

Master en Pharmacie

Travail Personnel de Recherche

Stabilité et produits de dégradation des perfusions de ceftazidime chez les patients pédiatriques avec mucoviscidose

présenté à la

Faculté des sciences de

L'Université de Genève

par

Ahmed Jibril

Unité de recherche

Pharmacie du CHUV

Directeur de l'unité

Prof. André Pannatier

Autres responsables

Dr. Lina Berger

Dr. Ermindo Di Paolo

Prof. André Pannatier

Dr. Gaudenz Hafen

Genève

2013

Remerciements

Je remercie beaucoup la Docteure Lina Berger, pharmacienne responsable de l'unité de contrôle qualité ; pour l'aide apporté sur le design de l'étude, pour ses conseils nombreux et très utiles. Je la remercie également pour sa disponibilité à répondre à mes questions, de sa patience et de sa rigueur du travail bien fait.

Je tiens également à remercier le Docteur Ermindo Di Paolo, pharmacien clinicien au département médico-chirurgical de pédiatrie et pharmacien responsable de l'Assistance pharmaceutique pédiatrique ; pour son aide précieuse dans l'élaboration et le suivi du travail de recherche. Je le remercie également de m'avoir fait entrevoir le travail que réalise un pharmacien clinicien, dans un hôpital universitaire comme le CHUV.

Je remercie également Lorena Rizzo, infirmière cheffe d'unité de soins en hospitalisation pédiatrique ; pour son aide apporté dans suivi de la température des cassettes de perfusion et leurs récoltes.

Merci à Béatrice Pellet, coordinatrice des études cliniques ; pour son aide apportée dans la mise à disposition des résultats du suivi des températures.

Merci au professeur André Pannatier, ancien chef de service de la Pharmacie du CHUV, pour son encouragement à la réalisation de ce projet et l'attrait qu'il m'a suscité pour la pharmacie hospitalière. Je le remercie également pour son accueil chaleureux au sein de ce service.

J'exprime ma gratitude au Docteur Gaudenz Hafen, médecin associé, responsable de l'unité de pneumologie pédiatrique dans le département médico-chirurgical de pédiatrie pour son aide dans la compréhension de la prise en charge de ces patients vulnérables.

Je tiens à remercier Madame Brigitte Reuge, laborantine en chimie dans l'unité de contrôle qualité, pour son aide apportée pour la commande des produits et de ses conseils pertinents tout au long de ces 5 mois de stage. Elle m'a permis de m'intégrer facilement dans l'unité, afin que je me sente le plus à l'aise possible.

Je remercie également les docteurs Guillaume et Schappler, pour leurs précieuses réponses apportées lors de la phase de validation de la méthode analytique par électrophorèse capillaire.

Merci à toute l'équipe du laboratoire de contrôle qualité ainsi que le service de la Pharmacie du CHUV pour leur gentillesse et leur accueil chaleureuse.

Résumé

INTRODUCTION

La mucoviscidose est la maladie héréditaire la plus fréquente chez les personnes types Caucasiennes (1/3500). Elle est causée par une mutation du gène Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) sur le chromosome 7, codant pour un canal Cl⁻. Ceci entraîne une viscosité importante du mucus des voies aériennes (l'eau suivant le gradient de chlorure), une déshydratation des fluides de l'épithélium respiratoire et une altération de la clairance mucociliaire. Cette clairance étant réduite, la présence des impuretés et des bactéries entraînent chez ces patients des infections pulmonaires induites en particulier par *Pseudomonas aeruginosa*. Ces infections sont combattues par une antibiothérapie de ceftazidime (β-lactam) et de tobramycine sur 14 jours. La β-lactam est administrée à l'aide d'une pompe de perfusion sur 24 heures, l'efficacité de la ceftazidime dépend du temps pendant lequel sa concentration est au-dessus de la concentration minimale inhibitrice (CMI). Le principal problème rencontré lors de cette administration de ceftazidime est la libération de pyridine, qui présente une hépato- et néphrotoxicité. Le Compendium et le fabricant indiquent une stabilité maximale de 18 heures à 25°C.

Le but de ce travail consistait à analyser la stabilité et les produits de dégradation (pyridine) en fonction de diverses conditions de stockage et d'utilisation en clinique. L'analyse a été réalisée par HPLC (méthode Ph. Eur.) et par électrophorèse capillaire (CE).

MATERIEL ET METHODE

La Pharmacopée Américaine fixe une limite de pyridine à 0.4% par rapport à la quantité de ceftazidime. Différentes conditions de stockages reproduites au laboratoire ont été testées, l'influence de la température (4, 25 et 30°C), de la concentration (15, 60 et 120 mg/ml), de la lumière (UV et visible), du pH (1.38, 6.8 et 12.7), de conditions extrêmes (5 N HCl, 5 N NaOH et 90°C) et en fonction du mode de reconstitution. Des cassettes provenant du service de pédiatrie ont également été analysées en suivant leur température.

RESULTATS ET DISCUSSION

Le modèle retenu pour la validation de la méthode par CE, est une régression linéaire passant par 0 ajustée en utilisant le niveau le plus haut.

Les quantités de ceftazidime et de pyridine mesurées après 24 heures d'exposition (in vitro) ne sont pas conformes aux limites imposées. Afin que les solutions de ceftazidime soient conformes, le taux de pyridine ne doit pas excéder les 0.4% et le taux de ceftazidime doit être supérieur à 90%. Seuls 62.5% des dosages effectués sur les cassettes étaient conformes. La température moyenne mesurée sur ces cassettes était de 24±2°C, la limite inférieure et supérieure étant respectivement de 17 et 31°C.

CONCLUSION

Il ressort de ce travail que l'administration sur 24 heures de ceftazidime tel que réalisée actuellement au CHUV ne présente pas une sécurité suffisante. Dans l'intérêt des patients, il serait judicieux de développer des systèmes de perfusion comprenant un cold pack ou effectuer deux administrations par jour.

Liste des abréviations

CE : Capillary Electrophoresis

CFRD : Cystic Fibrosis Related Diabete

CHUV : Centre Hospitalier Universitaire Vaudois

CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

FEV1 : Forced Expiratory Volume in 1 seconde

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

HR : Humidité Relative

ICH : International Conference Harmonization

LC-UV : Liquid Chromatography-UltraViolet

Ph. Eur. : Pharmacopée Européenne

PMN : PolyMorphoNucléaire

PP : Polypropylène

PPI : Pour préparation injectables

R² : Coefficient de corrélation

Rs :Résolution

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

TIR : Trypsine Immuno-réactive

USP : United States Pharmacopeia

Table des matières

1. INTRODUCTION	6
1.1. Physiopathologie de la mucoviscidose et prise en charge	6
1.2. Traitement en cas d'infection pulmonaire	7
1.3. Pyridine et isomère de la ceftazidime état des lieux de la recherche	9
1.4. Dosage simultané de la ceftazidime et de la pyridine par électrophorèse capillaire	11
1.5. But du travail de recherche	12
2. MATERIEL ET METHODE	12
2.1. Effet de la température sur la stabilité in vitro	14
2.2. Effet de la concentration sur la stabilité in vitro	14
2.3. Effet de la lumière UV et visible sur la stabilité in vitro	14
2.4. Effet du pH sur la stabilité in vitro	14
2.5. Conditions extrêmes de pH et de température	15
2.6. Reconstitution dans l'eau versus dans le NaCl 0.9%	15
2.7. Etude de stabilité en condition réelle	15
2.8. Méthodes d'analyses	16
2.8.1. Méthode Pharmacopée Européenne de dosage de la ceftazidime	16
2.8.2. Méthode Pharmacopée Européenne de dosage de la pyridine	17
2.8.3. Méthode de dosage par électrophorèse capillaire	17
3. RESULTATS	19
3.1. Méthodes d'analyses	19
3.1.1. Méthode Pharmacopée Européenne	19
3.1.2. Méthode de dosage par électrophorèse capillaire	19
3.2. Effet de la température sur la stabilité in vitro	19
3.3. Effet de la concentration sur la stabilité in vitro	20
3.4. Effet de la lumière UV et visible sur la stabilité in vitro	21
3.5. Effet du pH sur la stabilité in vitro	22
3.6. Conditions extrêmes de pH et de température	23
3.7. Reconstitution dans l'eau versus dans le NaCl 0.9%	24
3.8. Etude de stabilité en condition réelle	25
4. DISCUSSION	28
4.1. Méthodes d'analyses	28
4.1.1. Méthode Pharmacopée Européenne	28

4.1.1. Méthode de dosage par électrophorèse capillaire	28
4.2. Effet de la température sur la stabilité in vitro	28
4.3. Effet de la concentration sur la stabilité in vitro	29
4.4. Effet de la lumière UV et visible sur la stabilité in vitro	30
4.5. Effet du pH sur la stabilité in vitro	31
4.6. Conditions extrêmes de pH et de température	31
4.7. Reconstitution dans l'eau versus dans le NaCl 0.9%	32
4.8. Etude de stabilité en condition réelle	33
5. CONCLUSION	36
6. PERSPECTIVES	37
7. BIBLIOGRAPHIE	38
8. ANNEXES	41

1. INTRODUCTION

1.1. Physiopathologie de la mucoviscidose et prise en charge

La mucoviscidose est une maladie héréditaire récessive ; elle suit par conséquent les règles de génétique classiques, c'est-à-dire qu'un enfant né d'un père ou une mère mucoviscidosique et d'un père ou une mère porteurs aura un risque de 50% d'être atteint de cette pathologie. Le gène codant pour la Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR) se situe sur le chromosome 7 [1]. Ce gène code pour un canal chlore et il est médié par un messenger secondaire l'AMP_c. La perte fonctionnelle résulte dans la défection de ce canal à la surface de toutes les cellules [2, 3]. Il est possible de dépister rapidement cette maladie, par une simple prise de sang maternel.

Le dépistage néonatal de la fibrose kystique (« test de Guthrie ») se fait par la mesure de la trypsine immuno-réactive (TIR), pro-enzyme sécrétée par le pancréas circulant dans le sang en quantité trop élevée en cas d'atteinte pancréatique [3, 4]. Si la TIR est trop élevée, une recherche des 7 mutations les plus courantes est effectuée. Si au moins une mutation est détectée, réaliser le test de la sueur (« gold standard ») [4]. Ce test consiste à stimuler la sueur par iontophorèse à la pilocarpine transdermique et de mesurer le taux de chlorure, qui est très élevé chez ces patients [4]. Lorsque la maladie s'exprime, le tableau clinique est caractérisé par 3 principaux signes.

Ces symptômes sont l'iléus méconial, la malabsorption liée à une insuffisance pancréatique et les infections pulmonaires [4].

L'iléus méconial est caractérisé par une obstruction intestinale avec vomissement biliaire, distension abdominale et retard d'élimination du méconium (premières selles des nouveau-nés) [4]. L'iléus méconial, les vomissements, la malabsorption et l'augmentation de la dépense énergétique vont participer à la détérioration du statut nutritionnel de ces patients, ce qui affecte grandement la qualité de vie et le pronostic vital ; il leur est par conséquent recommandé d'ingérer 120-150% de la nutrition recommandée [4, 5]. La prise en charge thérapeutique visant à suppléer ce manque est composé par la prise per os d'enzyme pancréatique (Kreon[®] capsule gastro-résistante, afin d'éviter la dégradation de ces enzymes par le suc gastrique), une diète hyper énergétique fractionnée avec une forte teneur en graisse, une alimentation très salée et une supplémentation en vitamine ADEK (vitamines liposolubles) [4]. Cette insuffisance pancréatique entraîne une altération dans l'homéostasie glucidique entraînant une Cystic Fibrosis Related Diabete (CFRD), qui est due à une diminution de la masse de cellules pancréatiques, cette perte de cellules n'étant pas d'origine auto-immune mais associée à une destruction tissulaire du pancréas exocrine [4]. Cette destruction provient d'une sécrétion pancréatique concentrée qui entraîne la précipitation des protéines ce qui occasionne une occlusion des canalicules. En premier lieu, la libération rapide de l'insuline stockée est affectée et la sécrétion basale d'insuline reste normale donc pas d'hyperglycémie à jeun mais seulement post-prandial [4]. La CFRD représente la co-morbidité la plus fréquente chez les patients adultes atteints de mucoviscidose [4]. Un autre organe touché par cette maladie est le foie, la sécrétion biliaire trop épaisse qui obstrue les canalicules biliaire, ceci entraîne une fibrose qui peut mener à une cirrhose et l'hypertension portale entraînant des varices œsophagienne et anastomose porto-cave [4]. Afin de diminuer cette carence, de l'Ursosalk (acide ursodesoxycholique) est administré, un acide biliaire hydrophile naturel qui améliore la fluidité biliaire [4].

Le dernier des principaux symptômes caractéristiques de la mucoviscidose sont les atteintes pulmonaires. La performance pulmonaire est évaluée par le Volume Expiratoire Forcé par seconde (FEV1) [2, 5]. Les infections pulmonaires sont principalement causées par *Staphylococcus aureus* (coque G+) ou *Pseudomonas aeruginosa* (bacille G-), qui cause une inflammation excessive des voies aériennes, une insuffisance respiratoire et une éventuelle perte de la fonction pulmonaire nécessitant une transplantation du poumon [3, 4, 6]. La viscosité trop importante du mucus provient d'un manque de transport du chlore (l'eau suivant le gradient de chlorure) dans les voies aériennes ; ceci cause une déshydratation des fluides à la surface de l'épithélium respiratoire et altération de la clairance mucociliaire [3]. La couche de mucus visqueuse est un réservoir pour la reproduction de bactéries. La plupart des infections causées par *P. aeruginosa* persistent et deviennent chroniques ; la source de recolonisation pourrait être une source environnementale persistante ou un réservoir non détecté chez le patient [2, 5]. Les infections peuvent être combattues par une antibiothérapie agressive et retarder la survenue d'infection chronique [2, 5]. Une prise en charge physiothérapeutique est mise en place, afin de désencombrer les poumons. Ces patients reçoivent également du Ventolin® (salbutamol) comme bronchodilatateur et du NaCl hypertonique par aérosol, afin de restaurer la phase liquide du mucus [4, 7]. Une inhalation de Pulmozyme® (dornase alpha) est également effectuée une fois par jour, afin de diminuer les sécrétions visqueuse et purulentes des voies aériennes [4, 7].

1.2. Traitement en cas d'infection pulmonaire

En cas d'infection par *P.aeruginosa*, une antibiothérapie combinée d'un aminoglycoside, la tobramycine ainsi qu'une céphalosporine de 3^{ème} génération, la ceftazidime (annexe 1) est recommandée pour combattre l'infection [5]. Chaque année 40% des patients mucoviscidosiques sont admis à l'hôpital pour une exacerbation pulmonaire [8]. Cette infection des voies respiratoires provoque une inflammation qui entraîne une perméabilité accrue à la ceftazidime au niveau bronchique [5, 9].

L'Obracin® (tobramycine) est administré en intraveineux sur 30 minutes 1 fois par jour à une dose de 10 mg/kg/jour [7]. La tobramycine fait partie de la classe des aminoglycosides ; elle agit par conséquent en inhibant la synthèse des protéines des bactéries. Son mécanisme d'action consiste à interférer dans l'interaction entre la sous-unité ribosomale 30S et l'ARN_m [7, 10]. Elle est bactéricide au contraire de tous les autres antibiotiques agissant sur la production des protéines qui sont bactériostatiques [10]. Les données pharmacocinétiques concernant ce médicament sont : un volume de distribution de 0.2 à 0.25 l/kg, une élimination à 93% sous forme inchangée dans les urines, ce qui implique une adaptation posologique en cas d'insuffisance rénale. Les effets secondaires reportés de la tobramycine sont une neurotoxicité (nerfs vestibulo-cochléaire) et une néphrotoxicité. Des troubles de l'auditions, de l'équilibre et une diminution du taux de filtration glomérulaires apparaissent chez ces patients [7].

En plus de la tobramycine, une perfusion intraveineuse sur 23h30 heures de ceftazidime est entreprise [11]. L'activité bactéricide de la ceftazidime est caractérisée par le temps pendant lequel la concentration est au-dessus de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de 4 µg/ml [5, 7, 9, 12]. Son efficacité n'est par conséquent pas augmentée, lorsque le patient reçoit une dose plus importante. Les β-lactams ne possèdent pas non plus un effet post-antibiotique significatif au contraire des aminoglycosides [5, 9, 13]. Cela a pour conséquence

directe, que si la concentration en antibiotique est en dessous de la CMI, la croissance bactérienne reprend [13].

Cet antibiotique agit en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne de peptidoglycane des G+/- avec comme conséquence la lyse cellulaire [5, 7, 8]. La ceftazidime présente une demi-vie de 2 heures et est éliminée entre 80 et 90% sous forme inchangée par les urines ; c'est la raison pour laquelle une adaptation posologique est nécessaire lors d'insuffisance rénale [7, 14]. La ceftazidime de par la formation de pyridine (annexe 2, 3) est néphro et hépatotoxique ; sachant qu'en plus cette maladie provoque potentiellement une cirrhose chez ces patients, la fonction hépatique doit être étroitement surveillée [7, 8]. Les effets secondaires reportés avec ce médicament sont : rash cutanée (éruption cutanée maculo-pulpeuse), élévation réversible des enzymes hépatiques, éosinophilie transitoire, phlébite [7, 14].

Au Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV), le moyen d'administration utilisé est une perfusion continue sur 24 heures. C'est une technique efficace afin de maintenir une concentration plasmatique constante et au dessus de la concentration minimale inhibitrice [5, 9]. Les perfusions continues par rapport à une perfusion tri-quotidienne sont mieux tolérées, mieux appréciées par les enfants et ceci permet également une thérapie en ambulatoire [5]. Les thérapies à la maison contribuent à améliorer la qualité de vie et à diminuer les interférences avec la scolarisation [5]. Selon le Docteur Hafen, médecin associé responsable de l'unité de pneumologie pédiatrique dans le département médico-chirurgical de pédiatrie du CHUV, les hospitalisations pendant les vacances scolaires permettent à l'enfant et à sa famille de se reposer. Cependant en terme d'efficacité clinique, les perfusions sur 24 heures n'ont pas montré une supériorité par rapport à une perfusion conventionnelle (3 fois par jour) [5, 8, 15-17].

