

Maîtrise universitaire d'études avancées en pharmacie hospitalière (MAS)
Session 2009 – 2011

Fabrication de médicaments prêts à l'emploi : du choix des agents thérapeutiques à l'étude de leur stabilité

Stéphanie Berthouzoz

Pharmacienne

DIRECTION

Prof André Pannatier

SUPERVISION

Dr Markoulina Berger

Mme Marie-Christine Grouzmann

Pharmacie du CHUV, Lausanne 2012

REMERCIEMENTS

Ce travail n'aurait pas pu aboutir sans le soutien de nombreux collaborateurs de la pharmacie que je souhaite remercier. J'en profite également pour exprimer ma gratitude à tous ceux qui m'ont enseigné le métier de pharmacien hospitalier durant ces trois ans.

Je tiens en premier lieu à remercier le Professeur André Pannatier pour son soutien et ses conseils avisés durant ce travail de diplôme et tout au long des trois ans qu'a duré ma formation MAS.

Ma profonde reconnaissance s'adresse au Dr Markoulina Berger et à Mme Marie-Christine Grouzmann, mes deux superviseurs qui m'ont suivie et épaulée durant tout ce travail. Grâce à leur expérience et à leurs conseils avisés, il a pu se dérouler dans les meilleures conditions.

Un tout grand merci à toute l'équipe du contrôle qualité ainsi qu'à celle de fabrication pour leur aide durant la fabrication ainsi que l'étude de stabilité.

Un paragraphe tout particulier pour tous les gens qui m'ont aidé à « faire connaissance » avec l'électrophorèse capillaire. Tout d'abord, l'équipe du Professeur Jean-Luc Veuthey qui m'a reçue durant trois jours pour me familiariser avec le système. Ensuite, à Rachele Chianese qui a découvert l'électrophorèse capillaire en même temps que moi. Merci également au Dr Sandrine Fleury et au Dr Susanne Nussbaumer du contrôle qualité de la pharmacie des HUG et finalement toute ma gratitude à Isabelle Kholer qui a répondu à mes nombreuses questions et qui m'a énormément aidée et soutenue pour la mise en place de la méthode.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans un petit mot pour tous mes collègues ex-DESS, MAS et ex-MAS qui m'ont soutenue et supportée durant ces trois ans.

Merci également à mes relecteurs ainsi qu'à ma famille et à mon ami Raphaël.

Finalement merci à tous ceux que j'aurais oubliés.

RESUME

La reconstitution et l'administration de médicaments injectables dans les services de soins est un processus à risque. Afin d'en améliorer la sécurité, différentes pharmacies d'hôpital à travers le monde mettent à disposition des unités de soins des solutions prêtes à l'emploi, aussi appelé CIVAS (Centralised Intravenous Additive Service). Celles-ci sont ainsi préparées dans un environnement contrôlé et analysées par le laboratoire de la pharmacie avant leur libération.

L'objectif de ce travail était de déterminer les besoins des services concernant ces solutions et d'étudier la stabilité de trois d'entre elles sur six mois afin d'évaluer la faisabilité de ces solutions sous forme de lots.

Une rencontre avec les infirmiers chefs de services suivie de l'envoi d'un questionnaire à tous les infirmiers chefs d'unité de soins ont mis en évidence une grande demande pour ce type de préparation. Une fois le choix des agents thérapeutiques effectué, il a fallu déterminer la formulation qui allait être retenue. Par la suite, une méthode analytique permettant une bonne séparation du principe actif et de ses produits de dégradation a été validée, afin de suivre la concentration des préparations sur une année. Dans le cadre de ce travail, elle a été étudiée sur six mois, mais les tests seront poursuivis. Finalement, le mode de fabrication des futurs lots a également été évalué.

Les trois solutions retenues ont été l'amiodarone à 12.5 mg/mL dans du glucose 5%, le furosémide à 1mg/mL dans du NaCl 0.9% et finalement le cidofovir à 7.5 mg/mL dans du NaCl 0.9%. Le dosage des principes actifs a été pratiqué par chromatographie liquide pour les deux premiers et sur électrophorèse capillaire pour le cidofovir. Les résultats montrent une stabilité à six mois, que ce soit pour l'amiodarone et le furosémide, aussi bien du point de vue physico-chimique que microbiologique. Cependant, la méthode de fabrication par lot de l'amiodarone proposée dans le cadre de ce travail nécessite encore quelques tests avant de pouvoir débiter la production. La méthode de dosage du cidofovir n'a pas permis de confirmer la stabilité de celui-ci sur six mois, même s'il semble toutefois être stable.

La fabrication du furosémide peut commencer dès à présent avec une date de péremption à six mois. En ce qui concerne l'amiodarone et le cidofovir des tests supplémentaires sont encore en cours.

ABREVIATIONS

ADE	Événement indésirable médicamenteux (adverse drug event)
BPF = GMP	Bonnes pratiques de fabrication
CE	Electrophorèse capillaire
CHUV	Centre hospitalier universitaire vaudois
CIVAS	Centralised Intravenous Additive Service
CMV	Cytomégalovirus
CV	Coefficient de variation
CZE	Electrophorèse capillaire de zone
DMS	Dilution maximale significative
EMA	European Medicines Agency
EOF	Flux électroosmotique
G5	Glucose 5%
GSASA	Association suisse des pharmaciens de l'administration et des hôpitaux
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
HPMPU	Dérivé uracil du cidofovir
ICH	International conference on harmonisation
ICUS	Infirmier chef d'unité de soins
ISTD	Standard interne
LOD	Limite de détection
LOQ	Limite de quantification
ME	Erreur médicamenteuse (medication error)
MeOH	Méthanol
P80	Polysorbate 80
Ph Eur	Pharmacopée européenne
QC	Contrôle qualité
SF	Solution-fille
SFSTP	Société française des sciences et techniques pharmaceutiques
SIA	Soins intensifs
SIPHAROM	Soins intensifs et pharmacies romands
SIRS	Syndrome inflammatoire systémique
SM	Solution-mère
Std	Standard
TEA	Triéthylamine
THIO	Thioglycolate
TSB	Trypcase Soy
USP	United States Pharmacopeia

Table des matières

1	INTRODUCTION	1
1.1	L'erreur médicamenteuse	1
1.1.1	Terminologie	1
1.1.2	Incidence	2
1.1.3	Processus médicamenteux	2
1.1.4	Préparation des injectables	4
1.2	La production de CIVAS	8
1.2.1	Qu'est-ce qu'un CIVAS ?	8
1.2.2	Historique de l'introduction des CIVAS	8
1.2.3	Les CIVAS : avantages et inconvénients	9
1.3	Etude de stabilité	9
1.4	Validation analytique	11
2	OBJECTIFS	13
2.1	Objectif principal	13
2.2	Objectif secondaire	13
3	MATERIEL ET METHODE	14
3.1	Matériel	14
3.1.1	Appareillage	14
3.1.2	Logiciels	15
3.1.3	Standards	15
3.1.4	Produits de dégradation	15
3.1.5	Réactifs	15
3.1.6	Conditionnements	16
3.2	Choix des CIVAS	16
3.2.1	Amiodarone	17
3.2.2	Furosémide	20
3.2.3	Cidofovir	22
3.3	Tests analytiques	24
3.3.1	Chromatographie liquide	24

3.3.2	Electrophorèse capillaire	29
3.3.3	Mesure du pH	32
3.3.4	Mesure de l'osmolalité	32
3.3.5	Comptage des particules invisibles	33
3.3.6	Tests de stérilité	34
3.3.7	Mesures des endotoxines	35
3.4	Choix des formulations	37
3.4.1	Amiodarone	37
3.4.2	Furosémide	40
3.4.3	Cidofovir	40
3.5	Validation analytique	40
3.5.1	Amiodarone	42
3.5.2	Furosémide	48
3.5.3	Cidofovir	52
3.6	Etude de stabilité	58
3.6.1	Amiodarone	59
3.6.2	Furosémide	62
3.6.3	Cidofovir	64
3.7	Faisabilité de la fabrication en routine	66
3.7.1	Amiodarone	66
3.7.2	Furosémide	70
3.7.3	Cidofovir	70
4	RESULTATS ET DISCUSSION	71
4.1	Amiodarone	71
4.1.1	Résultats	71
4.1.2	Discussion	81
4.2	Furosémide	83
4.2.1	Résultats	83
4.2.2	Discussion	92
4.3	Cidofovir	92
4.3.1	Résultats	92
4.3.2	Discussion	98
5	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	100
6	BIBLIOGRAPHIE	102
7	ANNEXES	108

INTRODUCTION

En 1999, l'institut de médecine des Etats-Unis publiait un rapport intitulé « To err is Human : Building a Safer Health System »¹ afin de mettre en évidence les conséquences des erreurs médicales aux USA. Ce rapport, basé sur deux articles principaux^{2,3}, présente des chiffres impressionnants : respectivement 3.7% et 2.9% des patients admis à l'hôpital ont subi un effet indésirable dû à une erreur médicale, ce qui engendre des coûts entre 37.6 et 50 milliards de dollars par année pour les Etats-Unis. De plus, les événements indésirables évitables causent plus de morts que les accidents de la route, le cancer du sein ou le SIDA ; il s'agit de la 3^{ème} cause de mortalité.

1.1 L'ERREUR MEDICAMENTEUSE

1.1.1 Terminologie

Il existe de nombreuses définitions concernant l'erreur médicamenteuse qui rendent difficile la comparaison entre les études publiées. La GSASA (Société Suisse des pharmaciens de l'administration et des hôpitaux) en a édité une série qui seront utilisées pour la suite de ce travail⁴.

Le terme d'événement indésirable correspond à « un préjudice causé par un acte médical (action ou omission), plutôt que par la maladie ou l'état sous-jacent du patient ». L'événement indésirable médicamenteux (adverse drug event = ADE), quand à lui, est défini comme «un dommage ou préjudice, petit ou grand, causé par l'utilisation ou la non-utilisation d'un médicament ». Finalement, le dernier point sur lequel il semble nécessaire d'insister concerne l'erreur médicamenteuse (medication error = ME) : « tout événement évitable qui peut causer ou mener à une utilisation inadéquate d'un médicament ou une lésion du patient pendant que le médicament est sous le contrôle des professionnels de la santé, du patient ou du consommateur. Ces événements peuvent être liés à la pratique professionnelle, aux produits, procédures et systèmes, y compris la prescription,

communication des ordres, étiquetage, emballage, nomenclature, dispensation, distribution, administration, formation, suivi thérapeutique et utilisation ».

1.1.2 Incidence

Les événements indésirables médicamenteux représentent entre 4% et 8% de toutes les hospitalisations, que ce soit aux USA ou en Suisse⁵⁻¹². Ces événements indésirables comprennent aussi bien les effets indésirables (qui sont, par définition, inévitables) que les erreurs médicamenteuses. Selon une étude suisse¹⁰, un incident médicamenteux sur vingt serait le résultat d'une erreur. Ces taux d'ME sont encore plus élevés dans certains services où ils peuvent atteindre 10%¹³, voire 18%¹⁴ dans un service de soins intensifs de pédiatrie. Une étude canadienne¹⁵ a montré que 85% des anesthésistes interrogés avaient fait au moins une ME ou l'avait évitée de justesse durant leur carrière. Finalement, il a été rapporté que 64% des arrêts cardiaques dans un hôpital universitaire sont causés par une erreur ; la mauvaise utilisation des médicaments en est la cause principale¹⁶. Toutes ces erreurs ne sont pas préjudiciables pour le patient, mais celles qui le sont coûtent cher ; elles peuvent occasionner des surcoûts allant jusqu'à des dizaines de millions de francs pour un hôpital universitaire ou un hôpital cantonal⁹.

Les médicaments sont donc une source fréquente d'erreurs médicales. Ceci tient en partie au fait que le processus du médicament est très complexe et donc des erreurs peuvent survenir à chaque étape.

1.1.3 Processus médicamenteux

Le médicament passe par beaucoup de phases qui vont de la prescription par le médecin à l'administration au patient par l'infirmière. Ce circuit inclut la participation de nombreux intervenants qui peuvent détecter des erreurs potentielles, mais aussi en commettre¹⁷⁻²⁰.

Le schéma suivant résume le processus de distribution du médicament comme il a lieu dans la plupart des hôpitaux suisses.

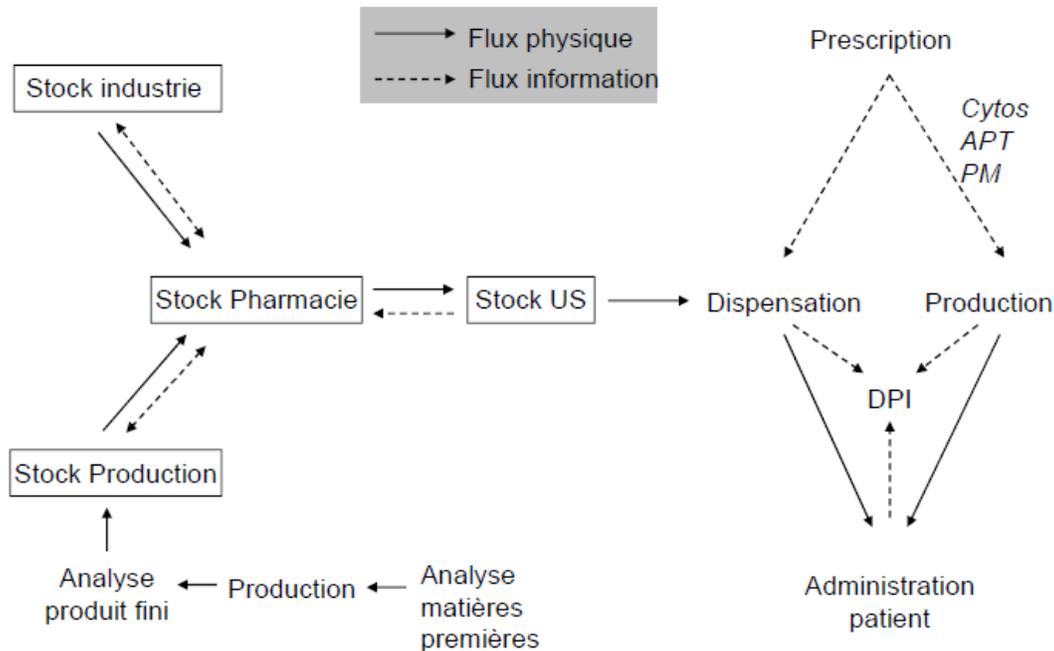


Figure 1 : Circuit du médicament²¹

Chacune des étapes du flux de l'information représentées ci-dessus peut être la cause de nombreuses erreurs. En 2007, une revue de la littérature¹² a présenté les chiffres suivants (tableau 1):

Tableau 1 : Taux d'erreur relevés dans la littérature

Etape	Médiane	Ecart
Prescription	16.5%	13 – 74%
Transcription	11%	2 – 14%
Préparation	13.5%	7 – 23%
Administration	53%	9 – 90.7%

Les écarts très différents entre les études proviennent du fait que les méthodes de détection des erreurs ne sont pas identiques. De plus, ces résultats sont probablement sous-évalués, car toutes les erreurs ou les erreurs potentielles ne sont pas annoncées. Il est pourtant très important de déclarer tous les incidents afin d'améliorer le système. En effet, les recherches effectuées lors de grandes catastrophes, comme par exemple l'accident du Challenger ou de la centrale nucléaire de Three Mile Island, montrent que ces catastrophes sont souvent le résultat d'une chaîne d'événements mis en mouvements par un système défectueux qui induit des erreurs ou les rend difficiles à détecter¹⁷. Une erreur

qui peut sembler banale pourrait mettre en évidence une défaillance du système et mener à une amélioration de celui-ci.

De nombreuses recommandations existent pour diminuer le taux d'erreur. Quelques exemples sont présentés ci-dessous en fonction de chacun des sous-processus :

- Prescription : informatisation de la prescription, utilisation d'une liste de médicaments, prescription complète et non ambiguë
- Transcription : suppression de la retranscription, répétition des ordres oraux pour les valider
- Préparation : préparation des médicaments dans un environnement adéquat, mise à disposition des informations nécessaires, utilisation de concentrations standards ou de formes prêtes à l'emploi
- Administration : utilisation de codes barres, distribution nominale des médicaments par la pharmacie centrale

Pour la suite de ce travail, nous allons plus particulièrement nous intéresser à l'un de ces sous-processus, à savoir la préparation des médicaments et plus particulièrement des médicaments injectables.

1.1.4 Préparation des injectables

De nombreuses études se sont penchées sur les risques liés à l'administration ainsi qu'à la préparation des médicaments injectables. En effet, les nombreuses étapes composant ce processus peuvent être sources d'erreurs. Celles-ci sont cliniquement plus significatives que lorsque le médicament est administré par une autre voie. Les avantages de la voie intraveineuse sont un délai d'action plus court et une meilleure biodisponibilité. Par contre, en cas d'erreur, ces avantages deviennent des inconvénients. D'autres éléments doivent être pris en compte : stérilité, absence de particules, stress du personnel soignant.

La figure 2 illustre le parcours de la prescription à l'administration d'un injectable.

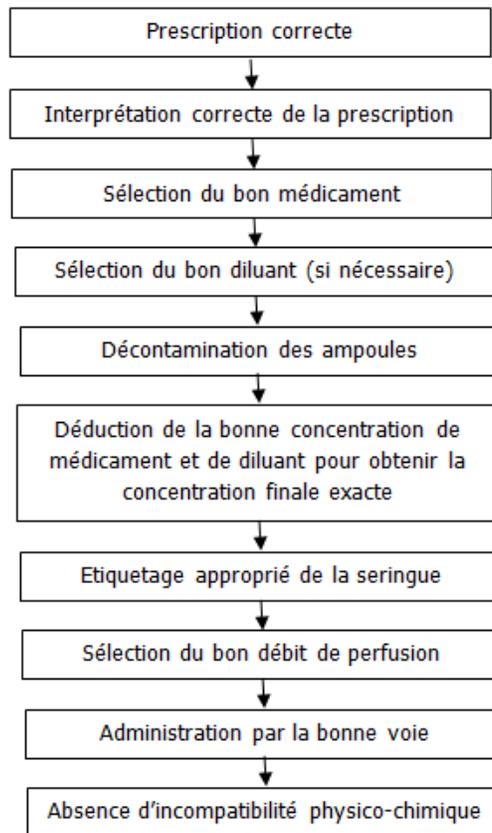


Figure 2 : Processus d'administration d'un médicament injectable²²

Le tableau 2, tiré d'une étude de Tissot et al.²³, présente le taux d'erreurs aux différentes étapes :

Tableau 2 : Taux d'erreur en fonction du type²³

Type d'erreur	Taux
Préparation	4.2%
Dose	7.2%
Technique d'administration	1.6%
Incompatibilité physico-chimique	18.6%
Vitesse d'administration	6.0%
Moment de l'administration	3.7%

De nombreuses études se sont intéressées aux erreurs de concentration des injectables préparés par des professionnels de santé dans les services. Les recommandations de la pharmacopée américaine (USP), qui sont suivies par la plupart des pays européens, autorisent une déviation de $\pm 10\%$ de la concentration cible. Dans son rapport de thèse, Stucki²⁴ a résumé les résultats de certaines de ces études qui se sont déroulés dans différents services.

Tableau 3 : Résumé des études de dosage sur les médicaments²⁴

Etude	Ecart entre la concentration mesurée et celle attendue				
	$\pm 10\%$	$\pm 10 - 20\%$	$\pm 20 - 50\%$	$\pm 50 - 100\%$	$\geq \pm 100\%$
Dosage d'acétylcystéine ²⁵	37%	61%		9%	
Dosage de morphine en néonatalogie et pédiatrie ²⁶	30%	65%			6%
Dosage de morphine en environnement expérimental ²⁷	Pas précisé	35%			8%
Dosage de méthotrexate ²⁸	Pas précisé	23%			
Dosage de 6 médicaments aux soins intensifs ²²	Pas précisé				4%
Moyenne	34%	46%		9%	6%

Les causes de ces inexactitudes peuvent être nombreuses : calculs non écrits et non contrôlés, sélection de la mauvaise concentration par une mauvaise lecture des étiquettes, erreurs de décimales,...

Toutefois, ces chiffres, déjà très impressionnants, ne représentent qu'une partie des erreurs commises. Ces préparations, comme indiqué précédemment, devraient être stériles et exemptes de particules. En ce qui concerne la stérilité, une comparaison entre des seringues préparées dans des soins intensifs et à la pharmacie montre que 22% des seringues produites dans l'unité de soin étaient contaminées alors que seulement 1% de celles préparées à la pharmacie l'étaient²⁹. Pour les particules, une analyse de 510 ampoules en verre ayant déjà servi a mis en évidence dans 3 d'entre elles des particules de verres visibles à l'œil nu, et dans 113 des particules non visibles, ce qui correspond à une moyenne de 0.22 particule par ampoule³⁰. Si elles étaient injectées aux patients, elles pourraient provoquer de sévères dommages locaux sur les endothéliums, une obstruction des petits vaisseaux, particulièrement au niveau pulmonaire, des thromboses voire, dans de rares cas, des SIRS (syndrome inflammatoire systémique)³¹. De plus, l'utilisation d'ampoules comporte aussi des risques pour le personnel soignant (bris de verre p.ex.)

Afin de remédier à ces problèmes, une des solutions est de préparer nominalement et à la pharmacie les injectables de chaque patient, ce qui est fait actuellement, à la pharmacie du CHUV, pour les nutriments parentéraux et les cytotoxiques. Toutefois, cette solution

entraîne un certain délai entre la prescription et l'administration et introduit de nouvelles sources potentielles d'erreurs. Delaloye et Stucki¹ ont analysé ce processus dans le cas de la préparation des cytotoxiques et ont représenté ces erreurs potentielles sous la forme d'un diagramme d'Ishikawa (figure 3).

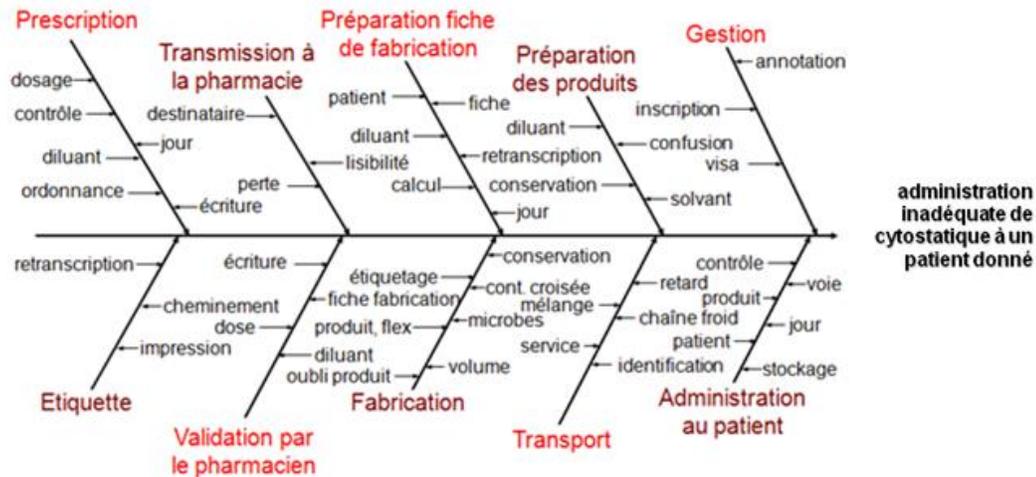


Figure 3 : Diagramme d'Ishikawa de la fabrication des cytostatiques

Afin de diminuer les erreurs liées aux médicaments injectables, la plupart des recommandations^{18,32-36} proposent non seulement de mettre à disposition des solutions prêtes à l'emploi (CIVAS = Centralised Intravenous Additive Service), mais aussi de standardiser les concentrations dans le but de répondre aux grands principes de l'amélioration : simplifier, réduire le recours à la mémoire, standardiser, diminuer la ressemblance, éliminer les étapes manuelles et enfin, utiliser des contrôles réalisables³⁷. En suivant ces recommandations, des diminutions de taux d'erreurs ont pu être constatées. Par exemple, dans une unité de soins intensifs de pédiatrie, l'introduction de concentrations standards des perfusions les plus à risques a permis de diminuer de plus de 50% les erreurs de médicaments dus à une erreur de dose³⁵.

¹ Tiré de la présentation « Analyse de risque AMDEC sur le processus de fabrication des cytostatiques » présentée par Delaloye et Stucki dans le cadre de leur DESS.

1.2 LA PRODUCTION DE CIVAS

1.2.1 Qu'est-ce qu'un CIVAS ?

Au sens large du terme, on dénomme CIVAS toute préparation prête à l'emploi fournie par la pharmacie. Les premiers CIVAS produits ont été les nutriments parentéraux suivis par les cytotoxiques. Ces préparations sont, la plupart du temps, effectuées de manière nominale, c'est-à-dire que la préparation est réalisée pour un patient identifié à une concentration spécifique pour celui-ci. Peu à peu, les pharmacies d'hôpital ont commencé à développer des préparations par lots pour les solutions les plus à risques. De nos jours, le terme CIVAS est généralement utilisé dans son sens restreint, à savoir celui de solutions prêtes à l'emploi produites par lots à la pharmacie. C'est dans ce sens que ce terme va être employé dans la suite de ce travail.

1.2.2 Historique de l'introduction des CIVAS

En 1960 déjà, le terme CIVAS était utilisé aux Etats-Unis où des préparations sous forme prêtes à l'emploi étaient fabriquées par les pharmacies. Toutefois, ce n'est qu'en 1976, suite à la parution du rapport Breckenridge³⁸, que ce service s'est développé et ce, tout particulièrement au Royaume Uni. En effet, à la suite d'une série d'incidents dus à l'utilisation de perfusions, un groupe de travail, dirigé par le Professeur Alisdair Breckenridge, a analysé tous les problèmes liés à l'ajout de médicaments dans les perfusions. Le rapport concluait que « l'addition de médicaments à une perfusion est une procédure pharmaceutique aseptique, qui devrait idéalement se dérouler dans un environnement approprié et sous le contrôle direct d'un pharmacien ». Par la suite, différentes lois, comme par exemple l'obligation de diminuer les risques pour le personnel lors de l'utilisation de cytotoxiques, ont forcé le développement de zones de fabrication dans les pharmacies d'hôpital³⁸⁻⁴¹.

A la pharmacie du CHUV, les préparations centralisées ont débuté dans les années 1985 avec les nutriments parentéraux. De nos jours, ces préparations existent sous forme prêtes à l'emploi dans le commerce. La pharmacie fabrique uniquement des poches pour la pédiatrie nécessitant des dosages spécifiques en fonction du patient ainsi que pour certains patients des soins intensifs adultes. En 1988, la production centralisée des cytotoxiques a débuté pour la pédiatrie. Actuellement, les principes actifs cytotoxiques sont préparés à la pharmacie pour tous les services. Par la suite, diverses préparations se

sont peu à peu développées ; en 2010, 22 types de préparations différentes ont été réalisés sous forme nominale et 19 par lots.

1.2.3 Les CIVAS : avantages et inconvénients

Le principal avantage des CIVAS est que, de par son mode de fabrication «semi-industriel », la pharmacie garantit le bon dosage et la stérilité des CIVAS mis à disposition dans les unités de soins. Elle suit, en effet, les recommandations des bonnes pratiques de fabrication (GMP), ce qui implique la préparation des CIVAS dans des locaux classés et vérifiés, une bonne traçabilité des lots ainsi qu'un contrôle final de la préparation. De plus, la stabilité de ces préparations est garantie par des études préalablement effectuées³⁸.

Les autres avantages peuvent être résumés par les points suivants :

- Mise à disposition rapide des injectables
- Utilisation des concentrations standards
- Etude de compatibilité pour une concentration donnée
- Diminution des coûts (utilisation des reliquats lors de la préparation)
- Diminution du travail infirmier

Toutefois, ces avantages doivent être mis en balance avec les points négatifs suivants :

- Problème de stockage dans les unités de soins (particulièrement si conservation au frigo)
- Risque de rupture de stock
- Augmentation du travail des pharmacies (fabrication des lots)
- Risque de confusion entre les différents CIVAS

La balance bénéfice-risque reste cependant positive, raison pour laquelle la production de CIVAS se développe de plus en plus dans les pharmacies hospitalières.

1.3 ÉTUDE DE STABILITE

Afin de pouvoir produire une fabrication sous forme de lots, il est nécessaire que la stabilité soit suffisante. Plus la stabilité est grande, plus la taille du lot peut être importante. Ceci diminue les coûts du contrôle qualité et donc de la production. Malheureusement, la littérature ne fournit que peu de données et la qualité de certains articles publiés ne permet pas de les utiliser. C'est pour cette raison qu'il est nécessaire, la plupart du temps, de faire une étude de stabilité dans les conditions locales.

Les paramètres à étudier sont de deux types : la stabilité physico-chimique et la stérilité. En effet, il faut démontrer qu'à la date de péremption fixée pour une préparation, celle-ci est toujours stérile et ne s'est pas dégradée. L'european Medicines Agency (EMA) a publié les normes de l'ICH (international conference on harmonisation)⁴² qui décrivent la manière dont les études de stabilité doivent être menées pour les produits pharmaceutiques. La première recommandation stipule que cette étude doit être faite sur au moins trois lots, préparés et conditionnés de la même manière et qui simulent la façon de produire qui sera utilisée pour les lots définitifs. Les conditions de conservation durant l'étude de stabilité sont également définies dans ce document. Pour une étude à long terme (minimum 12 mois) :

- Stockage à température ambiante : $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/65\%$ d'humidité relative $\pm 2\%$
- Stockage au frigo : $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$
- Stockage au congélateur : $- 20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$

Pour une analyse sur 12 mois, il est recommandé d'effectuer au moins 4 déterminations y compris l'analyse initiale et finale.

Le dernier point repris dans les normes ICH concerne les critères d'acceptation. La norme ICH Q6A⁴³ spécifie que si des recommandations pharmacopées spécifiques existent, il est conseillé de les suivre. Dans la pharmacopée européenne⁴⁴, des normes sont définies pour le test de stérilité ainsi que pour le test des particules visibles et invisibles. Pour ce qui est des limites de concentration, la pharmacopée helvétique et l'USP recommandent que les préparations contiennent $\pm 10\%$ de la concentration indiquée sur l'emballage.

Un article de 1983⁴⁵ décrivait les cinq plus grands manques dans les articles sur les études de stabilité :

- Absence de description complète du matériel utilisé, des conditions des tests et des méthodes utilisées
- Absence d'une méthode analytique spécifique pour les études de stabilité
- Absence de détermination au commencement de l'étude
- Utilisation d'un mauvais nombre d'échantillons à tester
- Conclusions qui ne correspondent pas aux résultats

La validation des méthodes analytiques permet de pallier à certains de ces manques.

1.4 VALIDATION ANALYTIQUE

Le but de la validation analytique est de prouver que la méthode analytique est adaptée à son usage futur. Dans le cas des études de stabilité, il s'agit donc de doser le principe actif, une fois celui-ci séparé de ses produits de dégradation.

Une validation analytique comprend plusieurs phases :

- Phase initiale : définir les objectifs et les conditions initiales
- Phase de développement : optimisation des conditions
- Phase de validation : validation de la méthode avec éventuellement une phase de pré-validation
- Phase d'application : utilisation en routine et validation partielle durant la routine (contrôle qualité = QC)

Ces phases forment le cycle de vie d'une méthode analytique :

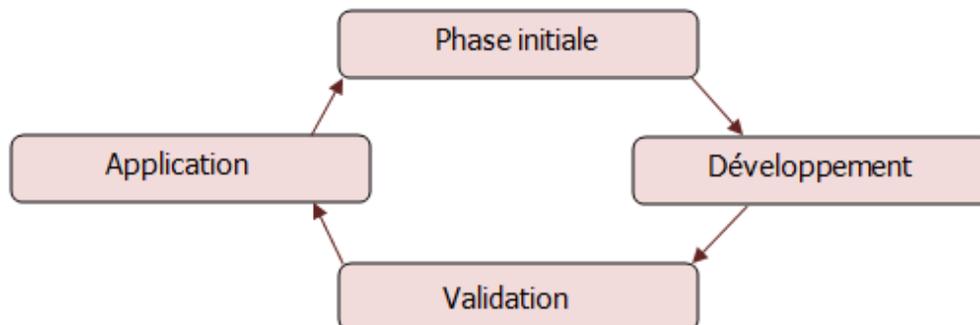


Figure 4 : Cycle de vie d'une méthode analytique²

Dans le cadre de la fabrication de CIVAS, l'objectif de la validation est de déterminer la stabilité d'un principe actif en solution. La phase de développement consiste donc à définir des conditions analytiques qui permettront une bonne séparation du principe actif, des produits de dégradation et des impuretés connues. Pour ce faire, le principe actif est soumis à des conditions de stress qui vont provoquer sa dégradation ; les impuretés, quand à elles, sont généralement disponibles dans le commerce.

² Adapté du travail de maîtrise de Christina Weber « Développement et validation d'une méthode analytique utilisant l'électrophorèse capillaire pour le dosage de principes actifs contenus dans différentes formulations pharmaceutiques ».

Une fois ces paramètres déterminés, la méthode analytique doit être validée. La société française des sciences et techniques pharmaceutiques (SFSTP) a émis des recommandations sur les validations de méthodes qui ont été suivies dans ce travail⁴⁶. Chaque méthode analytique est caractérisée par un biais et une fidélité qui ne sont pas connus d'emblée ; la validation permet d'estimer ces biais le plus exactement possible. Le premier critère évalué est la fonction de réponse de la méthode, établie en analysant des standards de calibration à des concentrations différentes. La fonction entre la concentration et la réponse détermine le type de calibration le plus adéquat. La validité de la méthode est ensuite mesurée avec des standards de validation. Une fois la droite de calibration posée, des standards de concentration connue sont analysés afin de vérifier si la concentration réelle du standard correspond à la concentration calculée à partir de la droite de calibration. La SFSTP recommande de calculer le profil d'exactitude qui n'utilise qu'un seul outil de décision, nommé limites de l'intervalle de tolérance attendues au niveau β , qui comprend la mesure de l'erreur totale. Pour être qualifié comme valide, la méthode doit montrer que la différence entre chaque mesure et la valeur vraie de l'échantillon est en dessous d'une limite d'acceptation (β) fixée par l'analyse ; β correspond au nombre de mesures qui sont dans les limites λ définies en fonction des objectifs de la méthode. La proportion attendue de valeurs qui sont en dehors des limites d'acceptation constitue le risque de la méthode. Avec, par exemple, un risque de 5%, l'analyste garantit que 95 fois sur 100, le résultat sera dans les limites fixées par les agences (5% pour l'analyse pharmaceutique). Comme le vrai biais et la vraie précision ne sont pas connus, le profil d'exactitude par niveau de concentration est obtenu en calculant les intervalles de confiance qui permettent d'évaluer la proportion de mesures attendues dans les limites d'acceptation λ pour chaque niveau de concentration. Le profil est construit à partir des estimations de biais et de précisions établies durant la phase de validation. En fonction du profil obtenu, on peut définir de nouvelles limites de quantification. Ce profil permet d'avoir un seul outil qui montre que la méthode est effectivement adaptée au but⁴⁷⁻⁴⁹.

OBJECTIFS

Ce travail de diplôme a débuté suite à la demande du service des soins intensifs de disposer d'amiodarone à une concentration de 12.5 mg/mL. Plusieurs autres demandes du même type avaient déjà été adressées à la pharmacie.

2.1 OBJECTIFS PRINCIPAUX

Les buts de ce travail étaient, tout d'abord, de recenser toutes ces demandes et de choisir trois préparations pour lesquelles une fabrication sous forme de CIVAS semblait envisageable et intéressante puis d'effectuer une étude de stabilité pour ces trois substances. Dans le cadre du présent travail, cette étude s'est déroulée sur six mois, mais elle sera poursuivie afin d'obtenir des résultats à une année. Après le choix initial des trois principes actifs, des formulations spécifiques pour chacun des principes actifs ont été investiguées. Par la suite, des méthodes analytiques ont été validées afin de pouvoir déterminer la concentration en principe actif durant l'étude de stabilité.

2.2 OBJECTIF SECONDAIRE

L'objectif secondaire a été la création et la mise en place de procédés de fabrication simples afin de pouvoir intégrer ces nouvelles préparations en routine.

MATERIEL ET METHODE

3.1 MATERIEL

3.1.1 Appareillage

HPLC :

- Pompe Varian 9012[®] (Walnut Creek, USA)
- Détecteur DAD Varian ProStar[®] (Walnut Creek, USA)
- Injecteur Varian ProStar 410[®] (Walnut Creek, USA)
- Colonne Chromolith Performance[®] PR-18e (100-4.6 mm), Merck KGaA (Darmstadt, Allemagne)
- Colonne Chromolith Performance[®] PR-8e (100-4.6 mm), Merck KGaA (Darmstadt, Allemagne)
- Précolonne Chromolith RP-18e (10-4.6 mm), Merck KGaA (Darmstadt, Allemagne)
- Précolonne Chromolith RP-8e (10-4.6 mm), Merck KGaA (Darmstadt, Allemagne)

CE :

- CE 7100 d'Agilent Technologie (Waldbronn, Allemagne)
- Capillaire : TSP FS-tubing ID = 50 µm et OD = 375 µm (BGB, Schlossboeckelheim, Allemagne)

Pompe : Repeater[®], Baxa (Berkshire, UK)

Enceinte climatique : Série 4000, RuMED (Laatzen, Allemagne)

Réfrigérateur : MUKS 3600/6 avec TC03, Fors Mediline (Berne, Suisse)

Congélateur : LGUw 1213 avec TCO2, Fors Mediline (Berne, Suisse)

3.1.2 Logiciels

HPLC : Star Chromatography Workstation® version 6.41 (Varian, Walnut Creek, USA)

CE : ChemStation® version B.04.03 (Agilent, Waldbronn, Allemagne)

3.1.3 Standards

- Amiodarone, Saurav Chemicals (Panchkula, Inde) Réf 110240
- Cidofovir, Gilead (Foster City, USA) Réf GS-0504
- Furosémide, Sigma-aldrich (St-Gall, Suisse) Réf 110240

3.1.4 Produits de dégradation

- Amiodarone Impurity D CRS, Concil of Europe Réf 00ARID0
- Amiodarone Impurity E CRS, Concil of Europe Réf 004H52
- Furosémide Impurity A CRS, Concil of Europe Réf 00Q7R1

3.1.5 Réactifs

- Acétonitrile (HPLC), Merck (Darmstadt, Allemagne) Réf. 1.00030
- Eau (HPLC), Merck (Darmstadt, Allemagne) Réf. 1.15333.2500
- Dihydrogenophosphate de potassium, Sigma-aldrich (St-Gall, Suisse) Réf. 1.05108.0050
- Acide orthophosphorique à 85%, Merck (Darmstadt, Allemagne) Réf. 1.00552.0250
- Triéthylamine, Merck (Darmstadt, Allemagne) Réf. 90337
- Methanol, Merck (Darmstadt, Allemagne) Réf. 1.0618.2500
- Polysorbate 80, Hänseler (Herissau, Suisse) Réf. 26.7380.02
- Glucose 5%, BBraun (Sempach, Suisse) Réf. 353 5819
- Glucose monohydrate Ph. Eur., Hänseler (Herissau, Suisse) Réf 06.3936.2
- Eau pour injectable, Bichsel (Interlaken, Suisse) Réf 100.0.006.00
- NaCl 0.9%, BBraun (Sempach, Suisse) Réf 1340410
- Tampon Low Pic A, Waters (Milford, USA) Réf WAT084189
- NaOH 2 N, Merck (Darmstadt, Allemagne) Réf 1.09136.1000
- HCl 2 N, Merck (Darmstadt, Allemagne) Réf 1.09063.1000
- NaCl Ph. Eur., Hänseler (Herissau, Suisse) Réf 13564.322
- Procaine hydrochloride Ph. Eur., Hänseler (Herissau, Suisse) Réf 6.7416.0
- Eau purifiée

3.1.6 Conditionnements

Seringues :

- 50 ml : BD perfusion Syringe (Franklin Lakes, USA) Réf 300136
- 3 ml : BD Syringe (Franklin Lakes, USA) Réf 300910

Fioles :

- 50 ml de type I en verre blanc, sans alcalin, Anwander E. (Oberwil, suisse)
Réf 585.50

3.2 CHOIX DES CIVAS

Comme mentionné précédemment, ce projet a débuté suite à une demande des soins intensifs de pouvoir disposer de fioles prêtes à l'emploi d'amiodarone à 12.5 mg/mL dans du glucose 5%. Une deuxième requête provenant de l'unité de fabrication concernait la préparation de seringues de cidofovir à 7.5 mg/mL dans du NaCl 0.9% ; ces deux souhaits ont été pris en compte dans ce travail. Pour ce qui est du choix du troisième et dernier CIVAS, une présentation du projet a été faite à tous les infirmiers-chefs de service. Celle-ci a été suivie par l'envoi d'un questionnaire à tous les infirmiers-chefs d'unité de soins (ICUS) afin de déterminer leurs besoins (le questionnaire ainsi que les résultats se trouvent en annexe I et II). De cette liste ont été éliminés les CIVAS qui sont déjà fabriqués par la pharmacie des HUG ainsi que ceux pour lesquels il n'y avait pas de dilution nécessaire ou qu'un kit était déjà disponible à la pharmacie. Le choix final a donc été effectué entre l'héparine, la pipéracilline, le rémifentanyl, le furosémide et l'épirubicine.

L'héparine ne peut pas être produite à la pharmacie du CHUV : un contrat d'exclusivité nous lie au fournisseur. Des études de stabilité existent déjà pour l'épirubicine qui peut être conservée 5 mois. La pipéracilline aurait été une bonne candidate, mais sa mise à disposition sous forme prête à l'emploi risquait de favoriser l'utilisation de cet antibiotique à large spectre au détriment d'un autre avec un spectre plus étroit. Le choix s'est donc fait entre le rémifentanyl et le furosémide. Le furosémide à 1 mg/mL dans du NaCl 0.9% a été préféré, car il était demandé par un plus grand nombre de services.

Les concentrations standards de furosémide et d'amiodarone ont été validées dans le groupe de travail SIPHAROM qui réunit un représentant médical infirmier et un pharmacien de chaque service de médecine intensive adulte (SIA) de Suisse romande et du Tessin. Leur but est d'uniformiser les pratiques dans les différents SIA, en particulier

concernant les dilutions des principaux médicaments. Les concentrations d'amiodarone et de furosémide étudiées dans ce travail sont donc celles utilisées par tous les SIA de Suisse romande et du Tessin.

Des fiches d'identité concernant les trois produits choisis se trouvent en annexe III.

3.2.1 Amiodarone

3.2.1.1 Utilisation thérapeutique

L'amiodarone est un antiarythmique de la classe III de Vaughan Williams. Elle est utilisée sous forme injectable dans la réanimation lors d'arrêt cardiaque, de fibrillation ventriculaire, de tachycardie ventriculaire sans pouls ; elle est également administrée en phase aiguë de tachycardie ventriculaire hémodynamiquement stable ou de tachycardies à QRS fins. Finalement, en phase chronique, l'amiodarone injectable sert à traiter les fibrillations auriculaires⁵⁰.

Bien que ce principe actif soit rangé dans la classe III de Vaughan Williams, il possède des caractéristiques électrophysiologiques des trois autres classes : il bloque les canaux sodiques comme dans la classe I, il exerce une action sympatholytique non compétitive (classe II), il prolonge la durée du potentiel d'action, et, par conséquent, la période réfractaire (classe III) et, finalement, il bloque les canaux potassiques du myocarde (classe IV). De par toutes ces actions, l'amiodarone est un antiarythmique très efficace, mais son utilisation en première ligne est limitée par ses effets indésirables. Elle reste, toutefois, réservée pour les arythmies à risque vital.

Les effets indésirables les plus courants et les plus graves sont une hypotension, une augmentation du QT qui peut conduire à des torsades de pointes, des fibrillations ventriculaires, des tachycardies supraventriculaires, une toxicité hépatique, des pneumopathies. De plus, l'amiodarone étant très lipophile, elle se distribue dans les tissus et, lors de traitement à long terme, des dépôts cornéens et une photosensibilité peuvent être observés. Finalement, la molécule est riche en iode et sa structure est fortement similaire aux hormones thyroïdiennes, elle peut donc être la cause de dysthyroïdies. Ces effets indésirables peuvent mettre en danger la vie du patient.

L'amiodarone possède une longue demi-vie (4 à 6 semaines). Cela s'explique par son caractère lipophile, sa grande affinité tissulaire et une forte liaison aux protéines plasmatiques (environ 95%). Elle est rapidement distribuée et il faut attendre 7 à 14 jours pour avoir un effet complet lorsqu'elle est administrée par voie intraveineuse, voire plus si

elle est prise per os. C'est pour cette raison qu'une thérapie débute toujours par une dose de charge. De plus, elle est principalement métabolisée par le foie (cyp 3A4 et 2C8), et agit aussi comme inhibiteur fort de certains cytochromes (3A4, 2C9 et 2D6). Son excrétion rénale est très faible ($< 1\%$)⁵¹⁻⁵⁷.

3.2.1.2 Préparation de la solution aux soins intensifs

L'amiodarone 12.5 mg/mL dans du glucose 5% en perfusion intraveineuse continue n'est utilisée qu'aux soins intensifs en cas de troubles du rythme persistant. Pour sa fabrication, les infirmiers cassent quatre ampoules de Cordarone® à 50 mg/mL chacune contenant 3 mL de solution. Ils prélèvent le tout et y ajoutent 36 mL de glucose 5%. La solution est ensuite administrée au patient à un débit de 2 mL/h, ce qui correspond à une dose de 600 mg/24h.

La figure 5 illustre la façon dont est préparée l'amiodarone.



Figure 5 : Préparation de l'amiodarone par une infirmière des soins intensifs

3.2.1.3 Propriétés physico-chimiques

L'amiodarone (figure 6) est une base avec un pKa de 6.6 et un LogP à 20°C de 7.57. Son poids moléculaire est de 681.8 g/mol. Elle est très peu soluble dans l'eau et c'est pour cette raison que du polysorbate 80 est ajouté dans la formulation commerciale. Toutefois, elle est très soluble dans le méthanol et dans le chloroforme⁵⁸⁻⁶⁰.

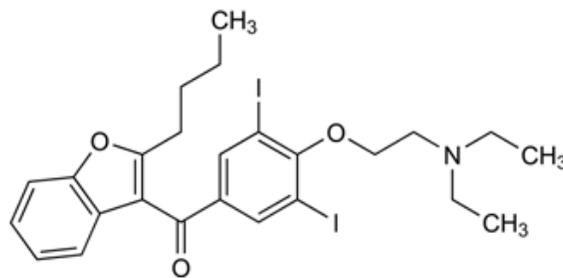


Figure 6 : Formule chimique de l'amiodarone⁵⁸

Son spectre UV est le suivant (figure 7) :

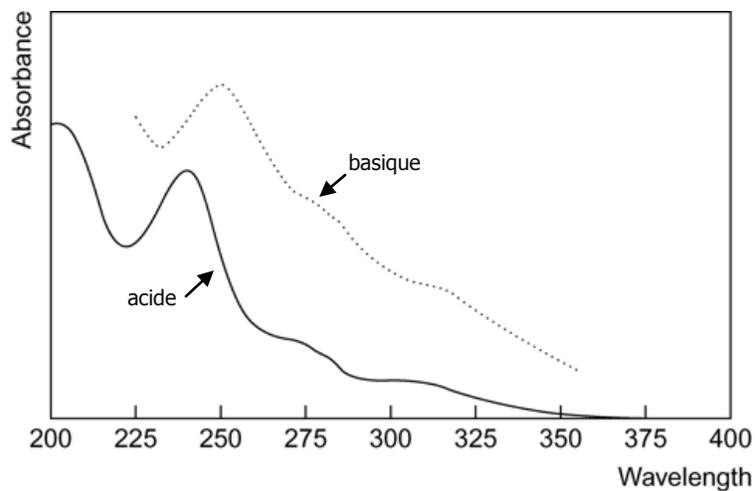


Figure 7 : Spectre UV de l'amiodarone en solution acide (max à 241 nm) et en solution basique (max à 251 nm)⁵⁸

3.2.2 Furosémide

3.2.2.1 Utilisation thérapeutique

Le furosémide est un diurétique de l'anse qui est utilisé par voie intraveineuse dans les œdèmes d'origine cardiaque, hépatique ou pulmonaire ; il est aussi utilisé pour maintenir une diurèse forcée en cas d'intoxication.

Il agit au niveau des tubules du rein et plus particulièrement de l'anse de Henle en bloquant le co-transporteur $\text{Na}^+ - \text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$; le furosémide inhibe ainsi la réabsorption de sodium et donc augmente son excrétion, ce qui s'accompagne d'une augmentation du volume urinaire par effet osmotique. Le blocage de ce transporteur induit parallèlement une diminution de la réabsorption de potassium, de calcium et de magnésium. Pour être actif, le furosémide doit se trouver dans l'urine primitive et il est donc éliminé principalement sous forme inchangée dans l'urine. La figure 8 illustre son mode d'action.

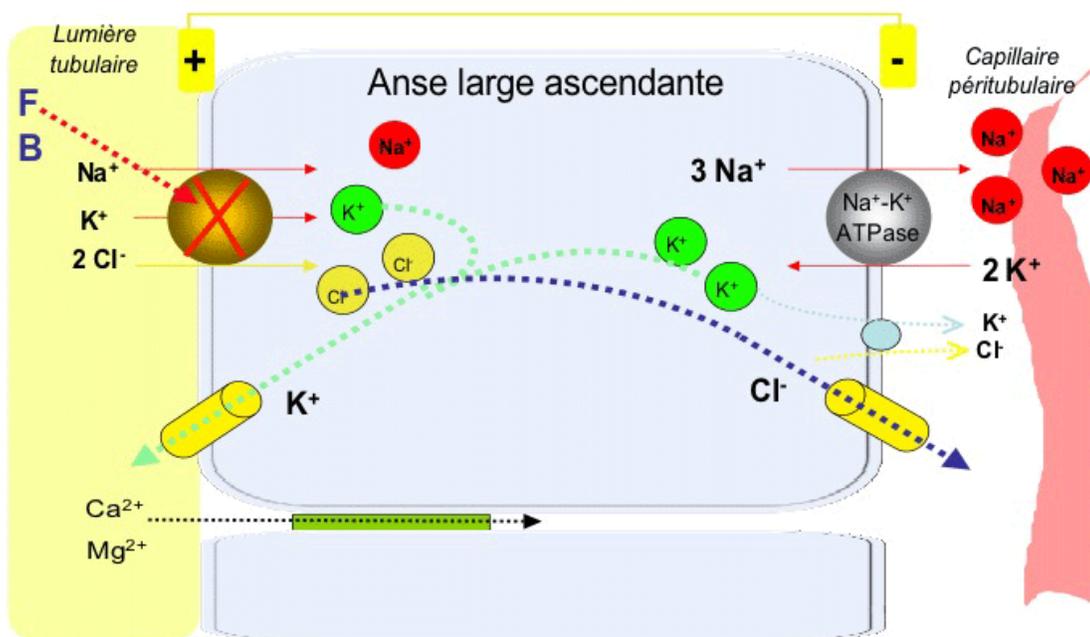


Figure 8 : Mode d'action du furosémide⁶¹

Ce mécanisme d'action permet de déduire certains des principaux effets indésirables du furosémide à savoir : hypovolémie, hyponatrémie, hypokaliémie, hypomagnésémie, hypocalcémie, alcalose métabolique, hyperglycémie, hyperuricémie, hyperlipidémie et ototoxicité (dose-dépendante).

