%. La répétabilité sur l'échantillon de concentration 10 µg/mL a révélé un CV de 0,92% (Tableau 1). Le pourcentage moyen de récupération obtenu, exprimant l'exactitude a été de 98,49% (Tableau 2). Les limites de détection et de quantification ont été respectivement de 0,08 µg/ml et de 0,8 µg/ml.

Les conditions d'analyse optimums utilisant une phase stationnaire C 18 (254 mm x 4 mm, 5 µm), une phase mobile composé du mélange eau/acétonitrile/acide acétique (75/24/1, v/v/v, pH 3), un débit d'élution de 1 ml/min et une longueur d'onde de détection de 254 nm ont été appliqués aux dosages du chlorhydrate de doxorubicine dans les échantillons A et B (Tableau 3). Les concentrations en chlorhydrate de doxorubicine ont été conformes aux spécifications (ICH Harmonised Tripartite, 2005). Elles sont comprises dans les intervalles de conformité définis entre [49,5-50,5] mg/l pour les échantillons dosées à 50 mg/ml et [9,5-10,5] mg/l pour les échantillons dosées à 10 mg/l (Pietrzak et al., 2003).

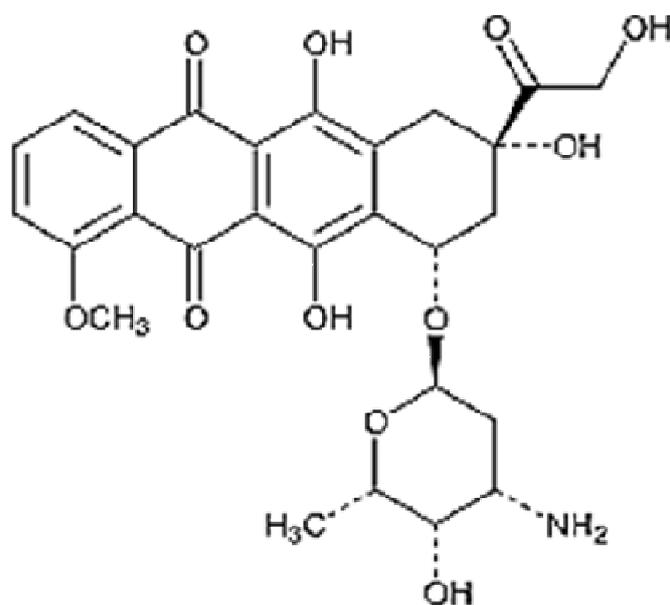


Figure 1: Structure chimique de la doxorubicine.

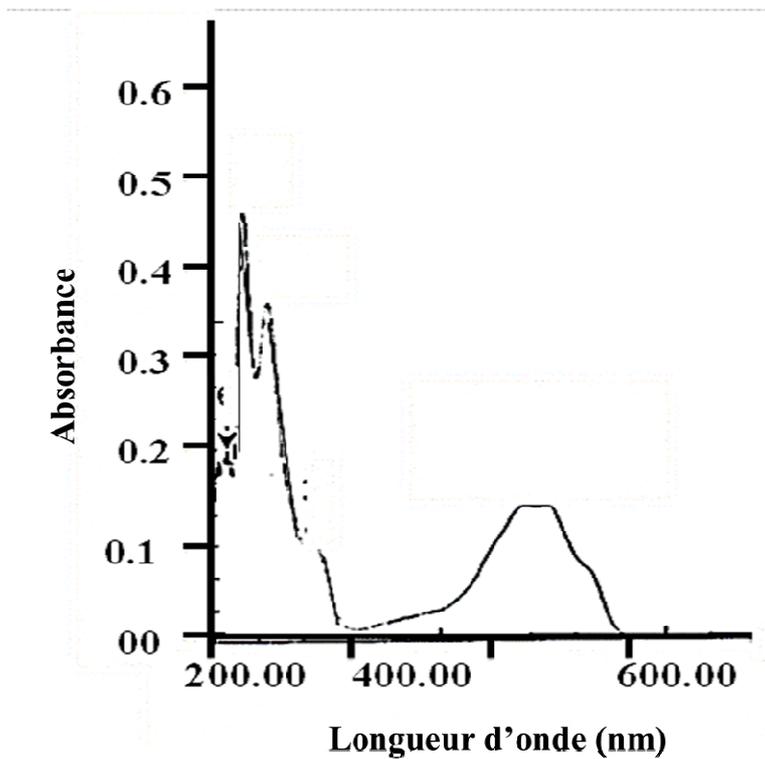


Figure 2: Spectre d'absorption UV du chlorhydrate de doxorubicine.