Dans le travail précédemment réalisé par Christelle Rossire, les performances des diffuseurs élastomériques *AutoSelector*[®] (Acemedical) et *Easypump*[®] (BBraun Medical) ont été comparés à la pompe électrique *CADD-Legacy*[®]1 (Smiths Medical) [18]. Le débit (mesuré par méthode gravimétrique) de l'*AutoSelector*[®] à 25°C est inférieur à plus de 10% de son débit nominal (4 ml/h) et n'est donc pas conforme. Les débits de l'*Easypump*[®] et de l'*AutoSelector*[®] à 25°C sont conformes selon les normes du fabricant [18]. Les débits des diffuseurs élastomériques ne sont pas conformes lorsque la concentration est de 60 mg/ml ou lors de la baisse de température [18]. Cependant ces diffuseurs élastomériques présentent des avantages non négligeables de par leur petite taille, leur légèreté et à un coût inférieur par rapport à *CADD-Legacy*[®] [18]. Le débit du perfuseur *CADD-Legacy*[®]1 n'est pas influencé par la température, ni par la concentration en ceftazidime [18]. Par conséquent cette pompe de perfusion paraît être le choix le plus adapté à ce type d'administration.

Les patients qui ne sont pas traités, meurent à un âge précoce ; grâce à la prise en charge thérapeutique ces patients survivront à un âge médian de 40 ans [2].

1.3. Pyridine et isomère de la ceftazidime état des lieux de la recherche

La stabilité est définie comme la capacité d'une substance médicamenteuse à rester dans les spécifications établies afin de maintenir son identité, la qualité et la pureté et ceci jusqu'à la date de péremption [12]. De par leur composition, les produits pharmaceutiques sont spécialement sensibles aux facteurs environnementaux [12]. Des conditions de stockage stricts sont nécessaires, afin de maintenir l'intégrité et l'activité du produit [12]. La stabilité des produits thérapeutiques doit être étroitement contrôlée, afin d'assurer leur efficacité et leur sécurité d'emploi [12]. Les tests de stabilité d'une substance active ou d'un produit fini fournit la preuve de la variation de la qualité du principe actif en fonction du temps, qui est influencée par une variété de facteurs environnementaux tels que la température, l'humidité et la lumière [12]. Dans le cas de la ceftazidime, la stabilité de la molécule dépend de la température, de la lumière, du pH, de sa concentration, du soluté dans lequel le médicament est dilué, de la température et du dispositif de perfusion [8, 12, 13].

Le fabricant donne une stabilité en solution de 18 heures à 25°C [9]. La stabilité peut être améliorée en plaçant un ice pack sur le corps du perfuseur et ainsi diminuer la vitesse de dégradation [5, 8, 9]. En changeant tout les 4 heures, l'ice pack pendant la perfusion, plus de 90% de la quantité initiale est conservée [9]. A une température de 30°C pendant 16 heures, la concentration de ceftazidime est en-dessous des 90% exigé par les pharmacopées ; c'est la raison pour laquelle il n'est pas autorisé d'effectuer une administration continue de ceftazidime avec des pompes élastomériques ou volumétriques si la température dépasse les 25-30°C [19]. Dès 30°C apparaissent les formes isomères de la ceftazidime, isomères qui ne sont pas détectables en-dessous de cette température [20]. Il a également été remarqué que la formulation développait une couleur jaune pâle (annexe 4) après un stockage à 7°C pendant 7 jours [10]. En plus de l'effet de la température, l'exposition à la lumière visible fait chuter la concentration de ceftazidime de 8% si celui-ci n'est pas protégé contre les rayonnements UV et visible [13]. L'association de ces facteurs peut faire que la concentration en ceftazidime soit en dessous de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et causer un échec thérapeutique.

Des essais de stabilité ont été effectués en exposant la solution de perfusion à la lumière 2 x 36 Watts [13]. La connaissance du mécanisme par lequel la photodégradation se produit est importante dans la stabilisation du produit [21]. Cette céphalosporine peut être affectée directement ou indirectement par la lumière ; ceci dépend de la manière à laquelle l'énergie radiative est transférée à la molécule [12]. L'exposition exacte de l'échantillon dépend d'une part de la source de lumière et d'autre part de la distance à laquelle l'échantillon est placé par rapport à la lumière et afin de le déterminer, un actinomètre chimique est utilisé [22]. L'ICH recommande que le médicament soit testé non seulement sous une exposition directe mais également dans son emballage primaire [22]. Lors de son administration, cet antibiotique devrait être protégé de la lumière par un moyen physique, afin d'éviter qu'il ne se dégrade.

Le noyau β -lactam contient un groupe amide qui est relativement instable chimiquement. Il peut s'ouvrir, ce qui résulte dans la formation d'acide pénicilloïque qui réagit facilement avec l'albumine et cause la formation d'haptènes allergènes [20]. Cette instabilité entraîne également une isomérisation, telle que lactonisation, épimérisation sur le carbone 6 ou 7, une syn-anti isomérisation de la fonction N-oxime qui est dépendante du pH (annexe 3, 5)

[23]. En effet, le pH joue un rôle prépondérant dans les mécanismes d'isomérisation et d'épimérisation, c'est la raison pour laquelle l'effet du pH sera investigué. Les trois groupements basiques sur la molécule pourraient agir comme catalyseur intermoléculaire dans la formation des produits de dégradations [24]. Les formes épimères sont en équilibre avec la ceftazidime et notamment celui sur le carbone 7 (figure 1) [23]. Puisque les isomères ont tendance à apparaître en condition basique, la stabilité est maximale dans un intervalle de pH compris entre 4.5 et 6.5 [10].

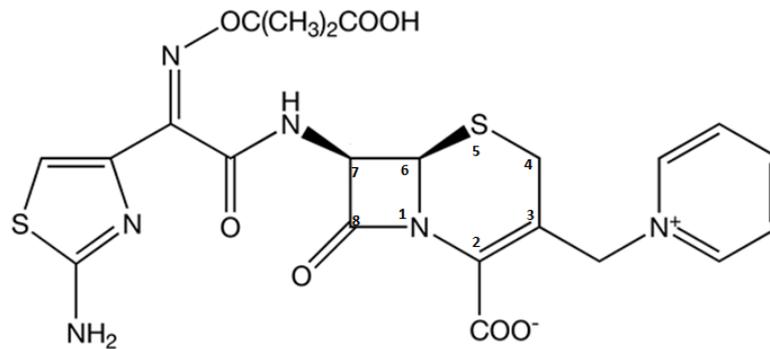


Figure 1 : Formule développée de la ceftazidime

En fonction des paramètres cités ci-dessus, une protection appropriée est recommandée durant le stockage et la manipulation de cet antibiotique après reconstitution [12]. La cinétique de dégradation a été déterminée sous des conditions de température et d'exposition à la lumière variée (UV et visible) ; afin de ne pas induire la formation d'isomères les dilutions ont été effectuées avec un tampon acide tel que le tampon phosphate pH 6.0 [12].

La pyridine présente une toxicité rénale et hépatique chez des patients potentiellement sujets à une cirrhose hépatique [7, 8, 25]. Cependant aucune étude n'a pu établir un lien entre l'accumulation de pyridine et l'augmentation des enzymes hépatiques, tels que les Aspartates aminotransférases (ASAT) et les Alanines aminotransférases (ALAT) [8]. De par sa structure, la ceftazidime présente sur sa chaîne C₃ un groupe pyridinium ; sa dégradation entraîne par conséquent la libération de cette pyridine, qui est un bon marqueur de sa stabilité [8, 26]. La Pharmacopée Américaine fixe une limite à 0.4% de pyridine en fonction de la quantité de ceftazidime [27]. Différentes études ont été menées, afin de déterminer la cinétique de formation de cette pyridine. Il s'avère que la cinétique de dégradation de la ceftazidime est d'ordre 1 ($\ln [C] = \ln [C_0] - kt$) et la cinétique de formation de la pyridine suit une cinétique pseudo-ordre 0, c'est-à-dire que la concentration en ceftazidime est si élevée qu'une augmentation de la quantité de ceftazidime n'entraîne pas un accroissement de la vitesse de formation de la pyridine [10, 24].

1.4. Dosage simultané de la ceftazidime et de la pyridine par électrophorèse capillaire

A l'heure actuelle, la LC-UV est la méthode standard, retenue par les Pharmacopées [28]. Ces dernières années on vu se développer la CE, qui présente comme avantages : un faible coût, une haute efficacité, une réduction dans l'utilisation des solvants et une rapidité d'exécution [28, 29]. Cependant la CE est connue pour son manque de sensibilité, dû au faible volume injecté (nanolitres) et de la petite fenêtre de détection [28]. Ceci est problématique lors du dosage de trace ou d'échantillons biologiques, car leur concentration est très faible mais cela n'a pas d'importance pour la quantification des préparations pharmaceutiques [28].

Les raisons qui ont amenées à utiliser la CE comme méthode de dosage de la ceftazidime et de la pyridine sont les avantages cités ci-dessus. L'inconvénient du manque de sensibilité n'affecte pas le dosage des préparations pharmaceutiques, car leurs concentrations sont relativement élevées.

Le principe de la CE est basé sur la migration différentielle des solutés dans un courant électrique, la mobilité dépend de la taille, de la charge, de la viscosité, du degré d'ionisation de la molécule et de la force ionique de l'électrolyte [30]. L'analyte est soumis à une force electro-osmotique et celle du champ électrique (migration électrophorétique) [30]

Le capillaire utilisé est « uncoated », c'est-à-dire qu'il n'est pas greffé avec une chaîne hydrophobe, typiquement une chaîne de C₁₈. La ceftazidime étant un acide, la pyridine une base et le tampon borate (pH 9.2) une base, il est possible de prédire l'ordre de migration des molécules. Les silanols composant le capillaire seront déprotonnés dans un tampon basique, la ceftazidime également sera déprotonnée et la pyridine restera sous forme neutre. La pyridine suit le mouvement électro-osmotique qui va de l'anode (+) à la cathode (-) et la ceftazidime a en plus de la migration électro-osmotique une migration électrophorétique en sens inverse qui la tire vers l'anode ; c'est la raison pour laquelle la pyridine sort en premier suivi de la ceftazidime.

Afin de doser la pyridine et la ceftazidime simultanément, une validation est entreprise en suivant les recommandations de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP). De nombreux articles décrivent des méthodes de dosages de la ceftazidime et de la pyridine simultanément, il a été choisi l'article de Porrà, Farina et al de 1998.

Il est vital de quantifier la présence d'impuretés ou de produits de dégradations toxiques pour la sécurité du patient. La présence d'impuretés et des produits de dégradations peuvent causer des modifications des propriétés chimiques, pharmacologiques et toxicologiques du médicament et avoir un impact significatif sur la qualité et la sécurité du produit [12].

1.5. But du travail de recherche

Le débit de la pompe électrique *CADD-Legacy*[®] est resté stable lors de changement de la température ou de la concentration en antibiotique. Le débit des deux diffuseurs élastomériques (*Easypump*[®] et *AutoSelector*[®]) varie en fonction de la température et ou de la concentration [18]. Ces débits étant déjà bien étudiés, ce travail s'axait plus sur la stabilité in vitro et in vivo.

Le but de ce travail consistait à analyser la stabilité et les produits de dégradation de la ceftazidime en fonction de diverses conditions de stockage et d'utilisation en clinique par HPLC et CE.

L'HPLC et la CE sont des méthodes complémentaires, car leurs mécanismes de séparations n'est pas le même.

La problématique au niveau de la prise en charge des patients mucoviscidosiques atteints d'une infection pulmonaire se fait par l'administration sur 24 heures de ceftazidime. Le fabricant ainsi que le compendium Suisse des médicaments fixent une perfusion sur 8 ou 12 heures. Il s'agira dans ce travail, de tester toutes les conditions de dégradation en laboratoire et si au final il ne serait pas mieux de changer de cassette 2 ou 3 fois par jour pour la sécurité des patients ?

2. MATERIEL ET METHODE

Dans un premier temps, il s'agit de parcourir la littérature en déterminant les conditions de dégradations de la ceftazidime, de déterminer le design de l'étude et reproduire ces conditions de dégradations dans le laboratoire de contrôle qualité de la Pharmacie du CHUV. Les conditions testées sont : l'influence de la température à 4, 25 et 30°C, de la concentration à 15, 60 et 120 mg/ml, de la lumière UV et visible, du pH à 1.38, 6.8 et 12.7, de conditions extrêmes de pH et de température ainsi que de la manière de reconstituer la solution. Des dosages de la ceftazidime et de la pyridine sont également effectués sur des cassettes utilisées en clinique. Dans certaines de ces cassettes, la température est suivie à l'aide d'un thermomètre *LogTag*[®] enregistrant la température toutes les 30 minutes. L'antibiotique ainsi que la pyridine sont analysés par High Performance Liquid Chromatography (HPLC) et par Electrophorèse Capillaire (CE), la méthode HPLC utilisée est celle de la Pharmacopée Européenne (Ph. Eur.) et celle de la CE est validée dans le laboratoire.

Actuellement la Ph. Eur. utilise deux méthodes, l'une pour le dosage de la ceftazidime et l'autre pour le dosage de la pyridine. La validation de cette méthode de dosage permettra de quantifier la ceftazidime et la pyridine simultanément.

La préparation des solutions est effectuée en suivant le protocole de fabrication en annexe 6. La solution préparée est de 100.0 ml à une concentration de 60 mg/ml. Chaque fiole de 2g de *Fortam*[®] (ceftazidime, GlaxoSmithKline, lot : 2010) est reconstituée avec 10.0 ml d'eau avec une seringue et le volume est ajusté avec du NaCl 0.9% (Bichsel, Suisse, lot n°1261112).

Lorsque la fiole de 100.0 ml a été préparée, 2 x 2 ml sont prélevés et stockés au congélateur. Ensuite, la fiole est divisée en 3 parts d'environ 30 ml et celles-ci sont stockées

à la condition requise. Après 12 h et 24 heures, environ 2 x 5 ml sont prélevés dans des éprouvettes et stockées au congélateur (Fors Medline, Suisse, -20°C série n°255569758) pour une analyse par HPLC et CE ultérieurs. Le schéma de l'annexe 7, représente la préparation des échantillons à une condition expérimentale fixée et les différents prélèvements à effectuer en fonction du temps.

Pour chacune de ces doses journalières, ces essais sont réalisés en triplicata, en accord avec les guidelines émit par l'International Conference Harmonization (ICH) pour les tests de stabilité [12, 31].

2.1. Effet de la température sur la stabilité in vitro

Les solutions à une concentration de 60 mg/ml sont préparées dans des fioles et analysées après t_{0h} , t_{12h} et à t_{24h} . Chaque condition opératoire est réalisée en triplicata.

Les échantillons stockés à 4°C ont été placés au frigo (Fors Medline, Suisse, 4°C, série n°791618972), ceux stockés à 25°C ont été placés dans un bain thermostaté (Assistant WTE Var 3185, Müller+Krempel AG, série n°8226751) et ceux stockés à 30°C ont été placés dans un incubateur (Blanclabo, Rumed 4010, 30°C et 65% humidité relative, série n°4010.05.00001)

2.2. Effet de la concentration sur la stabilité in vitro

L'adaptation posologique s'effectue selon le poids du patient, à une dose de 150 mg/kg/jour et au maximum à 12 g par jour [4, 7]. Afin d'évaluer l'effet de la concentration sur la formation d'impuretés et ou produits de dégradations, trois niveaux de concentrations sont investigués. Les solutions à 15, 60 et 120 mg/ml sont placées dans un bain thermostaté ($25\pm 1^\circ\text{C}$) et la température est contrôlée à l'aide d'un thermomètre en mercure. Des prélèvements à t_{0h} , t_{12h} et à t_{24h} sont effectués (annexe 7).

2.3. Effet de la lumière UV et visible sur la stabilité in vitro

Les rayons UV ou visibles ont un effet sur la dégradation de la ceftazidime ; la connaissance du mécanisme auquel a lieu cette dégradation permet de stabiliser le produit en plaçant par exemple un emballage opaque. L'exposition de l'échantillon de ceftazidime à 60 mg/ml dépend d'une part de la source lumineuse et d'autre part de la distance du rayonnement par rapport à l'échantillon. Afin d'étudier cet effet, un échantillon réalisé en triplicata est soumis à la lumière du laboratoire et un échantillon réalisé en triplicata également est soumis au rayon UV ($\lambda=254$ nm, Fisher Bioblock scientifique, France, VRD-108, série n° MOO2896). Les échantillons sont prélevés à 0, 12 et 24 heures et congelés pour une analyse par HPLC et CE ultérieure.

2.4. Effet du pH sur la stabilité in vitro

Lors du stockage d'une solution de ceftazidime, un changement de pH pourrait s'opérer et par conséquent entraîner une libération d'une plus grande quantité d'impuretés [23].

Les études de stabilité en fonction du pH se font à trois niveaux différents 1.38, 6.8 et 12.7 [23]. La concentration en antibiotique est gardée constante (60 mg/ml), afin de n'étudier que l'effet du pH. La préparation des échantillons se trouvent en annexe 6 et 7. Le pH est ajusté avec de l'HCl 1 M ou du NaOH 1 M afin de se situer au pH fixé. Ces différentes solutions sont stockées à $25\pm 1^\circ\text{C}$ pendant 12 et 24 heures. Tous les ballons jaugés ont été protégés de la lumière en les enveloppant dans du papier aluminium.

2.5. Conditions extrêmes de pH et de température

Des conditions extrêmes de pH et de températures sont utilisées, afin d'induire fortement la production de ces différents produits de dégradations.

Afin de tester des conditions extrêmes de pH, des solutions de HCl 5 N (Merck, Germany, lot n° HC142134) ou de NaOH 5 N (Merck, Germany, lot n° HC380501) ont été ajoutées à des solutions de ceftazidime de 60 mg/ml (volume de 10.0 ml) pendant 15 minutes. Passé ce délai, les solutions de l'antibiotique ont été neutralisées avec l'acide ou la base forte correspondante et analysées par HPLC et CE.

L'élévation de la température cause une augmentation de la vitesse de dégradation de cet antibiotique ou plus généralement de toutes substances médicamenteuses. Une température de 90°C pendant 15 minutes est maintenu sur une solution de 10.0 ml de ceftazidime à 60 mg/ml. Cette température a été obtenue en préparant un montage à reflux et la température a été suivie à l'aide d'un thermomètre à mercure. La préparation des échantillons se trouvent également en annexe 6 et 7.

