

Master en Pharmacie

Travail Personnel de Recherche

Etude de la stabilité de solutions de prostaglandine E₁ à 48 et 72h en vue d'une administration parentérale en continu à des patients de néonatalogie

présenté à la

Faculté des sciences de
L'Université de Genève

par

Emilienne Chavan

Unités de recherche

**Service de Pharmacie du CHUV
Laboratoire de Chimie Clinique du CHUV**

Directeur de l'unité

**Prof. Farshid Sadeghipour
Dr. Hugues Henry**

Autres responsables

**Prof. André Pannatier
Dr. Markoulina Berger
David Palmero**

Genève
2014

RESUME

INTRODUCTION

Le canal artériel est un vaisseau sanguin fœtal reliant l'artère pulmonaire à la crosse de l'aorte et permettant au flux sanguin de contourner partiellement les poumons encore non-fonctionnels à l'état fœtal. Sa perméabilité *in utero* est un état actif maintenu principalement par l'effet vasodilatateur puissant des prostaglandines. Après la naissance, il se ferme par contraction de sa musculature lisse et se transforme par fibrose en ligament artériel fixant entre elles l'artère pulmonaire et l'aorte.

Lors de cardiopathies congénitales dites ducto-dépendantes, il est souvent nécessaire de maintenir ce canal artificiellement ouvert par un traitement pharmacologique pour stabiliser l'état du nouveau-né jusqu'à ce qu'une opération correctrice ou palliative puisse avoir lieu. Dans ce but, la prostaglandine E₁ synthétique est administrée sous forme de perfusion continue.

Dans le Service de Néonatalogie du CHUV, les perfusions de prostaglandine E₁ sont préparées dans des seringues de 50ml et administrées pour 24h au maximum. Or, dans la plupart des cas, les 50ml de perfusion ne sont pas administrés en 24h et le reste de la solution est jetée, ce qui engendre des coûts importants pour le service.

L'objectif de ce travail était dans un premier temps de développer et valider une méthode indicatrice de la stabilité de solutions de prostaglandine E₁. Dans un deuxième temps, il s'agissait de déterminer la stabilité physico-chimique de solutions de prostaglandine E₁ à 48 et 72h dans le but de pouvoir proposer une prolongation de la durée de perfusion.

MATERIEL & METHODES

Les analyses ont été effectuées sur un système de chromatographie liquide en phase inverse couplé à un spectromètre de masse à haute résolution de type Orbitrap opérant en mode full scan. La méthode a été développée à l'aide d'un mélange de prostaglandine E₁ et de 10 de ses impuretés de synthèse et/ou de dégradation disponibles dans le commerce: 8-*epi* prostaglandine E₁, 11-*epi* prostaglandine E₁, 15-*epi* prostaglandine E₁, prostaglandine A₁, 8-*epi* prostaglandine A₁, prostaglandine B₁, prostaglandine E₂, 5,6-*trans* prostaglandine E₂, 15-keto prostaglandine E₁ et 13,14-dihydro prostaglandine E₁. La sélectivité de la méthode a été confirmée en réalisant des dégradations forcées du principe actif par des traitements acide, neutre, basique, oxydant, thermique et UV. Par la suite, la méthode a été validée selon l'approche basée sur l'évaluation de l'erreur totale et la construction d'un profil d'exactitude proposée par la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques. Le carry-over ainsi que la stabilité des échantillons à 4 et -20°C a également été investiguée.

Pour répondre au second objectif du travail, une étude de stabilité a été réalisée sur des solutions de prostaglandine E₁ à 1.5 et 15µg/ml préparées par dilution de la spécialité du commerce (Prostin VR) dans du glucose 10% et conditionnées en seringues de 50ml non-teintées et teintées. Des échantillons ont été prélevés à t₀ puis après 24, 48, 72 et 168h de stockage à 30°C et ont été analysés selon la méthode précédemment validée.

RESULTATS & DISCUSSION

Une méthode d'une durée totale de 25min a été développée permettant une séparation efficace de la prostaglandine E₁ et de 10 de ses impuretés. La réalisation des dégradations forcées a montré une sélectivité suffisante et une sensibilité excellente, et a permis de confirmer et compléter les voies de dégradation de la prostaglandine E₁ décrites dans la littérature. La méthode a été validée avec des limites d'acceptation de ±8% et un niveau de risque maximal de 5% pour l'intervalle de dosage 0.100 à 0.188µg/ml. Le carry-over était inférieur à 0.01% rendant son influence sur le dosage de la prostaglandine E₁ négligeable. Les échantillons placés à 4°C étaient stables sur une durée de 9h. Les échantillons stockés -20°C ont révélé une perte significative de principe actif après 2sem.

Lors de l'étude de stabilité, un seul produit de dégradation a été observé. Il s'agit de la prostaglandine A₁ formée à partir de la prostaglandine E₁ par une réaction de déshydratation. A 48 et 72h, le pourcentage moyen de prostaglandine E₁ par rapport à la teneur à t₀ était respectivement de 96.1 ± 3.9% et 90.9 ± 1.8% pour les lots à 1.5µg/ml en seringues non-teintées, 99.2 ± 2.6% et 92.9 ± 3.0% pour les lots à 1.5µg/ml en seringues teintées, 95.1 ± 4.5% et 92.9 ± 5.5% pour les lots à 15µg/ml en seringues non-teintées et 96.1 ± 1.4% et 97.9 ± 3.2% pour les lots à 15µg/ml en seringues teintées.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

La prolongation à 48 voire 72h de la durée de perfusion est envisageable car la stabilité physico-chimique a été démontrée sur 72h et le seul produit de dégradation observé, la prostaglandine A₁, n'est pas toxique. Cependant, il est nécessaire de compléter l'étude par des tests microbiologiques afin de déterminer si le fait de réduire la fréquence de changement de la perfusion entraîne une augmentation du taux de contamination de celle-ci.

ABBREVIATIONS

CHUV	Centre Hospitalier Universitaire Vaudois
CV	Coefficient de Variation
ESI	ElectroSpray Ionisation
FWHM	Full Width at Half Maximum
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
LC	Liquid Chromatography
m/z	Rapport masse sur charge
MS	Mass Spectrometry
PGA ₁	Prostaglandine A ₁
PGB ₁	Prostaglandine B ₁
PGE ₁	Prostaglandine E ₁
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
Ph. Eur.	Pharmacopée Européenne
pK _a	Constante d'acidité
R ²	Coefficient de détermination
R _s	Résolution
SFPC	Société Française de Pharmacie Clinique
SFSTP	Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques
SRM	Selected Reaction Monitoring
TIC	Total Ion Chromatogram
t _R	Temps de rétention
UV	UltraViolet
XIC	Extracted Ion Chromatogram

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	1
1.1. Le canal artériel.....	1
1.2. La prostaglandine E₁ (PGE₁)	1
1.3. La stabilité de la PGE₁.....	2
1.4. Techniques analytiques utilisées lors de ce travail.....	3
1.4.1. Chromatographie liquide (LC).....	3
1.4.2. Spectrométrie de masse (MS).....	4
1.5. Contexte et objectifs du travail de recherche	6
2. MATERIEL & METHODES	7
2.1. Produits utilisés	7
2.2. Instrumentation et conditions LC-MS	7
2.2.1. Conditions LC	7
2.2.2. Conditions MS.....	7
2.2.3. Echantillons utilisés pour le développement de la méthode.....	8
2.3. Validation de la méthode	8
2.3.1. Sélectivité.....	8
2.3.2. Profil d'exactitude.....	8
2.3.3. Carry-over.....	9
2.3.4. Stabilité à 4°C.....	9
2.3.5. Stabilité à -20°C.....	9
2.4. Etude de stabilité	9
3. RESULTATS & DISCUSSION	11
3.1. Développement de la méthode	11
3.1.1. Choix des techniques analytiques.....	11
3.1.2. Choix des conditions LC-MS initiales.....	11
3.1.3. Optimisation de la méthode	11
3.1.4. Analyse du mélange de PGE ₁ et de 10 impuretés obtenues dans le commerce.....	12
3.2. Validation de la méthode	12
3.2.1. Sélectivité.....	13
3.2.2. Profil d'exactitude.....	15
3.2.1. Carry-over.....	16
3.2.2. Stabilité à 4°C.....	16
3.2.3. Stabilité à -20°C.....	17
3.3. Etude de stabilité	17
4. CONCLUSION & PERSPECTIVES.....	20
5. BIBLIOGRAPHIE.....	21
6. ANNEXES	23

1. INTRODUCTION

1.1. Le canal artériel

Le canal artériel est un vaisseau sanguin fœtal reliant l'artère pulmonaire à la crosse de l'aorte (Figure 1). Avec le foramen ovale, il permet au flux sanguin de contourner partiellement les poumons encore non-fonctionnels chez le fœtus. Après la naissance, il commence à se fermer immédiatement tout en restant perméable durant quelques heures à quelques jours. Il se transforme ensuite par fibrose en ligament artériel fixant entre elles l'artère pulmonaire et l'aorte.¹⁻³

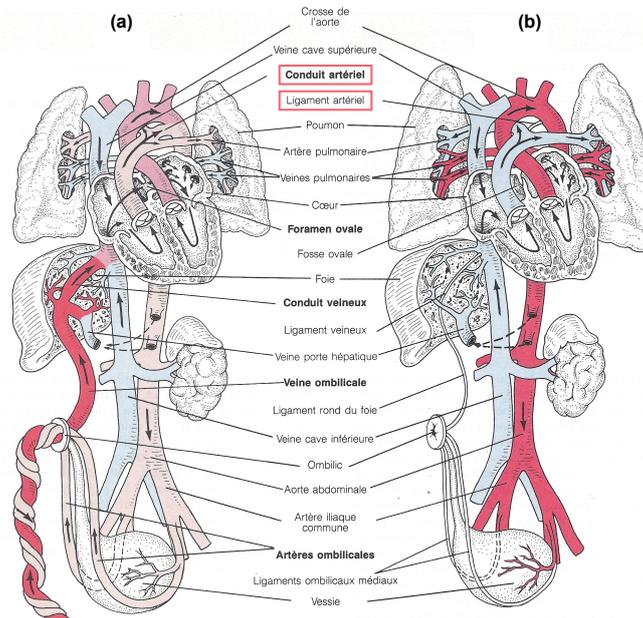


Figure 1: Circulation sanguine du fœtus (a) et du nouveau-né (b)⁴

La perméabilité du canal artériel *in utero* est un état actif maintenu principalement par l'effet vasodilatateur puissant des prostaglandines. Parmi celles-ci, la prostaglandine E_2 circulante produite par le placenta serait la plus impliquée. Après la naissance, la fermeture initiale du canal artériel se fait par contraction de sa musculature lisse suite à l'augmentation de la tension artérielle en oxygène et à la perte de la source placentaire de prostaglandine E_2 .¹⁻³

Lors de cardiopathies congénitales dites ducto-dépendantes, il est souvent nécessaire de maintenir le canal artériel artificiellement ouvert par un traitement pharmacologique pour stabiliser l'état du nouveau-né jusqu'à ce qu'une opération correctrice ou palliative puisse avoir lieu. A cette fin, la prostaglandine E_1 synthétique (alprostadil) est utilisée en routine en soins intensifs de néonatalogie, et ce depuis plus de 30ans.⁵⁻⁸

1.2. La prostaglandine E_1 (PGE_1)

D'un point de vue chimique, la PGE_1 (Figure 2) est un acide faible de formule brute $C_{20}H_{34}O_5$ possédant une masse moléculaire de 354.5g/mol, un point d'ébullition de 110°C, une constante d'acidité (pK_a) de 4.85 et un coefficient de partage octanol-eau de 3.20. Elle se présente sous la forme d'une poudre blanche à légèrement jaunâtre pratiquement insoluble dans l'eau mais facilement soluble dans l'éthanol. Son nom IUPAC est l'acide 7-[(1R,2R,3R)-3-hydroxy-2-[(1E,3S)-3-hydroxyoct-1-ényl]-5-oxocyclopentyl]heptanoïque.^{9,10}

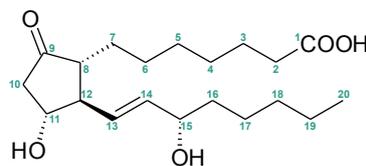


Figure 2: Structure chimique de la PGE_1

D'un point de vue biochimique, la PGE₁ est un acide gras appartenant à la famille des prostanoïdes. Elle est produite via la voie de la cyclooxygénase à partir du diholo γ -linoléate lui-même issu du linoléate, un acide gras essentiel provenant de l'alimentation.¹¹

En néonatalogie, la PGE₁ est indiquée pour conserver temporairement la perméabilité du canal artériel de nouveau-nés atteints de certaines cardiopathies congénitales; il s'agit de la tétralogie de Fallot, des atrésies pulmonaire, tricuspidiennne ou mitrale, des sténoses pulmonaire ou des troncs de l'arc aortique, de la coarctation de l'aorte ou encore de la transposition des grandes artères.¹²

La PGE₁ est commercialisée en ampoules de 1ml contenant 500 μ g de PGE₁ dans de l'éthanol anhydre (Prostin VR, Pfizer). Avant administration, elle doit être diluée dans une solution physiologique stérile. Etant très rapidement métabolisée, la PGE₁ est administrée par perfusion continue, dans une grande veine ou via un cathéter introduit dans l'artère ombilicale jusqu'à l'orifice du canal artériel. Il est recommandé de commencer avec une concentration de 0.05 à 0.1 μ g/kg/min puis de réduire la dose au maximum jusqu'à ce que l'effet désiré soit encore juste maintenu.¹² Une étude épidémiologique effectuée sur une période de 5ans avec 49 nouveau-nés traités par la PGE₁ a révélé une durée de traitement moyenne de 276h.⁶

La PGE₁ agit en se fixant sur des récepteurs aux prostanoïdes de type EP₄ et IP exprimés sur le canal artériel. Ce sont des récepteurs couplés à une protéine G_s. La fixation de PGE₁ entraîne successivement l'activation de l'adénylyl-cyclase, l'augmentation du taux d'AMPc intra-cellulaire, la diminution du taux intra-cellulaire de Ca²⁺ et en conséquence la relaxation de la musculature lisse du canal artériel et son ouverture.^{1,2,13,14}

Administrée par voie intra-veineuse, la PGE₁ est rapidement distribuée dans divers tissus. Elle est métabolisée principalement dans les poumons, jusqu'à 80% de la PGE₁ plasmatique étant extraits en un seul passage.¹² La PGE₁ est principalement métabolisée en 15-keto PGE₁ et 15-keto-13,14-dihydro PGE₁, 2 métabolites inactifs obtenus par oxydation du groupe hydroxyle en C15 de la PGE₁ puis réduction de la double liaison en C13-14. Cependant, la formation d'un métabolite actif a également été observée; il s'agit du 13,14-dihydro PGE₁ obtenu par réduction stéréosélective du 15-keto-13,14-dihydro PGE₁. Ce métabolite ayant un effet vasodilatateur similaire à celui de la PGE₁, l'effet pharmacologique d'une perfusion de PGE₁ serait non seulement dû à l'action de la PGE₁ mais également à celle du 13,14-dihydro PGE₁.^{15,16}

La PGE₁ et ses métabolites sont excrétés par les reins essentiellement. Le temps de demi-vie plasmatique de la PGE₁ est de 5 à 10min et son élimination est complète en l'espace de 24h.¹²

La PGE₁ n'agissant pas de manière sélective sur le canal artériel, des effets indésirables variés ont été observés: apnée, fièvre, convulsions, flush, bradycardie, tachycardie, hypotension, diarrhée, hypokaliémie, etc.^{6,12,17} De plus, la PGE₁ est un puissant inhibiteur de l'agrégation plaquettaire; son utilisation devrait donc être évitée en cas de tendance hémorragique suspectée.¹²

1.3. La stabilité de la PGE₁

Une préparation pharmaceutique est considérée comme stable lorsque, en un laps de temps déterminé, ses propriétés essentielles ne changent pas ou changent au plus dans des proportions tolérables.^{18,19} L'instabilité est principalement due à des réactions chimiques survenant de manière spontanée ou retardée. Dans le cas des formulations liquides, il peut s'agir de réactions d'hydrolyse, de déshydratation, d'oxydation, de photolyse ou encore de racémisation ou d'isomérisation. L'instabilité peut également être physique; il peut s'agir d'une précipitation du principe actif, de phénomène de sorption par interaction contenu-contenant, ou encore du relargage de composants du contenant dans la solution. Finalement, l'instabilité est de type microbiologique lorsqu'il y a croissance de micro-organismes au sein de la préparation.^{19,20}

Les principaux facteurs influençant la stabilité de la PGE₁ en solution sont la température, la présence d'eau et le pH. En effet, la PGE₁ est le plus stable à pH légèrement acide, à faible température et en solvants non-aqueux.²¹⁻²⁷ C'est la raison pour laquelle elle est commercialisée sous forme concentrée dans de l'éthanol anhydre, qu'elle doit être conservée entre 2 et 8°C et que, selon le fabricant, toute solution diluée ne peut être administrée plus de 24h après sa préparation.¹²

En conditions acide ou basique, la partie β -hydroxycétone de la PGE₁ est instable et subit facilement une déshydratation donnant la prostaglandine A₁ (PGA₁), le principal produit de dégradation de la PGE₁ (Figure 3). En milieu basique, la PGA₁ subit ensuite un réarrangement interne de la double liaison de son cyclopenténone pour former la prostaglandine B₁ (PGB₁), un isomère relativement stable.^{23,24,28,29} Ces 2 produits de dégradation sont moins actifs que la PGE₁ et ne sont pas toxiques.^{24,30}

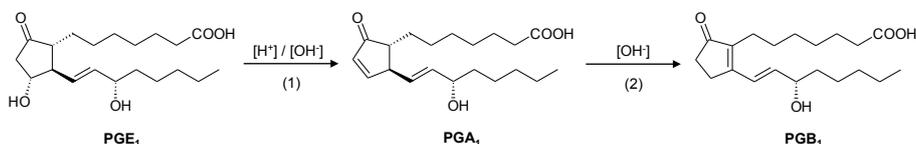


Figure 3: Voie de dégradation majeure de la PGE₁: (1) Déshydratation, (2) Isomérisation

En plus de cette voie de dégradation majeure, la PGE₁ ainsi que les PGA₁ et PGB₁ peuvent former des épimères en C8 et C15.^{24,28,29} Par ailleurs, des produits de réarrangement allylique en C13-15 à partir de la PGE₁ ou de la PGA₁ ont été considérés comme des produits de dégradation possibles mais avec des preuves limitées.²⁹ C'est également le cas d'isomères de PGA₁ et PGB₁ obtenus par migration de l'une ou l'autre des doubles liaisons entre atomes de carbone.³¹

Alors que l'oxydation de la PGE₁ en C15 suivie de la réduction de la double liaison en C13-14 est la première étape d'inactivation *in vivo* (cf. §1.2), l'oxydation initiale en 15-keto PGE₁ requiert de forts agents oxydants *in vitro*.²¹ Par contre, Matson et al.³² ont décrit le 13,14-dihydro PGE₁ comme une impureté potentielle de synthèse ou de dégradation de la PGE₁.

La Pharmacopée Européenne (Ph. Eur.) définit quant à elle 11 impuretés de la PGE₁:

- A. Prostaglandine A₁ (PGA₁)
- B. Prostaglandine B₁ (PGB₁)
- C. 15-oxoprostaglandine E₁ (15-keto PGE₁)
- D. 15-épiprostaglandine E₁ (15-*epi* PGE₁)
- E. 11-épiprostaglandine E₁ (11-*epi* PGE₁)
- F. 8-épiprostaglandine E₁ (8-*epi* PGE₁)
- G. Dinoprostone (PGE₂)
- H. (5E)-prostaglandine E₂ (5,6-*trans* PGE₂)
- I. Ester éthylique de la prostaglandine E₁
- J. Ester isopropylique de la prostaglandine E₁
- K. Triphénylphosphine oxyde

Parmi celles-ci, seules les PGA₁ et PGB₁ sont décrites comme des produits de dégradation potentiels.⁹

Du fait de l'utilisation thérapeutique variée de la PGE₁, sa stabilité en solution a fait l'objet d'un nombre considérable de publications. Pour définir la durée de stabilité, la plupart d'entre elles utilisent une limite acceptable de 90% de la teneur initiale en PGE₁. Cette valeur semble appropriée ici étant donné que la PGE₁ n'est pas un principe actif à marge thérapeutique étroite et que son principal produit de dégradation, la PGA₁, est connu et non-toxique.^{5,19,24,30}

Paul et al.³¹ ont investigué l'influence de différents paramètres sur la stabilité de la PGE₁ en solution, confirmant les conclusions d'études antérieures.^{22-24,28} La cinétique de dégradation de la PGE₁ était de 1^{er} ordre selon l'équation $C_t = C_0 \cdot e^{-kt}$ où C_t est la concentration de PGE₁ au temps t , C_0 sa concentration initiale et k la constante de vitesse de la réaction. La réaction de déshydratation de la PGE₁ était observée en conditions acide et basique mais elle était fortement accélérée avec l'augmentation du pH; la stabilité maximale était obtenue à un pH de 3. La PGB₁ était observée seulement en condition fortement basique et après 2h30 à 60°C. Par ailleurs, l'exposition à la lumière d'une solution saline de PGE₁ stockée durant 196j à 20°C n'avait pas modifié son taux de dégradation.

Pour des solutions de Prostin VR diluée à 20µg/ml dans du NaCl 0.9%, Shulman et al.³³ ont défini une stabilité de 106.5j à 4°C et 9.8j à 25°C. L'étude de Gatti et al.³⁴ confirme cela: pour une solution physiologique à 10µg/ml, il restait 85% de la concentration initiale de PGE₁ après 90j à 2-8°C mais une dégradation rapide était observée à température ambiante. De plus, la stabilité était légèrement meilleure lorsque la solution était conservée à l'abri de la lumière, indiquant une photosensibilité de la PGE₁ contrairement à l'étude de Paul et al.³¹ Par ailleurs, Uebel et al.³⁵ ont évalué la stabilité de solutions de Prostin VR diluée à 40µg/ml dans du NaCl 0.9%, conditionnées en seringues et stockées à 21°C; il restait 90% à 6sem puis 63% à 20sem. Ce profil de stabilité initiale suivie d'une dégradation avait déjà été observé.^{27,36}

Finalement, la stabilité de la PGE₁ a également été évaluée dans des cocktails de substances vasoactives indiqués pour le traitement de la dysfonction érectile.^{30,37-39} Ces études ont montré que la présence de papavérine et phentolamine accélère le processus naturel de dégradation de la PGE₁, ce qui peut s'expliquer aisément par le caractère basique de ces molécules.

1.4. Techniques analytiques utilisées lors de ce travail

1.4.1. Chromatographie liquide (LC)

La LC est une technique analytique permettant de séparer des solutés en solution en les faisant éluer à l'aide d'un liquide (phase mobile) à travers une colonne chromatographique remplie d'un support de fine granulométrie (phase stationnaire).

Le type de LC utilisé lors ce travail, et le plus courant en analyse pharmaceutique, est la chromatographie de partage, en phase inverse. La phase stationnaire est généralement un gel de silice greffé de chaînes alkyles (C18, C8, C4, phényle), et la phase mobile un mélange d'eau et d'un modificateur organique tel le méthanol ou l'acétonitrile. Le gel de silice ainsi modifié étant assimilable à un liquide immobilisé, la séparation est basée sur le coefficient de partage du soluté entre les 2 phases, un phénomène comparable à l'extraction liquide-liquide. La phase mobile étant polaire et la phase stationnaire peu polaire (d'où le

terme de phase inverse), les composés polaires sont élués les premiers. C'est pourquoi ce type de LC est particulièrement adapté pour les molécules à caractère peu polaire et hydrophobe telles que la PGE₁.^{19,40}

Les paramètres influençant la séparation sont divers, rendant cette technique très versatile: phase stationnaire (nature, type de greffage, diamètre particulaire, longueur et diamètre de la colonne), phase mobile (débit, modificateur organique, tampon, additifs, mode isocratique vs gradient), température.