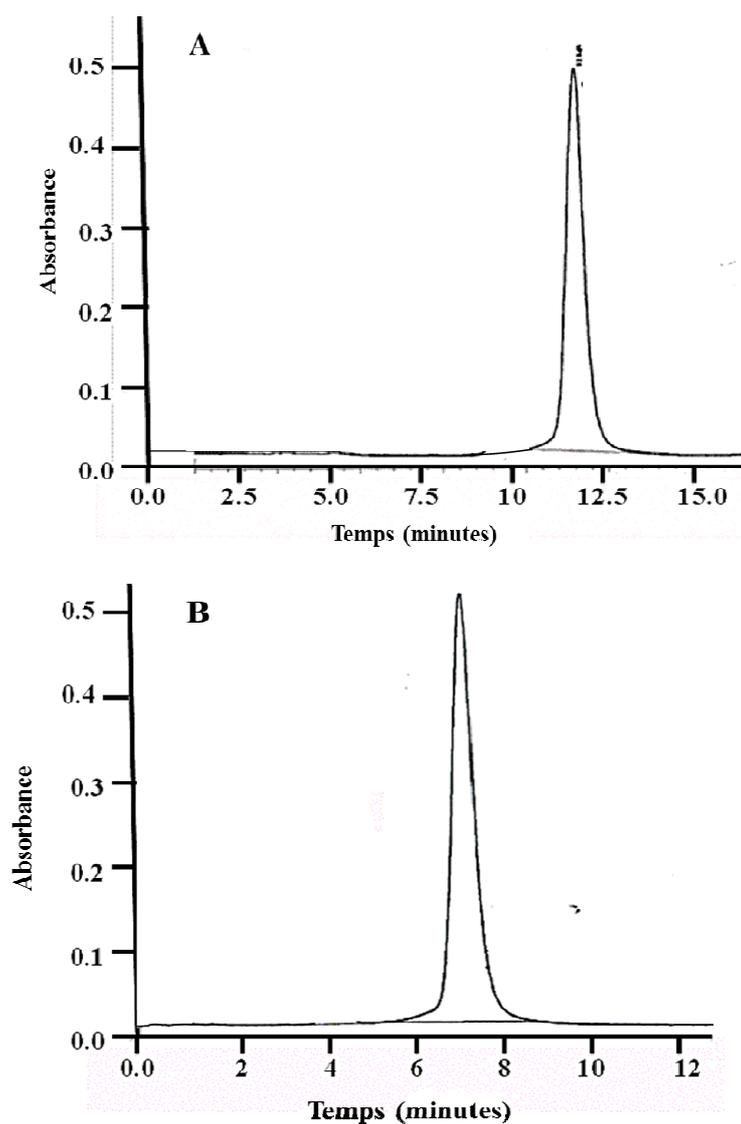


Figure 3 : Chromatogrammes d'une solution de référence à 10 mg/l de chlorhydrate de doxorubicine avec pour phase mobile (A) le mélange eau/acétonitrile/acide acétique (80/19/1 v/v/v) à pH 3. (B) le mélange eau/acétonitrile/acide acétique (75/24/1 v/v/v) à pH 3.

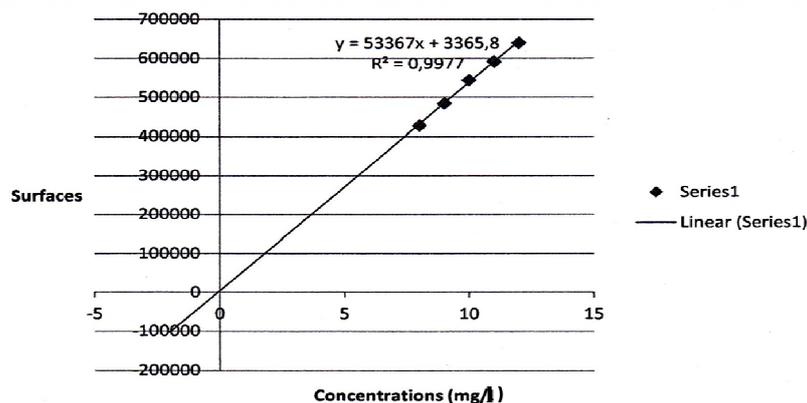


Figure 4 : Linéarité des concentrations de chlorhydrate de doxorubicine.

Tableau 1 : Répétabilité de la méthode sur des concentrations de solution de chlorhydrate de doxorubicine.

Répétabilité (n=6)	Concentrations (mg/l)	Moyenne de la surface des pics	Ecart type	Coefficient de variation
Solution de référence	9	479751,3	3374,735	0,70%
	10	562080	2819,694	0,50%
	11	605093,8	2697,636	0,45%
Echantillons de médicament	10	9,90		1,39%

Tableau 2 : Exactitude de la méthode sur des concentrations de la solution de référence du chlorhydrate de doxorubicine.