2.6. Reconstitution dans l'eau versus dans le NaCl 0.9%

L'unité de fabrication de la pharmacie du CHUV reconstitue les perfusions de Fortam 2 g. dans 10 ml d'eau pour préparation injectables (ppi) à l'aide d'une seringue de 10 ml et le volume est ajusté avec du NaCl 0.9% dans le flacon de polypropylène (PP). La concentration en ceftazidime est gardée à 60 mg/ml, la reconstitution s'effectue dans l'emballage primaire. Dans le travail réalisé précédemment, Christelle Rossire avait émis l'hypothèse selon laquelle, les isomères ne se formeraient seulement dans le cas d'une reconstitution à l'aide d'une seringue [18].

Afin de mettre en évidence ou non la formation d'isomères avec une reconstitution dans le NaCl 0.9% directement ou dans l'eau à l'aide d'une seringue ou pipette en verre. Les 4 modalités de reconstitutions testées sont : seringue-NaCl 0.9%, seringue-eau, pipette en verre-NaCl 0.9% et pipette en verre-eau. Tout de suite après la reconstitution, les échantillons sont placés au congélateur pour une analyse par HPLC et CE ultérieur.

2.7. Etude de stabilité en condition réelle

Afin de corrélérer la température dans la solution de perfusion et la quantité de pyridine produite, un thermomètre LogTag (annexe 8), a été placé sur les cassettes en le scotchant simplement. Ce thermomètre modèle TRIX-8, série numéro 7400004943 présente un intervalle de mesure de -40 à 85°C, il a été programmé afin qu'il enregistre la température toute les 30 minutes. Ensuite ces données ont été analysées par LogTag Analyzer®.

Il a été demandé aux infirmières d'enclencher le thermomètre au moment de la première perfusion ensuite lorsque une nouvelle cassette est administré d'enlever le scotch du thermomètre et de le recoller sur la nouvelle cassette.

Il a été demandé également aux infirmières de récupérer le maximum de cassettes et de les mettre au congélateur (-20°C) pour une analyse par HPLC et CE ultérieur. De cette façon,

une corrélation entre la température mesurée dans le système de perfusion et la formation de pyridine entre autres peut être mise en évidence.

La récolte d'un grand nombre de cassettes permettrait d'avoir des résultats significatifs de la stabilité de la ceftazidime en condition d'utilisation en clinique [18].

2.8. Méthodes d'analyses

Tant la pharmacopée Européenne qu'Américaine propose un dosage par HPLC, en ayant une méthode pour la ceftazidime et une pour la pyridine.

2.8.1. Méthode Pharmacopée Européenne de dosage de la ceftazidime

L'appareillage HPLC utilisé lors de ce travail est : Varian Prostar, USA ; injecteur série n° 8015 ; pompe Prostar 230SDM, série n°00196 et du détecteur UV série n° EL05049046) et le logiciel est star Chromatography Workstation 6.41, série n° 003070-2488-FAA-20F0.

Le tableau ci-dessous représente les conditions chromatographiques indiquées dans la Pharmacopée Européenne pour le dosage de la ceftazidime [32].

Tableau 1 : Conditions chromatographiques de la Ph.Eur. pour le dosage de la ceftazidime

Précolonne	Chromolith® RP-18e (10x4.6mm), Merck (Allemagne), lot n° HX084555	Volume d'injection	20 µl
Colonne	Chromolith® RP-18° 2x (100x4.6 mm), Merck (Allemagne), lot n° 0B465476	Débit	2 ml/min
Phase aqueuse	Tampon Phosphate à pH 7 (980 ml V/V)	Temps d'analyse	20 min
phase organique	Acétonitrile (20ml V/V)	Longueur d'onde d'excitation	245 nm

La phase mobile est constituée par un tampon phosphate (annexe 9) (disodium hydrogène phosphate dihydrate, Merck, Germany, lot n°K43237453232, potassium dihydrogène phosphate, Merck, Germany, lot n°B0691108207 ; d'acétonitrile Merck, Germany, lot n°I674930308 et eau HPLC, Merck, Germany, lot n°Z289533317), afin de solubiliser cette solution, un bain à ultra sons a été utilisé (Bender+Hobein, Branson 5200, Suisse, série n°PEQ0107). Les différentes pesées ont été réalisées sur une balance analytique (Mettler AT250, Suisse, série n°K33200) et les tickets de pesés ont été collés dans le cahier de laboratoire.

La teneur en ceftazidime est déterminée en tenant compte de la teneur assignée pour la ceftazidime SCR avec une concentration de 1 mg/ml.

2.8.2. Méthode Pharmacopée Européenne de dosage de la pyridine

Le tableau ci-dessous représente les conditions chromatographiques de la Ph. Eur. pour l'analyse de la pyridine. La préparation des échantillons ainsi que la phase mobile se trouvent en annexe 9.

Tableau 2 : Conditions chromatographiques Ph. Eur. pour le dosage de la pyridine

Précolonne	Chromolith® RP-18e (10x4.6mm), Merck (Allemagne)	Volume d'injection	20 µl
Colonne	Chromolith® RP-18 ^e [2 x(100x4.6 mm)], Merck (Allemagne)	Débit	1 ml/min
Phase aqueuse	80 ml tampon dihydrogénophosphate d'ammonium et 680 ml d'eau	Temps d'analyse	20 min
phase organique	Acétonitrile 240 ml	Longueur d'onde d'excitation	255 nm

La phase mobile pour la méthode de dosage de la pyridine est constituée par un tampon phosphate ajusté à pH 7 avec de l'ammoniac 25% (dihydrogénophosphate d'ammonium, Merck, Germany, lot n°B0697140250 ; hydroxyde d'ammonium, Merck , Germany, lot n° K43104132203 et pH mètre, Mettler Toledo, Suisse , Seven Multi 540, série n° 3824.84).

2.8.3. Méthode de dosage par électrophorèse capillaire

L'appareillage CE utilisé lors de ce travail est : Agilent Technologies 7100 CE, série n°DE94300465 et d'un thermostat, LKB Brommu, model 2209 multitemp, série n° 5921287. Le tableau ci-dessous représente les conditions d'utilisations de l'électrophorèse capillaire en se basant sur les articles ci-après [11, 33].

Tableau 3 : Conditions de l'électrophorèse pour le dosage de la ceftazidime et impuretés

Longueur détection	64.5 cm x 50 µm I.D. (56 cm effectif)	Voltage	20 kV
Conditionnement capillaire	0.1 M NaOH 5 min, 5 min avec eau et 5 min tampon pH 9.2	Température capillaire	25°C
Injection	50 mbar x 8 s	Détection	254 nm
Tampon	sodium tétraborate pH 9.2	Filtration	0.2 µm
Temps d'analyse	10 min	-	-

Le tampon utilisé est le sodium tétraborate pH 9.2 (annexe 10 ; Sigma Aldrich, UK, lot n° MKBF3466V) et le conditionnement du capillaire est effectué avec NaOH 0.1 M, eau HPLC et le tampon (NaOH 0.1 M : Merck, Germany, lot n° HC39542).

Un long capillaire de 10 mètres a été acheté (BGB, USA, TSP-050375, uncoated fused silica, 64.5 cm, 50µm ID), coupé à la longueur de 64.5 cm et la fenêtre de détection a été obtenue en le brûlant avec un chalumeau à 8.5 cm de la cathode. Le mode d'injection appliqué est l'injection type hydrodynamique qui est plus reproductible que l'injection électrocinétique [29].

Avant d'effectuer une analyse avec un nouveau capillaire, celui-ci doit être conditionné ; s'agissant d'un tampon basique, le conditionnement du capillaire consiste en 6 étapes : tout d'abord 8 min méthanol (Merck, Germany, lot n°I663518245), 4 min eau, 8 min HCl 1M, 4 min eau, 8 min NaOH 1M et pour finir 8 min tampon borate pH 9.2. Au début de chaque jour d'analyse une méthode de clean est effectuée consistant en rinçant le capillaire avec du méthanol, eau et tampon pendant 6 minutes chacun. Ensuite entre chaque injection, un rinçage du capillaire est effectué consistant en 3 min eau, 2 min NaOH 0.1M, 2 min eau et 2 min tampon. Donc le temps d'analyse par injection est de 9 minutes pour le rinçage et de 10 minutes d'analyse.

Les méthodes de dosage des pharmacopées ne sont pas obligatoirement à valider. Il faut cependant vérifier la conformité du système. Elles indiquent par exemple le temps de rétention du composé d'intérêt ou la résolution minimale entre deux pics voisins. Cependant l'utilisation d'une méthode de la littérature doit être revalidée dans le laboratoire qui utilise cette méthode (annexe 10).

3. RESULTATS

3.1. Méthodes d'analyses

3.1.1. Méthode Pharmacopée Européenne

La méthode Pharmacopée Européenne a été choisie pour le dosage de la ceftazidime et de la pyridine. La conformité du système a été respectée (pour le dosage de la ceftazidime), la résolution (Rs) entre le pic de la ceftazidime et de l'impureté A (Δ -2 ceftazidime, annexe 5) est supérieure à 1.5 (valeur trouvée Rs=1.75). La conformité du système est également respectée pour le dosage de la pyridine, la résolution entre la ceftazidime et la pyridine est de 7.5 (7.0 au minimum).

3.1.2. Méthode de dosage par électrophorèse capillaire

Les résultats de la validation se trouvent en annexe 10 et le modèle utilisé tant pour la ceftazidime et de la pyridine sont une régression linéaire passant par zéro avec uniquement le niveau le plus élevé, 140 μ g/ml pour la ceftazidime et de 17.5 μ g/ml pour la pyridine. Le principal avantage de la CE par rapport à l'HPLC est qu'il est capable de caractériser plus d'impuretés. La CE est capable de caractériser 5 isomères potentiels tandis que l'HPLC en identifie moins.

3.2. Effet de la température sur la stabilité in vitro

Les tableaux ci-dessous présentent la quantité de pyridine et le taux de ceftazidime en fonction du temps à différentes températures et à la concentration de 60 mg/ml. Aux annexes 11, 12 et 13 se trouvent les données brutes du temps de rétention et de l'aire.

Tableau 4 : Quantité de pyridine dosée par HPLC et CE en fonction de la température

4°C				
	Quantité de pyridine par HPLC [mg/ml]	Ecart-type quantité [mg/ml]	Quantité de pyridine par CE [mg/ml]	Ecart-type quantité [mg/ml]
t0	-	-	0.089	0.004
t12h	0.110	0.006	0.142	0.046
t24h	0.116	0.002	0.136	0.062
25°C				
to	-	-	0.130	-
t12h	0.308	0.005	0.327	0.033
t24h	0.567	0.010	0.592	0.007
30°C				
to	-	-	0.196	0.010
t12h	0.409	0.042	0.426	0.007
t24h	0.674	0.008	0.687	0.010

Tableau 5 : Ceftazidime dosée par HPLC et CE en fonction de la température

4°C				
	% de ceftazidime par HPLC selon Ph. Eur. [%]	Ecart-type de ceftazidime [%]	% de ceftazidime par CE	Ecart-type de ceftazidime [%]
t0	100.0%	0.4%	100%	
t12h	101%	2%	95%	2%
t24h	97%	1%	98%	3%
25°C				
t0	100%	0.2%	100%	-
t12h	94%	1%	86%	8%
t24h	93%	1%	82%	6%
30°C				
t0	100.0%	0.4%	100%	-
t12h	91%	1%	88%	4%
t24h	85%	2%	77%	6%

Les résultats obtenus à 4°C (tableaux 4 et 5) sont conformes aux limites imposées (inférieur à 0.4% pour la pyridine et supérieur à 90% pour la ceftazidime) par les pharmacopées pour la pyridine et pour la ceftazidime. Les résultats à 25 et 30°C (tableaux 4 et 5) ne sont pas conformes pour la quantité de pyridine et pour le taux de ceftazidime.

3.3. Effet de la concentration sur la stabilité in vitro

Les tableaux ci-dessous présentent la quantité de pyridine et le taux de ceftazidime en fonction du temps à différentes températures et à la concentration de 60 mg/ml. Aux annexes 12, 15 et 16 sont représentées les données brutes du temps de rétention et de l'aire.

Tableau 6 : Quantité de pyridine dosée par HPLC et CE en fonction de la concentration

15 mg/ml				
	Quantité de pyridine par HPLC [mg/ml]	Ecart-type quantité [mg/ml]	Quantité de pyridine par CE [mg/ml]	Ecart-type quantité [mg/ml]
t0	-	-	0.154	0.007
t12h	0.259	0.007	0.230	0.039
t24h	0.422	0.004	0.278	0.004
60 mg/ml				
to	-	-	0.130	-
t12h	0.308	0.005	0.327	0.033
t24h	0.567	0.010	0.592	0.007
120 mg/ml				
to	-	-	0.070	0.010
t12h	0.348	0.004	0.198	0.198
t24h	0.599	0.008	0.612	0.027

Tableau 7 : Ceftazidime dosée par HPLC et CE en fonction de la concentration

15 mg/ml				
	% de ceftazidime par HPLC selon Ph. Eur. [%]	Ecart-type de ceftazidime [%]	% de ceftazidime par CE	Ecart-type de ceftazidime [%]
t0	100.0%	0.4%	100%	-
t12h	95%	1%	92%	1%
t24h	93%	2%	98%	5%
60 mg/ml				
t0	100.0%	0.2%	100%	3%
t12h	94%	1%	86%	8%
t24h	93%	1%	82%	6%
120 mg/ml				
t0	100.0%	0.3%	100%	2%
t12h	99%	2%	52%	33%
t24h	96%	4%	40%	19%

Les résultats obtenus à 15 mg/ml (tableaux 6 et 7) ne sont pas conformes aux limites imposées pour la quantité de pyridine dosée par HPLC, le reste étant conforme (après 24 heures). Les résultats à 60 et 120 mg/ml (tableaux 6 et 7) ne sont pas conformes tant pour la quantité de pyridine que pour le taux de ceftazidime après 24 heures de stockage.

3.4. Effet de la lumière UV et visible sur la stabilité in vitro

Les tableaux ci-dessous présentent la quantité de pyridine et le taux de ceftazidime en fonction du temps. Les conditions de dégradation sont en fonction de la lumière UV/visible et à la concentration de 60 mg/ml. A l'annexe 17 est représentée les données brutes du temps de rétention et de l'aire.

Tableau 8 : Quantité de pyridine dosée par HPLC et CE en fonction de la lumière

UV				
	Quantité de pyridine par HPLC [mg/ml]	Ecart-type quantité [mg/ml]	Quantité de pyridine par CE [mg/ml]	Ecart-type quantité [mg/ml]
t0	-	-	ND	ND
t12h	0.204	0.003	ND	ND
t24h	0.343	0.003	ND	ND
Visible				
t0	-	-	0.126	-
t12h	0.178	0.002	0.141	0.060
t24h	0.256	0.037	0.310	0.075

Tableau 9 : Ceftazidime dosée par HPLC et CE en fonction de la lumière

UV				
	% de ceftazidime par HPLC selon Ph. Eur. [%]	Ecart-type de ceftazidime [%]	% de ceftazidime par CE	Ecart-type de ceftazidime [%]
t0	100.0%	0.2%	ND	ND
t12h	100%	1%	ND	ND
t24h	92%	1%	ND	ND
Visible				
t0	100.0%	0.1%	100%	0%
t12h	96.0%	0.3%	76%	10%
t24h	98%	1%	72%	3%

Les résultats obtenus sous une exposition à la lumière UV (tableaux 8 et 9) n'est pas conforme après 24 heures, car la quantité de pyridine dépasse les 0.32 mg/ml

L'exposition à la lumière visible (tableaux 8 et 9) dégrade plus lentement la ceftazidime. Les quantités de pyridine sont conformes, tandis que le taux de ceftazidime dosé par CE est trop faible.

3.5. Effet du pH sur la stabilité in vitro

Les tableaux ci-dessous présentent la quantité de pyridine et le taux de ceftazidime en fonction du pH et à la concentration de 60 mg/ml. Aux annexes 19, 20 et 21 sont représentées les données brutes du temps de rétention et de l'aire.

Tableau 10 : Quantité de pyridine dosée par HPLC et CE en fonction du pH

pH 1.38				
	Quantité de pyridine par HPLC [mg/ml]	Ecart-type quantité [mg/ml]	Quantité de pyridine par CE [mg/ml]	Ecart-type quantité [mg/ml]
t0 avant ajustement du pH	0.072	0.001	0.150	0
t0 après ajustement du pH	0.111	0.000	0.208	0
t12h	0.623	0.005	0.652	0.018
t24h	1.098	0.012	1.063	0.253
pH 6.8				
t0 avant ajustement du pH	0.086	0	0.156	0
t0 après ajustement du pH	-	-	-	-
t12h	0.305	0.002	0.332	0.010
t24h	0.474	0.065	0.538	0.008
pH 12.7				
t0 avant ajustement du pH	0.055	0	ND	ND
t0 après ajustement du pH	8.178	-	ND	ND
t12h	8.153	0.047	ND	ND
t24h	7.948	0.330	ND	ND

Tableau 11 : Ceftazidime dosée par HPLC et CE en fonction du pH

pH 1.38				
	% de ceftazidime par HPLC selon Ph. Eur. [%]	Ecart-type de ceftazidime [%]	% de ceftazidime par CE	Ecart-type de ceftazidime [%]
t0 avant ajustement du pH	100%	1%	100%	9%
t0 après ajustement du pH	86%	1%	81%	1%
t12h	81%	2%	74%	2%
t24h	75%	1%	66%	2%
pH 6.8				
t0 avant ajustement du pH	100%	0.9%	100.0%	6%
t0 après ajustement du pH	-	-	-	-
t12h	101 %	2.0%	93%	2%
t24h	95%	0.3%	93%	2%
pH 12.7				
t0 avant ajustement du pH	100.0%	0.2%	ND	ND
t0 après ajustement du pH	5.5%	1.1%	ND	ND
t12h	3.4%	1.4%	ND	ND
t24h	3.0%	0.9%	ND	ND

Les résultats obtenus à pH 1.38, 6.8 et 12.7 se situent toutes en dehors des limites fixées par la méthode HPLC et CE après 24 heures de stockage.

3.6. Conditions extrêmes de pH et de température

Les tableaux ci-dessous présentent la quantité de pyridine et le taux de ceftazidime à des conditions de pH et de température extrême et à la concentration de 60 mg/ml. Aux annexes 22, 23 et 24 sont représentées les données brutes du temps de rétention et de l'aire.