Un système de LC (Figure 4) est généralement constitué de: (a) un réservoir de phase mobile, (b) une pompe à haute pression permettant de faire percoler la phase mobile au travers de la colonne, (c) un système d'injection de l'échantillon à analyser, (d) une colonne chromatographique, (e) un four permettant au besoin de thermostatier la colonne, (f) un détecteur couplé à la sortie de la colonne, et (g) un système informatique permettant de tracer le chromatogramme. De nombreux modes de détection peuvent être couplés à la LC, telle la spectrophotométrie, la spectrofluorimétrie, la réfractométrie ou encore la spectrométrie de masse utilisée lors de ce travail.

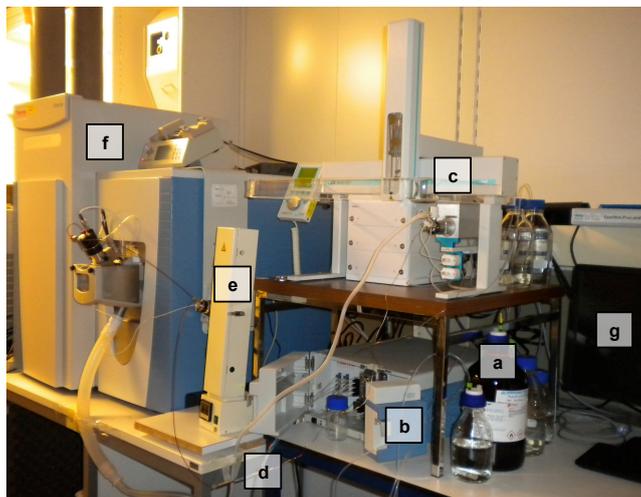


Figure 4: Plateforme LC-MS utilisée lors de ce travail

Le résultat d'une LC est présenté au moyen d'un chromatogramme, courbe qui traduit la variation au cours du temps d'un paramètre relié à la concentration instantanée du soluté en sortie de colonne. Le temps est porté en abscisse et l'intensité du signal de détection en ordonnée. Idéalement, un chromatogramme se présente comme une séquence de pics gaussiens au-dessus d'une ligne de base.^{9,40}

La qualité d'une séparation chromatographique de 2 analytes peut être évaluée en calculant la résolution R_S entre leur pic respectif selon l'équation 1, où t_R est le temps de rétention ($t_{R2} > t_{R1}$) et ω_h la largeur des pics à mi-hauteur.⁹

$$R_S = \frac{1.18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{\omega_{h1} + \omega_{h2}} \quad [\text{Eq. 1}]$$

Plus la résolution est élevée, meilleure est la séparation. A partir de $R_S = 1.5$, on considère que les pics sont résolus, la vallée entre les pics étant d'environ 2%.⁴⁰

1.4.2. Spectrométrie de masse (MS)

La MS est une technique analytique qui mesure sous haut vide et à l'aide de champs électrique ou magnétique le rapport masse sur charge (m/z) d'ions en phase gazeuse obtenus à partir de la substance à analyser. L'échantillon est introduit sous forme gazeuse, liquide ou solide et est ionisé dans la source. Aussitôt formés, les ions sont extraits de la source, focalisés et accélérés avant d'être séparés selon leur m/z par un analyseur de masse puis finalement détectés.⁴⁰

Le résultat est présenté au moyen d'un spectre de masse, graphe où le m/z des ions est porté en abscisse et leur intensité en ordonnée. Le type d'ion le plus abondant conduit au pic le plus intense, appelé pic de base, dont l'intensité est de 100%. Les intensités des autres pics s'expriment en pourcents du pic de base. Le signal d'un ion comporte plusieurs pics correspondant à la distribution statistique des différents isotopes le constituant; on parle alors de profil isotopique.^{9,40}

Un analyseur de masse peut être caractérisé par son domaine de m/z , son pouvoir de résolution, son exactitude, sa sensibilité ainsi que le temps nécessaire à l'acquisition d'un spectre. Le pouvoir de résolution est la capacité à séparer des ions de m/z voisins; il peut être calculé pour un pic isolé en divisant la valeur m/z du pic par sa largeur $\Delta(m/z)$ à mi-hauteur (*Full Width at*

Half Maximum, FWHM). Exprimée en ppm, l'exactitude se calcule quant à elle en divisant par le m/z théorique l'écart entre le m/z mesuré et le m/z théorique.

Grâce à son excellente sélectivité et sensibilité, l'analyse en mode *Selected Reaction Monitoring* (SRM) utilisant un triple quadrupôle a été l'approche standard durant les 2 dernières décennies pour la quantification de petites molécules basée sur la LC-MS.⁴¹⁻⁴³ Cependant, cette approche requiert pour chaque analyte la sélection des ions précurseur et produit, et l'optimisation de l'énergie de collision. Cela prend non seulement du temps lors du développement d'une méthode, mais nécessite d'avoir des composés de référence et rend impossible la détection d'analytes non-ciblés tels que les composants de la matrice, des produits de dégradation ou des adduits des analytes d'intérêt.^{41,44,45}

L'instrument utilisé lors de ce travail est un spectromètre de masse Q Exactive de la société Thermo Scientific (Figure 5). Avec son analyseur de masse de type Orbitrap, il fait partie de la nouvelle génération d'instruments de spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS). Au contraire du mode SRM, l'HRMS est basée sur des données obtenues en mode full scan (balayage complet); tous les ions générés dans la source sont virtuellement enregistrés. La sélectivité prend place en post-acquisition par la construction d'un *Extracted Ion Chromatogram* (XIC) à partir du *Total Ion Chromatogram* (TIC) au m/z théorique de l'analyte, avec une fenêtre de m/z d'extraction étroite, typiquement ≤ 10 ppm. Ainsi, l'information obtenue par HRMS est beaucoup plus complète que celle fournie en mode SRM puisque des analytes en nombre théoriquement illimité peuvent être extraits des données de manière rétrospective.^{41,42,44} De plus, la composition élémentaire des analytes peut être élucidée sur la base de leur masse exacte et profil isotopique.⁴⁴

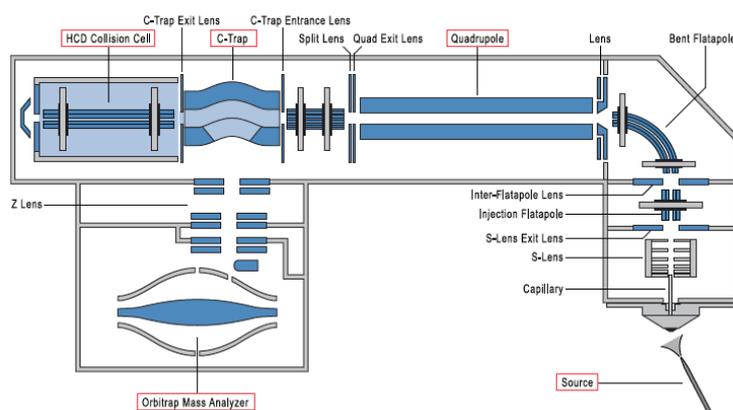


Figure 5: Représentation schématique d'un spectromètre de masse Q Exactive⁴⁶

Comparé à l'acquisition en mode SRM avec une résolution unitaire, plusieurs études ont montré des performances quantitatives équivalentes pour l'HRMS en mode full scan.^{41,43,45,47} De plus, Kaufmann et al.^{43,44} ont conclu qu'une résolution de $\geq 50'000$ (FWHM, m/z 200) avec une fenêtre de m/z appropriée permettait une sélectivité égale voire supérieure.

Le domaine de m/z couvert par le spectromètre de masse utilisé lors de ce travail est de 50 à 4000. La vitesse d'acquisition d'un spectre se situe entre 12Hz pour un pouvoir de résolution de 17'500 (FWHM, m/z 200) à 1.5Hz pour un pouvoir de résolution de 140'000 (FWHM, m/z 200).⁴⁶ Cet instrument permet d'atteindre des exactitudes de masse inférieures à 5ppm avec une calibration externe.⁴¹ De plus, c'est un appareil hybride puisqu'il est doté d'un quadrupôle permettant de sélectionner en amont plusieurs ions précurseurs avec une fenêtre de 0.4Da (m/z 400), et d'une cellule de collision HCD permettant leur fragmentation.⁴⁶ Enfin, il permet un changement de polarité très rapide durant l'analyse, un spectre en mode positif suivi d'un spectre en mode négatif étant acquis en 1s.⁴⁸

a. Ionisation par électrospray (ESI)

Le spectromètre de masse utilisé est équipé d'une source ESI. Il s'agit d'une source d'ionisation douce opérant à pression atmosphérique. Son mécanisme consiste en l'application d'une différence de potentiel de l'ordre de 5kV entre un capillaire en sortie de la LC et une contre-électrode séparés de 0.3 à 2cm. Le fort champ électrique ainsi créé provoque l'accumulation de charges à la surface du liquide situé à l'extrémité du capillaire, formant un cône de Taylor (Figure 6). Lorsque les forces de répulsion coulombiennes égalent la tension superficielle, la surface du liquide se rompt et un spray de gouttelettes fortement chargées apparaît.^{49,50}

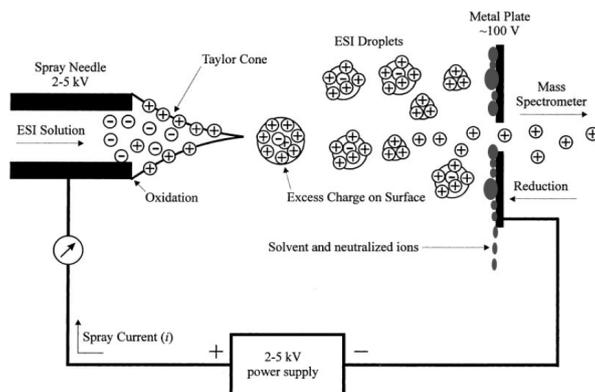


Figure 6: Procédé d'ionisation par électrospray (en mode positif)⁵⁰

Par la suite, le solvant contenu dans ces gouttelettes est évaporé à l'aide d'un gaz de séchage (diazote chauffé) ce qui provoque leur rétrécissement et ainsi augmente leur densité de charge jusqu'au moment où les forces de répulsion coulombiennes approchent le niveau des forces de cohésion des gouttelettes provoquant leur explosion. Ce processus d'évaporation suivie de fission de la gouttelette mère se répète jusqu'à former des ions désolvatés qui sont injectés dans l'analyseur de masse par un orifice à l'aide de champs électriques.^{49,50}

L'ESI libère ainsi des ions généralement non-fragmentés, portant une ou plusieurs charge(s), positive(s) ou négative(s) selon la tension appliquée: $[M+nH]^{n+}$ ou $[M-nH]^{n-}$ respectivement. Il s'agit d'une technique d'ionisation en phase condensée à partir d'ions en solution. Cependant, l'ESI est également applicable à des molécules ne possédant aucun site ionisable grâce à la formation d'adduits, par exemple sodique ou potassique en mode positif et chlorure ou formate en mode négatif.⁴⁹

b. Analyseur de masse Orbitrap

L'Orbitrap est un piège à ions constitué d'une électrode creuse coupée en 2, à l'intérieur de laquelle est placée coaxialement une seconde électrode en forme de fuseau. Des tensions continues sont appliquées sur les électrodes créant un champ électrostatique quadro-logarithmique.^{49,51,52}

Grâce à la C-Trap, les ions produits de façon continue par la source sont stockés et injectés dans l'Orbitrap dans un pulse court, par paquets d'ions d'un même m/z séparés de quelques nanosecondes. Les ions sont capturés dans l'Orbitrap en augmentant rapidement le champ électrostatique. Chaque paquet d'ions se propage alors en un anneau fin en rotation autour de l'électrode centrale. L'anneau oscille également le long de cette électrode, selon une fréquence directement proportionnelle à $(z/m)^{1/2}$ et induit un courant image qui est mesuré de manière différentielle entre les 2 moitiés de l'électrode externe. Une détection à large bande du signal est suivie d'une transformation de Fourier rapide pour convertir le signal en fréquences et finalement en spectre de masse.^{49,52-54}

Les hautes performances d'analyse en terme de pouvoir de résolution et d'exactitude s'expliquent en partie par le fait que la fréquence de l'oscillation axiale mesurée est uniquement liée au m/z des ions et est complètement indépendante de leur énergie.⁵¹

1.5. Contexte et objectifs du travail de recherche

Dans le Service de Néonatalogie du CHUV, les perfusions de PGE₁ sont préparées de manière aseptique sous un flux laminaire horizontal en diluant la spécialité du commerce, Prostin VR, avec du glucose 10%. Les perfusions sont conditionnées dans des seringues non-teintées de 50ml. Une fois préparées, elles sont administrées pour 24h au maximum. Or, dans la plupart des cas, les 50ml de perfusion ne sont pas administrés en 24h et le reste de la solution est jetée, ce qui engendre des coûts importants pour le service.

L'objectif de ce travail était dans un premier temps de développer une méthode indicatrice de la stabilité de solutions de PGE₁ puis de la valider. Dans un deuxième temps, il s'agissait d'évaluer la stabilité physico-chimique de solutions de PGE₁ à 48 et 72h dans le but de pouvoir proposer une prolongation de la durée de perfusion. Pour cela, une étude de stabilité a été réalisée sur des solutions de PGE₁ à 1.5 et 15µg/ml préparées par dilution de Prostin VR dans du glucose 10% et conditionnées en seringues de 50ml. Cette plage de concentrations a été définie en vue de couvrir la totalité des patients pouvant potentiellement être hospitalisés dans le Service de Néonatalogie, étant donné qu'elle couvre une gamme de poids allant de 0.5 à 5.0kg.

2. MATERIEL & METHODES

2.1. Produits utilisés

La liste des produits qui ont été utilisés lors de ce travail est présentée au Tableau 1.

Tableau 1: Produits utilisés

Produit (référence)	Abréviation	Fournisseur
Alprostadil CRS (Y0000054)	PGE ₁	European Pharmacopoeia Reference Standard
8-iso Prostaglandin E ₁ (13360)	8- <i>epi</i> PGE ₁	Cayman Chemical Company
11β-Prostaglandin E ₁ (13450)	11- <i>epi</i> PGE ₁	
15(R)-Prostaglandin E ₁ (13710)	15- <i>epi</i> PGE ₁	
Prostaglandin A ₁ (10010)	PGA ₁	
8-iso Prostaglandin A ₁ (10035)	8- <i>epi</i> PGA ₁	
Prostaglandin B ₁ (11110)	PGB ₁	
Prostaglandin E ₂ (14010)	PGE ₂	
5- <i>trans</i> Prostaglandin E ₂ (14210)	5,6- <i>trans</i> PGE ₂	
15-keto Prostaglandin E ₁ (13680)	15-keto PGE ₁	
13,14-dihydro Prostaglandin E ₁ (13610)	13,14-dihydro PGE ₁	
Prostin VR (N° AMM 45333)	-	Pfizer
Glucose 10% (N° AMM 29550)	Glc 10%	B. Braun
Ethanol absolu pour analyses EMSURE® (1009832500)	EtOH	Merck
Eau ultrapure obtenue à l'aide d'un appareil Synergy UV	H ₂ O	Millipore
Acetonitrile LC-MS CHROMASOLV® (34967-2.5L)	ACN	Fluka
Formic acid eluent additive for LC-MS (56302-50ML-F)	AF	
Hydrogen peroxide solution ≥30% TraceSELECT® (95321-100ML)	H ₂ O ₂	Merck
Acide chlorhydrique c(HCl) = 1mol/l (1N) Titripur® (1090571000)	HCl	
Solution ammoniacale à 25% pour analyses EMSURE® (1054321000)	NH ₄ OH	
Hydroxyde de sodium en pastilles pour analyses EMSURE® (1064951000)	NaOH	Thermo Scientific
Pierce® ESI Negative Ion Calibration Solution (88324)	-	

2.2. Instrumentation et conditions LC-MS

2.2.1. Conditions LC

La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne Symmetry C18 100Å 3.5µm 2.1x100mm (Waters, référence WAT058965) à température ambiante (23 ± 2°C), à travers laquelle une phase mobile constituée de (A) eau + 0.1% d'acide formique (V:V) et (B) acétonitrile + 0.1% d'acide formique (V:V) percolait selon le gradient indiqué au Tableau 2, à l'aide d'une pompe Accela 1250 (Thermo Scientific). Un volume de 10µl des échantillons maintenus à 4°C était injecté à l'aide d'un injecteur HTC PAL (CTC Analytics).

Tableau 2: Gradient de phase mobile

Temps [min]	% A (V:V)	% B (V:V)	Débit [µl/min]
0.0	76	24	300
19.0	57	43	
19.1	0	100	
21.0	0	100	
21.1	76	24	
23.0	76	24	

2.2.2. Conditions MS

Un spectromètre de masse Q Exactive doté d'une source ESI (Thermo Scientific) était couplé au système de LC pour la détection des analytes. Le contrôle de la plateforme LC-MS, l'acquisition des données, l'intégration des pics et la quantification étaient réalisés en utilisant le logiciel Xcalibur 2.2 (Thermo Scientific).

La source ESI opérait en mode négatif selon les paramètres suivants: sheath gas flow rate: 40, auxiliary gas flow rate: 2, spray voltage: 4kV, capillary temperature: 360°C, S-lens level: 80. Les 2 premières minutes de l'analyse étaient dirigées vers la

poubelle par commutation de la valve située entre la colonne chromatographique et le détecteur. Durant ces 2min initiales, le spray voltage était réduit à 0.2kV. Le pouvoir de résolution était fixé à 70'000 (FWHM, m/z 200), la capacité de la C-Trap (Automatic Gain Control) à 3⁶ charges et le temps d'injection maximal à 100ms. L'acquisition était faite en mode full scan sur un domaine de m/z de 50 à 500. Les XICs ont été construits sur une base de 5 décimales et une fenêtre d'extraction de 10ppm autour des m/z théoriques. L'intégration automatique des pics a été faite en utilisant l'algorithme Genesis avec un smoothing type boxcar de 7. Une calibration externe de l'instrument était faite hebdomadairement en infusant une solution de calibration selon les recommandations du fabricant.

2.2.3. Echantillons utilisés pour le développement de la méthode

La méthode a été développée en utilisant un mélange de PGE₁ et de certaines de ses impuretés de synthèse et/ou de dégradation obtenues dans le commerce: 8-*epi* PGE₁, 11-*epi* PGE₁, 15-*epi* PGE₁, PGA₁, 8-*epi* PGA₁, PGB₁, PGE₂, 5,6-*trans* PGE₂, 15-keto PGE₁, 13,14-dihydro PGE₁. Une solution stock à 100µg/ml a été préparée dans l'éthanol pour chaque analyte puis des solutions individuelles ainsi qu'un mélange des 11 analytes à 1µg/ml ont été préparés à partir des solutions stocks par dilution dans la phase mobile constituée d'eau, acétonitrile et acide formique en proportions 76.0:24.0:0.1 (V:V:V).

2.3. Validation de la méthode

La méthode a été validée selon les recommandations de la Société Française de Pharmacie Clinique (SFPC) pour la sélectivité et selon l'approche basée sur l'évaluation de l'erreur totale et la construction d'un profil d'exactitude proposée par la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP).^{19,55}

2.3.1. Sélectivité

La sélectivité de la méthode développée a été évaluée en réalisant des dégradations forcées de PGE₁. Pour cela, 2 solutions mères (SM) ont été préparées en diluant respectivement 100µl d'éthanol et 100µl d'une solution éthanolique de PGE₁ à 500µg/ml avec 900µl de glucose 10%. La préparation des solutions filles (SF), leur neutralisation éventuelle et leur dilution dans la phase mobile (PM) avant analyse ont été réalisées selon le Tableau 3. La phase mobile utilisée pour la dilution finale était constituée d'eau, acétonitrile et acide formique en proportions 76.0:24.0:0.1 (V:V:V).

Les traitements acide, neutre, basique et oxydant ont été réalisés en mettant durant 3h à température ambiante les solutions mères en présence de réactifs chimiques appropriés. Le traitement thermique a été réalisé en plaçant les échantillons durant 3h dans un système de chauffage (Dri-Block® heater 2B-2D, Techne) réglé à 80 ± 2°C. Le traitement aux UV a été réalisé en plaçant les échantillons durant 3h dans une enceinte climatique (Climatic Test Cabinet RUMED serie 4000, Rubarth Apparate GmbH) dont les paramètres étaient les suivants: UV-light, 30 ± 2°C, 65 ± 5% d'humidité.

Tableau 3: Protocole pour les dégradations forcées

Traitement	Conditions	Préparation des SF	Neutralisation	Dilution finale
Témoin	-	100µl SM + 100µl H ₂ O	-	50µl SF + 950µl PM
Acide fort	HCl 0.1M	100µl SM + 100µl HCl 0.2M	200µl SF + 100µl NaOH 0.2M	75µl SF neutralisée + 925µl PM
Acide faible	AF 5%	100µl SM + 10µl AF + 90µl H ₂ O	-	50µl SF + 950µl PM
Neutre	H ₂ O	100µl SM + 100µl H ₂ O	-	50µl SF + 950µl PM
Base faible	NH ₄ OH 5%	100µl SM + 40µl NH ₄ OH 25% + 60µl H ₂ O	-	50µl SF + 950µl PM
Base forte	NaOH 0.1M	100µl SM + 100µl NaOH 0.2M	200µl SF + 100µl HCl 0.2M	75µl SF neutralisée + 925µl PM
Oxydant	H ₂ O ₂ 15%	100µl SM + 100µl H ₂ O ₂ 30%	-	50µl SF + 950µl PM
Chaleur	80°C	100µl SM + 100µl H ₂ O	-	50µl SF + 950µl PM
UV	UV-light	100µl SM + 100µl H ₂ O	-	50µl SF + 950µl PM

Les échantillons ainsi préparés ont été analysés selon la méthode développée.

2.3.2. Profil d'exactitude

La stratégie de validation était basée sur le protocole V2 proposé par la SFSTP.⁵⁵ Des standards d'étalonnage (5 niveaux, sans la matrice) et de validation (3 niveaux, dans la matrice) ont été préparés en duplicat et triplicat respectivement. Le tout a été répété 4x de manière à obtenir 4 séries indépendantes. La préparation de la solution mère (SM), des solutions filles (SF), des standards d'étalonnage (SE) et de validation (SV) pour chacune des 4 séries a été réalisée selon les Tableaux 4 et 5 ci-après. Les pesées initiales ont été effectuées sur une balance analytique AT261 Delta Range (Mettler). La phase mobile (PM) utilisée pour la dilution finale était constituée d'eau, acétonitrile et acide formique en proportions 76.0:24.0:0.1 (V:V:V).

Tableau 4: Protocole pour la préparation de la solution mère (SM) et des solutions filles (SF)

	Concentration [$\mu\text{g/ml}$]	Préparation		
SM	4000	4mg PGE ₁	+	1000 μl EtOH
SF1	400	100 μl SM	+	900 μl EtOH
SF2A/2B	40	100 μl SF1	+	900 μl EtOH
SF3A/3B	20	700 μl SF2A/2B	+	700 μl EtOH
SF4A/4B	10	700 μl SF3A/3B	+	700 μl EtOH
SF5A/5B	5	700 μl SF4A/4B	+	700 μl EtOH

Tableau 5: Protocole pour la préparation des standards d'étalonnage (SE) et de validation (SV)

	Concentration [$\mu\text{g/ml}$]	Préparation des standards intermédiaires			Préparation des standards finaux
SE1	0.400	100 μl SF2A	+	900 μl EtOH	100 μl standard intermédiaire + 900 μl PM
SE2	0.200	100 μl SF3A	+	900 μl EtOH	
SE3	0.100	100 μl SF4A	+	900 μl EtOH	
SE4	0.050	100 μl SF5A	+	900 μl EtOH	
SE5	0.025	50 μl SF5A	+	950 μl EtOH	
SV1	0.200	100 μl SF3B	+	900 μl Glc 10%	100 μl standard intermédiaire + 900 μl PM
SV2	0.100	100 μl SF4B	+	900 μl Glc 10%	
SV3	0.050	100 μl SF5B	+	900 μl Glc 10%	

Les standards ainsi préparés ont été analysés selon la méthode développée. Les résultats obtenus ont été traités à l'aide du logiciel Enoval 3.0 (Arlenda) avec des limites d'acceptation de $\pm 8\%$ et un niveau de risque maximal de 5%.