Les diurétiques de l'anse sont les plus puissants et l'utilisation par voie intraveineuse du furosémide permet une action très rapide (délai d'environ 5 min). Sa durée d'action est d'environ 3h. La dose initiale est de 20 à 40 mg en bolus suivie par une perfusion continue de 10 à 40 mg/h⁵⁴. La dose est à titrer en fonction de la diurèse du patient. Pour l'administration en bolus, l'ampoule à 10 mg/mL est administrée sans dilution supplémentaire. La concentration de la perfusion continue est de 1 mg/mL⁵¹⁻⁵⁶.

3.2.2.2 Préparation de la solution dans les services

La demande des services de soins concerne la solution à 1mg/mL pour perfusion continue. Les ampoules du commerce sont à 10 mg/mL et contiennent 2 mL. Pour préparer cette solution, les infirmiers cassent deux ampoules de Lasix[®] et prélèvent le tout. Ils ajoutent ensuite 36 mL de NaCl 0.9%. Le choix du soluté est important, car le furosémide est incompatible avec le glucose 5%. La solution est administrée à un débit de 1 mL/h.

3.2.2.3 Propriétés physico-chimiques

Le furosémide (figure 9) est un acide avec un pKa de 3.9. Son logP est de 2 à 20°C et son poids moléculaire de 330.7 g/mol. Il est particulièrement soluble dans les solutions basiques (pH = 8) et très peu dans les acides. Pour cette raison, le furosémide ne doit pas être mélangé avec des solutions acides, comme les solutions de glucose par exemple⁵⁸⁻⁶⁰.

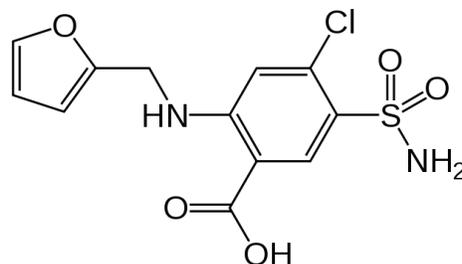


Figure 9 : Formule chimique du furosémide⁵⁸

Son spectre UV est le suivant (figure 10) :

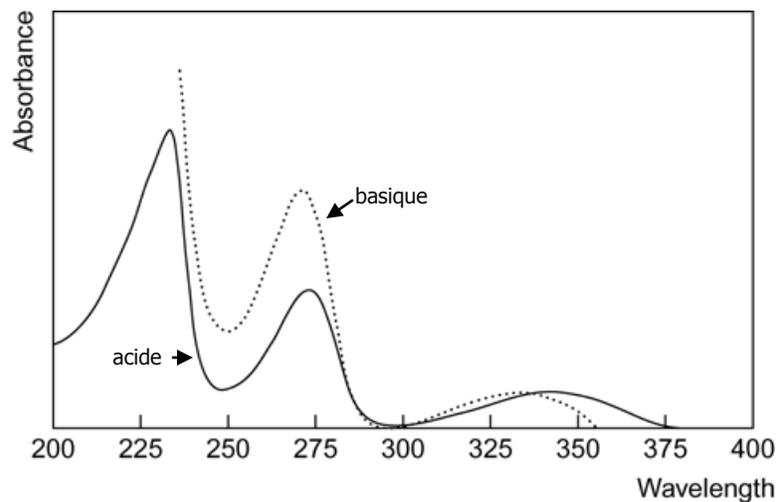


Figure 10 : Spectre UV du furosémide en solution acide (max à 235, 274 et 342 nm) et en solution basique (max à 271 et 33 nm)⁵⁸

3.2.3 Cidofovir

3.2.3.1 Utilisation thérapeutique

Le cidofovir est un antiviral analogue de la cytidine qui inhibe la réplication virale. Il est utilisé sous forme intraveineuse dans le traitement des rétinites à cytomégalovirus (CMV) chez les patients atteints de SIDA et ne souffrant pas d'insuffisance rénale⁵³. Cette indication est reconnue par Swissmedic. La posologie standard est de 5 mg/kg. Toutefois, ce principe actif est également utilisé off label dans le cas de papillomatose laryngée récurrente. Dans cette indication, le cidofovir est un traitement adjuvant à une ablation par laser de la lésion. Étant donné que l'administration systémique de Vistide® demande un suivi de la fonction rénale et peut causer des effets secondaires importants, il est administré directement dans les lésions provoquées par le papillomavirus. De nombreux rapports de cas présentent une diminution, voire un arrêt total des rechutes lors de l'administration intralésionnelle de cidofovir⁶²⁻⁶⁴. Dans ces études, les doses injectées varient entre 5.6 et 143 mg⁶⁵ ; au CHUV, la pharmacie fournit des seringues de 3 mL à une concentration de 7.5 mg/mL : ce qui fait une dose totale de 22.5 mg. Il existe peu de données sur les effets indésirables du cidofovir lorsqu'il est administré intra-lésion ; néanmoins, un rapport du fabricant rapporte que les effets indésirables signalés dans le cas d'une utilisation hors-indication (y compris par voie intraveineuse) sont une toxicité rénale, une toxicité oculaire et une neutropénie⁵¹⁻⁵³.

3.2.3.2 Préparation de la solution à la pharmacie

Dans l'indication de la papillomatose laryngée récurrente, le cidofovir est délivré dans des seringues à 7.5 mg/mL préparées nominalement à la pharmacie. Il est commercialisé sous le nom de Vistide[®] à une concentration de 75 mg/mL et chaque flacon contient 5 mL ; il faut donc diluer 10 fois la solution de base. Pour ce faire, 2 mL de Vistide[®] sont prélevés et dilués ad 20 mL de NaCl 0.9% ; une seringue de 3 mL est ensuite remplie. Le flacon de Vistide[®], une fois ouvert, n'est conservé que 30 jours et il est ensuite détruit. Un flacon coûte environ 1300.-, il s'agit donc d'une perte financière importante. Le but de la fabrication du CIVAS de cidofovir est de préparer à la pharmacie une série de seringue afin de ne pas jeter les restes de flacons. Lorsqu'un service en demande une, elle serait délivrée avec une étiquette au nom du patient. Actuellement, environ trente seringues sont produites par année, ce qui correspond à 2 flacons de 5 mL.

3.2.3.3 Propriétés physico-chimiques

Le cidofovir (figure 11) possède deux pKa :

pKa acide = 2.29

pKa basique = 4.42

Il se présente sous la forme d'une poudre blanche et est soluble dans l'eau à raison de 17 g/L. Son poids moléculaire est de 279.2 g/mol⁵⁸⁻⁶⁰.

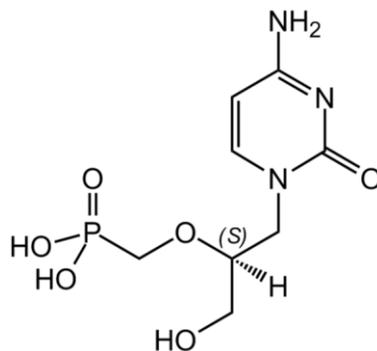


Figure 11 : Formule chimique du cidofovir⁵⁸

Son spectre UV est le suivant (figure 12) :

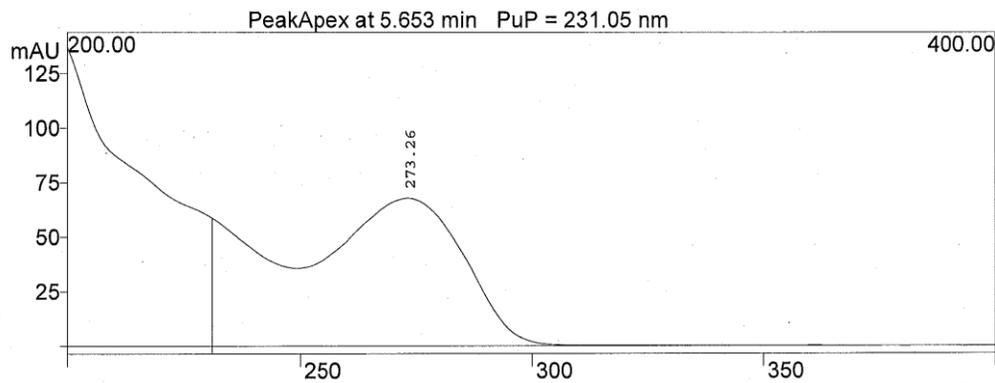


Figure 12 : Spectre UV du cidofovir en solution aqueuse

3.3 TESTS ANALYTIQUES

La stabilité physico-chimique est déterminée par le dosage des principes actifs, mais également par la mesure du pH, de l'osmolalité, le comptage des particules invisibles ainsi qu'une analyse visuelle. En parallèle, la stérilité de la préparation est vérifiée avec un test de stérilité ainsi qu'un dosage des endotoxines.

Dans le cadre de ce travail, le dosage est effectué par chromatographie liquide pour l'amiodarone et le furosémide et par électrophorèse capillaire pour le cidofovir.

3.3.1 Chromatographie liquide

3.3.1.1 Généralités

La chromatographie, du grec chroma qui signifie couleur et graphein écrire, est une méthode qui permet de séparer les composants d'un mélange complexe, de les identifier et de les doser. Il s'agit, actuellement, de la technique la plus employée dans l'industrie pharmaceutique⁶⁶⁻⁶⁸.

Les premiers travaux sont dus à Michael Tswett (figure 13), botaniste russe, qui utilisa une colonne avec du carbonate de calcium finement divisé pour séparer des pigments végétaux. Il déposa des extraits végétaux sur le sommet de la colonne et les élua avec du solvant pur. Il obtint des bandes colorées. C'est un peu plus tard, en 1906, qu'il rédigea la publication (parue dans Ber. Dtsch. Botan., Ges.), dans laquelle il écrivit le paragraphe le

plus souvent cité : « Comme les radiations lumineuses dans le spectre, les différents composants d'un mélange de pigments, obéissant à une loi, se trouvent séparés sur la colonne de carbonate de calcium et peuvent ensuite être déterminés qualitativement et quantitativement, j'appelle une telle préparation un chromatogramme et la méthode correspondante la méthode chromatographique »⁶⁷. Ces travaux tombèrent dans l'oubli et ce n'est qu'en 1941 qu'ils furent remis à jour et complétés par Martin et Synge⁶⁹ qui reçurent le prix Nobel de chimie pour leurs découvertes sur la chromatographie de partage en 1952.



© Bibliothèque de l'université de Tartu

Figure 13 : Michael Tswett (1872 - 1919)

Le principe de la chromatographie de partage est basé sur l'affinité des constituants du mélange pour deux phases immiscibles, à savoir une phase mobile et une phase stationnaire. La phase stationnaire peut être un liquide ou un solide et la phase mobile un gaz, un liquide ou un fluide supercritique. Il est également possible d'utiliser différents supports comme, par exemple, le papier, une surface plane (chromatographie sur couche mince) ou une colonne. Nous allons plus particulièrement nous intéresser à la chromatographie liquide sur colonne.

Il est nécessaire de commencer par poser quelques principes généraux de chromatographie sur colonne. La figure ci-dessous (figure 14) résume de manière simple le principe : on immobilise dans une colonne un solide finement divisé appelé phase stationnaire ; puis on place au sommet de cette colonne un petit volume de l'échantillon à séparer et, pour terminer, on force cet échantillon à traverser la colonne de haut en bas avec de la phase mobile. Si les composés présents migrent à des vitesses différentes, ils pourront être recueillis séparément, chacun en solution dans la phase mobile (chromatographie préparative). Si l'on place un détecteur à la sortie de la colonne, il est possible d'analyser les signaux obtenus et de déterminer la nature du composé (analyse qualitative), ainsi que sa concentration (analyse quantitative). En observant le signal en fonction du temps, on obtient une série de pics que l'on nomme chromatogramme. Chaque pic correspond au passage d'un composé devant le détecteur. Le

chromatogramme ainsi obtenu va permettre de déterminer des facteurs relatifs à l'efficacité de la colonne ainsi qu'au composé lui-même.

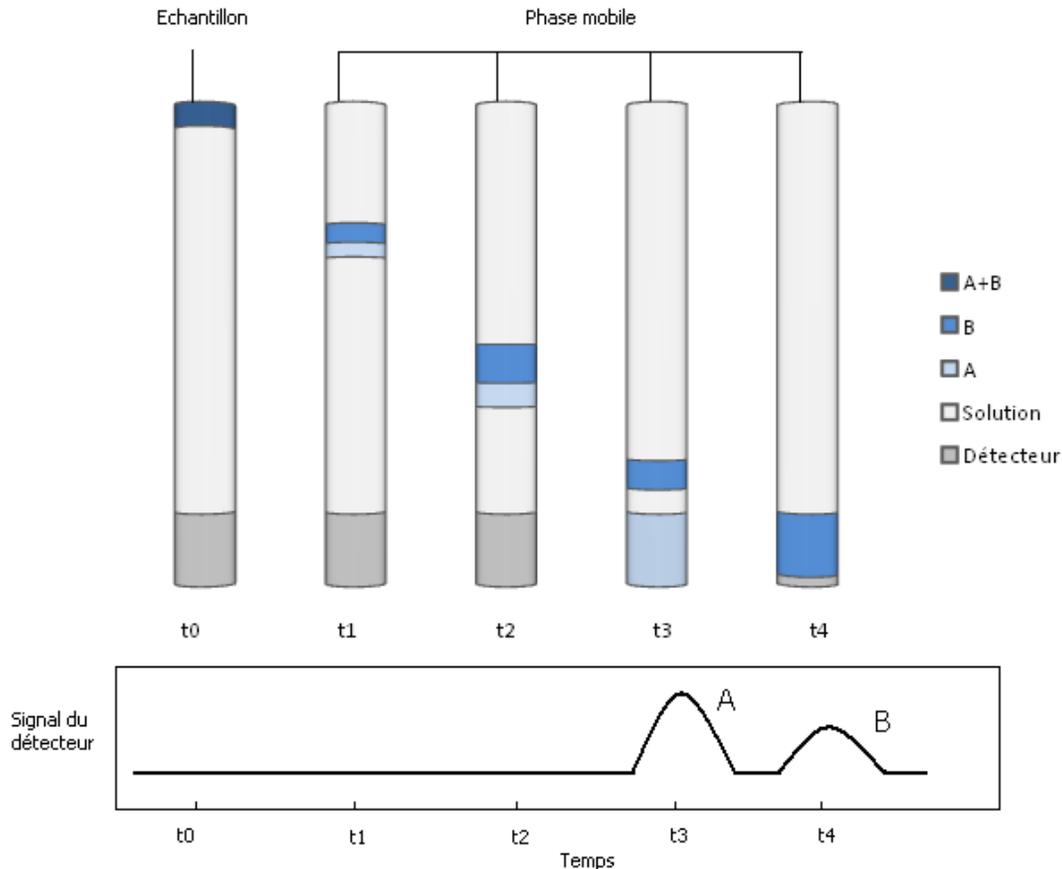


Figure 14 : Représentation du principe de la chromatographie⁶⁷

3.3.1.2 Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

L'HPLC est une méthode de chromatographie liquide sur colonne. Elle a été développée en 1963 lorsque J.C. Giddings utilisa du gel de silice d'une petite taille de particule calibrée en association avec la chromatographie sur colonne. Il put ainsi obtenir une résolution élevée et donc la vitesse analytique désirée.

Les mécanismes qui régissent la répartition du soluté entre la phase mobile et la phase stationnaire peuvent être de divers types (adsorption, partage, échange d'ions, exclusion stérique) mais dans ce travail, seule la chromatographie de partage est utilisée. Elle repose sur des interactions de type polaire. La silice de la phase stationnaire est greffée soit avec des groupements polaires (phase normale), soit avec des groupements apolaires (phase inverse).

3.3.1.3 Instrumentation

Un appareil HPLC classique est composé des éléments suivants (figure 15) :

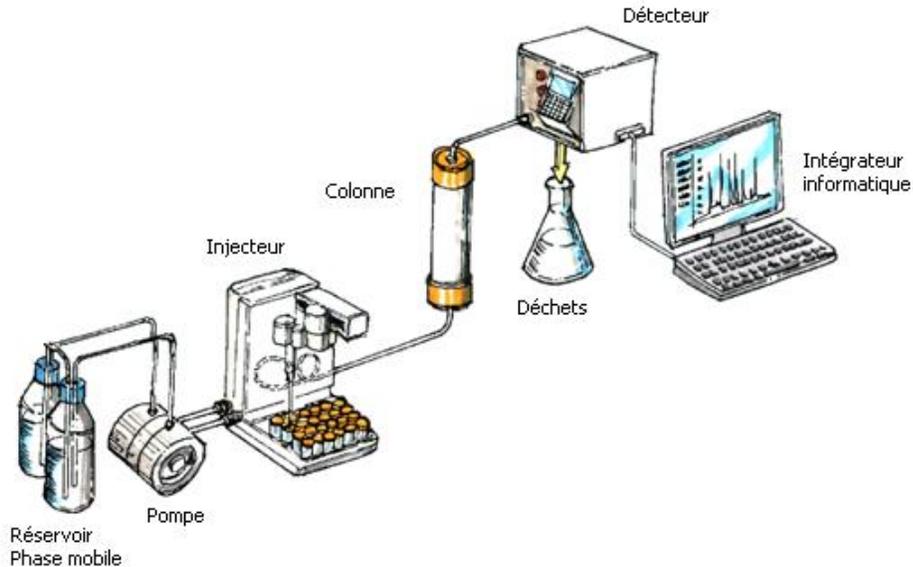


Figure 15 : Schéma d'un appareil HPLC classique

La pompe

La pompe permet d'amener la phase mobile dans la colonne. Pour ce faire, elle doit fournir un débit constant de phase mobile et une haute pression. En effet, la faible granulométrie des supports induit une pression importante (perte de charge) lors du passage de la phase mobile. Les pompes actuelles possèdent pour la plupart une chambre de mélange qui permet de choisir le pourcentage de chaque constituant de la phase mobile et également de le faire varier durant l'analyse si nécessaire.

L'injecteur

L'injecteur permet de déposer une faible quantité d'échantillon (entre 5 et 100 μL) sur le sommet de la colonne dans la phase mobile circulante. Cette opération doit être faite de manière rapide pour ne pas perturber le flux et de manière répétable afin d'obtenir une bonne précision.

La colonne

La colonne est un tube en acier inoxydable qui mesure entre 5 et 25 cm de longueur pour un diamètre entre 1 et 7 mm. Son rôle est de contenir la phase stationnaire. Comme dit

précédemment, la phase stationnaire est en général composée de silice greffée ; dans la plupart des cas une chaîne alkyl composée de huit (C8) ou de dix huit (C18) carbones est greffée par réaction de silanisation. La phase stationnaire devient ainsi apolaire.

Une précolonne est souvent fixée avant la colonne. Elle contient la même phase stationnaire que la colonne et sert à retenir les impuretés.

Détecteur

Le plus utilisé est le détecteur UV/visible. Il en existe toutefois d'autres types comme la spectrofluorométrie, la détection électrochimique, la réfractométrie. Nous allons nous concentrer sur le détecteur UV/visible. Il est basé sur le principe de Lambert-Beer qui permet de calculer directement la concentration à partir de l'absorbance de l'échantillon.

$$A = \epsilon_{\lambda} * l * c \quad \text{[équation 1]}$$

Avec A = absorbance, ϵ_{λ} = coefficient d'extinction, l = longueur traversée par la lumière (ici longueur de la cuve) et c = concentration.

De nos jours, les détecteurs à barrettes de diode (DAD) permettent d'acquérir un spectre complet et de mesurer simultanément l'absorbance à une longueur d'onde donnée.

Dans notre travail, le système utilisé était un HPLC Varian (figure 16).

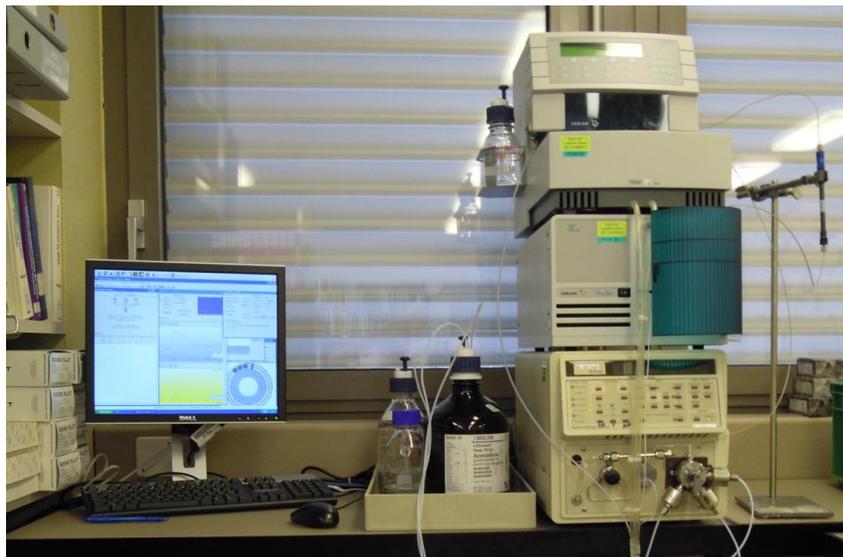


Figure 16 : HPLC Varian utilisé dans ce travail

3.3.2 Electrophorèse capillaire

3.3.2.1 Généralités

L'électrophorèse, à ses débuts, était pratiquée dans une solution d'électrolytes à laquelle on appliquait un courant électrique. Tiselius, en 1930, fut le premier à utiliser cette technique et il put observer que les protéines d'un mélange placées dans un champ électrique migraient à des vitesses différentes en fonction de leur charge et de leur taille. Il reçut le prix Nobel de chimie en 1948 pour cette découverte. Par la suite, afin de diminuer les problèmes de diffusion et de convection, la séparation était effectuée dans un milieu gélifié. Toutefois, les problèmes d'augmentation de chaleur liée au courant électrique n'étaient pas résolus. En 1967, Hjerten fut le premier à décrire l'électrophorèse capillaire de zone (CZE). A cette époque, le diamètre interne était d'environ 1 mm. Il a fallu attendre 1981 pour que Jorgenson (figure 17) décrive l'utilisation d'un tube en silice fondue de diamètre interne très faible (75 μm) afin de diminuer les problèmes liés à l'augmentation de la chaleur⁷⁰.



© Northern Illinois University

Figure 17 : James Jorgenson

Actuellement, l'intérêt porté à cette méthode peut être comparé à celui suscité par l'HPLC durant les années 70⁷¹. En 2003, Wätzig⁷² écrivait qu'une nouvelle revue sur ce sujet était publiée presque chaque jour. De nombreuses variantes de la CZE se sont développées, comme par exemple la chromatographie électrocinétique micellaire qui permet de séparer des composés neutres, la CE en milieu non-aqueux qui permet de modifier la sélectivité à l'aide de solvants organiques, ou l'électrochromatographie capillaire, une forme qui allie les propriétés de la CZE et de la chromatographie liquide^{67,68,71,73,74}. Toutefois, ce travail va plus particulièrement s'intéresser à la CZE.

3.3.2.2 Instrumentation

La figure 18 montre que la CE est composée d'un appareillage très simple. Il s'agit d'un capillaire qui trempe dans deux récipients de solution tampon.

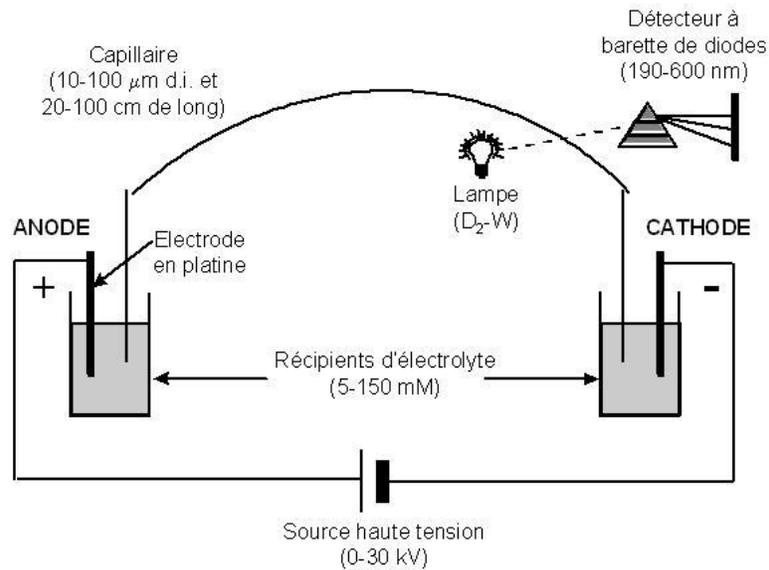


Figure 18 :Représentation du fonctionnement d'une CE⁷¹

Capillaire

Le capillaire est généralement composé de silice. Sa longueur varie entre 30 et 100 cm et son diamètre interne est de 50 ou de 75 μm . Il est recouvert d'une gaine de polyimide qui lui offre une grande souplesse et une bonne conductibilité thermique. Cette gaine ne permet toutefois pas une bonne détection et il est nécessaire de la brûler au niveau de détecteur.

A chaque extrémité du capillaire se trouvent deux vials de tampons dans lesquels trempent les électrodes en platine qui permettent l'application de la tension, ce qui va entraîner la migration des ions dans le champ électrique formé.

Alimentation électrique

L'efficacité dépend directement du voltage appliqué ; il est donc nécessaire d'avoir une alimentation électrique capable d'appliquer un voltage jusqu'à 30 kV.

Système d'injection

Il existe différents systèmes d'injection qui permettent d'injecter une faible quantité d'échantillon de manière répétable. En effet, dans le but d'éviter l'élargissement des pics, le volume d'injection ne doit pas dépasser 2% du volume total du capillaire (de l'ordre du nL). Le premier système d'injection, l'injection électrocinétique, consiste à appliquer une tension pour une courte période de temps. Ce mode d'injection est discriminant, car les composés seront injectés en fonction de leur différence de charge. Le deuxième, l'injection hydrodynamique, peut être réalisée de trois manières différentes : par gravité, en appliquant durant une certaine période une pression ou un vide. Dans ce travail, l'injection hydrodynamique avec application de pression est utilisée.

Détecteur

Comme en HPLC, le détecteur le plus utilisé est l'UV/DAD. La fenêtre de détection, dans le cas de la CE, est le capillaire lui-même. Etant donné le faible diamètre du capillaire, la sensibilité du système CE-UV est limitée.

La figure 19 présente le système d'Agilent Technologies utilisé dans ce travail.

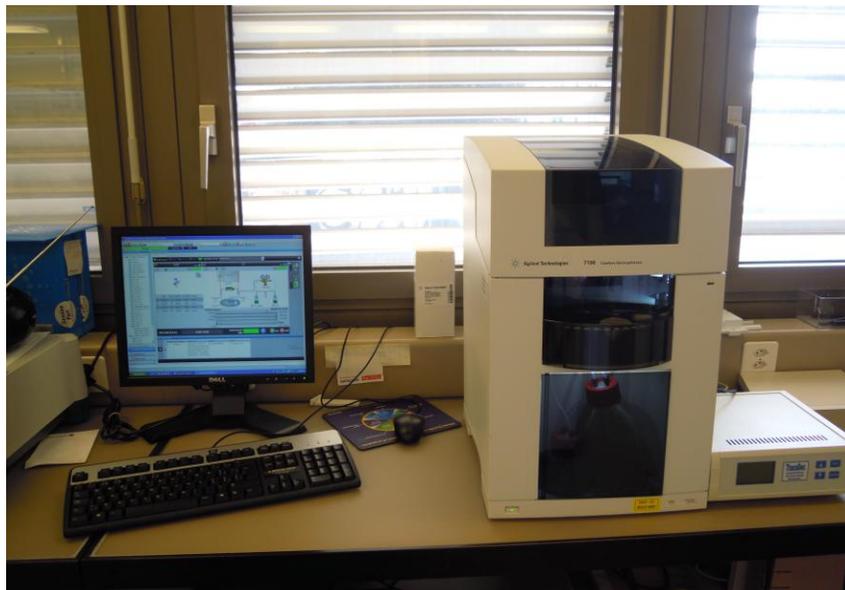


Figure 19 : Système d'Agilent Technologies utilisé dans ce travail

3.3.3 Mesure du pH

La détermination du pH se fait par mesure de la différence de potentiel entre deux électrodes plongeant dans la solution à examiner. Pour pouvoir obtenir une mesure exacte, il est nécessaire de calibrer régulièrement le pH mètre à l'aide de solutions tampon (Metrohm, Herisau, Suisse). Une fois revenues à température ambiante, les préparations sont alors analysées, car le pH est dépendant de la température. Dans ce travail, le pH mètre (figure 20) utilisé est un Sevenmulti (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland). Le résultat est donné avec une précision de ± 0.002 unités de pH⁴⁴.



Figure 20 : pH-mètre Sevenmulti utilisé dans ce travail

3.3.4 Mesure de l'osmolalité

Cette mesure permet de calculer le nombre de moles effectives en solution et donc la contribution des différents solutés à la pression osmotique de la solution. L'osmomètre (figure 21), un Modèle 3D3 de chez Advanced Instrument (Norwood, USA), mesure l'abaissement du point de congélation. En effet, à partir de ce résultat, il est possible de connaître l'osmolalité par la relation suivante :

$$\varepsilon_m = \frac{\Delta T}{1.86} \times 1000 \text{ mosmol/kg} \quad [\text{équation 2}]$$

Avec ε_m = osmolalité et ΔT = différence de température

Avant chaque mesure, un témoin à 290 mosm/kg (Advanced Instrument) est testé afin de vérifier que l'osmomètre fonctionne correctement. Les préparations doivent être à température ambiante. Le résultat est donné avec une précision de ± 2 mosm/kg⁴⁴.



Figure 21 : Osmomètre Advanced Instrument utilisé dans ce travail

3.3.5 Comptage des particules invisibles

Le comptage des particules invisibles se fait par blocage de la lumière avec un appareil (figure 22) Royco 9703 de Skan (Bâle, Suisse). Le principe est basé sur l'interception d'un rayon lumineux qui permet de détecter la taille des particules et le nombre de celles-ci.

Avant l'analyse, les circuits et la seringue de l'appareil sont remplis avec de l'éthanol 70%. Il faut préalablement rincer ceux-ci avec de l'eau exempte de particules. Un blanc, qui contient de l'eau exempte de particules, est testé 5 fois avant l'analyse des préparations.

Le nombre de particules de taille supérieure ou égale à 10 μm ou 25 μm est mesuré sur quatre fois 5 mL, il faut donc un volume minimal de 25 mL. Dans le cas de préparations de moins de 25 mL, la pharmacopée européenne recommande de réunir le contenu de 10 unités ou plus dans un récipient afin d'obtenir un volume d'au minimum 25 mL. Les

préparations d'un volume supérieur ou égal à 25 mL peuvent être examinées individuellement.

Les préparations dont le volume est inférieur à 100 mL satisfont à l'essai si le nombre moyen de particules dans l'unité examinée est de :

< 6000 particules/contenant pour les particules $\geq 10 \mu\text{m}$

< 600 particules/contenant pour les particules $\geq 25 \mu\text{m}$ ⁴⁴



Figure 22 : Compteur de particules Royco® utilisé dans ce travail

3.3.6 Tests de stérilité

Le test de stérilité s'effectue sous flux laminaire vertical. L'opérateur s'habille avec une blouse stérile, une charlotte, un masque et des gants stériles. L'échantillon est transféré dans les unités de filtration (Sartorius, Goettingen, Allemagne) où il est filtré sur une membrane avec une porosité inférieure à $0.45 \mu\text{m}$ afin que les microorganismes soient retenus. L'unité de filtration est ensuite remplie avec du milieu de culture. Chaque

échantillon est testé à double : une fois dans un bouillon de thioglycolate (THIO) et une fois dans un bouillon de trypticase soy (TSB). Le premier permet la détection des bactéries anaérobies ainsi que des aérobies, le second convient pour la recherche des levures, des moisissures et des bactéries aérobies. Les unités de filtration sont ensuite mises à incuber à 30 – 35°C pour le THIO et à 20 – 25°C pour le TSB.

Pour pouvoir affirmer que le lot satisfait à l'essai de stérilité, la Ph. Eur. recommande de tester la moitié de chaque récipient pour chaque milieu, mais pas moins de 1 mL ainsi que, dans le cas de lot de moins de 100 unités, de tester au minimum 4 unités. Les milieux de culture doivent être incubés au minimum 14 jours et être examinés plusieurs fois durant l'incubation, ainsi qu'à la fin des 14 jours. Si aucun trouble n'apparaît, le résultat est conforme (figures 23 et 24). Il est pourtant nécessaire de préciser qu'un résultat favorable signifie uniquement qu'aucun microorganisme contaminant n'a pu être décelé dans l'échantillon examiné, dans les conditions de l'essai⁴⁴.

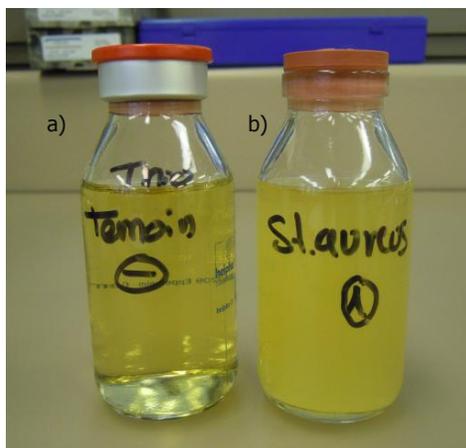


Figure 23 : Résultat d'un test de stérilité dans du TSB : a) témoin négatif → le milieu de culture est limpide, b) milieu de culture contaminé par staphylococcus aureus → le milieu est trouble

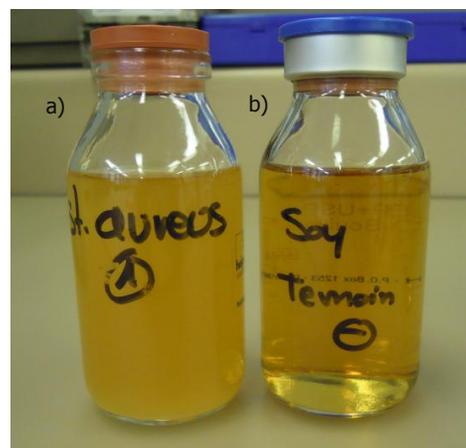


Figure 24 : Résultat d'un test de stérilité dans du THIO : a) milieu de contaminé par staphylococcus aureus → le milieu est trouble b) témoin négatif → le milieu de culture est limpide

3.3.7 Mesures des endotoxines

Les endotoxines proviennent de la paroi des bactéries gram négatives lorsque celles-ci sont lysées. Elles sont pyrogènes, c'est-à-dire qu'elles provoquent la fièvre, et peuvent conduire à un choc septique, voire au décès du patient.

La méthode de quantification utilisée dans ce travail est une méthode dite cinétique chromogénique. La détection et la quantification des endotoxines se fait au moyen d'un

lysats d'amœbocytes de limule. Il est extrait des cellules sanguines d'un crabe qui coagulent en présence d'endotoxines. Les facteurs LAL des extraits sont activés en une cascade protéolytique qui libère un substrat peptidique qui se colore en jaune. Ce substrat peptidique est ajouté artificiellement.

La mesure est réalisée à l'aide d'un lecteur de microplaque (figure 25) Anthos htIII (Labequip, Ontario, Canada). Celui-ci mesure la vitesse de développement de la coloration jaune qui est fonction de la quantité d'endotoxines présentes.

Un test préliminaire est effectué dans le but de déterminer si l'échantillon à analyser interfère avec la réaction. Des concentrations standards d'endotoxines (Lonza, Bâle, Suisse) sont déposées dans les micropuits de la plaque afin d'établir une courbe de calibration, puis une concentration connue d'endotoxines est ajoutée à la solution à tester. La plaque est ensuite mise à incuber durant 10 min à 37°C. Le substrat est ajouté dans tous les micropuits et la réaction peut ainsi débiter. Le taux de recouvrement est mesuré. Si celui-ci est inférieur à la concentration attendue, la solution à examiner possède une activité inhibitrice, si au contraire celui-ci est supérieur à la concentration attendue, la solution à examiner possède une activité activatrice. Il est à noter que les interférences sont en majorité inhibitrices. Afin d'éliminer ces interférences avec le test LAL, il est recommandé de diluer l'échantillon à tester dans de l'eau de qualité « LAL », sans toutefois dépasser la limite maximale de dilution (DMS). Si la dilution avec l'eau « LAL » ne s'avère pas suffisante, les fabricants des réactifs LAL proposent d'autres produits que de l'eau apyrogène pouvant être utilisés comme diluants. Pour notre échantillon, nous avons utilisé le Pyrospere™ (Lonza). La limite maximale de dilution (DMS) se calcule de la manière suivante :

$$DMS = \frac{\text{Limite en endotoxines} * \text{concentration de la solution à examiner}}{\lambda} \quad [\text{équation 3}]$$

Avec λ = point le plus bas utilisé pour la courbe d'étalonnage.

La limite en endotoxines est définie dans les monographies pharmacopées.

Si la substance à analyser ne se trouve dans aucune pharmacopée, il est possible de calculer la limite en endotoxines par la relation suivante :

$$\text{Limite en endotoxines} = K/M \quad [\text{équation 4}]$$

Avec K = dose seuil d'endotoxines ayant un effet pyrogène, par kilogramme de masse corporelle et par heure et M = dose maximale recommandée pour le produit, par kilogramme de masse corporelle et par heure.

La Ph. Eur.⁴⁴ propose des valeurs de K en fonction des voies d'administration (tableau 4) :

Tableau 4 : Critère d'acceptation de la teneur en endotoxines en fonction de la voie d'administration

Voie d'administration	K (UI d'endotoxines par kg de masse corporelle et par heure)
Intraveineuse	5.0
Intraveineuse, produit radiopharmaceutiques	2.5
Intrarachidienne	0.2

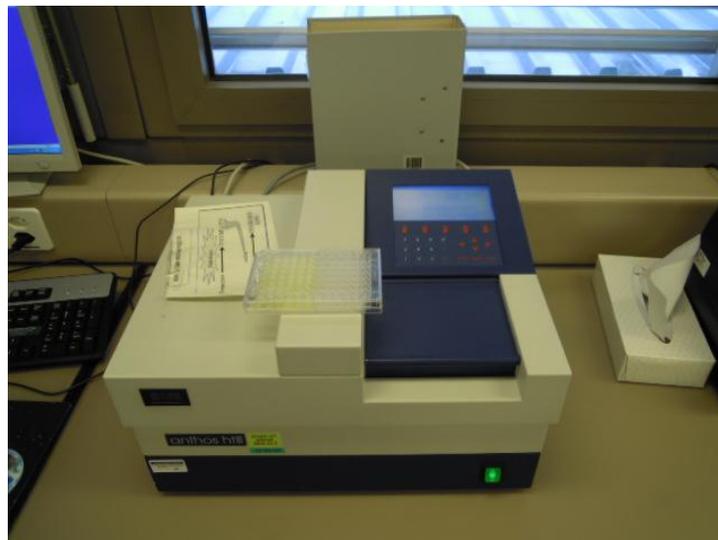


Figure 25 : Lecteur de microplaques Anthos® utilisé dans ce travail

3.4 CHOIX DES FORMULATIONS

En premier lieu, il s'agissait de définir la formulation à retenir pour l'étude de stabilité. Si plusieurs choix étaient possibles, une étude préliminaire a été effectuée sur un mois.

3.4.1 Amiodarone

Une recherche de littérature a permis de mettre en évidence les différents modes de fabrication de l'amiodarone HCl. Celle-ci étant très peu soluble dans l'eau, il est nécessaire d'utiliser des excipients qui permettent sa dissolution. Cependant, selon le fabricant⁷⁵, au dessus de 50°C, on peut dissoudre jusqu'à 1 g dans 5 mL et il se produit un gel. Avec une concentration d'environ 10%, on obtient une solution légèrement visqueuse. Lorsqu'on prépare à chaud une solution aqueuse concentrée, la solution reste limpide au refroidissement. Mais si on dilue à température ambiante une solution à 10% préparée à

chaud, il y a précipitation lorsque la concentration devient inférieure à 0.2%. L'industrie utilise du polysorbate 80 pour dissoudre l'amiodarone. Deux articles de 2002 et 2005^{76,77} présentent une nouvelle formulation dans laquelle l'amiodarone est dissoute dans un tampon acétate à pH 3.8. Ce nouveau produit, appelé Amino-Aqueous, n'existe pas sur le marché. Finalement, dans un dernier article⁷⁸, des cyclodextrines sont utilisés.

Pour ce travail, il a été décidé de tester la formulation commerciale ainsi que la dissolution au dessus de 50°C.

L'amiodarone étant sensible à l'oxygène, il est nécessaire d'éliminer l'oxygène de la préparation par un barbotage à l'azote. Le problème est que si l'on fait barboter de l'azote une fois que le polysorbate a été ajouté, la solution va mousser. Il faut donc faire bouillir l'eau (pour éliminer l'oxygène présent) tout en faisant barboter l'azote avant d'y ajouter les principes actifs et les excipients.

L'amiodarone étant sensible à la chaleur, elle ne pourrait donc théoriquement pas être stérilisée en fin de remplissage. Un test a été effectué afin de vérifier si l'autoclavage était tout de même possible.

Finalement, toujours selon le fabricant, il est nécessaire de chauffer la solution à la fin de la préparation car, dans le cas contraire, l'amiodarone risque de précipiter lorsque la température descend en dessous de 20°C. Le fabricant du médicament original stabilise la Cordarone® durant 1h à 70°C, alors qu'un fabricant de générique ne chauffe qu'à 60°C durant 15 min.

Sur la base de toutes ces informations, une étude préliminaire sur un mois a été effectuée afin de tester différentes formulations et d'en choisir une, voire deux, pour l'étude de stabilité à long terme.

3.4.1.1 Etude préliminaire

Les paramètres étudiés dans cette étude préliminaire étaient :

- la présence ou non de polysorbate 80 pour la dissolution
- la durée de barbotage à l'azote (30 ou 60 min)
- la stabilisation (1h à 70°C, 15 min à 70°C ou absence de stabilisation)
- le conditionnement en seringue ou en fiole

24 modes de préparation d'une solution d'amiodarone à 12.5 mg/mL dans du G5 ont ainsi été testés. Le tableau 5 résume les différentes formulations testées :

Tableau 5 : Formulation testées durant l'étude préliminaire

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
Fiole	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Seringue	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
P80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Azote 30 min	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Azote 60 min	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Stabilisation												
1h à 70°C	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
15 min à 60°C	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
	F13	F14	F15	F16	F17	F18	F19	F20	F21	F22	F23	F24
Fiole	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Seringue	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
P80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Azote 30 min	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Azote 60 min	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Stabilisation												
1h à 70°C	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
15 min à 60°C	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+

Un graphique présentant la façon de fabriquer ces lots est présenté à l'annexe V. Pour chaque formulation (de F1 à F24), trois seringues et deux fioles ont été préparées. La troisième seringue a servi à mesurer la concentration d'amiodarone juste après la fabrication (J0). En effet, comme les fioles et les seringues ont été remplies avec la même solution-mère, le dosage d'une seringue est suffisant pour servir de point de comparaison.

Durant la fabrication, il n'a pas été possible de dissoudre l'amiodarone sans polysorbate bien que la solution ait été chauffée à plus de 60°C. Les formulations F13 à F24 n'ont donc pas pu être réalisées.

Une fiole et une seringue de chaque formulation (F1 à F12) ont été conservées durant un mois dans une enceinte climatique à 30°C et 65% d'humidité ; les autres ont été conservées au frigo à 5°C.

Une mesure de la concentration par HPLC a été effectuée après 30 jours.

3.4.2 Furosémide

Le furosémide n'étant pas soluble en solution acide, la littérature propose de le dissoudre dans une solution basique, puis d'ajuster le pH entre 8.0 et 9.3⁷⁹. L'industrie procède également ainsi pour le Lasix[®] 10 mg/mL. Pour cette étude de stabilité, le furosémide a été dissous dans une solution aqueuse basique, puis dilué dans du NaCl 0.9%.

Etant donné que le furosémide peut être stérilisé par la chaleur, il a été décidé de le conditionner en fioles, car les seringues utilisées à la pharmacie du CHUV ne supportent pas une chaleur de plus de 60°C.

3.4.3 Cidofovir

La poudre de cidofovir a été mise à disposition par le fabricant pour la validation de la méthode analytique. Comme il n'est pas possible de s'en procurer pour la fabrication en routine, les seringues de cidofovir à 7.5 mg/mL ont donc été produites avec du Vistide[®] pour l'étude de stabilité.

3.5 VALIDATION ANALYTIQUE

Durant la phase de développement de la méthode analytique, certains paramètres sont calculés afin de déterminer si les conditions opératoires sont appropriées. Le premier est le facteur d'asymétrie du pic qui est obtenu à l'aide de l'équation suivante :

$$As = \frac{\omega_{0.05}}{2d} \quad \text{[équation 5]}$$

Avec $\omega_{0.05}$ = largeur du pic au vingtième de sa hauteur (5%) et d = distance entre la perpendiculaire abaissée du maximum et le bord d'entrée du pic au vingtième de sa hauteur. Le résultat doit se trouver entre 0.8 et 2.

Le second est le facteur de rétention qui correspond au rapport des masses de soluté contenues dans la phase stationnaire et la phase mobile. Si le facteur de rétention est trop faible, cela signifie que le composé sortira en même temps que les composés non retenus et s'il est trop élevé, l'analyse sera beaucoup trop longue. C'est la raison pour laquelle des k entre 1 et 10 sont préférés.

Il se calcule par l'équation suivante :

$$k = \frac{m_s}{m_M} = \frac{tr - t_0}{t_0} \quad [\text{équation 6}]$$

avec m_s et m_M = masse de composé dans la phase solide et dans la phase mobile, tr = temps de rétention du composé et t_0 = temps de rétention des composés non retenus.

Une fois les conditions opératoires définies, la validation peut débuter. Comme présenté dans l'introduction, elle se base sur les principes émis par la SFSTP⁴⁷. La première étape est de déterminer quel protocole de validation va être suivi. L'annexe V présente les différents protocoles proposés. Celui-ci dépend principalement du nombre de niveaux de concentration qui seront utilisés en routine pour la calibration, ainsi que de la présence ou non d'un effet matrice. En effet, une fois validée, la méthode servira à mesurer les concentrations de principes actifs dans des formulations pharmaceutiques. Il est donc nécessaire que les standards de validation soient préparés de la manière la plus ressemblante possible à la spécialité pharmaceutique qui sera analysée en routine, car les excipients de celle-ci peuvent interférer avec la méthode analytique et, dans ce cas, les standards de calibration devront, eux aussi, être préparés de la même manière que la forme finale. Afin de déterminer si un effet matrice est présent ou non, une étape de prévalidation peut être effectuée. Le protocole de validation ainsi choisi définit le nombre nécessaire de standards de validation et de standards de calibration pour la validation de la méthode.

La validation a été répétée sur trois séries. De nouveaux standards de calibration et de validation ainsi qu'une nouvelle phase mobile ont été préparés pour chaque série et, entre chacune d'elles, l'HPLC ou la CE ainsi que l'ordinateur étaient éteints, puis rallumés au minimum 30 minutes plus tard afin d'obtenir des séries indépendantes.

Les résultats ainsi obtenus ont été analysés avec la version 3 du logiciel Enoval (Arlenda[®], Liège, Belgique) qui permet de calculer le profil d'exactitude. Celui-ci contient, sous la forme d'un graphique, tous les éléments nécessaires à la validation : le biais, la précision, le risque et les limites de quantification⁴⁹.

3.5.1 Amiodarone

3.5.1.1 Développement de la méthode HPLC

Une recherche de la littérature a montré qu'il existait différentes méthodes analytiques validées pour le dosage de l'amiodarone^{44,51,80}. La méthode utilisée par la pharmacie des hôpitaux universitaires de Genève semblait la plus adaptée⁵¹ aux conditions de notre laboratoire et elle avait été développée dans le cadre d'une étude de stabilité sur l'amiodarone à 12.5 mg/mL. Il a donc été décidé d'utiliser cette méthode et de l'adapter si nécessaire.

Les conditions initiales étaient les suivantes (tableau 6) :

Tableau 6 : Condition HPLC pour les essais préliminaires de l'amiodarone

Colonne	C ₁₈ Nucleodur gravity spéciale base (125x4)
Phase mobile	ACN/Tampon (tampon phosphate 26.5 mM à pH=2.5) 50/50
Diluant = blanc	ACN
Débit	1.5 mL/min
Température	ambiante
Volume d'injection	20 µL
Longueur d'onde de détection	206 nm

Deux adaptations ont été faites avant de débiter les premières analyses. La première concernait la colonne. En effet, l'utilisation d'une colonne spéciale base ne semblait pas nécessaire étant donné que le pH de la phase mobile était à 2.5. Deuxièmement, la longueur d'onde a été modifiée. Le spectre UV de l'amiodarone présente deux maxima : 206 nm et 240 nm. Pour plus de sélectivité, la longueur d'onde de détection choisie dans le cadre de ce travail était de 240 nm.

La préparation du tampon a été faite de la manière suivante :

- Peser 3.61 g de dihydrogénophosphate de potassium (KH₂PO₄)
- Dissoudre dans environ 800 mL d'eau pour HPLC
- Ajuster le pH à 2.5 avec de l'acide phosphorique concentré à 85%
- Ajuster à 1000.0 mL avec de l'eau pour HPLC
- Filtrer sur un filtre à 0.22 µm
- Dégazer aux ultrasons durant environ 30 min

Deux solutions d'amiodarone à des concentrations différentes ont été préparées en diluant de l'amiodarone HCl dans du méthanol de manière à obtenir une concentration à 0.05 mg/mL et 0.1 mg/mL. Dans ces conditions, le pic d'amiodarone présentait une traînée importante, le facteur d'asymétrie était d'environ 2. Afin de le diminuer, de

l'isopropanol a été ajouté à la phase mobile dans différentes proportions. La traînée était moindre, mais le bruit de fond trop important. L'isopropanol a donc été éliminé de la phase mobile qui était, à nouveau, composée d'ACN/tampon 50/50 mais, cette fois, la colonne a été chauffée à 55°C, ce qui améliore l'efficacité de la méthode⁸¹. De plus, l'amiodarone HCl a été dissoute dans un mélange de MeOH et de tampon, afin que le pH soit plus proche de celui de la phase mobile. Une traînée beaucoup plus faible (facteur d'asymétrie = 1.27) a été observée.

Différents tests ont été pratiqués dans ces conditions et après plusieurs injections, un pic correspondant à l'amiodarone était présent dans les blancs. Une investigation a été faite afin de vérifier si le problème d'effet mémoire se situait au niveau de l'injecteur ou de la colonne et il s'est avéré que la colonne en était responsable. Pour connaître l'impact de cet effet mémoire sur les analyses futures, un échantillon contenant de l'amiodarone à 0.050 mg/mL et un autre à 0.070 mg/mL ont été injectés cinq fois et le coefficient de variation (CV) a été calculé. Les solutions ont été préparées de la manière suivante : 10 mg d'amiodarone HCl ont été dissous dans 10.0 mL de MeOH (solution-mère). 0.5 mL de cette solution a été prélevé et complété ad 10.0 mL de tampon pour la solution à 0.050 mg/mL. 0.7 mL de la solution-mère ont été dilués ad 10.0 mL de tampon pour la solution à 0.070 mg/mL. Les coefficients de variation étaient respectivement de 2.2% et 2.4%, ce qui est trop élevé pour une analyse HPLC.

L'effet mémoire de la colonne est provoqué par des silanols résiduels de la phase mobile qui n'ont pas été greffés : l'amiodarone se lie à ces silanols et reste ainsi accrochée à la colonne. En général, pour pallier ce problème, une amine est ajoutée au tampon ; comme elle est chargée positivement, elle se lie aux silanols résiduels et ainsi l'amiodarone ne peut plus se fixer. La triéthylamine (TEA) a une très forte affinité pour les groupements silanols et présente l'avantage de ne pas être détectée en UV. La phase mobile a été préparée comme précédemment mais cette fois, 4 mL de TEA ont été ajoutés au tampon avant l'ajustement du pH. Le coefficient de variation a été à nouveau testé en injectant cinq fois une solution à 0.060 mg/mL ; le résultat est de 0.4%.