Tableau 12 : Quantité de pyridine dosée par HPLC et CE dans des conditions extrêmes de pH et de température

HCl 5N				
	Quantité de pyridine par HPLC [mg/ml]	Ecart-type quantité [mg/ml]	Quantité de pyridine par CE [mg/ml]	Ecart-type quantité [mg/ml]
t0	0.012	0	0.056	0.004
t15 min	0.108	0.023	0.127	0.020
NaOH 5N				
to	0.068	0.001	0.077	0.014
t15 min	3.968	0.047	3.848	0.096
90°C				
to	0.077	0	0.140	0.007
t15 min	0.221	0.004	0.245	0.068

Tableau 13 : Ceftazidime dosée par HPLC et CE dans des conditions extrêmes de pH et de température

HCl 5N				
	% de ceftazidime par HPLC selon Ph. Eur. [%]	Ecart-type de ceftazidime [%]	% de ceftazidime par CE	Ecart-type de ceftazidime [%]
t0	100.0%	0.3%	100%	2%
t15 min	92.2%	0.3%	58%	2%
NaOH 5N				
t0	100.0%	0.3%	100%	4%
t15 min	1.37%	0.01%	7.9%	0.2%
90°C				
t0	100%	1%	100.0%	0.4%
t15 min	99%	3%	95%	6%

Les résultats obtenus sous conditions basique forte (tableaux 12 et 13) après 15 minutes ne sont pas conformes. La dégradation de la ceftazidime est moindre en conditions acide forte (HCl 5 N) qu'en conditions basique (tableaux 12 et 13).

Maintenir les échantillons à 90°C pendant 15 minutes est acceptable en termes de stabilité du produit.

3.7. Reconstitution dans l'eau versus dans le NaCl 0.9%

Les tableaux ci-dessous présentent la quantité de pyridine et le taux de ceftazidime en fonction de la reconstitution et à la concentration de 60 mg/ml. Dans l'annexe 25 se trouve les données brutes du temps de rétention et de l'aire.

Tableau 14 : Quantité de pyridine dosée par HPLC et CE en fonction de la reconstitution

Seringue				
	Quantité de pyridine par HPLC [mg/ml]	Ecart-type quantité [mg/ml]	Quantité de pyridine par CE [mg/ml]	Ecart-type quantité [mg/ml]
Eau	0.052	0.005	-	-
NaCl 0.9%	0.051	0.004	-	-
Pipette en verre				
Eau	0.060	0.002	-	-
NaCl 0.9%	0.070	0.002	-	-

Tableau 15 : Ceftazidime dosée par HPLC et CE en fonction de la reconstitution

Seringue				
	% de ceftazidime par HPLC selon Ph. Eur. [%]	Ecart-type de ceftazidime [%]	% de ceftazidime par CE	Ecart-type de ceftazidime [%]
Eau	99%	1%	115%	5%
NaCl 0.9%	97%	2%	131%	3%
Pipette en verre				
Eau	100%	1%	110%	3%
NaCl 0.9%	105%	2%	122%	6%

La quantité de pyridine en fonction de ces 4 modes de reconstitutions peut être considérée comme équivalente (tableaux 14). Le taux de ceftazidime déterminé par HPLC se situe dans les spécifications, tandis que ces mêmes taux déterminés par CE ne sont pas conformes.

Les électrophérogrammes présentés en annexe 26 ne montrent pas de différence dans la formation d'isomères potentiels en fonction du mode de reconstitution.

3.8. Etude de stabilité en condition réelle

Les données brutes pour les temps de rétentions et les aires sous la courbe de l'HPLC et la CE dans les conditions d'administration in vivo sont représentées à l'annexe 28. La figure ci-dessous représente le pourcentage de ceftazidime restant dans la cassette de perfusion ainsi que de la quantité de pyridine dosée par HPLC et CE en fonction de la date d'administration chez Mger.

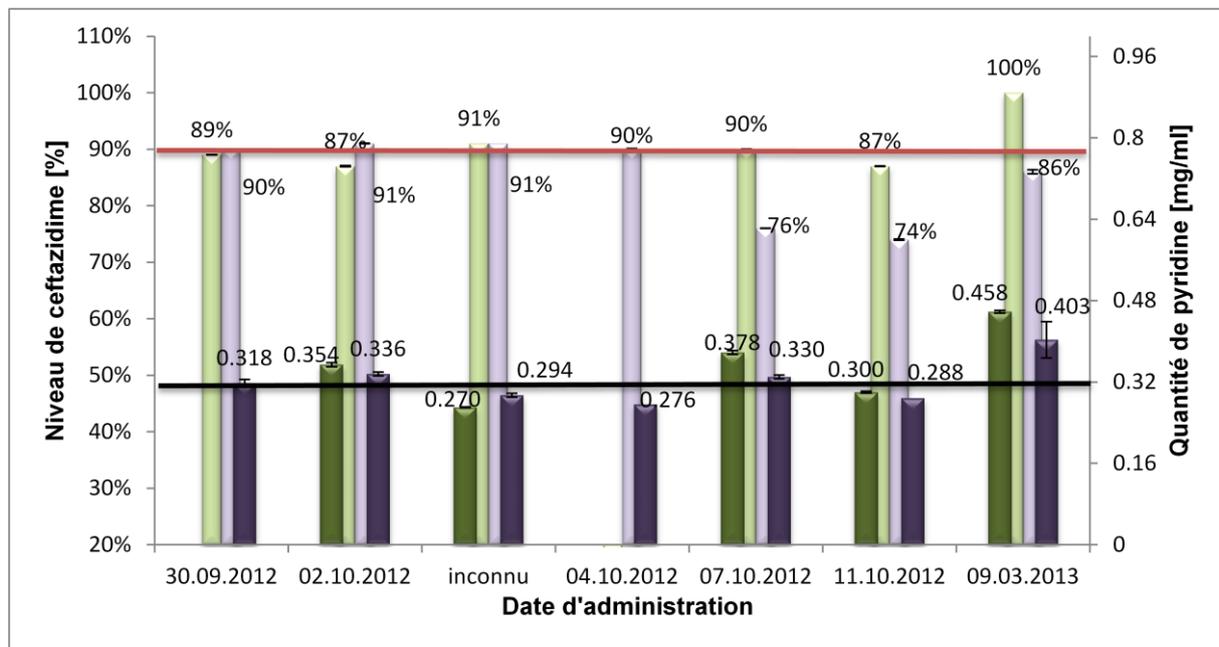


Figure 2 : Taux de ceftazidime et quantité de pyridine dosés par HPLC (vert) et CE (violet) chez le patient Mger (cf. remarque ci-dessous, page 26)

Remarque : La barre rouge représente la limite minimale du taux de ceftazidime. La barre noire représente elle, la limite maximale de pyridine. Les barres vertes foncée représentent la quantité de pyridine dosée par HPLC, tandis que les barres violettes foncée représentent la quantité de pyridine dosée par CE. Les barres violettes claires représentent le taux de ceftazidime dosé par CE, tandis que les barres vertes claires représentent le taux de ceftazidime dosé par HPLC.

Lorsque le taux de ceftazidime ou de pyridine n'a pas été déterminé pour l'une ou l'autre méthode, cela provient du fait que la quantité résiduelle de solution était trop faible pour effectuer toutes les analyses.

La figure ci-dessous représente le pourcentage de ceftazidime restant dans la cassette de perfusion ainsi que de la quantité de pyridine dosé par HPLC et CE en fonction de la date d'administration chez Cmu.

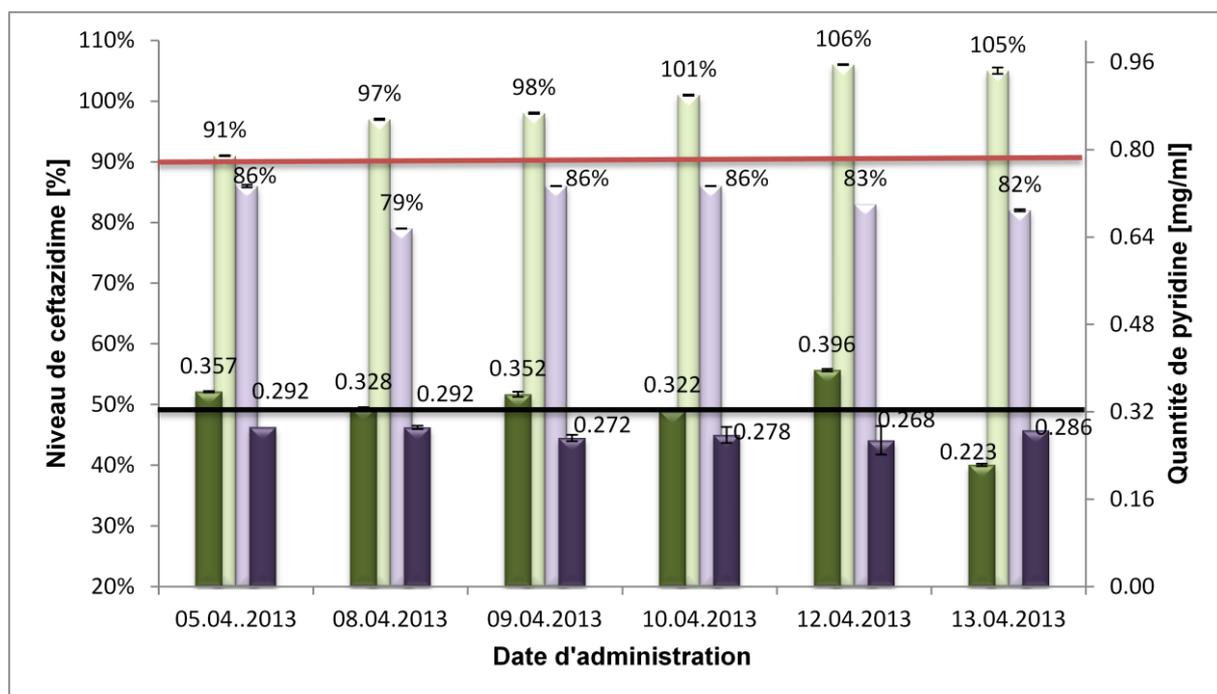


Figure 3 : Taux de ceftazidime et quantité de pyridine dosé par HPLC (vert) et CE (violet) chez le patient Cmu (cf.remarque ci-dessus)

Le tableau ci-dessous représente la moyenne de la température en relation avec le jour de l'administration.

Tableau 16 : Suivi de la température pendant 8 jours chez Cmu

Dates	5.04	8.04	9.04	10.04	12.04	13.04
Moyenne [°C]	24.6	25.4	24.8	24.7	25.9	24.2
Ecart-type [°C]	0.9	2.6	2.5	2.2	2.6	1.9

La figure ci-dessous représente le pourcentage de ceftazidime restant dans la cassette de perfusion ainsi que de la quantité de pyridine dosé par HPLC et CE en fonction de la date d'administration chez Sgun (20-23.11.12) et Tsan (04-06.05.13).

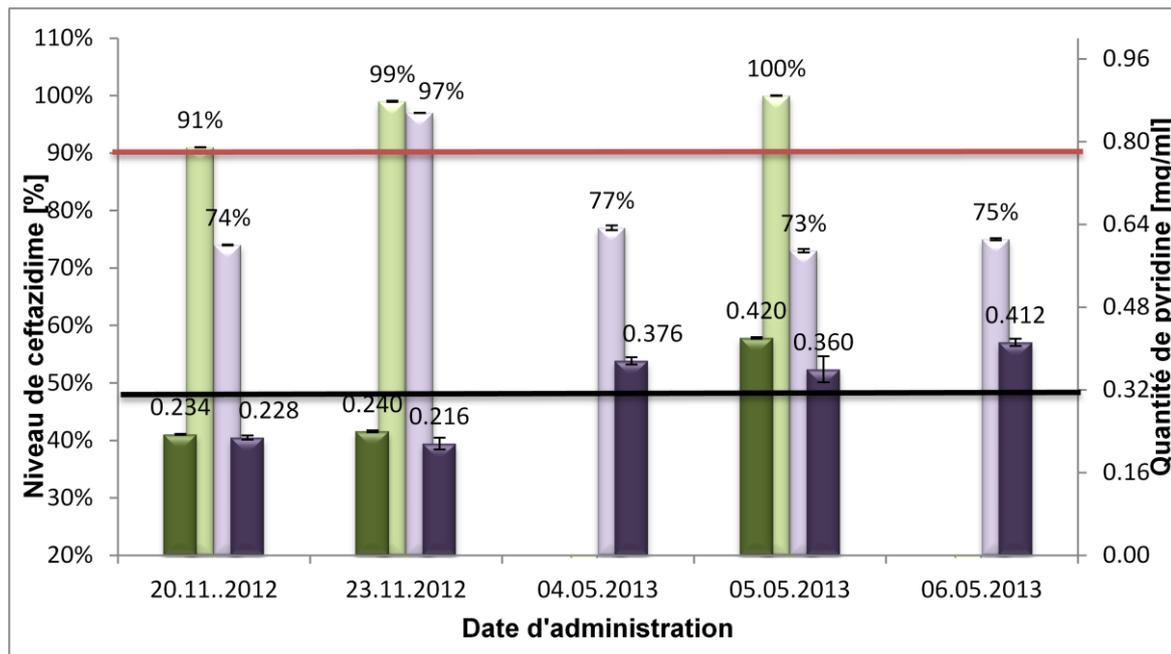


Figure 4 : Taux de ceftazidime et quantité de pyridine dosé par HPLC (vert) et CE (violet) chez les patients Sgun et Tsan (cf.remarque ci-dessus, p.26)

La figure ci-dessous représente le pourcentage de ceftazidime restant dans la cassette de perfusion ainsi que de la quantité de pyridine dosé par HPLC et CE en fonction de la date d'administration chez Abue.

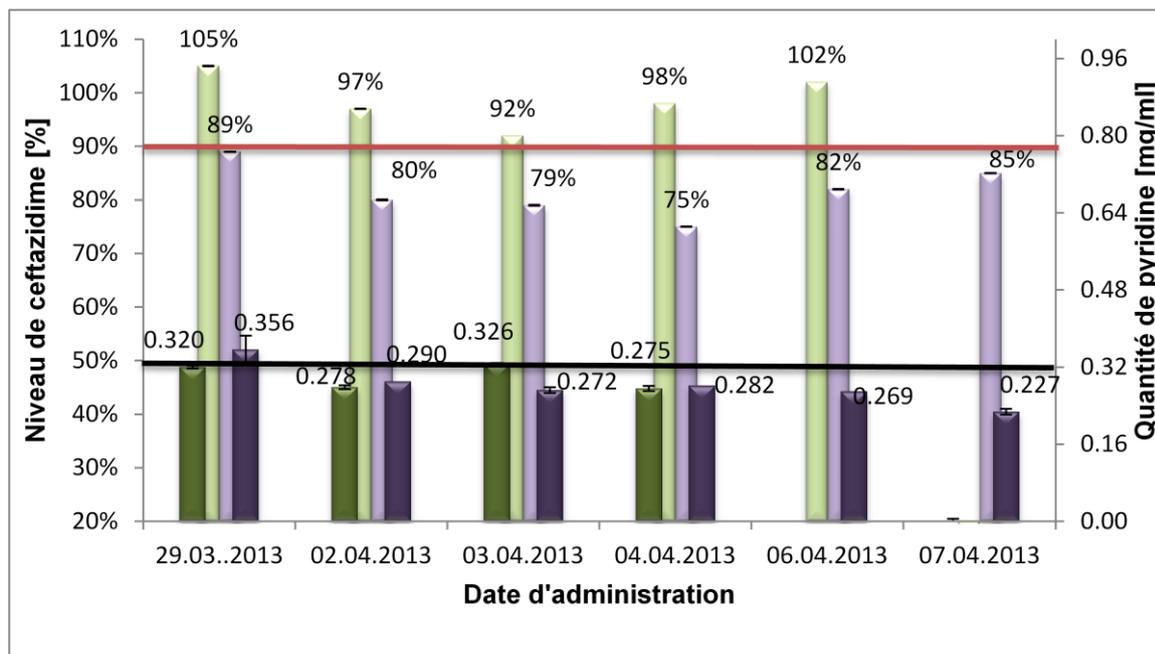


Figure 5: Taux de ceftazidime et quantité de pyridine dosé par HPLC (vert) et CE (violet) chez Abue (cf.remarque ci-dessus, p.26)

4. DISCUSSION

4.1. Méthodes d'analyses

4.1.1. Méthode Pharmacopée Européenne

Une recherche de la littérature a été effectuée, afin de trouver des méthodes de dosage par HPLC de la ceftazidime et de la pyridine. La méthode Ph. Eur. a été choisie, car la méthode développée à l'interne ne comprenait pas la pyridine. Les méthodes Pharmacopées sont des méthodes de choix pour les dosages des médicaments. Avant d'utiliser une méthode Pharmacopée, il faut vérifier la conformité du système avant d'entreprendre la moindre analyse. L'appareillage utilisé au laboratoire respecte les critères de la Ph. Eur.

4.1.1. Méthode de dosage par électrophorèse capillaire

L'analyse des différents échantillons a été effectuée en validant une méthode de dosage simultané de la ceftazidime et de la pyridine par CE. En premier lieu, il s'agissait d'utiliser une méthode par CE en phase micellaire afin de doser en plus les isomères de la ceftazidime [11]. Le tampon contenait 150 mM de Sodium DodecylSulfate (SDS), cela permet que toutes les molécules puissent toutes être entourées de micelles. Dès lors, les molécules sont entourées d'une couche de micelle chargées négativement, cela permet une séparation selon la taille de la substance. L'ajout de SDS permet de différencier les isomères de la ceftazidime avec une résolution adéquate, c'est-à-dire supérieur à 1.5. Le SDS permet une interaction différente entre la molécule mère et son isomère, ce qui entraîne une variation de leur temps de migration électrophorétique [11]. Cette interaction différentielle entre la ceftazidime et ses isomères proviennent du déplacement de la double liaison sur l'anneau β -lactam qui induit une perturbation de la densité électronique du groupe carboxylique [11, 33]. Cependant, cette technique a été abandonnée, car l'utilisation de l'électrophorèse avec des micelles n'était pas suffisamment reproductible. En l'absence de SDS, la ceftazidime et son isomère sortent au même temps de rétention, car ils présentent la même lipophilie ($\log P = -1.6$) [11]. La procédure de validation a été effectuée en suivant les recommandations de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP). Les résultats de la validation sont présentés en annexe 10.