2.3.3. Carry-over

Le carry-over a été évalué en injectant 6x un standard d'étalonnage à 0.400 $\mu\text{g/ml}$ (cf. §2.3.2) suivi d'un blanc préparé avec 100 μl d'éthanol et 900 μl de phase mobile constituée d'eau, acétonitrile et acide formique en proportions 76.0:24.0:0.1 (V:V:V).

2.3.4. Stabilité à 4°C

La stabilité des échantillons à 4°C a été évaluée en analysant les standards d'une série de validation (cf. §2.3.2) une seconde fois 9h après leur analyse initiale.

2.3.5. Stabilité à -20°C

Pour évaluer l'impact d'une étape de stockage à -20°C, des échantillons aux concentrations cibles de l'étude de stabilité, 1.5 et 15 $\mu\text{g/ml}$, ont été préparés en triplicat par dilution de Prostin VR (concentré pour perfusion à 500 $\mu\text{g/ml}$) dans du glucose 10%. Ils ont ensuite été répartis en 3 aliquotes de 300 μl dans des vials en verre, dont la première a été analysée immédiatement. Les deuxième et troisième aliquotes ont été congelées à -20°C puis analysées après 1 et 2sem de stockage respectivement.

Pour l'analyse, les aliquotes congelées ont été équilibrées à température ambiante durant 10min. Les aliquotes à 1.5 $\mu\text{g/ml}$ ont été préparées par dilution de 1/10 dans la phase mobile. Les aliquotes à 15 $\mu\text{g/ml}$ ont subi une première dilution de 1/10 dans du glucose 10% puis une deuxième dilution de 1/10 dans la phase mobile. Les échantillons ont alors été analysés selon la méthode développée. La phase mobile utilisée pour la préparation des échantillons était constituée d'eau, acétonitrile, acide formique et éthanol en proportions 74.9:24.0:0.1:1.1 (V:V:V:V). Elle a été ajustée de manière à avoir la même composition en eau, acétonitrile, acide formique et éthanol dans l'échantillon final que celle des standards de validation de §2.3.2. Les standards d'étalonnage ont quant à eux été préparés selon le protocole décrit en §2.3.2. Le modèle mathématique utilisé pour la construction des courbes d'étalonnage était une régression linéaire pondérée (1/x).

2.4. Etude de stabilité

L'étude de stabilité a été réalisée sur 7j sur des solutions de PGE₁ à 1.5 et 15 $\mu\text{g/ml}$ préparées par dilution de Prostin VR (concentré pour perfusion à 500 $\mu\text{g/ml}$) dans du glucose 10%. Deux conditionnements ont été utilisés: (a) seringue non-teintée (BD Perfusion 50ml Syringe, BD, référence 300136) et (b) seringue teintée (BD Perfusion 50ml Syringe, BD, référence 300138). Chaque concentration et conditionnement ont été étudiés en triplicat.

Les 3 lots (n° 1 à 3) à 1.5 $\mu\text{g/ml}$ ont été préparés comme suit: (1) dilution de 1ml de Prostin VR ad 10ml de glucose 10%, (2) dilution de 3ml de la solution obtenue en (1) ad 100ml de glucose 10%, (3) répartition en parts égales de la solution obtenue en (2) dans une seringue non-teintée et dans une seringue teintée.

Les 3 lots (n° 4 à 6) à 15µg/ml ont été préparés comme suit: (1) dilution de 3ml de Prostin VR ad 100ml de glucose 10%, (2) répartition en parts égales de la solution obtenue en (1) dans une seringue non-teintée et dans une seringue teintée.

Les 12 seringues ainsi préparées ont été placées dans une enceinte climatique (Climatic Test Cabinet RUMED serie 4000, Rubarth Apparate GmbH) dont les paramètres étaient les suivants: day-light, $30 \pm 2^\circ\text{C}$, $65 \pm 5\%$ d'humidité. Un volume de 1ml par seringue a été prélevé à t0 après la fabrication des lots puis après 24, 48, 72 et 168h de stockage. Celui-ci a été réparti en 2 aliquotes de 300µl dans des vials en verre qui ont été immédiatement stockées à -20°C jusqu'à leur analyse. Au temps d'analyse, l'une des 2 aliquotes a été préparée en duplicat selon le protocole décrit en §2.3.5 et analysée selon la méthode validée. L'analyse a été faite par lot, en intercalant entre les échantillons de chaque seringue les standards d'étalonnage préparés selon le protocole décrit en §2.3.2. Le modèle mathématique utilisé pour la construction des courbes d'étalonnage était une régression linéaire pondérée (1/x).

3. RESULTATS & DISCUSSION

3.1. Développement de la méthode

3.1.1. Choix des techniques analytiques

Le projet initial pour ce travail était de valider la méthode LC-UV proposée par la Pharmacopée Américaine pour la PGE₁ en injection.²⁰ Celle-ci s'est de suite révélée inappropriée dans le cadre d'une étude de stabilité du fait de son étape de dérivatisation pré-chromatographique. En effet, les conditions de dérivatisation pourraient accélérer la dégradation de la PGE₁ et ainsi fausser les résultats.³⁴ Une recherche dans la littérature a donc été menée et a montré l'existence de différentes méthodes LC-UV indicatrices de la stabilité de PGE₁ et sans étape de dérivatisation.^{28,30,31,33,34,38} Néanmoins, un essai préliminaire réalisé selon la méthode décrite par Vieillard et al.³⁰ a montré une sensibilité insuffisante pour les concentrations cibles de l'étude. Il a donc été décidé d'effectuer le travail par LC couplée à une détection MS pour gagner en sensibilité. Le Laboratoire d'analyse de la Pharmacie du CHUV ne possédant pas encore de spectromètre de masse, les analyses ont été réalisées au Laboratoire de Chimie Clinique du CHUV. La plateforme LC-MS utilisée comportait un spectromètre de masse de la technologie Orbitrap à haute résolution (cf. §1.4.2).

3.1.2. Choix des conditions LC-MS initiales

L'objectif était de développer une méthode analytique en vue d'une étude de stabilité de solutions de PGE₁. Elle devait donc permettre de (1) doser la PGE₁ pour suivre son évolution dans le temps, et (2) suivre l'apparition d'éventuels produits de dégradation.¹⁹ Pour développer une telle méthode, la stratégie a été d'utiliser un mélange de PGE₁ et de ses impuretés de synthèse et/ou de dégradation décrites dans la littérature et disponibles dans le commerce (cf. Annexe 1). Aucune méthode LC n'ayant été décrite pour un tel mélange d'analytes, des conditions LC génériques ont été utilisées initialement: gradient de 5 à 100% d'acétonitrile + 0.1% d'acide formique (V:V) en 40min réalisé sur une colonne Symmetry C18 100Å 3.5µm 2.1x50mm (Waters, référence WAT200650). Le choix d'une phase mobile acide s'est basé sur les méthodes LC-MS/MS décrites dans la littérature.^{21,56-58} En effet, avec une phase mobile basique, la rétention de la PGE₁ (pK_a 4.85) était très limitée car sous forme chargée à pH basique.⁵⁶ Alors qu'avec 0.1% d'acide formique (pH 2.6-2.8), la PGE₁ est majoritairement sous forme neutre ce qui la rend compatible à une séparation par LC en phase inverse.

Concernant les conditions MS, la polarité négative a été définie en fonction de la structure de la molécule (acide), de la littérature^{21,56-58} et d'un essai en mode positif qui avait montré une faible intensité du signal. Les autres paramètres ont été fixés à des valeurs standards utilisées sur l'instrument.

3.1.3. Optimisation de la méthode

Dans un premier temps, l'optimisation de la méthode a consisté à améliorer la séparation des 11 analytes du mélange tout en raccourcissant la durée de l'analyse. Cela a été atteint en remplaçant la colonne initiale par une colonne de même type mais de longueur double, et en modifiant le gradient de la phase mobile (cf. §2.2.1). Le temps d'équilibration de la colonne était alors de 1.9min en fin d'analyse + 2min entre les analyses durant les rinçages de la seringue d'injection. Cela est bien inférieur aux recommandations de son fournisseur (10 volumes de colonne) cependant une pression stabilisée en début d'analyse et une bonne répétabilité du t_R des analytes étaient observées. D'ailleurs, il a été démontré que seuls 2 volumes de colonnes suffisent, du moins dans le cas d'analytes non-ionisables et basiques.⁵⁹

Dans un deuxième temps, la méthode a été optimisée dans le but de réduire le carry-over conséquent à une contamination par transfert inter-échantillon. La stratégie a été de doubler les rinçages pré- et post-analyse de la seringue et de la valve d'injection. Pour ne pas trop allonger le temps de rinçage et donc la durée de l'analyse, seuls les rinçages au solvant organique ont été intensifiés, les analytes étudiés étant tous de nature lipophile.

Finalement, une commutation de la valve située entre la colonne et le détecteur a été ajoutée, de manière à diriger les 2 premières minutes de l'analyse vers la poubelle. Le but était d'éviter la contamination du détecteur par le glucose, seul constituant de la matrice des échantillons. L'intérêt de cette tactique a été démontré fortuitement par une analyse durant laquelle la valve s'est bloquée et n'a pu empêcher l'entrée de glucose dans le détecteur. Le XIC au m/z théorique du ion [M-H]⁻ du glucose est présenté en Figure 7 ci-après. De par sa nature fortement polaire, le glucose n'est pas retenu en LC en phase inverse; son t_R (0.63min) correspond donc au temps mort. En conclusion, le glucose élué durant les 2min qui sont normalement dirigées vers la poubelle ce qui permet d'éviter un effet matrice au niveau de la détection MS.

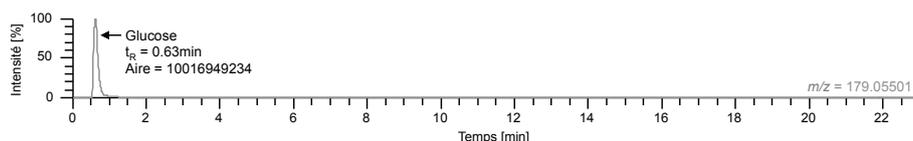


Figure 7: XIC au m/z 179.05501 d'un échantillon contenant du glucose (avec panne de la valve post-colonne)

3.1.4. Analyse du mélange de PGE_1 et de 10 impuretés obtenues dans le commerce

Les chromatogrammes du mélange de PGE_1 et de ses 10 impuretés obtenues dans le commerce analysé selon la méthode optimisée sont présentés en Figure 8 ci-dessous. Les résultats obtenus pour l'analyse individuelle des composés (chromatogrammes et spectres de masse) sont joints en Annexes 2 et 3.

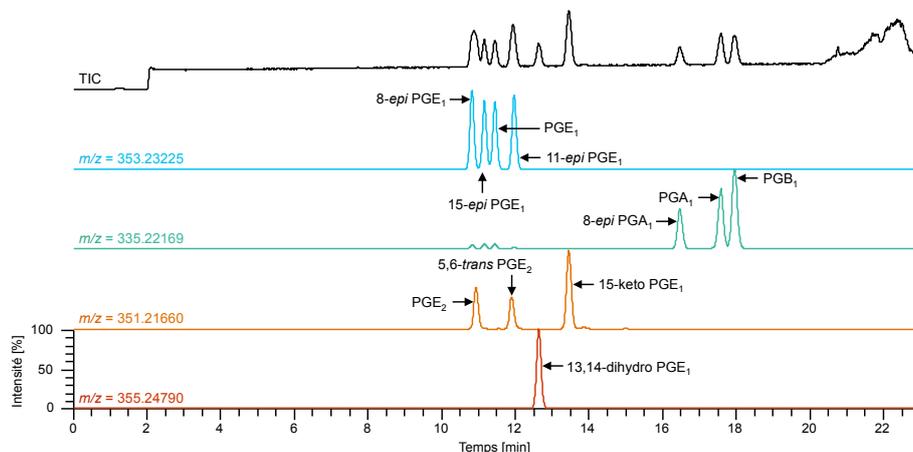


Figure 8: Chromatogrammes du mélange de PGE_1 et de 10 impuretés disponibles dans le commerce

Le TIC représente tous les ions détectés dans l'intervalle de m/z fixé, soit 50 à 500. Les autres chromatogrammes sont des XIC obtenus par extraction du TIC au m/z théorique des analytes avec une tolérance de 10ppm. Pour chaque composé, le m/z sélectionné pour la construction du XIC est celui où le signal est le plus intense; il correspond dans chaque cas au ion $[M-H]^+$. Du fait de leur analogie structurale, les 11 composés suivent le même schéma d'ionisation. En plus du ion majoritaire $[M-H]^+$, ils forment des fragments à M-18 et M-36 par perte d'1 ou 2 molécule(s) d'eau, fragments qui sont d'ailleurs utilisés comme ion produit dans les méthodes LC-MS/MS de dosage de la PGE_1 décrites dans la littérature.^{21,56-58} Les 11 composés apparaissent également sous la forme d'un adduit chlorure à M+35 et d'autres adduits à M+67 et M+135.

Les résultats de l'analyse du mélange de PGE_1 et des 10 impuretés sont récapitulés en Tableau 6.

Tableau 6: Résultats de l'analyse du mélange de PGE_1 et de 10 impuretés disponibles dans le commerce

Analyte	m/z théorique	m/z mesuré	Δ [ppm]	t_R [min]	t_R relatif au t_R de PGE_1
PGE_1		353.23172	-1.50	11.45	1.00
8-epi PGE_1	353.23225	353.23166	-1.67	10.82	0.94
11-epi PGE_1		353.23157	-1.93	11.97	1.05
15-epi PGE_1		353.23169	-1.59	11.16	0.97
PGA_1		335.22122	-1.40	17.59	1.54
8-epi PGA_1	335.22169	335.22141	-0.84	16.46	1.44
PGB_1		335.22128	-1.22	17.95	1.57
PGE_2		351.21603	-1.62	10.94	0.96
5,6-trans PGE_2	351.21660	351.21625	-1.00	11.90	1.04
15-keto PGE_1		351.21594	-1.88	13.45	1.17
13,14-dihydro PGE_1	355.24790	355.24750	-1.13	12.63	1.10

3.2. Validation de la méthode

La validation d'une méthode analytique a pour but de démontrer qu'elle correspond à l'usage pour lequel elle est prévue. Dans le cas d'une méthode de dosage, il s'agit donc d'évaluer les performances de la méthode dans les conditions attendues d'utilisation et de vérifier sur la base de ces performances son aptitude à quantifier à l'avenir chaque échantillon inconnu qu'elle aura à doser.⁵⁵ Les critères évalués lors de ce travail sont la sélectivité, la fonction de réponse, la justesse, la fidélité,

l'exactitude, la linéarité et l'intervalle de dosage, qui sont les critères de validation couramment utilisés dans le cas d'une procédure de dosage. Par ailleurs, la validation de la méthode a été complétée par la détermination du carry-over et l'évaluation de la stabilité des échantillons à 4 et -20°C.

3.2.1. Sélectivité

La sélectivité d'une méthode analytique est sa capacité à établir de manière univoque l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants potentiellement présents.⁵⁵ Dans le cas d'une méthode indicatrice de la stabilité d'une préparation pharmaceutique, il s'agit de vérifier que les impuretés de synthèse et/ou de dégradation du principe actif, ainsi que les excipients, n'interfèrent pas avec la mesure du principe actif. Lors de ce travail, la méthode a été développée à l'aide de certaines impuretés de la PGE₁ disponibles dans le commerce (cf. §3.1.2) puis sa sélectivité a été confirmée en soumettant la PGE₁ à des conditions de stress dans le but de forcer sa dégradation.

L'ensemble des chromatogrammes obtenus pour les échantillons de PGE₁ et des blancs soumis à des conditions de stress est joint en Annexe 4. Les résultats sont présentés au Tableau 7.

Tableau 7: Résultats des dégradations forcées (avec PR = produit de réaction)

Traitement	<i>m/z</i> théorique	<i>m/z</i> mesuré	Δ [ppm]	<i>t_R</i> [min]	<i>t_R</i> relatif au <i>t_R</i> de PGE ₁	Aire	Aire / Aire de PGE ₁ du témoin [%]	Identification
Témoin	353.23225	353.23218	-0.20	11.42	1.00	740715125	100.00	PGE ₁
Acide fort	353.23225	353.23279	1.53	11.42	1.00	674260348	91.03	PGE ₁
	335.22169	335.22232	1.88	17.56	1.54	25588138	3.45	PGA ₁
Acide faible	353.23225	353.23184	-1.16	11.50	1.00	699098533	94.38	PGE ₁
	335.22169	335.22141	-0.84	17.63	1.53	9939627	1.34	PGA ₁
Neutre	353.23225	353.23184	-1.16	11.50	1.00	718352128	96.98	PGE ₁
	335.22169	335.22122	-1.40	17.63	1.53	770523	0.10	PGA ₁
Base faible	353.23225	353.23193	-0.91	11.41	1.00	165967839	22.41	PGE ₁
	353.23225	353.23187	-1.08	10.78	0.94	17875779	2.41	8- <i>epi</i> PGE ₁
	335.22169	335.22137	-0.95	16.47	1.44	20045327	2.71	8- <i>epi</i> PGA ₁
	335.22169	335.22144	-0.75	17.56	1.54	236601295	31.94	PGA ₁
	335.22169	335.22141	-0.84	17.95	1.57	102584014	13.85	PGB ₁
	352.24824	352.24786	-1.08	2.42	0.21	19312047	2.61	PR de 8- <i>epi</i> PGE ₁ avec NH ₄ OH
	352.24824	352.24792	-0.91	2.61	0.23	151284379	20.42	PR de PGE ₁ avec NH ₄ OH
	334.23767	334.23795	0.84	2.20	0.19	79978	0.01	PR de PGA ₁ avec NH ₄ OH
334.23767	334.23932	4.94	2.45	0.21	12547	0.00	PR de PGB ₁ avec NH ₄ OH	
Base forte	353.23225	353.23251	0.74	11.42	1.00	996666	0.13	PGE ₁
	353.23225	353.23306	2.29	10.88	0.95	203497	0.03	8- <i>epi</i> PGE ₁
	353.23225	353.23297	2.04	11.17	0.98	62272	0.01	15- <i>epi</i> PGE ₁
	353.23225	353.23257	0.91	11.95	1.05	474585	0.06	11- <i>epi</i> PGE ₁
	335.22169	335.22232	1.88	17.95	1.57	760212836	102.63	PGB ₁
Oxydant	353.23225	353.23203	-0.62	11.49	1.00	723175571	97.63	PGE ₁
	335.22169	335.22147	-0.66	17.61	1.53	1644146	0.22	PGA ₁
	351.21660	351.21622	-1.08	13.48	1.17	416621	0.06	15-keto PGE ₁
Chaleur	353.23225	353.23199	-0.74	11.47	1.00	632401235	85.38	PGE ₁
	335.22169	335.22156	-0.39	17.60	1.53	111898729	15.11	PGA ₁
UV	353.23225	353.23199	-0.74	11.46	1.00	725406648	97.93	PGE ₁
	335.22169	335.22150	-0.57	17.60	1.54	1082694	0.15	PGA ₁

Les produits de dégradation ont été identifiés selon leur *m/z* et leur *t_R* relatif à celui de PGE₁ par comparaison avec les résultats obtenus pour le mélange de PGE₁ et des 10 impuretés obtenues dans le commerce (cf. §3.1.4).

Le principal produit de dégradation observé est la PGA₁ obtenue par une réaction de déshydratation en C11 de la PGE₁. La dégradation a été la plus forte en conditions basiques et à 80°C. Les traitements à différents pH montrent différents stades de dégradation avec une stabilité maximale en milieu légèrement acide (traitement neutre, cf. §2.3.1). La plus grande diversité de produits de dégradation a été obtenue en condition faiblement basique, par traitement avec 5% d'ammoniaque durant 3h à température ambiante (Figure 9). En effet, une partie de la PGA₁ s'est isomérisée en PGB₁ et des épimères en C8 des PGE₁ et PGA₁ ont été formés. Par ailleurs, des composés plus polaires que la PGE₁ ont été détectés; ceux-ci se révèlent être des produits de réaction avec l'ammoniaque, obtenus par substitution d'un groupe -OH de la PGE₁ ou d'un de ses produits de dégradation par un groupe -NH₂ issu de l'ammoniaque.

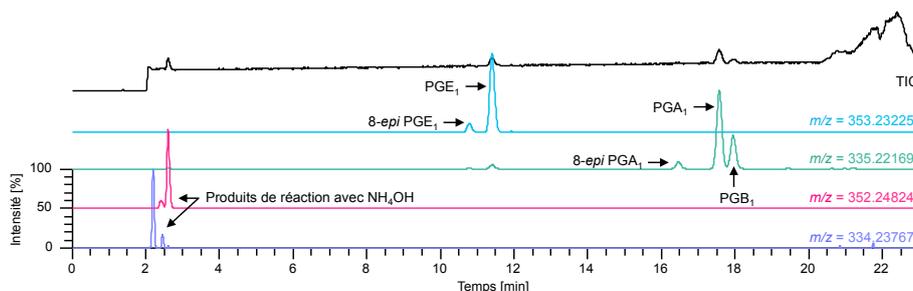


Figure 9: Chromatogrammes de l'échantillon de PGE₁ traité avec une base faible

Le seul échantillon où la PGA₁ n'a pas été détectée est l'échantillon de PGE₁ traité avec une base forte; la réaction d'isomérisation en PGB₁ y est quasiment complète (Figure 10). Dans cet échantillon, les 3 épimères de PGE₁ en C8, C11 et C15 ont également été formés mais leur proportion par rapport à la PGB₁ est minime.

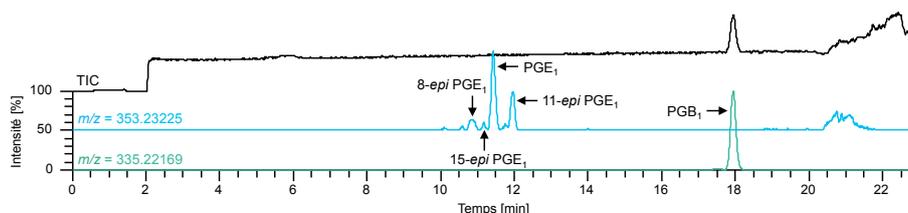


Figure 10: Chromatogrammes de l'échantillon de PGE₁ traité avec une base forte

Le traitement oxydant a seulement produit une très faible quantité de 15-keto PGE₁ et l'effet du traitement aux UV semble négligeable. Ainsi, l'ensemble de ces résultats confirme les voies de dégradation de la PGE₁ décrites dans la littérature (cf. §1.3). Les seuls aspects novateurs sont la formation de 11-*epi* PGE₁ en condition fortement basique et la formation de produits de réaction avec l'ammoniaque.

Malgré l'optimisation des conditions chromatographiques, une zone reste critique; il s'agit de la séparation de PGE₁ de son épimère en C15. En effet, 2 épimères ont par définition la même formule brute ce qui rend leur séparation par MS impossible, et leur comportement en LC en phase inverse est très proche du fait qu'ils se différencient structurellement que par la configuration d'un seul centre asymétrique. Comme le montre la Figure 11a, la PGE₁ n'est pas complètement séparée du 15-*epi* PGE₁ lors de l'analyse du mélange des 11 analytes obtenus dans le commerce ($R_s = 1.35$). Cependant cet épimère n'a été observé qu'en condition fortement basique lors des dégradations forcées; il est donc peu probable qu'il soit présent dans les échantillons prélevés lors de l'étude de stabilité. De plus, la séparation est d'autant plus efficace qu'il est peu abondant (Figure 11b, $R_s = 1.46$).