Quantité de chlorhydrate de doxorubicine ajoutée (µg/ml)	Pourcentage de récupération (%)	Pourcentage de récupération moyen (%)
1	97,66	98,49
2	98,99	
3	89,84	

Tableau 3: Teneurs en chlorhydrate de doxorubicine des échantillons analysés.

Numéro d'échantillon (n=30)	Teneur moyenne	Teneur moyenne	Teneur moyenne
	Echantillon A Lot 1 (50mg/l)	Echantillon A Lot 2 (50mg/l)	Echantillon B (10mg/l)
Concentration moyenne	49,99	49,28	9,99
Ecart type	0,60	0,64	0,31
CV%	1,2	1,29	3,1

DISCUSSION

Le contrôle des médicaments anticancéreux à base de chlorhydrate de doxorubicine par chromatographie liquide dans les conditions retenues a révélé le pic du chlorhydrate de doxorubicine à 7,776 minutes. Ce temps de rétention se rapproche des spécifications de la pharmacopée européenne (2011) qui rapportent un temps de rétention de 8 minutes.

Dans le but d'obtenir des temps de rétention réduits pour des temps d'analyses plus courts à moindre coût, le mélange eau/acétonitrile/acide acétique de proportion 75/24/1, v/v/v à pH 3, a été retenu comme phase mobile d'analyse car le temps de rétention obtenu pour le chlorhydrate de doxorubicine (7,776 minutes) a été satisfaisant contrairement aux travaux de Larson et al. (2003) qui ont rapporté un temps de rétention plus long (15 minutes). De plus, les solvants que compose cette phase mobile sont d'usage courant, pouvant ainsi réduire le coût des analyses dans le cadre de contrôle de routine.

Les résultats des critères de validation de la méthode que sont la linéarité, la répétabilité et l'exactitude ont été satisfaisants. Le domaine de linéarité a été mis en évidence avec une droite de régression ($Y=53\ 367X-3365,8$) et un coefficient de détermination (0,997) significatifs. Les coefficients de variations obtenus à l'issue des tests de répétabilité pour les solutions de référence (0,70%, 0,50%, 0,45%) et pour l'échantillon de générique (0,92%) ont été conformes à la norme (2%). Le pourcentage moyen de récupération (98,49%) obtenu, exprimant l'exactitude a été conforme à la norme comprise entre 90% et 110%. Les limites de détection et de quantification obtenues ont rapporté des CV (2,05% et 2,4%) satisfaisants (ICH Harmonised Tripartite, 2005; Farooqui et al., 2010; Sharmin et al., 2016).

Le dosage des médicaments à base de

chlorhydrate de doxorubicine dans les échantillons prélevés a montré que le chlorhydrate de doxorubicine a été identifié dans tous les échantillons analysés. Les concentrations moyennes en chlorhydrate de doxorubicine ont été conformes aux indications des fabricants. Les résultats obtenus attestent de la bonne qualité des médicaments à base de chlorhydrate de doxorubicine utilisés dans les structures sanitaires de la Côte d'Ivoire. Cette méthode contribuerait à assurer la conformité des lots de médicaments à base de chlorhydrate de doxorubicine avant l'administration aux malades et à détecter les contrefaçons qui pourraient circuler en milieu hospitaliers (Höllein et al., 2016; Krakowska et al., 2016). Elle pourrait concourir à l'instauration systématique de contrôle post-distribution de médicaments anticancéreux à base de chlorhydrate de doxorubicine de Côte d'Ivoire. En outre, dans le cadre du suivi clinique des malades traités, cette méthode de limite de quantification faible (0,08 µg/mL) pourrait être utilisée pour le dosage de la doxorubicine dans les liquides biologiques après la mise en œuvre d'une procédure d'extraction adaptée (Al-Abd et al., 2009).

Conclusion

La présente étude a permis de mettre au point une méthode chromatographique de dosage du chlorhydrate de doxorubicine en routine. Les paramètres de validation de la méthode ont révélé que la méthode constitue un moyen de contrôle de la conformité des teneurs en chlorhydrate de doxorubicine dans les formulations pharmaceutiques. L'application de la méthode à l'analyse de médicaments génériques à base de chlorhydrate de doxorubicine a révélé que les teneurs en substances actives de ces échantillons étaient conformes aux spécifications des fabricants. Cette méthode peut être donc proposée aux structures en

charge du contrôle de qualité des médicaments pour le contrôle de routine des médicaments anticancéreux à base de chlorhydrate de doxorubicine en milieu hospitalier.