4.2. Effet de la température sur la stabilité in vitro

Le dosage maximal trouvé dans la littérature est de 200 mg/kg/jour et l'USP fixe une limite à 0.4% de pyridine par rapport à la quantité de ceftazidime, ce qui représente une limite de 0.32 mg/ml [8, 16, 27, 34, 35]. La teneur en ceftazidime a été déterminée tant dans les conditions de mesures in vitro qu'in vivo, en tenant compte de la teneur assignée pour la ceftazidime SCR avec une concentration de 1 mg/ml. Trois vials ont été préparés et chacun injectés deux fois, ce qui représente 6 spectres, le coefficient de variation entre ces 6 spectres est de 0.72%. Ce qui prouve que les mesures effectuées sont précises et reproductibles. Les pourcentages de ceftazidime ont été déterminés par une simple règle de 3. Cependant pour la CE, 10 injections du même vial donne un coefficient de variation de 7% pour la ceftazidime et de 6% pour la pyridine [36]. Cela est un facteur qui a causé, une

validation à 15% avec un risque total de 5%. C'est la raison pour laquelle, les résultats selon la Ph. Eur. sont plus fiables.

Il est clair que la dégradation de tous les médicaments dépend de la température ; la dégradation peut être réduite de manière drastique en le maintenant à 4°C [37, 38]. Chimiquement les céphalosporines sont plus réactives que les pénicillines et moins stable en milieu aqueux, à cause de la substitution du C₃ (pyridine) qui agit comme groupe partant [39].

Comme la lumière est un facteur de dégradation, tous les récipients des échantillons ont soigneusement été entourés par du papier aluminium. Sinon il y'a un risque non négligeable de réflexion de la lumière à l'intérieur du flacon.

Il semble que le monitoring de la pyridine semble être une voie sûre pour étudier la stabilité de la ceftazidime, car plus la concentration en pyridine est élevée plus la solution s'est dégradée [40]. La quantité de pyridine est conforme pour le dosage par HPLC et CE à 4°C, elle se situe au maximum à 45% de la limite maximale (tableau 4). A 4°C, la CE a une faible précision, son coefficient de variation est de 45% après 24 heures. Concernant le taux de ceftazidime à 4°C, il est supérieur au 90%, en accord avec la littérature, qui indique même une stabilité de plus de 7 jours [10]. La stabilité de la ceftazidime en solution peut même aller jusqu'à 14 jours si elle est stockée à 4°C (plus de 90% de la dose initiale) [40, 41].

Les valeurs trouvées expérimentalement à 25°C (tableau 5) correspondent aux valeurs indiquées par le fournisseur car après 24 heures, la quantité est effectivement inférieure au 90% pour la CE, mais pas pour l'HPLC. Tandis que la quantité de pyridine à 25°C et 24h (tableau 4) est augmentée de plus de 75%, tant pour le dosage par HPLC que CE. Ces résultats indiquent qu'il serait plus approprié d'effectuer cette perfusion 2 fois 12h au lieu d'une fois 24 heures, car le taux de ceftazidime est satisfaisant et la quantité de pyridine également (tableau 4 et 5).

La littérature indique qu'à la température de 30°C et après 16 heures, la quantité de ceftazidime est en dessous des 90%, ce qui est corrélé aux résultats obtenus au tableau 5 [20].

Baririan et al., suggéraient que les isomères de la ceftazidime n'étaient détectables qu'à partir de 30°C [19]. L'annexe 14 présente les électrophérogrammes à 4, 25 et 30°C ; ces isomères potentiels sont détectables dès 4°C, mais ceux-ci sont plus importants à des températures de 25 ou même 30°C. Ces isomères sont des diastérisomères, car il n'est pas possible de séparer les énantiomères à l'aide d'un capillaire simple ; il faudrait pour cela opter pour une séparation chirale ou faire réagir le composé avec un réactif énantiomériquement pur, afin de former des diastérisomères. Les diastérisomères qui ont un seul centre chiral modifié peuvent également s'appeler « épimères ».

L'acceptabilité au niveau de la stabilité comprend d'une part que la quantité restante de ceftazidime soit au dessus de 90% mais également que la quantité de pyridine ne dépasse pas les 0.4%.

4.3. Effet de la concentration sur la stabilité in vitro

L'effet de la concentration a été investigué à 15, 60 et 120 mg/ml à la température de 25°C. La concentration à 120 mg/ml représente la concentration la plus élevée utilisée en pratique clinique [39]. La cinétique de formation de la pyridine suit une cinétique de pseudo-ordre 1, c'est-à-dire que la quantité de ceftazidime est si élevée que la quantité de pyridine qui s'y

forme est dans le même ordre de grandeur indépendamment de la concentration [10, 24, 42].

Comme le montrent les résultats obtenus sous le tableau 4, la quantité de pyridine est acceptable après 12 heures et non après 24 heures. Comme la cinétique de formation de la pyridine suit une cinétique de pseudo-ordre 1, les quantités de pyridine calculées au tableau 6 sont comparables aux valeurs obtenues en stockant ces solutions à 25°C (tableau 4). Une concentration élevée (120 mg/ml) semble quand même jouer un rôle dans la quantité de pyridine formée. Bien qu'il soit mineur, il faut tenir compte de cet effet, car la quantité de pyridine est 10% plus élevée à 120 mg/ml en comparaison à 60 mg/ml (tableau 6).

La quantité de ceftazidime aux concentrations de 15 et 60 mg/ml (à 24 h.) se trouvent toutes au-dessus des 90% exigés pour les tests de stabilité (tableau 7). Cependant le pourcentage de ceftazidime à 60 mg/ml après 24 heures dosé par CE est 2% en dessous des 90%. Cette valeur de 82±6% est quand même acceptable, car la variabilité de la méthode est de 15%.

La quantité de ceftazidime est restée stable à 120 mg/ml, même après 24 heures au bain-marie à 25°C (96±4%), pour la méthode par HPLC [39]. Selon Couldry et al., la stabilité est conservée (plus de 90%) pour des concentrations de plus de 100 mg/ml à 25°C pendant 18 heures [9]. Cependant, la méthode de dosage par CE au niveau le plus élevé présente un coefficient de variation de plus de 60% (tableau 7) ; ce qui n'est pas acceptable dans le dosage des produits pharmaceutiques. Une telle variation peut provenir, d'une concentration trop importante d'analyte, qui aurait saturé le capillaire et par conséquent causer une baisse dans l'efficacité de la séparation [29]. Afin d'éviter ce type d'erreur, la concentration à viser devrait être à 0.1 mg/ml de ceftazidime, présentant un bon équilibre entre une sensibilité suffisante et bien au-dessus de la limite de quantification.

4.4. Effet de la lumière UV et visible sur la stabilité in vitro

L'influence de la lumière a un important impact sur la stabilité de certains produits pharmaceutiques, ceux-ci peuvent être protégés de cette lumière en plaçant la solution de perfusion dans une cassette opaque. La distance à laquelle les 3 ballons contenant environ 30 ml de ceftazidime à 60 mg/ml à la lumière UV se trouvaient à une distance de 10 cm et la distance par rapport à la lumière visible est de 1 mètre. La quantité de pyridine calculée à la lumière UV (tableau 8) est non conforme, tandis que l'exposition à la lumière visible (par CE et HPLC) est conforme à la limite maximale autorisée. Une différence de 14% est calculée en exposant l'échantillon sous lumière UV par rapport à la lumière blanche. Cette variation peut soit provenir de la lumière UV même, mais également de la faible distance séparément la solution de perfusion par rapport à la lumière UV.

La température mesurée dans le laboratoire durant ces 24 heures était en moyenne de 21±2°C. La différence d'un facteur 2 entre la quantité de pyridine libérée à 25°C (tableau 4) et la quantité de pyridine libérée sous lumière visible (tableau 8, après 24 heures) pourrait être expliquée par un manque de reproductibilité de la méthode. Par exemple une variation du courant électrique provoque une variation dans la réponse du détecteur.

La quantité de ceftazidime mesurée par HPLC pour la lumière UV et visible est au-dessus de la limite minimale acceptée qui est de 90%. Cependant au tableau 9, une différence de 10 et 16% est mesurée entre les deux méthodes de dosage ; une telle différence peut être

expliquée, par une dilution erronée pour les échantillons t12 et t24 heures, mais également la variabilité de la méthode qui rappelle-le est de 15%.

Contrairement aux autres conditions, ces échantillons n'ont pas été protégés de la lumière, car il s'agissait justement d'évaluer cet effet.

4.5. Effet du pH sur la stabilité in vitro

Le noyau β -lactam comprend un noyau amide qui est instable chimiquement, cette instabilité entraîne une isomérisation ou une épimérisation de la fonction N-oxime [23, 43]. Les isomères sont pharmacologiquement inactifs, car ils ne possèdent pas la bonne conformation tridimensionnelle pour une interaction avec la paroi bactérienne des bactéries Gram+ et les Gram- [8, 43, 44].

La cefazidime présente une stabilité maximale à un pH compris entre 4.5 et 6.5 [10]. Lorsque le pH a été ajusté à 12.7 (tableaux 10 et 11), une forte odeur de pyridine se dégageait de la solution. Elle était passée de quasiment incolore à orange (annexe 4). La quantité de pyridine libérée après ajustement du pH est augmentée de 150 fois, passant de 0.055 à environ 8 mg/ml (tableau 10). Cependant cette concentration de 8 mg/ml est restée stable après 24 heures dans ces conditions. La quantité restante de ceftazidime est très faible de l'ordre de 3 à 5%, cela provient du fait que l'anneau β -lactam est susceptible à l'hydrolyse par une catalyse basique [39]. Le dosage de la pyridine ainsi que la ceftazidime n'ont pas pu être déterminé par CE, car un pH si élevé ne convient pas à ce type de capillaire.

Lorsque le pH a été ajusté à 1.38 (tableaux 10 et 11), la quantité de pyridine a augmenté de plus de 30% pour l'HPLC et la CE. A partir de 12 heures, le niveau de pyridine dépasse de deux fois la limite maximale autorisée. La quantité de pyridine libérée augmente linéairement, avec un coefficient de corrélation (R^2) de 0.998. Après 12 heures d'exposition à ce pH, le taux de ceftazidime est d'ores et déjà en dessous de la limite minimale (90%).

Les résultats obtenus en ajustant le pH à 6.8 est comparable aux résultats obtenus à une exposition à 25°C (tableau 4), tant pour la quantité de pyridine que pour le taux de ceftazidime. La quantité libérée augmente également de façon linéaire ($R^2=0.999$) par rapport au temps. Le taux de ceftazidime après 24 heures est au-dessus de la limite exigé de 90%.

4.6. Conditions extrêmes de pH et de température

Les conditions extrêmes de pH et de température servent à mettre clairement en évidence la formation de produits de dégradations. Comme dans l'ajustement du pH à 12.7 (tableau 12), la quantité de pyridine formée est de l'ordre de 10 à 20 fois au-dessus de la limite supérieure. Le taux restant de l'antibiotique sous condition basique très forte est de $1.37\pm 0.01\%$ et de $7.9\pm 0.2\%$ pour l'HPLC et la CE respectivement. Le taux observé en moyenne pour la CE et l'HPLC qui est en moyenne de 4.6% de ceftazidime se situe dans l'intervalle mesuré à pH 12.7 (tableau 11) juste après l'ajustement du pH qui est de $5.5\pm 1.1\%$.

La corrélation entre HPLC et CE au niveau de la production de pyridine pour l'HCl après 15 minutes est totale (tableau 12). Des quantités de pyridine 50 fois moindre sont observées en condition acide qu'en condition basique forte. Ceci est également corrélé avec l'intervalle de pH auquel la ceftazidime est la plus stable entre 4.5 et 6.5 [10].

L'exposition des solutions de perfusion à une température extrême (90°C) pendant 15 minutes permet d'induire la formation de produits de dégradations. Les valeurs obtenues pour la pyridine des solutions de perfusion à 90°C (tableau 12) peuvent être mises en regard avec les mesures effectuées au tableau 4 (25°C et 60 mg/ml). Cela prouve qu'exposer l'échantillon à une température plus élevée avec un temps réduit, le résultat de la dégradation est comparable [31].

Le pourcentage de ceftazidime dans des conditions acides et à la condition de 90°C après 15 min est en dessous des 90% (tableau 13). Cependant pour la méthode par CE, le taux de ceftazidime pour l'HCl 5 N présente une différence de près de 40% par rapport au dosage du même échantillon par HPLC. Ce manque apparent d'une telle corrélation peut provenir d'une dilution erronée, d'un manque de reproductibilité de l'appareillage ou de la formation de sel au niveau de l'injecteur qui fausse le courant et par conséquent la détection.

4.7. Reconstitution dans l'eau versus dans le NaCl 0.9%

Il n'y a pas eu de formation d'isomères potentiels en fonction du type de reconstitution établie. Par manque de temps, le travail précédent n'avait pu déterminer si l'impureté détectée par HPLC provenait du mode de reconstitution (seringue) ou était présent dans le contenant primaire [18]. A l'annexe 26, l'électrophérogramme ne présente pas de différence en fonction des 4 modes de préparations, soit seringue-NaCl 0.9%, seringue-eau, pipette en verre-NaCl 0.9% et pipette en verre-eau. La quantité de pyridine en fonction de ces 4 modes de reconstitutions peut être considérés comme équivalente (tableau 14). De faibles différences dans la quantité de pyridine peuvent provenir du fait car au moment où l'échantillon sort du congélateur et au moment de l'analyse se déroule un certain laps de temps qui est différent en fonction des échantillons. Afin de palier à ces imprécisions, il aurait fallu laisser décongeler les échantillons au frigo (4°C) et de les diluer au facteur nécessaire et de tout de suite les injecter. Ces 4 modes ont été réalisés non pour quantifier la présence de pyridine, mais plutôt de déterminer sous quelle condition des isomères potentiels étaient détectables. C'est la raison pour laquelle, il n'y a pas de résultats de dosage de la pyridine par CE (tableau 14).

Le taux de ceftazidime pour ces 4 conditions déterminé avec la méthode Ph.Eur. est conforme aux valeurs attendue, c'est-à-dire situé au dessus des 90%. Cependant, le dosage de ces mêmes échantillons effectués par CE donnent des résultats en moyenne 20% au-dessus du taux mesuré par HPLC. Cette forte variation peut être partiellement expliquée par l'incertitude de la méthode qui présente une variation de 15% ou à un biais systématique. Cela peut provenir par exemple que le courant devient plus faible donc l'échantillon passe plus de temps au niveau du détecteur et son aire sous la courbe est augmentée [29].

4.8. Etude de stabilité en condition réelle

La variabilité dans la disponibilité des cassettes provient du fait que d'une part certaines solutions contenaient moins de 98 ml et d'autre part que les infirmières ne changeaient pas à l'heure précise la cassette. La pompe électrique utilisée au CHUV *CADD-Legacy*[®] délivre toute la solution de perfusion (100 ml) après 23h40 au lieu des 24 heures indiquées [18].

Le nombre total de cassettes récoltées est de 24 contenant suffisamment de solution pour être analysable. Les résultats déterminés sur un nombre relativement élevé de cassettes (24) de perfusion permettent d'obtenir des données stabilité in vivo significatives [18]. Le nombre de patients présent à l'unité de soin durant cette période est de 4. Ce nombre est statistiquement suffisant pour en tirer des conclusions sur sa stabilité d'utilisation en clinique.

Le suivi de la température a pu être réalisé chez 4 enfants hospitalisés au CHUV d'une période allant de 3 à 12 jours, le suivi de ces températures se trouve en annexe 27. Un pic à 31°C est observé pendant la nuit, ce qui suggère que la cassette s'est retrouvée sous la couverture. Le minimum observé est de 17°C, correspondant à la sortie de la cassette du frigo. Mais en général, une moyenne de 24±2°C a été observé. Avec l'arrivée du beau temps et sans une protection adéquate du dispositif de perfusion, les températures peuvent grimper à des valeurs plus élevées que celles reportées dans le présent chapitre. Une comparaison a été effectuée entre la quantité de pyridine et les températures observées pendant toute la période de perfusion de la ceftazidime. Il est raisonnable de penser que la température mesurée à la surface de la cassette est la même que la température dans la solution de perfusion, car dans le travail de diplôme précédemment réalisé il a été démontrée une différence de moins de 1% entre ces deux valeurs [18].

Les patients admis au CHUV suivent une cure de 14 jours d'hospitalisation et celles-ci sont effectuées pendant les vacances scolaires, afin de ne pas interférer avec la scolarité de ces enfants atteints de fibrose kystique [5]. Une prise en charge globale est effectuée, avec de la physiothérapie respiratoire, une prise en charge nutritionnelle, une supplémentation en vitamines liposolubles (ADEK) etc. La prise en charge par antibiotique se fait par l'administration de ceftazidime entre autre. Elle est en première indication dans le traitement d'infection dû à *P. aeruginosa* avec une posologie moyenne de 150 mg/kg/jour [4, 7]. Les infections des voies respiratoires affectent de manière significative la morbidité et la mortalité de ces patients [5]. L'espérance de vie des patients atteints de mucoviscidose a été largement augmentée, jusqu'à en moyenne 38 ans et ceci est largement attribué au traitement par antibiothérapie [35]. Les exacerbations pulmonaires dû à *P. aeruginosa* augmente avec l'âge et ceci requiert des cures d'antibiotique sur 2-3 semaines [35]. Cet antibiotique est administré par perfusion sur 24 heures, car il présente une biodisponibilité orale très faible et son activité bactéricide est caractérisé par le temps pendant lequel sa concentration est au-dessus de la CMI et n'a pas d'effet post-antibiotique significatif [9, 11, 34]. L'efficacité clinique entre l'administration par bolus trois fois par jour ou une perfusion continue sur 24 heures est la même, cependant la sécurité peut être modifiée [5].

En 2012, les étiquettes ne mentionnaient que la date de fabrication et non la date d'administration, ces dates étaient notées à la main par le corps infirmier. Dès 2013, les étiquettes indiquent clairement la date de fabrication et la date d'administration.

Chez le patient Mger (figure 2), les dosages de ceftazidime et/ou de pyridine qui n'ont pas été effectués proviennent du fait que la quantité de solution restante dans la cassette était trop faible. Les solutions de perfusion pour les 4 premières dates d'administrations ont été préparées le 28.09.12 au sein de l'unité de fabrication de la Pharmacie du CHUV. Les quantités de pyridine et de ceftazidime durant ces 4 premiers jours d'administrations étaient conformes aux exigences établies. Il aurait été intéressant de suivre la température de ces cassettes, afin de potentiellement reproduire ces conditions pour de futures administrations en clinique. La température joue un rôle considérable dans la vitesse de dégradation de la plupart des produits pharmaceutiques. C'est la raison pour laquelle les tests de vieillissement accélérés se font à des températures élevées [31].