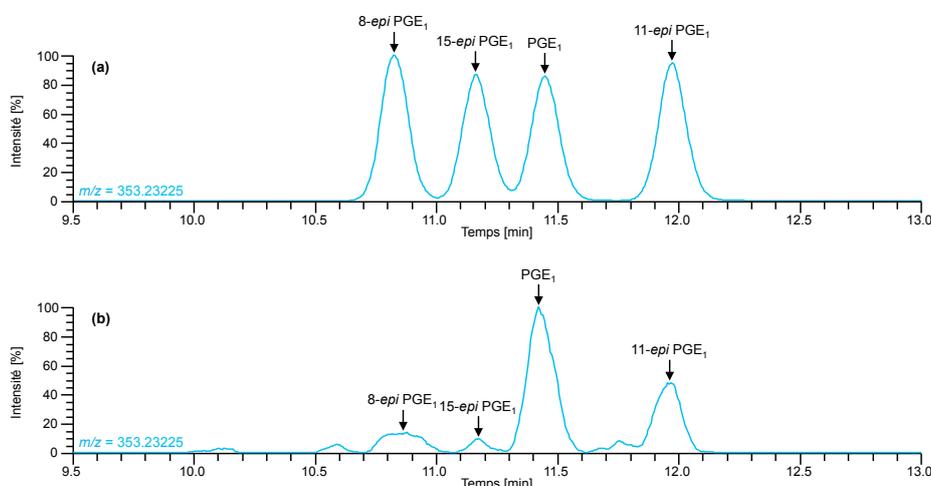


Figure 11: XIC au m/z 353.23225 du mélange des 11 analytes (a) et de l'échantillon de PGE₁ traité par une base forte (b)

Ainsi, les différents chromatogrammes présentés montrent que les impuretés de synthèse et/ou de dégradation de la PGE₁ n'interfèrent pas avec son pic. La méthode analytique est donc indicatrice de stabilité et adaptée pour le dosage de la PGE₁ dans

le cadre d'une étude de stabilité. Par ailleurs, le pourcentage parfois très faible des produits de dégradation par rapport à la PGE_1 est signe d'une sensibilité très élevée de la détection.

Les différents XICs présentés permettent de constater l'absence de bruit de fond, ce qui est une caractéristique de l'HRMS utilisée en mode full scan avec une fenêtre d'extraction étroite.^{41,43} De plus, l'écart relatif entre le m/z mesuré et le m/z théorique (indiqué Δ en Tableaux 6 et 7) est systématiquement inférieur à 5ppm, ce qui démontre une excellente exactitude de m/z et stabilité du spectromètre de masse.

3.2.2. Profil d'exactitude

Les résultats bruts obtenus pour les standards d'étalonnage (SE) et de validation (SV) des 4 séries de validation sont joints en Annexe 5. Ces résultats ont été traités selon l'approche proposée par la SFSTP à l'aide du logiciel Enoval qui fournit un rapport de validation complet présentant la fonction de réponse, la justesse, la fidélité, l'exactitude, la linéarité et l'intervalle de dosage de la méthode. Ce rapport est joint en Annexe 6 et les résultats principaux sont repris au Tableau 8.

Tableau 8: Résultats principaux extraits du rapport de validation

Fonction de réponse		Régression linéaire pondérée (1/x)	
Modèle mathématique			
Série	Pente	Ordonnée à l'origine	R ²
1	6.0540E+08	7.5540E+05	0.9997
2	6.2127E+08	-1.1246E+05	0.9985
3	6.5609E+08	5.3788E+05	0.9996
4	6.1783E+08	1.0081E+06	0.9992
Justesse			
Concentration [$\mu\text{g/ml}$]	Biais [%]		
0.5	-1.8		
1.0	0.3		
2.0	-1.1		
Fidélité			
Concentration [$\mu\text{g/ml}$]	Répétabilité [CV %]	Fidélité intermédiaire [CV %]	
0.5	1.9	4.7	
1.0	2.2	3.0	
2.0	2.0	2.7	
Exactitude			
Concentration [$\mu\text{g/ml}$]	Limites de l'intervalle de tolérance au niveau β [%]		Risque [%]
0.5	[-16.8, 13.1]		22.4
1.0	[-7.4, 8.0]		4.4
2.0	[-8.1, 6.0]		3.5
Linéarité			
Pente	0.9896		
Ordonnée à l'origine	0.0002865		
R ²	0.9966		
Intervalle de dosage			
Limite inférieure de quantification [$\mu\text{g/ml}$]	0.100		
Limite supérieure de quantification [$\mu\text{g/ml}$]	0.188		

L'approche proposée par la SFSTP consiste dans un premier temps à déterminer à l'aide des standards d'étalonnage la relation existant entre la réponse et la concentration de la substance à doser; il s'agit de la fonction de réponse (ou courbe d'étalonnage). Ensuite, la concentration des standards de validation est calculée selon la courbe d'étalonnage et à partir de leur réponse puis pour chaque niveau de concentration, la justesse et la fidélité de la méthode sont estimées en calculant respectivement le biais et le coefficient de variation (CV). Un profil d'exactitude est alors construit en reliant entre elles les limites supérieures et les limites inférieures de l'intervalle de tolérance au niveau β calculé pour chaque niveau de concentration. Ce concept est basé sur l'erreur totale de mesure car l'intervalle de tolérance est calculé selon une formule prenant en compte le biais (erreur systématique) et le CV (erreur aléatoire) de la méthode.⁵⁵

Le profil d'exactitude obtenu est présenté en Figure 12.

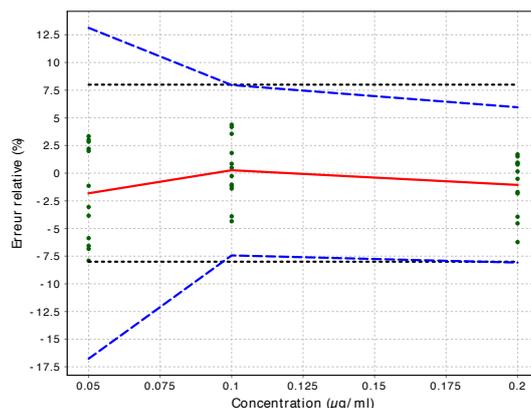


Figure 12: Profil d'exactitude obtenu en considérant une régression linéaire pondérée (1/x)

La ligne rouge représente le biais, les lignes bleues définissent les limites de l'intervalle de tolérance au niveau β et les lignes noires sont les limites d'acceptation fixées *a priori*. Les points reflètent quant à eux l'erreur relative des concentrations calculées pour les standards de validation et sont représentées en fonction de leurs concentrations cibles.

Le profil d'exactitude constitue un outil visuel de décision permettant d'évaluer la capacité de la procédure analytique à fournir des résultats dans les limites d'acceptation. En effet, une méthode peut être considérée comme valide pour l'intervalle de dosage où le profil d'exactitude est inclus dans les limites d'acceptation fixées *a priori*. Cette approche garantit que seules 5% des futures mesures d'échantillons inconnus seront en-dehors de ces limites (si $\beta = 95\%$).⁵⁵

La fonction de réponse qui a été retenue est une régression linéaire pondérée (1/x) à partir des standards d'étalonnage des 5 niveaux de concentration. Avec des limites d'acceptation fixées à $\pm 8\%$ et un niveau de risque maximal de 5%, la méthode a été validée pour l'intervalle de dosage 0.100 à 0.188 µg/ml. Cet intervalle est jugé suffisant grâce à une étude préliminaire de stabilité réalisée sur 7j.

La difficulté principale rencontrée lors de la validation de la méthode a été la construction d'un protocole de validation approprié. En effet, il devait comporter le moins d'étapes possible pour diminuer l'erreur liée à la préparation des standards, et devait permettre une solubilisation totale de la PGE₁ qui est un composé pratiquement insoluble dans l'eau. La solution a été d'effectuer le maximum de dilutions dans l'éthanol et de maintenir dans les standards de validation préparés dans la matrice (glucose 10%) un pourcentage final en éthanol constant de 1% qui semblait jouer le rôle de co-solvant. Ainsi, la variabilité due à un phénomène probable de précipitation de la PGE₁ a été réduite et la méthode a pu être validée avec des limites d'acceptation de $\pm 8\%$. La méthode n'a cependant pas pu être validée avec des limites d'acceptation de $\pm 5\%$ habituellement utilisées pour les spécialités pharmaceutiques. Plusieurs raisons semblent expliquer cela: variabilité inhérente à la détection par HRMS, nombre trop faible d'expériences, évaporation et difficulté de pipetage de l'éthanol, phénomène d'adsorption de la PGE₁ sur le contenant.

L'utilisation d'un standard interne deutéré (PGE₁-d₄) a été testée mais la variabilité analytique était plus importante pouvant être due à une compétition à la charge avec la PGE₁ ou à une instabilité du standard interne. Il a donc été décidé d'effectuer le dosage sans standard interne.

Par ailleurs, les CV intra-série calculés à partir des t_R des standards d'étalonnage et de validation des 4 séries sont de l'ordre de 0.2% ce qui démontre un temps d'équilibration de la colonne suffisant. De plus, le CV inter-série, 1.3%, informe quant à la robustesse de la méthode.

3.2.1. Carry-over

Les résultats de l'analyse d'un standard d'étalonnage du niveau de concentration le plus élevé (0.400 µg/ml) suivi d'un blanc, et ce répété 6x, sont joints en Annexe 7. Le carry-over obtenu est de $0.009 \pm 0.002\%$; son influence sur le dosage de la PGE₁ est donc négligeable. Cette expérience informe également quant à la variabilité de la méthode pour l'injection répétée d'un même échantillon. Le CV obtenu sur les 6 réponses du standard d'étalonnage est de 1.3% ce qui est une valeur typique pour une méthode avec détection par HRMS.

3.2.2. Stabilité à 4°C

La température de 4°C est la température à laquelle les échantillons étaient maintenus avant d'être injectés dans le système LC-MS. Elle a été choisie dans le but de ralentir la dégradation de la PGE₁. Les résultats des analyses à t_0 et à 9h des standards

d'une série de validation stockés dans l'injecteur à 4°C sont joints en Annexe 8. L'écart relatif moyen entre les deuxièmes et les premières mesures est de $0.9 \pm 2.4\%$; il n'est donc statistiquement pas différent d'un écart nul. Cette expérience permet de déterminer la durée maximale entre le placement de l'échantillon dans l'injecteur et son analyse, 9h, pour laquelle la stabilité a été démontrée. Elle informe également quant à la stabilité de l'instrument.

3.2.3. Stabilité à -20°C

Les échantillons prélevés lors de l'étude de stabilité ont été placés à -20°C dans le but de stopper leur dégradation et permettre leur conservation jusqu'à leur analyse; cela a été décidé en se basant sur la littérature.^{30,33,37} L'impact de cette étape de stockage a été évalué en analysant à t0, 1 et 2sem 6 échantillons de Prostin VR diluée à 1.5µg/ml (n° 1 à 3) et à 15µg/ml (n° 4 à 6) stockés à -20°C. Les résultats obtenus sont joints en Annexe 9.

Cette expérience met en évidence la présence de PGA₁ dans la spécialité étudiée fraîchement analysée à raison de $1.84 \pm 0.05\%$. Ce pourcentage, calculé par le rapport des aires de PGA₁ et de PGE₁, n'est qu'une valeur indicative étant donné que la PGA₁ n'a pas été dosée faute d'avoir pu obtenir un composé en quantité suffisante et de qualité pharmacopée.

Le pourcentage restant de PGE₁ après 1 et 2sem de congélation est respectivement de $91.8 \pm 5.4\%$ et $93.3 \pm 7.6\%$. Bien que l'incertitude sur les résultats soit élevée, il semble y avoir une perte qui ne s'accroît pas avec la durée de congélation. Cette perte n'est pas causée par une dégradation chimique de la PGE₁ car le pourcentage indicatif de PGA₁ est stable. Le phénomène serait plutôt d'ordre physique, comme une baisse de solubilité des analytes ou une adsorption sur le contenant provoquée par l'étape de congélation-décongélation. La stabilité à -20°C des échantillons n'a donc pas été démontrée. L'étape de congélation engendre un biais dans les mesures qui doit être pris en considération lors de l'utilisation de la méthode pour doser les échantillons de l'étude de stabilité.

Cette instabilité à -20°C n'a d'ailleurs pas été reportée dans la littérature. Au contraire, Trissel et al.³⁷ avaient observé un pourcentage restant de PGE₁ de $99.7 \pm 0.7\%$ après 1mois de stockage à -20°C d'une préparation contenant de la PGE₁ (12.5µg/ml), du chlorhydrate de papavérine (4.5mg/ml) et du mésylate de phentolamine (0.125mg/ml).

3.3. Etude de stabilité

Les conditions de l'étude de stabilité ont été définies de manière à être au plus proche des conditions de préparation et d'administration de Prostin VR dans le Service de Néonatalogie du CHUV. Les concentrations étudiées, 1.5 et 15µg/ml, ont été calculées dans le but de permettre une perfusion continue sur 48 ou 72h aux posologies habituellement prescrites dans le service et pour des patients allant de 0.5 à 5.0kg. Les solutions ont été préparées en 3 lots dans du glucose 10% car c'est le diluant le plus utilisé dans le service, et elles ont été conditionnées dans des seringues non-teintées identiques à celles utilisées dans le service. En parallèle, l'étude a été menée avec des seringues teintées dans le but d'évaluer une photosensibilité éventuelle du principe actif. Les seringues préparées ont été stockées dans une enceinte climatique réglée en mode day-light, à $30 \pm 2^\circ\text{C}$ et $65 \pm 5\%$ d'humidité afin de répondre aux normes de l'International Conference on Harmonisation pour les études de stabilité⁶⁰ et de mimer les conditions d'administration du service. Pour illustration, un des lots préparés est présenté en Figure 13.



Figure 13: Lot n° 1 à 1.5µg/ml réparti dans une seringue non-teintée (a) et dans une seringue teintée (b)

Des échantillons ont été prélevés à t0, 24, 48, 72 et 168h après préparation et ont été immédiatement stockés à -20°C. Aucun changement de coloration ni précipité n'a été observé depuis la préparation des solutions jusqu'au dernier prélèvement effectué après 7j de stockage. Les échantillons prélevés ont été dilués et analysés selon la méthode LC-MS précédemment validée. A titre d'exemple, les chromatogrammes obtenus pour les échantillons prélevés à t0 et à 168h d'un lot à 15µg/ml conditionné en seringue teintée sont présentés en Figure 14.

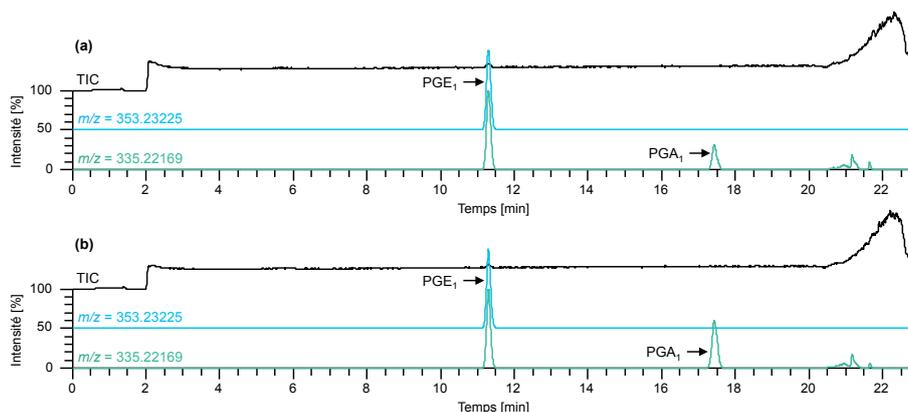


Figure 14: Chromatogrammes des échantillons prélevés à t0 (a) et à 168h (b) d'un lot à 15µg/ml conditionné en seringue teintée

Un seul produit de dégradation a été détecté, et ce systématiquement dans tous les échantillons. Il s'agit de la PGA₁, décrite dans la littérature comme le principal produit de dégradation de la PGE₁, non-toxique et moins actif que la PGE₁.^{24,30} Les résultats obtenus sont joints en Annexe 10 et résumés au Tableau 9 ci-après. Ils sont exprimés en concentration initiale de PGE₁, pourcentage restant de PGE₁ et pourcentage indicatif de PGA₁ sous la forme de moyenne ± écart-type calculés à partir de 6 répétitions (3 échantillons par concentration et par temps de prélèvement, analysés en duplicat). Pour plus de clarté, les résultats sont également présentés graphiquement en Figures 15 et 16.

Tableau 9: Résultats de l'étude de stabilité des lots conditionnés en seringues non-teintées (a) et teintées (b)

	Concentration en PGE ₁ initiale [µg/ml]		Pourcentage restant de PGE ₁ [%]		Pourcentage indicatif de PGA ₁ [%]		Temps [h]
	a	b	a	b	a	b	
Lots à 1.5µg/ml	1.29 ± 0.02	1.28 ± 0.05	100.0	100.0	1.84 ± 0.03	1.83 ± 0.05	0
			95.7 ± 5.1	98.1 ± 3.0	1.93 ± 0.03	2.21 ± 0.07	24
			96.1 ± 3.9	99.2 ± 2.6	1.98 ± 0.20	2.59 ± 0.12	48
			90.9 ± 1.8	92.9 ± 3.0	2.16 ± 0.12	2.87 ± 0.19	72
			85.8 ± 3.0	90.7 ± 2.1	2.88 ± 0.26	3.91 ± 0.58	168
Lots à 15µg/ml	12.9 ± 0.7	12.9 ± 0.6	100.0	100.0	1.77 ± 0.03	1.74 ± 0.02	0
			95.7 ± 6.6	98.4 ± 2.7	1.96 ± 0.13	2.12 ± 0.07	24
			95.1 ± 4.5	96.1 ± 1.4	2.20 ± 0.06	2.43 ± 0.10	48
			92.9 ± 5.5	97.9 ± 3.2	2.55 ± 0.10	2.79 ± 0.13	72
			87.7 ± 3.7	91.3 ± 6.0	3.75 ± 0.14	4.23 ± 0.31	168

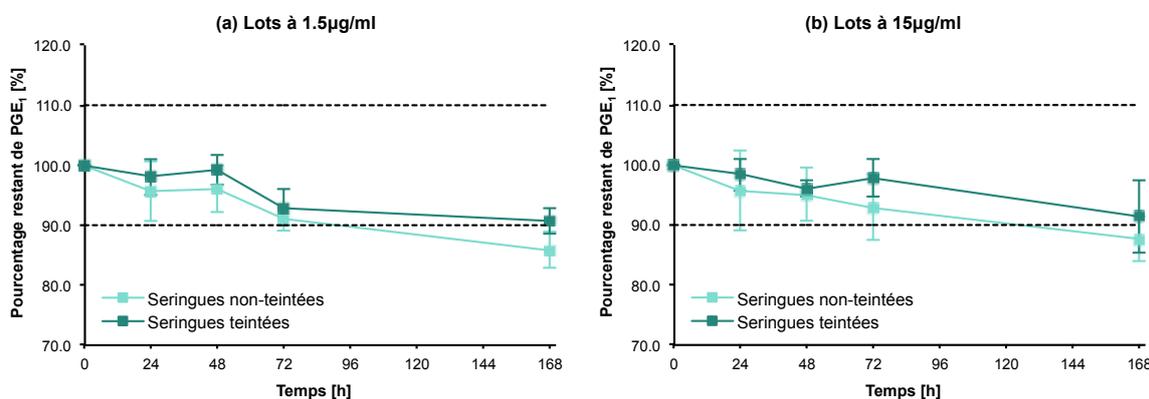


Figure 15: Pourcentage restant de PGE₁ mesuré dans les lots à 1.5µg/ml (a) et 15µg/ml (b)

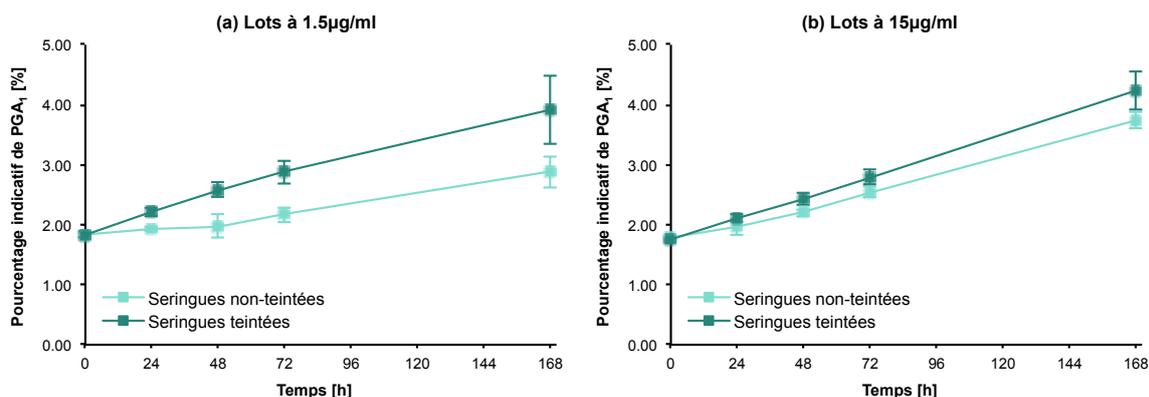


Figure 16: Pourcentage indicatif de PGA₁ mesuré dans les lots à 1.5µg/ml (a) et 15µg/ml (b)

Dans chaque cas, un écart significatif, -14% en moyenne, est observé entre la concentration de PGE₁ mesurée à t₀ et la concentration théoriquement introduite. La raison principale à cela est probablement le stockage à -20°C des échantillons prélevés jusqu'à leur analyse. En effet, il avait été observé lors de la validation de la méthode que cette étape engendrait une perte de principe actif non-négligeable (cf. §3.2.3). Cependant, cela n'a pas empêché l'interprétation des résultats étant donné que tous les échantillons ont subi le même biais et que l'intérêt dans une étude de stabilité est la variation de la teneur en principe actif au cours du temps, et non sa valeur absolue.

D'autres raisons peuvent être suggérées pour expliquer l'écart avec la concentration théorique à t₀. Le pourcentage indicatif de PGA₁ mesuré à t₀ est de l'ordre de 1.8%; cela peut indiquer que les solutions de Prostin VR utilisées avaient déjà entamé leur processus de dégradation et ainsi pouvaient être sous-dosées en PGE₁. Par ailleurs, une erreur systématique a pu être commise lors de la préparation des solutions, par exemple par manque d'homogénéisation ou mauvais pipetage.

Globalement, une diminution de PGE₁ et une augmentation de PGA₁ sont observées au cours du temps, ce qui révèle une instabilité chimique. Cependant, la PGA₁ n'a pas été dosée, il n'est donc pas possible d'établir un bilan de masse pour savoir si la perte de PGE₁ au cours du temps est uniquement attribuable à sa dégradation en PGA₁. Il reste donc envisageable qu'un autre type d'instabilité ait eu lieu, comme un phénomène de précipitation du principe actif, les solutions à 1.5µg/ml ne contenant en effet que 0.3% d'éthanol, ou un phénomène d'adsorption du fait du contact avec la seringue en polypropylène. Cependant, Shulman et al.³³ n'avaient pas observé de différences significatives dans les profils de dégradation de solutions de PGE₁ stockées en ampoules en verre ou en seringues en plastique.

Les CV calculés sur le pourcentage restant de PGE₁ sont de l'ordre de 4% et ne dépassent jamais les 7%; cela démontre une bonne fidélité tout au long du processus, de la préparation des lots, à la dilution des échantillons prélevés et leur analyse LC-MS.

La stabilité de PGE₁ en solution ne semble pas dépendre de sa concentration; les résultats obtenus pour les lots à 1.5µg/ml et les lots à 15µg/ml sont en effet comparables. En considérant une limite acceptable de 90% de la teneur initiale en PGE₁ pour définir la stabilité, les solutions sont stables jusqu'à 72h alors qu'après 7j de stockage, la limite est clairement dépassée.