Pour ces tests préliminaires, l'amiodarone HCl a toujours été dissoute dans des solvants organiques, ce qui n'est bien évidemment pas possible lors de la fabrication pour injection. Dans cette situation, l'amiodarone HCl est mélangée à du polysorbate 80 (P80) ainsi qu'à du glucose 5%. Les conditions chromatographiques, définies préalablement, peuvent ne pas être aussi efficaces dans cette matrice. Pour cette raison, la mesure du CV a été effectuée sur un échantillon avec matrice.

Celui-ci a été préparé de la manière suivante :

- Peser 125.0 mg d'amiodarone HCl
- Ajouter 250 mg de polysorbate 80
- Ajouter environ 8 mL de glucose 5% (G5)
- Chauffer à 55°C jusqu'à dissolution
- Compléter ad 10.0 mL avec du G5
- Prélever 0.5 mL de cette solution et compléter ad 100.0 mL de tampon

Le CV obtenu est de 0.3%. Ces conditions analytiques ont donc été retenues pour la suite du travail.

3.5.1.2 Spécificité

Aussi appelée sélectivité, la spécificité caractérise la capacité d'une procédure analytique à établir de manière univoque l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants potentiellement présents⁴⁶. Ces autres composants peuvent être soit des produits de dégradation, soit des impuretés produites lors de la synthèse de la molécule ; une impureté peut, toutefois, être également un produit de dégradation. L'amiodarone en possède cinq⁸² :

- Impureté D : (2-butylbenzofuran-3-yl)(4-hydroxy,3,5-diiodophenyl)methanone
- Impureté A : (2-butylbenzofuran-3-yl)[4-[2-(diethylamino)ethoxy]phenyl]methanone
- Impureté E : (2-butylbenzofuran-3-yl)(4-hydroxyphenyl)methanone
- Impureté C : (2-butylbenzofuran-3-yl)[4-[2-(diethylamino)ethoxy]3-iodophenyl]methanone
- Impureté F : (2-butylbenzofuran-3-yl)(4-hydroxy-3-iodophenyl)methanone

Les impuretés D et E sont disponibles dans le commerce. Afin de déterminer si les autres impuretés peuvent être des produits de dégradation qui risquent d'interférer lors de l'étude de stabilité, l'amiodarone HCl est soumise à des conditions de stress. Elle est connue pour être dégradée par la chaleur et la lumière⁵³. Elle a donc été exposée aux rayons UV et mise dans une étuve. Des tests ont également été faits pour évaluer si ce principe actif pouvait être dégradé en milieu acide ou basique.

Préparation du tampon :

- Peser 3.61g de dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4)
- Dissoudre dans environ 800 mL d'eau pour HPLC
- Ajouter 4 mL de triéthylamine
- Mélanger
- Ajuster le pH à 2.5 avec de l'acide phosphorique à 85% (environ 3mL)
- Compléter ad 1000 mL d'eau pour HPLC
- Filtrer sur un filtre à 0.2 μm
- Dégazer aux ultrasons pendant 30 min

La préparation des solutions-mères (SM) est décrite dans le tableau 7.

Tableau 7 : Préparation des solutions-mères d'amiodarone

Composants	SM dans solvant organique	SM dans la matrice
Amiodarone HCl	125.0 mg	125.0 mg
MeOH	ad 10.0 mL	/
P80	/	250 mg
G5	/	ad 10.0 mL
Concentration	12.5 mg/mL	12.5 mg/mL

Essais de dégradation :

Dégradation basique : 2 mL de SM ont été prélevés et mélangés à 2 mL de NaOH 5N. Le tout a été laissé en contact durant 24h, puis filtré. 20 mL de tampon ont été ajoutés à 0.5 mL de cette solution. Le pH a été ajusté à 2.5, puis la solution complétée ad 50.0 mL avec du tampon.

Dégradation acide : 2 mL de SM ont été prélevés et mélangés à 2 mL de HCl 5N. Le tout a été laissé en contact durant 24h, puis filtré. 20 mL de tampon ont été ajoutés à 0.5 mL de cette solution. Le pH a été ajusté à 2.5, puis la solution complétée ad 50.0 mL avec du tampon.

Dégradation par la température : 2 mL de SM + 2 mL de tampon ont été mis dans une étuve à 100°C durant 24h. 0.5 mL de la solution a été prélevé et dilué ad 50.0 mL avec du tampon.

Dégradation par les UV : 2 mL de SM + 2 mL de tampon ont été mis sous une lampe UV à 340 nm durant 24h. 0.5 mL de la solution a été prélevé et dilué ad 50.0 mL avec du tampon.

Chaque solution de dégradation a été analysée selon la méthode analytique mise au point durant la phase de développement (tableau 8) :

Tableau 8 : Conditions chromatographiques pour l'étude de la spécificité de l'amiodarone

Colonne	Chromolith Performance® RP-18 ^e avec une précolonne PR-18 ^e
Phase mobile	ACN/Tampon (tampon phosphate 26.5 mM à pH=2.5 + TEA 0.4%) 50/50
Diluant = blanc	Tampon
Débit	1.5 mL/min
Température	55°C
Volume d'injection	20 µL
Longueur d'onde de détection	240 nm

La résolution entre les pics a ensuite été calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$R_s = \frac{1.18 (tr_2 - tr_1)}{\omega_{h1} + \omega_{h2}} \quad [\text{équation 7}]$$

Avec ω_h = largeur des pics à mi-hauteur.

3.5.1.3 Prévalidation

Pour doser un principe actif, une courbe de calibration doit être préalablement établie afin de définir à quelle concentration le signal UV obtenu correspond. Cette calibration est en général réalisée dans un solvant organique mais, dans certains cas, la matrice de la formulation à analyser peut interférer dans le dosage et la courbe de calibration devra alors être établie avec cette même matrice. L'étape de prévalidation permet de déterminer si un effet matrice est présent ou non. Pour ce faire, une calibration est réalisée dans un solvant organique et une autre dans la matrice. Les résultats sont ensuite comparés.

La méthode analytique utilisée est la même que celle pour la spécificité. La concentration des standards se situe entre 0.05 mg/mL et 0.075 mg/mL, ce qui correspond à $\pm 20\%$ de la concentration cible (0.0625 mg/mL = 12.5/200).

La préparation des solutions-mères est rapportée dans le tableau 9, celle des standards de calibration, que ce soit dans le solvant organique ou dans la matrice, dans le tableau 10.

Tableau 9 : Préparation des solutions-mères d'amiodarone

Composants	SM dans solvant organique	SM dans la matrice
Amiodarone HCl	125.0 mg	125.0 mg
MeOH	ad 10.0 mL	/
P80	/	250 mg
G5	/	ad 10.0 mL
Concentration	12.5 mg/mL	12.5 mg/mL

Les solutions-filles (SF) ont été obtenues en prélevant 0.5 mL de chaque solution-mère et en les diluant ad 50.0 mL avec le tampon. Deux SF ont été faites à partir de la solution-mère dans le solvant organique et trois à partir de celle dans la matrice. La concentration est de 0.125 mg/mL.

Tableau 10 : Préparation des standards de calibration dans un solvant organique ou dans la matrice

Standard	Concentration des stds en mg/mL	Volume de SF prélevé [μ L]	Volume diluant [μ L]	Volume total [mL]
Std 1	0.0500	400	600	1
Std 2	0.0625	500	500	1
Std 3	0.0750	600	400	1

Les standards ont été injectés deux fois.

Ces analyses ont été répétées sur trois jours en préparant chaque fois de nouvelles solutions ainsi qu'un tampon frais. Les résultats ont ensuite été analysés avec la version 3 du programme Enoval.

3.5.1.4 Validation

La prévalidation a montré qu'une calibration dans la matrice était nécessaire. En suivant les recommandations de la SFSTP, le protocole V5 doit être utilisé (annexe V) ; il propose d'utiliser deux standards d'étalonnage pour trois niveaux de calibration et trois standards de validation pour ces mêmes trois niveaux.

La préparation des solutions-mères est rapportée dans le tableau 11, celle des standards de calibration et de validation dans le tableau 12.

Tableau 11 : Préparation des solutions-mères d'amiodarone

Composants	SM calibration	SM validation
Amiodarone HCl	125 mg	125 mg
P80	250 mg	250 mg
G5	ad 10.0 mL	ad 10.0 mL
Concentration	12.5 mg/mL	12.5 mg/mL

Les solutions-filles (SF) ont été obtenues en prélevant 0.5 mL de chaque solution-mère et en les diluant ad 50.0 mL avec le tampon. Comme prévu par le protocole V5, deux SF de calibration ont été préparées et trois SF de validation. La concentration est de 0.125 mg/mL.

Tableau 12 : Préparation des standards de calibration et de validation pour la validation de l'amiodarone

Standard calibration	Concentration des stds en mg/mL	Volume de SF prélevé [μ L]	Volume diluant [μ L]	Volume total [mL]
Std 1	0.0500	400	600	1
Std 2	0.0625	500	500	1
Std 3	0.0750	600	400	1

Chaque standard a été injecté deux fois. On a ainsi quatre points pour chaque niveau de calibration et six points pour chaque niveau de validation.

Ces analyses ont été répétées sur trois jours en préparant chaque fois de nouvelles solutions ainsi qu'un tampon frais. Les standards de validation préparés à J1 ont à nouveau été analysés à J3, afin de vérifier que ceux-ci restaient stables sur au moins trois jours. Les résultats ont été traités avec le programme Enoval version 3.

3.5.2 Furosémide

3.5.2.1 Développement de la méthode HPLC

La méthode retenue a été tirée de la Ph. Eur⁴⁴. Les conditions sont résumées dans le tableau 13 :

Tableau 13 : Conditions chromatographiques pour les essais préliminaires du furosémide

Colonne	Chromolith Performance [®] RP-8 ^e avec une précolonne PR-8 ^e
Phase mobile	propanol/tampon (tampon phosphate à pH 7 et cétimide) 30/70
Diluant = blanc	Phase mobile
Débit	1 mL/min
Température	ambiante
Volume d'injection	20 μ L
Longueur d'onde de détection	238 nm

La seule modification apportée a été le choix du tampon. En effet, les tests préliminaires ont été effectués avec un tampon low PIC A[®] (Waters, Milford, USA) composé de tetrabutylammonium phosphate à pH 7.5.

Pour ces premiers essais, le furosémide a été dissous dans de la phase mobile (tampon/n-propanol) de façon à obtenir une concentration de 0.020 mg/mL. Le tampon a été préparé en diluant le contenu d'un flacon de concentré pour tampon PIC A[®] dans 1000.0 mL d'eau pour HPLC, puis filtré sur un filtre à 0.22 μ m et finalement passé aux ultrasons durant 30 min.

En appliquant les recommandations de la Ph. Eur., le pic de furosémide sortait trop rapidement ($k = 0.93$). Pour augmenter le temps de rétention de celui-ci, la quantité de n-propanol a été diminuée. Dans un rapport de 75/25 (tampon/n-propanol), le furosémide sortait toujours trop vite ($k = 0.88$). La phase mobile a encore été modifiée (80/20 tampon/n-propanol) et, dans ces conditions, le pic de furosémide apparaissait à 2.84 min mais avec un épaulement visible sur le sommet du pic. L'analyse UV a montré que le spectre n'était pas pur. Le n-propanol a alors été remplacé par de l'ACN. Dans une proportion de 75/25 (tampon/ACN), le pic de furosémide sortait après 10 min ($k = 9.69$), l'analyse en routine aurait donc été trop longue. La proportion d'ACN a été modifiée avec un rapport 70/30 (tampon/ACN), le pic de furosémide sortait à 5.3 min ($k = 4.3$) et son asymétrie était de 1.3. Cette méthode a donc été retenue pour mesurer la spécificité. De plus, le spectre UV obtenu grâce au détecteur DAD montrait que le maximum d'absorption du furosémide se situait à 228 nm. La longueur d'onde de détection a donc été modifiée.

3.5.2.2 Spécificité

La Ph. Eur. décrit cinq impuretés contenues dans le furosémide⁴⁴ :

- Impureté A : acide 2-chloro-4-[(furan-2-ylméthyl)amino]-5-sulfamoylbenzoïque
- Impureté B : acide 2,4-dichloro-5-sulfamoylbenzoïque
- Impureté C : acide 2-amino-4-chloro-5-sulfamoylbenzoïque
- Impureté E : acide 2,4-dichlorobenzoïque
- Impureté D : acide 2,4-bis[(furan-2-ylméthyl)amino]-5-sulfamoylbenzoïque

Seule l'impureté A est disponible dans le commerce. Les tests de dégradation ont été effectués en milieu acide et sous UV selon des conditions décrites dans la littérature^{83,84}.

Préparation du tampon :

- Dissoudre 1 flacon de PIC A dans 1000.0 mL d'eau HPLC
- Mélanger la solution
- Filtrer sur un filtre à 0.22 μm
- Dégazer aux ultrasons pendant 30 min

Préparation des solutions :

Solution-mère : dissoudre 2 mg de furosémide dans 3 mL d'ACN et compléter ad 20.0 mL avec du tampon PIC A ($C = 0.1 \text{ mg/mL}$)

Dégradation UV : prélever 2 mL de SM et placer sous une lampe UV à 350 nm durant 24h. Prélever le tout et compléter ad 10.0 mL de tampon.

Dégradation acide : prélever 2 mL de SM et ajouter 2 mL d'HCl 5N. Laisser reposer durant 24h. Filtrer la solution de dégradation. Récupérer la solution et ajouter environ 5 mL de tampon. Ajuster le pH à environ 7.5 et compléter à 10.0 mL avec du tampon.

Impureté A : ajouter environ 0.5 mg d'impureté à la solution-mère, puis diluer 20x la solution-mère

Chaque solution de dégradation a été analysée avec la méthode analytique mise au point durant la phase de développement (tableau 14) :

Tableau 14 : Conditions chromatographiques pour l'étude de la spécificité du furosémide

Colonne	Chromolith Performance® RP-8 ^e avec une précolonne PR-8 ^e
Phase mobile	Low Pic A/ACN (70/30)
Diluant = blanc	Phase mobile
Débit	1 mL/min
Température	ambiante
Volume d'injection	20 µL
Longueur d'onde de détection	228 nm

Les résultats obtenus ont montré que pour une meilleure sélectivité, une deuxième colonne devait être ajoutée.

3.5.2.3 Prévalidation

La matrice de la solution de furosémide est composée de NaCl 0.9%. Une prévalidation a été effectuée pour déterminer si celui-ci pouvait avoir une influence sur la mesure des concentrations.

La méthode analytique retenue a été la même que celle pour la spécificité. La concentration des standards se situait entre 0.015 mg/mL et 0.025 mg/mL, ce qui correspond à $\pm 20\%$ de la concentration cible (0.020 mg/mL = 1/50).

La préparation des solutions-mères est rapportée dans le tableau 15, celle des standards de calibration, que ce soit dans le solvant organique ou dans la matrice, dans le tableau 16.

Tableau 15 : Préparation des solutions-mères de furosémide

Composant	SM dans tampon	SM dans la matrice
Furosémide	50.0 mg	50.0 mg
Tampon	50.0 mL	/
NaCl 0.9%	/	50.0 mL
NaOH 10%	/	Jusqu'à dissolution du furosémide
HCl 10%	/	Ajustement du pH à 9
Concentration	10 mg/mL	10 mg/mL

Les solutions-filles (SF) ont été obtenues en prélevant 0.5 mL de chaque solution-mère et en les diluant ad 10.0 mL avec le tampon. Deux SF ont été préparées à partir de la solution-mère dans le solvant organique et trois à partir de celle dans la matrice. La concentration est de 0.05 mg/mL.

Tableau 16 : Préparation des standards de calibration sans matrice et avec matrice

Standard	Concentration des stds [mg/mL]	Volume de SF prélevé [μ L]	Volume diluant [μ L]	Volume total [mL]
Std 1	0.015	300	700	1
Std 2	0.020	400	600	1
Std 3	0.025	500	500	1

Les standards ont été injectés deux fois.

Ces analyses ont été répétées sur trois jours en préparant chaque fois de nouvelles solutions ainsi qu'un tampon frais. Les résultats ont ensuite été analysés avec la version 3 du programme Enoval.

3.5.2.4 Validation

La prévalidation a montré qu'une calibration dans la matrice était nécessaire. En suivant les recommandations de la SFSTP, le protocole V5 doit être utilisé (annexe V) ; il propose d'utiliser deux standards d'étalonnage pour trois niveaux de calibration et trois standards de validation pour ces mêmes trois niveaux. La prévalidation a aussi mis en évidence que le standard 1 était hors des critères de répétabilité et d'exactitude fixés au départ. La validation a donc été effectuée dans un intervalle compris entre 0.02 mg/mL et 0.1 mg/mL. Etant donné que l'intervalle est très large, il a été décidé de tester 5 niveaux de concentration.

Préparation des solutions :

Les solutions-mères de calibration et de validation ont été préparées de la manière suivante :

- Peser 50.0 mg de furosémide
- Ajouter environ 30 mL de NaCl 0.9%
- Ajouter une quantité suffisante de NaOH 5N pour dissoudre le furosémide
- Ajuster le pH à 9 avec du HCl 5N
- Transférer le tout dans un ballon jaugé de 50.0 mL
- Compléter jusqu'au trait de jauge avec du NaCl 0.9%

Les solutions-filles (SF) ont été préparées en prélevant 1 mL de chaque solution-mère et en les diluant ad 10.0 mL avec le tampon. Comme prévu par le protocole V5, deux SF de calibration ont été réalisées et trois SF de validation.

La préparation des standards de calibration et de validation est décrite dans le tableau 17.

Tableau 17 : Préparation des standards de calibration et de validation pour la validation du furosémide

Standard calibration	Concentration des stds [mg/mL]	Volume de SF prélevé [μ L]	Volume diluant [μ L]	Volume total [mL]
Std 1	0.02	200	800	1
Std 2	0.04	400	600	1
Std 3	0.06	600	400	1
Std 4	0.08	800	200	1
Std 5	0.10	1000	0	1

Chaque standard a été injecté deux fois. On a ainsi quatre points pour chaque niveau de calibration et 6 points pour chaque niveau de validation.

Ces analyses ont été répétées sur trois jours en préparant chaque fois de nouvelles solutions ainsi qu'un tampon frais. Les standards de validation préparés à J1 ont à nouveau été analysés à J3, afin de vérifier que ceux-ci restaient stables sur au moins trois jours.

Les résultats ont été analysés avec la version 3 du programme Enoval.

3.5.3 Cidofovir

3.5.3.1 Développement de la méthode CE

Le cidofovir ne figure ni dans la Ph. Eur., ni dans la Ph. Helv., ni dans l'USP. Une recherche de la littérature a donc été entreprise afin de déterminer si une méthode HPLC existait pour ce principe actif. Dans les études de stabilité publiées⁸⁵⁻⁸⁷, la mesure des concentrations de cidofovir est réalisée par HPLC avec une phase mobile ne contenant que du tampon (aucun solvant organique n'est ajouté à la préparation). Il a donc été décidé d'utiliser l'électrophorèse capillaire pour le dosage de ce médicament bien que la recherche de littérature n'ait révélée aucune méthode utilisant la CE pour doser le cidofovir.

Comme présenté précédemment, ce principe actif possède deux fonctions ionisables : une acide et une basique. La figure 26 montre graphiquement l'ionisation de chaque groupement ionisable du cidofovir en fonction du pH déduite à partir des pKa du cidofovir :

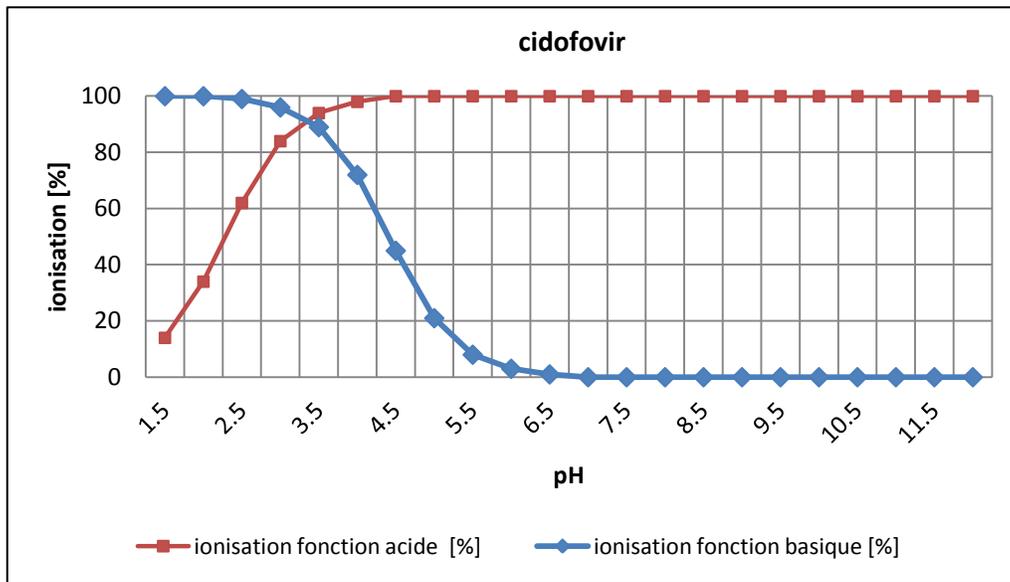


Figure 26 : Profil d'ionisation du cidofovir en fonction du pH

La CZE est basée sur la différence de mobilité des ions dans un champ électrique en fonction de leur charge et de leur taille. Afin de décrire le déplacement des ions dans la solution, la mobilité électrophorétique (μ_{eff}) d'un ion qui se calcule de la manière suivante est utilisée :

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad [\text{équation 8}]$$

Avec q = charge de l'ion, η = viscosité de la solution et r = rayon de l'ion

Le déplacement des électrolytes contenus dans le tampon doit également être pris en compte. Ce déplacement, appelé flux électroosmotique (EOF), est la conséquence des charges présentes sur la surface interne du capillaire.

Deux approches étaient donc envisageables pour débiter les tests :

- Travailler à très bas pH pour avoir une fonction basique à 100 % ionisée (BH^+) avec toutefois la présence d'un petit pourcentage de forme A^-
- Travailler à pH supérieur à 8.5 de manière à ce que la forme acide soit ionisée à 100% et la base, elle, soit présente à 100% sous forme neutre

Dans le premier cas, il est possible d'utiliser une solution d'acide formique 1M avec un capillaire long (64.5 cm, l_{eff} 56 cm). Le pH de cette solution se situe à 1.8. Dans le second,

le tampon est composé de borate 50 mM à pH 9.0. Cependant, comme le composé est sous forme A^- , il migrera vers la cathode et donc dans le sens inverse à l'EOF. Deux cas de figure peuvent se présenter : soit la μ_{app} est positive ($\mu_{EOF} > \mu_{eff}$) et l'anion est entraîné vers le détecteur, soit la μ_{app} est négative ($\mu_{EOF} < \mu_{eff}$) et le composé est entraîné vers l'anode et ne sera pas détecté. Dans le second cas, il est alors possible d'inverser la polarité de la CE, c'est-à-dire que le composé est injecté du côté de la cathode et va migrer vers l'anode, en sens inverse de l'EOF.

Les deux électrolytes de séparation ont été testés. La solution à pH acide a permis la migration et la détection du cidofovir avec la meilleure efficacité et les expériences se sont donc poursuivies avec celle-ci. Divers essais ont montré que la concentration la plus adéquate de cidofovir pour ces analyses était de 0.25 mg/mL. Le tableau 18 résume les conditions utilisées :

Tableau 18 : Conditions CE pour les essais préliminaires du cidofovir

Capillaire	Longueur = 64.5 cm, $L_{eff} = 56$ cm Diamètre interne = 50 μ m
Tampon de séparation	Acide formique 1M à pH = 1.8
Diluant	Eau déminéralisée
Tension appliquée	30 KV
Injection hydrodynamique	50 mbar * 30 sec => 1% du capillaire
Longueur d'onde de détection	280 nm (bw = 10 nm)
Température	25°C

Un test de dégradation a été effectué en ajoutant du HCl 5N à une solution de cidofovir à 1 mg/mL avec stockage à l'étuve à 70°C durant 24h. Cette solution a ensuite été analysée selon la méthode développée. Le résultat montre une mauvaise séparation entre le cidofovir et son produit de dégradation. De plus, le composé est détecté après 25 min, ce qui s'explique par le très bas pH de l'électrolyte de séparation (1.8) qui crée peu, voire pas d'EOF.

La même solution a donc été analysée avec un tampon phosphate à pH 2.5 et à différentes concentrations :

- Capillaire long (64.5 cm, 45 de leff) et 50 mM de tampon phosphate
- Capillaire long et 100 mM de tampon phosphate
- Capillaire court (32.5 cm, 24 de leff) et 25 mM de tampon phosphate
- Capillaire court et 50 mM de tampon phosphate

L'utilisation d'un capillaire long et d'un tampon phosphate à 100 mM permettait une bonne séparation du principe actif et de son produit de dégradation, avec néanmoins une durée d'analyse encore trop longue pour une utilisation en routine. Une pression de 20 mbar a

donc été appliquée en même temps que la tension pour permettre au composé de migrer plus rapidement. Avec cette méthode, le cidofovir est détecté à environ 17 min avec une répétabilité sur les temps de migration peu satisfaisante (CV = 4.0% avec n = 6).

En diminuant le pH du tampon, il est possible d'augmenter le pourcentage de forme ionisée et donc d'accélérer la migration. Pour ce faire, un tampon phosphate à pH 1.6 a été testé. Le CV ainsi obtenu était de 0.7% (avec n = 6). La suite de la validation a donc été réalisée avec ce tampon.

3.5.3.2 Spécificité

Selon Oliyai *et al.*⁸⁸, le cidofovir possède quatre produits de dégradation (figure 27) :

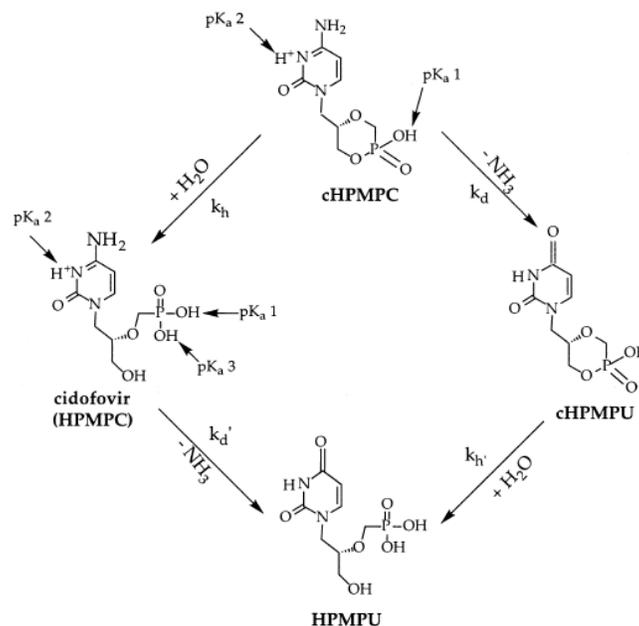


Figure 27 : Voies de dégradation du cidofovir

Cependant, ceux-ci peuvent aussi bien être obtenus par dégradation chimique que par dégradation enzymatique ; ils ne devraient donc pas être tous visibles lors de l'étude de stabilité. Dans les articles relatifs à la stabilité du cidofovir^{85,87}, un seul produit de dégradation était d'ailleurs visible lors des essais de stress à savoir le dérivé uracil (HPMPU).

L'analyse de la spécificité s'est déroulée de la manière suivante :

Préparation du tampon :

- Ajouter 340 μL de d'acide phosphorique à environ 30 mL d'eau purifiée
- Ajuster le pH à 1.6 avec du NaOH 1M
- Transférer la solution dans un ballon jaugé de 50 mL
- Ajuster à 50.0 mL avec de l'eau purifiée
- Passer aux ultrasons durant 30 min

Préparation des solutions :

- Solution-mère : dissoudre 50 mg de cidofovir dans 50.0 mL d'eau purifiée de façon à obtenir une solution à 1 mg/mL
- Dégradation : prélever 2 mL de cette solution et ajouter 2 mL de HCl 5N. Passer le tout à l'étuve à 100°C durant 24h
- Solution-fille : reprendre les cristaux obtenus dans 10 mL d'eau purifiée

Cette solution a été analysée avec la méthode mise au point qui est résumée dans le tableau 19.

Tableau 19 : Conditions CE pour l'étude de la spécificité du cidofovir

Capillaire	Longueur = 64.5 cm, $L_{\text{eff}} = 56$ cm Diamètre interne = 50 μm
Tampon de séparation	Tampon phosphate 100 mM à pH = 1.6
Diluant	Eau déminéralisée
Tension appliquée	30 KV
Injection hydrodynamique	50 mbar * 30 sec => 1% du capillaire
Longueur d'onde de détection	280 nm (bw = 10 nm)
Température	25°C

La sélectivité entre le cidofovir et son dérivé uracil était suffisante, car la séparation était bien visible jusqu'à la ligne de base.

3.5.3.3 Prévalidation

La matrice de la solution de cidofovir est composée de NaCl 0.9%. Une prévalidation a été effectuée pour déterminer si celui-ci pouvait avoir une influence sur la mesure des concentrations. Le standard interne (ISTD) utilisé était une solution de procaïne à 0.1 mg/mL.

La méthode analytique utilisée était la même que celle pour la spécificité. La concentration des standards se situe entre 0.20 mg/mL et 0.30 mg/mL, ce qui correspond à $\pm 20\%$ de la concentration cible (0.25 mg/mL = 1/30).

Les solutions-mères ont été préparées en dissolvant 50 mg de cidofovir dans 50.0 mL d'eau purifiée de façon à obtenir une solution à 1 mg/mL.

La préparation des standards avec et sans matrice est rapportée dans le tableau 20.

Tableau 20 : Préparation des standards de calibration

Standard	Concentration des stds [mg/mL]	Volume de SF prélevé [mL]	Volume de procaïne à 1 mg/mL = ISTD [mL]	Volume d'eau purifiée [mL]
Std 1	0.20	2.0	1.0	ad 10.0
Std 2	0.25	2.5	1.0	ad 10.0
Std 3	0.30	3.0	1.0	ad 10.0

Lors de la préparation des standards avec matrice, 1.0 mL de NaCl à 0.03% a été ajoutés à chaque standard.

Chaque standard sans matrice a été préparé deux fois et ceux avec matrice trois fois. Chaque standard a été injecté deux fois et on obtient ainsi quatre analyses pour chaque niveau sans matrice et six pour ceux avec matrice.

Ces analyses ont été répétées sur deux jours en préparant chaque fois de nouvelles solutions ainsi qu'un tampon frais. Les résultats ont ensuite été analysés avec la version 3 du programme Enoval.

3.5.3.4 Validation

La prévalidation a montré qu'une calibration dans la matrice était nécessaire. En suivant les recommandations de la SFSTP, le protocole V5 doit être utilisé (annexe V) ; il propose d'utiliser deux standards d'étalonnage pour trois niveaux de calibration et trois standards de validation pour ces mêmes trois niveaux

Les solutions-mères ont été préparées en dissolvant 50 mg de cidofovir dans 50.0 mL d'eau purifiée de façon à obtenir une solution à 1 mg/mL.

La préparation des standards de validation et de calibration est rapportée dans le tableau 21.

Tableau 21 : Préparation des standards de calibration et de validation pour la validation du cidofovir

Standard calibration	Concentration des standards [mg/mL]	Volume de SF prélevé [mL]	Volume de NaCl 0.03% = matrice [mL]	Volume de procaïne à 1 mg/mL = ISTD [mL]	Volume d'eau purifiée [mL]
Std 1	0.20	2.0	1.0	1.0	ad 10.0
Std 2	0.25	2.5	1.0	1.0	ad 10.0
Std 3	0.30	3.0	1.0	1.0	ad 10.0

Comme pour la prévalidation, chaque standard a été injecté à deux reprises. On obtient ainsi quatre points pour chaque niveau de calibration et six points pour chaque niveau de validation.

Ces analyses ont été répétées sur trois jours en préparant chaque fois de nouvelles solutions ainsi qu'un tampon frais. Les standards de validation préparés à J1 ont à nouveau été analysés à J3, afin de vérifier que ceux-ci restent stables sur au moins trois jours.

Les résultats ont été analysés avec la version 3 du programme Enoval.

3.6 ÉTUDE DE STABILITE

Une fois la (ou les) formulation(s) choisie(s) et la méthode analytique validée, trois lots ont été fabriqués. Le nombre d'unité par lot dépendait des tests effectués tout au long de l'étude et du nombre de détermination. Le choix de la première détermination a été fait en fonction des données de stabilité maximum obtenues dans la littérature. Dans le cadre de ce travail, il a été décidé que le test de stérilité, le comptage des particules et le dosage des endotoxines ne seraient réalisés qu'immédiatement après la fabrication, à six mois et à une année alors que l'inspection visuelle, la mesure du pH et de l'osmolalité ainsi que le dosage le seraient après les temps de conservation déterminés selon les données de la littérature.

3.6.1 Amiodarone

Toutes les formulations testées durant l'étude préliminaire étaient stables après un mois ($\pm 10\%$ de la concentration de départ). La durée de barbotage à l'azote ainsi que la durée de stabilisation ne paraissant pas influencer les résultats, le temps le plus court a donc été retenu à chaque fois. Bien que l'absence ou non de stabilisation ne semblait également pas jouer de rôle dans la stabilité, il a été décidé de tester son influence sur une année. Finalement, le conditionnement en fiole convenait mieux aux soins intensifs, qui en sont les seuls utilisateurs.

Il existe peu de données publiées sur la stabilité de l'amiodarone à long terme et aucune avec une concentration à 12.5 mg/mL. Une étude montre que l'amiodarone est stable durant 32 jours mais à une concentration de 2 mg/mL⁸⁹. Aucun article publié qui montre des résultats sur une stabilité de plus de 24h pour une concentration à 12.5 mg/mL n'a été trouvé. Ceci étant, une étude effectuée aux HUG a montré que l'amiodarone était stable sur un mois pour cette concentration, mais elle n'a jamais été publiée⁹⁰. Il a donc été décidé de vérifier la stabilité de l'amiodarone après un mois, deux mois, quatre mois, six mois et une année. Le protocole détaillé de l'étude se trouve en annexe VI. Pour pouvoir effectuer tous les tests, 35 fioles par lots ont été nécessaires, ce qui correspond à 1680 mL par lot.

3.6.1.1 Fabrication des lots

Six lots ont été produits pour l'étude de stabilité, trois avec une stabilisation finale (chauffage durant 15 min à 60°C) et trois sans.

La détermination de la masse volumique de la solution d'amiodarone à 12.5 mg/mL dans du G5 a été mesurée ; elle donnait une valeur de 1.402 g/cm³.

La fabrication a débuté dans un local classé C. Le mode opératoire était le suivant :

- Vider une bouteille Bichsel® de 2 L d'eau et conserver la bouteille et le bouchon
- Tarer la bouteille vide avec le bouchon
- Ajouter 1565 g d'eau dans la bouteille
- Porter à ébullition tout en faisant barboter à l'azote durant 30 min
- Compléter à 1565.25 g d'eau (eau évaporée durant l'ébullition)
- Ajouter l'amiodarone : 21.00 g
- Ajouter le polysorbate 80 : 42.00 g
- Ajouter le glucose monohydrate : 92.40 g

- Refermer la bouteille et la mettre aux ultrasons en chauffant à 60°C jusqu'à dissolution complète
- Transférer la bouteille dans le local classé B
- Sous flux laminaire, remplir les fioles sous azote
- Répartir la solution dans les fioles à l'aide de la pompe Repeater[®], avec filtration à l'aide d'un filtre Pall Milipak 40 de 0.22 µm.

Le montage utilisé pour le remplissage des fioles est présenté à la figure 28 :



Figure 28 : Remplissage des fioles d'amiodarone avec la pompe Repeater[®]

La moitié des lots a été stabilisée à l'étuve durant 15 min à 60°C.

Une première série d'analyses sur chacun des lots a été effectuée immédiatement après la fabrication. Puis une moitié de chaque lot a été stockée à 30°C et 65% d'humidité, tandis que l'autre moitié a été conservée à 5°C ± 3°C. L'amiodarone précipitant lorsqu'il est congelé⁵³, un test à -20°C n'a donc pas été pratiqué. Tous les lots ont été conservés à l'abri de la lumière, l'amiodarone étant photosensible.

Les plans détaillés de l'étude de stabilité se trouvent en annexe VI.

3.6.1.2 Tests analytiques

Analyse HPLC

L'amiodarone a été dosée à J0, J30, J60, J120 et J180. Les conditions analytiques sont celles présentées dans la partie validation (voir tableau 8 p.46).

Etant donné que le meilleur modèle de validation était une régression linéaire passant par 0 et ajustée en utilisant uniquement le niveau 3, un seul standard de calibration à une concentration de 0.075 mg/mL a été préparé dans la matrice. Un standard de concentration connue (QC) a également été préparé ; il permet de s'assurer que la méthode analytique fonctionne correctement. En effet, celui-ci est dosé plusieurs fois durant la série d'analyse et son résultat doit être à $\pm 5\%$ de la concentration exacte.

Les échantillons testés ont été dilués 200 fois. Pour ce faire, 0.5 mL du médicament produit a été dilué dans 50.0 mL de tampon (SF), puis 0.5 mL de cette solution mélangée à 0.5 mL de tampon de façon à obtenir une concentration à 0.0625 mg/mL.

La concentration mesurée doit être de $\pm 10\%$ de celle obtenue à J0⁹¹.

Mesure du pH, l'osmolalité et contrôle visuel

La mesure du pH, de l'osmolalité et le contrôle visuel ont également été déterminés à J0, J30, J60, J120 et J180.

La solution doit être jaune pâle et exempte de particules visibles. L'osmolalité doit être à $\pm 10\%$ de celle de départ et finalement le pH doit se situer entre 3.5 et 4.5, ce qui correspond aux spécifications de l'industrie pour les ampoules de Cordarone®.

Comptage des particules et essai de stérilité

Ces deux tests ont eu lieu à J0 et J180.

Le comptage des particules et l'essai de stérilité doivent répondre aux exigences de la Ph. Eur.⁴⁴

Dosage des endotoxines

L'amiodarone exerce un effet inhibiteur sur la réaction de dosage des endotoxines même si elle est diluée 10x. A une dilution supérieure, elle précipite. Un agent dispersant a donc été testé. La solution d'amiodarone a été diluée 100x et 1000x (la DMS calculée étant de 1500x) avec du pyroperse® (Lonza) 0.2% qui est un agent dispersant. Malgré les dilutions importantes, la réaction était toujours inhibée.

En diminuant la concentration en amiodarone tout en gardant la même charge en endotoxines, il est envisageable de doser les endotoxines. Dans cette optique, l'amiodarone, préalablement chargée en endotoxines, a été diluée 100x avec de l'eau de qualité « LAL », ce qui a entraîné en partie sa précipitation puis une partie de la solution a

été centrifugée et une autre filtrée. Ces deux solutions ont été analysées mais les endotoxines n'ont pas été retrouvées, ce qui signifie que ces solutions possédaient toujours une action inhibitrice. Ce n'est qu'après une nouvelle dilution de 10x avec du pyrospèrse® à 0.2% que la charge en endotoxines a pu être retrouvée.

L'analyse des solutions à J0 n'a pas pu être pratiquée, car ces tests initiaux ont pris du temps. Seule la détermination à J180 a été faite selon le mode opératoire suivant :

- Diluer la solution d'amiodarone 100x avec de l'eau de qualité « LAL »
- Filtrer le tout sur un filtre à 5 µm
- Diluer le filtrat encore 10x avec du pyrospèrse® à 0.2%.

La concentration en endotoxines doit être inférieure à 12.5 UI/mL. En effet, en appliquant l'équation 4, on obtient :

$$K/M = 5/0.4 = 12.5 \text{ UI/mL.}$$

Avec $M = 600 \text{ mg (dose journalière) / (60 kg (poids moyen d'un homme) * 24h) = 0.4.$

3.6.2 Furosémide

L'étude présentant la plus longue durée de stabilité pour le furosémide est celle effectuée par Donnelly⁸⁴ qui donnait 84 jours pour des solutions à 1 mg/mL. La mesure des paramètres physico-chimiques a donc été faite à 3 mois, 6 mois et une année. Le protocole détaillé de l'étude se trouve en annexe VII. Pour pouvoir effectuer tous les tests, 36 fioles par lots ont été nécessaires, ce qui correspond à 1440 mL par lot.

3.6.2.1 Fabrication des lots

Trois lots ont été préparés pour l'étude de stabilité.

La fabrication s'est déroulée dans un local classé C. Le mode opératoire était le suivant :

- Peser 2.00 g de furosémide
- Ajouter environ 400 mL d'eau pour injectable
- Ajouter doucement le NaOH 2N jusqu'à ce que tout le furosémide soit dissout
- Dans un autre bécher, dissoudre 18.0 g de NaCl dans environ 800 mL d'eau pour injectable
- Mélanger la solution de furosémide et celle de NaCl
- Ajuster le pH à environ 9 avec du HCl 2N

- Transférer la solution dans un ballon jaugé de 2 L et compléter avec de l'eau pour injectable
- Répartir la solution dans les fioles à l'aide de la pompe Repeater[®], tout en filtrant avec un filtre Pall Milipak 40 de 0.22 µm.
- Autoclaver les flacons à 121°C durant 20 min.

Une première série d'analyse sur chacun des lots a été effectuée immédiatement après la fabrication. Puis un tiers de chaque lot a été stocké à 30°C et 65% d'humidité, le second à 5°C ± 3°C, tandis que le dernier a été entreposé au congélateur à -20°C ± 5°C. Tous les lots ont été conservés à l'abri de la lumière, le furosémide étant photosensible.

Les plans détaillés de l'étude de stabilité se trouvent en annexe VII.

3.6.2.2 Tests analytiques

Analyse HPLC

Les conditions analytiques sont celles présentées dans la partie validation (voir tableau 14 p.50).

Etant donné que le meilleur modèle de validation était une régression linéaire passant par 0 et ajustée en utilisant uniquement le niveau 5, un seul standard de calibration à une concentration de 0.1 mg/mL a été préparé dans la matrice. Un QC de concentration connue a également été préparé ; il permet de s'assurer que la méthode analytique fonctionne correctement.

Les échantillons testés ont été dilués 20 fois. Pour ce faire, 0.5 mL du médicament produit a été dilué dans 10.0 mL de tampon de façon à obtenir une concentration de 0.050 mg/mL.

La concentration mesurée doit être de ± 10% de celle à J0⁹¹.

Mesure du pH, l'osmolalité et contrôle visuel

La solution doit être incolore et exempte de particules visibles. L'osmolalité doit être à ± 10% de celle de départ et finalement le pH doit se situer entre 8 et 9.3, ce qui correspond aux spécifications de l'industrie pour les ampoules de Lasix[®].

Comptage des particules et essai de stérilité

Le comptage des particules et l'essai de stérilité doivent répondre aux exigences de la Ph. Eur.⁴⁴

Dosage des endotoxines

Le dosage des endotoxines a été validé avec une dilution de 10x. 0.1 mL de la solution a été dilué dans 0.9 mL d'eau exempte d'endotoxine.

La concentration en endotoxines doit être inférieure à 3.6 UI/mL⁸².

3.6.3 Cidofovir

L'étude de Hennere et al.⁸⁵ ayant montré que le cidofovir à 6.25 mg/mL était stable durant 150 jours, il a été décidé de faire nos mesures à J0, J90, J180 et J360. Comme des études ont montré que le cidofovir pouvait être congelé sans perte d'efficacité^{87,92}, la préparation des solutions a donc été faite avant la validation de la méthode analytique et, à chaque fois qu'une mesure devait avoir lieu, les solutions étaient congelées. Le protocole détaillé de l'étude se trouve en annexe VIII. Le Vistide[®] étant très cher, il a été décidé d'effectuer les tests de stérilité, le test des particules ainsi que le dosage des endotoxines uniquement à J0 et à J360. Cette étude a nécessité 60 seringues de 3.3 mL par lot, ce qui correspond à 4 fioles de Vistide[®] à 75 mg/mL par lot.

3.6.3.1 Fabrication des lots

Trois lots ont été préparés pour l'étude de stabilité. La solution à 7.5 mg/mL a été obtenue en diluant 10x la solution de Vistide[®], puis les seringues remplies à 3.3 mL.

La fabrication s'est déroulée de la manière suivante dans la zone de production dédiée aux cytotoxiques :

- Retirer 79 mL d'un flex de NaCl 0.9% à 250 mL (50 mL car la solution finale doit contenir 200 mL, 20 mL qui sont remplacé par le Vistide[®] et 9 mL pour l'overfill de la poche)
- Ajouter 20 mL de Vistide[®] (le contenu total de 4 fioles) dans le flex
- Mélanger
- Remplir 60 seringues de 3.3 mL

Une partie des seringues a été analysée immédiatement : mesure du pH, de la stérilité, des endotoxines et des particules. Un tiers des seringues restantes a été placé au

congélateur à $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, un tiers à $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ et un tiers à 30°C et 65% d'humidité. Tous les lots ont été conservés à l'abri de la lumière pour des raisons logistiques.

Les plans de l'étude de stabilité se trouvent en annexe VIII.

3.6.3.2 Tests analytiques

Analyse CE

Les conditions analytiques sont celles présentées dans la partie validation (voir tableau 19 p.56).

L'un des meilleurs modèles proposés par le programme Enoval était une régression linéaire passant par 0 et ajustée au niveau le plus bas. C'est donc cette façon de faire qui a été retenue. Un standard à une concentration de 0.20 mg/ml a été préparé de la même manière que pour la validation. Un QC de concentration connue a également été préparé.

Les échantillons ont été testés en prélevant 1 mL de la solution de cidofovir à 7.5 mg/mL et en y ajoutant 2 mL d'eau purifiée. Cette solution-mère est ensuite diluée 10x de manière à obtenir une concentration de 0.25 mg/ mL.

Tous les tests prévus ont été effectués à J0 excepté le dosage du cidofovir, car la méthode analytique n'était pas encore validée. Une seringue a donc été congelée. A J90, une seringue conservée au frigo et une autre conservée à 30°C ont également été congelées. A J180, tous les tests ont pu être effectués. Les seringues congelées précédemment ont également été analysées à J180. Finalement, trois seringues ont été dosées avant et après congélation, afin de vérifier que la congélation n'ait pas d'effet sur la concentration de cidofovir.

La concentration mesurée doit être de $\pm 10\%$ de celle à J0⁹¹.

Mesure du pH et contrôle visuel

La solution doit être incolore et exempte de particules visibles et le pH doit se situer entre 7.1 et 7.7, ce qui correspond aux spécifications de l'industrie pour le Vistide®.

Comptage des particules et essai de stérilité

Le comptage des particules et l'essai de stérilité doivent répondre aux exigences de la Ph. Eur.⁴⁴

Dosage des endotoxines

Le dosage des endotoxines a été validé avec une dilution de 10x. 0.1 mL de la solution a été dilué dans 0.9 mL d'eau.

La concentration en endotoxines doit être inférieure à 0.5 UI/ mL.

3.7 FAISABILITE DE LA FABRICATION EN ROUTINE

Une fois les tests de stabilité terminés, les solutions devraient pouvoir être fabriquées en routine en grande quantité. Leur mode opératoire a déjà été présenté et discuté dans le cadre de ce travail.

3.7.1 Amiodarone

Etant thermosensible, l'amiodarone ne peut pas subir une stérilisation finale par la chaleur. Il est donc nécessaire de terminer la production par un remplissage aseptique sous flux laminaire dans un local B. Toutefois, dans nos locaux classés B, aucune balance n'est présente actuellement pour peser des quantités aussi importantes; la solution doit donc être préparée dans un local C, puis transférée dans un récipient hermétique dans le local B en vue du remplissage final. De plus, l'amiodarone étant sensible à l'oxygène, elle nécessite un barbotage à l'azote, mais une fois le polysorbate introduit, il n'est plus possible d'utiliser l'azote, car la solution risque de mousser. Il faut donc que la dissolution se fasse en milieu clos. Pour cette dissolution, il faut que la solution soit chauffée à environ 60°C et qui plus est sous agitation mécanique. Les cuves disponibles à la pharmacie peuvent être fermées de manière hermétique et chauffées. Le problème est que le chauffage se fait par vapeur d'eau, ce qui signifie que la température ne peut pas être contrôlée et donc l'amiodarone risque d'être dégradée durant cette étape. De plus, le transfert d'une cuve de 200 L entre le local C et B n'irait pas sans problème.

La solution proposée dans le cadre de ce travail est de préparer une solution concentrée d'amiodarone dans une bouteille en polypropylène de 2 L et de dissoudre le tout aux ultrasons tout en chauffant à 60°C et, ensuite, de diluer cette solution pour obtenir la concentration attendue. La société Millipore propose des poches de 20 L avec une connectique adaptée (figure 29).



Figure 29 : Poche Mobius® de 20 L de chez Millipore

La dilution finale peut donc être effectuée dans ces poches et celles-ci transférées ensuite du local C au local B. Dans un premier temps, il est nécessaire de vérifier s'il est possible de préparer une solution concentrée et de valider que le procédé de fabrication permette bien de produire des lots stériles. Dans le cadre de ce travail, un test préliminaire de dissolution a été réalisé ainsi que la validation microbiologique de la fabrication.

Les futurs lots ne pouvant pas dépasser 20 L, la solution concentrée doit donc contenir 250 g d'amiodarone et 500 g de polysorbate 80 dans 2 L d'eau (concentration de 125 mg/mL). Un test a été effectué en dissolvant 2.50 g de polysorbate 80 dans 10.0 mL d'eau, puis ensuite en ajoutant 1.25 g d'amiodarone, le tout chauffé dans un bain à ultrasons à 60°C. Il a fallu environ 3h pour aboutir à une dissolution complète. Lorsque cette solution a été diluée de manière à obtenir une concentration de 12.5 mg/mL, aucun précipité n'est apparu. Il est donc possible de fabriquer une solution concentrée et de la diluer ensuite.

La dernière étape était de valider microbiologiquement le processus de fabrication. Pour ce faire, une fabrication a été simulée sur trois lots en utilisant du milieu de culture. Dans la zone C, une bouteille en polypropylène a été remplie avec 2 L de bouillon de culture et déposée dans un récipient contenant de l'eau durant environ 3h. Parallèlement, une cuve de 20 L remplie avec 18 L de TSB a été laissée ouverte durant 30 min pour simuler l'étape de barbotage à l'azote. Le tout a été transféré dans une poche de 20 L avec une pompe Repeater® (figure 30).