CONFLIT D'INTERETS

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

CONTRIBUTION DES AUTEURS

ASK a contribué à l'exploitation des résultats et à la rédaction du manuscrit. EBS a contribué à la réalisation des dosages. CNA a contribué à la correction du manuscrit. MA et AKM ont initié et supervisé les travaux.

REFERENCES

- Al-Abd AM, Kim NH, Song SC, Lee S J, Kuh H J. 2009. A simple HPLC method for doxorubicin in plasma and tissues of nude mice. *Archives of Pharmacal Research*, **32**(4): 605-611.
- Almuzaini T, Choonara I, Sammons H. 2013. Substandard and counterfeit medicines: a systematic review of the literature. *BMJ Open*, **3**(8): 002923.
- BA S. 2006. La contrefaçon des médicaments: un phénomène en pleine expansion. *Medecine Tropicale*, **66**(6): 529.
- Badea I, Lazar L, Moja D, Nicolescu D, Tudose A. 2005. A HPLC method for the simultaneous determination of seven anthracyclines. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **39**(1): 305-309.
- Badea I, Lazar L, Moja D, Nicolescu D, Tudose A. 2005. A HPLC method for the simultaneous determination of seven anthracyclines. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **39**(1): 305-309.
- Briot T, Robelet A, Morin N, Riou J, Lelièvre B, Lebellet-Dehaut AV. 2016. Développement et validation d'une méthode de dosage des traces de détergents inactivants totaux du prion. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, **74**(4): 317-325.
- Echimane AK, Ahnoux AA, Adoubi I, Hien S, M'Bra K, D'Horpoock A, Diomandé M, Anongda Danho, Mensah-Adoh I, Parkin DM. 2000. Cancer incidence in Abidjan, Ivory Coast. *Cancer*, **89**(3): 653-663.
- Effi AB, Koffi KE, Aman NA, Doukouré B, N'dah, KJ, Koffi KD, Kouyaté M, Koui BB, Hondé M, Diomandé MI. 2013. Epidémiologie descriptive des cancers en Côte d'Ivoire. *Bulletin du Cancer*, **100**(2): 119-125.
- Farooqui NA, Smith AA, Sharma HK, Manavalan R. 2010. Analytical method development and validation of secnidazole tablets by RP-HPLC. *J. Pharm. Sci. Res.*, **2**: 412-416.
- Höllein L, Kaale E, Mwalwisi YH, Schulze MH, Holzgrabe U. 2016. Routine quality control of medicines in developing countries: Analytical challenges, regulatory infrastructures and the prevalence of counterfeit medicines in Tanzania. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **76**: 60-70.
- ICH Harmonised Tripartite. 2005. Validation of analytical procedures: text and methodology. ICH Expert Working Group.
- Jaryum KH, Aliyu R, Deme AS, Daning IE, Binjin DN. 2008. Cancer genetics-A review. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **2**(4): 587-591.
- Krakowska B, Custers D, Deconinck E, Daszykowski M. 2016. Chemometrics and the identification of counterfeit medicines-A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **127**(5): 112-122.
- Larson RR, Khazaeli MB, Dillon HK. 2003. Development of an HPLC method for simultaneous analysis of five

- antineoplastic agents. *Applied Occupational and Environmental Hygiene*, **18**(2): 109-119.
- Lucas AT, O'Neal SK, Santos CM, White TF, Zamboni WC. 2016. A sensitive high performance liquid chromatography assay for the quantification of doxorubicin associated with DNA in tumor and tissues. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **119**: 122-129.
- Pharmacopée européenne. 2011. Doxorubicine (Chlorhydrate de). 7(2). p.2044.
- Pietrzak M, Wieczorek Z, Stachelska A, Darzynkiewicz Z. 2003. Interactions of chlorophyllin with acridine orange, quinacrine mustard and doxorubicin analyzed by light absorption and fluorescence spectroscopy. *Biophysical Chemistry*, **104**(1): 305-313.
- Ping Z, Alekha K. 1999. A simple HPLC method for simultaneous analysis of five antineoplastic agents. *Department of Pharmaceutical and Administrative Sciences*, **20**: 543-548.
- Sharmin T, Akter M, Hossain MS. 2016. Analytical method development and validation of Secnidazole in the tablet dosage form by RP-HPLC method. *International Current Pharmaceutical Journal*, **5**(4): 41-44.
- Stewart B, Christopher P. 2015. World cancer report. World Health Organization. 630 p.
- Toure M, N'guessan E, Bambara AT. 2013. Facteurs liés au diagnostic tardif des cancers du sein en Afrique-sub-saharienne: cas de la côte d'ivoire. *Gynécologie Obstétrique et Fertilité*, **41**(12): 696-700.
- WHO. 2003. Substandard and counterfeit medicines. World Health Organization, fact sheet, 275, Geneva.