Le pourcentage restant de PGE₁ au cours du temps (Figure 15) indique que la stabilité de PGE₁ en solution est meilleure lorsque le conditionnement est réalisé en seringue teintée, ce qui est la preuve d'une photosensibilité du principe actif. Par contre, dans ces mêmes seringues, le pourcentage indicatif de PGA₁ y est plus important (Figure 16). Outre la variabilité analytique, l'explication à ce paradoxe pourrait être que la seringue teintée a favorisé une stabilité de la PGA₁ qui du coup a été détectée en plus forte intensité, ou que la seringue non-teintée a favorisé une instabilité de la PGA₁ qui a été par conséquent détectée en plus faible intensité. Les 2 cas sont envisageables étant donné que la composition des 2 sortes de seringues utilisées n'est pas strictement identique.

Différentes études de stabilité de solutions physiologiques de PGE₁ à température ambiante ont été décrites dans la littérature. Paul et al.³¹ avaient observé une stabilité de 10j à 20°C pour des solutions salines de PGE₁ à 25µg/ml. Dans une autre étude³⁸, des solutions physiologiques à 4µg/ml gardaient 94.55% de PGE₁ après 15j à 20°C. Uebel et al.³⁵ ont reporté une stabilité de 6sem à 21°C pour des solutions de Prostin VR diluée à 40µg/ml dans du NaCl 0.9%. Enfin, Shulman et al.³³ ont défini une stabilité de 9.8j à 20°C pour des solutions de Prostin VR diluée à 20µg/ml dans du NaCl 0.9%. Cependant, aucune de ces études n'avait été réalisée à 30°C et sur des solutions de PGE₁ à 1.5 et 15µg/ml obtenues par dilution de Prostin VR dans du glucose 10%.

4. CONCLUSION & PERSPECTIVES

L'objectif premier de ce travail était de développer et valider une méthode indicatrice de la stabilité de solutions de PGE₁. La sensibilité offerte par une détection UV s'étant de suite révélée insuffisante pour les concentrations étudiées, une méthode par LC couplée à l'HRMS en mode full scan a été développée. La phase de validation de la méthode a montré des performances adaptées en terme de sélectivité, exactitude, linéarité et intervalle de dosage.

Contrairement à la MS en mode SRM qui implique une analyse strictement ciblée et pré-définie, l'HRMS en mode full scan a pour avantage de permettre une analyse large et non-ciblée avec un traitement rétrospectif des données. De plus, la mise au point est rapide et facile, et il est possible d'élucider la formule brute des analytes grâce à leur masse exacte et à leur profil isotopique. Ainsi, lors de cette étude, les conditions analytiques du spectromètre de masse ont été définies rapidement et n'ont pas nécessité d'optimisation. De plus, il a été possible de détecter et identifier des composés dont la présence n'était pas attendue tels que des produits de réaction de PGE₁ avec l'ammoniaque utilisé comme réactif lors des dégradations forcées.

Le second objectif de ce travail était de déterminer s'il était envisageable ou non de proposer une prolongation de la durée de perfusion de Prostin VR au Service de Néonatalogie du CHUV, jusqu'alors limitée à 24h. Dans ce but, une étude de stabilité a été réalisée à l'aide de la méthode LC-MS précédemment validée sur des solutions de PGE₁ à 2 concentrations extrêmes définies en vue de couvrir la totalité des patients pouvant potentiellement être hospitalisés dans le service. Selon les résultats obtenus, la prolongation à 48 voire 72h est possible car la stabilité de la PGE₁ a été démontrée sur 72h et le seul produit de dégradation observé, la PGA₁, est non seulement non-toxique mais actif. Cependant, seule la stabilité physico-chimique a été investiguée, il est donc nécessaire de compléter l'étude par des tests microbiologiques pour déterminer si le fait de réduire la fréquence de changement de la perfusion de PGE₁ entraîne une augmentation du taux de contamination de celle-ci.

Dans le cas où la stérilité de la perfusion serait maintenue, une prolongation de la durée de perfusion à 48 ou 72h permettrait d'une part de réduire les coûts, mais également de réduire le nombre de préparations et d'administrations devant être effectuées par le personnel infirmier, et par conséquent le risque d'erreurs médicamenteuses. Pour estimer cela, une étude pharmacoéconomique pourrait être utile, et ce d'autant plus qu'à partir d'une certaine posologie et d'un certain poids, la préparation de la perfusion de 50ml nécessite 2 ampoules de Prostin VR si l'on veut l'administrer sur 72h.

Finalement, en vue d'une amélioration globale de l'utilisation des médicaments au Service de Néonatalogie, le même type d'étude que celle réalisée lors de ce travail pourrait être appliqué à d'autres médicaments administrés en perfusion continue qui sont, soit onéreux, soit utilisés fréquemment, tel le lévosimendan, la milrinone ou la morphine.

5. BIBLIOGRAPHIE

1. Smith GC. The pharmacology of the ductus arteriosus. *Pharmacol Rev* **1998**;50:35-58.
2. Leonhardt A, Glaser A, Wegmann M, Schranz D, Seyberth H, Nüsing R. Expression of prostanoid receptors in human ductus arteriosus. *Br J Pharmacol* **2003**;138:655-9.
3. Chamberlin M, Lozynski J. To Go Against Nature: Manipulating the Neonatal Ductus Arteriosus with Prostaglandin. *Newborn Infant Nurs Rev* **2006**;6:158-62.
4. Marieb EN. *Anatomie et physiologie humaines*. 2 ed: De Boeck; **1993**.
5. Committee PF. *BNF for Children 2011-2012*. Pharmaceutical Press; **2011**.
6. Tálosi G, Katona M, Rácz K, Kertész E, Onozó B, Túri S. Prostaglandin E₁ treatment in patent ductus arteriosus dependent congenital heart defects. *J Perinat Med* **2004**;32:368-74.
7. Huang FK, Lin CC, Huang TC. Reappraisal of the prostaglandin E₁ dose for early newborns with patent ductus arteriosus-dependent pulmonary circulation. *Pediatr Neonatol* **2013**;54:102-6.
8. Elliott RB, Starling MB, Neutze JM. Medical manipulation of the ductus arteriosus. *Lancet* **1975**;1:140-2.
9. *Pharmacopée Européenne*. 8.1 ed; **2014**.
10. Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, Watts J. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. 4 ed: Pharmaceutical Press; **2011**.
11. Katzung BG. *Pharmacologie fondamentale et clinique*. 9 ed: Piccin; **2004**.
12. Information sur le médicament. (Accessed 13.06, **2014**, at <http://www.swissmedicinfo.ch>)
13. Momma K, Toyoshima K, Takeuchi D, Imamura S, Nakanishi T. In vivo reopening of the neonatal ductus arteriosus by a prostanoid EP4-receptor agonist in the rat. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **2005**;78:117-28.
14. Tsuboi K, Sugimoto Y, Ichikawa A. Prostanoid receptor subtypes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **2002**;68-69:535-56.
15. Anggård E, Larsson C. The sequence of the early steps in the metabolism of prostaglandin E₁. *Eur J Pharmacol* **1971**;14:66-70.
16. Leonhardt A, Schweer H, Wolf D, Seyberth HW. Formation of biologically active 13,14-dihydro-prostaglandin E₁ during intravenous infusion of prostaglandin E₁ in newborns with ductus arteriosus-dependent congenital heart disease. *Br J Clin Pharmacol* **1992**;33:323-5.
17. Lewis AB, Freed MD, Heymann MA, Roehl SL, Kensey RC. Side effects of therapy with prostaglandin E₁ in infants with critical congenital heart disease. *Circulation* **1981**;64:893-8.
18. *Pharmacopée Helvétique*. 11.0 ed; **2012**.
19. *Guide méthodologique des études de stabilité des préparations*. SFPC; **2013**.
20. *United States Pharmacopoeia*. 37 ed; **2014**.
21. Sood BG, Peterson J, Malian M. Jet nebulization of prostaglandin E₁ during neonatal mechanical ventilation: stability, emitted dose and aerosol particle size. *Pharmacol Res* **2007**;56:531-41.
22. Younger EW, Szabo RM. The stability of prostaglandin E₁ in dilute physiological solutions at 37 degrees C. *Prostaglandins* **1986**;31:923-7.
23. Monkhouse DC, Van Campen L, Aguiar AJ. Kinetics of Dehydration and Isomerization of Prostaglandins E₁ and E₂. *J Pharm Sci* **1973**;62:576-80.
24. Oesterling TO, Morozowich W, Roseman TJ. Prostaglandins. *J Pharm Sci* **1972**;61:1861-95.
25. Karim SM, Devlin J, Hillier K. The stability of dilute solutions of prostaglandins E₁, E₂, F_{1-alpha} and F_{2-alpha}. *Eur J Pharmacol* **1968**;4:416-20.
26. Brummer HC. Storage life of prostaglandin E₂ in ethanol and saline. *J Pharm Pharmacol* **1971**;23:804-5.
27. Yalkowsky SH, Roseman TJ. Stability of E-type prostaglandins in triacetin. *J Pharm Sci* **1979**;68:114-5.
28. Lee KC, DeLuca PP. Simultaneous determination of prostaglandins E₁, A₁, and B₁ by reversed-phase high-performance liquid chromatography for the kinetic studies of prostaglandin E₁ in solution. *J Chromatogr* **1991**;555:73-80.
29. Stehle RG, Oesterling TO. Stability of prostaglandin E₁ and dinoprostone (prostaglandin E₂) under strongly acidic and basic conditions. *J Pharm Sci* **1977**;66:1590-5.
30. Vieillard V, Eychenne N, Astier A, Yiou R, Deffaux C, Paul M. Physicochemical stability study of a new Trimix formulation for treatment of erectile dysfunction. *Ann Pharm Fr* **2013**;71:358-63.
31. Paul M, Razzouq N, Tixier G, Astier A. Stability of prostaglandin E₁ (PGE₁) in aqueous solutions. *Eur J Hosp Pharm Sci* **2005**;31:6.
32. Matson MT, Ramstad T, Dunn MJ. Purity Determination of Alprostadil by Micellar Electrokinetic Chromatography with Signal Enhancement Involving Field-Amplified Sample Stacking and Extended Path Length Detection. *J Liq Chrom Related Tech* **2005**;28:3181-203.
33. Shulman NH, Fyfe RK. Shelf-life determination of prostaglandin E₁ injections. *J Clin Pharm Ther* **1995**;20:41-4.

34. Gatti R, Gotti R, Cavrini V, Soli M, Bertaccini A, Carparelli F. Stability study of Prostaglandin E₁ (PGE₁) in physiological solutions by liquid chromatography (HPLC). *Int J Pharm* **1995**;115:113-7.
35. Uebel RA, Wium CA, Schmidt AC. Stability evaluation of a prostaglandin E₁ saline solution packed in insulin syringes. *Int J Impot Res* **2001**;13:16-7.
36. Fraccaro A, Grion AM, Gaion RM, Ricatti MG, Pescatori ES, Calabrò A. Prostaglandin E₁ diluted solution: preparation technique and stability evaluation. *Int J Impot Res* **1993**;5:43-5.
37. Trissel LA, Zhang Y. Long-Term Stability of Trimax: A Three-Drug Injection Used to Treat Erectile Dysfunction. *Int J Pharm Compd* **2004**;8:231-5.
38. Bertaccini A, Gotti R, Soli M. Prostaglandin E₁-based vasoactive cocktails in erectile dysfunction: how environmental conditions affect PGE₁ efficacy. *Urol Int* **2002**;68:251-4.
39. Soli M, Bertaccini A, Carparelli F. Vasoactive cocktails for erectile dysfunction: chemical stability of PGE₁, papaverine and phentolamine. *J Urol* **1998**;160:551-5.
40. Rouessac F, Rouessac A. *Analyse chimique*. 6 ed: Dunod; **2004**.
41. Henry H, Sobhi HR, Scheibner O, Bromirski M, Nimkar SB, Rochat B. Comparison between a high-resolution single-stage Orbitrap and a triple quadrupole mass spectrometer for quantitative analyses of drugs. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2012**;26:499-509.
42. Rochat B. Quantitative/qualitative analysis using LC-HRMS: the fundamental step forward for clinical laboratories and clinical practice. *Bioanalysis* **2012**;4:1709-11.
43. Kaufmann A, Butcher P, Maden K, Walker S, Widmer M. Quantitative and confirmative performance of liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry compared to tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2011**;25:979-92.
44. Kaufmann A, Butcher P, Maden K, Walker S, Widmer M. Comprehensive comparison of liquid chromatography selectivity as provided by two types of liquid chromatography detectors (high resolution mass spectrometry and tandem mass spectrometry): "where is the crossover point?". *Anal Chim Acta* **2010**;673:60-72.
45. Fedorova G, Randak T, Lindberg RH, Grabic R. Comparison of the quantitative performance of a Q-Exactive high-resolution mass spectrometer with that of a triple quadrupole tandem mass spectrometer for the analysis of illicit drugs in wastewater. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2013**;27:1751-62.
46. Michalski A, Damoc E, Hauschild JP. Mass spectrometry-based proteomics using Q Exactive, a high-performance benchtop quadrupole Orbitrap mass spectrometer. *Mol Cell Proteomics* **2011**;10:M111.011015.
47. Lu W, Clasquin MF, Melamud E, Amador-Nogues D, Caudy AA, Rabinowitz JD. Metabolomic analysis via reversed-phase ion-pairing liquid chromatography coupled to a stand alone orbitrap mass spectrometer. *Anal Chem* **2010**;82:3212-21.
48. Scigelova M, Makarov A. Advances in bioanalytical LC-MS using the Orbitrap™ mass analyzer. *Bioanalysis* **2009**;1:741-54.
49. De Hoffmann E, Stroobant V. *Spectrométrie de masse*. 3 ed: Dunod; **2005**.
50. Cech NB, Enke CG. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrom Rev* **2001**;20:362-87.
51. Hu Q, Noll RJ, Li H, Makarov A, Hardman M, Graham Cooks R. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J Mass Spectrom* **2005**;40:430-43.
52. Makarov A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal Chem* **2000**;72:1156-62.
53. Makarov A, Denisov E, Kholomeev A. Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Anal Chem* **2006**;78:2113-20.
54. Makarov A, Scigelova M. Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry. *J Chromatogr A* **2010**;1217:3938-45.
55. SFSTP C. Validation des procédures analytiques quantitatives - Harmonisation des démarches. *STP Pharma Pratiques* **2003**;13:101-38.
56. Zhang Y, Sun Y, Li G. Determination of Prostaglandin E₁ in dog plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2013**;937:97-102.
57. Lin X, Zhang Y, Cui Y, Wang L, Wang J, Tang X. Determination of alprostadil in rat plasma by ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry after intravenous administration. *J Pharm Biomed Anal* **2009**;49:983-8.
58. Lee S, Kang SY, Ji D, Baeck S, Oh SM, Chung KH. Quantitative LC-MS/MS method in urine for the detection of drugs used to reverse the effects of chemical castration. *Anal Bioanal Chem* **2013**;405:3185-94.
59. Schellinger AP, Stoll DR, Carr PW. High-speed gradient elution reversed-phase liquid chromatography of bases in buffered eluents. Part I. Retention repeatability and column re-equilibration. *J Chromatogr A* **2008**;1192:41-53.
60. *Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A(R2)*. ICH; **2003**.

6. ANNEXES

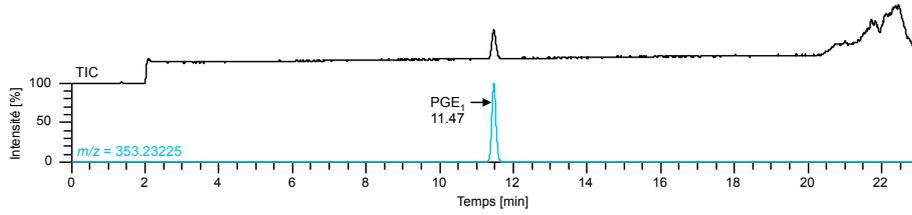
ANNEXE 1:	Caractéristiques des 11 analytes obtenus dans le commerce.....	I
ANNEXE 2:	Chromatogrammes des 11 analytes obtenus dans le commerce	II
ANNEXE 3:	Spectres de masse des 11 analytes obtenus dans le commerce.....	IV
ANNEXE 4:	Chromatogrammes des échantillons de PGE ₁ et des blancs soumis à des conditions de stress	VII
ANNEXE 5:	Résultats de l'analyse des standards des 4 séries de validation.....	X
ANNEXE 6:	Rapport de validation fourni par le logiciel Enoval	XI
ANNEXE 7:	Résultats de l'évaluation du carry-over.....	XXI
ANNEXE 8:	Résultats de l'analyse à t0 et à 9h des standards d'une série de validation stockés à 4°C.....	XXII
ANNEXE 9:	Résultats de l'analyse à t0, 1 et 2sem des échantillons de Prostin VR stockés à -20°C.....	XXIII
ANNEXE 10:	Résultats de l'étude de stabilité	XXIV

ANNEXE 1: Caractéristiques des 11 analytes obtenus dans le commerce

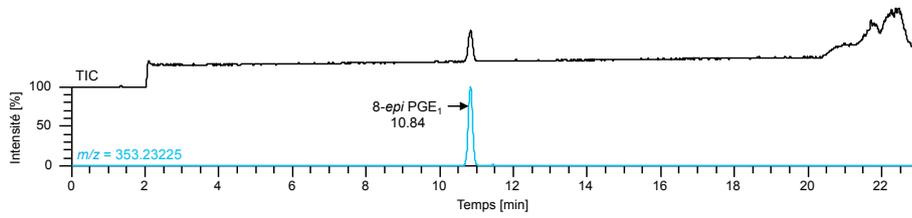
Substance	Formule développée	N° CAS	Formule brute	Masse moléculaire [g/mol]	Impureté selon la Ph. Eur.
PGE ₁		745-65-3	C ₂₀ H ₃₄ O ₅	354.5	-
8- <i>epi</i> PGE ₁		21003-46-3			F
11- <i>epi</i> PGE ₁		24570-01-2			E
15- <i>epi</i> PGE ₁		20897-91-0			D
PGA ₁		14152-28-4	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	336.5	A
8- <i>epi</i> PGA ₁		211186-29-7			-
PGB ₁		13345-51-2			B
PGE ₂		363-24-6	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	352.5	G
5,6- <i>trans</i> PGE ₂		36150-00-2			H
15-keto PGE ₁		22973-19-9			C
13,14-dihydro PGE ₁		19313-28-1	C ₂₀ H ₃₆ O ₅	356.5	-