Le suivi de la température a été réalisé sur la cassette administrée le 09.03.2013 (figure 2), elle était de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ en moyenne (annexe 27). Les quantités de pyridines déterminées à cette date sont comparables aux résultats obtenus au tableau 4 (0.567 ± 0.010 et de 0.592 ± 0.007 mg/ml pour l'HPLC et la CE respectivement).

Le taux de ceftazidime est supérieur au 90% pour les deux méthodes de dosage pour les dates d'administration du 30.09.12, inconnu et au 09.03.13 (figure 2). La corrélation entre les deux méthodes étaient en général satisfaisantes en tenant compte de la variabilité de la méthode de dosage par CE. Cette variation peut être expliquée par la formation de sel au niveau de l'injecteur qui risque d'une part de boucher le capillaire et d'autre part de fausser passablement les résultats. Un courant modifié engendre en général une vélocité des molécules plus différente et par conséquent la réponse du détecteur varie [29].

Les quantités de pyridine lors de l'administration au 5, 8 et 9 avril (figure 3) chez Crou se situent toutes au-dessus de la limite à 0.32 mg/ml dosé par CE (fabriquées le 05.04). Ces valeurs sont inférieures par rapport à la quantité de pyridine déterminée à 25°C et à une concentration de 60 mg/ml (tableau 4). Cette différence provient du fait que la température n'est pas fixe tout au long des 24 heures pour l'administration in vivo. La température varie fortement si le patient positionne la cassette sous ou au-dessus de la couverture. Le contrôle de la température est critique pour l'administration de ceftazidime par des pompes portables [16]. Afin que le produit se dégrade le moins possible, la pompe ne doit pas être placée sous les habits pendant un laps de temps prolongé [16, 39]. Lors d'un effort physique la chaleur dégagée par le patient réchauffe également la solution. Seule la perfusion le 13.04, est en dessous de la limite à 0.32 mg/ml pour ces deux méthodes.

Le fabricant indique que la ceftazidime garde >90% de sa concentration après 18 heures à température ambiante ($24-25^\circ\text{C}$) [9]. Les 6 cassettes analysées chez ce patient (figure 3) présentent la particularité suivante que tous les dosages effectués par HPLC sont conformes tandis que tous les taux mesurés par CE sont inférieurs au 90% en ne tenant compte que de la variabilité mesurée par l'écart-type. La validation de la procédure de dosage par CE (annexe 10) présente une variation de 15%; en tenant également compte de cette importante variation, les dosages effectués par CE sont également conformes.

Chez le patient Sgun (figure 4), la quantité de pyridine est en dessous de la limite elle est de (20.11.12) 0.234 ± 0.001 et 0.228 ± 0.004 mg/ml pour l'HPLC et la CE respectivement. Lors de la perfusion du 23.11.12, elle est également inférieure à la limite maximale, elle se situe à 0.240 ± 0.002 et de 0.216 ± 0.011 mg/ml pour l'HPLC et la CE respectivement (figure 4). Ces

cassettes datent de plus de 6 mois, un suivi de la température n'a pu être effectué afin de corrélérer la température moyenne avec la quantité de pyridine libérée. Cependant, le taux de ceftazidime présente une différence de 17% lors de l'administration le 20.11.12. Cette différence peut provenir de la variabilité de la méthode (15%). La répétabilité de la méthode par CE peut varier de 2-8%, les coefficients de variations mesurés sont pour la ceftazidime de 7% et de la pyridine de 6% [36]. Les différents facteurs pouvant influencer les résultats sont : une acidification à l'anode dû à une électrolyse ou à la formation de sel au niveau de l'injecteur qui fait varier les résultats [36].

Chez le patient Tsan (figure 4), les 3 cassettes analysées étaient toutes non conformes, tout d'abord la pyridine mesurée par CE étaient entre 10 et 20% au-dessus de la limite, lors de la perfusion le 04, 05 et 06.05.13. Le seul dosage de pyridine par HPLC qui a pu être effectuée chez ce patient, en raison de la faible quantité de solution restante était à la date de perfusion du 05.05 avec une quantité de 0.420 ± 0.002 mg/ml. Le taux de ceftazidime mesuré à cette date était de $100.0 \pm 0.1\%$, tandis que les taux de ceftazidime mesuré pour le 04, 05 et 06.05 se situent au maximum à 77% (figure 4). En tenant compte également de cette variation de la méthode par CE (15%), le taux de ceftazidime est dans la limite exigé par la réglementation. Cependant, à la date du 05.05, une différence de plus de 25% entre les deux méthodes n'est pas acceptable, ceci pourrait provenir d'une dilution erronée. Il n'était pas possible de préparer à nouveau les échantillons pour la raison toute simple qu'il y'en avait pas assez.

Chez le patient Abue (figure 5) recevait une posologie de 100 mg/kg/jour pour un poids de 68 kg, représentant une dose de 6 g/jour. 4 cassettes sur 6 reçues par ce patient étaient conformes (inférieure à 0.32 mg/ml) quant au niveau de pyridine libérée. La corrélation entre les deux méthodes de dosage présente une différence d'en moyenne 15%, ce taux représente également la variabilité de la méthode par électrophorèse capillaire. Le 10.04, la pyridine et la ceftazidime n'ont pu être dosées par HPLC, car la quantité résiduelle de solution était trop faible.

En ce qui concerne le dosage de la ceftazidime par CE, aucune n'est au-dessus de la limite à 90%, à nouveau en tenant compte des 15% de variation dans la méthode ces différents taux nous indique la même information (par rapport à l'HPLC) que les solutions administrées chez Abue sont conformes à la réglementation.

La moyenne de la quantité de pyridine déterminée sur les 24 cassettes est de 0.322 ± 0.003 et de 0.301 ± 0.01 mg/ml pour l'HPLC et la CE respectivement. Le taux de ceftazidime est quant à lui de 95.9 ± 0.1 et de $83.1 \pm 0.1\%$ pour l'HPLC et la CE respectivement. La CE étant capable de mieux différencier les isomères potentiels (annexe 26), c'est la raison pour laquelle le taux de ceftazidime est aussi faible. La méthode appliquée par HPLC ne permet de distinguer que deux isomères potentiels (annexe 31). Tandis que la méthode appliquée par CE permet, elle de différencier en plus de la cetazidime, 5 isomères potentiels et de la pyridine. Grace à la méthode d'électrophorèse capillaire, il a été possible d'identifier plus d'impuretés que l'HPLC. Le dosage effectué par LC est potentiellement surestimé, ce qui pourrait occasionner un échec thérapeutique.

Les débits des diffuseurs élastomériques ne sont pas conformes lorsque la concentration est de 60 mg/ml ou lors de la baisse de température [18]. Par conséquent, un système de refroidissement ne peut être utilisé pour effectuer une administration sur 24 heures, car cela

entraîne une dose incomplètement administrée. Raison pour laquelle, la pompe électrique CADD-Legacy[®] est utilisée. En maintenant une température de 13°C, la quantité de pyridine libérée après 24 heures est inférieure à la limite maximale autorisée (0.4%) [18].

5. CONCLUSION

Il ressort de ce travail que la ceftazidime est stable à 4°C pendant 24 heures. Elle présente également une stabilité suffisante à 25°C pendant 12 heures. Cependant, il faudrait éviter de stocker la solution de perfusion à 30°C (12 heures), car la quantité de pyridine est au-delà de la limite maximale autorisée. L'influence de la concentration sur la vitesse de dégradation a une influence modérée. Les solutions de perfusion doivent bel et bien être protégées de la lumière UV/visible, car celle-ci influe sur la stabilité de cet antibiotique. Les cassettes actuellement utilisées au CHUV sont opaques et protègent la solution de la photodégradation [21].

Un facteur très important qui affecte grandement la stabilité est le pH. La ceftazidime se dégrade très rapidement, lorsqu'elle est exposée à un pH de 12. Une dégradation plus faible a été observée pour les échantillons exposés à un pH de 1.38. Ce qui suggère que la ceftazidime est plus stable en condition acide. Des résultats similaires ont été obtenus en exposant les échantillons à des conditions extrêmes de pH (acide ou basique). Il apparaît que le mode de reconstitution n'a pas d'influence sur la formation d'isomères potentiels. La méthode par électrophorèse capillaire utilisée est capable d'identifier la ceftazidime, ses 5 isomères potentiels et de la pyridine. La méthode Ph. Eur. est capable d'identifier potentiellement que 2 isomères. Il faudrait acquérir tous les standards des produits de dégradations afin de tous les identifier, mais ils ne sont pas disponibles dans le commerce [18].

Sur les 24 cassettes récoltées, seules 15 d'entre-elles étaient conformes (62.5%) tant pour la limite de pyridine fixée par la Pharmacopée Américaine que pour les 90% de ceftazidime. Afin de pallier ces problèmes, il serait intéressant de maintenir la solution à une température plus froide ($24 \pm 2^\circ\text{C}$ observé avec le suivi de la température sur les cassettes) avec un cold pack ou un sac isolant. Une autre possibilité offerte aux cliniciens serait d'effectuer une perfusion continue sur 12 heures. Il est plus contraignant une administration deux fois par jour tant pour le patient que pour le corps médical, mais cela permet d'assurer une sécurité d'emploi plus élevée. Sachant que le Compendium Suisse des médicaments indique une perfusion de ceftazidime sur 8 ou 12 heures pour les enfants jusqu'à 14 ans [7]. Cependant, l'administration sur 24 heures présente des avantages indéniables, car cela améliore la compliance du patient, maîtrise les coûts de fabrications, de préparation et d'administration [5]. Le fournisseur indique une stabilité de 18 heures à 25°C, au-delà de cette période le fabricant ne peut être retenu responsable en cas d'échec thérapeutique ou une exposition à des doses trop élevée de pyridine. Elle peut potentiellement leur causer une hépato- et ou une néphrotoxicité.

La méthode de choix pour le dosage de la ceftazidime reste la méthode HPLC, car les résultats sont dans les limites des dosages pharmaceutiques. La CE pourrait représenter une alternative, car elle identifie plus d'impuretés. Cependant, cette méthode reste encore à perfectionner, afin de se situer dans les limites des dosages pharmaceutiques (5% de risque).

6. PERSPECTIVES

La CE est une méthode complémentaire à la LC, car le mécanisme de séparation est différent. La méthode utilisée par électrophorèse capillaire pour le dosage de la ceftazidime a permis d'identifier 3 impuretés supplémentaires (par rapport à l'HPLC). Il faudrait valider une méthode de dosage simultané de la ceftazidime, de ces 5 isomères potentiels et de la pyridine par CE. Le développement de l'électrophorèse capillaire permet d'économiser du temps (analyses plus rapide) et de solvant.

Il serait intéressant de développer des sacs portatifs comprenant un emplacement à l'avant et à l'arrière afin de positionner des compresses froides. De cette façon, les perfusions sur 24 heures peuvent être conservées ; facilitant la compliance des patients tout en assurant une sécurité dans l'administration de cet antibiotique.

Le nombre de cassettes récoltées n'étaient que de 24, il aurait fallu récupérer toutes les cassettes d'une période comprenant de mai à septembre. Il serait nécessaire d'avoir des échantillons à t₀, t_{12h} et t₂₄ heures, afin d'avoir le niveau de dégradation avant la perfusion. De cette façon le nombre de cassettes est important et il est plus intéressant d'étudier la stabilité en plein été avec un suivi de la température sur chacune des cassettes.

7. BIBLIOGRAPHIE

1. Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, Johansen HK, Ciofu O, Høiby N, et al. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol.* 2012 Dec;10(12):841-51.
2. Antunovic SS, Lukac M, Vujovic D. Longitudinal cystic fibrosis care. *Clin Pharmacol Ther.* 2013 Jan;93(1):86-97.
3. Cohen TS, Prince A. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nature medicine.* 2012;18(4):509-19.
4. G. H, I. R, al. KYe. Vade-mecum mucoviscidose en pédiatrie. 11 ed. CHUV Lausanne; 2012.
5. Rappaz I, Decosterd LA, Bille J, Pilet M, Bélaz N, Roulet M. Continuous infusion of ceftazidime with a portable pump is as effective as thrice-a-day bolus in cystic fibrosis children. *Eur J Pediatr.* 2000 Dec;159(12):919-25.
6. Cohen TS, Prince A. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nat Med.* 2012 Apr;18(4):509-19.
7. Documed. Compendium Suisse des médicaments. [cited; Available from:
8. Prescott WA, Gentile AE, Nagel JL, Pettit RS. Continuous-infusion antipseudomonal Beta-lactam therapy in patients with cystic fibrosis. *P T.* 2011 Nov;36(11):723-63.
9. Couldry R, Sanborn M, Klutman NE, Strayer AH. Continuous infusion of ceftazidime with an elastomeric infusion device. *Am J Health Syst Pharm.* 1998 Jan;55(2):145-9.
10. Barnes AR, Nash S. Stability of ceftazidime in a viscous eye drop formulation. *J Clin Pharm Ther.* 1999 Aug;24(4):299-302.
11. Porrà R, Farina A, Cotichini V, Lecce R. Analysis of ceftazidime and related compounds by micellar electrokinetic chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* 1998 Oct;18(1-2):241-8.
12. A.H. M, H.R.N. S. Stability Study and Degradation Kinetics of Ceftazidime in Pharmaceutical Preparations. *Advances in Analytical Chemistry.* 2012;2(1):1-5.
13. Jaruratanasirikul S, Sriwiriyan S. Stability of ceftazidime in normal saline solution after exposure to light. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2001 Mar;32(1):216-8.
14. Choi SH, Koh Y. Ceftazidime for respiratory infections. *Expert Opin Pharmacother.* 2012 Oct;13(14):2097-109.
15. Nicolau DP, McNabb J, Lacy MK, Quintiliani R, Nightingale CH. Continuous versus intermittent administration of ceftazidime in intensive care unit patients with nosocomial pneumonia. *International journal of antimicrobial agents.* 2001;17(6):497-504.
16. Hubert D, Le Roux E, Lavrut T, Wallaert B, Scheid P, Manach D, et al. Continuous versus intermittent infusions of ceftazidime for treating exacerbation of cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Sep;53(9):3650-6.
17. Riethmueller J, Junge S, Schroeter TW, Kuemmerer K, Franke P, Ballmann M, et al. Continuous vs thrice-daily ceftazidime for elective intravenous antipseudomonal therapy in cystic fibrosis. *Infection.* 2009 Oct;37(5):418-23.
18. C. R. Evaluation de trois pompes employées pour la perfusion continue de ceftazidime chez les enfants avec mucoviscidose. Lausanne: Genève; 2012.
19. Baririan N, Chanteux H, Viaene E, Servais H, Tulkens PM. Stability and compatibility study of cefepime in comparison with ceftazidime for potential administration by continuous infusion under conditions pertinent to ambulatory treatment of cystic fibrosis patients and to administration in intensive care units. *J Antimicrob Chemother.* 2003 Mar;51(3):651-8.
20. Servais H, Tulkens PM. Stability and compatibility of ceftazidime administered by continuous infusion to intensive care patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Sep;45(9):2643-7.
21. Tønnesen HH. Formulation and stability testing of photolabile drugs. *International journal of Pharmaceutics.* 2001;225(1):1-14.
22. Waterman KC, Adami RC. Accelerated aging: prediction of chemical stability of pharmaceuticals. *Int J Pharm. Netherlands;* 2005. p. 101-25.

23. Zajac M, Siwek J, Muszalska I. The mechanism of ceftazidime degradation in aqueous solutions. *Acta Pol Pharm.* 1998 Jul-Aug;55(4):275-8.
24. Fubara JO, Notari RE. A kinetic oxymoron: concentration-dependent first-order rate constants for hydrolysis of ceftazidime. *J Pharm Sci.* 1998 Jan;87(1):53-8.
25. Plasse JC, Chabloz C, Terrier A, Bellon G. To the editor: Is it safe to administer a continuous infusion of ceftazidime (Fortum) prepared for 24 hours in cystic fibrosis (CF) patients? *Pediatr Pulmonol.* 2002 Mar;33(3):232-3.
26. Favetta P, JA, Allombert C., Breyse C., Guitton J., Bureau J. Simultaneous Quantification of Ceftazidime and Pyridine, its Main Degradation Product, by High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Letters.* 2000;33:2465-75.
27. www.uspnf.com. United States of Pharmacopeia. 2013 [cited 19.02.2013]; Available from:
28. Sandrine Fleury-Souverain LV, Christina Weber, Pascal Bonnabry. Use of capillary electrophoresis coupled to UV detection for a simple and rapid analysis of pharmaceutical formulations in a quality control laboratory in a hospital pharmacy. *EJHP Science.* 2009;15(3):53-60.
29. Wätzig H, Degenhardt M, Kunkel A. Strategies for capillary electrophoresis: method development and validation for pharmaceutical and biological applications. *Electrophoresis.* 1998;19(16-17):2695-752.
30. Suntornsuk L. Capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis: A survey on recent applications. *Journal of chromatographic science.* 2007;45(9):559-19.
31. www.FDA.com. Guidance for Industry Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products. [cited; Available from:
32. <http://online.pheur.org>. Pharmacopée Européenne. 2013 [cited 21.02.2013]; Available from:
33. Farina A, Porrà R, Cotichini V, Doldo A. Stability of reconstituted solutions of ceftazidime for injections: an HPLC and CE approach. *J Pharm Biomed Anal.* 1999 Jul;20(3):521-30.
34. Walker M. LW, Manasco K. B. Continuous and Extended Infusions of b-Lactam Antibiotics in the Pediatrics Population. *The Annals of Pharmacotherapy.* 2012;46:1537-46.
35. Vinks AA, Brimicombe RW, Heijerman HG, Bakker W. Continuous infusion of ceftazidime in cystic fibrosis patients during home treatment: clinical outcome, microbiology and pharmacokinetics. *J Antimicrob Chemother.* 1997 Jul;40(1):125-33.
36. Labat L, Deveaux M, Dubost J-P. Applications de l'électrophorèse capillaire en toxicologie clinique et médico-légale. *Annales de toxicologie analytique;* 2000; 2000. p. 179-95.
37. Kodym A, Hapka-Zmich D, Gołab M, Gwizdala M. Stability of ceftazidime in 1% and 5% buffered eye drops determined with HPLC method. *Acta Pol Pharm.* 2011 Jan-Feb;68(1):99-107.
38. Walker SE, Iazzetta J, Law S, Biniecki K. Stability of commonly used antibiotic solutions in an elastomeric infusion device. *Can J Hosp Pharm.* 2010 May;63(3):212-24.
39. Viaene E, Chanteux H, Servais H, Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. Comparative stability studies of antipseudomonal beta-lactams for potential administration through portable elastomeric pumps (home therapy for cystic fibrosis patients) and motor-operated syringes (intensive care units). *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Aug;46(8):2327-32.
40. Favetta P, Allombert C, Breyse C, Dufresne C, Guitton J, Bureau J. Fortum stability in different disposable infusion devices by pyridine assay. *J Pharm Biomed Anal.* 2002 Mar;27(6):873-9.
41. Stendal TL, Klem W, Tønnesen HH, Kjønneksen I. Drug stability and pyridine generation in ceftazidime injection stored in an elastomeric infusion device. *Am J Health Syst Pharm.* 1998 Apr;55(7):683-5.
42. Zajac M, Jelińska A, Sobczak A, Musiał W. Stability of ceftazidime pentahydrate in medicinal preparations Biotum and Ceftim. *Acta Pol Pharm.* 2005 Jan-Feb;62(1):11-5.
43. Hutt AJ, O'Grady J. Drug chirality: a consideration of the significance of the stereochemistry of antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother.* 1996 Jan;37(1):7-32.