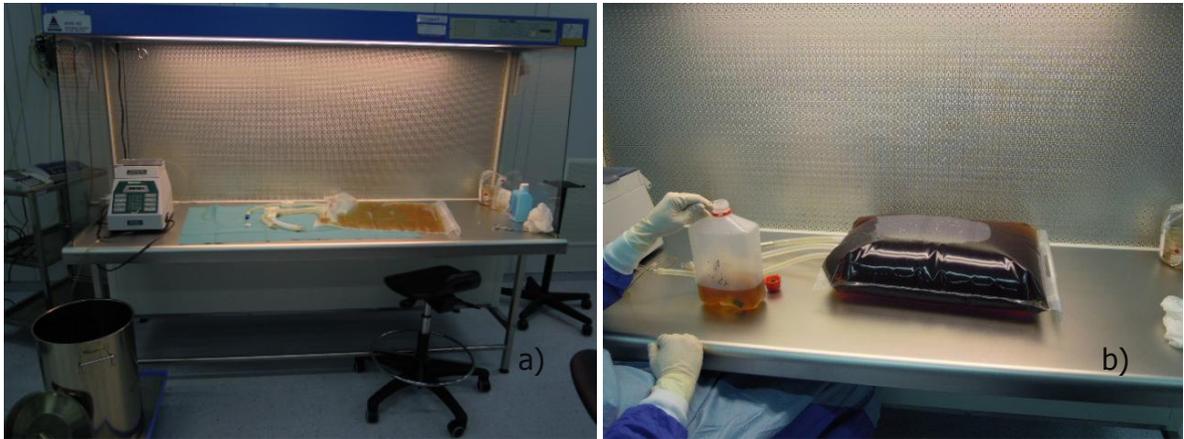


Figure 30 : Remplissage de la poche de 20 L sous flux laminaire en zone classée C :
a) remplissage de la poche à partir de la cuve de 20 L
b) remplissage de la cuve à partir du flacon de 2 L

Cette poche a ensuite été transférée du local C dans le local B où des fioles de 50 mL ont été remplies sous flux laminaire avec le TSB préalablement filtré sur un filtre à 0.22 μm . Dix fioles ont été remplies pour chaque lot. Les deux premières ont été remplies directement puis, environ 5 L de milieu de culture ont été éliminés, ensuite deux autres fioles ont été complétées et à nouveau 5 L ont été jetés ainsi de suite, jusqu'au remplissage des fioles 9 et 10 avec la fin du contenu de la poche (figure 31).



Figure 31 : Remplissage des fioles sous flux laminaire en zone classée B :
a) la poche est laissé hors du flux
b) sous flux, remplissage des fioles et des 5 L éliminés

Les fioles (figure 32) ont ensuite été mises à incuber une semaine à 20-25°C puis une semaine à 30-35°C.



Figure 32 : Fioles remplies de milieu de culture

3.7.2 Furosémide

La préparation en routine du furosémide peut être effectuée dans une grande cuve. De plus, comme le furosémide peut subir une stérilisation terminale, la mise en solution ainsi que le remplissage des fioles peut s'effectuer dans un local classé C. Ce processus de fabrication a déjà été validé pour d'autres préparations, il n'a donc pas été nécessaire de pratiquer plus de tests.

3.7.3 Cidofovir

La préparation en routine pourra être effectuée exactement de la même manière que lors de la préparation des lots pour l'étude de stabilité. En effet, les lots seront composés de 30 seringues environ par année. Si la solution est stable une année, 15 seringues pourront être préparées chaque 6 mois en injectant la totalité d'un flacon de Vistide® dans un flex de NaCl 0.9% à 50 mL. Des tests supplémentaires n'ont donc pas été effectués.

RESULTATS ET DISCUSSION

4.1 AMIODARONE

4.1.1 Résultats

4.1.1.1 Choix des formulations

Afin de déterminer s'il est possible de stériliser l'amiodarone par la chaleur, une ampoule a été autoclavée à 121°C durant 20 min. Il en résulte que le contenu de l'ampoule n'est plus limpide (figure 33) et le dosage HPLC montre que seule 85% de la concentration initiale d'amiodarone a été retrouvée. La stérilisation par la chaleur n'est donc pas possible.



Figure 33 : Ampoules de Cordarone® avant (a) et après (b) stérilisation

A la fin de l'étude préliminaire, les concentrations des solutions se situaient toutes dans la fourchette de $\pm 10\%$ établie comme limite et, par conséquent, toutes ont été considérées comme stables.

Le choix des modes de fabrication pour l'étude à long terme a donc été effectué en fonction de la complexité de la préparation et les modes les plus simples ont été retenus, soit 30 min de barbotage et stabilisation la plus courte (15 min à 60°C). Trois lots ont également été testés sans stabilisation, afin de vérifier si celle-ci avait un effet sur le long terme. Finalement, la solution a été conditionnée dans des fioles, car les soins intensifs (seul utilisateur) les préféraient aux seringues de manière à économiser de la place dans leur pharmacie d'unités de soins.

4.1.1.2 Validation analytique

Les essais de dégradation de l'amiodarone HCl ainsi que l'analyse des impuretés sont présentés dans les chromatogrammes ci-dessous (figures 34, 35 et 36):

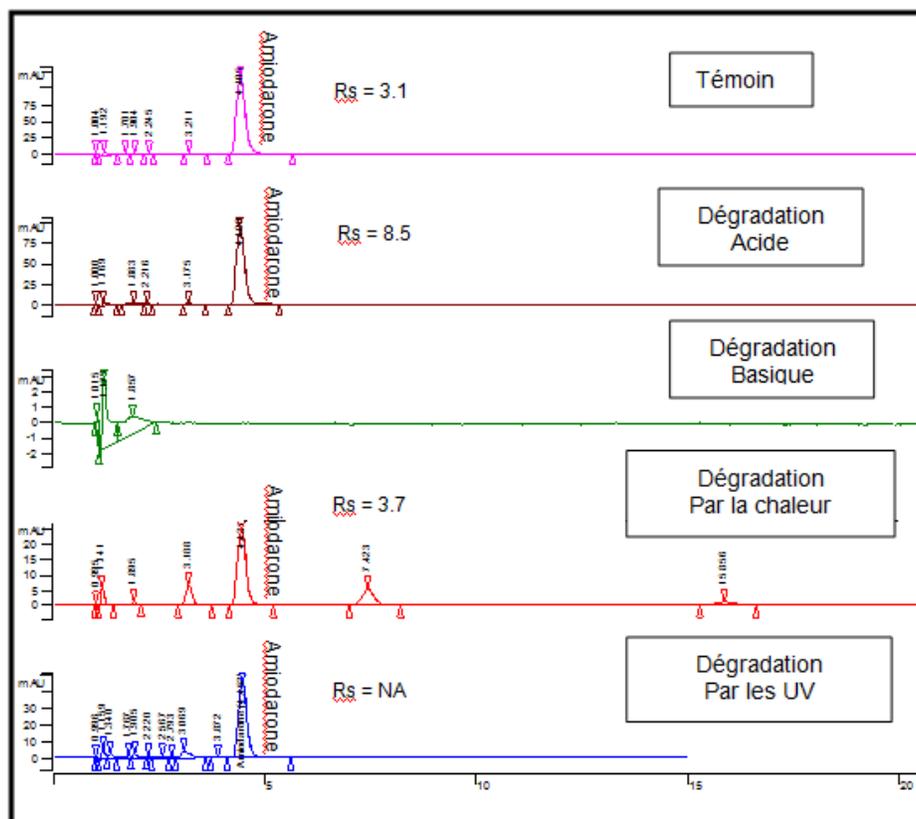


Figure 34 : Chromatogrammes obtenus lors des tests de dégradation de l'amiodarone dans le solvant avec Rs = résolution et NA = non applicable

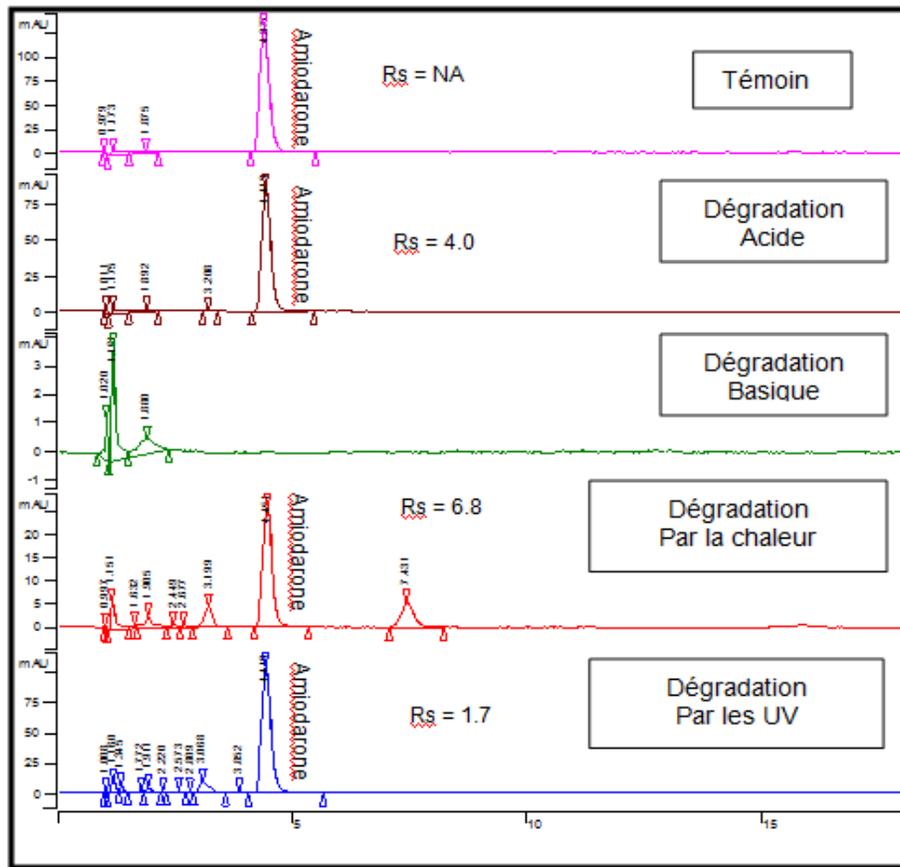


Figure 35 : Chromatogrammes obtenus lors des tests de dégradation de l'amiodarone dans la matrice avec Rs = résolution et NA = non applicable

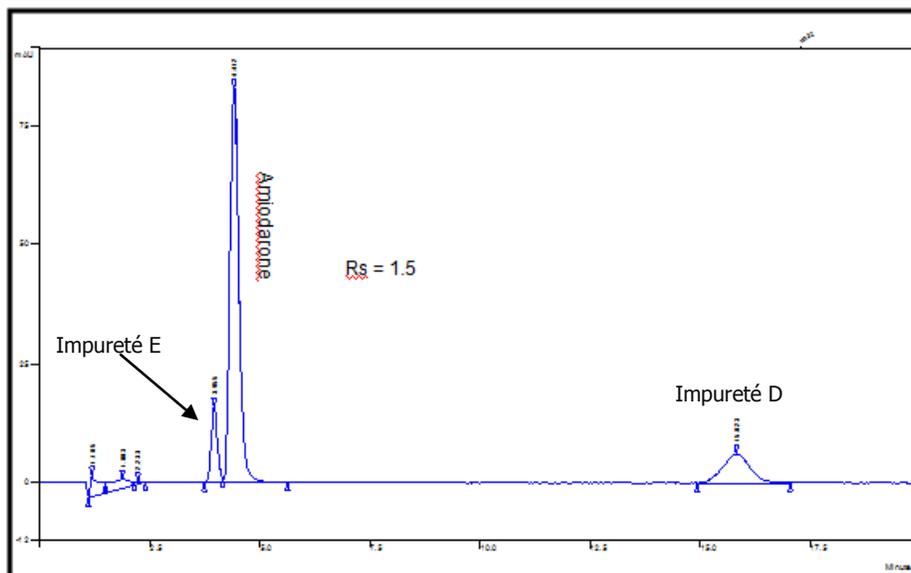


Figure 36 : Chromatogramme obtenu avec l'ajout des impuretés D et E avec Rs = résolution

La séparation entre les pics est considérée comme suffisante si la résolution est supérieure ou égale à 1.5, ce qui est le cas ici. Lors de la dégradation basique, le pic d'amiodarone a totalement disparu. Celle-ci est probablement transformée en un dérivé insoluble (étape de filtration durant la préparation de l'échantillon). La dégradation par la chaleur et la lumière met en évidence que les pics de dégradation correspondent principalement aux impuretés D et E. En plus du calcul de la résolution, l'analyse du spectre UV du pic d'amiodarone confirme la pureté de celui-ci.

Le tableau 22 résume les paramètres obtenus durant ces premiers tests :

Tableau 22 : Paramètres chromatographiques observés durant la phase de développement

Paramètres chromatographiques	Critères d'acceptabilité	Valeurs Amiodarone	Evaluation Amiodarone
Largeur à mi hauteur w_h (cm)	-	13.84	-
Tps de rétention t_R (min)	-	4.381 min	-
Tps de rétention nulle t_M (min)	-	1.195	-
Facteur de rétention k	^a De 1 à 10	3.38	conforme
Facteur de symétrie A_s Facteur de symétrie As	^a De 0.8 à 2	1.13	conforme
Nombre de plateaux par mètre de colonne (N /m)	^b >20000	27310	-
Facteur de similarité	^c >0.98	0.999 ^e	conforme
Facteur de dissimilarité	^c < 0.2	0.010 ^e	conforme
Déviat ion standard de la Valeur moyenne de PuP	<2	0.184 ^e	conforme
Note : a : Données internes b : Reviewer guidance validation chromatographic methods, November 1994, Center for drug evaluation and research (CDER) c : Limites données par Varian (fournisseur logiciel) d : PuP (worst correlation) de 200 nm à 400 nm			

Les produits de dégradation de l'amiodarone n'interfèrent pas avec le pic principal. La méthode analytique est donc adaptée pour le dosage de l'amiodarone.

L'étape de prévalidation a mis en évidence qu'il existait un effet matrice, ce qui signifie que les standards de calibration doivent être préparés dans la matrice ; c'est ce qui a été fait pour la validation. Les rapports Enoval pour la prévalidation et la validation se trouvent en annexe IX et X. Le meilleur modèle est une régression linéaire passant par 0 ajustée en utilisant uniquement le niveau le plus haut, à savoir 0.075 mg/mL. Le profil d'exactitude est le suivant (figure 37) :

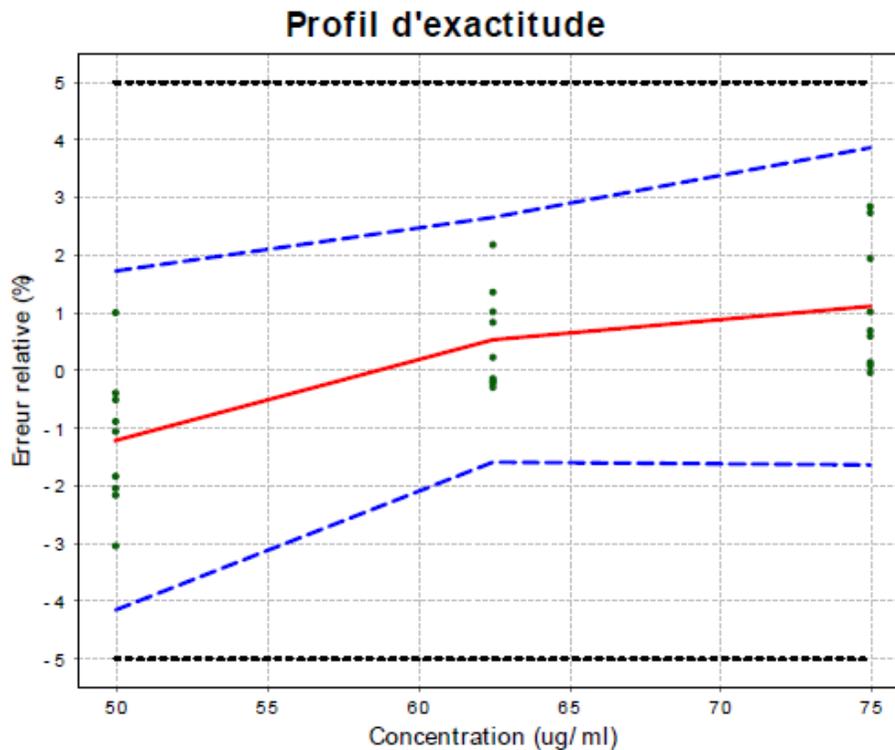


Figure 37 : Profil d'exactitude obtenu lors de la validation de l'amiodarone

La ligne rouge représente le biais, les lignes 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 reflètent quant à eux l'erreur relative des concentrations calculées et sont représentés en fonction de leur concentration cible. Comme le montre le graphique 37, les intervalles de confiance pour chaque niveau de concentration se situent dans les limites fixées pour les produits pharmaceutiques, à savoir 5%⁴⁶.

Le tableau 23 détaille les résultats de la validation :

Tableau 23 : Résultats obtenus lors de la validation de la méthode HPLC

Régression linéaire passant par 0 et ajustée au point le plus haut			
Fonction de réponse			
	Pente	Interception	R ²
Jour 1	3.4611*10 ⁵	na	na
Jour 2	3.5513*10 ⁵	na	na
Jour 3	3.4253*10 ⁵	na	na
Profil d'exactitude			
Concentration	0.05 mg/mL	0.0625 mg/mL	0.075 mg/mL
Limite de tolérance "β-expectation intervalle (95%)"	[-4.152, 1.726]	[-1.590, 2.655]	[-1.636, 3.863]
Résultats de la linéarité			
Pente		1.058	
Interception		- 3.415	
Intervalle [µg/mL]		49.96 – 74.97 µg/mL	
r ²		0.9964	
Limite de quantification (LOQ)		49.96 µg/mL	
Limite de détection (LOD)		1.137 µg/mL	

Durant la phase de validation, la stabilité des solutions sur trois jours a également été testée. Pour ce faire, les solutions analysées à J1 ont à nouveau été analysées à J3. Les résultats ne montrent pas de dégradation durant ces trois jours.

4.1.1.3 Etude de stabilité

Les solutions d'amiodarone (figure 38) ont été suivies sur 6 mois dans le cadre de ce travail. Le contrôle visuel, la mesure du pH et de l'osmolalité ainsi que le dosage de l'amiodarone ont été effectués à tous les temps de contrôle, à savoir J0, J30, J60, J120 et J180. Le comptage des particules, l'essai de stérilité et le dosage des endotoxines ont été réalisés uniquement à J0 et J180. Les résultats détaillés de ces analyses se trouvent en annexe XI.



Figure 38 : CIVAS d'amiodarone

Essais de stérilité

Lors de l'analyse de la stérilité, des filaments ont été observés dans les unités de filtration ; ceux-ci provenaient probablement du polysorbate qui ne se dissout pas bien à température ambiante. Ces filaments n'ont pas entravé la lecture du test de stérilité qui était négatif à J0 et J180 pour tous les lots testés, que se soit dans le THIO ou dans le TSB.

Comptage des particules

Les résultats détaillés du nombre de particules par vials sont en annexe XI. Aucune anomalie n'a pu être observée et tous les résultats se trouvent bien en dessous des limites autorisées par la Ph. Eur⁴⁴.

Dosage des endotoxines

Aucun résultat n'a pu être obtenu à J0, la mise au point de la méthode a pris beaucoup de temps. Les résultats à J180 montrent qu'aucun lot ne comporte plus de 5 UI/mL d'endotoxines.

Aspect visuel

A J0, les solutions de tous les lots étaient limpides et de coloration légèrement jaune. Les lots stockés à 5°C ont gardé cette légère coloration, alors que ceux conservés à 30°C sont devenus plus jaune au fil du temps, sans pour autant que la coloration ne soit trop importante pour être considérée comme non conforme, selon les données de l'industrie. En effet l'augmentation de la coloration jaune n'a pu être observée qu'en comparant les vials conservés au frigo et ceux à température ambiante.

Tous les lots observés étaient exempts de particules visibles.

Mesure du pH

Le graphique suivant (figure 39) représente l'évolution du pH au cours du temps. Chaque valeur correspond à la moyenne des trois lots analysés dans cette étude.

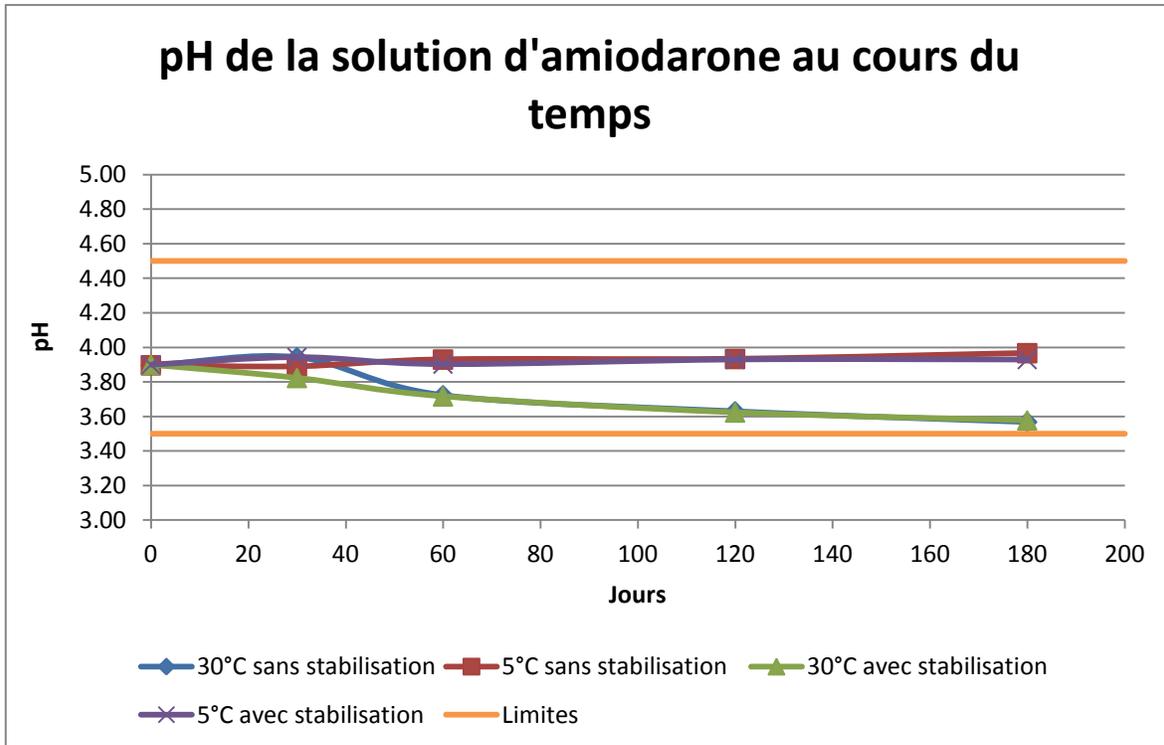


Figure 39 : Evolution du pH de la solution d'amiodarone au cours du temps à différentes températures

Ce graphique met en évidence une diminution du pH en fonction du temps pour les lots stockés à 30°C.

Afin d'évaluer si la diminution du pH des lots stockés à 30°C était statistiquement significative, un test de Friedman a été utilisé⁹³. Pour ce test les résultats à J0, J60 et J180 ont été pris en compte.

La variation du pH est statistiquement significative sur les lots stockés à 30°C ($p < 0.05$) alors qu'elle ne l'est pas sur ceux stockés à 5°C ($p > 0.05$).

Mesure de l'osmolalité

Le graphique 40 représente l'évolution de l'osmolalité au cours du temps. Chaque point correspond à la moyenne des trois lots.

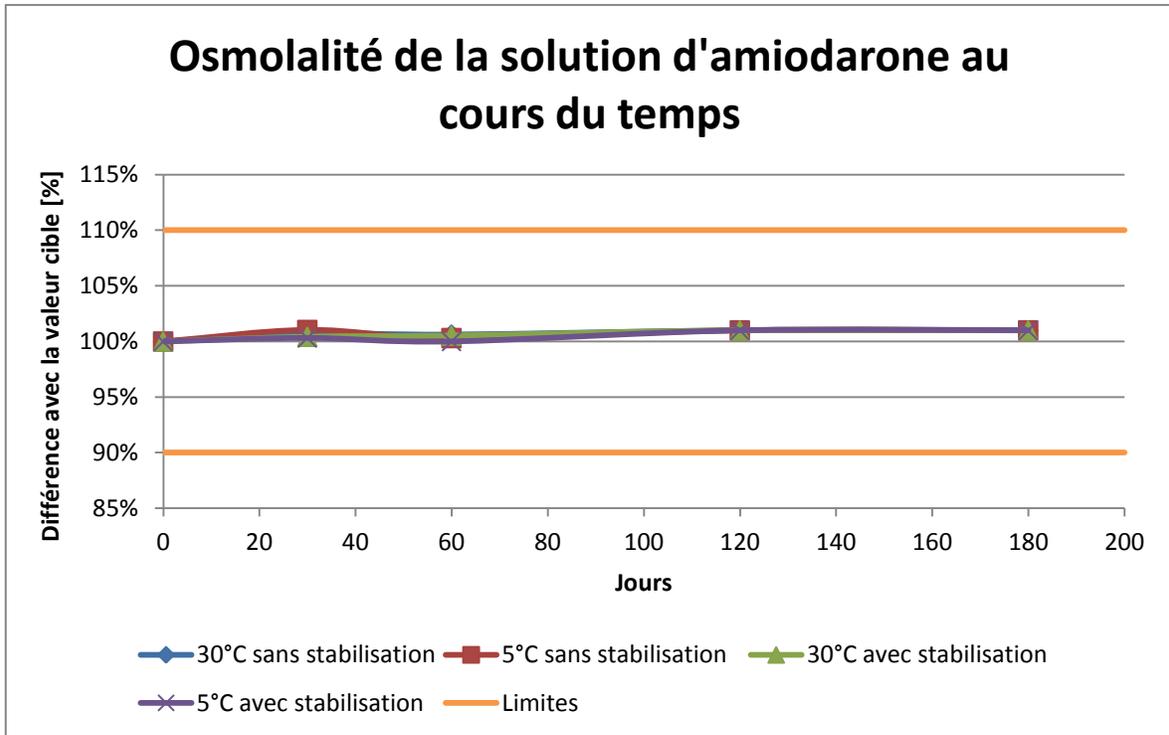


Figure 40 : Evolution de l'osmolalité de la solution d'amiodarone au cours du temps à différentes températures

Dosage de l'amiodarone

La figure ci-dessous (figure 41) représente l'évolution de la concentration de l'amiodarone au cours du temps. Chaque point représente la moyenne des trois lots.

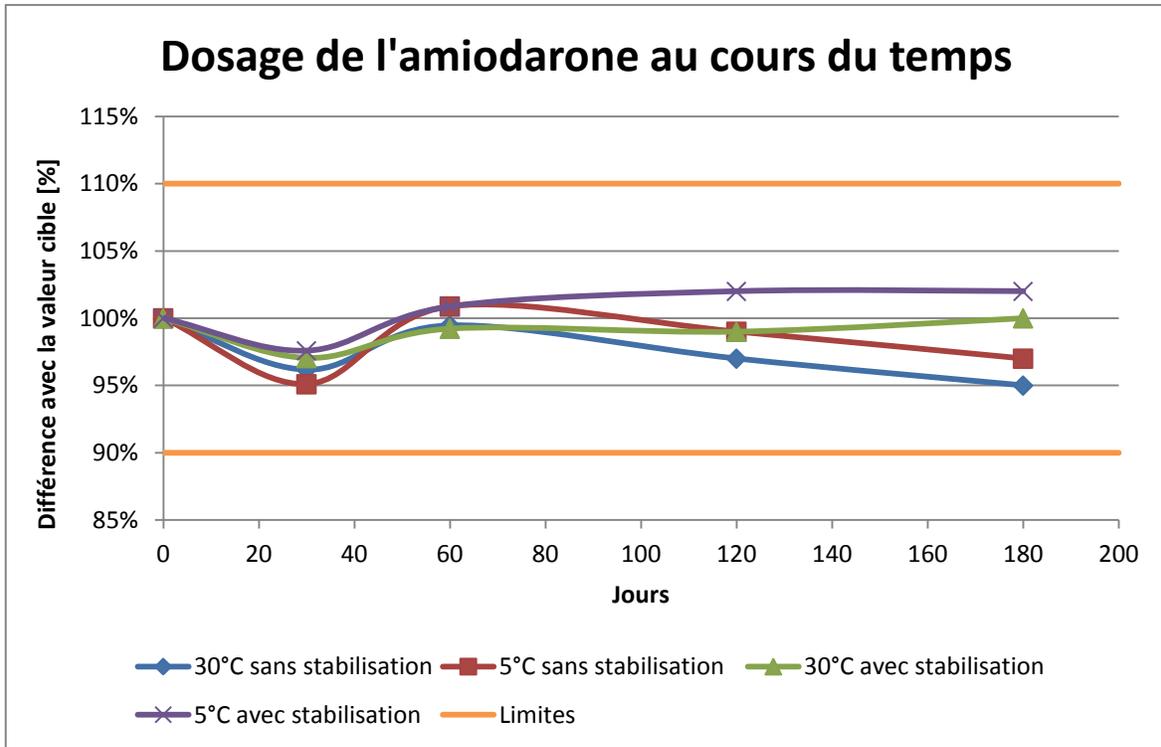


Figure 41 : Evolution de la concentration de la solution d'amiodarone au cours du temps à différentes températures

A partir de J60, un pic de dégradation est présent sur les chromatogrammes des lots conservés à 30°C (figure 42), ce qui n'est pas le cas pour ceux conservés à 5°C (figure 43).

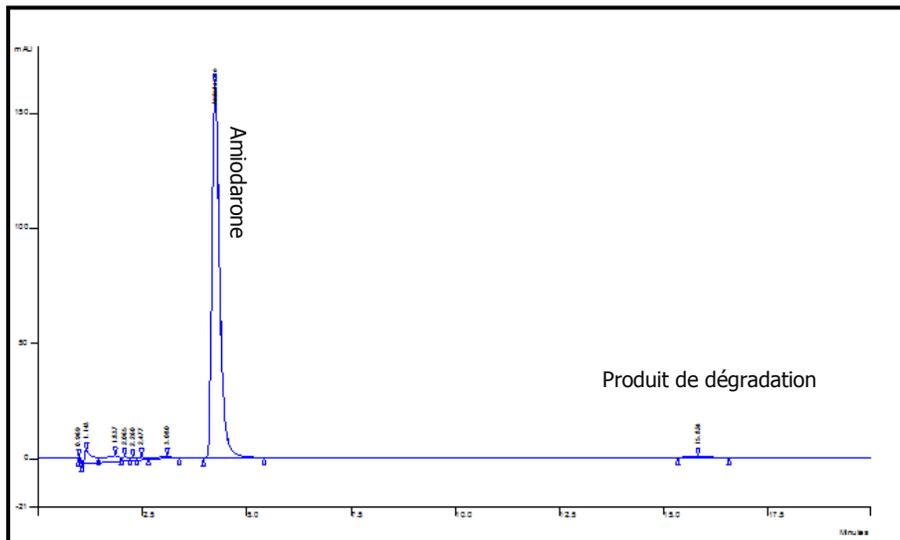


Figure 42 : Chromatogramme d'un lot conservé à 30°C après 180 jours

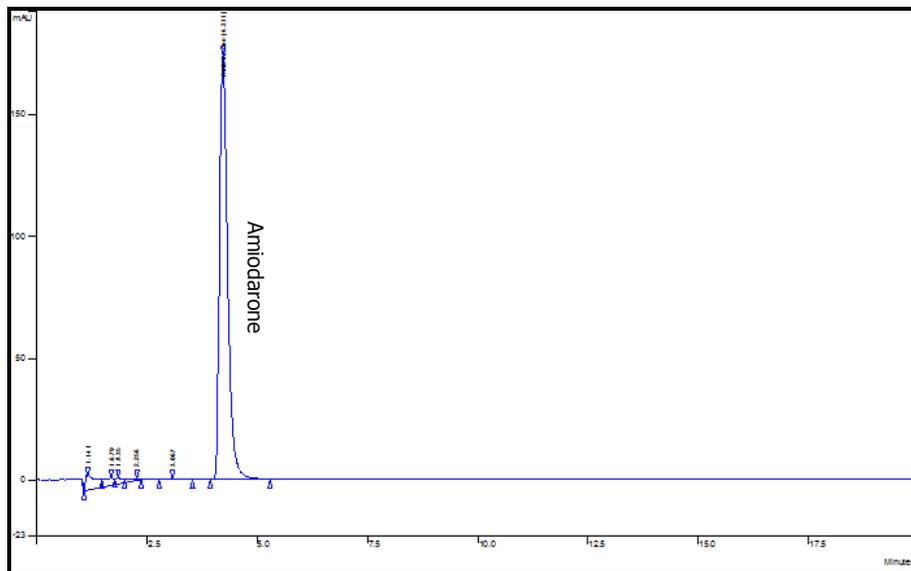


Figure 43 : Chromatogramme d'un lot conservé à 5°C après 180 jours

Fabrication en routine

Les fioles préparées durant la simulation de la fabrication et contenant le milieu de culture n'ont révélé aucune croissance bactérienne. Le transfert d'un environnement C à une zone B à l'aide d'une poche Mobius® de 20 L peut donc être validé.

4.1.2 Discussion

Le dosage de l'amiodarone montre une légère diminution de la concentration à un mois qui peut s'expliquer par la méthode analytique qui a été validée avec un risque de 5%. Par ailleurs, aucun produit de dégradation n'est visible sur les chromatogrammes. A J180, le lot P0KDW (sans stabilisation) conservé à 30°C a présenté une concentration de 87% ce qui est en dessous des limites admises. Les deux autres lots (P0KDU et P0KDV) préparés et conservés dans les mêmes conditions se situaient eux, dans les normes. En faisant la moyenne de ces trois lots, le résultat est conforme. Il semble que cette faible concentration soit due à un problème de dilution lors de l'analyse HPLC. En effet, les deux autres lots étant conformes, il semble donc peu probable que seul ce lot puisse être incriminé. De plus, le pic de dégradation était similaire aux autres spectres, ce qui signifie qu'une dégradation plus importante n'a pas eu lieu. Le pH lui n'était pas différent de celui des autres lots. L'hypothèse d'une erreur de dilution devrait pouvoir être vérifiée à J360.

Tous les tests effectués étaient dans les limites fixées et donc tous les lots peuvent être considérés comme stables durant 6 mois. Toutefois, ceux conservés à 30°C commencent à

se dégrader déjà après 2 mois. En effet, des pics de dégradation étaient présents sur certains des chromatogrammes des lots stockés à 30°C et, à partir de J120, ce même pic était présent sur tous les chromatogrammes. Ce produit de dégradation n'apparaît pas lorsque les lots sont conservés au frigo.

Le pH semble être un bon indicateur de la dégradation. En effet, celui-ci diminue de manière significative pour les lots stockés à 30°C. Il pourrait donc s'agir d'un moyen simple de vérifier l'évolution d'une solution d'amiodarone sans devoir recourir à un dosage par HPLC.

A ce point de l'étude, la stabilisation ne semble jouer aucun rôle. En effet, l'argument avancé par l'industrie était une précipitation de l'amiodarone lorsque la température descendait en dessous de 20°C. Une différence entre les lots conservés à 30°C et ceux à 5°C aurait donc déjà dû être visible à J30, ce qui n'était pas le cas. De plus, si l'amiodarone avait précipité, il aurait été visible à l'œil nu et probablement le nombre de particules de 25 µm aurait dû être supérieur sur les lots sans stabilisation, alors qu'on observe en moyenne 9.6 particules par vial, que ce soit avec ou sans stabilisation. Le nombre de particules à 10 µm est aussi relativement constant avec 86.4 particules par vial pour les lots sans stabilisation contre 70.4 particules par vial pour ceux avec stabilisation.

L'étude va se poursuivre afin de déterminer si les solutions conservées à 5°C sont stables sur une année.

Il serait possible de commencer la fabrication en série de solutions d'amiodarone à 12.5 mg/mL dans du glucose 5% avec une stabilité de 6 mois et sans stabilisation finale. Cependant, le mode de fabrication choisi pour la routine ne correspond pas entièrement à celui utilisé pour l'étude de stabilité. En effet, le passage par une solution concentrée impliquant la dissolution du principe actif sans dépasser la température de dégradation de l'amiodarone n'a pas été validée dans le cadre de ce travail. Une étude de stabilité allégée doit donc être réalisée.

Par contre, le contrôle de la stérilité et des endotoxines ne devrait pas être nécessaire car le mode de conditionnement restera le même. En effet, une contamination bactérienne peut survenir soit au moment de la fabrication soit durant le stockage si le contenant n'est pas intègre. Il a été démontré lors de la simulation de la fabrication avec du milieu de culture que le mode de fabrication permettait de produire des lots stériles et cette étude de stabilité a mis en évidence que les vials utilisés permettaient une conservation des solutions sans risque de contamination. L'osmolalité et le comptage des particules n'étant pas des indicateurs de la stabilité de l'amiodarone, il n'est, par conséquent, pas utile de

refaire ces mesures. Le pH est un bon indicateur et il s'agit d'une mesure simple et rapide. Il serait donc possible de n'utiliser que cette méthode pour l'étude de stabilité allégée et ce d'autant plus que le mode de fabrication ne devrait pas altérer la stabilité de l'amiodarone.

4.2 FUROSEMIDE

4.2.1 Résultats

4.2.1.1 Validation analytique

Les chromatogrammes ci-dessous (figure 44 et 45) représentent les résultats obtenus lors de l'analyse de la spécificité.

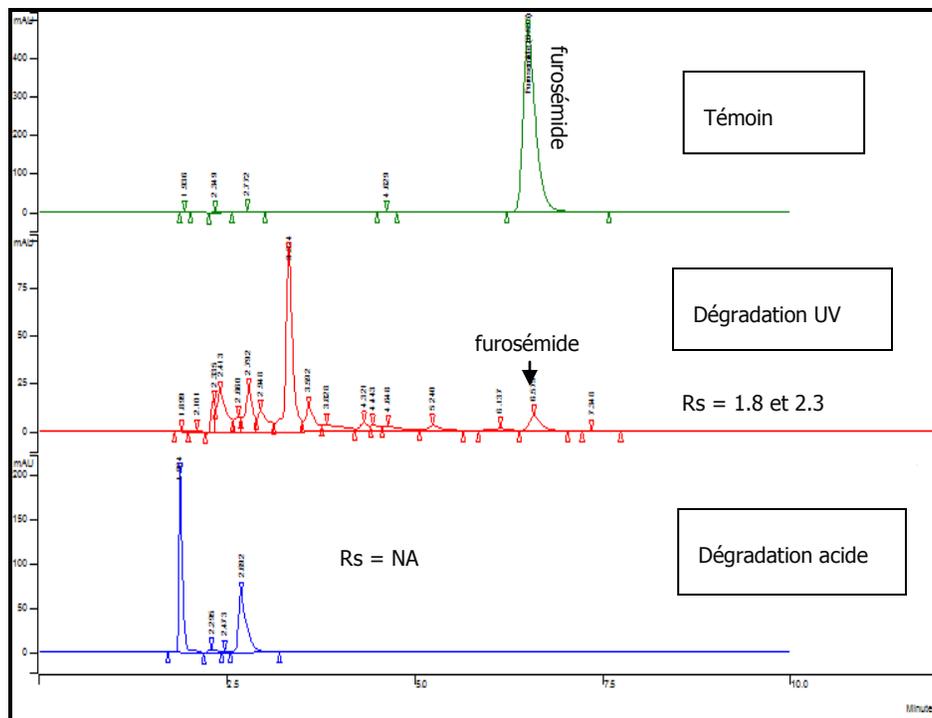


Figure 44 : Chromatogrammes obtenus lors des tests de dégradation du furosémide avec Rs = résolution et NA = non applicable

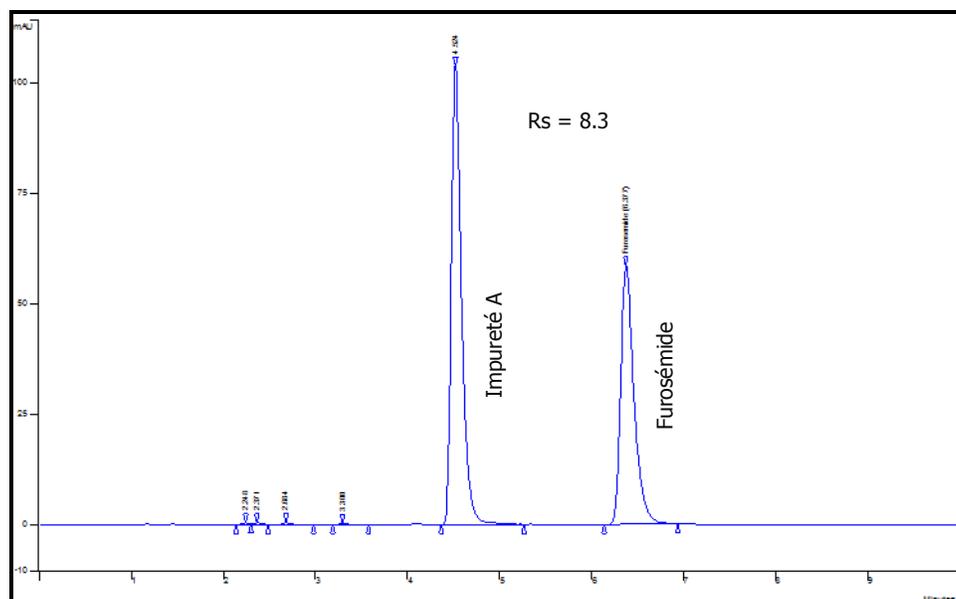


Figure 45 : Chromatogramme obtenu avec l'ajout de l'impureté A avec R_s = résolution

La résolution entre les pics est supérieure à 1.5. La dégradation acide a conduit à la disparition totale du furosémide. En effet, celui-ci étant insoluble en milieu acide, il a donc précipité et a été totalement éliminé lors de l'étape de filtration. La dégradation par les UV a entraîné l'apparition de nouveaux composés sur le chromatogramme. En plus du calcul de la résolution, l'analyse du spectre UV du pic de furosémide a mis en évidence sa pureté.

Le tableau suivant résume les paramètres obtenus durant ces premiers tests :

Tableau 24 : Paramètres chromatographiques observés durant la phase de développement

Paramètres chromatographiques	Critères d'acceptabilité	Valeurs Furosémide	Evaluation Furosémide
Largeur à mi hauteur w_h (cm)	-	9.84	-
Tps de rétention t_R (min)	-	6.356 min	-
Tps de rétention nulle t_M (min)	-	1.905	-
Facteur de rétention k	^a De 1 à 10	5.36	Conforme
Facteur de symétrie A_s Facteur de symétrie A_s	^a De 0.8 à 2	1.31	Conforme
Nombre de plateaux par mètre de colonne (N /m)	^b >20000	83291	-
Facteur de similarité	^c >0.98	0.999 ^e	Conforme
Facteur de dissimilarité	^c < 0.2	0.012 ^e	Conforme
Déviati on standard de la Valeur moyenne de PuP	<2	0.748 ^e	Conforme
Note : a : Données internes b : Reviewer guidance validation chromatographic methods, November 1994, Center for drug evaluation and research (CDER) c : Limites données par Varian (fournisseur logiciel) d : PuP (worst correlation) de 200 nm à 400 nm			

Ces tests préliminaires ont montré que ni l'impureté A, ni les produits de dégradation n'interféraient avec le pic de furosémide et la méthode analytique peut donc être considérée comme adaptée à l'étude de la stabilité du furosémide.

Les standards de calibration ont été préparés dans la matrice suite aux résultats de la prévalidation. Les rapports Enoval pour la prévalidation et la validation se trouvent en annexe XII et XIII. Le meilleur modèle est une régression linéaire passant par 0 ajustée en utilisant uniquement le niveau le plus haut à savoir 0.1 mg/mL. Le profil d'exactitude est le suivant (figure 46) :

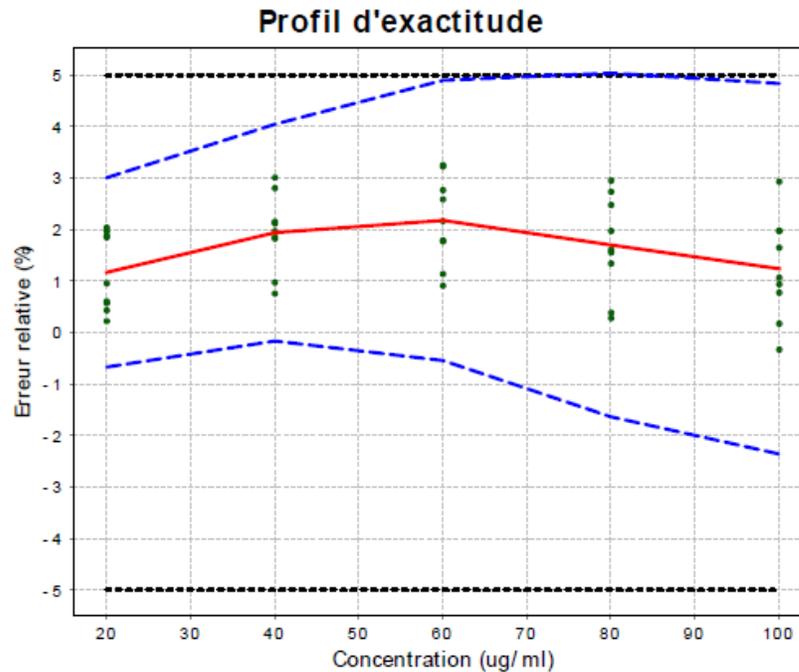


Figure 46 : Profil d'exactitude obtenu lors de la validation du furosémide

Comme le montre cette figure, les intervalles de confiance pour chaque niveau de concentration se situent dans les limites fixées pour les produits pharmaceutiques, à savoir 5%.

Le tableau 25 détaille les résultats de la validation :

Tableau 25 : Résultats obtenus lors de la validation de la méthode HPLC

Régression linéaire passant par 0 et ajustée au point le plus haut					
Fonction de réponse					
	Pente		Interception		R²
Jour 1	6.6912*10 ⁵		na		na
Jour 2	6.6692*10 ⁵		na		na
Jour 3	6.6371*10 ⁵		na		na
Profil d'exactitude					
Concentration	0.02 mg/mL	0.04 mg/ml	0.06 mg/mL	0.08 mg/ml	0.1 mg/mL
Limite de tolérance "β-expectation intervalle (95%)"	[-0.6721, 3.007]	[-0.1660, 4.045]	[-0.5449, 4.899]	[-1.639, 5.038]	[-2.361, 4.836]
Résultats de la linéarité					
Pente			1.013		
Interception			0.2052		
Intervalle			20.02 – 74.60 µg/mL		
r ²			0.9995		
Limite de quantification (LOQ)			20.02 µg/mL		
Limite de détection (LOD)			1.274 µg/mL		

Durant la phase de validation, la stabilité des solutions sur trois jours a également été testée. Pour ce faire, les solutions analysées à J1 ont, à nouveau, été analysées à J3. Les résultats ne montrent pas de dégradation durant ces trois jours.

Bien que la limite de quantification soit inférieure à celle du standard de calibration, il a quand même été décidé de garder la concentration à 0.1 mg/mL afin de simplifier le dosage du furosémide en routine.

4.2.1.2 Etude de stabilité

Comme pour l'amiodarone, le contrôle de la stérilité, le comptage des particules invisibles ainsi que le dosage des endotoxines a été effectué à J0 et J180. La mesure du pH, de l'osmolalité et le dosage du furosémide ont été effectués à J0, J90 et J180. Les résultats détaillés de ces analyses se trouvent en annexe XIV.



Figure 47 : CIVAS de furosémide

Essai de stérilité

Les tests de stérilité à J0 et J180 étaient tous négatif.

Comptage des particules

Les résultats détaillés du nombre de particules par vial sont en annexe XIV. Les résultats se trouvent dans les limites autorisées par la Ph. Eur⁴⁴.

Dosage des endotoxines

Que ce soit à J0 ou à J180, le dosage des endotoxines donnait des valeurs inférieures à 0.05 UI/mL.

Aspect visuel

Tous les lots sont restés limpides, incolores et aucune particule n'était visible durant les 6 premiers mois qu'a duré l'étude de stabilité.

Mesure du pH

Le graphique 48 représente l'évolution du pH au cours du temps. Chaque valeur correspond à la moyenne des trois lots préparés pour cette étude.

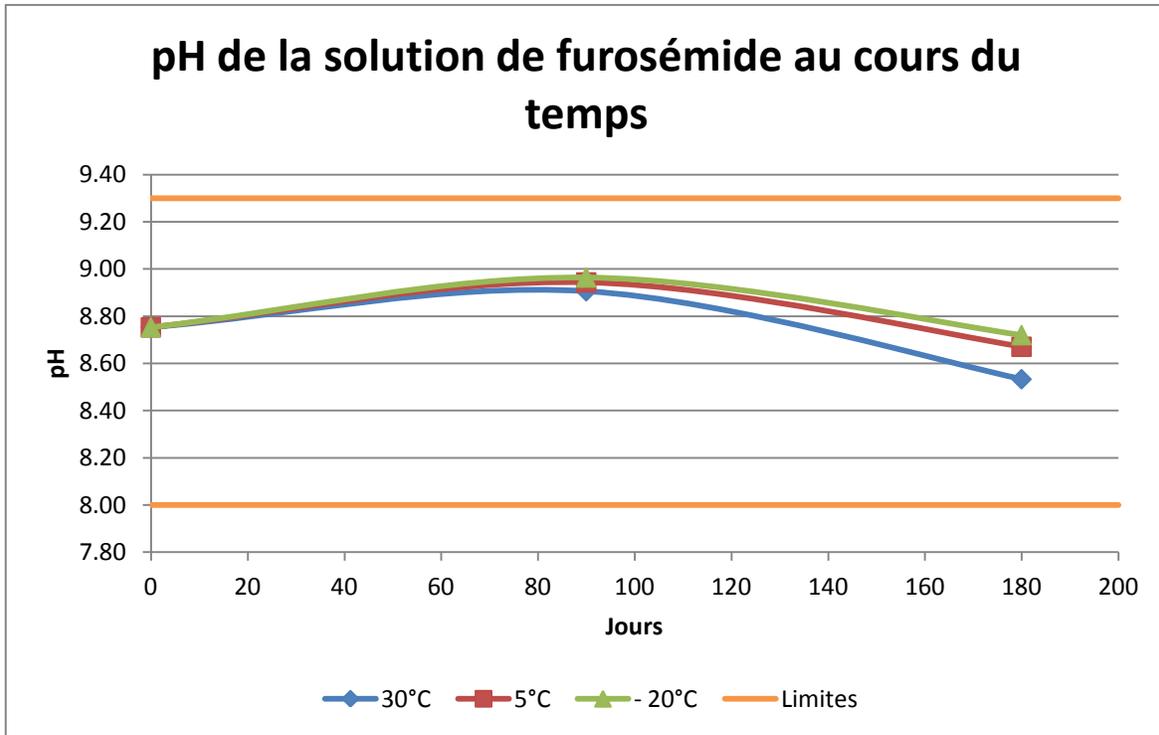


Figure 48 : Evolution du pH de la solution de furosémide au cours du temps à différentes températures

Mesure de l'osmolalité

Le graphique 49 représente l'évolution de l'osmolalité au cours du temps. Chaque point correspond à la moyenne des trois lots.