ANNEXE 2: Chromatogrammes des 11 analytes obtenus dans le commerce

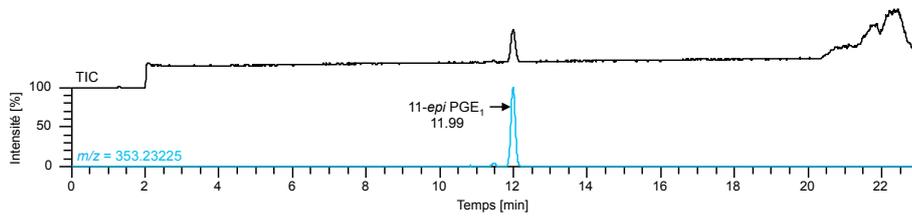
a. PGE₁



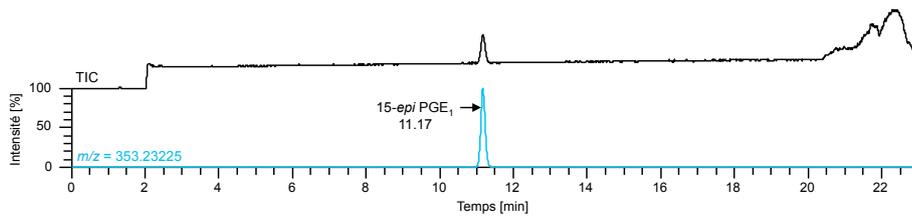
b. 8-*epi* PGE₁



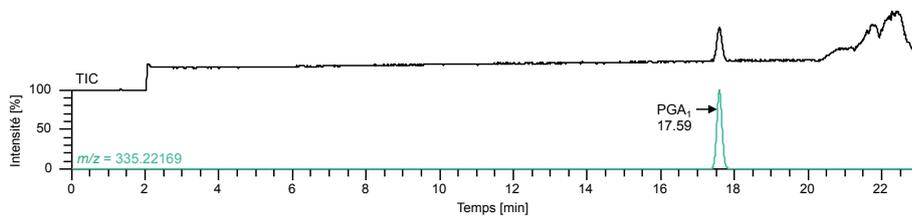
c. 11-*epi* PGE₁



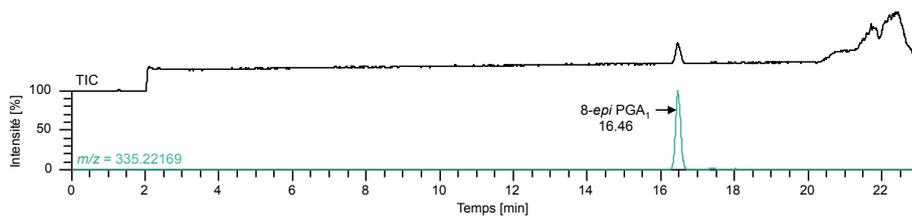
d. 15-*epi* PGE₁



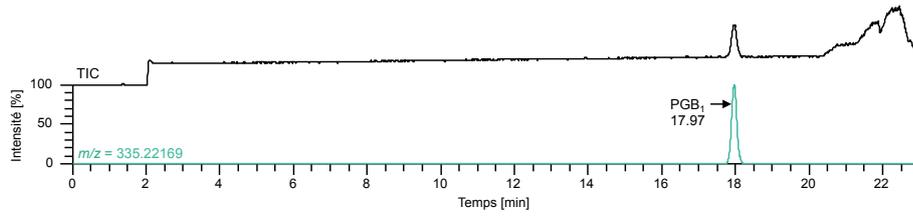
e. PGA₁



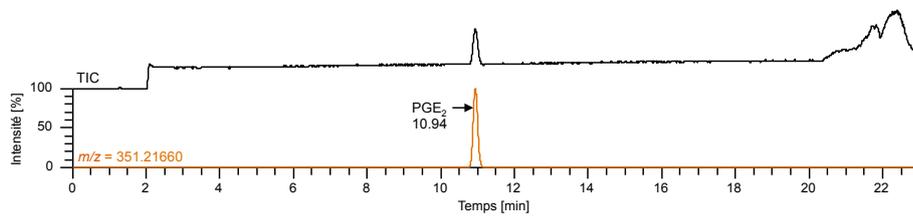
f. 8-*epi* PGA₁



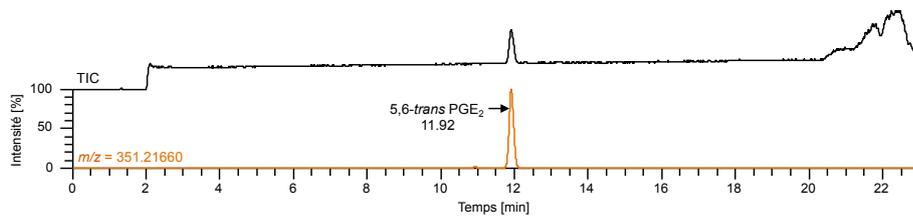
g. PGB₁



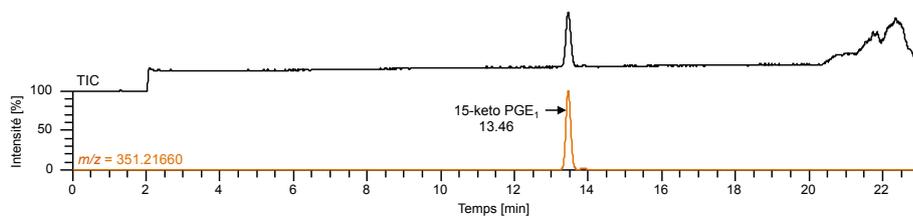
h. PGE₂



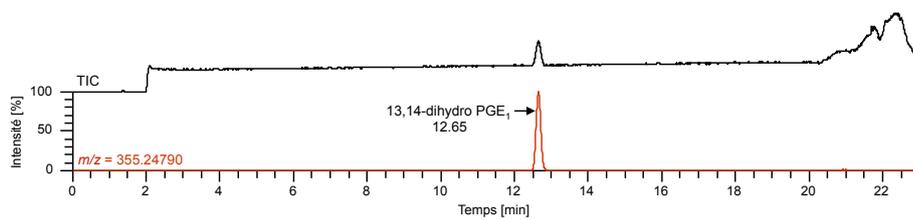
i. 5,6-trans PGE₂



j. 15-keto PGE₁

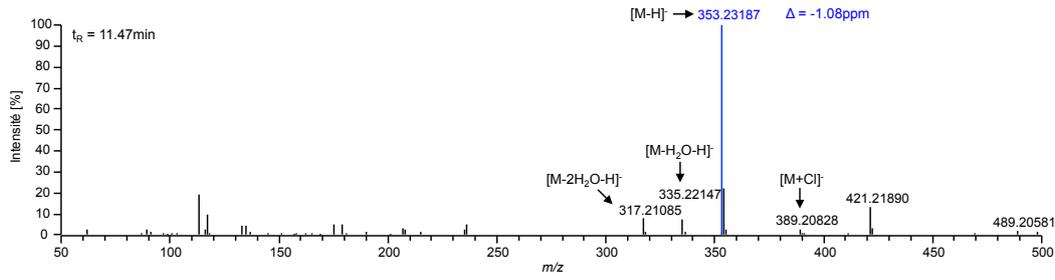


k. 13,14-dihydro PGE₁

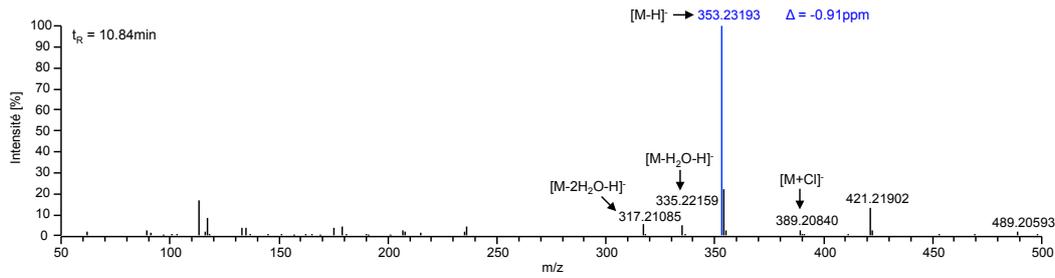


ANNEXE 3: Spectres de masse des 11 analytes obtenus dans le commerce

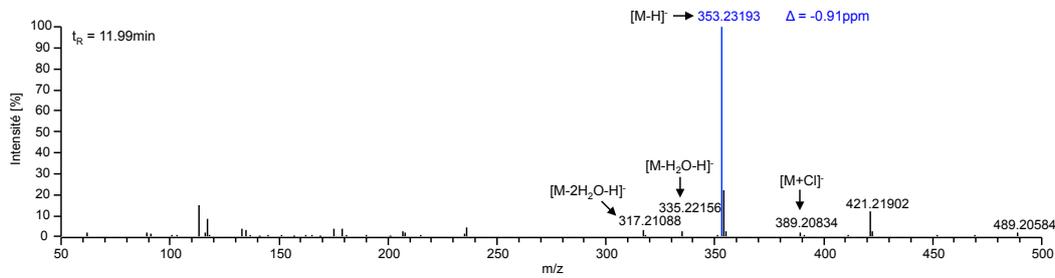
a. PGE₁



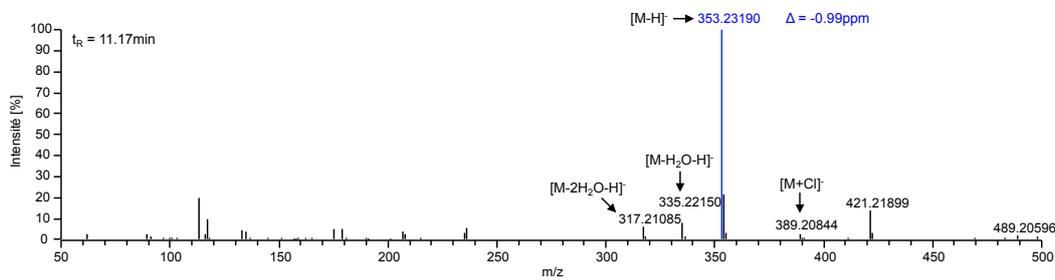
b. 8-*epi* PGE₁



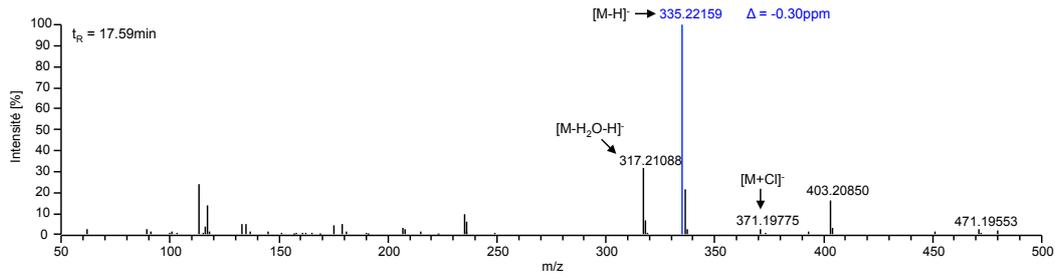
c. 11-*epi* PGE₁



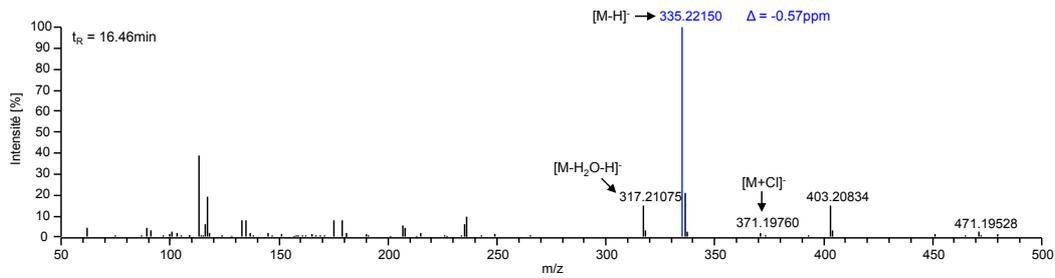
d. 15-*epi* PGE₁



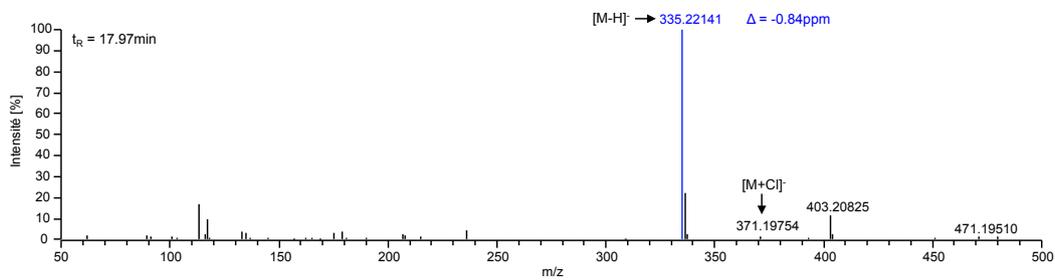
e. PGA₁



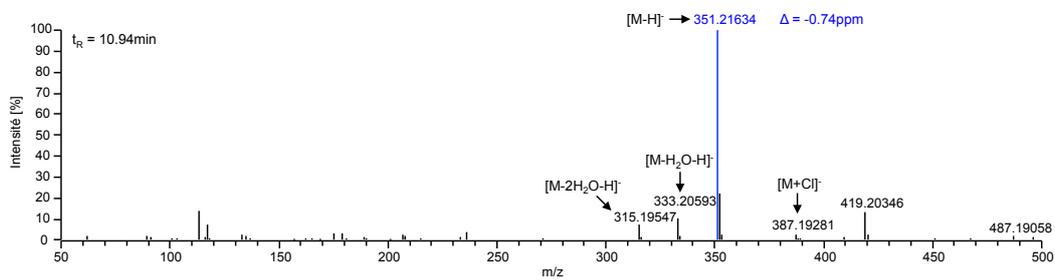
f. 8-*epi* PGA₁



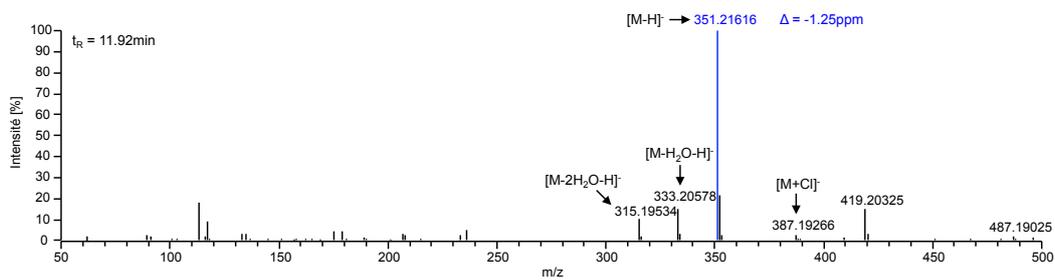
g. PGB₁



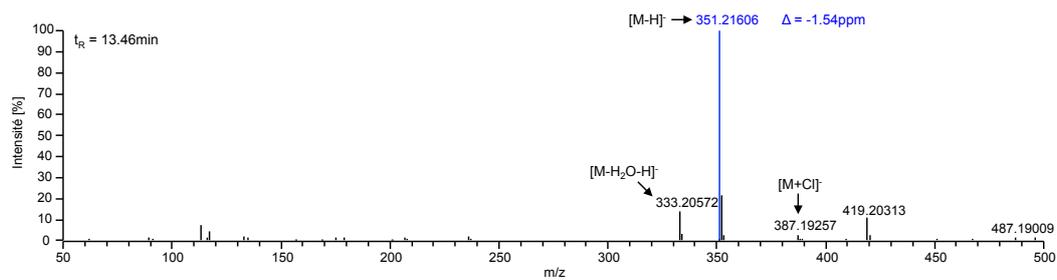
h. PGE₂



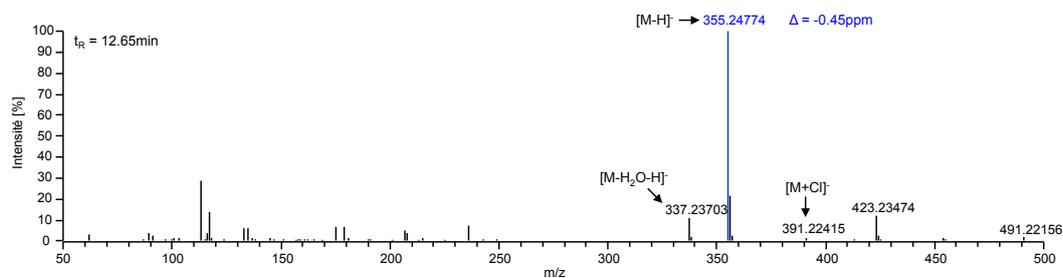
i. 5,6-*trans* PGE₂



j. 15-keto PGE₁

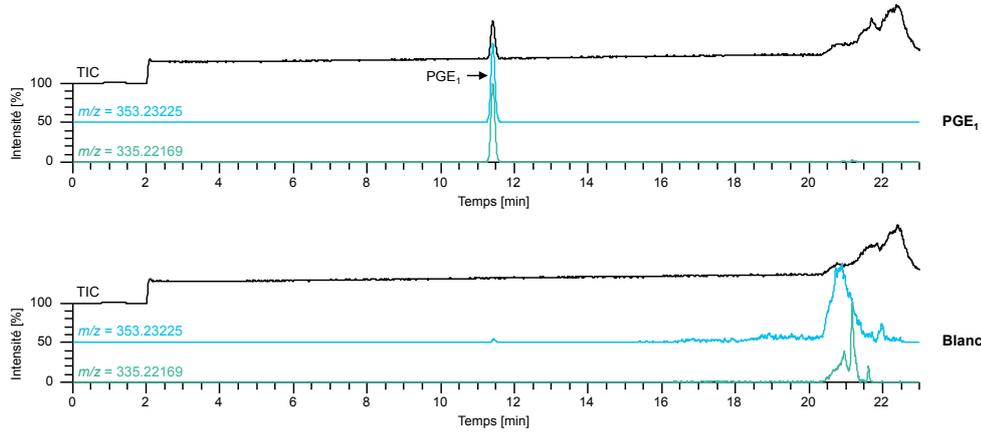


k. 13,14-dihydro PGE₁

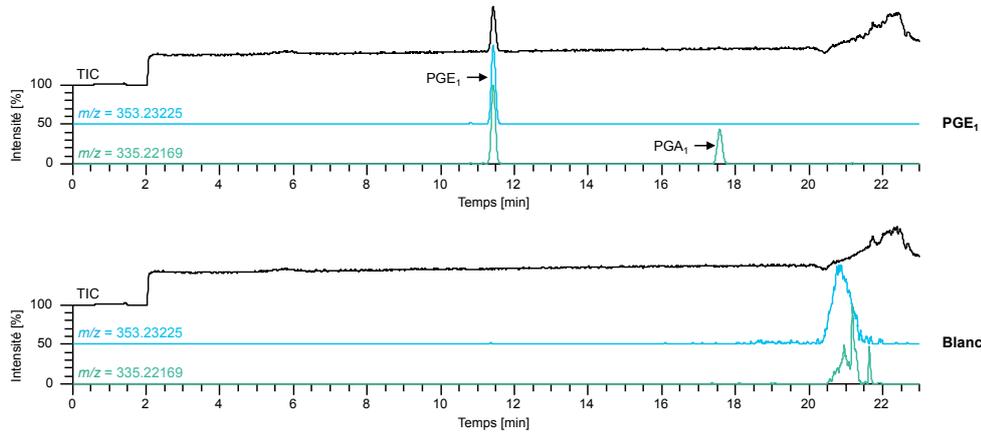


ANNEXE 4: Chromatogrammes des échantillons de PGE₁ et des blancs soumis à des conditions de stress

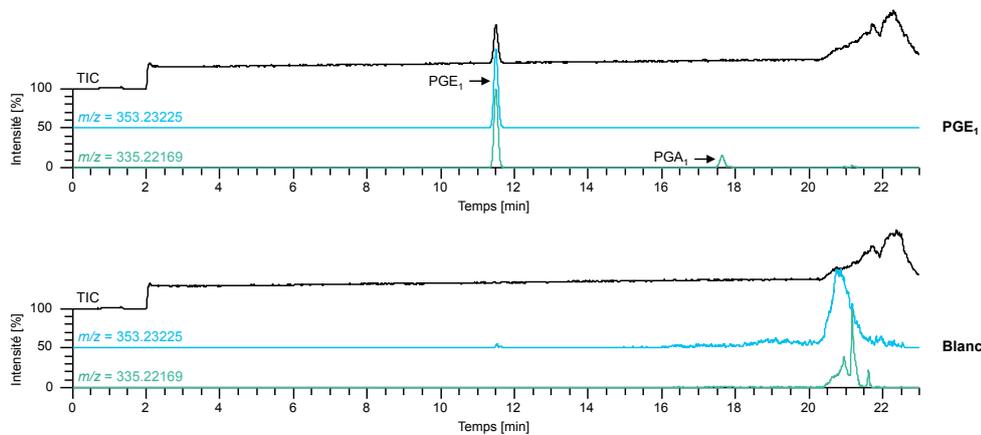
a. Témoin (solutions fraîches)



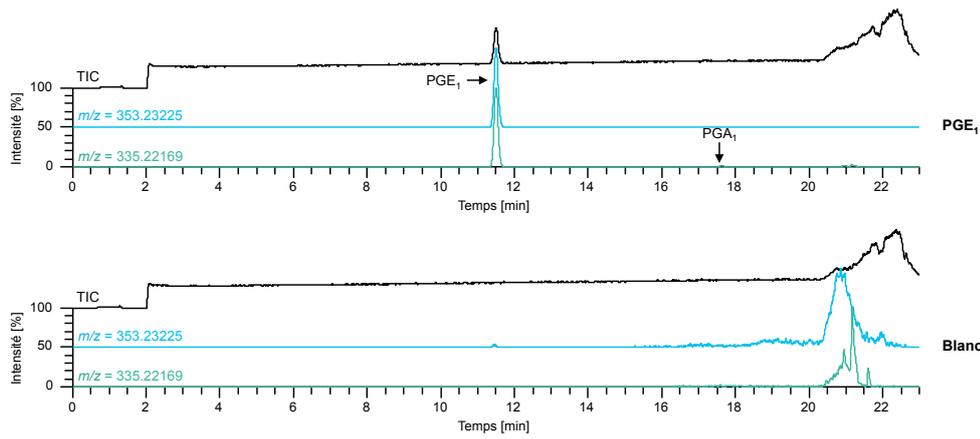
b. Traitement à l'acide fort (HCl 0.1M, température ambiante, 3h)



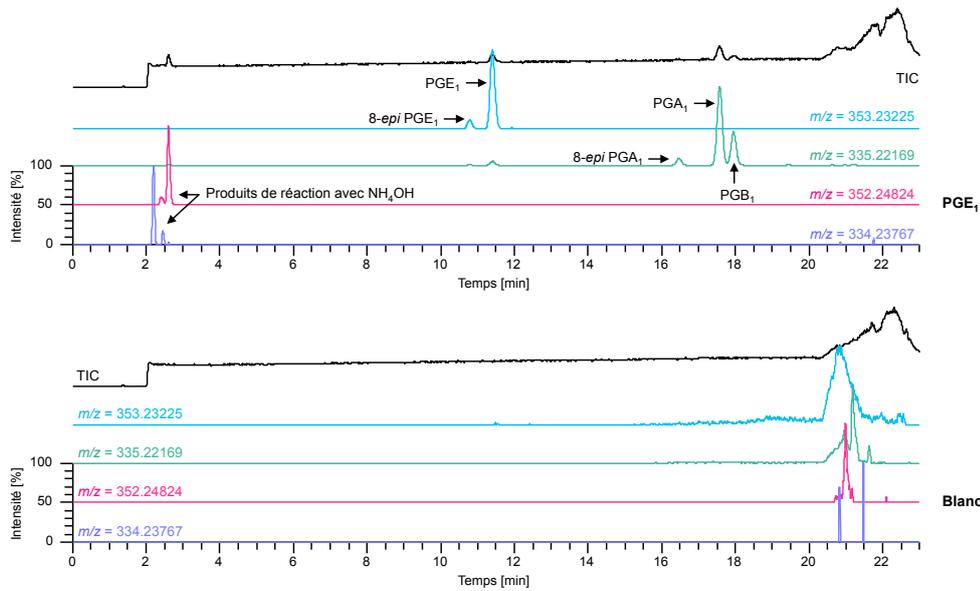
c. Traitement à l'acide faible (AF 5%, température ambiante, 3h)



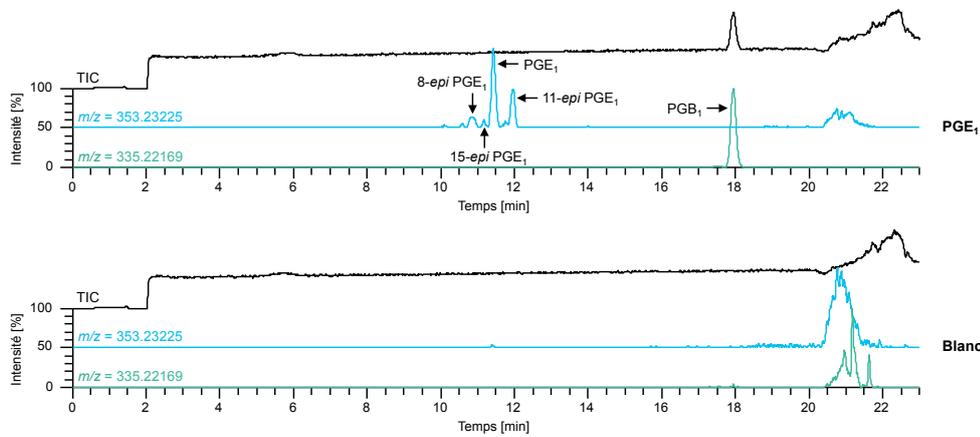
d. Traitement neutre (H₂O, température ambiante, 3h)



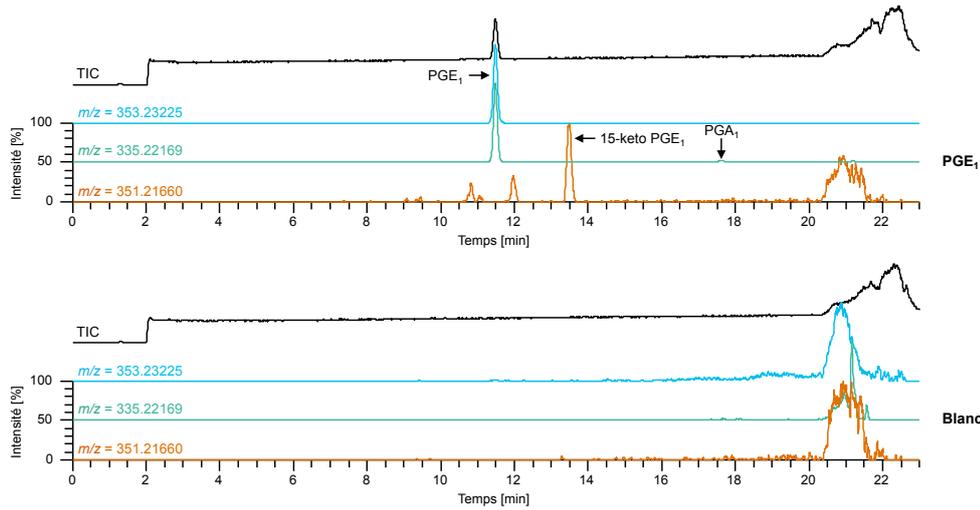
e. Traitement à la base faible (NH₄OH 5%, température ambiante, 3h)



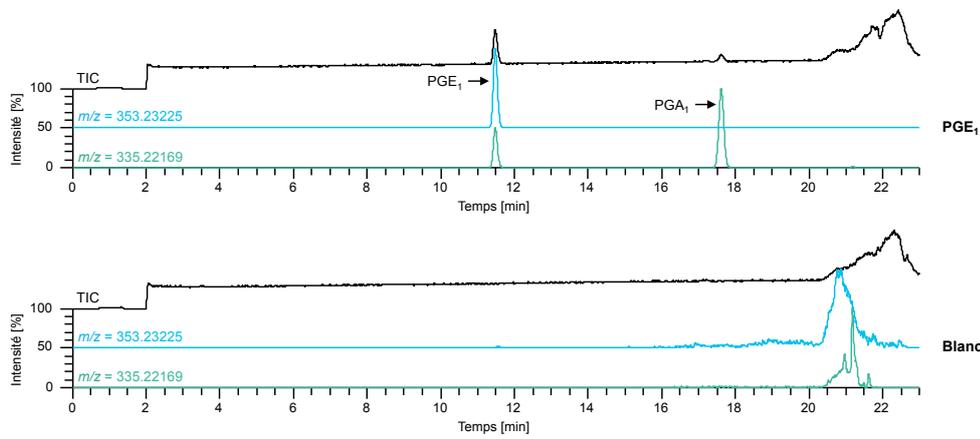
f. Traitement à la base forte (NaOH 0.1M, température ambiante, 3h)