44. Lüthy R, Blaser J, Bonetti A, Simmen H, Wise R, Siegenthaler W. Comparative multiple-dose pharmacokinetics of cefotaxime, moxalactam, and ceftazidime. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1981;20(5):567-75.
45. Quanyun AX, Lawrence AT. *Stability-Indicatin HPLC Methods for Drug Analysis*; 1999.
46. [cited; Available from: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>
47. pharmacie Sd. Modèle pour rédiger le protocole et rapport de validationi d'une méthode analytique. 2011. p. 1-9.
48. pharmacie Sd. Validatin des méthodes analytiques. 2011. p. 1-2.
49. www.ICH.org. Valildation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2R1. [cited 06.03.2013]; Available from:

8. ANNEXES

Annexe 1 : Fiche de produit de la ceftazidime

Annexe 2 : Fiche de produit de la pyridine

Annexe 3 : Mécanisme d'hydrolyse de la ceftazidime et libération de pyridine

Annexe 4 : Coloration de la ceftazidime en fonction de sa dégradation

Annexe 5 : Impuretés et produits de dégradation de la ceftazidime

Annexe 6 : Protocole de préparation des cassettes de Fortam[®]

Annexe 7 : Préparation des échantillons à une condition expérimentale fixée et les différents prélèvements à effectuer en fonction du temps

Annexe 8 : Spécification du thermomètre LogTag[®]

Annexe 9 : Préparation de la phase mobile et des solutions témoins pour le dosage de la ceftazidime et de la pyridine selon Ph. Eur.

Annexe 10 : Protocole et rapport de validation par l'électrophorèse capillaire du dosage simultané de la ceftazidime et de la pyridine

Annexe 11 : Données brutes du dosage de la ceftazidime et de la pyridine à 4°C par HPLC et CE respectivement

Annexe 12 : Données brutes du dosage de la ceftazidime et de la pyridine à 25°C par HPLC et CE respectivement

Annexe 13 : Données brutes du dosage de la ceftazidime et de la pyridine à 30°C par HPLC et CE

Annexe 14 : Electrophérogrammes à 4, 25 et 30°C après 24 heures d'exposition

Annexe 15 : Données brutes du dosage de la ceftazidime et de la pyridine à 15 mg/ml par HPLC et CE respectivement

Annexe 16 : Données brutes du dosage de la ceftazidime et de la pyridine à 120 mg/ml par HPLC et CE respectivement

Annexe 17 : Données brutes du dosage de la ceftazidime et de la pyridine en fonction de la lumière UV par HPLC

Annexe 18 : Données brutes de dosage de la ceftazidime et de la pyridine en fonction de la lumière visible par HPLC et CE respectivement

Annexe 19 : Données brutes du dosage de la ceftazidime et de la pyridine à pH 1.38 par HPLC et CE respectivement

Annexe 20 : Données brutes du dosage de la ceftazidime et de la pyridine à pH 6.8 par HPLC et CE respectivement

Annexe 21 : Données brutes du dosage de la ceftazidime et de la pyridine à pH 12.7 par HPLC

Annexe 22 : Données brutes du dosage de la ceftazidime et de la pyridine à 5N HCl pendant 15 minutes par HPLC et CE respectivement

Annexe 23 : Données brutes du dosage de la ceftazidime et de la pyridine 5N NaOH pendant 15 minutes par HPLC et CE respectivement

Annexe 24 : Données brutes du dosage de la ceftazidime et de la pyridine à 90°C pendant 15 minutes par HPLC et CE respectivement

Annexe 25 : Données brutes du dosage de la ceftazidime et de la pyridine en fonction de la reconstitution par HPLC et CE respectivement

Annexe 26 : Electrophérogrammes en fonction de la procédure de reconstitution de l'antibiotique par CE

Annexe 27 : Suivi de la température chez Mger, Cmou, Tsan et Abue

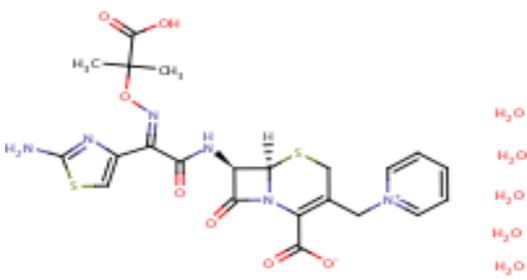
Annexe 28 : Données brutes de dosage de la ceftazidime et de la pyridine mesuré dans des cassettes de perfusion

Annexe 29 : Témoin Ph. Eur. du la ceftazidime et de la pyridine selon USP de dosage par HPLC

Annexe 30 : Electrophérogrammes après ajustement du pH à 1.38, 6.8 et 12.7

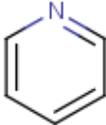
Annexe 31 : Chromatogrammes en fonction de la procédure de reconstitution de l'antibiotique par HPLC

Annexe 1 : Fiche de produit de la ceftazidime

Nom *	Ceftazidime pentahydraté		
Formule brute	$C_{22}H_{22}N_6O_7S_2 \cdot 5H_2O$	Masse mol. *	636.66g/mol
Formule développée *			
Usage *	Antibiotique contre <i>P. aeruginosa</i>		
Posologie/concentration d'utilisation *	Dose journalière entre 1 et 6 grammes		
Toxicité *	Convulsions en cas de surdosage		
Fournisseur/n° lot *			
Caractères physico-chimiques:			
- pK _a et log P *	pK _{a1} = 1.9 pK _{a2} = 2.7 pK _{a3} = 4.1 /log P = -1.6		
- solubilité *	Soluble dans l'eau : 396mg/l à 25°C		
- stabilité *	Hydrolyse en milieu aqueux, sensible à la température		

REFERENCE : [45, 46]

Annexe 2 : Fiche de produit de la pyridine

Nom *	Pyridine		
Formule brute	C ₅ H ₅ N	Masse mol. *	79.10g/mol
Formule développée *			
Usage *	Réactif en synthèse chimique		
Toxicité *	Toxicité rénale et hépatique		
Fournisseur/n° lot *			
Caractères physico-chimiques:			
- pK _a et log P *	pK _a = 5.23/log P=0.65		
- solubilité *	Solubilité dans l'eau 1g/l à 25°C		

REFERENCE : [45, 46]

Annexe 3 : Mécanisme d'hydrolyse de la ceftazidime et libération de pyridine

La figure ci-dessous représente l'hydrolyse de la ceftazidime avec l'ouverture du cycle β -lactam et la libération de la pyridine [24].

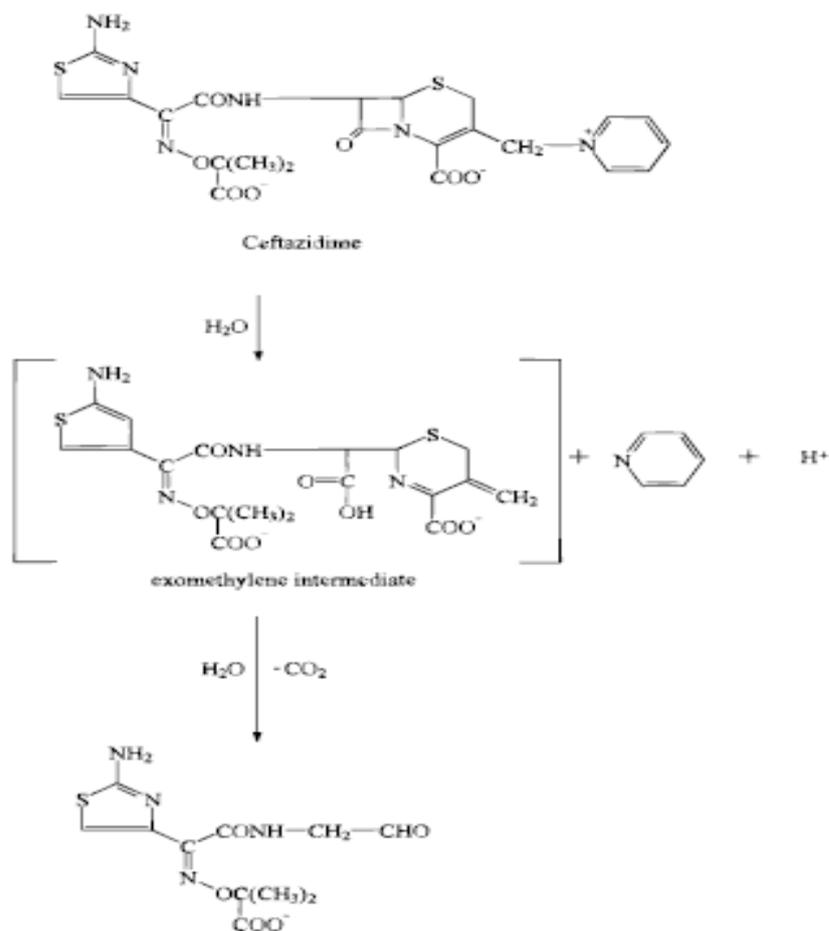


Figure a: mécanisme de dégradation de la ceftazidime

Annexe 4 : Coloration de la ceftazidime en fonction de sa dégradation

La figure ci-dessous représente 10 éprouvettes d'une solution de ceftazidime à 60 mg/ml de la moins dégradé (tout à gauche) à la plus dégradé.

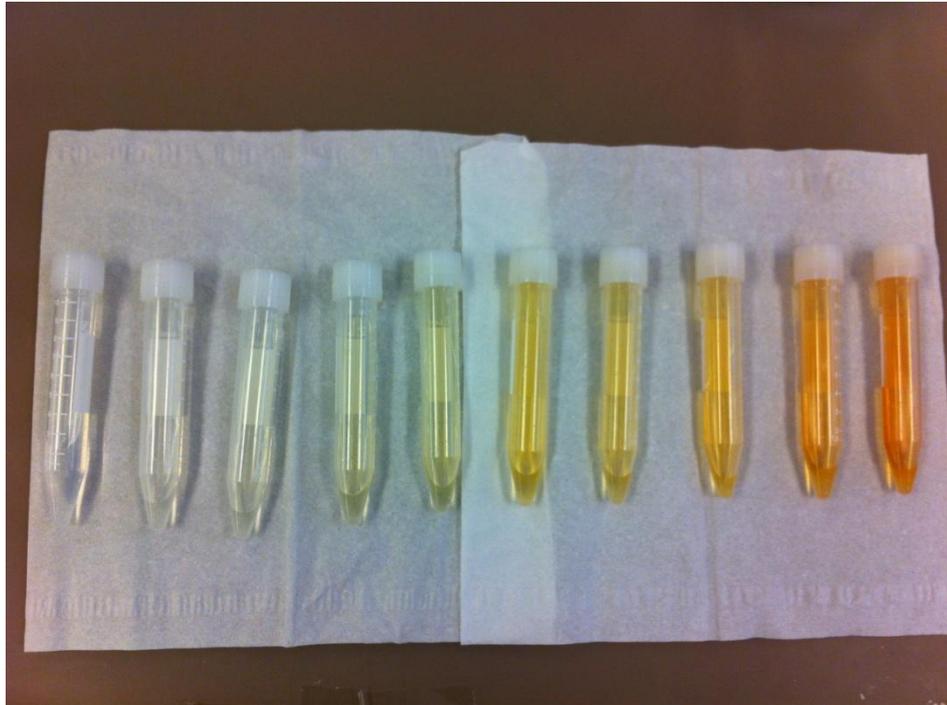


Figure b : Coloration de la solution de perfusion à 60 mg/ml de gauche à droite de la moins à la plus dégradée

Annexe 5 : Impuretés et produits de dégradation de la ceftazidime

La figure ci-dessous représente la ceftazidime et ses principaux produits de dégradations.

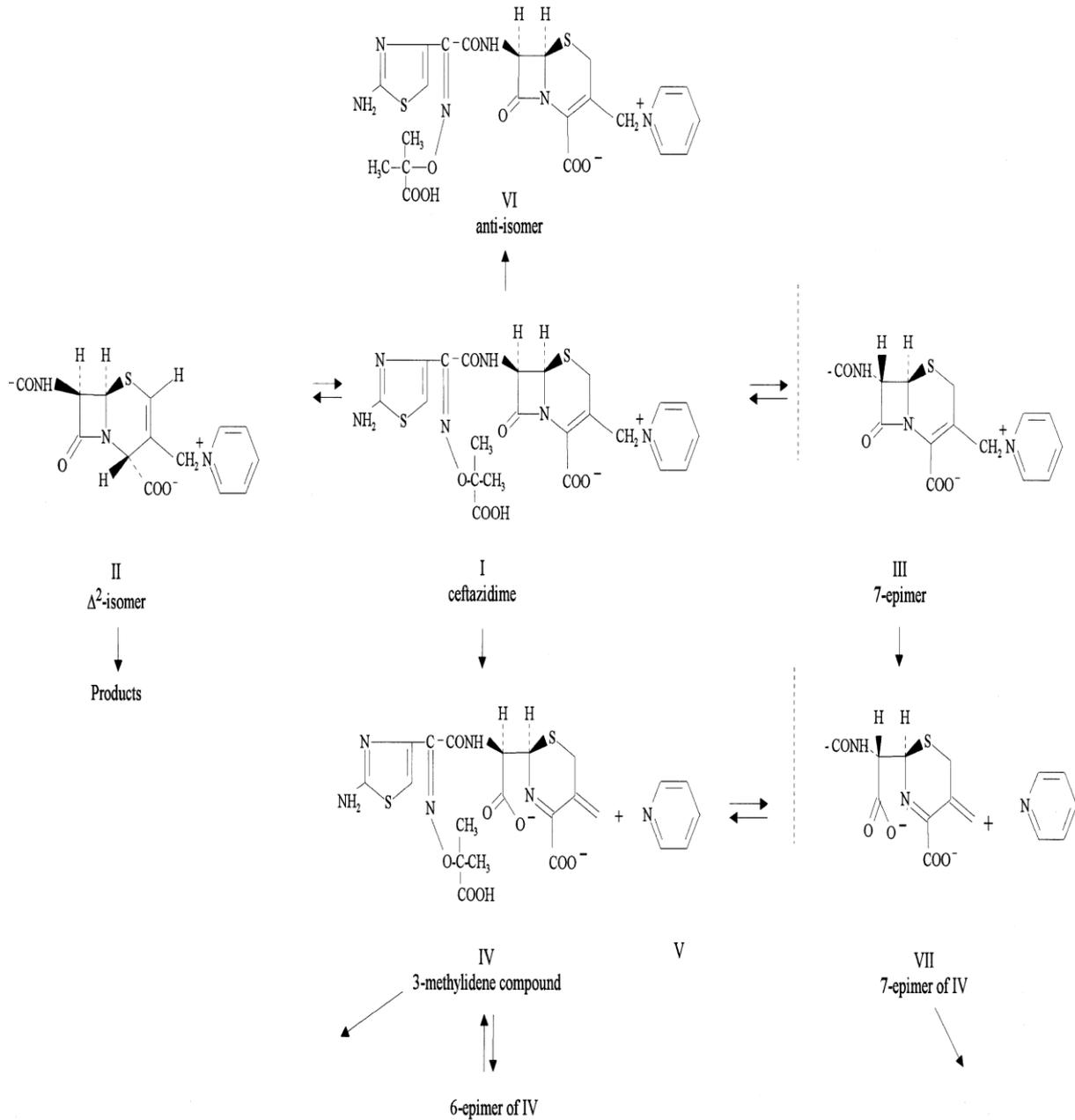


Figure c : Ceftazidime et ses principaux produits de dégradations

Annexe 6 : Protocole de préparation des cassettes de Fortam®

Protocole de fabrication de la solution de perfusion de ceftazidime

		CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE VAUDOIS Centres interdisciplinaires et logistique médicale Service de Pharmacie		COPIE		
Processus PRO.04	FORMULAIRE				Elaboré par MVOE	
Code F-0167	CEFTAZIDIME (FORTAM) XX g/jour dans NaCl 0,9%				Validé par CSCH	
Version 1.0	100 ml				Libéré par	
	Préparation Magistrale					
Remplace Nouveau	S'applique à FAB9	Dossier PF0690	Article		Diffusé le 20.09.2007	
Lot : P0T3T		Date de fabrication : 11.02.2013		EXP : 18.02.2013		
		N° d'analyse :		Deleze Alexandre		

TAILLE DE CHARGE : 7

PRODUITS	N° de lot	QTE	Date/visa
Fortam (ceftazidime) 2g fio sèche		Fio	
Eau ppi 100 ml Bichsel		ml	
NaCl 0.9 % 1000 ml Bichsel		14.00eo	
Cassette CADD 100 ml		7.00eo	
Prolongateur CADD		3.50eo	

MODE OPERATOIRE	Date/visa
<p>Mode opératoire</p> <p>Sous flux laminaire VERTICAL :</p> <ol style="list-style-type: none"> Reconstituer chacune des _____ fioles de Fortam (cetazidime) 2g avec 10 ml d'eau ppi à l'aide d'une seringue de 10 ml. Laisser une aiguille blanche dans chaque fiole pour permettre le dégazage. Vider un flacon de NaCl 0.9% de 1 litre et conserver aseptiquement le bouchon Peser le NaCl 0.9% nécessaire : _____ [g] Lorsque le contenu des fioles de fortam est limpide, prélever le tout (environ 10,5 ml par fiole) et l'injecter dans le flacon pp. Bouchonner le flacon et mélanger en retournant le flacon. S'assurer qu'il n'y a plus de dégagement gazeux à l'aide d'une seringue. Remplir les cassettes avec 100 ml de solution à l'aide d'une seringue de 50 ml. Ôter l'air et toutes les bulles, clamber la tubulure et mettre le bouchon rouge fourni. Etiqueter. <p>Dans la zone d'emballage:</p> <ol style="list-style-type: none"> Emballer chaque cassette individuellement dans une gaine transparente. Conditionner toutes les cassettes dans une gaine opaque. 	