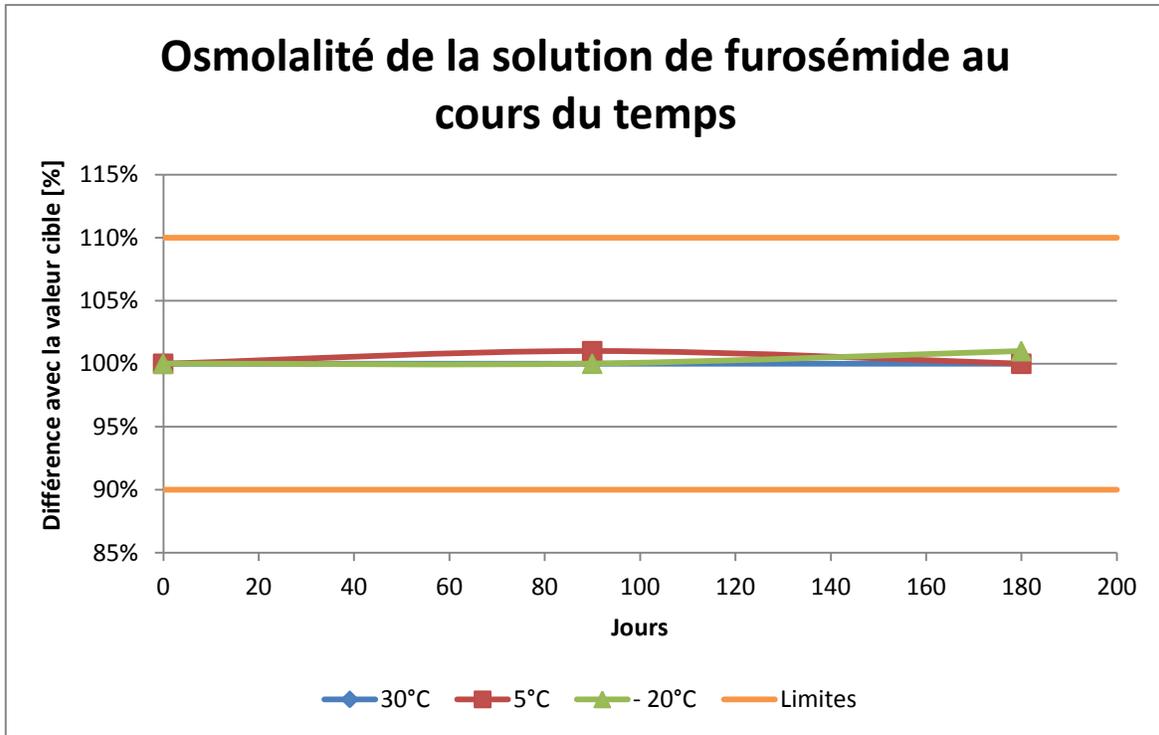


Figure 49 : Evolution de l'osmolalité de la solution de furosémide au cours du temps à différentes températures

Dosage du furosémide

La figure 50 montre l'évolution de la concentration du furosémide au cours du temps. Chaque point représente la moyenne des trois lots.

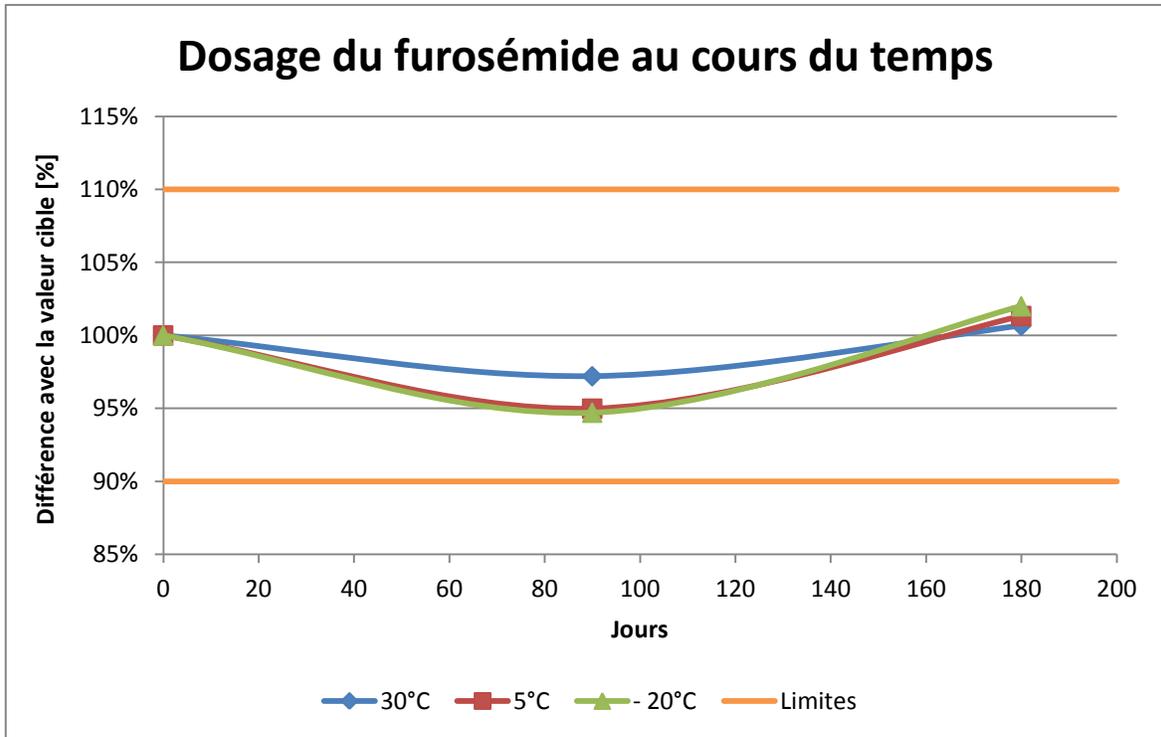


Figure 50 : Evolution de la concentration de la solution de furosémide au cours du temps à différentes températures

Aucun pic de dégradation n'a été observé sur les chromatogrammes à 180 jours, quel que soit le mode de conservation des solutions de furosémide (figure 51).

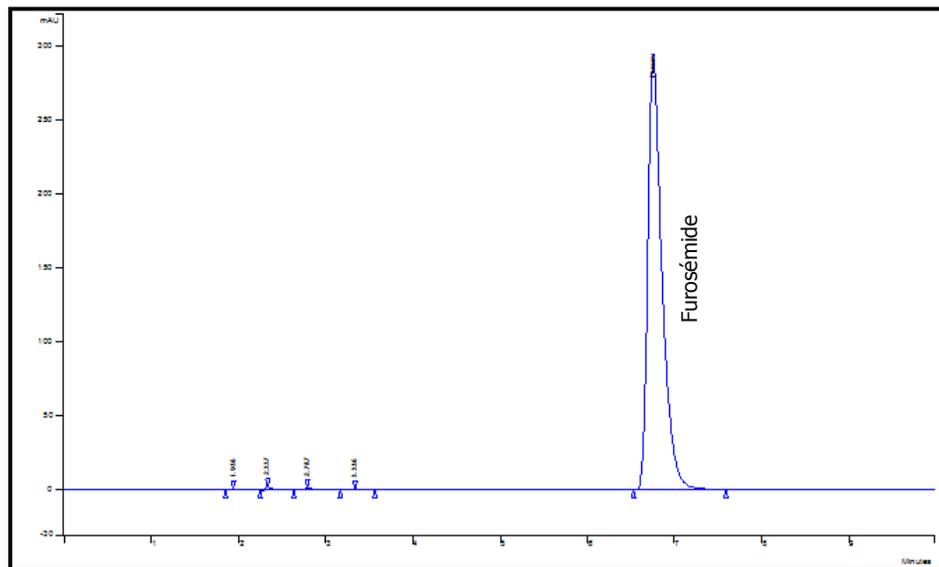


Figure 51 : Chromatogramme d'un lot de furosémide après 180 jours

4.2.2 Discussion

Tous les résultats montrent que les lots préparés sont stables au cours du temps. Une légère diminution de la teneur est observée à J90 pouvant être expliquée par l'imprécision de la méthode analytique.

La solution de furosémide à 1mg/mL dans du NaCl 0.9% est donc stable sur six mois et la production en routine peut débuter dès à présent.

4.3 CIDOFOVIR

4.3.1 Résultats

4.3.1.1 Validation analytique

Les essais de dégradation ont montré une bonne séparation entre le pic de cidofovir et son dérivé uracil comme il est possible de le voir sur l'électrophorégramme suivant (figure 52) :

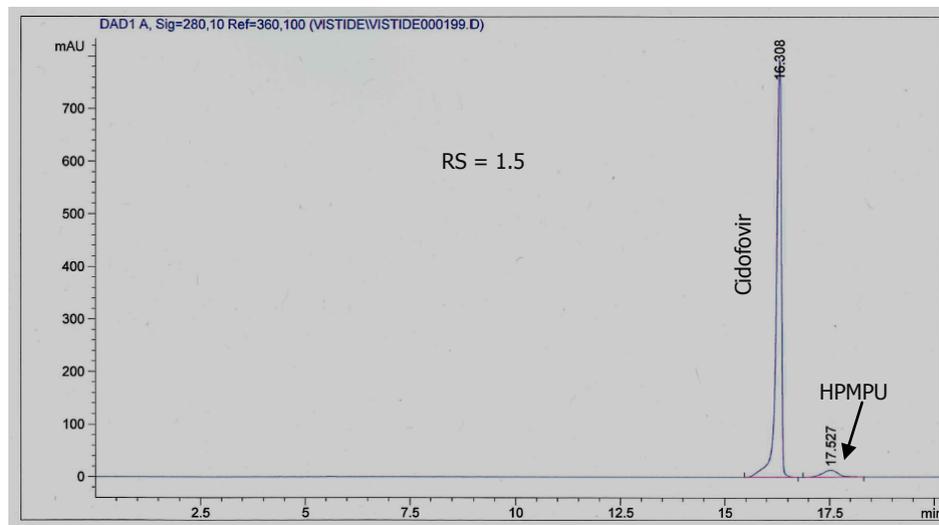


Figure 52 : Electrophorégramme obtenu lors du test de dégradation du cidofovir avec Rs = résolution

De plus, l'analyse du spectre UV a montré que le pic principal était pur.

La prévalidation a mis en évidence qu'une calibration dans la matrice était nécessaire, ce qui a donc été fait pour la validation. Les rapports Enoval se trouvent en annexe XV et XVI. Les limites de tolérance attendues au niveau β ne sont pas contenues dans les limites

d'acceptation si celles-ci sont de 5%. Il a donc été décidé d'utiliser une valeur de 10% pour les bornes α . Le meilleur modèle est une régression quadratique. Toutefois, comme il était également possible d'utiliser une régression linéaire passant par 0 et ajustée au niveau le plus bas (ici 0.2 mg/mL), c'est ce modèle qui a été retenu car il permet une utilisation plus simple.

Le profil d'exactitude fait l'objet de la figure 53.

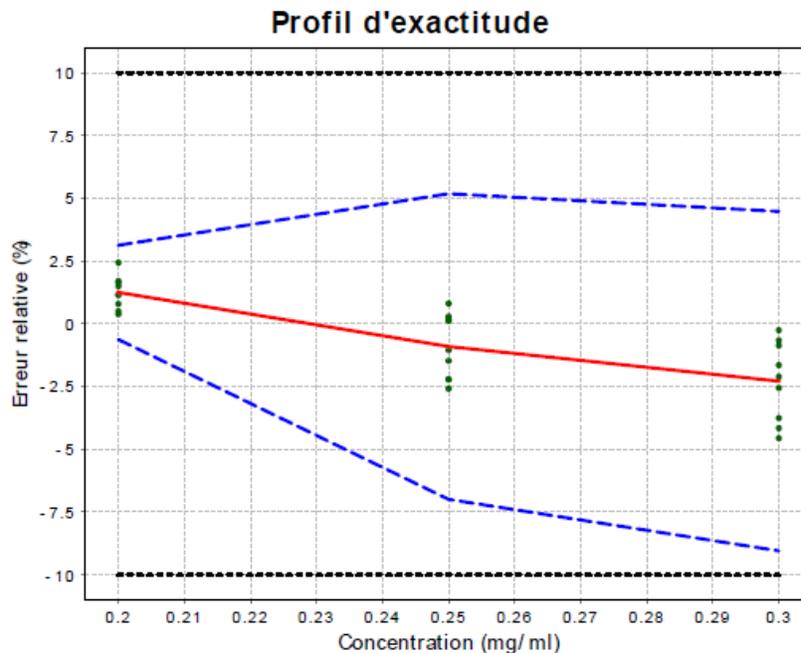


Figure 53 : Profil d'exactitude obtenu lors de la validation du cidofovir

La ligne rouge représente le biais, les lignes 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 reflètent quant à eux l'erreur relative des concentrations calculées et sont représentés en fonction de leur concentration cible.

Les résultats détaillés sont regroupés dans le tableau 26.

Tableau 26 : Résultats obtenus lors de la validation de la méthode CE

Régression linéaire passant par 0 et ajustée au point le plus			
Fonction de réponse			
	Pente	Interception	R ²
Jour 1	19.90	na	na
Jour 2	19.51	na	na
Jour 3	19.98	na	na
Accuracy profile approach			
Concentration	0.05 mg/mL	0.0625 mg/mL	0.075 mg/mL
Limite de tolérance "β-expectation intervalle (95%)"	[-0.627, 0.206]	[0.232, 0.263]	[0.273, 0.313]
Résultats de la linéarité			
Pente		0.906	
Interception		0.021	
Intervalle		0.200 – 0.300 mg/mL	
r ²		0.9926	
Limite de quantification (LOQ)		0.200 mg/mL	
Limite de détection (LOD)		0.0035 mg/mL	

Cette méthode ne pourra pas être utilisée en routine, car les limites d'acceptation sont trop larges. Elle a malgré tout été retenue dans le cadre de cette étude de stabilité.

4.3.1.2 Etude de stabilité

Immédiatement après la fabrication des trois lots (figure 54), la mesure du pH, le comptage des particules, l'essai de stérilité et la mesure des endotoxines ont été effectués ; les résultats obtenus correspondent au JO. Les trois dernières analyses n'ont pas été refaites à J180 dans le cadre de ce travail pour des questions de coûts.



Figure 54 : CIVAS de cidofovir

Etant donné que la méthode analytique a été validée après la fabrication des lots, une seringue a été congelée immédiatement après la fabrication et elle a été considérée comme correspondant au J0. Les autres seringues ont été conservées à température ambiante, au frigo et au congélateur. A J90, une seringue conservée au frigo et une autre à température ambiante ont également été congelées. Finalement, le dosage du cidofovir s'est effectué à J180. Les résultats détaillés de ces analyses se trouvent en annexe XVII.

Essai de stérilité

L'essai de stérilité était conforme que ce soit dans le TSB ou dans le THIO.

Comptage des particules

Le comptage des particules à J0 a démontré l'absence de particules de 25 µm et une moyenne de 12.9 particules/seringue pour celles de 10 µm, ce qui est parfaitement dans les normes.

Dosage des endotoxines

La présence d'endotoxines était inférieure à 0.05 UI/mL à J0.

Aspect visuel

A chaque temps de contrôle, les solutions dans les seringues étaient limpides et exemptes de particules visibles.

Mesure du pH

Le graphique suivant (figure 55) montre l'évolution du pH au cours du temps. Chaque valeur correspond à la moyenne des trois lots préparés pour cette étude.

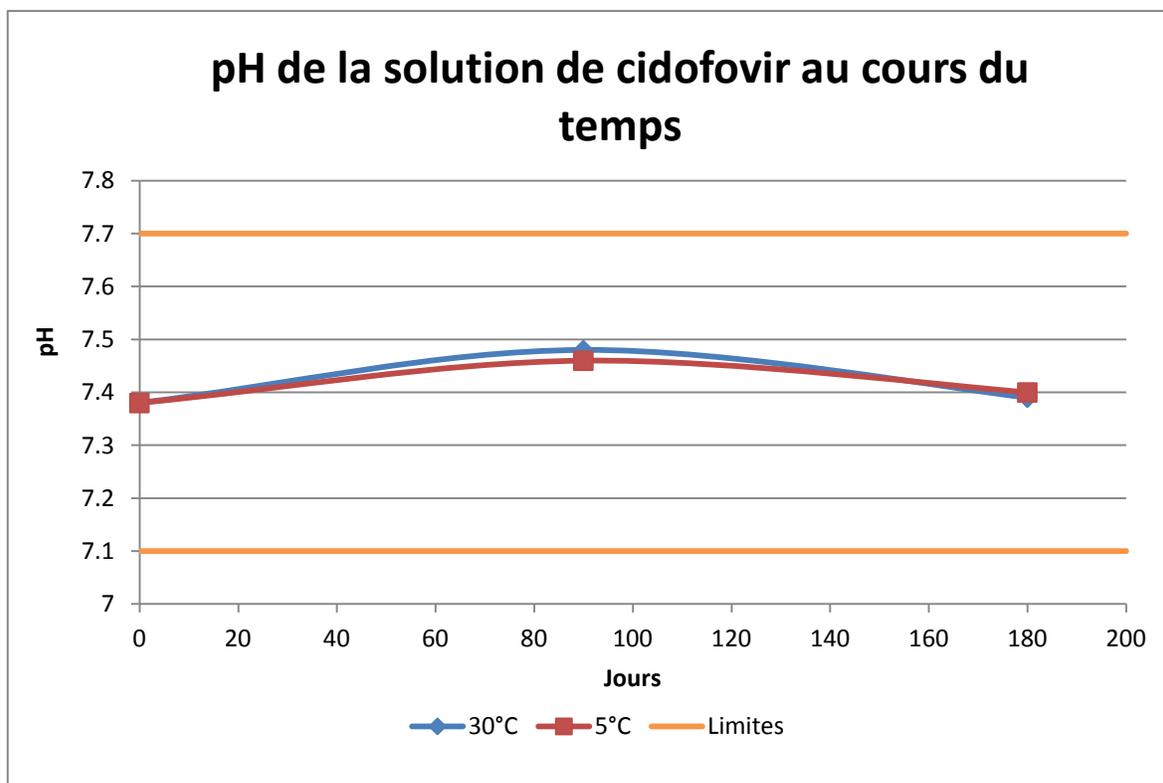


Figure 55 : Evolution du pH de la solution du cidofovir au cours du temps à différentes températures

Dosage du cidofovir

Les mesures de l'aire de l'analyte ont été relativisées par rapport à la concentration du standard interne ainsi que son temps de migration, afin de tenir compte de la différence de vitesse des composés lors de leur passage devant le détecteur.

Le graphique suivant (figure 56) illustre l'évolution de la concentration de cidofovir au cours du temps :

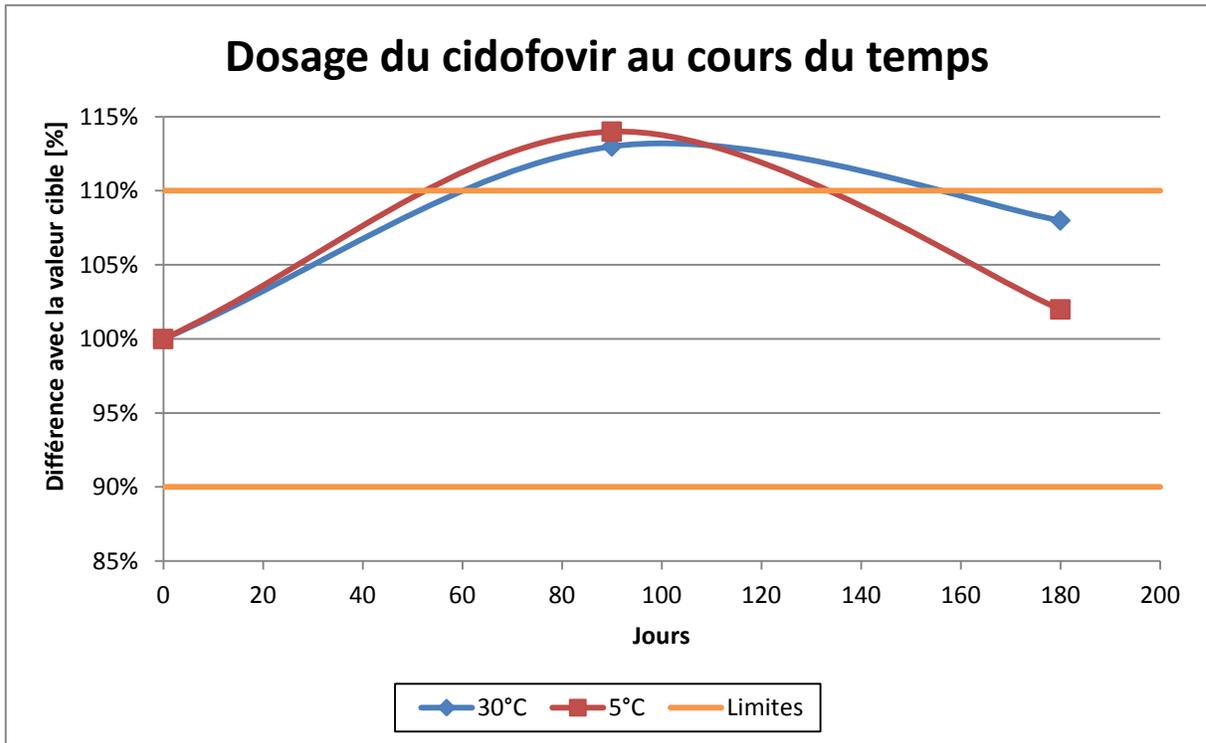


Figure 56 : Evolution de la concentration de la solution du cidofovir au cours du temps à différentes températures

Aucun pic de dégradation n'a été observé lors du dosage du cidofovir à J180 (figure 57).

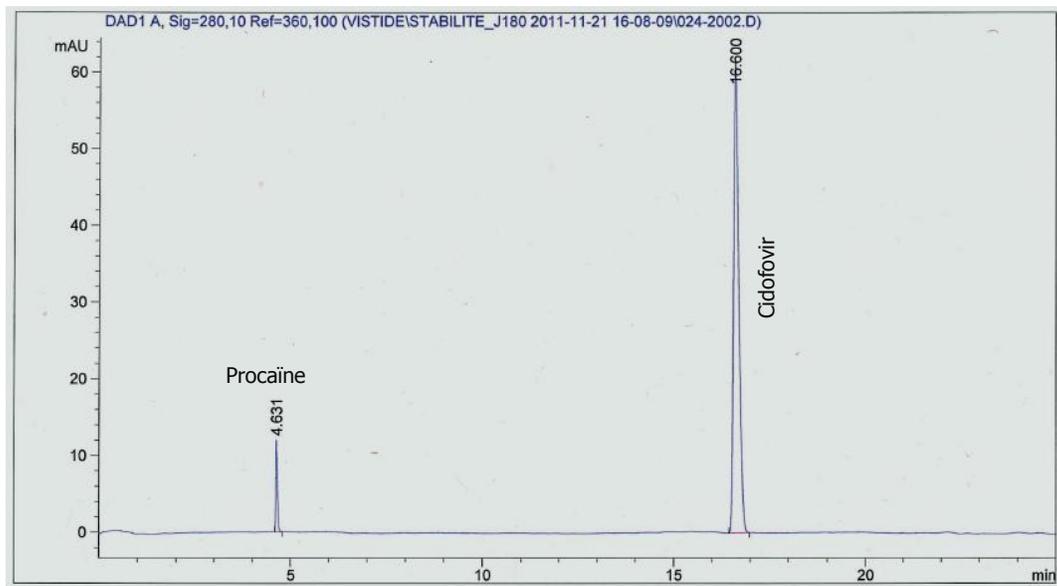


Figure 57 : Electrophorégramme d'un lot de cidofovir après 180 jours

Congélation du cidofovir

Les seringues conservées au frigo et analysées à J180 ont ensuite été congelées et la mesure du pH ainsi que le dosage ont été effectués à nouveau après congélation. Voici les résultats obtenus pour chacun des trois lots :

Tableau 27 : Effet de la congélation sur la solution de cidofovir

		Avant congélation	Après congélation	%
Contrôle visuel	P0K6H	C	C	/
	P0K6J	C	C	/
	P0K6K	C	C	/
Mesure du pH	P0K6H	7.4	7.402	100%
	P0K6J	7.408	7.389	100%
	P0K6K	7.398	7.385	100%
Concentration en cidofovir	P0K6H	8.302	9.533	115%
	P0K6J	8.325	9.569	115%
	P0K6K	8.139	8.887	109%

4.3.2 Discussion

La figure 56 montre clairement qu'à J90, la concentration de cidofovir est supérieure à celle autorisée pour une étude de stabilité. De plus, les résultats de dosage avant et après congélation présente une augmentation de 13% de la concentration après congélation. L'explication la plus plausible serait une perte en eau de la solution. Cependant, étant donné qu'à J180, la concentration redevient acceptable, cette explication ne semble pas être la bonne.

Le problème viendrait plutôt de la méthode analytique. En effet, avec une limite d'acceptation à 10%, il est possible que le résultat soit à 110% alors que la concentration est réellement à 100%. Il est donc nécessaire de valider des méthodes avec une limite à 5% même pour les études de stabilité. La méthode utilise un tampon phosphate à pH 1.6, alors que les capillaires usuels en silice supportent des pH entre 2 et 8. Ce tampon n'est donc pas adapté au capillaire utilisé et ceci peut, en partie du moins, expliquer la variabilité observée. Une des solutions serait de travailler à pH 2.5 et d'utiliser un capillaire enduit d'alcool polyvinylique, ce qui pourrait améliorer le coefficient de variation. En effet, il semble que le cidofovir soit en partie retenu sur les parois du capillaire. Il est aussi possible de reprendre les analyses en utilisant un tampon basique et d'essayer d'améliorer la méthode qui a été testée. La recherche d'une méthode adéquate va donc se poursuivre.

Ces résultats préliminaires montrent néanmoins que la solution de cidofovir semble stable sur 6 mois. En effet, le pH est resté dans les normes et aucun pic de dégradation n'a été

observé lors du dosage sur CE. Des tests supplémentaires sont cependant nécessaires pour confirmer ces données.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le questionnaire envoyé aux services de soins ainsi que la présentation faite aux infirmiers chefs a montré qu'il existait un réel besoin de solutions prêtes à l'emploi. Dans le cadre de ce travail, deux des trois CIVAS étudiés ont montré une stabilité acceptable sur six mois au moins.

La solution d'amiodarone 12.5 mg/mL est stable durant au moins six mois. Cependant, il ne sera pas possible de fabriquer en grande quantité cette solution de la même manière que celle réalisée lors de cette étude. En effet, pour la fabrication en routine, il faudra préparer une solution concentrée avant de la diluer pour obtenir la concentration désirée. Une étude de stabilité allégée devra donc être effectuée pour prouver que ce mode de fabrication n'a pas d'influence sur la stabilité de l'amiodarone. Les résultats obtenus montrent qu'un simple suivi du pH pourrait convenir. Toutefois, si une mesure de la concentration s'avérait nécessaire, la méthode validée peut être utilisée.

La solution de furosémide à 1 mg/mL peut dès à présent être fabriquée en petite série avec une date d'expiration à 6 mois, en attendant que l'analyse à une année soit terminée.

Finalement, il n'est pas possible de tirer de conclusions suite aux résultats obtenus sur la solution de cidofovir à 7.5 mg/mL. En effet, les limites de la méthode analytique n'ont pas permis de réaliser le dosage du cidofovir dans des limites d'acceptation appropriées. Comme les seringues ont été congelées, il est possible de continuer cette étude. Il est cependant nécessaire de développer une méthode analytique plus adaptée en utilisant, par exemple, un capillaire enduit d'alcool polyvinylique ou un tampon basique.

Dans ce travail, les solutions ont été conditionnées en fioles pour diverses raisons. Dans le service, les infirmiers devront donc prélever la totalité de la fiole dans une seringue de 50 mL afin d'administrer la solution avec un pousse-seringue. Les soignants devront

également coller une étiquette sur cette seringue et cette étape peut être une source d'erreur. Une des solutions serait de fournir une étiquette à appliquer sur la seringue avec chaque fiole afin limiter le risque de confusion lors de l'étiquetage de la solution.

Pour l'avenir, d'autres CIVAS pourront être mis en place en reprenant la liste obtenue suite à l'envoi du questionnaire aux ICUS. Pour chaque nouvelle préparation, une bonne communication sera nécessaire afin que les soignants soient tous clairement informés de ces nouveautés proposées par la pharmacie pour répondre à leurs besoins.

En conclusion, la mise à disposition de préparations prêtes à l'emploi permet d'améliorer la sécurisation du processus médicamenteux. Elle demande toutefois un investissement important en temps et des outils analytiques performants.

Les coûts de développement n'ont pas été évalués ici, mais ils sont loin d'être négligeables et les moyens de les répercuter sur les préparations elles-mêmes devront être évalués.

Ces différents éléments peuvent expliquer en partie la raison pour laquelle il n'y a que peu de CIVAS développés dans les hôpitaux Suisses. Il serait donc hautement souhaitable que les pharmacies d'hôpitaux collaborent dans le développement de formes prêtes à l'emploi non seulement en échangeant leur savoir, mais encore en mettant en place un réseau de centres qualifiés aptes fabriquer chacun quelques types de CIVAS qui pourraient être délivrés à tous les hôpitaux Suisses qui en auraient l'usage.

BIBLIOGRAPHIE

1. Kohn LT CJ, Donaldson MS. To err is human : building a safer health system Washington DC: National Academy Press; 1999.
2. Thomas EJ, Studdert DM, Newhouse JP, et al. Costs of medical injuries in Utah and Colorado. *Inquiry : a journal of medical care organization, provision and financing* 1999;36:255-64.
3. Brennan TA, Leape LL, Laird NM, et al. Incidence of adverse events and negligence in hospitalized patients. Results of the Harvard Medical Practice Study I. *The New England journal of medicine* 1991;324:370-6.
4. GSASA. *Gestion des risques : Bases et stratégies de la gsasa*; 2006.
5. Neale G, Woloshynowych M, Vincent C. Exploring the causes of adverse events in NHS hospital practice. *Journal of the Royal Society of Medicine* 2001;94:322-30.
6. Bates DW, Cullen DJ, Laird N, et al. Incidence of adverse drug events and potential adverse drug events. Implications for prevention. ADE Prevention Study Group. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 1995;274:29-34.
7. Wasserfallen J, Livio F, Buclin T, Tillet L, Yersin B, Biollaz J. Rate, type, and cost of adverse drug reactions in emergency department admissions. *European journal of internal medicine* 2001;12:442-7.
8. Bates DW, Leape LL, Petrycki S. Incidence and preventability of adverse drug events in hospitalized adults. *Journal of general internal medicine* 1993;8:289-94.
9. Fondation pour la sécurité des patients Projet DEM - SMM drug event monitoring : Sécurité des médicaments et de la médication dans les hôpitaux suisses; 2010.
10. Hardmeier B, Braunschweig S, Cavallaro M, et al. Adverse drug events caused by medication errors in medical inpatients. *Swiss medical weekly* 2004;134:664-70.
11. Fattinger K, Roos M, Vergeres P, et al. Epidemiology of drug exposure and adverse drug reactions in two swiss departments of internal medicine. *British journal of clinical pharmacology* 2000;49:158-67.
12. Krahenbuhl-Melcher A, Schlienger R, Lampert M, Haschke M, Drewe J, Krahenbuhl S. Drug-related problems in hospitals: a review of the recent literature. *Drug safety : an international journal of medical toxicology and drug experience* 2007;30:379-407.

13. Morgan N, Luo X, Fortner C, Frush K. Opportunities for performance improvement in relation to medication administration during pediatric stabilization. *Quality & safety in health care* 2006;15:179-83.
14. Schneider MP, Cotting J, Pannatier A. Evaluation of nurses' errors associated in the preparation and administration of medication in a pediatric intensive care unit. *Pharmacy world & science : PWS* 1998;20:178-82.
15. Golfier L. SC. Evaluation de l'étiquetage des seringues contenant les médicaments utilisés en anesthésie. *Risques et qualité* 2007;IV:159-66.
16. Cohen MR. Medication errors. 2nd ed: The American Pharmacists Association; 2007.
17. Leape LL, Bates DW, Cullen DJ, et al. Systems analysis of adverse drug events. ADE Prevention Study Group. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 1995;274:35-43.
18. Top-priority actions for preventing adverse drug events in hospitals. Recommendations of an expert panel. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists* 1996;53:747-51.
19. Understanding and preventing drug misadventures. Proceedings of a conference. Chantilly, Virginia, October 21-23, 1994. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists* 1995;52:369-416.
20. Schmitt E. Le risque médicamenteux nosocomial : circuit hospitalier du médicament et qualité des soins: Ed. Masson; 1999.
21. Bonnabry P. Cours de pharmacie hospitalière 3ème année : Flux du médicament à l'hôpital. 2011.
22. Wheeler DW, Degnan BA, Sehmi JS, Burnstein RM, Menon DK, Gupta AK. Variability in the concentrations of intravenous drug infusions prepared in a critical care unit. *Intensive care medicine* 2008;34:1441-7.
23. Tissot E, Cornette C, Demoly P, Jacquet M, Barale F, Capellier G. Medication errors at the administration stage in an intensive care unit. *Intensive care medicine* 1999;25:353-9.
24. Stucki C. Contribution à la sécurisation du processus de préparation des médicaments en anesthésiologie. Thèse N°4220: Université de Genève, section des Sciences Pharmaceutiques; 2010.
25. Ferner RE, Langford NJ, Anton C, Hutchings A, Bateman DN, Routledge PA. Random and systematic medication errors in routine clinical practice: a multicentre study of infusions, using acetylcysteine as an example. *British journal of clinical pharmacology* 2001;52:573-7.
26. Parshuram CS, Ng GY, Ho TK, et al. Discrepancies between ordered and delivered concentrations of opiate infusions in critical care. *Critical care medicine* 2003;31:2483-7.

27. Parshuram CS, To T, Seto W, Trope A, Koren G, Laupacis A. Systematic evaluation of errors occurring during the preparation of intravenous medication. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* 2008;178:42-8.
28. Parshuram CS, Dupuis LL, To T, Weitzman SS, Koren G, Laupacis A. Occurrence and impact of unanticipated variation in intravenous methotrexate dosing. *The Annals of pharmacotherapy* 2006;40:805-11.
29. van Grafhorst JP, Foudraine NA, Nootboom F, Crombach WH, Oldenhof NJ, van Doorne H. Unexpected high risk of contamination with staphylococci species attributable to standard preparation of syringes for continuous intravenous drug administration in a simulation model in intensive care units. *Critical care medicine* 2002;30:833-6.
30. Lye ST, Hwang NC. Glass particle contamination: is it here to stay? *Anaesthesia* 2003;58:93-4.
31. Brent BE, Jack T, Sasse M. In-line filtration of intravenous fluids retains 'spearhead'-shaped particles from the vascular system after open-heart surgery. *European heart journal* 2007;28:1192.
32. ASHP guidelines on preventing medication errors in hospitals. *American journal of hospital pharmacy* 1993;50:305-14.
33. Nemeck K, Kopelent-Frank H, Greif R. Standardization of infusion solutions to reduce the risk of incompatibility. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists* 2008;65:1648-54.
34. McDowell SE, Mt-Isa S, Ashby D, Ferner RE. Where errors occur in the preparation and administration of intravenous medicines: a systematic review and Bayesian analysis. *Quality & safety in health care* 2010;19:341-5.
35. Bullock J, Jordan D, Gawlinski A, Henneman EA. Standardizing IV infusion medication concentrations to reduce variability in medication errors. *Critical care nursing clinics of North America* 2006;18:515-21.
36. Cadman B PG. Reducing the risk of IV drug administration to the critically ill patient. *Hospital pharmacist* 1999;6:213-8.
37. Bonnabry P, Stucki C. La préparation centralisée de médicaments injectables. *Le moniteur hospitalier* 2011;237:1-14.
38. Needle R, Sizer T. *The CIVAS Handbook: Centralised Intravenous Additive Services* Reference: Pharmaceutical Press; 2005.
39. Breckenridge A, Woolfson AM. Drugs and intravenous fluids. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1984;289:637-8.
40. Pang FJ. Nurses like centralized I.V. additive service. *Hospital management* 1970;110:50-3.
41. Allwood MC. Practical guides. I: Central intravenous additive services. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics* 1994;19:137-45.
42. EMEA. ICH Topic Q 1 A : Stability Testing of new Drug Substances and Products; 2003.

43. EMA. ICH Topic Q6A : Specifications : Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products : Chemical Substances. 2000.
44. Pharmacopée européenne - 7ème édition: EDQM; 2010.
45. Trissel LA. Avoiding common flaws in stability and compatibility studies of injectable drugs. American journal of hospital pharmacy 1983;40:1159-60.
46. Hubert P, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapupez E, Chiap P, Chohen N. Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches. STP Pharma Pratiques 2003;13:101-38.
47. Hubert P, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal--Part I. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis 2004;36:579-86.
48. Hubert P, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal--part III. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis 2007;45:82-96.
49. Hubert P, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal--part II. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis 2007;45:70-81.
50. P. F. SURF : Guide thérapeutique de médecine interne & diagnostique différentiel selon INVESTI-MED 2006.
51. Micromedex 2.0. (Accessed at www.thomsonhc.com/hcs/librerian.)
52. UpToDate. (Accessed at www.uptodate.com.)
53. Compendium Suisse des médicaments online. (Accessed at www.kompendium.ch.)
54. Ferrero JD. Pharmacologie : programme des 2e/3e années de Médecine de Genève et Lausanne: Université de Genève; 2006.
55. Schorderet M. Pharmacologie : Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques: Frison-Roche; 1998.
56. Rang HP, Dalde MM. Rang and Dale's Pharmacology: Elsevier; 2012.
57. Intravenous amiodarone. The Medical letter on drugs and therapeutics 1995;37:114-5.
58. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. (Accessed at www.medicinescomplete.com/mc/clarke.)
59. ChemIDplus Advanced. (Accessed at chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus.)
60. The Merck Index - 12ème édition: Merck Research Laboratories; 1996.
61. Collège universitaire des Enseignants en Néphrologie. Visité le 26.10.2011. (Accessed at <http://cuen.fr/umvf/IMG/gif/DIU-FIG3.gif>.)
62. Valera F, Maldonato L, Lima J, et al. Efficacy of cidofovir in recurrent juvenile respiratory papillomatosis. Brazilian journal of otorhinolaryngology 2010;76:713-7.

63. Van Cutsem E, Snoeck R, Van Ranst M, et al. Successful treatment of a squamous papilloma of the hypopharynx-esophagus by local injections of (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine. *Journal of medical virology* 1995;45:230-5.
64. Good LM, Miller MD, High WA. Intralesional agents in the management of cutaneous malignancy: a review. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2011;64:413-22.
65. Soma MA, Albert DM. Cidofovir: to use or not to use? *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery* 2008;16:86-90.
66. Skoog, West, Holler. *Chimie analytique: De Boeck*; 1997.
67. Rouessac F. *Analyse chimique - Méthodes et techniques instrumentales modernes: Dunod*; 2004.
68. Kellner R. *Analytical Chemistry : A Modern Approach to Analytical Science: Wiley*; 2004.
69. James AT, Martin AJ. Liquid-gas partition chromatography. *The Biochemical journal* 1951;48:vii.
70. Jorgenson JW, Lukacs KD. Free-zone electrophoresis in glass capillaries. *Clinical chemistry* 1981;27:1551-3.
71. Laboratoire. Suisse d'analyse du dopage. *L'électrophorèse capillaire*; 2009.
72. Watzig H, Gunter S. Capillary electrophoresis-a high performance analytical separation technique. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 2003;41:724-38.
73. Marina ML, Rios A. *Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis: Elsevier*; 2005.
74. Kemp G. Capillary electrophoresis: a versatile family of analytical techniques. *Biotechnology and applied biochemistry* 1998;27 (Pt 1):9-17.
75. Dossier Technique : Cordarone (amiodarone).
76. Somberg JC, Cao W, Cvetanovic I, Ranade V, Molnar J. Pharmacology and toxicology of a new aqueous formulation of intravenous amiodarone (Amio-Aqueous) compared with Cordarone IV. *American journal of therapeutics* 2005;12:9-16.
77. Gallik DM, Singer I, Meissner MD, Molnar J, Somberg JC. Hemodynamic and surface electrocardiographic effects of a new aqueous formulation of intravenous amiodarone. *The American journal of cardiology* 2002;90:964-8.
78. Souney PF, Cooper WD, Cushing DJ. PM101: intravenous amiodarone formulation changes can improve medication safety. *Expert opinion on drug safety* 2010;9:319-33.
79. Compounding today. (Accessed at <http://compoundingtoday.com/>.)
80. Khan MA, Kumar S, Jayachandran J, Vartak SV. Validation of a Stability Indicating LC Method for Amiodarone HCL and Related Substances. *Chromatographia* 2005;61:599-607.

81. Guillaume D, Heinisch S, Rocca JL. Effect of temperature in reversed phase liquid chromatography. *Journal of chromatography A* 2004;1052:39-51.
82. U.S. Pharmacopeia : The Official Compendia of Standards - 31ème édition; 2008.
83. Asker AF, Ferdous AJ. Photodegradation of furosemide solutions. *PDA journal of pharmaceutical science and technology / PDA* 1996;50:158-62.
84. Donnelly RF. Chemical Stability of Furosemide in Minibags and Polypropylene Syringes. *International of Pharmaceutical Compounding* 2002;6:468-70.
85. Hennere G, Havard L, Bonan B, Prognon P. Stability of cidofovir in extemporaneously prepared syringes. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists* 2005;62:506-9.
86. Yuan LC, Samuels GJ, Visor GC. Stability of cidofovir in 0.9% sodium chloride injection and in 5% dextrose injection. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists* 1996;53:1939-43.
87. Ennis RD, Dahl TC. Stability of cidofovir in 0.9% sodium chloride injection for five days. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists* 1997;54:2204-6.
88. Oliyai R, Lee WA, Visor GC, Yuan LC. Enhanced chemical stability of the intracellular prodrug, 1-(((S)-2-hydroxy-2-oxo-1,4,2-dioxaphosphorinan-5-yl)methyl)cytosine, relative to its parent compound, cidofovir. *International journal of pharmaceutics* 1999;179:257-65.
89. Prammar YV. Chemical Stability of Amiodarone Hydrochloride in Intravenous Fluids. *International of Pharmaceutical Compounding* 1997;1:347-8.
90. Marcoz N. Etude de stabilité des solutions injectables d'amiodarone. 2003.
91. Pharmacopée Helvétique - 10ème Edition ; 2006.
92. Stiles J, Gwin W, Pogranichniy R. Stability of 0.5% cidofovir stored under various conditions for up to 6 months. *Veterinary ophthalmology* 2010;13:275-7.
93. Troitzky A, Tirault M, Lefeuvre S, Lepage B, Debaene B. [Physico-chemical stability and sterility of non-opioid analgesics in solution]. *Annales francaises d'anesthesie et de reanimation* 2008;27:813-8.

ANNEXES

- I. Questionnaire envoyé aux ICUS de chaque service afin de connaître leurs besoins en CIVAS
- II. Résultats du questionnaire sur les besoins en CIVAS des différentes unités de soins
- III. Cartes d'identité des agents thérapeutiques étudiés
- IV. Fabrication de l'amiodarone pour l'étude préliminaire
- V. Choix du protocole de validation selon la SFSTP
- VI. Protocole de l'étude de stabilité à un an pour l'amiodarone
- VII. Protocole de l'étude de stabilité à un an pour le furosémide
- VIII. Protocole de l'étude de stabilité à un an pour le cidofovir
- IX. Rapport Enoval pour la prévalidation de l'amiodarone
- X. Rapport Enoval pour la validation de l'amiodarone
- XI. Résultats de l'étude de stabilité pour les solutions d'amiodarone
- XII. Rapport Enoval pour la prévalidation du furosémide
- XIII. Rapport Enoval pour la validation du furosémide
- XIV. Résultats de l'étude de stabilité pour les solutions de furosémide
- XV. Rapport Enoval pour la prévalidation du cidofovir
- XVI. Rapport Enoval pour la validation du cidofovir
- XVII. Résultats de l'étude de stabilité de les solutions de cidofovir

ANNEXE I

Questionnaire envoyé aux ICUS de chaque service afin de connaître leurs besoins en CIVAS

CIVAS

Ces quelques questions vont nous permettre d'évaluer l'utilité et la faisabilité de vos demandes.

* Required

*Dans quel service travaillez-vous? **

*Quelle est votre fonction? **

Continue »

Powered by [Google Docs](#)

[Report Abuse](#) - [Terms of Service](#) - [Additional Terms](#)

CIVAS

* Required

Choix des substances *

Indiquez trois principes actifs, les diluants, la concentration, le volume et le contenant des préparations que vous souhaiteriez avoir sous forme de CIVAS (ex. amiodarone dans glucose 5% 12.5mg/ml 50ml en seringue)

Indication *

Précisez l'indication de chacune des préparations souhaitées

Raisons du choix *

Indiquez pour chaque préparation les raisons qui vous poussent à faire cette demande (ex. risque, coût, difficulté de préparation,...)

CIVAS

Risque d'erreur avec la préparation 1

Actuellement, à quel degré évaluez-vous le risque d'erreur?

- Elevé
- Moyen
- Faible

Risque d'erreur avec la préparation 2

Actuellement, à quel degré évaluez-vous le risque d'erreur?

- Elevé
- Moyen
- Faible

Risque d'erreur avec la préparation 3

Actuellement, à quel degré évaluez-vous le risque d'erreur?

- Elevé
- Moyen
- Faible

Potentiel d'économie avec la préparation 1

A quel degré évaluez vous le potentiel d'économie?

- Elevé
- Moyen
- Faible

Potentiel d'économie avec la préparation 2

A quel degré évaluez vous le potentiel d'économie?

- Elevé
- Moyen
- Faible

Potentiel d'économie avec la préparation 3

A quel degré évaluez vous le potentiel d'économie?

- Elevé
- Moyen
- Faible

Evaluation de la quantité pour la préparation 1

A combien évaluez-vous le nombre annuel de seringues pour votre service?

- < 100
- 100-200
- 200-500
- 500-1000
- > 1000

Evaluation de la quantité pour la préparation 2

A combien évaluez-vous le nombre annuel de seringues pour votre service?

- < 100
- 100-200
- 200-500
- 500-1000
- > 1000

Evaluation de la quantité pour la préparation 3

A combien évaluez-vous le nombre annuel de seringues pour votre service?