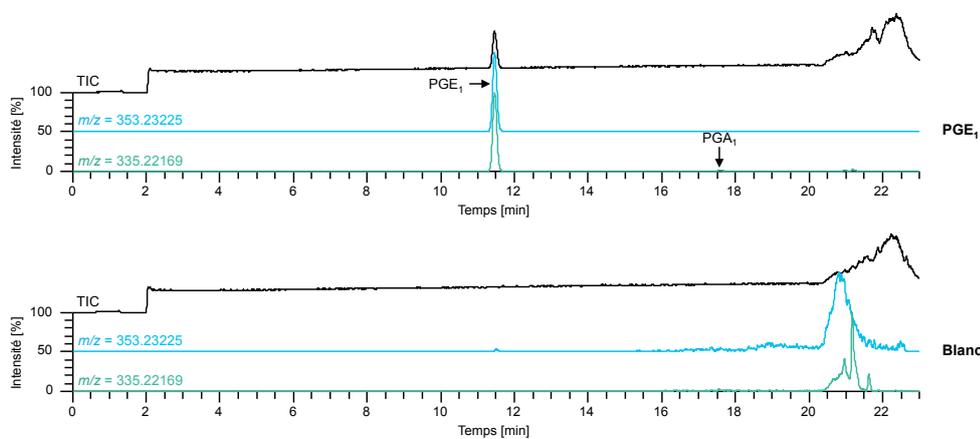
g. Traitement oxydant (H₂O₂ 15%, température ambiante, 3h)



h. Traitement à la chaleur (H₂O, 80°C, 3h)



i. Traitement aux UV (H₂O, UV-light, 30°C, 3h)



ANNEXE 5: Résultats de l'analyse des standards des 4 séries de validation

Standard	Concentration [µg/ml]	t _R de PGE ₁ [min]				Aire de PGE ₁			
		Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4
SE1a	0.400	11.69	11.35	11.44	11.34	241162820	251757701	258878346	248236918
SE1b	0.400	11.70	11.36	11.42	11.33	242789238	239775790	261659726	243033558
SE2a	0.200	11.70	11.34	11.44	11.32	120277453	124309472	134109024	122702112
SE2b	0.200	11.68	11.34	11.44	11.35	124768263	127420393	132635441	128507816
SE3a	0.100	11.71	11.36	11.45	11.35	63022550	62250518	67807097	64861938
SE3b	0.100	11.72	11.36	11.44	11.35	60435345	65081356	67532241	64527811
SE4a	0.050	11.73	11.35	11.44	11.35	30247027	29906210	33385795	31412007
SE4b	0.050	11.72	11.35	11.46	11.35	31616220	30862505	33219768	32450430
SE5a	0.025	11.71	11.37	11.46	11.34	15554265	15389881	17149202	16361952
SE5b	0.025	11.74	11.37	11.47	11.34	16048766	15086935	15943601	15616484
SV1a	0.200	11.73	11.36	11.47	11.35	122778830	126020534	129353553	116878253
SV1b	0.200	11.73	11.38	11.46	11.32	122930038	125324115	133984177	118965269
SV1c	0.200	11.74	11.34	11.48	11.36	117068310	124331892	131088836	122472342
SV2a	0.100	11.72	11.36	11.51	11.35	63824107	61150179	67344531	60380123
SV2b	0.100	11.73	11.35	11.49	11.35	63447753	61850762	65404691	63312367
SV2c	0.100	11.74	11.36	11.49	11.34	61590709	61370311	69017764	60105183
SV3a	0.050	11.69	11.43	11.52	11.37	31886026	30001138	34436360	30085328
SV3b	0.050	11.72	11.36	11.50	11.36	31939571	28912372	34068029	30712565
SV3c	0.050	11.73	11.38	11.53	11.35	30679327	28827573	33999570	29457677
Intra-série	Moyenne	11.72	11.36	11.47	11.35				
	Ecart-type	0.02	0.02	0.03	0.01				
	CV	0.2%	0.2%	0.3%	0.1%				
Inter-série	Moyenne	11.47							
	Ecart-type	0.15							
	CV	1.3%							

ANNEXE 6: Rapport de validation fourni par le logiciel Enoval



Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: -

**VALIDATION DE LA MÉTHODE DE
DOSAGE DE LA PROSTAGLANDINE E1**

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: -
Méthode: LC-MS
Protocole: §2.3.2
Produit: Prostin VR
Composé: Prostaglandine E1
Matrice: Glucose 10%

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: -

2 PLAN D'EXPERIENCES

Dans le but de valider une méthode analytique, deux types d'échantillons ont été préparés de façon indépendante: les standards d'étalonnage et les standards de validation.

Les standards d'étalonnage sont des échantillons, de concentrations connues, préparés dans ou hors de la matrice et qui permettent d'établir la courbe d'étalonnage.

La matrice est : Glucose 10%

Le **tableau 2:1** reprend le nombre de standards d'étalonnage par niveau de concentration, les niveaux de concentration envisagés et les différentes séries réalisées.

Tableau 2:1. Standards d'étalonnage

Série	Niveaux de concentration (•)	Nb. de répétitions
1	1.0	2
1	2.0	2
1	3.0	2
1	4.0	2
1	5.0	2
2	1.0	2
2	2.0	2
2	3.0	2
2	4.0	2
2	5.0	2
3	1.0	2
3	2.0	2
3	3.0	2
3	4.0	2
3	5.0	2
4	1.0	2
4	2.0	2
4	3.0	2
4	4.0	2
4	5.0	2

Le nombre total d'observations est 40.

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: -

Validation de la méthode de dosage de la prostaglandine E1

1 INTRODUCTION

Le but de la validation est d'établir que la méthode analytique correspond à l'usage pour lequel elle est prévue et de prouver par conséquent la fiabilité des résultats obtenus dans des limites bien définies. Plusieurs critères de validation doivent être examinés afin d'assurer la fiabilité de la méthode développée.

Les critères de validation présentés dans ce rapport sont :

- Fonction de réponse (courbe de d'étalonnage)
- Justesse
- Fidélité (répétabilité et précision intermédiaire)
- Exactitude
- Linéarité
- Limites de détection (LD) et de quantification (LQ)
- Intervalle de dosage

La règle d'arrondi appliquée est : les valeurs plus grandes ou égales à 10000 seront rapportées en notation scientifique avec 4 décimales, les valeurs supérieures ou égales à 1000 seront rapportées comme des valeurs entières, les valeurs inférieures à 1000 et supérieures ou égales à 1 seront rapportées avec 4 chiffres, 4 décimales significatives seront utilisées pour rapporter les valeurs inférieures à 1, les valeurs strictement inférieures à 10⁻⁸ seront rapportées comme 0. Cette règle s'applique aux valeurs absolues, le signe - n'est pas pris en considération.

Cependant, cette règle n'est pas appliquée aux données introduites par l'utilisateur.

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: -

3 FONCTION DE RÉPONSE

La fonction de réponse d'une méthode analytique est, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existante entre la réponse (signal) et la concentration de la substance à examiner dans l'échantillon. La fonction de réponse monotone la plus simple qui exprime cette relation est appelée "courbe d'étalonnage".

Le **tableau 3:1** reprend les modèles de régression sélectionnés. Ces modèles ont été triés en fonction de leur "indice d'exactitude" (cf. **annexe 2**).

Tableau 3:1. Modèles d'étalonnage triés par 'Indice d'Exactitude'

Modèle	Indice d'Exactitude	Limite inférieure et supérieure de quantification ($\mu\text{g/ml}$)	Indice d'Intervalle de Dosage	Indice de Fidélité	Indice de Justesse
Régression linéaire pondérée (1/X)	0.6399	[0.09967, 0.1875]	0.5839	0.4579	0.9766

L'explication des indices d'Exactitude, d'Intervalle de Dosage, de Justesse et de Fidélité est reprise en **annexe 5**.

Le modèle d'étalonnage sélectionné est: **Régression linéaire pondérée (1/X)**

Les courbes d'étalonnage obtenues pour ce modèle de régression (cf. **tableau 3:2** et **figure 3:1**) sont représentées par les équations suivantes:

$$Y = a + bX$$

où Y = réponse analytique (en -) et X = concentration introduite (en $\mu\text{g/ml}$)

Tableau 3:2. Paramètres de régression

Série	Ordonnée à l'origine	Pente	r^2	d.d.l. résiduels	SCR
1	7.5540E+05	6.0540E+08	0.9997	8	1.8931E+13
2	-1.1246E+05	6.2127E+08	0.9985	8	1.0703E+14
3	5.3788E+05	6.5609E+08	0.9996	8	3.0544E+13
4	1.0081E+06	6.1783E+08	0.9992	8	5.3610E+13

r^2 = coefficient de détermination; d.d.l. = degrés de liberté; SCR = somme des carrés des résidus

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: -

Les standards de validation sont les échantillons reconstitués dans la matrice contenant une concentration connue et dont la valeur est considérée comme vraie par consensus.

Le **tableau 2:2** reprend le nombre de standards de validation par niveau de concentration, les niveaux de concentration considérés et les différentes séries réalisées.

Tableau 2:2. Standards de Validation

Série	Niveau de concentration	Nb. de répétitions indépendantes
1	1.0	3
1	2.0	3
1	3.0	3
2	1.0	3
2	2.0	3
2	3.0	3
3	1.0	3
3	2.0	3
3	3.0	3
4	1.0	3
4	2.0	3
4	3.0	3

Le nombre total d'observations est 36.

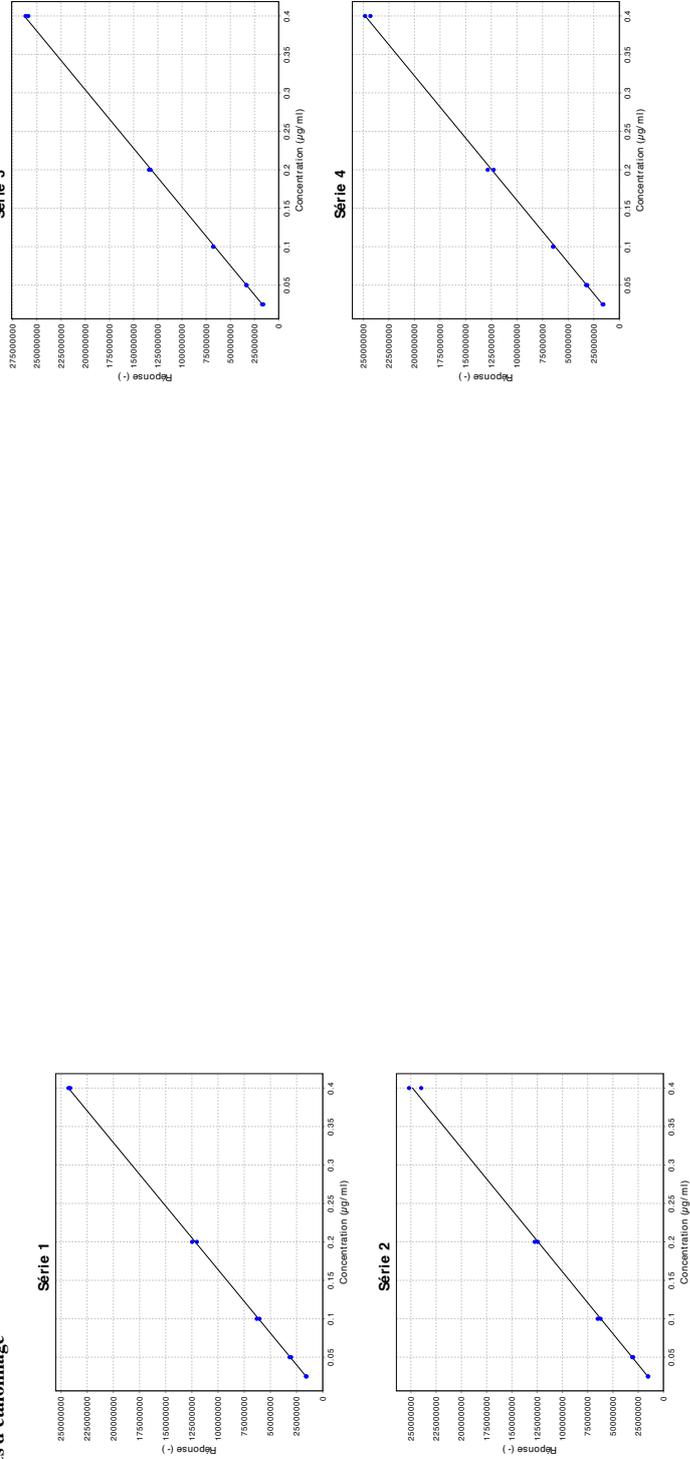
Tous les standards d'étalonnage et de validation sont repris dans **l'annexe 1**.



Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: -

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: -

Figure 3:1. Courbes d'étalonnage



Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: -



5 FIDÉLITÉ

La fidélité exprime l'écart entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites. Elle donne des informations sur l'erreur aléatoire et est évaluée à deux niveaux: la répétabilité et la fidélité intermédiaire.

Comme présenté dans le **tableau 5:1** et le **tableau 5:2**, la fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) peut être exprimée en écart type (SD) et en terme de coefficient de variation (CV).

Les estimations des composantes de la variance sont obtenues par l'approche itérative du maximum de vraisemblance restreint (REML).

Tableau 5:1. Répétabilité et Fidélité Intermédiaire relatives

Niveau de concentration (-)	Moyenne des concentrations introduites (µg/ml)	Répétabilité (CV%) ¹	Fidélité Intermédiaire (CV%) ¹
1.0	0.2000	2.031	2.731
2.0	0.10000	2.242	3.002
3.0	0.05000	1.912	4.743

¹ Les CV en % de Répétabilité et de Fidélité Intermédiaire ont été obtenus en divisant l'écart-type (SD) obtenu par la moyenne des concentrations introduites correspondante.

Tableau 5:2. Répétabilité et Fidélité Intermédiaire absolues

Niveau de concentration (-)	Moyenne des concentrations introduites (µg/ml)	Répétabilité (SD - µg/ml)	Inter-Séries (SD - µg/ml)	Ratio des composants de la variance (Inter / Intra)	Fidélité Intermédiaire (SD - µg/ml)
1.0	0.2000	0.004061	0.003652	0.8087	0.005462
2.0	0.10000	0.002242	0.001996	0.7924	0.003002
3.0	0.05000	0.0009559	0.002170	5.155	0.002372

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: -



4 JUSTESSE

La justesse exprime l'écart entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et la valeur de référence acceptée comme telle. La justesse donne une indication sur les erreurs systématiques.

Comme indiqué dans le **tableau 4:1**, la justesse est exprimée en terme de biais absolu (µg/ml), de biais relatif (%) ou de taux de recouvrement (%) pour chaque niveau de concentration des standards de validation.

Si pour un niveau de concentration, $\hat{\mu}$ est la moyenne des concentrations introduites et que \bar{x} est l'estimation de la concentration moyenne obtenue par les concentrations calculées alors nous avons:

$$\text{Biais absolu} = \bar{x} - \hat{\mu}$$

$$\text{Biais relatif (\%)} = 100 \times \frac{\bar{x} - \hat{\mu}}{\hat{\mu}}$$

$$\text{Taux de recouvrement (\%)} = 100 \times \frac{\bar{x}}{\hat{\mu}}$$

Tableau 4:1. Justesse

Niveau de concentration (-)	Moyenne des concentrations introduites (µg/ml)	Moyenne des concentrations calculées (µg/ml)	Biais absolu (µg/ml)	Biais relatif (%)	Taux de recouvrement (%)	Intervalle de confiance à 95% des Recouvrements (%)
1.0	0.2000	0.1979	-0.002124	-1.062	98.94	[97.27, 100.6]
2.0	0.10000	0.1003	0.0002663	0.2663	100.3	[98.44, 102.1]
3.0	0.05000	0.04909	-0.0009085	-1.817	98.18	[95.41, 101.0]

Confidentiel
ENOV-V3.0b PROD-2014:158454818
Rapport v1.4 FR
Page 10 sur 39

Confidentiel
ENOV-V3.0b PROD-2014:158454818
Rapport v1.4 FR
Page 11 sur 39

7 juin 2014 18:48 (CEST)
© Atalanta 2001-2013.



Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: -

Tableau 5:3. Limite supérieure de confiance à 95 %

Niveau de concentration (-)	Moyenne des concentrations introduites ($\mu\text{g/ml}$)	Limite supérieure de confiance à 95% de la répétabilité (SD - $\mu\text{g/ml}$)	Limite supérieure de confiance à 95% de la fidélité intermédiaire (SD - $\mu\text{g/ml}$)
1.0	0.2000	0.006949	0.01316
2.0	0.10000	0.003836	0.007217
3.0	0.05000	ND	0.006587

De plus, le taux de recouvrement de chaque série ainsi que toute les séries est rapporté dans le [tableau 5:4](#).

Tableau 5:4. Taux de recouvrement par série

Niveau de concentration (-)	Série	Moyenne des concentrations introduites ($\mu\text{g/ml}$)	Concentration calculée ($\mu\text{g/ml}$)	Taux de recouvrement (%)
1.0	1	0.2000	0.1985	99.25
1.0	2	0.2000	0.2017	100.9
1.0	3	0.2000	0.1996	99.79
1.0	4	0.2000	0.1917	95.84
1.0	Moyenne des séries	0.2000	0.1979	98.94
2.0	1	0.1000	0.1027	102.7
2.0	2	0.1000	0.09910	99.10
2.0	3	0.1000	0.1017	101.7
2.0	4	0.1000	0.09753	97.53
2.0	Moyenne des séries	0.10000	0.1003	100.3
3.0	1	0.05000	0.05079	101.6
3.0	2	0.05000	0.04726	94.51
3.0	3	0.05000	0.05126	102.5
3.0	4	0.05000	0.04706	94.13
3.0	Moyenne des séries	0.05000	0.04909	98.18

Confidentiel
ENOV-V3.0b PROD-2014158454818
Rapport v1.4 FR
Page 12 sur 39
7 juin 2014 18:48 (CEST)
© Atilenda 2001-2013.



Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: -

6 INCERTITUDE DE MESURE

L'incertitude est un paramètre associé au résultat de la mesure, qui caractérise la dispersion des valeurs qui pourrait raisonnablement être attribuée au mesurande.

Tableau 6:1. Incertitude

Niveau de concentration (-)	Moyenne des concentrations introduites ($\mu\text{g/ml}$)	Incertitude du biais ($\mu\text{g/ml}$)	Incertitude ($\mu\text{g/ml}$)	Incertitude étendue ($\mu\text{g/ml}$)	Incertitude étendue relative (%)
1.0	0.2000	0.002170	0.005877	0.01175	5.877
2.0	0.10000	0.001189	0.003229	0.006457	6.457
3.0	0.05000	0.001120	0.002623	0.005245	10.49

Confidentiel
ENOV-V3.0b PROD-2014158454818
Rapport v1.4 FR
Page 13 sur 39
7 juin 2014 18:48 (CEST)
© Atilenda 2001-2013.

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: -



7 EXACTITUDE

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée comme telle, appelée également "valeur conventionnellement vraie". L'exactitude prend en compte l'erreur totale, c'est à dire l'erreur systématique et l'erreur aléatoire liées au résultat. Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité. Elle est estimée à partir du profil d'exactitude présenté en [figure 7.1](#).

Les limites d'acceptation ont été fixées à $\pm 8\%$, et ceci en accord avec l'objectif de la procédure analytique.

Le profil d'exactitude est obtenu en reliant entre elles d'une part les bornes inférieures et d'autre part les bornes supérieures de l'intervalle de tolérance, bornes calculées pour chaque niveau de concentration.

La formule utilisée pour le calcul de cet intervalle de tolérance est:

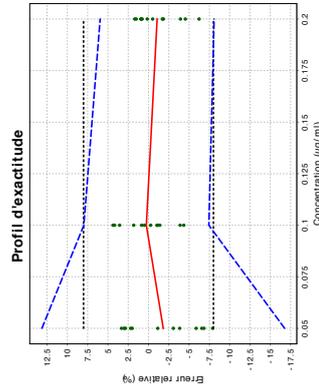
$$biases(\%) \pm kCV_{FI}(\%)$$

L'explication de k et CV_{FI} peut être trouvée dans l'[annexe 5](#).

La méthode est considérée comme valide pour l'intervalle de dosage où le profil d'exactitude est compris dans les limites d'acceptation fixées a priori. Cette approche garantit que seules 5.0% des futures mesures d'échantillons inconnus seront en dehors de ces limites.

Confidentiel
ENOV-V3.0b PROD-2014158454818
Rapport v1.4 FR
Page 14 sur 39
7 juin 2014 18:48 (CEST)
© Atilenda 2001-2013.

Figure 7:1. Profil d'exactitude obtenu en considérant le modèle: Régression linéaire pondérée (1/X)



La ligne rouge continue représente le biais, les lignes discontinues bleues définissent les limites de l'intervalle de tolérance attendues au niveau β et les lignes pointillées noires sont les limites d'acceptation. Les points sont quant à eux l'erreur relative des concentrations calculées et sont représentées en fonction de leurs concentrations cibles.

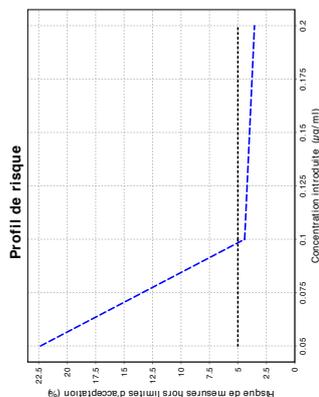
Les limites inférieures et supérieures de l'intervalle de tolérance exprimées en erreur relative sont également présentées dans le [tableau 7:1](#) pour chaque niveau de concentration introduit. Le risque d'avoir des mesures en dehors des limites d'acceptation à chaque niveau est calculé uniquement s'il y a au moins deux répétitions par série.

Confidentiel
ENOV-V3.0b PROD-2014158454818
Rapport v1.4 FR
Page 15 sur 39
7 juin 2014 18:48 (CEST)
© Atilenda 2001-2013.

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: -



Figure 7.2. Profil de risque obtenu en considérant le modèle: Régression linéaire pondérée (1/X)



La ligne pointillée noire représente le niveau de risque maximum choisi, à savoir : 5,0%.

Tableau 7.1. Exactitude de la méthode obtenue en considérant le modèle Régression linéaire pondérée (1/X)

Niveau de concentration (-)	Moyenne des concentrations introduites ¹ (µg/ml)	Limites de "tolérance à l'expectation" (µg/ml)	Limites de "tolérance relatives" (%)	Risque ² (%)
1.0	0.2000	[0.1838; 0.2119]	[-8.081; 5.957]	3.542
2.0	0.10000	[0.09257; 0.10890]	[-7.433; 7.966]	4.405
3.0	0.05000	[0.04162; 0.05657]	[-16.77; 13.13]	22.35

¹ Les concentrations introduites et réponses associées peuvent avoir fait l'objet de transformations pour aligner les données sur une valeur moyenne de la concentration et ce par niveau (cf. annexe 1).

² Le risque d'avoir des mesures en dehors des limites d'acceptation.

Confidentiel
ENOV-V3.0b-PROD-2014158454818
Rapport v1.4 FR
Page 16 sur 39
7 juin 2014 18:48 (CEST)
© Atilenda 2001-2013.

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: -



8 LINÉARITÉ DES RÉSULTATS

La linéarité d'une méthode analytique est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration en analyte dans l'échantillon.

Un modèle de régression linéaire (cf. Figure 8.1) a été ajusté sur les concentrations calculées en fonction des concentrations introduites dans le but d'obtenir l'équation suivante:

$$Y = 0.0002865 + 0.9896 X$$

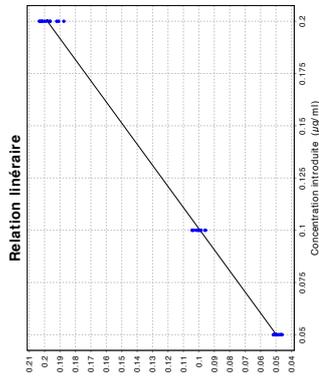
où Y = concentrations calculées (µg/ml) et X = concentrations introduites (µg/ml).

Le coefficient de détermination (r²) est égal à 0.9966 .

La somme des carrés des résidus (SCR) est égale à 0.0004643.

Les concentrations calculées figurent en annexe 3.

Figure 8.1. Relation entre les concentrations introduites et calculées



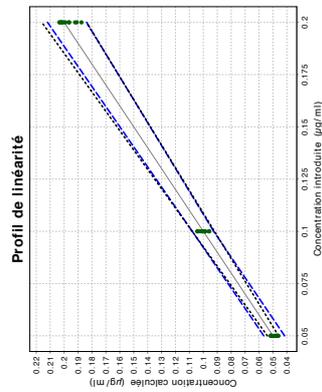
Dans le but de démontrer la linéarité de la méthode, l'approche basée sur l'intervalle de tolérance attendu au niveau β exprimé en valeur absolue peut-être utilisé et est illustré dans la figure 8.2.