- < 100
- 100-200

200-500 500-1000 > 1000

Commentaires

Coordonnées

Merci d'indiquer vos coordonnées afin que nous puissions vous contactez si nécessaire

Powered by [Google Docs](#)

[Report Abuse](#) - [Terms of Service](#) - [Additional Terms](#)

ANNEXE II

Résultats du questionnaire sur les besoins en CIVAS des différentes unités de soins

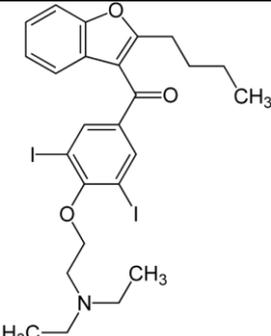
Principe actif	Concentration	Diluant	Volume total	Service	Remarques	Qté	Stabilité
Liquémine	12500 UI/30 ml	G5%	30 ml	SMIA		> 1000	21 jours
Liquémine	12500 UI/30 ml	G5%	30 ml	SMIA		> 1000	
Liquémine	12500 UI/30 ml	G5%	30 ml	SMIA		> 1000	
Liquémine	Selon protocole étage?			NCHH		500 - 1000	
Liquémine	27500 UI/30 ml	NaCl 0.9%	30 ml	OTPH, RUHH		< 100	21 jours
Liquémine	12500 UI/30 ml	NaCl 0.9%	30 ml	CHVH		> 1000	
Liquémine	12500 UI/30 ml	NaCl 0.9%	30 ml	UROH		< 100	
Liquémine	12500 UI/30 ml	NaCl 0.9%	30 ml	TRAH		200 - 500	
Liquémine	20000 UI/50 ml	?	50 ml	Med		?	
Liquémine	20000 UI/50 ml	G5%	50 ml	URG		200-500	
Adrénaline	0.1 mg/ml	G5%	10 ml	SMIA	Kit		
Adrénaline	1mg/ml	-	?	CARH	Pas de dilution		
Adrénaline	0.1 mg/ml	G5%	10 ml	SMIA	Kit		
Adrénaline	0.1mg/ml	G5%	10 ml	SMIA	Kit		
Adrénaline	0.1 mg/ml	?	10 ml	ALG	Kit		
Atropine	0.5 mg/ml	-	?	CARH	Pas de dilution		
Atropine	0.5 mg/ml	-	3 ml	SMIA	Pas de dilution		
KCl	10 mmol/ml	-	50 ml	SMIA	Pas de dilution		
KCl	10 mmol/ml	-	50 ml	SMIA	Pas de dilution		
KCl	10 mmol/ml	-	50 ml	SMIA	Pas de dilution		
KCl	20 meq dans 90 ml	NaCl 0.9%	90 ml ?	MINK	Dilution non standard	200 - 500	

ANNEXE II

Principe actif	Concentration	Diluant	Volume total	Service	Remarques	Qté	Stabilité
Lasix	1mg/ml	G5%	40 ml	SMIA		> 1000	84 jours
Lasix	1mg/ml	NaCl 0.9%	40 ml	TRAH		100 - 200	
Lasix	40 mg/52 ml	NaCl 0.9%	52 ml	MINK		< 100	
Lasix	1mg/ml	NaCl 0.9%	40ml	URG		200-500	
Tazobac	45 mg/ml	NaCl 0.9%	100 ml	MINK		200 - 500	17 jours
Tazobac	?	NaCl 0.9%	50 ml	CHVH		> 1000	
Nexium	0.4 mg/ml	NaCl 0.9%	100 ml	GYN		< 100	12h
Nexium	0.8 mg/ml	NaCl 0.9%	50 ml	GYN		< 100	
Nexium	4 mg/ml	NaCl 0.9%	10 ml	CHVH		> 1000	
Ferinject	500 mg dans 250 ml	NaCl 0.9%	?	GYN		< 100	
Ferinject	1 g dans 250 ml	NaCl 0.9%	?	GYN		< 100	
Ondansetron	4 mg dans 100 ml	NaCl 0.9%	?	GYN		100 - 200	90 jours
Minalgine	1 g dans 100 ml	NaCl 0.9%	?	GYN		?	4 jours
Epirubicine	1mg/ml	NaCl 0.9%	?	UROH		< 100	150 jours
Hexvix	85 mg	solvent	50 ml	UROH	Solvant fourni avec l'Hexvix	< 100	
Phenylephrine	0.1 mg/ml	?	10 ml	ALG	Fabriqué aux HUG	> 1000	
Phenylephrine	0.1 mg/ml	NaCl 0.9%	100 ml	URG			
Remifentanyl	0.06 mg/ml	?	20 ml	ALG		> 1000	24h
Remifentanyl	0.06 mg/ml	?	50 ml	ALG		> 1000	
Actrapid	1UI/ml	G5%	50ml	SMIA	Fabriqué aux HUG		
Actrapid	1UI/ml	G5%	50ml	SMIA	Fabriqué aux HUG		
NaCl	0.90%	-	20 ml	SMIA			
Nozinan	pur	-	5mg	Soins pal	Pas de dilution		
Pegasyis	90ug/0.5ml	-	0.5ml	CMA	Pas de dilution		
Noradrénaline	0.06 mg/ml	G5%	50 ml	URG		200-500	
Clonazépam	0.04 mg/ml	G5%	50 ml	URG			
Octréotide	0.025 mg/ml	NaCl 0.9%	40 ml	URG			

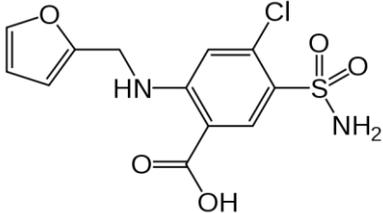
ANNEXE III

3.1 Carte d'identité de l'amiodarone hydrochloride

Nom	Amiodarone hydrochloride
Formule brute	$C_{25}H_{29}I_2NO_3$
Masse molaire	645.3
Formule développée	
Usage	Antiarythmique de classe III
Effets secondaires	Hypotension, photosensibilité, hypothyroïdisme
Concentration d'utilisation	Entre 2 mg/ml et 12.5 mg/ml
Toxicité	Ingestion accidentelle : nausée, vomissement, battements cardiaques irréguliers, atteinte des poumons. Contact : irritation
Fournisseur	Pharmaserv
Caractères organoleptiques	
Aspect, couleur	Poudre blanche
Caractères physico-chimiques	
Point de fusion	159°C
Solubilité	Totalement soluble dans le chloroforme et le méthanol, soluble dans l'acétone et le dioxyde. Peu soluble dans l'eau (0.07g/100ml à 25°C).
pKa	6.5
Stabilité	Dégradation par la lumière et l'oxydation
Caractères pharmacologiques	
ATC	C01BD01
$T_{1/2}$	20 à 100 jours
Vd	60 l/kg
Cl rénale	négligeable
Liaison aux protéines plasmatiques	96%

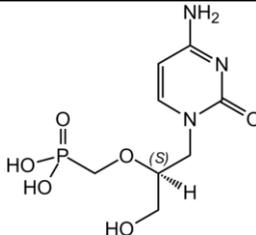
ANNEXE III

3.2 Carte d'identité du furosémide

Nom	5-(aminosulfonyl)-4-chloro-2-[(2-furanylméthyl)amino]benzoic acid
Formule brute	$C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$
Masse molaire	330.7
Formule développée	
Usage	Diurétique de l'anse
Effets secondaires	Hypokaliémie, alcalose métabolique, hypomagnésémie, rétention d'acide urique et hyperglycémie
Concentration d'utilisation	Entre 1 mg/ml et 10mg/ml
Toxicité	Irritant
Fournisseur	Fagron
Caractères organoleptiques	
Aspect, couleur	Poudre cristalline blanche à légèrement jaune
Caractères physico-chimiques	
Point de fusion	206°C
Solubilité	Peu soluble dans l'eau, le chloroforme et l'éther. Soluble dans l'acétone et le méthanol ainsi que dans les solutions aqueuses à pH \approx 8
pKa	3.9
Stabilité	Dégradation par la lumière et en milieu acide
Osmolarité	270-300 mosm/kg
Caractères pharmacologiques	
ATC	C03CA01
$T_{1/2}$	0.5 - 2h
Vd	0.2 L/Kg
Cl rénale	50 - 80%
Liaison aux protéines plasmatiques	91-99%

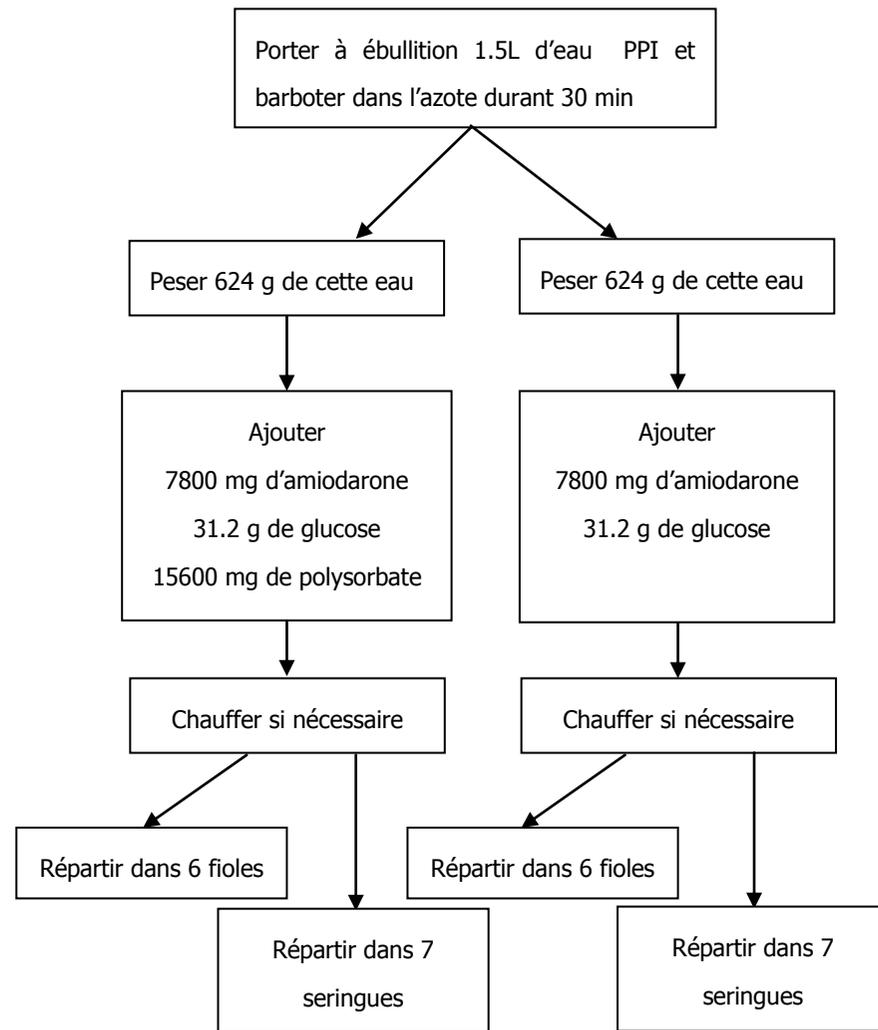
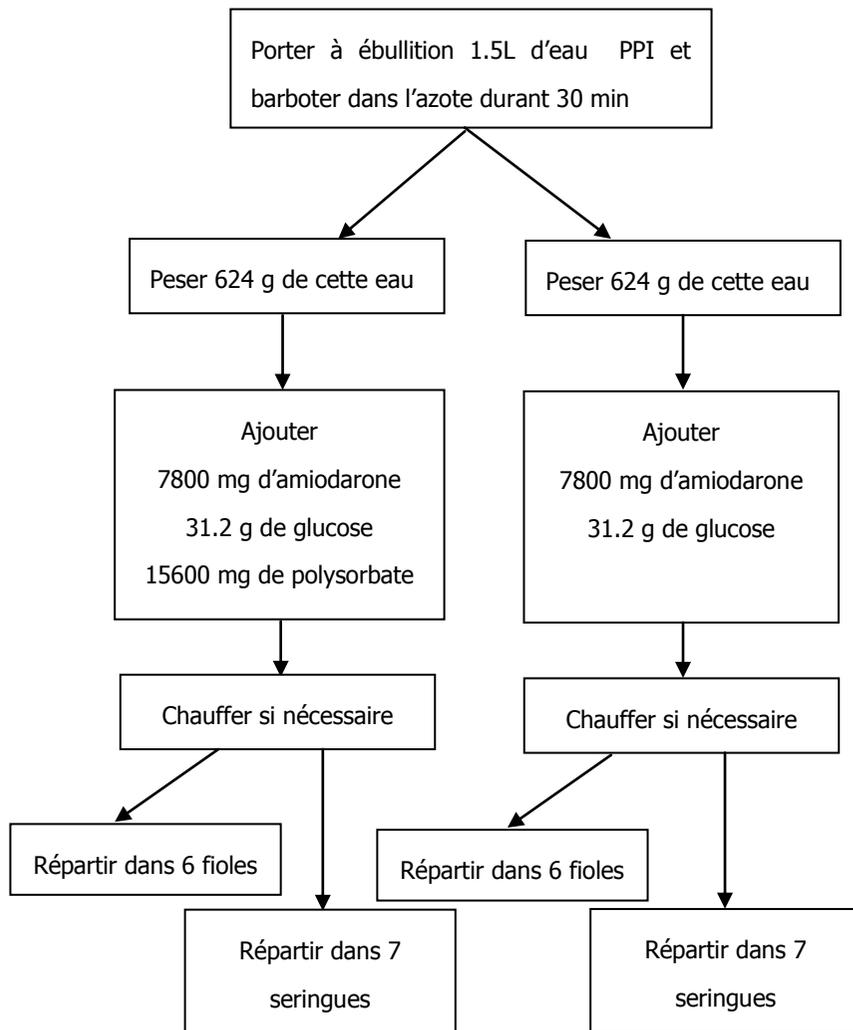
ANNEXE III

3.3 Carte d'identité du cidofovir

Nom	(S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonyl-methoxypropyl)cytosine
Formule brute	C ₈ H ₁₄ N ₃ O ₆ P
Masse molaire	279.2
Formule développée	
Usage	Antiviral
Effets secondaires	Neutropénie, céphalées, dyspnée, nausées, vomissements, alopecie, protéinurie, insuffisance rénale
Concentration d'utilisation	5mg/kg dans 100 ml de NaCl 0.9%
Toxicité	Cytotoxique R : 40/62/63/68 S : 23/36/37/53
Fournisseur	Gilead Science
Caractères organoleptiques	
Aspect, couleur	Poudre blanche duveteuse
Caractères physico-chimiques	
Point de fusion	260°C
Solubilité	Soluble dans l'eau à 170 g/l
pKa	pKa ₁ = 1.7 (acide phosphorique) pKa ₂ = 4.7 (cytosine base) pKa ₃ = 6.9 (acide phosphorique)
Stabilité	Stable
Osmolarité	240 - 393 mosm/kg
Caractères pharmacologiques	
ATC	J05AB12
T _{1/2}	2.5 h
Vd	0.50 L/kg
Cl rénale	80 – 100%
Liaison aux protéines plasmatiques	< 6%

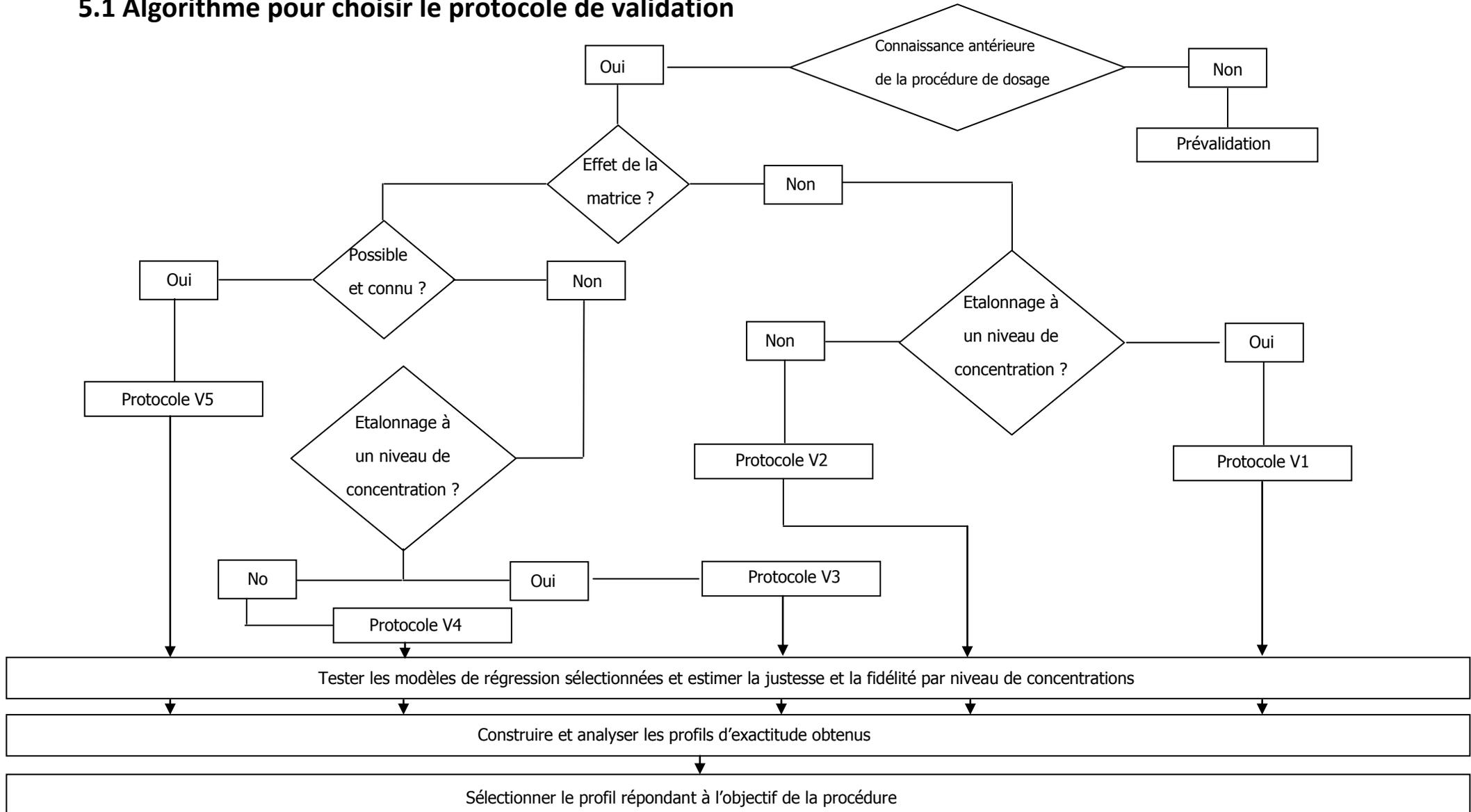
ANNEXE IV

Fabrication de l'amiodarone pour l'étude préliminaire



ANNEXE V

5.1 Algorithme pour choisir le protocole de validation



ANNEXE V

5.2 Protocoles de validation proposés par la SFSTP

Standards	Niveau de concentration	Protocole				
		V1	V2	V3	V4	V5
SE Etalonnage sans la matrice	Bas		2		2	
	Médian	2	2	2	2	
	Haut	2	2	2	2	
SE Etalonnage avec la matrice	Bas				2	2
	Médian			2	2	2
	Haut			2	2	2
	Additionnel					2a
SV validation avec la matrice	Bas	3	3	3	3	3
	Médian	3	3	3	3	3
	Haut	3	3	3	3	3
Nbre minimum de séries		3	3	3	3	3
Nbre total d'essais (min)		33	45	39	63	45

a) Addition d'un niveau de concentration supplémentaire pour une fonction de réponse nécessitant un modèle plus complexe

ANNEXE VI

Protocole de l'étude de stabilité à un an pour l'amiodarone

Processus COQ.05	PROTOCOLE			Elaboré par SBER
Code A-	ETUDE STABILITE AMIODARONE			Validé par LBER
Version -0.0				Libéré par RCHI
Remplace NOUVEAU	S'applique à PHA8	Dossier ---	Article ---	Diffusé le ---

1. OBJET

Ce protocole décrit le plan de l'étude de stabilité de l'amiodarone à 12.5mg/ml en fiole de 48 ml.

2. DOMAINE D'APPLICATION

Cette instruction s'applique à tout le personnel travaillant au laboratoire CQ et FAB 9

3. DEFINITIONS

-

4. RESPONSABILITES

FAB 9 :

Rédiger le plan de l'étude de stabilité en collaboration avec PHA8.

Fabriquer le produit.

PHA 8 :

Collecter les échantillons et réaliser les analyses suivantes (aspect visuel, pH, osmolarité, dosage de l'amiodarone, particules, essai de stérilité, endotoxines) selon les méthodes analytiques en vigueur.

5. DOCUMENTS ET TEXTES DE REFERENCE

ICH, Q1A(R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products

ICH, Q1C: Stability Testing for New Dosage Forms

ICH, Q4B: Evaluation and Recommendation of Pharmacopoeial Texts for Use in the ICH Regions

ICH, Q6A: Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances.

ICH, Q6B: Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for ICH, Biotechnological/Biological Products.

S.T.P Pharma pratiques 4(4)233-254, 1994

6. DOCUMENTS ASSOCIES

I-0592, I-0969, I-1016

7. DEROULEMENT

7.1 Composition et description des lots

Composition

Amiodarone : 12.5 mg/ml

Polysorbate 80 : 25 mg/ml

Glucose 5% : ad 48 ml

Description des lots

Tableaux 1 : Description des lots

Formule commerciale avec barbotage dans l'azote de 30 min sans stabilisation			
No de lot	P0KDU	P0KDV	P0KDW
Date de fabrication	15.06.2011	15.06.2011	15.06.2011
Site de fabrication	Pharmacie du CHUV	Pharmacie du CHUV	Pharmacie du CHUV
Taille du lot	35	35	35
Emballage	Fiole	Fiole	Fiole
Quantité par seringues	48 ml	48 ml	48 ml

Processus COQ.05		PROTOCOLE			Elaboré par SBER
Code I-	Version 01	ETUDE STABILITE AMIODARONE			Validé par LBER

Formule commerciale avec barbotage dans l'azote de 30 min stabilisé 15 min à 60°C			
No de lot	P0K DQ	P0K DR	P0K DS
Date de fabrication	15.06.2011	15.06.2011	15.06.2011
Site de fabrication	Pharmacie du CHUV	Pharmacie du CHUV	Pharmacie du CHUV
Taille du lot	35	35	35
Emballage	Fiole	Fiole	Fiole
Quantité par seringues	48 ml	48 ml	48 ml

7.2 Plan de stabilité

La stabilité à long terme sera étudiée selon le plan ci-dessous.

Tableau 2 : Plan de stabilité

Conditions de conservation	Points de contrôle en jours				
	30	60	120	180	360
Température ambiante	x	x	x	x	x
5°C ± 3°C	x	x	x	x	x
-20°C ± 5°C	-	-	-	-	-

x : à tester, - : pas à tester, [x] : test en option

7.3 Tests analytiques et spécifications du produit

Les tests analytiques et les exigences suivantes seront évalués pour la qualité et la stabilité du produit :

Tableau 3 : Spécifications

Tests Analytiques	Exigences
Aspect visuel (coloration, trouble, précipité)	Solution limpide, incolore
pH	3.5 - 4.5
Osmolarité	± 10% de l'osmolarité de départ
Amiodarone	11.25 mg/ml < 12.5 mg/ml < 13.75 mg/ml
Particules	La préparation satisfait à l'essai si le nombre moyen des particules dans les unités examinées de taille : 1) ≥ 10 µm est < 6000 particules/ml 2) ≥ 25 µm est < 600 particules/ml
Essai de stérilité	Culture stérile
Endotoxines	12.5 UI/ml

Tableaux 4 : Plan de stabilité aux différentes conditions de stockage pour les fioles

Formulation commerciale avec barbotage dans l'azote de 30 min sans stabilisation						
Stabilité à 30°C et à 65% d'humidité						
T0 + x jours	0	30	60	120	180	360
Dates planifiées	15.06.11	15.07.11	15.08.11	15.10.11	15.12.11	15.6.11
Tests analytiques						
Aspect visuel	1	1	1	1	1	1
pH						
Osmolarité						
Amiodarone						
Particules						
Essai de stérilité	4	/	/	/	4	4
Endotoxines						
Nbre de fioles	5	1	1	1	5	5
Sous-total						18

Processus COQ.05		PROTOCOLE				Elaboré par SBER	
Code I-	Version 01	ETUDE STABILITE AMIODARONE				Validé par LBER	

Formulation commerciale avec barbotage dans l'azote de 30 min sans stabilisation						
Stabilité à 5°C ± 3°C						
T0 + x jours	0	30	60	120	180	360
Dates planifiées	15.06.11	15.07.11	15.08.11	15.10.11	15.12.11	15.6.11
Tests analytiques						
Aspect visuel	/	1	1	1	1	1
pH	/					
Osmolarité	/					
Amiodarone	/					
Particules	/	/	/	/	4	4
Essai de stérilité	/	/	/	/		
Endotoxines	/	/	/	/		
Nbre de fioles	0	1	1	1	5	5
Sous-total						13

Formulation commerciale avec barbotage dans l'azote de 30 min stabilisée 15 min à 60°C						
Stabilité à 30°C et à 65% d'humidité						
T0 + x jours	0	30	60	120	180	360
Dates planifiées	15.06.11	15.07.11	15.08.11	15.10.11	15.12.11	15.6.11
Tests analytiques						
Aspect visuel	1	1	1	1	1	1
pH						
Osmolarité						
Amiodarone						
Particules	/	/	/	4	4	
Essai de stérilité	/	/	/			
Endotoxines	/	/	/			
Nbre de fioles	5	1	1	1	5	5
Sous-total						18

Formulation commerciale avec barbotage dans l'azote de 30 min stabilisée 15 min à 60°C						
Stabilité à 5°C ± 3°C						
T0 + x jours	0	30	60	120	180	360
Dates planifiées	15.06.11	15.07.11	15.08.11	15.10.11	15.12.11	15.6.11
Tests analytiques						
Aspect visuel	/	1	1	1	1	1
pH	/					
Osmolarité	/					
Amiodarone	/					
Particules	/	/	/	/	4	4
Essai de stérilité	/	/	/	/		
Endotoxines	/	/	/	/		
Nbre de fioles	0	1	1	1	5	5
Sous-total						13

ANNEXE VII

Protocole de l'étude de stabilité à un an pour le furosémide

Processus COQ.05	PROTOCOLE			Elaboré par SBER
Code A-	ETUDE STABILITE FUROSEMIDE			Validé par LBER
Version -0.0				Libéré par RCHI
Remplace NOUVEAU	S'applique à PHA8	Dossier ---	Article ---	Diffusé le ---

1. OBJET

Ce protocole décrit le plan de l'étude de stabilité furosémide à 1 mg/ml dans des fioles de 40 ml.

2. DOMAINE D'APPLICATION

Cette instruction s'applique à tout le personnel travaillant au laboratoire CQ

3. DEFINITIONS

-

4. RESPONSABILITES

QC :

Rédiger le plan de l'étude de stabilité en collaboration avec PHA8.

Fabriquer le produit.

Collecter les échantillons et réaliser les analyses suivantes (aspect visuel, pH, dosage du cidofovir, particules, essai de stérilité, endotoxines) selon les méthodes analytiques en vigueur.

5. DOCUMENTS ET TEXTES DE REFERENCE

ICH, Q1A(R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products

ICH, Q1C: Stability Testing for New Dosage Forms

ICH, Q4B: Evaluation and Recommendation of Pharmacopoeial Texts for Use in the ICH Regions

ICH, Q6A: Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances.

ICH, Q6B: Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for ICH, Biotechnological/Biological Products.

S.T.P Pharma pratiques 4(4)233-254, 1994

6. DOCUMENTS ASSOCIES

I-0592, I-0969, I-1016

7. DEROULEMENT

7.1 Composition et description des lots

Composition

Furosémide : 1 mg/ml

HCl 2M : qs

NaOH 2M : qs

NaCl 0.9% : ad 40 ml

Description des lots

Tableau 1 : Description des lots

No de lot	P0KF6	P0KFC	P0KFD
Date de fabrication	17.06.2011	17.06.2011	17.06.2011
Site de fabrication	Pharmacie du CHUV	Pharmacie du CHUV	Pharmacie du CHUV
Taille du lot	36	36	36
Emballage	Fioles	Fioles	Fioles
Quantité par fioles	40 ml	40 ml	40 ml

Processus COQ.05		PROTOCOLE	Elaboré par SBER
Code I-	Version 01	ETUDE STABILITE FUROSEMIDE	Validé par LBER

7.2 Plan de stabilité

La stabilité à long terme sera étudiée selon le plan ci-dessous.

Tableau 2 : Plan de stabilité

Conditions de conservation	Points de contrôle en jours		
	90	180	360
35°C et 65% d'humidité	x	x	x
5°C ± 3°C	x	x	x
-20°C ± 5°C	x	x	x

x : à tester, - : pas à tester, [x] : test en option

7.3 Tests analytiques et spécifications du produit

Les tests analytiques et les exigences suivantes seront évalués pour la qualité et la stabilité du produit :

Tableau 3 : Spécifications

Tests Analytiques	Exigences
Aspect visuel (coloration, trouble, précipité)	Solution limpide, incolore
pH	8 - 9.3
Osmolarité	± 10% de l'osmolarité de départ
Furosémide	0.9 mg/ml < 1 mg/ml < 1.1 mg/ml
Particules	La préparation satisfait à l'essai si le nombre moyen des particules dans les unités examinées de taille : 1) ≥ 10 µm est < 6000 particules/ml 2) ≥ 25 µm est < 600 particules/ml
Essai de stérilité	Culture stérile
Endotoxines	< 3.6 UI/ml

Tableau 4 : Plan de stabilité aux différentes conditions de stockage

Stabilité à 30°C et à 65% d'humidité				
T0 + x jours	0	90	180	360
Dates planifiées	17.06.2011	17.09.2011	17.12.2011	17.06.2012
<i>Tests analytiques</i>				
Particules	1	/	1	1
Aspect visuel		1		
pH				
Osmolarité				
Furosémide	4	/	2	4
Endotoxines		/		
Essai de stérilité				
Nbre de fioles	5	1	3	5
Sous-total			14	

Processus COQ.05		PROTOCOLE		Elaboré par SBER
Code I-	Version 01	ETUDE STABILITE FUROSEMIDE		Validé par LBER

Stabilité à 5°C ± 3°C				
T0 + x jours	0	90	180	360
Dates planifiées	17.06.2011	17.09.2011	17.12.2011	17.06.2012
<i>Tests analytiques</i>				
Particules	/	/		
Aspect visuel	/	1	1	1
pH	/			
Osmolarité	/			
Furosémide	/			
Endotoxines	/	/	2	
Essai de stérilité	/	/		4
Nbre de fioles	0	1	3	5
Sous-total			9	

Stabilité à - 20°C ± 5°C				
T0 + x jours	0	90	180	360
Dates planifiées	17.06.2011	17.09.2011	17.12.2011	17.06.2012
<i>Tests analytiques</i>				
Particules	/	/		
Aspect visuel	/	1	1	1
pH	/			
Osmolarité	/			
Furosémide	/			
Endotoxines	/	/	2	
Essai de stérilité	/	/		4
Nbre de fioles	0	1	3	5
Sous-total			9	

ANNEXE VIII

Protocole de l'étude de stabilité à un an pour le cidofovir

Processus COQ.05	PROTOCOLE			Elaboré par SBER
Code A-	ETUDE STABILITE CIDOFOVIR			Validé par LBER
Version -0.0				Libéré par RCHI
Remplace NOUVEAU	S'applique à PHA8	Dossier ---	Article ---	Diffusé le ---

1. OBJET

Ce protocole décrit le plan de l'étude de stabilité du cidofovir à 7.5 mg/ml conditionné en seringues de 3.3 ml.

2. DOMAINE D'APPLICATION

Cette instruction s'applique à tout le personnel travaillant au laboratoire CQ et à FAB 9

3. DEFINITIONS

-

4. RESPONSABILITES

FAB 9 :

Rédiger le plan de l'étude de stabilité en collaboration avec PHA 8.

Fabriquer le produit.

Collecter les échantillons et réaliser les analyses suivantes (aspect visuel, pH, dosage du cidofovir, particules, essai de stérilité, endotoxines) selon les méthodes analytiques en vigueur.

5. DOCUMENTS ET TEXTES DE REFERENCE

ICH, Q1A(R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products

ICH, Q1C: Stability Testing for New Dosage Forms

ICH, Q4B: Evaluation and Recommendation of Pharmacopoeial Texts for Use in the ICH Regions

ICH, Q6A: Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances.

ICH, Q6B: Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for ICH, Biotechnological/Biological Products.

S.T.P Pharma pratiques 4(4)233-254, 1994

6. DOCUMENTS ASSOCIES

I-0592, I-0969, I-1016

7. DEROULEMENT

7.1 Composition et description des lots

Composition

Cidofovir : 7.5 mg/ml

NaCl 0.9% : ad 3.3 ml

Description des lots

Tableau 1 : Description des lots

No de lot	POK6K	POH6H	POK6J
Date de fabrication	20.05.2011	20.05.2011	20.05.2011
Site de fabrication	Pharmacie du CHUV	Pharmacie du CHUV	Pharmacie du CHUV
Taille du lot	60 (= 4 fioles)	60 (= 4 fioles)	60 (= 4 fioles)
Emballage	Seringues	Seringues	Seringues
Quantité par seringues	3.3ml	3.3ml	3.3ml

Processus COQ.05		PROTOCOLE		Elaboré par SBER
Code I-	Version 01	ETUDE STABILITE CIDOFOVIR		Validé par LBER

7.2 Plan de stabilité

La stabilité à long terme sera étudiée selon le plan ci-dessous.

Tableau 2 : Plan de stabilité

Conditions de conservation	Points de contrôle en jours		
	90	180	360
35°C et 65% d'humidité	x	x	x
5°C ± 3°C	x	x	x
-20°C ± 5°C	-	-	x

x : à tester, - : pas à tester, [x] : test en option

7.3 Tests analytiques et spécifications du produit

Les tests analytiques et les exigences suivantes seront évalués pour la qualité et la stabilité du produit :

Tableau 3 : Spécifications

Tests Analytiques	Exigences
Aspect visuel (coloration, trouble, précipité)	Solution limpide, incolore
pH	7.1 – 7.7
Cidofovir	6.75 mg/ml < 7.5 mg/ml < 8.25 mg/ml
Particules	La préparation satisfait à l'essai si le nombre moyen des particules dans les unités examinées de taille : 1) ≥ 10 µm est < 6000 particules/ml 2) ≥ 25 µm est < 600 particules/ml
Essai de stérilité	Culture stérile
Endotoxines	< 0.5 UI/ml

Tableau 4 : Plan de stabilité aux différentes conditions de stockage

Stabilité à 30°C et à 65% d'humidité				
T0 + x jours	0	90	180	360
Dates planifiées	20.05.2011	20.08.2011	20.11.2011	20.05.2012
<i>Tests analytiques</i>				
Particules	25 ml (8 seringues)	/	/	25 ml (8 seringues)
Aspect visuel		1	1	
pH				
cidofovir		1	1	
Endotoxines	4	/	/	4
Essai de stérilité	13	/	/	4
Nbre de seringues		1	1	13
Sous-total			28 seringues (= 2 fioles à 75mg/ml)	

Stabilité à 5°C ± 3°C				
T0 + x jours	0	90	180	360
Dates planifiées	20.05.2011	20.08.2011	20.11.2011	20.05.2012
<i>Tests analytiques</i>				
Particules	/	/	/	25 ml (8 seringues)
Aspect visuel	/	1	1	
pH	/			
cidofovir	/	1	1	
Endotoxines	/	/	/	1
Essai de stérilité	/	/	/	4
Nbre de seringues	0	1	1	13
Sous-total			15 seringues (= 1 fioles à 75mg/ml)	

Processus COQ.05		PROTOCOLE		Elaboré par SBER
Code I-	Version 01	ETUDE STABILITE CIDOFOVIR		Validé par LBER

Stabilité à - 20°C ± 5°C				
T0 + x jours	0	90	180	360
Dates planifiées	20.05.2011	20.08.2011	20.11.2011	20.05.2012
<i>Tests analytiques</i>				
Particules	/	/	/	25 ml (8 seringues)
Aspect visuel	/	/	/	
pH	/	/	/	
cidofovir	/	1	1	1
Endotoxines	/	/	/	4
Essai de stérilité	/	/	/	13
Nbre de seringues	0	1	1	13
Sous-total			15 seringues (= 1 fioles à 75mg/ml)	

ANNEXE IX

Rapport Enoval pour la prévalidation de l'amiodarone



Nom: Lina Berger
Société: HOSPICES CANTONAU
Département: -
Phase: Prévalidation, non destiné à la validation
Numéro de référence: Annexe 3

1 / 25

PREVALIDATION DU DOSAGE DE L'AMIODARONE PAR HPLC

Nom: Lina Berger
Société: HOSPICES CANTONAU
Département: -
Phase: Prévalidation, non destiné à la validation
Numéro de référence: Annexe 3
Méthode: HPLC DAD
Protocole: Annexe 3
Produit: Amiodarone 12.5 mg/ml
Composé: Amiodarone
Matrice: Polysorbate 80 et glucose 5%



Nom: Lina Berger
Société: HOSPICES CANTONAU
Département: -
Phase: Prévalidation, non destiné à la validation
Numéro de référence: Annexe 3

2 / 25

Table des matières

1. Introduction.....	4
2. Plan d'expériences.....	5
3. Fonction de réponse.....	6
4. Justesse.....	10
5. Fidélité.....	11
6. Exactitude.....	13
7. Linéarité des résultats.....	16
8. Limite de détection (LD), limites de quantification (LQ) et intervalle de dosage..	18
Annexe 1 Données.....	19
Annexe 2 Concentrations calculées pour le modèle sélectionné.....	22
Annexe 3 Diagnostics.....	23

Table des tableaux

Tableau I - Standards d'étalonnage.....	5
Tableau II - Modèles d'étalonnage triés par 'Indice d'Exactitude'.....	6
Tableau III - Paramètres de régression.....	7
Tableau IV - Justesse.....	10
Tableau V - Répétabilité et Fidélité intermédiaire relatives.....	11
Tableau VI - Répétabilité et Fidélité Intermédiaire absolues.....	11
Tableau VII - Limite supérieure de confiance à 95%.....	11
Tableau VIII - Taux de recouvrement par série.....	11
Tableau IX - Exactitude de la méthode obtenue en considérant le modèle Régression quadratique pondérée ($1/X^2$)	15
Tableau X - Standards d'étalonnage (hors matrice).....	19
Tableau XI - Standards d'étalonnage (dans la matrice).....	19
Tableau XII - Alignement des données ¹	20
Tableau XIII - Concentrations calculées ¹	22
Tableau XIV - Test de Levène.....	23
Tableau XV - Test de manque d'ajustement du modèle de régression linéaire sélectionné pour l'étalonnage.....	23
Tableau XVI - Résidus standardisés pour le modèle d'étalonnage choisi.....	23

Table des figures

Figure 1 - Courbes d'étalonnage.....	8
---	---



Figure 2 - Profil d'exactitude obtenu en considérant le modèle: Régression quadratique pondérée ($1/X^2$)	13
Figure 3 - Profil de risque obtenu en considérant le modèle: Régression quadratique pondérée ($1/X^2$)	14
Figure 4 - Relation entre les concentrations introduites et calculées.....	16
Figure 5 - Graphe de linearité.....	17
Figure 6 - Résidus standardisés.....	24



PREVALIDATION DU DOSAGE DE L'AMIODARONE PAR HPLC

1. Introduction

Les critères de prévalidation 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.



2. Plan d'expériences

Tableau I - Standards d'étalonnage

A. Hors matrice.

Série	Niveau de concentration (ug/ml)	Nb. de répétitions
1	1.0	2
1	2.0	2
1	3.0	2
2	1.0	2
2	2.0	2
2	3.0	2
3	1.0	2
3	2.0	2
3	3.0	2

Le nombre total d'observations est 18.

B. Dans la matrice.

Série	Niveau de concentration (ug/ml)	Nb. de répétitions
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

Le nombre total d'observations est 27.

Toutes les données sont reprises dans l'annexe 1.



3. Fonction de réponse

Le tableau II reprend les modèles de régression sélectionnés. Ces modèles ont été triés en fonction de leur "indice d'exactitude".

Tableau II - Modèles d'étalonnage triés par 'Indice d'Exactitude'

Modèle	Indice d'Exactitude	Limite inférieure et supérieure de quantification (LQ) (ug/ml)	Indice d'Intervalle de Dosage	Indice de Fidélité	Indice de Justesse
Regression quadratique ponderee (1/X^2) (dans la matrice)	0.8290	[49.96 , 74.94]	1.000	0.5697	1.0000
Regression quadratique (dans la matrice)	0.8290	[49.96 , 74.94]	1.000	0.5697	1.0000
Regression quadratique ponderee (1/X) (dans la matrice)	0.8290	[49.96 , 74.94]	1.000	0.5697	1.0000
Regression lineaire ponderee (1/X^2) (dans la matrice)	0.8265	[49.96 , 74.94]	1.000	0.5652	0.9991
Regression lineaire ponderee (1/X) (dans la matrice)	0.8263	[49.96 , 74.94]	1.000	0.5647	0.9990
Regression lineaire (dans la matrice)	0.8260	[49.96 , 74.94]	1.000	0.5641	0.9990
Regression lineaire apres transformation racine carree (dans la matrice)	0.8259	[49.96 , 74.94]	1.000	0.5641	0.9987
Regression lineaire apres transformation logarithmique (dans la matrice)	0.8258	[49.96 , 74.94]	1.000	0.5642	0.9983
Regression lineaire passant par 0 ajustee en utilisant uniquement le niveau 3 (dans la matrice)	0.7905	[50.88 , 74.94]	0.9634	0.5544	0.9250
Regression lineaire passant par 0 ajustee en utilisant uniquement le niveau 1.0 (dans la matrice)	0.7437	[49.96 , 71.47]	0.8613	0.5402	0.8842



Modèle	Indice d'Exactitude	Limite inférieure et supérieure de quantification (LQ) (ug/ml)	Indice d'Intervalle de Dosage	Indice de Fidélité	Indice de Justesse
Regression lineaire passant par 0 ajustee en utilisant uniquement le niveau 3 (hors matrice)	0	ND	0	0	0
Regression lineaire (hors matrice)	0	ND	0	0	0
Regression lineaire ponderee (1/X) (hors matrice)	0	ND	0	0	0
Regression lineaire ponderee (1/X^2) (hors matrice)	0	ND	0	0	0
Regression lineaire apres transformation logarithmique (hors matrice)	0	ND	0	0	0
Regression lineaire apres transformation racine carree (hors matrice)	0	ND	0	0	0
Regression quadratique (hors matrice)	0	ND	0	0	0
Regression quadratique ponderee (1/X) (hors matrice)	0	ND	0	0	0
Regression quadratique ponderee (1/X^2) (hors matrice)	0	ND	0	0	0
Regression lineaire passant par 0 ajustee en utilisant uniquement le niveau 1.0 (hors matrice)	0	ND	0	0	0

Le modèle d'étalonnage sélectionné est: **Régression quadratique pondérée (1/X²) (dans la matrice)**.

Tableau III - Paramètres de régression

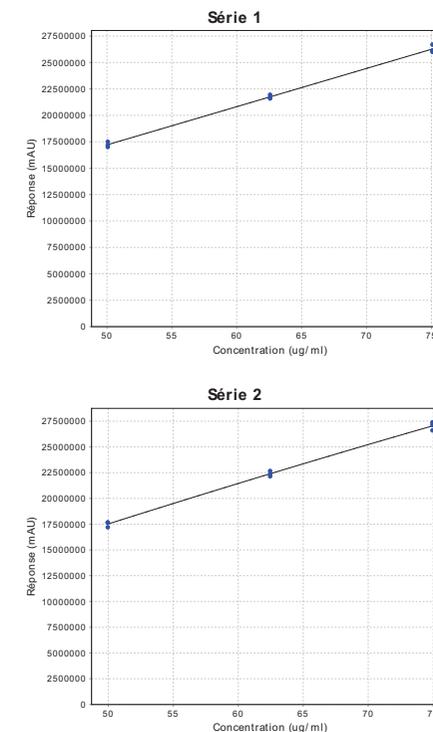
Série	Ordonnée à l'origine	Pente	Terme Quadratique	r ²	d.d.l. résiduels	SCR
1	-7.6977E+05	3.5794E+05	31.36	0.9963	6	4.5751E+11
2	-4.3848E+06	4.7615E+05	-758.9	0.9957	6	5.8255E+11

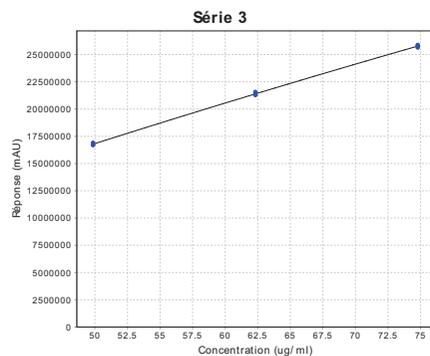


Série	Ordonnée à l'origine	Pente	Terme Quadratique	r ²	d.d.l. résiduels	SCR
3	-3.9808E+06	4.5331E+05	-741.2	0.9992	6	9.2716E+10

r² = coefficient de détermination; d.d.l. = degrés de liberté; SCR = somme des carrés des résidus

Figure 1 - Courbes d'étalonnage





4. Justesse

Tableau IV - Justesse

Niveau de concentration (ug/ml)	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Moyenne des concentrations calculées (ug/ml)	Biais absolu (ug/ml)	Biais relatif (%)	Taux de recouvrement (%)	Intervalle de confiance à 95% des Recouvrements (%)
1.0	49.96	49.97	0.007003	0.01402	100.0	[99.25 , 100.8]
2.0	62.45	62.46	0.01083	0.01734	100.0	[99.44 , 100.6]
3.0	74.94	74.95	0.01656	0.02210	100.0	[99.25 , 100.8]



5. Fidélité

Tableau V - Répétabilité et Fidélité intermédiaire relatives

Niveau de concentration (ug/ml)	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Répétabilité (CV%)*	Fidélité Intermédiaire (CV%)*
1.0	49.96	0.9980	0.9980
2.0	62.45	0.7545	0.7545
3.0	74.94	1.011	1.011

* 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 VI - Répétabilité et Fidélité Intermédiaire absolues

Niveau de concentration (ug/ml)	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Répétabilité (SD - ug/ml)	Inter-Séries (SD - ug/ml)	Ratio des composants de la variance (Inter / Intra)	Fidélité Intermédiaire (SD - ug/ml)
1.0	49.96	0.4986	0	0	0.4986
2.0	62.45	0.4712	0	0	0.4712
3.0	74.94	0.7574	0	0	0.7574

Tableau VII - Limite supérieure de confiance à 95%

Niveau de concentration (ug/ml)	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Limite supérieure de confiance à 95% de la répétabilité (SD - ug/ml)	Limite supérieure de confiance à 95% de la fidélité intermédiaire (SD - ug/ml)
1.0	49.96	0.8531	0.8531
2.0	62.45	0.8062	0.8062
3.0	74.94	1.296	1.296

Tableau VIII - Taux de recouvrement par série

Niveau de concentration (ug/ml)	Série	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Concentration calculée (ug/ml)	Taux de recouvrement (%)
1.0	1	50.06	49.96	100.0
1.0	2	49.96	49.96	100.00
1.0	3	49.86	49.98	100.0
1.0	Moyenne des series	49.96	49.97	100.0



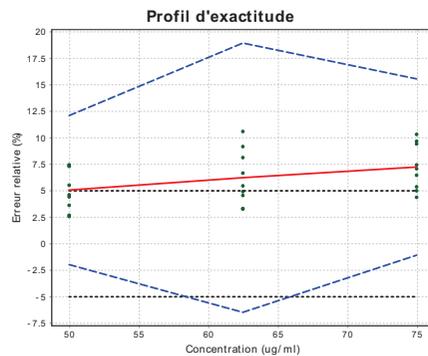
Niveau de concentration (ug/ml)	Série	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Concentration calculée (ug/ml)	Taux de recouvrement (%)
2.0	1	62.57	62.45	100.0
2.0	2	62.46	62.45	100.00
2.0	3	62.32	62.48	100.1
2.0	Moyenne des series	62.45	62.46	100.0
3.0	1	75.08	74.94	100.0
3.0	2	74.95	74.93	100.00
3.0	3	74.78	74.99	100.1
3.0	Moyenne des series	74.94	74.95	100.0



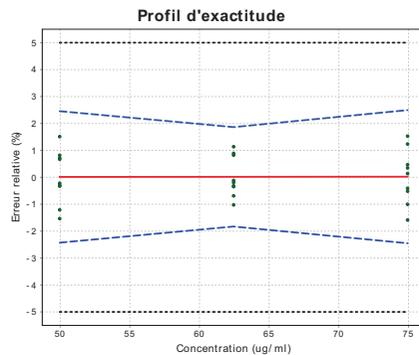
6. Exactitude

Figure 2 - Profil d'exactitude obtenu en considérant le modèle: Régression quadratique pondérée (1/X²)

A. Hors matrice.



B. Dans la matrice.



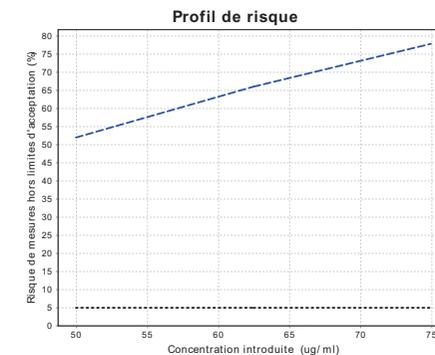
La ligne rouge continue représente le biais, les lignes discontinues bleues définissent les limites de l'intervalle de tolérance attendu au niveau β et les lignes pointillées noires sont les limites d'acceptation. Les points sont quant à eux l'erreur relative des concentrations calculées et sont représentés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



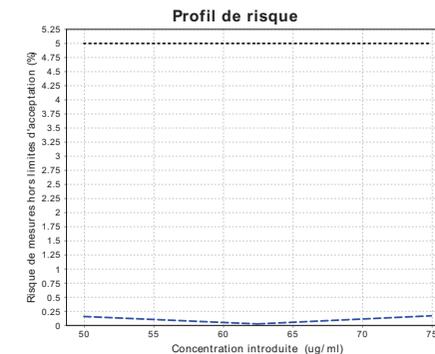
Les limites inférieures et supérieures de l'intervalle de tolérance exprimées en erreur relative sont également présentées dans le tableau IX pour chaque niveau de concentration introduit. Le risque d'avoir des mesures en dehors des limites d'acceptation à chaque niveau est calculé uniquement s'il y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

Figure 3 - Profil de risque obtenu en considérant le modèle: Régression quadratique pondérée (1/X²)

A. Hors matrice.



B. Dans la matrice.



La ligne pointillée noire représente le niveau de risque maximum choisi, à savoir : 5.0%.



Tableau IX - Exactitude de la méthode obtenue en considérant le modèle Régression quadratique pondérée (1/X²)

A. Hors matrice.

Niveau de concentration (ug/ml)	Moyenne des concentrations introduites ¹ (ug/ml)	Beta-expectation tolerance limit (ug/ml)	Beta-expectation tolerance limit relatif (%)	Risque ² (%)
1.0	49.96	[48.98 , 56.01]	[-1.965 , 12.10]	51.98
2.0	62.45	[58.41 , 74.28]	[-6.468 , 18.94]	66.02
3.0	74.94	[74.13 , 86.60]	[-1.076 , 15.56]	77.85

B. Dans la matrice.

Niveau de Concentration (ug/ml)	Moyenne des concentrations introduites ¹ (ug/ml)	Beta-expectation tolerance limit (ug/ml)	Beta-expectation tolerance limit relatif (%)	Risque ² (%)
1.0	49.96	[48.75 , 51.19]	[-2.428 , 2.456]	0.1592
2.0	62.45	[61.30 , 63.61]	[-1.829 , 1.863]	0.02748
3.0	74.94	[73.10 , 76.81]	[-2.451 , 2.495]	0.1717

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.



7. Linéarité des résultats

$$Y = -0.01244 + 1.000 X$$

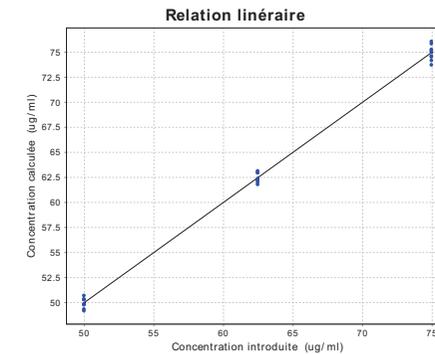
où Y = concentrations calculées (ug/ml)

et X = concentrations introduites (ug/ml)

Le coefficient de détermination (r²) est égal à 0.9970 .

La somme des carrés des résidus (SCR) est égale à 8.354 .

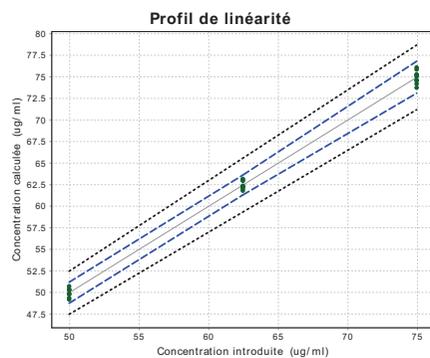
Figure 4 - Relation entre les concentrations introduites et calculées



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 5.



Figure 5 - 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 "β-expectation tolerance limits" exprimées en valeur absolue.



8. Limite de détection (LD), limites de quantification (LQ) et intervalle de dosage

LD (ug/ml) = 6.831

Limite inférieure de quantification (LQ_{Inf}) (ug/ml) = 49.96

Limite supérieure de quantification (LQ_{Sup}) (ug/ml) = 74.94

ANNEXE X

Rapport Enoval pour la validation de l'amiodarone



Nom: Lina Berger
Société: HOSPICES CANTONAU
Département: -
Phase: Validation
Numéro de référence: Annexe 4

1 / 43

VALIDATION DU DOSAGE DE L'AMIODARONE PAR HPLC

Nom: Lina Berger
Société: HOSPICES CANTONAU
Département: -
Phase: Validation
Numéro de référence: Annexe 4
Méthode: HPLC DAD
Protocole: Annexe 4
Produit: Amiodarone 12.5 mg/ml
Composé: Amiodarone
Matrice: Polysorbate 80 et glucose 5%



Nom: Lina Berger
Société: HOSPICES CANTONAU
Département: -
Phase: Validation
Numéro de référence: Annexe 4

2 / 43

Table des matières

1. Introduction.....	5
2. Plan d'expériences.....	6
3. Fonction de réponse.....	8
4. Justesse.....	11
5. Fidélité.....	12
6. Incertitude de mesure.....	14
7. Exactitude.....	15
8. Linéarité des résultats.....	17
9. Limite de détection (LD), limites de quantification (LQ) et intervalle de dosage..	19
10. Références bibliographiques.....	20
Annexe 1 Données.....	22
Annexe 2 Sélection du modèle d'étalonnage.....	25
Annexe 3 Concentrations calculées pour le modèle sélectionné.....	34
Annexe 4 Diagnostics.....	35
Annexe 5 Statistiques.....	36
Annexe 6 Résumé.....	40

Table des tableaux

Tableau I - Standards d'étalonnage.....	6
Tableau II - Standards de Validation.....	6
Tableau III - Modèles d'étalonnage triés par 'Indice d'Exactitude'.....	8
Tableau IV - Paramètres de régression.....	9
Tableau V - Justesse.....	11
Tableau VI - Répétabilité et Fidélité intermédiaire relatives.....	12
Tableau VII - Répétabilité et Fidélité Intermédiaire absolues.....	12
Tableau VIII - Limite supérieure de confiance à 95%.....	12
Tableau IX - Taux de recouvrement par série.....	13
Tableau X - Incertitude.....	14
Tableau XI - Exactitude de la méthode obtenue en considérant le modèle Régression linéaire passant par 0 Ajustée en utilisant uniquement le niveau le plus haut	16
Tableau XII - Standards d'étalonnage.....	22
Tableau XIII - Standards de Validation.....	22
Tableau XIV - Alignement des données ¹	23
Tableau XV - Justesse de la méthode et exactitude obtenues en considérant une Régression linéaire	25



Tableau XVI - Justesse de la méthode et exactitude obtenues en considérant une Régression linéaire pondérée ($1/X^2$)	26
Tableau XVII - Justesse de la méthode et exactitude obtenues en considérant une Régression linéaire après transformation logarithmique	27
Tableau XVIII - Justesse de la méthode et exactitude obtenues en considérant une Régression linéaire après transformation racine carrée	28
Tableau XIX - Justesse de la méthode et exactitude obtenues en considérant une Régression linéaire pondérée ($1/X$)	29
Tableau XX - Justesse de la méthode et exactitude obtenues en considérant une Régression quadratique	30
Tableau XXI - Justesse de la méthode et exactitude obtenues en considérant une Régression quadratique pondérée ($1/X$)	31
Tableau XXII - Justesse de la méthode et exactitude obtenues en considérant une Régression quadratique pondérée ($1/X^2$)	32
Tableau XXIII - Justesse de la méthode et exactitude obtenues en considérant une Régression linéaire passant par 0 Ajusté en utilisant uniquement le niveau 1.0	33
Tableau XXIV - Concentrations calculées ¹	34
Tableau XXV - Résidus standardisés pour le modèle d'étalonnage choisi.....	35

Table des figures

Figure 1 - Courbes d'étalonnage.....	9
Figure 2 - Profil d'exactitude obtenu en considérant le modèle: Régression linéaire passant par 0 Ajustée en utilisant uniquement le niveau le plus haut	15
Figure 3 - Profil de risque obtenu en considérant le modèle: Régression linéaire passant par 0 Ajustée en utilisant uniquement le niveau le plus haut	16
Figure 4 - Relation entre les concentrations introduites et calculées.....	17
Figure 5 - Graphe de linearité.....	18
Figure 6 - Profil d'Exactitude obtenu en considérant une Régression linéaire	25
Figure 7 - Profil d'Exactitude obtenu en considérant une Régression linéaire pondérée ($1/X^2$)	26
Figure 8 - Profil d'Exactitude obtenu en considérant une Régression linéaire après transformation logarithmique	27
Figure 9 - Profil d'Exactitude obtenu en considérant une Régression linéaire après transformation racine carrée	28
Figure 10 - Profil d'Exactitude obtenu en considérant une Régression linéaire pondérée ($1/X$)	29
Figure 11 - Profil d'Exactitude obtenu en considérant une Régression quadratique	30



Figure 12 - Profil d'Exactitude obtenu en considérant une Régression quadratique pondérée ($1/X$)	31
Figure 13 - Profil d'Exactitude obtenu en considérant une Régression quadratique pondérée ($1/X^2$)	32
Figure 14 - Profil d'Exactitude obtenu en considérant une Régression linéaire passant par 0 Ajusté en utilisant uniquement le niveau 1.0	33
Figure 15 - Résidus standardisés.....	35



VALIDATION DU DOSAGE DE L'AMIODARONE PAR HPLC

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.



2. Plan d'expériences

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 : Polysorbate 80 et glucose 5%

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

Tableau I - Standards d'étalonnage

Série	Niveaux de concentration (ug/ml)	Nb. de répétitions
1	1.0	2
1	2.0	2
1	3.0	2
2	1.0	2
2	2.0	2
2	3.0	2
3	1.0	2
3	2.0	2
3	3.0	2

Le nombre total d'observations est 18.

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 II reprend le nombre de standards de validation par niveau de concentration, les niveaux de concentration considérés et les différentes séries réalisées.

Tableau II - 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



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

Le nombre total d'observations est 27.

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



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 III reprend les modèles de régression sélectionnés. Ces modèles ont été triés en fonction de leur "indice d'exactitude" (cfr. annexe 2).

Tableau III - Modèles d'étalonnage triés par 'Indice d'Exactitude'

Modèle	Indice d'Exactitude	Limite inférieure et supérieure de quantification (ug/ml)	Indice d'Intervalle de Dosage	Indice de Fidélité	Indice de Justesse
Regression linéaire passant par 0 ajustée en utilisant uniquement le niveau 3	0.7847	[49.96 , 74.94]	1.000	0.5033	0.9601
Regression lineaire	0.7491	[51.03 , 74.94]	0.9570	0.4613	0.9522
Regression lineaire ponderee (1/X^2)	0.7466	[49.96 , 74.94]	1.000	0.4372	0.9520
Regression lineaire apres transformation logarithmique	0.7453	[49.96 , 74.94]	1.000	0.4353	0.9512
Regression lineaire apres transformation racine carree	0.7450	[50.19 , 74.94]	0.9910	0.4385	0.9516
Regression lineaire ponderee (1/X)	0.7442	[49.98 , 74.94]	0.9993	0.4333	0.9520
Regression quadratique ponderee (1/X^2)	0.7222	[49.96 , 74.94]	1.000	0.3968	0.9491
Regression quadratique ponderee (1/X)	0.7222	[49.96 , 74.94]	1.000	0.3968	0.9491
Regression quadratique	0.7222	[49.96 , 74.94]	1.000	0.3968	0.9491
Regression linéaire passant par 0 ajustée en utilisant uniquement le niveau 1.0	0.2933	[49.96 , 50.88]	0.03670	0.9722	0.7074



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 passant par 0 ajustée en utilisant uniquement le niveau 3**

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

$$Y = bX$$

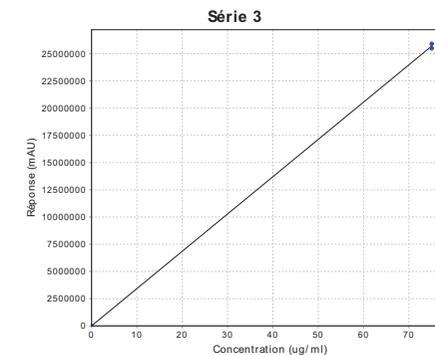
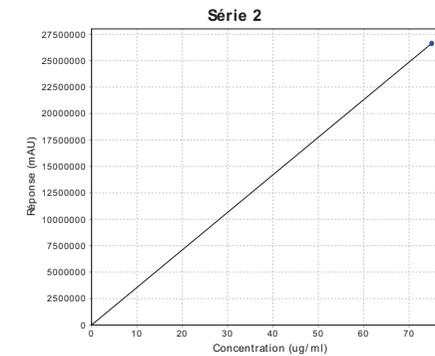
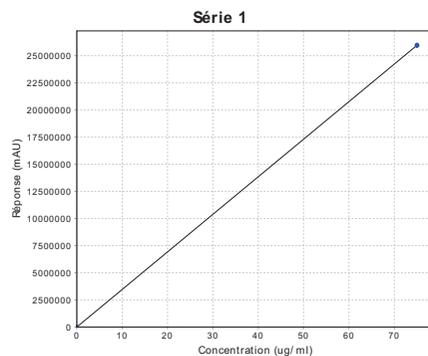
où Y = réponse analytique (en mAU) et X = concentration introduite (en ug/ml)

Tableau IV - Paramètres de régression

Série	Pente	r ²	d.d.l. résiduels	SCR
1	3.4611E+05	ND	1	1.7544E+09
2	3.5513E+05	ND	1	3.4049E+09
3	3.4253E+05	ND	1	8.5032E+10

r² = coefficient de détermination; d.d.l. = degrés de liberté; SCR = somme des carrés des résidus

Figure 1 - Courbes d'étalonnage





4. Justesse

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

Comme indiqué dans le tableau V, la justesse est exprimée en terme de biais absolu (ug/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 V - Justesse

Niveau de concentration (ug/ml)	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Moyenne des concentrations calculées (ug/ml)	Biais absolu (ug/ml)	Biais relatif (%)	Taux de recouvrement (%)	Intervalle de confiance à 95% des Recouvrements (%)
1.0	49.96	49.35	-0.6061	-1.213	98.79	[97.86 , 99.71]
2.0	62.45	62.78	0.3326	0.5326	100.5	[99.87 , 101.2]
3.0	74.94	75.77	0.8345	1.114	101.1	[100.2 , 102.0]



5. Fidélité

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord 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 VI et le tableau VII, 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 VI - Répétabilité et Fidélité intermédiaire relatives

Niveau de concentration (ug/ml)	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Répétabilité (CV%) ¹	Fidélité Intermédiaire (CV%) ¹
1.0	49.96	1.201	1.201
2.0	62.45	0.8675	0.8675
3.0	74.94	1.124	1.124

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 VII - Répétabilité et Fidélité Intermédiaire absolues

Niveau de concentration (ug/ml)	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Répétabilité (SD - ug/ml)	Inter-Séries (SD - ug/ml)	Ratio des composants de la variance (Inter / Intra)	Fidélité Intermédiaire (SD - ug/ml)
1.0	49.96	0.6002	0	0	0.6002
2.0	62.45	0.5417	0	0	0.5417
3.0	74.94	0.8422	0	0	0.8422

Tableau VIII - Limite supérieure de confiance à 95%

Niveau de concentration (ug/ml)	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Limite supérieure de confiance à 95% de la répétabilité (SD - ug/ml)	Limite supérieure de confiance à 95% de la fidélité intermédiaire (SD - ug/ml)
1.0	49.96	1.027	1.027



Niveau de concentration (ug/ml)	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Limite supérieure de confiance à 95% de la répétabilité (SD - ug/ml)	Limite supérieure de confiance à 95% de la fidélité intermédiaire (SD - ug/ml)
2.0	62.45	0.9269	0.9269
3.0	74.94	1.441	1.441

De plus, le taux de recouvrement de chaque série ainsi que toute les séries est rapporté dans le tableau IX.

Tableau IX - Taux de recouvrement par série

Niveau de concentration (ug/ml)	Série	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Concentration calculée (ug/ml)	Taux de recouvrement (%)
1.0	1	50.06	49.67	99.43
1.0	2	49.96	49.30	98.69
1.0	3	49.86	49.08	98.25
1.0	Moyenne des series	49.96	49.35	98.79
2.0	1	62.57	62.72	100.4
2.0	2	62.46	63.05	101.0
2.0	3	62.32	62.58	100.2
2.0	Moyenne des series	62.45	62.78	100.5
3.0	1	75.08	75.79	101.1
3.0	2	74.95	76.12	101.6
3.0	3	74.78	75.40	100.6
3.0	Moyenne des series	74.94	75.77	101.1



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 X - Incertitude

Niveau de concentration (ug/ml)	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Incertitude du biais (ug/ml)	Incertitude (ug/ml)	Incertitude étendue (ug/ml)	Incertitude étendue relative (%)
1.0	49.96	0.2001	0.6327	1.265	2.533
2.0	62.45	0.1806	0.5710	1.142	1.829
3.0	74.94	0.2807	0.8878	1.776	2.369



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 2.

Les limites d'acceptation ont été fixées à $\pm 5\%$, 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.

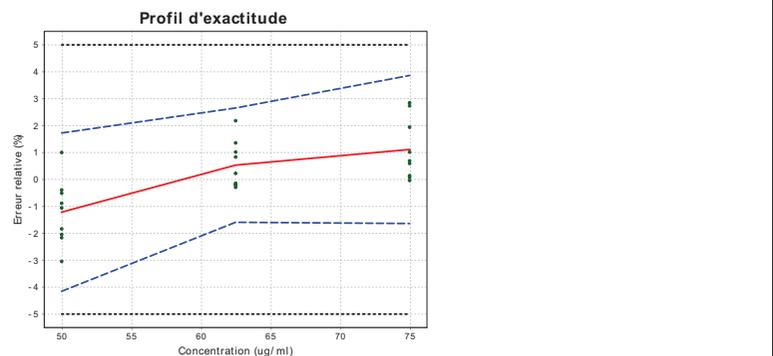
La formule utilisée pour le calcul de cet intervalle de tolérance est:

$$\text{biais}(\%) \pm kCV_{FI}(\%)$$

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.

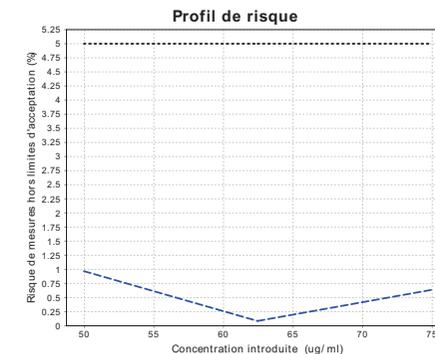
Figure 2 - Profil d'exactitude obtenu en considérant le modèle: Régression linéaire passant par 0 Ajustée en utilisant uniquement le niveau le plus haut



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 XI 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.

Figure 3 - Profil de risque obtenu en considérant le modèle: Régression linéaire passant par 0 Ajustée en utilisant uniquement le niveau le plus haut



La ligne pointillée noire représente le niveau de risque maximum choisi, à savoir : 5.0%.

Tableau XI - Exactitude de la méthode obtenue en considérant le modèle Régression linéaire passant par 0 Ajustée en utilisant uniquement le niveau le plus haut

Niveau de concentration (ug/ml)	Moyenne des concentrations introduites ¹ (ug/ml)	Limites de tolérance "Beta-acceptation" (ug/ml)	Limites de tolérance "Beta-acceptation" relatives (%)	Risque ² (%)
1.0	49.96	[47.89 , 50.82]	[-4.152 , 1.726]	0.9686
2.0	62.45	[61.45 , 64.10]	[-1.590 , 2.655]	0.08518
3.0	74.94	[73.71 , 77.83]	[-1.636 , 3.863]	0.6362

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.



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 4) a été ajusté sur les concentrations calculées en fonction des concentrations introduites dans le but d'obtenir l'équation suivante:

$$Y = -3.415 + 1.058 X$$

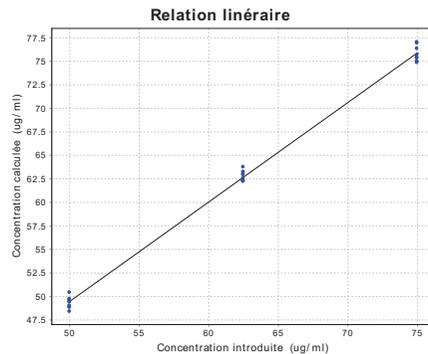
où Y = concentrations calculées (ug/ml) et X = concentrations introduites (ug/ml).

Le coefficient de détermination (r^2) est égal à 0.9964 .

La somme des carrés des résidus (SCR) est égale à 11.19 .

Les concentrations calculées figurent en annexe 3.

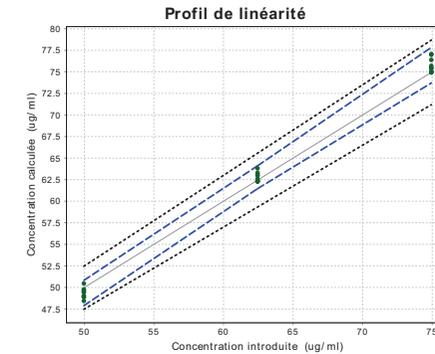
Figure 4 - Relation entre les concentrations introduites et calculées



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 5.



Figure 5 - 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:

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

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.



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} = Ordonnée à l'origine (0 si négative) + 3 * 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 (ug/ml) = 1.137

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}) (ug/ml) = 49.96

Limite supérieure de quantification (LQ_{sup}) (ug/ml) = 74.94



10. Références bibliographiques

1. Burdik RK, Graybill FA. Confidence interval on variance components. New York: CRC Press;1992.
2. Derringer D, Suich 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>.
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.

ANNEXE XI

11.1 Résultats de l'étude de stabilité de la solution d'amiodarone à 12.5 mg/mL sans stabilisation

Amiodarone lot : P0KDU n° analyse : 170611/F						
<i>Stabilité à 30°C et à l'abri de la lumière</i>						
T0 + x jours	0	30	60	120	180	360
<i>Tests analytiques</i>						
Aspect visuel	C	C	C	C	C	NA
pH	3.90	3.99	3.72	3.63	3.57	
Osmolalité [mOSM]	322	325	325	326	327	
Amiodarone [mg/mL]	12.45	11.99	12.46	12.18	12.25	
Particules 10 µm [particules /vial]	54.4	N/A			54.4	
Particules 25 µm [particules /vial]	0				0	
Essai de stérilité	C				C	
Endotoxines [UI/ml]	NA				< 5	

Amiodarone lot : P0KDV n° analyse : 170611/G						
<i>Stabilité à 30°C et à l'abri de la lumière</i>						
T0 + x jours	0	30	60	120	180	360
<i>Tests analytiques</i>						
Aspect visuel	C	C	C	C	C	NA
pH	3.91	3.99	3.73	3.63	3.57	
Osmolalité [mOSM]	319	321	321	321	321	
Amiodarone [mg/mL]	12.56	12.12	12.35	12.12	12.61	
Particules 10 µm [particules /vial]	9.6	N/A			89.6	
Particules 25 µm [particules /vial]	0				0	
Essai de stérilité	C				C	
Endotoxines [UI/ml]	NA				< 5	

Amiodarone lot : P0KDW n° analyse : 170611/H						
<i>Stabilité à 30°C et à l'abri de la lumière</i>						
T0 + x jours	0	30	60	120	180	360
<i>Tests analytiques</i>						
Aspect visuel	C	C	C	C	C	NA
pH	3.88	3.85	3.72	3.63	3.57	
Osmolalité [mOSM]	323	325	324	326	323	
Amiodarone [mg/mL]	12.58	12.04	12.57	12.23	10.91	
Particules 10 µm [particules /vial]	60.8	N/A			105.6	
Particules 25 µm [particules /vial]	0				0	
Essai de stérilité	C				C	
Endotoxines [UI/ml]	NA				< 5	

ANNEXE XI

Amiodarone lot : P0KDU n° analyse : 170611/F						
<i>Stabilité à 5°C et à l'abri de la lumière</i>						
T0 + x jours	0	30	60	120	180	360
<i>Tests analytiques</i>						
Aspect visuel	NA	C	C	C	C	NA
pH		3.85	3.91	3.93	3.97	
Osmolalité [mOSM]		326	324	324	325	
Amiodarone [mg/mL]		11.80	12.53	12.53	12.47	
Particules 10 µm [particules /vial]		N/A			105.6	
Particules 25 µm [particules /vial]					16	
Essai de stérilité					C	
Endotoxines [UI/ml]		N/A			< 5	

Amiodarone lot : P0KDV n° analyse : 170611/G						
<i>Stabilité à 5°C et à l'abri de la lumière</i>						
T0 + x jours	0	30	60	120	180	360
<i>Tests analytiques</i>						
Aspect visuel	NA	C	C	C	C	NA
pH		3.85	3.91	3.94	3.96	
Osmolalité [mOSM]		322	319	319	321	
Amiodarone [mg/mL]		11.95	12.57	12.47	11.87	
Particules 10 µm [particules /vial]		N/A			67.2	
Particules 25 µm [particules /vial]					0	
Essai de stérilité					C	
Endotoxines [UI/ml]		N/A			< 5	

Amiodarone lot : P0KDW n° analyse : 170611/H						
<i>Stabilité à 5°C et à l'abri de la lumière</i>						
T0 + x jours	0	30	60	120	180	360
<i>Tests analytiques</i>						
Aspect visuel	NA	C	C	C	C	NA
pH		3.97	3.97	3.93	3.97	
Osmolalité [mOSM]		326	324	326	325	
Amiodarone [mg/mL]		12.00	12.82	12.40	12.11	
Particules 10 µm [particules /vial]		N/A			86.4	
Particules 25 µm [particules /vial]					12.8	
Essai de stérilité					C	
Endotoxines [UI/ml]		N/A			< 5	

ANNEXE XI

11.2 Résultats de l'étude de stabilité de la solution d'amiodarone à 12.5 mg/mL avec stabilisation

Amiodarone lot : P0KDQ n° analyse : 170611/C						
<i>Stabilité à 30°C et à l'abri de la lumière</i>						
T0 + x jours	0	30	60	120	180	360
<i>Tests analytiques</i>						
Aspect visuel	C	C	C	C	C	NA
pH	3.89	3.81	3.71	3.62	3.57	
Osmolalité [mOSM]	320	323	323	325	323	
Amiodarone [mg/mL]	12.21	12.02	12.24	12.20	12.14	
Particules 10 µm [particules /vial]	6.4	N/A			73.6	
Particules 25 µm [particules /vial]	0				3.2	
Essai de stérilité	C				C	
Endotoxines [UI/ml]	NA				< 5	

Amiodarone lot : P0KDR n° analyse : 170611/D						
<i>Stabilité à 30°C et à l'abri de la lumière</i>						
T0 + x jours	0	30	60	120	180	360
<i>Tests analytiques</i>						
Aspect visuel	C	C	C	C	C	NA
pH	3.91	3.84	3.73	3.62	3.58	
Osmolalité [mOSM]	324	322	323	327	325	
Amiodarone [mg/mL]	12.44	12.01	12.25	12.20	12.50	
Particules 10 µm [particules /vial]	38.4	N/A			28.8	
Particules 25 µm [particules /vial]	0				0	
Essai de stérilité	C				C	
Endotoxines [UI/ml]	NA				< 5	

Amiodarone lot : P0KDS n° analyse : 170611/E						
<i>Stabilité à 30°C et à l'abri de la lumière</i>						
T0 + x jours	0	30	60	120	180	360
<i>Tests analytiques</i>						
Aspect visuel	C	C	C	C	C	NA
pH	3.90	3.82	3.71	3.63	3.59	
Osmolalité [mOSM]	316	319	319	321	319	
Amiodarone [mg/mL]	12.50	12.02	12.37	12.22	12.49	
Particules 10 µm [particules /vial]	118.4	N/A			35.2	
Particules 25 µm [particules /vial]	0				0	
Essai de stérilité	C				C	
Endotoxines [UI/ml]	NA				< 5	

ANNEXE XI

Amiodarone lot : P0KDQ n° analyse : 170611/C						
<i>Stabilité à 5°C et à l'abri de la lumière</i>						
T0 + x jours	0	30	60	120	180	360
<i>Tests analytiques</i>						
Aspect visuel	NA	C	C	C	C	NA
pH		3.94	3.90	3.92	3.92	
Osmolalité [mOSM]		321	321	322	322	
Amiodarone [mg/mL]		12.08	12.51	12.42	12.45	
Particules 10 µm [particules /vial]		N/A			89.6	
Particules 25 µm [particules /vial]					6.4	
Essai de stérilité					C	
Endotoxines [UI/ml]					< 5	

Amiodarone lot : P0KDR n° analyse : 170611/D						
<i>Stabilité à 5°C et à l'abri de la lumière</i>						
T0 + x jours	0	30	60	120	180	360
<i>Tests analytiques</i>						
Aspect visuel	NA	C	C	C	C	NA
pH		3.95	3.91	3.93	3.92	
Osmolalité [mOSM]		325	324	326	324	
Amiodarone [mg/mL]		12.10	12.42	12.60	12.69	
Particules 10 µm [particules /vial]		N/A			44.8	
Particules 25 µm [particules /vial]					19.2	
Essai de stérilité					C	
Endotoxines [UI/ml]					< 5	

Amiodarone lot : P0KDS n° analyse : 170611/E						
<i>Stabilité à 5°C et à l'abri de la lumière</i>						
T0 + x jours	0	30	60	120	180	360
<i>Tests analytiques</i>						
Aspect visuel	NA	C	C	C	C	NA
pH		3.94	3.90	3.93	3.95	
Osmolalité [mOSM]		317	315	318	319	
Amiodarone [mg/mL]		12.07	12.54	12.85	12.69	
Particules 10 µm [particules /vial]		N/A			76.8	
Particules 25 µm [particules /vial]					3.2	
Essai de stérilité					C	
Endotoxines [UI/ml]					< 5	

ANNEXE XII

Rapport Enoval pour la prévalidation du furosémide



Nom: Lina Berger
Société: HOSPICES CANTONAU
Département: -
Phase: Prévalidation, non destiné à la validation
Numéro de référence: Annexe 3

1 / 25

PREVALIDATION DU DOSAGE DU FUROSEMIDE PAR HPLC

Nom: Lina Berger
Société: HOSPICES CANTONAU
Département: -
Phase: Prévalidation, non destiné à la validation
Numéro de référence: Annexe 3
Méthode: HPLC DAD
Protocole: Annexe 3
Produit: Furosemide 1 mg/ml
Composé: Furosemide
Matrice: NaCl 0.9%, NaOH et HCl



Nom: Lina Berger
Société: HOSPICES CANTONAU
Département: -
Phase: Prévalidation, non destiné à la validation
Numéro de référence: Annexe 3

2 / 25

Table des matières

1. Introduction.....	4
2. Plan d'expériences.....	5
3. Fonction de réponse.....	6
4. Justesse.....	10
5. Fidélité.....	11
6. Exactitude.....	13
7. Linéarité des résultats.....	16
8. Limite de détection (LD), limites de quantification (LQ) et intervalle de dosage..	18
Annexe 1 Données.....	19
Annexe 2 Concentrations calculées pour le modèle sélectionné.....	22
Annexe 3 Diagnostics.....	23

Table des tableaux

Tableau I - Standards d'étalonnage.....	5
Tableau II - Modèles d'étalonnage triés par 'Indice d'Exactitude'.....	6
Tableau III - Paramètres de régression.....	7
Tableau IV - Justesse.....	10
Tableau V - Répétabilité et Fidélité intermédiaire relatives.....	11
Tableau VI - Répétabilité et Fidélité Intermédiaire absolues.....	11
Tableau VII - Limite supérieure de confiance à 95%.....	11
Tableau VIII - Taux de recouvrement par série.....	11
Tableau IX - Exactitude de la méthode obtenue en considérant le modèle Régression quadratique	15
Tableau X - Standards d'étalonnage (hors matrice).....	19
Tableau XI - Standards d'étalonnage (dans la matrice).....	19
Tableau XII - Alignement des données ¹	20
Tableau XIII - Concentrations calculées ¹	22
Tableau XIV - Test de Levène.....	23
Tableau XV - Test de manque d'ajustement du modèle de régression linéaire sélectionné pour l'étalonnage.....	23
Tableau XVI - Résidus standardisés pour le modèle d'étalonnage choisi.....	23

Table des figures

Figure 1 - Courbes d'étalonnage.....	8
---	---



Figure 2 - Profil d'exactitude obtenu en considérant le modèle: Régression quadratique.....	13
Figure 3 - Profil de risque obtenu en considérant le modèle: Régression quadratique.....	14
Figure 4 - Relation entre les concentrations introduites et calculées.....	16
Figure 5 - Graphe de linearité.....	17
Figure 6 - Résidus standardisés.....	24



PREVALIDATION DU DOSAGE DU FUROSEMIDE PAR HPLC

1. Introduction

Les critères de prévalidation 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.



2. Plan d'expériences

Tableau I - Standards d'étalonnage

A. Hors matrice.

Série	Niveau de concentration (ug/ml)	Nb. de répétitions
1	1.0	2
1	2.0	2
1	3.0	2
2	1.0	2
2	2.0	2
2	3.0	2
3	1.0	2
3	2.0	2
3	3.0	2

Le nombre total d'observations est 18.

B. Dans la matrice.

Série	Niveau de concentration (ug/ml)	Nb. de répétitions
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

Le nombre total d'observations est 27.

Toutes les données sont reprises dans l'annexe 1.



3. Fonction de réponse

Le tableau II reprend les modèles de régression sélectionnés. Ces modèles ont été triés en fonction de leur "indice d'exactitude".

Tableau II - Modèles d'étalonnage triés par 'Indice d'Exactitude'

Modèle	Indice d'Exactitude	Limite inférieure et supérieure de quantification (LQ) (ug/ml)	Indice d'Intervalle de Dosage	Indice de Fidélité	Indice de Justesse
Regression quadratique (dans la matrice)	0.7234	[18.33 , 24.94]	0.6626	0.5717	0.9993
Regression quadratique ponderee (1/X) (dans la matrice)	0.7234	[18.33 , 24.94]	0.6626	0.5717	0.9993
Regression quadratique ponderee (1/X^2) (dans la matrice)	0.7234	[18.33 , 24.94]	0.6626	0.5717	0.9993
Regression lineaire apres transformation logarithmique (dans la matrice)	0.7233	[18.27 , 24.94]	0.6692	0.5654	1.0000
Regression lineaire apres transformation racine carree (dans la matrice)	0.7226	[18.24 , 24.94]	0.6718	0.5617	1.0000
Regression lineaire (dans la matrice)	0.7219	[18.24 , 24.94]	0.6720	0.5599	1.0000
Regression lineaire ponderee (1/X) (dans la matrice)	0.7218	[18.23 , 24.94]	0.6725	0.5592	1.0000
Regression lineaire ponderee (1/X^2) (dans la matrice)	0.7217	[18.23 , 24.94]	0.6732	0.5584	1.0000
Regression lineaire passant par 0 ajustee en utilisant uniquement le niveau 3 (dans la matrice)	0.7100	[19.33 , 24.94]	0.5621	0.6483	0.9820
Regression lineaire passant par 0 ajustee en utilisant uniquement le niveau 1.0 (hors matrice)	0.5286	[22.99 , 24.94]	0.1959	0.8729	0.8636



Modèle	Indice d'Exactitude	Limite inférieure et supérieure de quantification (LQ) (ug/ml)	Indice d'Intervalle de Dosage	Indice de Fidélité	Indice de Justesse
Regression lineaire apres transformation logarithmique (hors matrice)	0.4190	[23.92 , 24.94]	0.1024	0.9551	0.7519
Regression quadratique ponderee (1/ X) (hors matrice)	0.4108	[23.98 , 24.94]	0.09620	0.9570	0.7532
Regression quadratique (hors matrice)	0.4108	[23.98 , 24.94]	0.09620	0.9570	0.7532
Regression quadratique ponderee (1/ X^2) (hors matrice)	0.4108	[23.98 , 24.94]	0.09620	0.9570	0.7532
Regression lineaire apres transformation racine carree (hors matrice)	0.4081	[24.00 , 24.94]	0.09460	0.9582	0.7500
Regression lineaire ponderee (1/ X) (hors matrice)	0.3957	[24.08 , 24.94]	0.08608	0.9618	0.7486
Regression lineaire ponderee (1/ X^2) (hors matrice)	0.3956	[24.08 , 24.94]	0.08594	0.9620	0.7488
Regression lineaire (hors matrice)	0.3952	[24.09 , 24.94]	0.08579	0.9618	0.7479
Regression lineaire passant par 0 ajustee en utilisant uniquement le niveau 3 (hors matrice)	0.3041	[24.46 , 24.94]	0.04780	0.9786	0.6012
Regression lineaire passant par 0 ajustee en utilisant uniquement le niveau 1.0 (dans la matrice)	0	ND	0	0	0

Le modèle d'étalonnage sélectionné est: **Régression quadratique (dans la matrice)** .

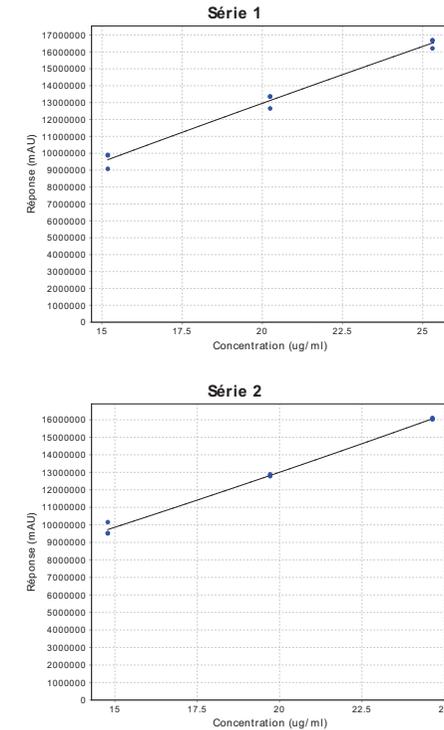
Tableau III - Paramètres de régression

Série	Ordonnée à l'origine	Pente	Terme Quadratique	r ²	d.d.l. résiduels	SCR
1	-1.5249E+06	7.6493E+05	-2042	0.9873	6	9.1675E+11
2	1.3828E+06	5.1864E+05	3122	0.9954	6	2.7715E+11
3	-5.5887E+05	6.8898E+05	-707.4	0.9999	6	4.8056E+09



r² = coefficient de détermination; d.d.l. = degrés de liberté; SCR = somme des carrés des résidus

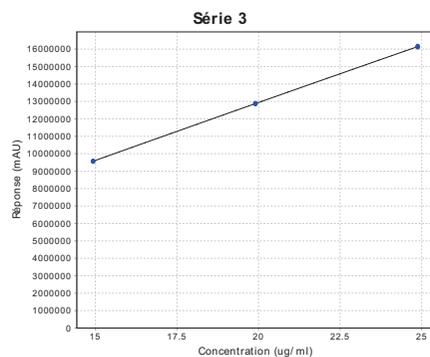
Figure 1 - Courbes d'étalonnage





Nom: Lina Berger
Société: HOSPICES CANTONAUX
Département: -
Phase: Prévalidation, non destiné à la validation
Numéro de référence: Annexe 3

9 / 25



Nom: Lina Berger
Société: HOSPICES CANTONAUX
Département: -
Phase: Prévalidation, non destiné à la validation
Numéro de référence: Annexe 3

10 / 25

4. Justesse

Tableau IV - Justesse

Niveau de concentration (ug/ml)	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Moyenne des concentrations calculées (ug/ml)	Biais absolu (ug/ml)	Biais relatif (%)	Taux de recouvrement (%)	Intervalle de confiance à 95% des Recouvrements (%)
1.0	14.97	14.95	-0.01523	-0.1018	99.90	[97.60 , 102.2]
2.0	19.95	19.93	-0.02618	-0.1312	99.87	[98.70 , 101.0]
3.0	24.94	24.90	-0.04060	-0.1628	99.84	[99.19 , 100.5]



5. Fidélité

Tableau V - Répétabilité et Fidélité intermédiaire relatives

Niveau de concentration (ug/ml)	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Répétabilité (CV%)*	Fidélité Intermédiaire (CV%)*
1.0	14.97	2.986	2.986
2.0	19.95	1.516	1.516
3.0	24.94	0.8440	0.8440

* 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 VI - Répétabilité et Fidélité Intermédiaire absolues

Niveau de concentration (ug/ml)	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Répétabilité (SD - ug/ml)	Inter-Séries (SD - ug/ml)	Ratio des composants de la variance (Inter / Intra)	Fidélité Intermédiaire (SD - ug/ml)
1.0	14.97	0.4469	0	0	0.4469
2.0	19.95	0.3025	0	0	0.3025
3.0	24.94	0.2105	0	0	0.2105

Tableau VII - Limite supérieure de confiance à 95%

Niveau de concentration (ug/ml)	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Limite supérieure de confiance à 95% de la répétabilité (SD - ug/ml)	Limite supérieure de confiance à 95% de la fidélité intermédiaire (SD - ug/ml)
1.0	14.97	0.7647	0.7647
2.0	19.95	0.5175	0.5175
3.0	24.94	0.3602	0.3602

Tableau VIII - Taux de recouvrement par série

Niveau de concentration (ug/ml)	Série	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Concentration calculée (ug/ml)	Taux de recouvrement (%)
1.0	1	15.18	14.95	99.88
1.0	2	14.78	14.94	99.81
1.0	3	14.93	14.97	100.0
1.0	Moyenne des series	14.97	14.95	99.90



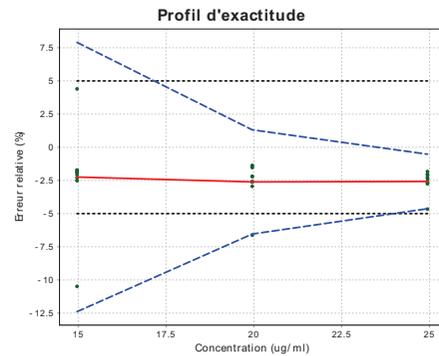
Niveau de concentration (ug/ml)	Série	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Concentration calculée (ug/ml)	Taux de recouvrement (%)
2.0	1	20.24	19.92	99.83
2.0	2	19.71	19.91	99.77
2.0	3	19.90	19.96	100.0
2.0	Moyenne des series	19.95	19.93	99.87
3.0	1	25.31	24.89	99.77
3.0	2	24.64	24.87	99.72
3.0	3	24.88	24.94	100.0
3.0	Moyenne des series	24.94	24.90	99.84



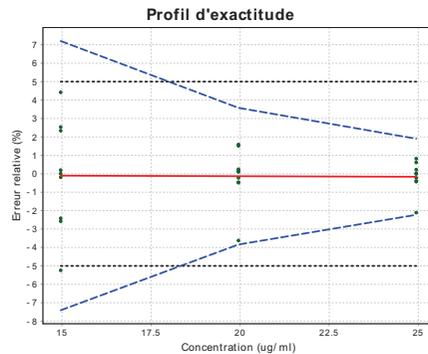
6. Exactitude

Figure 2 - Profil d'exactitude obtenu en considérant le modèle: Régression quadratique

A. Hors matrice.



B. Dans la matrice.



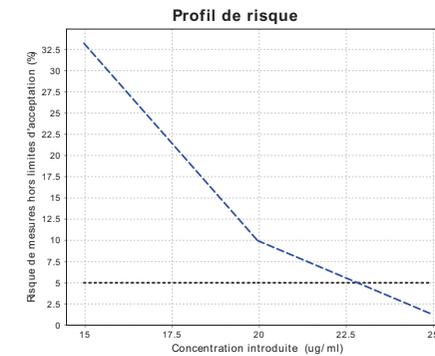
La ligne rouge continue représente le biais, les lignes discontinues bleues définissent les limites de l'intervalle de tolérance attendu au niveau β et les lignes pointillées noires sont les limites d'acceptation. Les points sont quant à eux l'erreur relative des concentrations calculées et sont représentés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



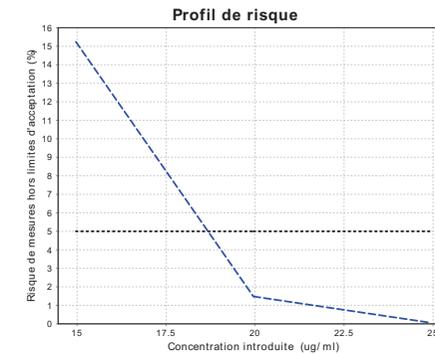
Les limites inférieures et supérieures de l'intervalle de tolérance exprimées en erreur relative sont également présentées dans le tableau IX pour chaque niveau de concentration introduit. Le risque d'avoir des mesures en dehors des limites d'acceptation à chaque niveau est calculé uniquement s'il y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

Figure 3 - Profil de risque obtenu en considérant le modèle: Régression quadratique

A. Hors matrice.



B. Dans la matrice.



La ligne pointillée noire représente le niveau de risque maximum choisi, à savoir : 5.0%.



Tableau IX - Exactitude de la méthode obtenue en considérant le modèle Régression quadratique

A. Hors matrice.

Niveau de concentration (ug/ml)	Moyenne des concentrations introduites ¹ (ug/ml)	Beta-expectation tolerance limit (ug/ml)	Beta-expectation tolerance limit relatif (%)	Risque ² (%)
1.0	14.97	[13.11 , 16.15]	[-12.39 , 7.901]	33.24
2.0	19.95	[18.65 , 20.22]	[-6.540 , 1.314]	9.977
3.0	24.94	[23.79 , 24.81]	[-4.633 , -0.5230]	1.328

B. Dans la matrice.

Niveau de Concentration (ug/ml)	Moyenne des concentrations introduites ¹ (ug/ml)	Beta-expectation tolerance limit (ug/ml)	Beta-expectation tolerance limit relatif (%)	Risque ² (%)
1.0	14.97	[13.86 , 16.04]	[-7.408 , 7.204]	15.24
2.0	19.95	[19.19 , 20.67]	[-3.840 , 3.577]	1.480
3.0	24.94	[24.39 , 25.42]	[-2.228 , 1.902]	0.05808

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.



7. Linéarité des résultats

$$Y = 0.02340 + 0.9975 X$$

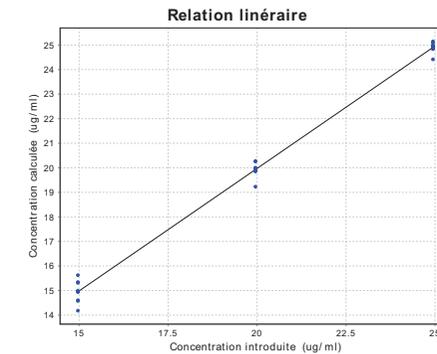
où Y = concentrations calculées (ug/ml)

et X = concentrations introduites (ug/ml)

Le coefficient de détermination (r^2) est égal à 0.9940 .

La somme des carrés des résidus (SCR) est égale à 2.684 .

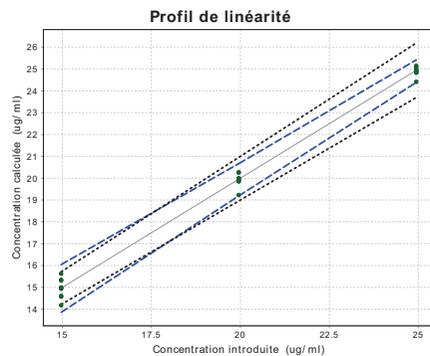
Figure 4 - Relation entre les concentrations introduites et calculées



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 5.



Figure 5 - 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 "β-expectation tolerance limits" exprimées en valeur absolue.



8. Limite de détection (LD), limites de quantification (LQ) et intervalle de dosage

LD (ug/ml) = 4.952

Limite inférieure de quantification (LQ_{Inf}) (ug/ml) = 18.33

Limite supérieure de quantification (LQ_{Sup}) (ug/ml) = 24.94

ANNEXE XIII

Rapport Enoval pour la validation du furosémide



Nom: Lina Berger
Société: HOSPICES CANTONAU
Département: -
Phase: Validation
Numéro de référence: Annexe 4

1 / 48

VALIDATION DU DOSAGE DU FUROSEMIDE PAR HPLC

Nom: Lina Berger
Société: HOSPICES CANTONAU
Département: -
Phase: Validation
Numéro de référence: Annexe 4
Méthode: HPLC DAD
Protocole: Annexe 4
Produit: Furosemide 1 mg/ml
Composé: Furosemide
Matrice: NaCl 0.9%, HCl, NaOH



Nom: Lina Berger
Société: HOSPICES CANTONAU
Département: -
Phase: Validation
Numéro de référence: Annexe 4

2 / 48

Table des matières

1. Introduction.....	5
2. Plan d'expériences.....	6
3. Fonction de réponse.....	8
4. Justesse.....	11
5. Fidélité.....	12
6. Incertitude de mesure.....	14
7. Exactitude.....	15
8. Linéarité des résultats.....	18
9. Limite de détection (LD), limites de quantification (LQ) et intervalle de dosage..	20
10. Références bibliographiques.....	21
Annexe 1 Données.....	23
Annexe 2 Sélection du modèle d'étalonnage.....	27
Annexe 3 Concentrations calculées pour le modèle sélectionné.....	37
Annexe 4 Diagnostics.....	39
Annexe 5 Statistiques.....	40
Annexe 6 Résumé.....	44

Table des tableaux

Tableau I - Standards d'étalonnage.....	6
Tableau II - Standards de Validation.....	7
Tableau III - Modèles d'étalonnage triés par 'Indice d'Exactitude'.....	8
Tableau IV - Paramètres de régression.....	9
Tableau V - Justesse.....	11
Tableau VI - Répétabilité et Fidélité intermédiaire relatives.....	12
Tableau VII - Répétabilité et Fidélité Intermédiaire absolues.....	12
Tableau VIII - Limite supérieure de confiance à 95%.....	13
Tableau IX - Taux de recouvrement par série.....	13
Tableau X - Incertitude.....	14
Tableau XI - Exactitude de la méthode obtenue en considérant le modèle Régression linéaire passant par 0 Ajustée en utilisant uniquement le niveau le plus haut	16
Tableau XII - Standards d'étalonnage.....	23
Tableau XIII - Standards de Validation.....	24
Tableau XIV - Alignement des données ¹	25
Tableau XV - Justesse de la méthode et exactitude obtenues en considérant une Régression linéaire pondérée (1/X)	27



Tableau XVI - Justesse de la méthode et exactitude obtenues en considérant une Régression linéaire après transformation racine carrée	29
Tableau XVII - Justesse de la méthode et exactitude obtenues en considérant une Régression linéaire pondérée ($1/X^2$)	30
Tableau XVIII - Justesse de la méthode et exactitude obtenues en considérant une Régression linéaire après transformation logarithmique	31
Tableau XIX - Justesse de la méthode et exactitude obtenues en considérant une Régression quadratique	32
Tableau XX - Justesse de la méthode et exactitude obtenues en considérant une Régression quadratique pondérée ($1/X$)	33
Tableau XXI - Justesse de la méthode et exactitude obtenues en considérant une Régression linéaire	34
Tableau XXII - Justesse de la méthode et exactitude obtenues en considérant une Régression quadratique pondérée ($1/X^2$)	35
Tableau XXIII - Justesse de la méthode et exactitude obtenues en considérant une Régression linéaire passant par 0 Ajusté en utilisant uniquement le niveau 1.0	36
Tableau XXIV - Concentrations calculées ¹	37
Tableau XXV - Résidus standardisés pour le modèle d'étalonnage choisi.....	39

Table des figures

Figure 1 - Courbes d'étalonnage.....	9
Figure 2 - Profil d'exactitude obtenu en considérant le modèle: Régression linéaire passant par 0 Ajustée en utilisant uniquement le niveau le plus haut	15
Figure 3 - Profil de risque obtenu en considérant le modèle: Régression linéaire passant par 0 Ajustée en utilisant uniquement le niveau le plus haut	16
Figure 4 - Relation entre les concentrations introduites et calculées.....	18
Figure 5 - Graphe de linearité.....	19
Figure 6 - Profil d'Exactitude obtenu en considérant une Régression linéaire pondérée ($1/X$)	27
Figure 7 - Profil d'Exactitude obtenu en considérant une Régression linéaire après transformation racine carrée	28
Figure 8 - Profil d'Exactitude obtenu en considérant une Régression linéaire pondérée ($1/X^2$)	29
Figure 9 - Profil d'Exactitude obtenu en considérant une Régression linéaire après transformation logarithmique	30
Figure 10 - Profil d'Exactitude obtenu en considérant une Régression quadratique	31
Figure 11 - Profil d'Exactitude obtenu en considérant une Régression quadratique pondérée ($1/X$)	32



Figure 12 - Profil d'Exactitude obtenu en considérant une Régression linéaire	33
Figure 13 - Profil d'Exactitude obtenu en considérant une Régression quadratique pondérée ($1/X^2$)	34
Figure 14 - Profil d'Exactitude obtenu en considérant une Régression linéaire passant par 0 Ajusté en utilisant uniquement le niveau 1.0	35
Figure 15 - Résidus standardisés.....	39



VALIDATION DU DOSAGE DU FUROSEMIDE PAR HPLC

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.



2. Plan d'expériences

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 : NaCl 0.9%, HCl, NaOH

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

Tableau I - Standards d'étalonnage

Série	Niveaux de concentration (ug/ml)	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

Le nombre total d'observations est 30.

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 II reprend le nombre de standards de validation par niveau de concentration, les niveaux de concentration considérés et les différentes séries réalisées.



Tableau II - Standards de Validation

Série	Niveau de concentration	Nb. de répétitions indépendantes
1	1.0	3
1	2.0	3
1	3.0	3
1	4.0	3
1	5.0	3
2	1.0	3
2	2.0	3
2	3.0	3
2	4.0	3
2	5.0	3
3	1.0	3
3	2.0	3
3	3.0	3
3	4.0	3
3	5.0	3

Le nombre total d'observations est 45.

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



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 III reprend les modèles de régression sélectionnés. Ces modèles ont été triés en fonction de leur "indice d'exactitude" (cfr. annexe 2).

Tableau III - Modèles d'étalonnage triés par 'Indice d'Exactitude'

Modèle	Indice d'Exactitude	Limite inférieure et supérieure de quantification (ug/ml)	Indice d'Intervalle de Dosage	Indice de Fidélité	Indice de Justesse
Regression linéaire passant par 0 ajustée en utilisant uniquement le niveau 5	0.7409	[20.02 , 74.60]	0.6816	0.6737	0.8857
Regression lineaire ponderee (1/X)	0.6876	[20.02 , 100.1]	1.000	0.3403	0.9553
Regression lineaire apres transformation racine carree	0.6848	[20.02 , 100.1]	1.000	0.3356	0.9570
Regression lineaire ponderee (1/X^2)	0.6843	[20.02 , 100.1]	1.000	0.3351	0.9563
Regression lineaire apres transformation logarithmique	0.6840	[20.02 , 100.1]	1.000	0.3349	0.9556
Regression quadratique	0.6829	[20.02 , 100.1]	1.000	0.3331	0.9561
Regression quadratique ponderee (1/X)	0.6800	[20.02 , 100.1]	1.000	0.3278	0.9594
Regression lineaire	0.6788	[20.02 , 100.1]	1.000	0.3272	0.9561
Regression quadratique ponderee (1/X^2)	0.6767	[20.02 , 100.1]	1.000	0.3228	0.9601
Regression linéaire passant par 0 ajustée en utilisant uniquement le niveau 1.0	0.4868	[20.02 , 31.44]	0.1426	0.9156	0.8839



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 passant par 0 ajustée en utilisant uniquement le niveau 5**

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

$$Y = bX$$

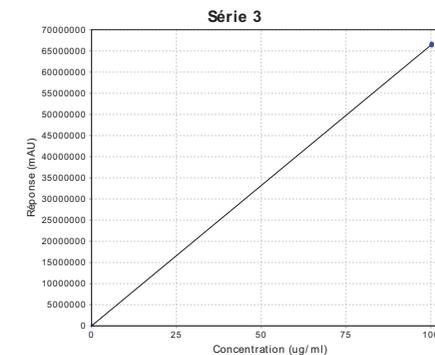
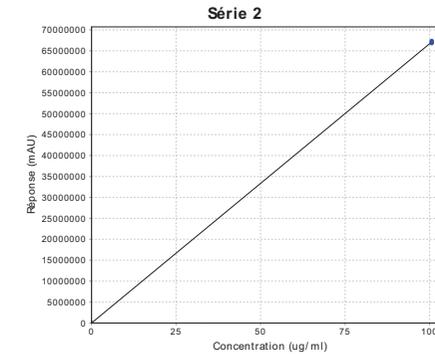
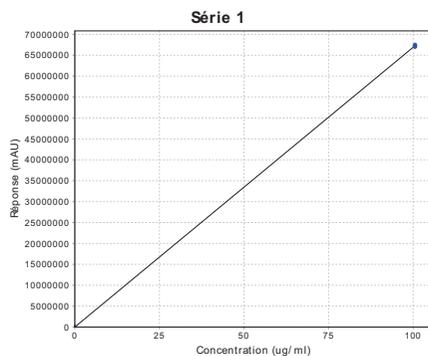
où Y = réponse analytique (en mAU) et X = concentration introduite (en ug/ml)

Tableau IV - Paramètres de régression

Série	Pente	r ²	d.d.l. résiduels	SCR
1	6.6912E+05	ND	1	7.6165E+10
2	6.6692E+05	ND	1	1.2225E+11
3	6.6371E+05	ND	1	4.9965E+10

r² = coefficient de détermination; d.d.l. = degrés de liberté; SCR = somme des carrés des résidus

Figure 1 - Courbes d'étalonnage





4. Justesse

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

Comme indiqué dans le tableau V, la justesse est exprimée en terme de biais absolu (ug/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 V - Justesse

Niveau de concentration (ug/ml)	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Moyenne des concentrations calculées (ug/ml)	Biais absolu (ug/ml)	Biais relatif (%)	Taux de recouvrement (%)	Intervalle de confiance à 95% des Recouvrements (%)
1.0	20.02	20.26	0.2338	1.168	101.2	[100.6 , 101.7]
2.0	40.04	40.82	0.7767	1.940	101.9	[101.4 , 102.5]
3.0	60.06	61.37	1.308	2.177	102.2	[101.5 , 102.8]
4.0	80.09	81.45	1.361	1.699	101.7	[101.0 , 102.4]
5.0	100.1	101.3	1.239	1.238	101.2	[100.5 , 102.0]



5. Fidélité

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord 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 VI et le tableau VII, 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 VI - Répétabilité et Fidélité intermédiaire relatives

Niveau de concentration (ug/ml)	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Répétabilité (CV%) ¹	Fidélité Intermédiaire (CV%) ¹
1.0	20.02	0.7520	0.7520
2.0	40.04	0.6281	0.7679
3.0	60.06	0.6492	0.9071
4.0	80.09	0.6551	1.030
5.0	100.1	0.6748	1.091

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 VII - Répétabilité et Fidélité Intermédiaire absolues

Niveau de concentration (ug/ml)	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Répétabilité (SD - ug/ml)	Inter-Séries (SD - ug/ml)	Ratio des composantes de la variance (Inter / Intra)	Fidélité Intermédiaire (SD - ug/ml)
1.0	20.02	0.1506	0	0	0.1506
2.0	40.04	0.2515	0.1769	0.4945	0.3075
3.0	60.06	0.3899	0.3805	0.9524	0.5448
4.0	80.09	0.5246	0.6365	1.472	0.8248
5.0	100.1	0.6756	0.8581	1.614	1.092



Tableau VIII - Limite supérieure de confiance à 95%

Niveau de concentration (ug/ml)	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Limite supérieure de confiance à 95% de la répétabilité (SD - ug/ml)	Limite supérieure de confiance à 95% de la fidélité intermédiaire (SD - ug/ml)
1.0	20.02	0.2576	0.2576
2.0	40.04	0.4818	1.034
3.0	60.06	0.7469	1.981
4.0	80.09	1.005	3.144
5.0	100.1	1.294	4.201

De plus, le taux de recouvrement de chaque série ainsi que toute les séries est rapporté dans le tableau IX.