Confidentiel
ENOV-V3.0b-PROD-2014158454818
Rapport v1.4 FR
Page 17 sur 39
7 juin 2014 18:48 (CEST)
© Atilenda 2001-2013.

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: -



Figure 8.2. Graphe de linéarité



La ligne continue est la droite d'identité ($Y=X$). Les limites représentées par les lignes discontinues bleues sur le graphique correspondent au profil d'exactitude c'est à dire les limites de tolérance "β-expectation" exprimées en valeur absolue. Ces limites sont calculées de la façon suivante:

$$\bar{x} \pm k \cdot S_{FI}$$

L'explication de \bar{x} , k et S_{FI} peut être trouvée en annexe 5.

Les lignes pointillées noires représentent les limites d'acceptation exprimées dans l'unité de la concentration.

La méthode est considérée comme valide là où l'intervalle de tolérance représenté par les lignes discontinues bleues est à l'intérieur des limites d'acceptation définies par les lignes pointillées noires.

La linéarité du modèle est démontrée quand les limites de l'intervalle de tolérance exprimées en absolu sont incluses dans les limites d'acceptation.

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: -



9 LIMITE DE DÉTECTION (LD), LIMITES DE QUANTIFICATION (LQ) ET INTERVALLE DE DOSAGE

La limite de détection d'une procédure d'analyse est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure.

Il existe deux façons de calculer la LD :

- $LD = LQ/3.3$
- En utilisant Miller & Miller (non applicable si un seul niveau et pas de répétition) :
 - Détermination par série de $Y_{LD} = \text{Ordonnée à l'origine (0 si négative)} + 3 \cdot \text{Déviation standard résiduelle obtenue par ANOVA}$. A l'aide du modèle de régression choisi, la concentration calculée, X_{LD} , sera déterminée pour chaque série.
 - La moyenne des X_{LD} sur toutes les séries définira la LD de la procédure analytique.

L'application choisit la plus petite valeur.

LD ($\mu\text{g/ml}$) = 0.02565

La limite inférieure de quantification est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites, avec une exactitude définie. La définition peut également être appliquée pour la limite supérieure de quantification, qui est la plus grande quantité de l'analyte dans l'échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites, avec une exactitude définie.

Les limites de quantification sont obtenues en calculant la plus petite et la plus grande concentration pour lesquelles les limites d'exactitude, c'est à dire les limites de l'intervalle de tolérance attendu au niveau β sortent des limites d'acceptation.

L'intervalle de dosage est l'intervalle compris entre les limites inférieure et supérieure de quantification où la procédure analytique atteint l'exactitude souhaitée.

Limite inférieure de quantification (LQ_{inf}) ($\mu\text{g/ml}$) = 0.09967

Limite supérieure de quantification (LQ_{sup}) ($\mu\text{g/ml}$) = 0.1875

Confidentiel
ENOV-V3.0b PROD-2014158454818

Rapport v1.4 FR
Page 19 sur 39

7 juin 2014 18:48 (CEST)
© Atilenda 2001-2013.

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: -



Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: -



10 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Burdick RK, Graybill FA. Confidence interval on variance components. New York: CRC Press;1992.
2. Derringer D, Stuech R. Simultaneous optimization of several response variables. Journal of quality technology. 1980;12:214-219.
3. Feinberg M, Boulanger B, Dewe W, Hubert P. New advances in method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical data. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2004;380:502-514.
4. Gonzalez Gustavo A, Herrador Angeles M. Accuracy profile from uncertainty measurement. Talanta, 2006 Nov; 70(4):896-901.
5. Hubert Ph, Nguyen-Huu JJ. Validation of quantitative analytical procedures. Harmonization of approaches. STP Pharma Pratiques. 2003 May;13(3):101-138.
6. Mee RW. Beta-expectation and beta-content tolerance limits for balanced one-way ANOVA random model. Technometrics. 1984;26:251-254.
7. Miller JC, Miller JN. Statistics for Analytical Chemistry. 3rd edn. New York:Ellis Horwood;1993.
8. Miller K, Bowsher R, Celniker R, Gibbons J, Gupta S, Lee J, et al. Workshop on Bioanalytical Methods Validation for Macromolecules : Summary Report. Pharmaceutical Research. 2001;18(9):1373-83.
9. Shah VP, Midha KK, Findlay JW, Hill HM, Hulse JD, McGilveray IJ, et al. Bioanalytical Method Validation - A revisit with a decade of progress. Pharmaceutical Research. 2000;17(12):1551-7.
10. Eurachem. The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 1st ed. Eurachem;1998.
11. Eurachem. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 2nd ed. Eurachem;2000.
12. Guidance for industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). 2001 May [cited 2009 Apr 2]. Available from: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>.
13. Guidance for Industry : Analytical Procedures and Methods Validation (Draft guidance). U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). 2000 Aug [cited 2009 Apr 2]. Available from: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>.

Confidentiel
ENOV-V3.0b-PROD-2014158454818
Rapport v.1.4 FR
Page 20 sur 39
7 juin 2014 18:48 (CEST)
© Atilenda 2001-2013.

14. Guidance for Industry Q9 Quality Risk Management. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). 2006 [cited 2009 Apr 2]. Available from: <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>.
15. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 2005 [cited 2009 Apr 2]. Available from: <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>.
16. ISO 5725-1:1994, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 1: General principles and definitions.
17. ISO 5725-2:1994, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.
18. ISO 5725-3:1994, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method.
19. ISO 5725-4:1994, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 4: Basic methods for the determination of the trueness of a standard measurement method.
20. ISO 5725-6:1994, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 6: Use in practice of accuracy values.
21. ISO/IEC 17025:2005, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.

Confidentiel
ENOV-V3.0b-PROD-2014158454818
Rapport v.1.4 FR
Page 21 sur 39
7 juin 2014 18:48 (CEST)
© Atilenda 2001-2013.

ANNEXE 7: Résultats de l'évaluation du carry-over

Injection	t _R de PGE ₁ [min]		Aire de PGE ₁		Carry-over [%] = Aire du Blanc / Aire du Standard
	Standard	Blanc	Standard	Blanc	
1	11.45	11.47	269930417	17383	0.006
2	11.42	11.42	269974594	28643	0.011
3	11.45	11.44	270216042	15736	0.006
4	11.42	11.45	269921044	29781	0.011
5	11.45	11.49	261643627	25706	0.010
6	11.45	11.43	271506892	23882	0.009
		Moyenne	268865436		0.009
		Ecart-type	3589838		0.002
		CV	1.3%		24.9%

ANNEXE 8: Résultats de l'analyse à t0 et à 9h des standards d'une série de validation stockés à 4°C

Standard	t _r de PGE ₁ [min]		Aire de PGE ₁		Ecart [%] = (Aire à 9h - Aire à 0h) / Aire à 0h
	0h	9h	0h	9h	
SE1a	11.35	11.34	251757701	252627814	0.3
SE1b	11.36	11.35	239775790	242857483	1.3
SE2a	11.34	11.35	124309472	126564722	1.8
SE2b	11.34	11.34	127420393	128864625	1.1
SE3a	11.36	11.34	62250518	64035486	2.9
SE3b	11.36	11.33	65081356	65120790	0.1
SE4a	11.35	11.34	29906210	29683628	-0.7
SE4b	11.35	11.33	30862505	30868045	0.0
SE5a	11.37	11.31	15389881	15921725	3.5
SE5b	11.37	11.36	15086935	14649618	-2.9
SV1a	11.36	11.36	126020534	123970400	-1.6
SV1b	11.38	11.34	125324115	127610525	1.8
SV1c	11.34	11.36	124331892	126930300	2.1
SV2a	11.36	11.33	61150179	61030190	-0.2
SV2b	11.35	11.36	61850762	61211836	-1.0
SV2c	11.36	11.33	61370311	61509457	0.2
SV3a	11.43	11.36	30001138	31336274	4.5
SV3b	11.36	11.36	28912372	30825670	6.6
SV3c	11.38	11.34	28827573	27936297	-3.1
			Moyenne		0.9
			Ecart-type		2.4
			CV		277%

ANNEXE 9: Résultats de l'analyse à t0, 1 et 2sem des échantillons de Prostin VR stockés à -20°C

a. Analyse des standards d'étalonnage

Standard	Concentration [$\mu\text{g/ml}$]	Aire de PGE ₁		
		Analyses à t0	Analyses à 1sem	Analyses à 2sem
SE1a	0.400	263020244	256126013	252021381
SE1b	0.400	255194141	273004190	258181082
SE2a	0.200	137111955	133954651	133814860
SE2b	0.200	131669673	144994499	136550934
SE3a	0.100	66234454	65604120	66217306
SE3b	0.100	67849335	68744726	66026628
SE4a	0.050	33477520	31701663	32749865
SE4b	0.050	32187691	32300632	32090488
SE5a	0.025	15209089	16219784	16385920
SE5b	0.025	16737217	16368173	16059387
Régression linéaire pondérée (1/x)	Pente	6.5728E+08	6.7452E+08	6.4971E+08
	Ordonnée à l'origine	-8.4391E+03	-6.4897E+05	3.0540E+05
	R ²	0.9989	0.9972	0.9988

b. Analyse des échantillons n° 1 à 6

Aire de PGE ₁									
Temps [sem]	Echantillon n° 1	n° 2	n° 3	n° 4	n° 5	n° 6			
0	91768953	100120772	102912584	91526702	89406285	80488311			
1	87794710	92388193	85265079	88405638	85517126	78780717			
2	82944011	84545217	86199619	90616003	85640436	81912512			
Aire de PGA ₁									
Temps [sem]	Echantillon n° 1	n° 2	n° 3	n° 4	n° 5	n° 6			
0	1678604	1809577	1963882	1709485	1584902	1516860			
1	1598311	1784845	1520561	1711194	1608590	1389244			
2	1508396	1578646	1502187	1841611	1612200	1432467			
Concentration de PGE ₁ [$\mu\text{g/ml}$]									
Temps [sem]	Echantillon n° 1	n° 2	n° 3	n° 4	n° 5	n° 6			
0	1.396	1.523	1.566	13.926	13.604	12.247			
1	1.311	1.379	1.274	13.203	12.774	11.776			
2	1.272	1.297	1.322	13.900	13.134	12.561			
Pourcentage restant de PGE ₁ [%]									
Temps [sem]	Echantillon n° 1	n° 2	n° 3	n° 4	n° 5	n° 6	Moyenne	Ecart-type	CV
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	-	-
1	93.9	90.5	81.3	94.8	93.9	96.2	91.8	5.4	5.9%
2	91.1	85.1	84.4	99.8	96.5	102.6	93.3	7.6	8.2%
Pourcentage indicatif de PGA ₁ [%]									
Temps [sem]	Echantillon n° 1	n° 2	n° 3	n° 4	n° 5	n° 6	Moyenne	Ecart-type	CV
0	1.83	1.81	1.91	1.87	1.77	1.88	1.84	0.05	2.8%
1	1.82	1.93	1.78	1.94	1.88	1.76	1.85	0.07	4.0%
2	1.82	1.87	1.74	2.03	1.88	1.75	1.85	0.11	5.8%

ANNEXE 10: Résultats de l'étude de stabilité

a. Analyse des standards d'étalonnage

Standard	Concentration [$\mu\text{g/ml}$]	Aire de PGE_1				
		Lot n° 1	Lots n° 2 & 3	Lot n° 4	Lot n° 5	Lot n° 6
SE1a	0.400	270905484	267555329	256126013	284792109	270951232
SE1b	0.400	273169433	267312665	273004190	280777909	271609513
SE2a	0.200	133976949	135514902	133954651	143382387	139035850
SE2b	0.200	136923664	140553758	144994499	138800580	133164095
SE3a	0.100	67741829	67950905	65604120	69855467	68956739
SE3b	0.100	67288907	68880425	68744726	69592759	70229863
SE4a	0.050	31995650	33427734	31701663	33516620	35240464
SE4b	0.050	32229296	32555124	32300632	33271812	33953074
SE5a	0.025	16406600	16609205	16219784	17214351	17044234
SE5b	0.025	16438680	16453115	16368173	17078306	16974718
Régression linéaire pondérée (1/x)	Pente	6.8210E+08	6.7719E+08	6.7452E+08	7.0885E+08	6.7965E+08
	Ordonnée à l'origine	-1.0170E+06	-2.8355E+05	-6.4897E+05	-1.0431E+06	3.7035E+05
	R ²	0.9998	0.9994	0.9972	0.9997	0.9996

b. Analyse des lots n° 1 à 3 à 1.5µg/ml

Aire de PGE ₁										
Conditionnement	Temps [h]	Lot n° 1		Lot n° 2		Lot n° 3		Moyenne	Ecart-type	CV
Seringues non-teintées	0	88911698	86653641	87727686	87830780	84064228	87495575	87113935	1660165	1.9%
	24	88903983	87484334	78745220	78617835	83063872	83419413	83372443	4280666	5.1%
	48	86963850	87886115	86264801	83219248	79050100	78935148	83719877	3982678	4.8%
	72	79611841	81290752	80393979	77741565	76087313	79852696	79163024	1907884	2.4%
	168	74594076	74936916	77805934	78317686	71295797	71047979	74666398	3089366	4.1%
Seringues teintées	0	84658297	87877110	89826566	90116719	82492893	84802008	86628932	3107260	3.6%
	24	81292352	83011975	87608454	88808655	85373476	83455136	84925008	2881011	3.4%
	48	84359338	88529310	87230901	85786224	84512067	84746500	85860723	1692266	2.0%
	72	78091305	80397522	81016063	80994855	79685187	81893996	80346488	1325841	1.7%
	168	75295197	79607336	80016013	79987478	76329098	79439445	78445761	2077766	2.6%
Aire de PGA ₁										
Conditionnement	Temps [h]	Lot n° 1		Lot n° 2		Lot n° 3		Moyenne	Ecart-type	CV
Seringues non-teintées	0	1664190	1623160	1562573	1597017	1544318	1602631	1598982	42820	2.7%
	24	1721505	1716845	1544463	1502735	1575769	1586647	1607994	90932	5.7%
	48	1940889	1970508	1580766	1498444	1479184	1490718	1660085	231967	14.0%
	72	1834609	1866222	1603960	1651798	1657714	1667951	1713709	108613	6.3%
	168	2363226	2386022	2053903	2017555	2050508	2001881	2145516	178698	8.3%
Seringues teintées	0	1573434	1659997	1573516	1673559	1499465	1517923	1582982	71448	4.5%
	24	1806918	1732392	1996293	2003365	1845199	1869858	1875671	106840	5.7%
	48	2112682	2161776	2265278	2161596	2332407	2279848	2218931	85532	3.9%
	72	2183214	2257079	2223589	2169672	2481101	2537627	2308714	159445	6.9%
	168	2768195	2844721	2783076	2765378	3605507	3630275	3066192	428380	14.0%
Concentration de PGE ₁ [µg/ml]										
Conditionnement	Temps [h]	Lot n° 1		Lot n° 2		Lot n° 3		Moyenne	Ecart-type	CV
Seringues non-teintées	0	1.318	1.285	1.300	1.301	1.246	1.296	1.291	0.025	1.9%
	24	1.318	1.297	1.167	1.165	1.231	1.236	1.236	0.064	5.2%
	48	1.290	1.303	1.278	1.233	1.172	1.170	1.241	0.059	4.8%
	72	1.182	1.207	1.191	1.152	1.128	1.183	1.174	0.029	2.5%
	168	1.109	1.114	1.153	1.161	1.057	1.053	1.108	0.046	4.1%
Seringues teintées	0	1.256	1.303	1.331	1.335	1.222	1.256	1.284	0.046	3.6%
	24	1.207	1.232	1.298	1.316	1.265	1.237	1.259	0.042	3.3%
	48	1.252	1.313	1.292	1.271	1.252	1.256	1.273	0.025	2.0%
	72	1.160	1.194	1.201	1.200	1.181	1.214	1.191	0.019	1.6%
	168	1.119	1.182	1.186	1.185	1.131	1.177	1.163	0.030	2.6%
Pourcentage restant de PGE ₁ [%]										
Conditionnement	Temps [h]	Lot n° 1		Lot n° 2		Lot n° 3		Moyenne	Ecart-type	CV
Seringues non-teintées	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	-	-
	24	100.0	100.9	89.8	89.5	98.8	95.4	95.7	5.1	5.3%
	48	97.8	101.4	98.3	94.8	94.1	90.2	96.1	3.9	4.1%
	72	89.7	93.9	91.7	88.5	90.5	91.3	90.9	1.8	2.0%
	168	84.1	86.6	88.7	89.2	84.9	81.3	85.8	3.0	3.5%
Seringues teintées	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	-	-
	24	96.1	94.5	97.5	98.6	103.5	98.4	98.1	3.0	3.1%
	48	99.7	100.7	97.1	95.2	102.4	99.9	99.2	2.6	2.6%
	72	92.3	91.6	90.2	89.9	96.6	96.6	92.9	3.0	3.2%
	168	89.1	90.7	89.1	88.8	92.6	93.7	90.7	2.1	2.3%
Pourcentage indicatif de PGA ₁ [%]										
Conditionnement	Temps [h]	Lot n° 1		Lot n° 2		Lot n° 3		Moyenne	Ecart-type	CV
Seringues non-teintées	0	1.87	1.87	1.78	1.82	1.84	1.83	1.84	0.03	1.9%
	24	1.94	1.96	1.96	1.91	1.90	1.90	1.93	0.03	1.5%
	48	2.23	2.24	1.83	1.80	1.87	1.89	1.98	0.20	10.3%
	72	2.30	2.30	2.00	2.12	2.18	2.09	2.16	0.12	5.6%
	168	3.17	3.18	2.64	2.58	2.88	2.82	2.88	0.26	8.9%
Seringues teintées	0	1.86	1.89	1.75	1.86	1.82	1.79	1.83	0.05	2.8%
	24	2.22	2.09	2.28	2.26	2.16	2.24	2.21	0.07	3.2%
	48	2.50	2.44	2.60	2.52	2.76	2.69	2.59	0.12	4.7%
	72	2.80	2.81	2.74	2.68	3.11	3.10	2.87	0.19	6.5%
	168	3.68	3.57	3.48	3.46	4.72	4.57	3.91	0.58	14.7%

c. Analyse des lots n° 4 à 6 à 15µg/ml

Aire de PGE ₁										
Conditionnement	Temps [h]	Lot n° 4		Lot n° 5		Lot n° 6		Moyenne	Ecart-type	CV
Seringues non-teintées	0	82088625	90221067	94501650	90047783	81218097	90639961	88119530	5276746	6.0%
	24	83405131	86470272	81363407	88682907	83263236	81145040	84054999	2966912	3.5%
	48	80242928	85951158	82577326	89984486	79207246	83673221	83606061	3947324	4.7%
	72	80116403	86503527	79353547	87404210	76734338	79835341	81657894	4283681	5.2%
	168	69592117	77454916	79214389	80574817	76414045	79475318	77120934	3978676	5.2%
Seringues teintées	0	87083135	88984778	87006539	95140779	82332669	88532554	88180076	4147187	4.7%
	24	83022615	90012476	86352421	90597173	83524950	86841441	86725179	3159164	3.6%
	48	81838049	85423593	85576210	91258998	79417481	85034923	84758209	4012465	4.7%
	72	86299938	87461151	85694178	89967514	84577763	83389802	86231724	2305356	2.7%
	168	76512359	80098986	74473774	82171424	80068046	88663251	80331306	4936105	6.1%
Aire de PGA ₁										
Conditionnement	Temps [h]	Lot n° 4		Lot n° 5		Lot n° 6		Moyenne	Ecart-type	CV
Seringues non-teintées	0	1445960	1571162	1656987	1578903	1481403	1622421	1559472	81198	5.2%
	24	1797491	1825145	1532276	1626801	1562222	1563290	1651204	128095	7.8%
	48	1758985	1869651	1862039	2038681	1770545	1754099	1842333	109154	5.9%
	72	2084471	2256623	2022455	2287860	1811338	2030642	2082232	174538	8.4%
	168	2560638	2822439	3120069	3130396	2850529	2858801	2890479	212742	7.4%
Seringues teintées	0	1526088	1544213	1506188	1665158	1449140	1503813	1532433	72444	4.7%
	24	1816888	1946014	1892112	1909532	1676429	1810342	1841886	96889	5.3%
	48	2087010	2184381	2036160	2117265	1901921	2017717	2057409	96731	4.7%
	72	2337571	2468662	2574628	2545286	2271644	2228591	2404397	145572	6.1%
	168	3148704	3346346	3409534	3830631	3143151	3503459	3396971	256196	7.5%
Concentration de PGE ₁ [µg/ml]										
Conditionnement	Temps [h]	Lot n° 4		Lot n° 5		Lot n° 6		Moyenne	Ecart-type	CV
Seringues non-teintées	0	12.266	13.472	13.479	12.851	11.896	13.282	12.874	0.666	5.2%
	24	12.461	12.916	11.625	12.658	12.196	11.885	12.290	0.484	3.9%
	48	11.992	12.839	11.797	12.842	11.600	12.257	12.221	0.527	4.3%
	72	11.974	12.921	11.342	12.478	11.236	11.692	11.940	0.658	5.5%
	168	10.413	11.579	11.322	11.514	11.189	11.639	11.276	0.455	4.0%
Seringues teintées	0	13.007	13.288	12.422	13.569	12.060	12.972	12.886	0.557	4.3%
	24	12.405	13.441	12.329	12.928	12.235	12.723	12.677	0.456	3.6%
	48	12.229	12.761	12.220	13.021	11.631	12.457	12.386	0.484	3.9%
	72	12.890	13.063	12.236	12.839	12.390	12.215	12.606	0.369	2.9%
	168	11.439	11.971	10.653	11.739	11.726	12.991	11.753	0.760	6.5%
Pourcentage restant de PGE ₁ [%]										
Conditionnement	Temps [h]	Lot n° 4		Lot n° 5		Lot n° 6		Moyenne	Ecart-type	CV
Seringues non-teintées	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	-	-
	24	101.6	95.9	86.2	98.5	102.5	89.5	95.7	6.6	6.9%
	48	97.8	95.3	87.5	99.9	97.5	92.3	95.1	4.5	4.7%
	72	97.6	95.9	84.1	97.1	94.5	88.0	92.9	5.5	5.9%
	168	84.9	86.0	84.0	89.6	94.1	87.6	87.7	3.7	4.2%
Seringues teintées	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	-	-
	24	95.4	101.1	99.3	95.3	101.5	98.1	98.4	2.7	2.7%
	48	94.0	96.0	98.4	96.0	96.4	96.0	96.1	1.4	1.4%
	72	99.1	98.3	98.5	94.6	102.7	94.2	97.9	3.2	3.2%
	168	88.0	90.1	85.8	86.5	97.2	100.1	91.3	6.0	6.6%
Pourcentage indicatif de PGA ₁ [%]										
Conditionnement	Temps [h]	Lot n° 4		Lot n° 5		Lot n° 6		Moyenne	Ecart-type	CV
Seringues non-teintées	0	1.76	1.74	1.75	1.75	1.82	1.79	1.77	0.03	1.7%
	24	2.16	2.11	1.88	1.83	1.88	1.93	1.96	0.13	6.8%
	48	2.19	2.18	2.25	2.27	2.24	2.10	2.20	0.06	2.9%
	72	2.60	2.61	2.55	2.62	2.36	2.54	2.55	0.10	3.8%
	168	3.68	3.64	3.94	3.89	3.73	3.60	3.75	0.14	3.7%
Seringues teintées	0	1.75	1.74	1.73	1.75	1.76	1.70	1.74	0.02	1.3%
	24	2.19	2.16	2.19	2.11	2.01	2.08	2.12	0.07	3.4%
	48	2.55	2.56	2.38	2.32	2.39	2.37	2.43	0.10	4.1%
	72	2.71	2.82	3.00	2.83	2.69	2.67	2.79	0.13	4.5%
	168	4.12	4.18	4.58	4.66	3.93	3.95	4.23	0.31	7.4%