Tableau IX - Taux de recouvrement par série

Niveau de concentration (ug/ml)	Série	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Concentration calculée (ug/ml)	Taux de recouvrement (%)
1.0	1	19.98	20.31	101.4
1.0	2	20.11	20.26	101.2
1.0	3	19.97	20.20	100.9
1.0	Moyenne des series	20.02	20.26	101.2
2.0	1	39.96	40.94	102.2
2.0	2	40.22	40.97	102.3
2.0	3	39.94	40.56	101.3
2.0	Moyenne des series	40.04	40.82	101.9
3.0	1	59.94	61.42	102.3
3.0	2	60.34	61.79	102.9
3.0	3	59.92	60.91	101.4
3.0	Moyenne des series	60.06	61.37	102.2
4.0	1	79.92	81.60	101.9
4.0	2	80.45	82.06	102.5
4.0	3	79.89	80.68	100.7
4.0	Moyenne des series	80.09	81.45	101.7
5.0	1	99.90	101.3	101.2
5.0	2	100.6	102.3	102.2
5.0	3	99.86	100.4	100.3
5.0	Moyenne des series	100.1	101.3	101.2



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 X - Incertitude

Niveau de concentration (ug/ml)	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Incertitude du biais (ug/ml)	Incertitude (ug/ml)	Incertitude étendue (ug/ml)	Incertitude étendue relative (%)
1.0	20.02	0.05019	0.1587	0.3174	1.585
2.0	40.04	0.1321	0.3347	0.6693	1.672
3.0	60.06	0.2553	0.6017	1.203	2.003
4.0	80.09	0.4069	0.9197	1.839	2.297
5.0	100.1	0.5442	1.220	2.440	2.438



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 2.

Les limites d'acceptation ont été fixées à $\pm 5\%$, 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.

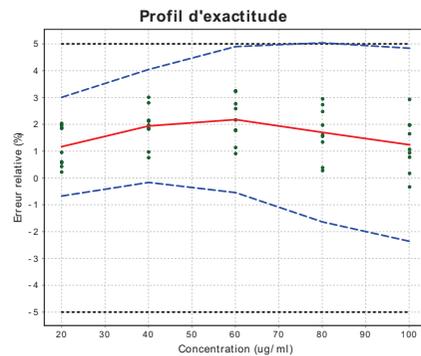
La formule utilisée pour le calcul de cet intervalle de tolérance est:

$$\text{biais}(\%) \pm kCV_{FI}(\%)$$

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 des limites.

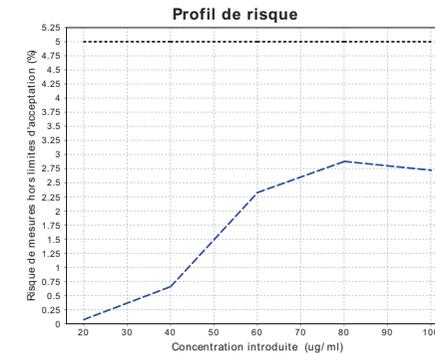
Figure 2 - Profil d'exactitude obtenu en considérant le modèle: Régression linéaire passant par 0 Ajustée en utilisant uniquement le niveau le plus haut



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 XI 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.

Figure 3 - Profil de risque obtenu en considérant le modèle: Régression linéaire passant par 0 Ajustée en utilisant uniquement le niveau le plus haut



La ligne pointillée noire représente le niveau de risque maximum choisi, à savoir : 5.0%.

Tableau XI - Exactitude de la méthode obtenue en considérant le modèle Régression linéaire passant par 0 Ajustée en utilisant uniquement le niveau le plus haut

Niveau de concentration (ug/ml)	Moyenne des concentrations introduites ¹ (ug/ml)	Limites de tolérance "Beta-attente" (ug/ml)	Limites de tolérance "Beta-attente" relatives (%)	Risque ² (%)
1.0	20.02	[19.89 , 20.62]	[-0.6721 , 3.007]	0.07511
2.0	40.04	[39.98 , 41.66]	[-0.1660 , 4.045]	0.6591
3.0	60.06	[59.74 , 63.01]	[-0.5449 , 4.899]	2.326
4.0	80.09	[78.77 , 84.12]	[-1.639 , 5.038]	2.878
5.0	100.1	[97.74 , 104.9]	[-2.361 , 4.836]	2.722



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.



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 4) a été ajusté sur les concentrations calculées en fonction des concentrations introduites dans le but d'obtenir l'équation suivante:

$$Y = 0.2052 + 1.013 X$$

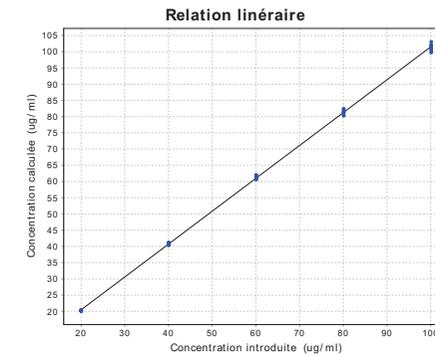
où Y = concentrations calculées (ug/ml) et X = concentrations introduites (ug/ml).

Le coefficient de détermination (r^2) est égal à 0.9995 .

La somme des carrés des résidus (SCR) est égale à 17.86 .

Les concentrations calculées figurent en annexe 3.

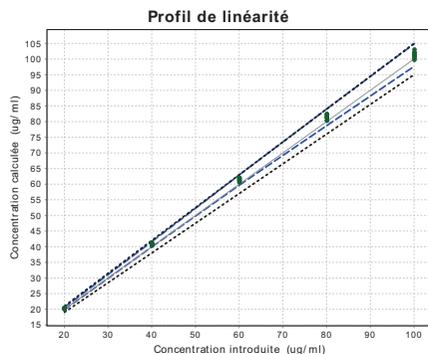
Figure 4 - Relation entre les concentrations introduites et calculées



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 5.



Figure 5 - 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:

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

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.



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 $Y_{LD} =$ Ordonnée à l'origine (0 si négative) + 3 * 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 (ug/ml) = 1.274

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}) (ug/ml) = 20.02

Limite supérieure de quantification (LQ_{sup}) (ug/ml) = 74.60



10. Références bibliographiques

1. Burdik RK, Graybill FA. Confidence interval on variance components. New York: CRC Press;1992.
2. Derringer D, Suich 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>.
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.

ANNEXE XIV

Résultats de l'étude de stabilité de la solution de furosémide à 1 mg/mL

Furosémide lot : P0KF6 n° analyse : 170611/K				
<i>Stabilité à 30°C et à l'abri de la lumière</i>				
T0 + x jours	0	90	180	360
<i>Tests analytiques</i>				
Aspect visuel	C	C	C	NA
pH	8.73	8.90	8.53	
Osmolalité [mOSM]	305	306	306	
Furosémide [mg/mL]	1.049	1.015	1.054	
Particules 10 µm [particules /vial]	8	NA	773.3	
Particules 25 µm [particules /vial]	0		8	
Essai de stérilité	C		C	
Endotoxines [UI/ml]	< 0.05		< 0.05	

Furosémide lot : P0KFC n° analyse : 170611/I				
<i>Stabilité à 30°C et à l'abri de la lumière</i>				
T0 + x jours	0	90	180	360
<i>Tests analytiques</i>				
Aspect visuel	C	C	C	NA
pH	8.77	8.93	8.53	
Osmolalité [mOSM]	299	301	301	
Furosémide [mg/mL]	1.043	1.050	1.054	
Particules 10 µm [particules /vial]	0	NA	192	
Particules 25 µm [particules /vial]	0		18.7	
Essai de stérilité	C		C	
Endotoxines [UI/ml]	< 0.05		< 0.05	

Furosémide lot : P0KFD n° analyse : 170611/J				
<i>Stabilité à 30°C et à l'abri de la lumière</i>				
T0 + x jours	0	90	180	360
<i>Tests analytiques</i>				
Aspect visuel	C	C	C	NA
pH	8.76	8.90	8.54	
Osmolalité [mOSM]	307	307	308	
Furosémide [mg/mL]	1.025	0.966	1.034	
Particules 10 µm [particules /vial]	21.33	NA	970	
Particules 25 µm [particules /vial]	0		2.6	
Essai de stérilité	C		C	
Endotoxines [UI/ml]	< 0.05		< 0.05	

ANNEXE XIV

Furosémide lot : P0KF6 n° analyse : 170611/K				
<i>Stabilité à 5°C et à l'abri de la lumière</i>				
T0 + x jours	0	90	180	360
<i>Tests analytiques</i>				
Aspect visuel	NA	C	C	NA
pH		8.96	8.75	
Osmolalité [mOSM]		305	305	
Furosémide [mg/mL]		0.995	1.060	
Particules 10 µm [particules /vial]		NA	314.7	
Particules 25 µm [particules /vial]			18.7	
Essai de stérilité			C	
Endotoxines [UI/ml]			< 0.05	

Furosémide lot : P0KFC n° analyse : 170611/I				
<i>Stabilité à 5°C et à l'abri de la lumière</i>				
T0 + x jours	0	90	180	360
<i>Tests analytiques</i>				
Aspect visuel	NA	C	C	NA
pH		8.95	8.54	
Osmolalité [mOSM]		306	300	
Furosémide [mg/mL]		0.994	1.054	
Particules 10 µm [particules /vial]		NA	213.3	
Particules 25 µm [particules /vial]			2.7	
Essai de stérilité			C	
Endotoxines [UI/ml]			< 0.05	

Furosémide lot : P0KFD n° analyse : 170611/J				
<i>Stabilité à 5°C et à l'abri de la lumière</i>				
T0 + x jours	0	90	180	360
<i>Tests analytiques</i>				
Aspect visuel	NA	C	C	NA
pH		8.92	8.73	
Osmolalité [mOSM]		308	308	
Furosémide [mg/mL]		0.972	1.048	
Particules 10 µm [particules /vial]		NA	322.67	
Particules 25 µm [particules /vial]			16	
Essai de stérilité			C	
Endotoxines [UI/ml]			< 0.05	

ANNEXE XIV

Furosémide lot : P0KF6 n° analyse : 170611/K				
<i>Stabilité à -20°C et à l'abri de la lumière</i>				
T0 + x jours	0	90	180	360
<i>Tests analytiques</i>				
Aspect visuel	NA	C	C	NA
pH		8.95	8.75	
Osmolalité [mOSM]		306	307	
Furosémide [mg/mL]		0.990	1.059	
Particules 10 µm [particules /vial]		NA	285.3	
Particules 25 µm [particules /vial]			8	
Essai de stérilité			C	
Endotoxines [UI/ml]			< 0.05	

Furosémide lot : P0KFC n° analyse : 170611/I				
<i>Stabilité à -20°C et à l'abri de la lumière</i>				
T0 + x jours	0	90	180	360
<i>Tests analytiques</i>				
Aspect visuel	NA	C	C	NA
pH		8.98	8.73	
Osmolalité [mOSM]		297	307	
Furosémide [mg/mL]		1.003	1.071	
Particules 10 µm [particules /vial]		NA	1144	
Particules 25 µm [particules /vial]			82.7	
Essai de stérilité			C	
Endotoxines [UI/ml]			< 0.05	

Furosémide lot : P0KFD n° analyse : 170611/J				
<i>Stabilité à -20°C et à l'abri de la lumière</i>				
T0 + x jours	0	90	180	360
<i>Tests analytiques</i>				
Aspect visuel	NA	C	C	NA
pH		8.96	8.68	
Osmolalité [mOSM]		307	309	
Furosémide [mg/mL]		0.959	1.046	
Particules 10 µm [particules /vial]		NA	742	
Particules 25 µm [particules /vial]			44.8	
Essai de stérilité			C	
Endotoxines [UI/ml]			< 0.05	

ANNEXE XV

Rapport Enoval pour la prévalidation du cidofovir



Nom: Lina Berger
Société: HOSPICES CANTONAU
Département: -
Phase: Prévalidation, non destiné à la validation
Numéro de référence: Annexe

1 / 23

PRÉVALIDATION DU DOSAGE DU CIDOFOVIR PAR CE

Nom: Lina Berger
Société: HOSPICES CANTONAU
Département: -
Phase: Prévalidation, non destiné à la validation
Numéro de référence: Annexe
Méthode: CE-DAD
Protocole: Annexe
Produit: cidofovir 7.5 mg/ml
Composé: cidofovir
Matrice: NaCl 0.9%



Nom: Lina Berger
Société: HOSPICES CANTONAU
Département: -
Phase: Prévalidation, non destiné à la validation
Numéro de référence: Annexe

2 / 23

Table des matières

1. Introduction.....	4
2. Plan d'expériences.....	5
3. Fonction de réponse.....	6
4. Justesse.....	9
5. Fidélité.....	10
6. Exactitude.....	12
7. Linéarité des résultats.....	15
8. Limite de détection (LD), limites de quantification (LQ) et intervalle de dosage..	17
Annexe 1 Données.....	18
Annexe 2 Concentrations calculées pour le modèle sélectionné.....	20
Annexe 3 Diagnostics.....	21

Table des tableaux

Tableau I - Standards d'étalonnage.....	5
Tableau II - Modèles d'étalonnage triés par 'Indice d'Exactitude'.....	6
Tableau III - Paramètres de régression.....	7
Tableau IV - Justesse.....	9
Tableau V - Répétabilité et Fidélité intermédiaire relatives.....	10
Tableau VI - Répétabilité et Fidélité Intermédiaire absolues.....	10
Tableau VII - Limite supérieure de confiance à 95%.....	10
Tableau VIII - Taux de recouvrement par série.....	10
Tableau IX - Exactitude de la méthode obtenue en considérant le modèle Régression quadratique pondérée (1/X)	14
Tableau X - Standards d'étalonnage (hors matrice).....	18
Tableau XI - Standards d'étalonnage (dans la matrice).....	18
Tableau XII - Alignement des données ¹	19
Tableau XIII - Concentrations calculées ¹	20
Tableau XIV - Test de Levène.....	21
Tableau XV - Test de manque d'ajustement du modèle de régression linéaire sélectionné pour l'étalonnage.....	21
Tableau XVI - Résidus standardisés pour le modèle d'étalonnage choisi.....	21

Table des figures

Figure 1 - Courbes d'étalonnage.....	8
---	---



Figure 2 - Profil d'exactitude obtenu en considérant le modèle: Régression quadratique pondérée (1/X)	12
Figure 3 - Profil de risque obtenu en considérant le modèle: Régression quadratique pondérée (1/X)	13
Figure 4 - Relation entre les concentrations introduites et calculées.....	15
Figure 5 - Graphe de linearité.....	16
Figure 6 - Résidus standardisés.....	22



Prévalidation du dosage du cidofovir par CE

1. Introduction

Les critères de prévalidation 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.



2. Plan d'expériences

Tableau I - Standards d'étalonnage

A. Hors matrice.

Série	Niveau de concentration (mg/ml)	Nb. de répétitions
1	1.0	2
1	2.0	2
1	3.0	2
2	1.0	2
2	2.0	2
2	3.0	2

Le nombre total d'observations est 12.

B. Dans la matrice.

Série	Niveau de concentration (mg/ml)	Nb. de répétitions
1	1.0	3
1	2.0	3
1	3.0	3
2	1.0	3
2	2.0	3
2	3.0	3

Le nombre total d'observations est 18.

Toutes les données sont reprises dans l'annexe 1.



3. Fonction de réponse

Le tableau II reprend les modèles de régression sélectionnés. Ces modèles ont été triés en fonction de leur "indice d'exactitude".

Tableau II - Modèles d'étalonnage triés par 'Indice d'Exactitude'

Modèle	Indice d'Exactitude	Limite inférieure et supérieure de quantification (LQ) (mg/ml)	Indice d'Intervalle de Dosage	Indice de Fidélité	Indice de Justesse
Regression quadratique ponderee (1/X) (dans la matrice)	0.6317	[0.2030 , 0.2383]	0.3475	0.7253	1.0000
Regression quadratique ponderee (1/X^2) (dans la matrice)	0.6317	[0.2030 , 0.2383]	0.3475	0.7253	1.0000
Regression quadratique (dans la matrice)	0.6317	[0.2030 , 0.2383]	0.3475	0.7253	1.0000
Regression lineaire ponderee (1/X^2) (dans la matrice)	0.6163	[0.2730 , 0.3046]	0.3108	0.7578	0.9942
Regression lineaire ponderee (1/X) (dans la matrice)	0.6141	[0.2735 , 0.3046]	0.3058	0.7619	0.9941
Regression lineaire apres transformation logarithmique (dans la matrice)	0.6140	[0.2735 , 0.3046]	0.3055	0.7624	0.9935
Regression lineaire apres transformation racine carree (dans la matrice)	0.6130	[0.2738 , 0.3046]	0.3034	0.7640	0.9938
Regression lineaire (dans la matrice)	0.6121	[0.2739 , 0.3046]	0.3015	0.7653	0.9938
Regression lineaire passant par 0 ajustee en utilisant uniquement le niveau 3 (dans la matrice)	0.5878	[0.2785 , 0.3046]	0.2569	0.8007	0.9875
Regression lineaire passant par 0 ajustee en utilisant uniquement le niveau 1.0 (dans la matrice)	0.5265	[0.2030 , 0.2208]	0.1749	0.8642	0.9655



Modèle	Indice d'Exactitude	Limite inférieure et supérieure de quantification (LQ) (mg/ml)	Indice d'Intervalle de Dosage	Indice de Fidélité	Indice de Justesse
Regression lineaire passant par 0 ajustee en utilisant uniquement le niveau 3 (hors matrice)	0	ND	0	0	0
Regression lineaire (hors matrice)	0	ND	0	0	0
Regression lineaire ponderee (1/X) (hors matrice)	0	ND	0	0	0
Regression lineaire ponderee (1/X^2) (hors matrice)	0	ND	0	0	0
Regression lineaire apres transformation logarithmique (hors matrice)	0	ND	0	0	0
Regression lineaire apres transformation racine carree (hors matrice)	0	ND	0	0	0
Regression quadratique (hors matrice)	0	ND	0	0	0
Regression quadratique ponderee (1/X) (hors matrice)	0	ND	0	0	0
Regression quadratique ponderee (1/X^2) (hors matrice)	0	ND	0	0	0
Regression lineaire passant par 0 ajustee en utilisant uniquement le niveau 1.0 (hors matrice)	0	ND	0	0	0

Le modèle d'étalonnage sélectionné est: **Régression quadratique pondérée (1/X) (dans la matrice)**.

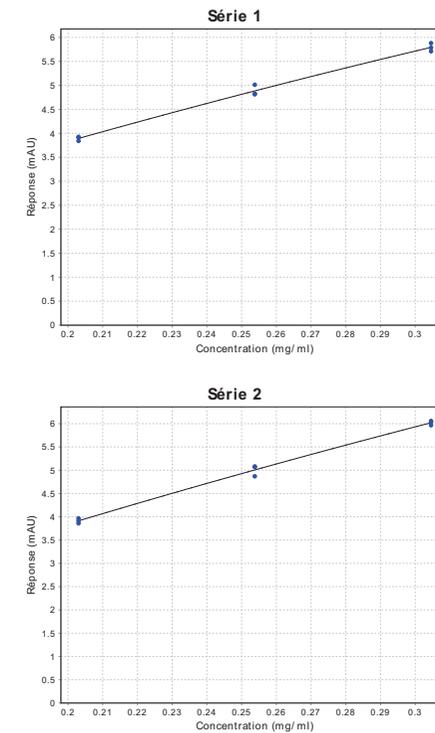
Tableau III - Paramètres de régression

Série	Ordonnée à l'origine	Pente	Terme Quadratique	r ²	d.d.l. résiduels	SCR
1	-0.9002	26.88	-16.11	0.9921	6	0.04333
2	-1.256	28.60	-15.46	0.9943	6	0.03808



r² = coefficient de détermination; d.d.l. = degrés de liberté; SCR = somme des carrés des résidus

Figure 1 - Courbes d'étalonnage





4. Justesse

Tableau IV - Justesse

Niveau de concentration (mg/ml)	Moyenne des concentrations introduites (mg/ml)	Moyenne des concentrations calculées (mg/ml)	Biais absolu (mg/ml)	Biais relatif (%)	Taux de recouvrement (%)	Intervalle de confiance à 95% des Recouvrements (%)
1.0	0.2030	0.2030	0.00000261	0.001286	100.0	[98.94 , 101.1]
2.0	0.2538	0.2538	0.00001831	0.007215	100.0	[97.85 , 102.2]
3.0	0.3046	0.3046	0.00000937	0.003077	100.0	[98.80 , 101.2]



5. Fidélité

Tableau V - Répétabilité et Fidélité intermédiaire relatives

Niveau de concentration (mg/ml)	Moyenne des concentrations introduites (mg/ml)	Répétabilité (CV%)*	Fidélité Intermédiaire (CV%)*
1.0	0.2030	1.014	1.014
2.0	0.2538	2.057	2.057
3.0	0.3046	1.150	1.150

* 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 VI - Répétabilité et Fidélité Intermédiaire absolues

Niveau de concentration (mg/ml)	Moyenne des concentrations introduites (mg/ml)	Répétabilité (SD - mg/ml)	Inter-Séries (SD - mg/ml)	Ratio des composants de la variance (Inter / Intra)	Fidélité Intermédiaire (SD - mg/ml)
1.0	0.2030	0.002058	0	0	0.002058
2.0	0.2538	0.005222	0	0	0.005222
3.0	0.3046	0.003503	0	0	0.003503

Tableau VII - Limite supérieure de confiance à 95%

Niveau de concentration (mg/ml)	Moyenne des concentrations introduites (mg/ml)	Limite supérieure de confiance à 95% de la répétabilité (SD - mg/ml)	Limite supérieure de confiance à 95% de la fidélité intermédiaire (SD - mg/ml)
1.0	0.2030	0.004299	0.004299
2.0	0.2538	0.01091	0.01091
3.0	0.3046	0.007318	0.007318

Tableau VIII - Taux de recouvrement par série

Niveau de concentration (mg/ml)	Série	Moyenne des concentrations introduites (mg/ml)	Concentration calculée (mg/ml)	Taux de recouvrement (%)
1.0	1	0.2030	0.2030	100.0
1.0	2	0.2030	0.2030	100.0
1.0	Moyenne des séries	0.2030	0.2030	100.0
2.0	1	0.2538	0.2538	100.0



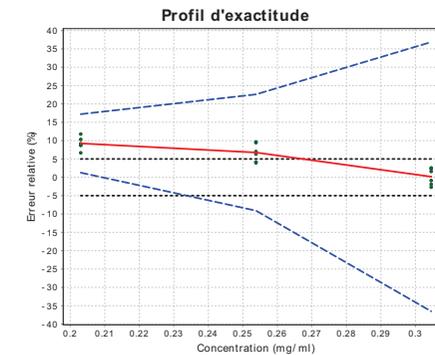
Niveau de concentration (mg/ml)	Série	Moyenne des concentrations introduites (mg/ml)	Concentration calculée (mg/ml)	Taux de recouvrement (%)
2.0	2	0.2538	0.2538	100.0
2.0	Moyenne des series	0.2538	0.2538	100.0
3.0	1	0.3046	0.3046	100.0
3.0	2	0.3046	0.3046	100.0
3.0	Moyenne des series	0.3046	0.3046	100.0



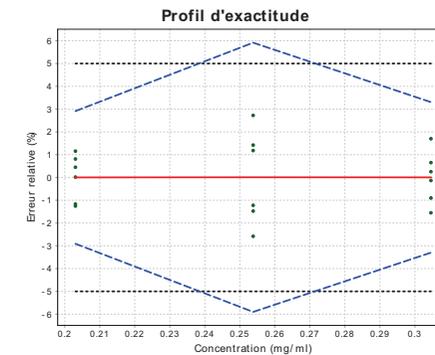
6. Exactitude

Figure 2 - Profil d'exactitude obtenu en considérant le modèle: Régression quadratique pondérée (1/X)

A. Hors matrice.



B. Dans la matrice.



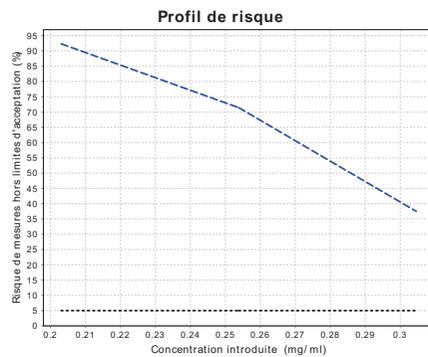
La ligne rouge continue représente le biais, les lignes discontinues bleues définissent les limites de l'intervalle de tolérance attendu au niveau β et les lignes pointillées noires sont les limites d'acceptation. Les points sont quant à eux l'erreur relative des concentrations calculées et sont représentés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



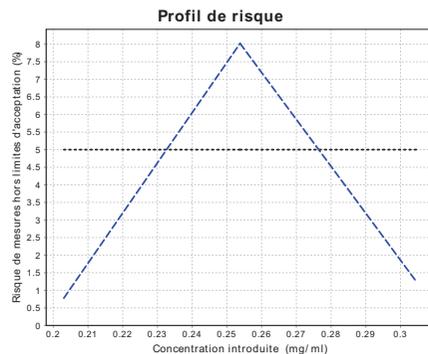
Les limites inférieures et supérieures de l'intervalle de tolérance exprimées en erreur relative sont également présentées dans le tableau IX pour chaque niveau de concentration introduit. Le risque d'avoir des mesures en dehors des limites d'acceptation à chaque niveau est calculé uniquement s'il y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

Figure 3 - Profil de risque obtenu en considérant le modèle: Régression quadratique pondérée (1/X)

A. Hors matrice.



B. Dans la matrice.



La ligne pointillée noire représente le niveau de risque maximum choisi, à savoir : 5.0%.



Tableau IX - Exactitude de la méthode obtenue en considérant le modèle Régression quadratique pondérée (1/X)

A. Hors matrice.

Niveau de concentration (mg/ml)	Moyenne des concentrations introduites ¹ (mg/ml)	Beta-expectation tolérance limit (mg/ml)	Beta-expectation tolérance limit relatif (%)	Risque ² (%)
1.0	0.2030	[0.2056 , 0.2380]	[1.263 , 17.21]	92.33
2.0	0.2538	[0.2307 , 0.3112]	[-9.088 , 22.60]	71.44
3.0	0.3046	[0.1933 , 0.4168]	[-36.52 , 36.86]	37.49

B. Dans la matrice.

Niveau de Concentration (mg/ml)	Moyenne des concentrations introduites ¹ (mg/ml)	Beta-expectation tolérance limit (mg/ml)	Beta-expectation tolérance limit relatif (%)	Risque ² (%)
1.0	0.2030	[0.1971 , 0.2090]	[-2.909 , 2.912]	0.7772
2.0	0.2538	[0.2388 , 0.2688]	[-5.902 , 5.916]	8.021
3.0	0.3046	[0.2945 , 0.3146]	[-3.300 , 3.306]	1.248

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.



7. Linéarité des résultats

$$Y = -0.00000681 + 1.000 X$$

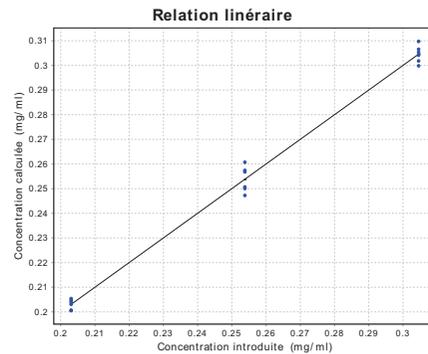
où Y = concentrations calculées (mg/ml)

et X = concentrations introduites (mg/ml)

Le coefficient de détermination (r^2) est égal à 0.9930 .

La somme des carrés des résidus (SCR) est égale à 0.0002189.

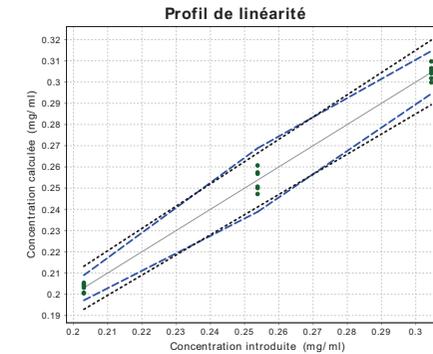
Figure 4 - Relation entre les concentrations introduites et calculées



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 5.



Figure 5 - 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 "β-expectation tolerance limits" exprimées en valeur absolue.



Nom: Lina Berger

Société: HOSPICES CANTONNAUX

Département: -

Phase: Prévalidation, non destiné à la validation

Numéro de référence: Annexe

17 / 23

8. Limite de détection (LD), limites de quantification (LQ) et intervalle de dosage

LD (mg/ml) = 0.05827

Limite inférieure de quantification (LQ_{inf}) (mg/ml) = 0.2030

Limite supérieure de quantification (LQ_{sup}) (mg/ml) = 0.2383

ANNEXE XVI

Rapport Enoval pour la validation du cidofovir



Nom: Lina Berger
Société: HOSPICES CANTONAUX
Département: -
Phase: Validation
Numéro de référence: Annexe

1 / 43

VALIDATION DU DOSAGE DE CIDOFOVIR PAR CE

Nom: Lina Berger
Société: HOSPICES CANTONAUX
Département: -
Phase: Validation
Numéro de référence: Annexe
Méthode: CE-DAD
Protocole: Annexe
Produit: cidofovir 7.5 mg/ml
Composé: cidofovir
Matrice: NaCl 0.9%



Nom: Lina Berger
Société: HOSPICES CANTONAUX
Département: -
Phase: Validation
Numéro de référence: Annexe

2 / 43

Table des matières

1. Introduction.....	5
2. Plan d'expériences.....	6
3. Fonction de réponse.....	8
4. Justesse.....	11
5. Fidélité.....	12
6. Incertitude de mesure.....	14
7. Exactitude.....	15
8. Linéarité des résultats.....	17
9. Limite de détection (LD), limites de quantification (LQ) et intervalle de dosage..	19
10. Références bibliographiques.....	20
Annexe 1 Données.....	22
Annexe 2 Sélection du modèle d'étalonnage.....	25
Annexe 3 Concentrations calculées pour le modèle sélectionné.....	34
Annexe 4 Diagnostics.....	35
Annexe 5 Statistiques.....	36
Annexe 6 Résumé.....	40

Table des tableaux

Tableau I - Standards d'étalonnage.....	6
Tableau II - Standards de Validation.....	6
Tableau III - Modèles d'étalonnage triés par 'Indice d'Exactitude'.....	8
Tableau IV - Paramètres de régression.....	9
Tableau V - Justesse.....	11
Tableau VI - Répétabilité et Fidélité intermédiaire relatives.....	12
Tableau VII - Répétabilité et Fidélité Intermédiaire absolues.....	12
Tableau VIII - Limite supérieure de confiance à 95%.....	12
Tableau IX - Taux de recouvrement par série.....	13
Tableau X - Incertitude.....	14
Tableau XI - Exactitude de la méthode obtenue en considérant le modèle Régression linéaire passant par 0 Ajusté en utilisant uniquement le niveau 1.0	16
Tableau XII - Standards d'étalonnage.....	22
Tableau XIII - Standards de Validation.....	22
Tableau XIV - Alignement des données ¹	23
Tableau XV - Justesse de la méthode et exactitude obtenues en considérant une Régression quadratique	25



Tableau XVI - Justesse de la méthode et exactitude obtenues en considérant une Régression quadratique pondérée ($1/X$)	26
Tableau XVII - Justesse de la méthode et exactitude obtenues en considérant une Régression quadratique pondérée ($1/X^2$)	27
Tableau XVIII - Justesse de la méthode et exactitude obtenues en considérant une Régression linéaire pondérée ($1/X^2$)	28
Tableau XIX - Justesse de la méthode et exactitude obtenues en considérant une Régression linéaire après transformation logarithmique	29
Tableau XX - Justesse de la méthode et exactitude obtenues en considérant une Régression linéaire pondérée ($1/X$)	30
Tableau XXI - Justesse de la méthode et exactitude obtenues en considérant une Régression linéaire après transformation racine carrée	31
Tableau XXII - Justesse de la méthode et exactitude obtenues en considérant une Régression linéaire	32
Tableau XXIII - Justesse de la méthode et exactitude obtenues en considérant une Régression linéaire passant par 0 Ajustée en utilisant uniquement le niveau le plus haut	33
Tableau XXIV - Concentrations calculées ¹	34
Tableau XXV - Résidus standardisés pour le modèle d'étalonnage choisi.....	35

Table des figures

Figure 1 - Courbes d'étalonnage.....	9
Figure 2 - Profil d'exactitude obtenu en considérant le modèle: Régression linéaire passant par 0 Ajusté en utilisant uniquement le niveau 1.0	15
Figure 3 - Profil de risque obtenu en considérant le modèle: Régression linéaire passant par 0 Ajusté en utilisant uniquement le niveau 1.0	16
Figure 4 - Relation entre les concentrations introduites et calculées.....	17
Figure 5 - Graphe de linearité.....	18
Figure 6 - Profil d'Exactitude obtenu en considérant une Régression quadratique.....	25
Figure 7 - Profil d'Exactitude obtenu en considérant une Régression quadratique pondérée ($1/X$)	26
Figure 8 - Profil d'Exactitude obtenu en considérant une Régression quadratique pondérée ($1/X^2$)	27
Figure 9 - Profil d'Exactitude obtenu en considérant une Régression linéaire pondérée ($1/X^2$)	28
Figure 10 - Profil d'Exactitude obtenu en considérant une Régression linéaire après transformation logarithmique	29
Figure 11 - Profil d'Exactitude obtenu en considérant une Régression linéaire pondérée ($1/X$)	30



Figure 12 - Profil d'Exactitude obtenu en considérant une Régression linéaire après transformation racine carrée	31
Figure 13 - Profil d'Exactitude obtenu en considérant une Régression linéaire	32
Figure 14 - Profil d'Exactitude obtenu en considérant une Régression linéaire passant par 0 Ajustée en utilisant uniquement le niveau le plus haut	33
Figure 15 - Résidus standardisés.....	35



Validation du dosage de cidofovir par CE

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.



2. Plan d'expériences

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 : NaCl 0.9%

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

Tableau I - Standards d'étalonnage

Série	Niveaux de concentration (mg/ml)	Nb. de répétitions
1	1.0	2
1	2.0	2
1	3.0	2
2	1.0	2
2	2.0	2
2	3.0	2
3	1.0	2
3	2.0	2
3	3.0	2

Le nombre total d'observations est 18.

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 II reprend le nombre de standards de validation par niveau de concentration, les niveaux de concentration considérés et les différentes séries réalisées.

Tableau II - 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



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

Le nombre total d'observations est 27.

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



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 III reprend les modèles de régression sélectionnés. Ces modèles ont été triés en fonction de leur "indice d'exactitude" (cfr. annexe 2).

Tableau III - Modèles d'étalonnage triés par 'Indice d'Exactitude'

Modèle	Indice d'Exactitude	Limite inférieure et supérieure de quantification (mg/ml)	Indice d'Intervalle de Dosage	Indice de Fidélité	Indice de Justesse
Regression quadratique ponderee (1/X^2)	0.8798	[0.2000 , 0.3000]	1.000	0.6855	0.9935
Regression quadratique ponderee (1/X)	0.8798	[0.2000 , 0.3000]	1.000	0.6855	0.9935
Regression quadratique	0.8798	[0.2000 , 0.3000]	1.000	0.6855	0.9935
Regression lineaire ponderee (1/X^2)	0.7824	[0.2000 , 0.3000]	1.000	0.4810	0.9959
Regression lineaire apres transformation logarithmique	0.7801	[0.2000 , 0.3000]	1.000	0.4765	0.9962
Regression lineaire ponderee (1/X)	0.7784	[0.2000 , 0.3000]	1.000	0.4734	0.9965
Regression lineaire apres transformation racine carree	0.7776	[0.2000 , 0.3000]	1.000	0.4718	0.9967
Regression lineaire passant par 0 ajustee en utilisant uniquement le niveau 1.0	0.7761	[0.2000 , 0.3000]	1.000	0.4797	0.9746
Regression lineaire	0.7738	[0.2000 , 0.3000]	1.000	0.4647	0.9972
Regression lineaire passant par 0 ajustee en utilisant uniquement le niveau 3	0.7638	[0.2000 , 0.3000]	1.000	0.4705	0.9470



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 passant par 0 ajustée en utilisant uniquement le niveau 1.0**

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

$$Y = bX$$

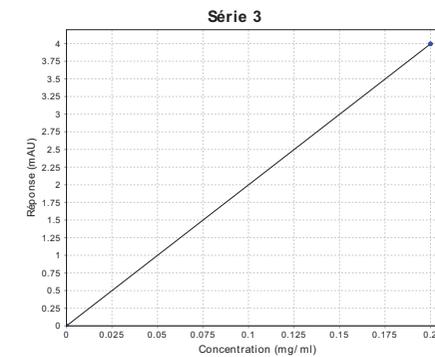
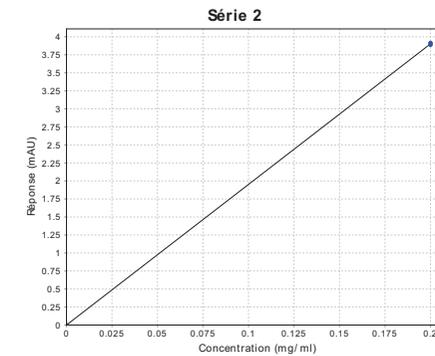
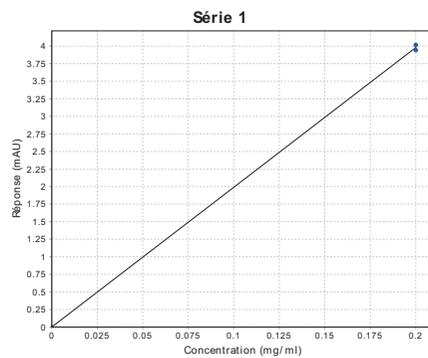
où Y = réponse analytique (en mAU) et X = concentration introduite (en mg/ml)

Tableau IV - Paramètres de régression

Série	Pente	r ²	d.d.l. résiduels	SCR
1	19.90	ND	1	0.002646
2	19.51	ND	1	0.0002862
3	19.98	ND	1	0.00000121

r² = coefficient de détermination; d.d.l. = degrés de liberté; SCR = somme des carrés des résidus

Figure 1 - Courbes d'étalonnage





4. Justesse

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

Comme indiqué dans le tableau V, la justesse est exprimée en terme de biais absolu (mg/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 V - Justesse

Niveau de concentration (mg/ml)	Moyenne des concentrations introduites (mg/ml)	Moyenne des concentrations calculées (mg/ml)	Biais absolu (mg/ml)	Biais relatif (%)	Taux de recouvrement (%)	Intervalle de confiance à 95% des Recouvrements (%)
1.0	0.2000	0.2025	0.002500	1.250	101.3	[100.8 , 101.7]
2.0	0.2500	0.2477	-0.002266	-0.9064	99.09	[98.11 , 100.1]
3.0	0.3000	0.2931	-0.006856	-2.285	97.71	[96.50 , 98.93]



5. Fidélité

La fidélité exprime l'écart de l'accord 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 VI et le tableau VII, 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 VI - Répétabilité et Fidélité intermédiaire relatives

Niveau de concentration (mg/ml)	Moyenne des concentrations introduites (mg/ml)	Répétabilité (CV%) ¹	Fidélité Intermédiaire (CV%) ¹
1.0	0.2000	0.5491	0.6791
2.0	0.2500	0.5302	1.449
3.0	0.3000	0.8297	1.767

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 VII - Répétabilité et Fidélité Intermédiaire absolues

Niveau de concentration (mg/ml)	Moyenne des concentrations introduites (mg/ml)	Répétabilité (SD - mg/ml)	Inter-Séries (SD - mg/ml)	Ratio des composants de la variance (Inter / Intra)	Fidélité Intermédiaire (SD - mg/ml)
1.0	0.2000	0.001098	0.0007993	0.5298	0.001358
2.0	0.2500	0.001326	0.003372	6.469	0.003623
3.0	0.3000	0.002489	0.004681	3.537	0.005302

Tableau VIII - Limite supérieure de confiance à 95%

Niveau de concentration (mg/ml)	Moyenne des concentrations introduites (mg/ml)	Limite supérieure de confiance à 95% de la répétabilité (SD - mg/ml)	Limite supérieure de confiance à 95% de la fidélité intermédiaire (SD - mg/ml)
1.0	0.2000	ND	0.004606



Nom: Lina Berger
Société: HOSPICES CANTONAUX
Département: -
Phase: Validation
Numéro de référence: Annexe

13 / 43

Niveau de concentration (mg/ml)	Moyenne des concentrations introduites (mg/ml)	Limite supérieure de confiance à 95% de la répétabilité (SD - mg/ml)	Limite supérieure de confiance à 95% de la fidélité intermédiaire (SD - mg/ml)
2.0	0.2500	ND	0.01530
3.0	0.3000	0.004768	0.02172

De plus, le taux de recouvrement de chaque série ainsi que toute les séries est rapporté dans le tableau IX.

Tableau IX - Taux de recouvrement par série

Niveau de concentration (mg/ml)	Série	Moyenne des concentrations introduites (mg/ml)	Concentration calculée (mg/ml)	Taux de recouvrement (%)
1.0	1	0.2000	0.2013	100.7
1.0	2	0.2000	0.2029	101.4
1.0	3	0.2000	0.2033	101.6
1.0	Moyenne des series	0.2000	0.2025	101.3
2.0	1	0.2500	0.2511	100.4
2.0	2	0.2500	0.2480	99.20
2.0	3	0.2500	0.2442	97.66
2.0	Moyenne des series	0.2500	0.2477	99.09
3.0	1	0.3000	0.2875	95.84
3.0	2	0.3000	0.2965	98.84
3.0	3	0.3000	0.2954	98.46
3.0	Moyenne des series	0.3000	0.2931	97.71



Nom: Lina Berger
Société: HOSPICES CANTONAUX
Département: -
Phase: Validation
Numéro de référence: Annexe

14 / 43

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 X - Incertitude

Niveau de concentration (mg/ml)	Moyenne des concentrations introduites (mg/ml)	Incertainité du biais (mg/ml)	Incertainité (mg/ml)	Incertainité étendue (mg/ml)	Incertainité étendue relative (%)
1.0	0.2000	0.0005890	0.001480	0.002961	1.480
2.0	0.2500	0.001996	0.004136	0.008273	3.309
3.0	0.3000	0.002827	0.006008	0.01202	4.006



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 2.

Les limites d'acceptation ont été fixées à $\pm 10\%$, 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.

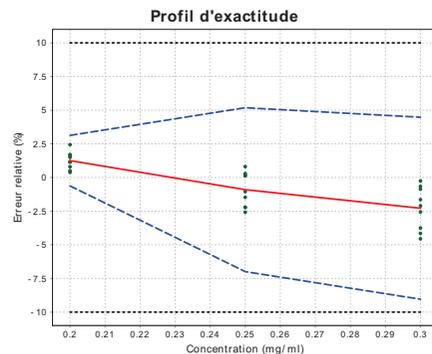
La formule utilisée pour le calcul de cet intervalle de tolérance est:

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

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.

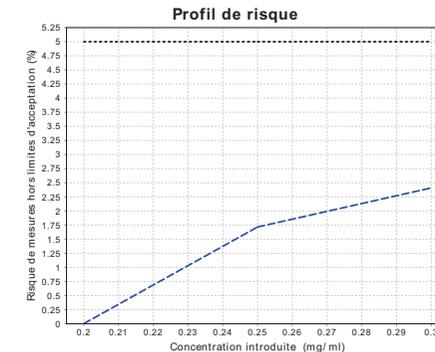
Figure 2 - Profil d'exactitude obtenu en considérant le modèle: Régression linéaire passant par 0 Ajusté en utilisant uniquement le niveau 1.0



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 XI 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.

Figure 3 - Profil de risque obtenu en considérant le modèle: Régression linéaire passant par 0 Ajusté en utilisant uniquement le niveau 1.0



La ligne pointillée noire représente le niveau de risque maximum choisi, à savoir : 5.0%.

Tableau XI - Exactitude de la méthode obtenue en considérant le modèle Régression linéaire passant par 0 Ajusté en utilisant uniquement le niveau 1.0

Niveau de concentration (mg/ml)	Moyenne des concentrations introduites ¹ (mg/ml)	Limites de tolérance "Beta-attente" (mg/ml)	Limites de tolérance "Beta-attente" relatives (%)	Risque ² (%)
1.0	0.2000	[0.1987 , 0.2063]	[-0.6266 , 3.127]	0.003584
2.0	0.2500	[0.2325 , 0.2630]	[-6.994 , 5.181]	1.716
3.0	0.3000	[0.2729 , 0.3134]	[-9.044 , 4.474]	2.408

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.



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 4) a été ajusté sur les concentrations calculées en fonction des concentrations introduites dans le but d'obtenir l'équation suivante:

$$Y = 0.02118 + 0.9064 X$$

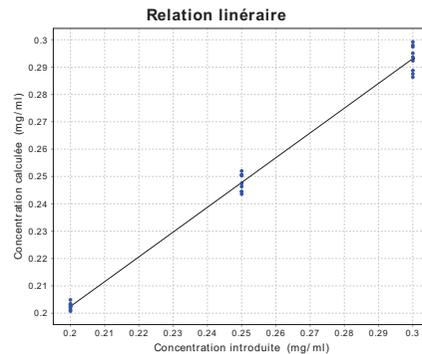
où Y = concentrations calculées (mg/ml) et X = concentrations introduites (mg/ml).

Le coefficient de détermination (r^2) est égal à 0.9926 .

La somme des carrés des résidus (SCR) est égale à 0.0002768.

Les concentrations calculées figurent en annexe 3.

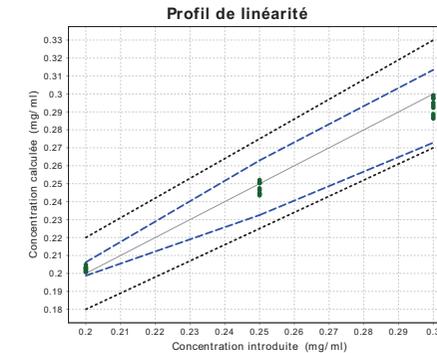
Figure 4 - Relation entre les concentrations introduites et calculées



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 5.



Figure 5 - 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:

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

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.



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} = Ordonnée à l'origine (0 si négative) + 3 * 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 (mg/ml) = 0.003507

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}) (mg/ml) = 0.2000

Limite supérieure de quantification (LQ_{sup}) (mg/ml) = 0.3000



10. Références bibliographiques

1. Burdik RK, Graybill FA. Confidence interval on variance components. New York: CRC Press;1992.
2. Derringer D, Suich 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>.
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.

ANNEXE XVII

Résultats de l'étude de stabilité du cidofovir à 7.5 mg/mL

Cidofovir lot : P0K6H n° analyse : 300511/A				
<i>Stabilité à 30°C et à l'abri de la lumière</i>				
T0 + x jours	0	90	180	360
<i>Tests analytiques</i>				
Aspect visuel	C	C	C	NA
pH	7.38	7.45	7.40	
Cidofovir [mg/mL]	8.302	9.779	8.240	
Particules 10 µm [particules /seringue]	11.9	NA		
Particules 25 µm [particules /seringue]	0			
Essai de stérilité	C			
Endotoxines [UI/ml]	< 0.05			

Cidofovir lot : P0K6J n° analyse : 300511/B				
<i>Stabilité à 30°C et à l'abri de la lumière</i>				
T0 + x jours	0	90	180	360
<i>Tests analytiques</i>				
Aspect visuel	C	C	C	NA
pH	7.37	7.46	7.41	
Cidofovir [mg/mL]	8.325	8.953	8.533	
Particules 10 µm [particules /seringue]	15.6	NA		
Particules 25 µm [particules /seringue]	0			
Essai de stérilité	C			
Endotoxines [UI/ml]	< 0.05			

Cidofovir lot : P0K6K n° analyse : 300511/C				
<i>Stabilité à 30°C et à l'abri de la lumière</i>				
T0 + x jours	0	90	180	360
<i>Tests analytiques</i>				
Aspect visuel	C	C	C	NA
pH	7.39	7.45	7.40	
Cidofovir [mg/mL]	8.139	9.441	8.563	
Particules 10 µm [particules /seringue]	11.2	NA		
Particules 25 µm [particules /seringue]	0			
Essai de stérilité	C			
Endotoxines [UI/ml]	< 0.05			

ANNEXE XVII

Cidofovir lot : P0K6H n° analyse : 300511/A				
<i>Stabilité à 5°C et à l'abri de la lumière</i>				
T0 + x jours	0	90	180	360
<i>Tests analytiques</i>				
Aspect visuel	NA	C	C	NA
pH		7.45	7.40	
Cidofovir [mg/mL]		9.779	8.240	
Particules 10 µm [particules /seringue]		NA		
Particules 25 µm [particules /seringue]		NA		
Essai de stérilité		NA		
Endotoxines [UI/ml]		NA		

Cidofovir lot : P0K6J n° analyse : 300511/B				
<i>Stabilité à 5°C et à l'abri de la lumière</i>				
T0 + x jours	0	90	180	360
<i>Tests analytiques</i>				
Aspect visuel	NA	C	C	NA
pH		7.46	7.41	
Cidofovir [mg/mL]		8.953	8.533	
Particules 10 µm [particules /seringue]		NA		
Particules 25 µm [particules /seringue]		NA		
Essai de stérilité		NA		
Endotoxines [UI/ml]		NA		

Cidofovir lot : P0KF6K n° analyse : 300511/C				
<i>Stabilité à 5°C et à l'abri de la lumière</i>				
T0 + x jours	0	90	180	360
<i>Tests analytiques</i>				
Aspect visuel	NA	C	C	NA
pH		7.45	7.40	
Cidofovir [mg/mL]		9.441	8.563	
Particules 10 µm [particules /seringue]		NA		
Particules 25 µm [particules /seringue]		NA		
Essai de stérilité		NA		
Endotoxines [UI/ml]		NA		

ANNEXE XVII

Cidofovir lot : P0K6H n° analyse : 300511/A					
<i>Stabilité à -20°C et à l'abri de la lumière</i>					
T0 + x jours	0	90	180	360	
<i>Tests analytiques</i>					
Aspect visuel	NA	C	C	NA	
pH		NA	7.40		
Cidofovir [mg/mL]			8.302		
Particules 10 µm [particules /seringue]		NA			
Particules 25 µm [particules /seringue]					
Essai de stérilité					
Endotoxines [UI/ml]					

Cidofovir lot : P0K6J n° analyse : 300511/B					
<i>Stabilité à -20°C et à l'abri de la lumière</i>					
T0 + x jours	0	90	180	360	
<i>Tests analytiques</i>					
Aspect visuel	NA	C	C	NA	
pH		NA	7.41		
Cidofovir [mg/mL]			8.325		
Particules 10 µm [particules /seringue]		NA			
Particules 25 µm [particules /seringue]					
Essai de stérilité					
Endotoxines [UI/ml]					

Cidofovir lot : P0K6K n° analyse : 300511/C					
<i>Stabilité à -20°C et à l'abri de la lumière</i>					
T0 + x jours	0	90	180	360	
<i>Tests analytiques</i>					
Aspect visuel	NA	C	C	NA	
pH		NA	7.40		
Cidofovir [mg/mL]			8.139		
Particules 10 µm [particules /seringue]		NA			
Particules 25 µm [particules /seringue]					
Essai de stérilité					
Endotoxines [UI/ml]					