Date / Visa responsable fabrication : _____



CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE VAUDOIS
Centres interdisciplinaires et logistique médicale
Service de Pharmacie

COPIE



Processus PRO.04		FORMULAIRE	Elaboré par MVOE
Code	Version	CEFTAZIDIME (FORTAM) XX g/jour dans NaCl 0,9% 100 ml	Validé par CSCH

Lot : P0T3T

Calculs

Nombre de fioles de Fortam (ceftazidime) nécessaires :

Dose prescrite : _____ [g] pour 1 jour

Dose totale prescrite : _____ [g] pour _____ jours

Si le nombre de grammes n'est pas un nombre pair, choisir le nombre supérieur pair le plus proche : _____ [g]

Nombre de fioles = _____ [g]/2 = _____ [fio sèches]

Calcul du volume d'eau ppi nécessaire pour la reconstitution :

_____ [fio sèches] x 10 [ml/fio sèche] = _____ [ml]

Calcul du volume final :

Dose prescrite par jour : _____ [g] dans 100 [ml] =

Nombre pair de grammes : _____ [g] dans _____ [ml]

Volume de NaCl 0.9% nécessaire :

Volume final - volume d'eau ppi nécessaire à la reconstitution :

_____ [ml] - _____ [ml] = _____ [ml]

Masse de NaCl 0.9% à peser : _____ [ml] * 1.005 [g/ml] = _____ [g]

MONTAGES, APPAREILS, SCHEMAS

MATERIEL: DESCRIPTION

CONDITIONNEMENT				ETIQUETTE	
TYPE D'EMBALLAGE	gaine standard			DELEZE Alexandre 17.09.1992 1PNE CEFTAZIDIME (FORTAM) XX g/jour dans NaCl 0,9% 100 ml Cassette Tenir entre 2 et 8°C A l'abri de la lumière Exp : 18.02.2013 Lot : P0T3T PHARMACIE du CHUV LAUSANNE	
QTE PAR EMBALLAGE	1				
LIEU DE QUARANTAINE	-				
LIEU DE STOCKAGE	FASOL				
LIEU DE RESERVE					
CONDITIONS STOCK	Frigo / abri lum.				
DUREE DE VALIDITE	7 Jours	Mois	Ans		

REMARQUES

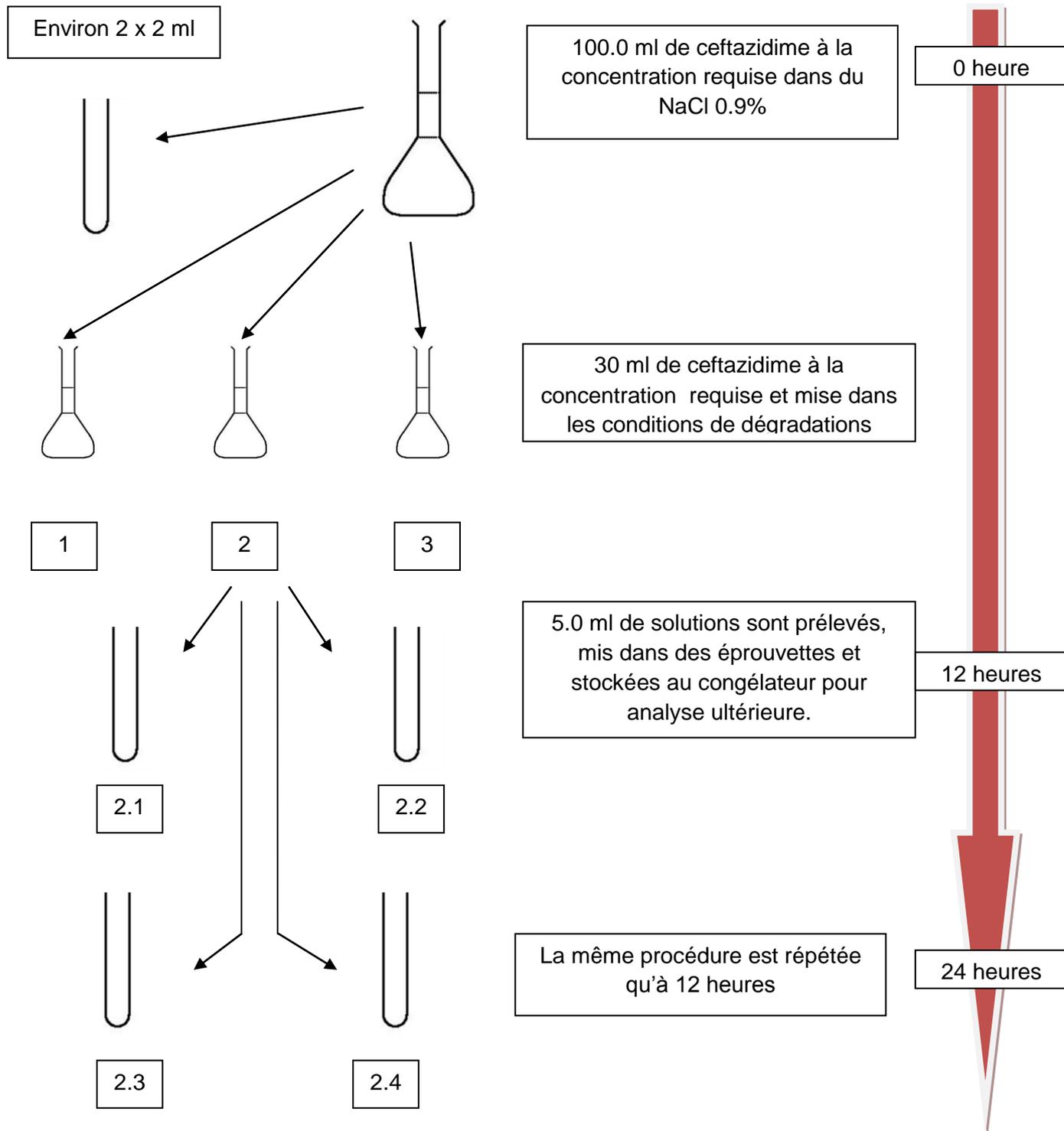
TAILLE DE CHARGE : 7 UNITES PRODUITES : RENDEMENT :

ECHANTILLONS POUR ANALYSE 0

QUITTANCES DE PESEES ET/OU DE MESURES IN-PROCESS

Date / Visa responsable fabrication : _____

Annexe 7 : Préparation des échantillons à une condition expérimentale fixée et les différents prélèvements à effectuer en fonction du temps



1

¹ lewebpedagogique.com

Annexe 8 : Spécification du thermomètre LogTag®

LogTag

TEMPERATURE RECORDER



product code: TRV-8

The LogTag Temperature Recorder incorporates an external temperature sensor uniquely arranged in a recess in the case. This design protects the sensor from damage but still provides a fast reaction time more associated with remote temperature sensors.

Using the LogTag Interface and LogTag's freely available companion software *LogTag Analyser*, the LogTag is easily set-up for recording conditions including delayed start, sampling interval, number of readings, continuous or fixed number of readings and configuration of conditions to activate the *ALERT* indicator.

Readings are downloaded using LogTag Analyser which provides facilities for charting, zooming, listing data statistics and allows exporting the data to other applications such as Excel.

Product Highlights

- **Alert indicator** – indicates if readings are outside of preset limits
- **OK indicator** indicates if still recording and if readings within configured limits
- **Inspection mark** in log by push button
- **Push Button Logging start**
- **Rapid Download!** Takes only seconds to download recordings
- **'Pre-Start' logging** - Logtag can be configured to record *even if it has not been started*.
- **High performance** at low cost
- **Credit card sized case** – thin enough to be easily mailed "letter rate".
- **Real time clock** records time & temperature simultaneously
- **Easy to use** *LogTag Analyser* software that runs on any PC configures LogTag for recording then downloads resulting data for analysis. Data can also be exported to formats compatible with other applications such as Excel
- **Highly reliable** and accurate
- Re-calibration to achieve higher accuracy possible

Annexe 9 : Préparation de la phase mobile et des solutions témoins pour le dosage de la ceftazidime et de la pyridine selon Ph. Eur.

Dosage de la ceftazidime

Phase mobile : dissoudre 4.3 g. de phosphate disodique et 2.7 g. de phosphate monopotassique dans 980 ml. d'eau et ajouter 20.0 ml d'acétonitrile. Ensuite filtrer la solution à l'aide d'un filtre de porosité 0.2µm.

Solution à examiner : dissoudre 50.0 mg de substance à examiner dans la phase mobile à 50.0 ml.

Solution témoin (a) : Dissoudre 25.0 mg. de ceftazidime SCR dans la phase mobile et compléter à 25.0 ml avec la même solution.

Solution témoin (b) : Dissoudre 5.0 mg. de ceftazidime pour identification des pics SCR dans la phase mobile à 5.0 ml.

Dosage de la pyridine

Phase mobile 1 : mélanger 80 ml d'une solution de dihydrogénophosphate d'ammonium à 28.8g/l ajustée à pH7.0 avec de l'ammoniaque, puis 240 ml. d'acétonitrile et enfin 680 ml d'eau qualité HPLC. Ensuite bien homogénéiser cette solution, la filtrer sur un filtre de porosité 0.2µm, puis dégazer aux bains à ultrasons pendant 20 minutes.

Solution tampon phosphate pH 7.0 : Dissoudre 28.4 g. de phosphate disodique anhydre (35.6g sous forme dihydrate) et 18.2 g. de phosphate monopotassique dans 500.0 ml. d'eau. Si nécessaire, 10 minutes aux bains à ultrasons afin de bien dissoudre les substances. Ensuite, prélever 50.0 ml de cette solution et diluer dans 500.0 ml. d'eau.

Solution à examiner : dissoudre 500 mg de ceftazidime dans de la solution tampon phosphate à 100.0 ml.

Solution témoin (a) : dissoudre 1.00 g de pyridine (ou $\rho=0.982$ mg/ml, 1.0183ml) dans 100.0 ml d'eau ; ensuite prélever 5.0 ml de cette solution et compléter à 200.0 ml d'eau et pour finir, prélever 1.0 ml de cette dernière solution dans 200.0 ml de solution tampon phosphate.

Solution témoin (b) : prélever 1.0 ml. de solution à examiner et compléter à 200.0 avec le tampon phosphate. 1.0 ml. de cette solution, rajouter 20.0 ml de solution témoin (a) et compléter au volume avec la solution tampon phosphate à 200.0 ml.

Annexe 10 : Protocole et rapport de validation par l'électrophorèse capillaire du dosage simultané de la ceftazidime et de la pyridine

1. OBJET

Tout essai qui n'est pas pharmacopée doit être validé. Le but de cette validation permettra le dosage simultané de la ceftazidime et de ses produits de dégradation par électrophorèse capillaire (CE).

2. DOMAINE D'APPLICATION

Ce rapport concerne la méthode de dosage par CE de la ceftazidime et ses impuretés.

3. DEFINITIONS/ABREVIATIONS

CE : Electrophorèse Capillaire
SFSTP : Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques
PA : Principe actif
CQ : Contrôle qualité
RAQ : Responsable Assurance Qualité
PHA8 : Laboratoire de Contrôle Qualité
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
NaOH : Hydroxyde de sodium
SDS : Sodium DodecylSulfate
NaCl : Chlorure de Sodium
Ppi : pour préparations injectables
SE : Standard d'étalonnage
SD : Standard de validation
SF : Solution Fille

4. RESPONSABILITES

PHA
Rédiger et valider le protocole
RAQ
Autoriser le protocole

5. DOCUMENTS ET TEXTES DE REFERENCES

Cf. à la fin du texte

6. DOCUMENTS ASSOCIES

PHA_IT_0101 : Modèle pour rédiger le Protocole et Rapport de Validation d'une méthode analytique

PHA_IT_0100 : Critères de validation et limites d'acceptation

PHA_PRO_0041 : Validation des méthodes analytiques

7. DEROULEMENT

Tables des matières

- 1. Introduction**
- 2. Instructions sécurité**
- 3. Composition du produit**
- 4. Propriétés physico-chimiques du principe actif**
- 5. Expérimental**
 - 5.1 Matériel et produits
 - 5.2 Méthode
 - 5.2.1 *Tests de dégradations*
 - 5.2.2 *Préparations des solutions*
- 6. Validation de la méthode**

1. Introduction

L'électrophorèse est une technique complémentaire à la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), car le mécanisme de séparation se fait par l'application d'un fort potentiel entre deux électrodes (Cf. partie 1.4) [30].

La méthode de dosage a été validée selon les recommandations de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP). Les paramètres de validation ont été calculés à l'aide du logiciel E-noval.

Spécificité - Sélectivité : La spécificité est la capacité à établir de manière univoque la présence du composé à analyser en présence d'impuretés, de produits de dégradations ou la présence de matrice [47, 48].

Exactitude : L'exactitude d'une procédure analytique exprime l'étroitesse de la mesure en fonction de la valeur de référence (« valeur vraie »). Le terme de justesse est parfois utilisé [48, 49].

Précision/Fidélité : La fidélité d'une procédure analytique exprime l'étroitesse entre la série de mesures obtenues de plusieurs prises provenant d'un échantillon homogène. Elle comprend la répétabilité, la fidélité intermédiaire et la reproductibilité et peut être exprimé par la variance, l'écart-type ou encore le coefficient de variation.

- Répétabilité : La répétabilité exprime la fidélité sous de même conditions opératoires (même équipement, même opérateur, mêmes produits) avec un intervalle de temps court.
- Fidélité intermédiaire : La fidélité intermédiaire exprime la variation intra-laboratoire (différent jour, différent opérateur et différent équipement).
- Reproductibilité : La reproductibilité exprime la variation inter-laboratoire. Elle n'est pas exigée par les autorités régulatrices [47, 48].

Limite de détection : La limite de détection d'une procédure analytique est la quantité la plus faible d'analyte dans un échantillon qui peut être détecté mais sans nécessairement être quantifié [47, 48].

Linéarité : La linéarité d'une procédure analytique est la capacité d'obtenir des résultats qui soient directement proportionnel à la concentration d'analyte dans l'échantillon [47-49].

Intervalle de dosage : L'intervalle de dosage d'une procédure analytique est l'intervalle entre la concentration supérieur et inférieur d'analyte dans l'échantillon.

Limite de quantification : La limite de quantification est la plus petite quantité de l'analyte qui peut être quantifiée dans un échantillon [47-49].

2. Instructions sécurité

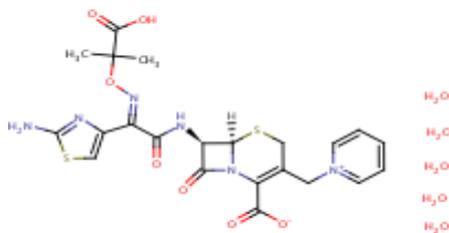
Ce document est placé sous la responsabilité du responsable du laboratoire contrôle qualité.
Ce document s'adresse au personnel du laboratoire contrôle qualité.
L'interprétation et l'évaluation des résultats, ainsi que la bonne application de ce document sont sous la responsabilité du responsable du laboratoire contrôle qualité.
Les règles de sécurité générales du laboratoire doivent être suivies ainsi que les procédures pour l'élimination des déchets selon l'instruction en vigueur.

3. Composition du produit

Fortam 2g, GSK, n° lot 2010
Principe actif : Ceftazidimum (ut ceftazidimi pentahydras)
Excipients : Natrii carbonas [7].
Le lyophilisat est dissout dans du NaCl 0.9%.

4. Propriétés physico-chimiques du principe actif

La ceftazidime comporte des fonctions acides et basiques. La figure ci-dessous représente la structure de la ceftazidime pentahydraté. Elle se présente sous forme de fine poudre blanche.



$pK_{a1} = 1.9$ acide sur le noyau dihydrothiazine
 $pK_{a2} = 2.7$ acide carboxylique sur la chaîne latéral
 $pK_{a3} = 4.1$ groupe amine
 $\log P = -1.6$

5. Expérimental

5.1 Matériel et produits

Appareillage

- CE : Agilent 7100, détecteur DAD
- Capillaire : BGB 64.5 cm uncoated, TSPFS-Tubing, 50µm ID, 363µm OD, USA
- Ultra-sons: Branson 5200
- Balance analytique Mettler Toledo, AT250
- pH-mètre : 713 Metrohm®

Matériel

- Ballon jaugés (10,25 et 50 ml)
- Micropipette (200 et 1000µl)
- Vials CE et bouchons

Réactif

- Tétraborate, Sigma-Aldrich, n° lot MKBF3466V, Suisse
- Eau HPLC, Merck, n° lot Z289533317, Germany
- Méthanol, Merck, n° lot I663518245, Germany
- Ceftazidime, GSK, n° lot 2010, UK
- HCl 1M, Merck, n° lot HC088982
- NaOH 1M, Merck, n° lot HC380501
- NaOH 0.1M, Merck, n° lot HC39542

5.2 Méthode

Le tableau ci-dessous représente les conditions d'utilisations de l'électrophorèse capillaire [11, 33].

Tableau 17 : Conditions de l'électrophorèse pour le dosage de la ceftazidime et impuretés

Longueur détection	64.5 cm x 50 µm I.D. (56 cm effectif)	Voltage	20 kV
Conditionnement capillaire	0.1 M NaOH 5 min, 5 min avec eau et 5 min tampon pH 9.2	Température capillaire	25°C
Injection	50 mbar x 8 s	Détection	254 nm
Tampon	sodium tétraborate pH 9.2	Filtration	0.2 µm
Temps d'analyse	10 min	-	-

Conditions test pour les produits de dégradations : au frigo (4°C) pendant 7 jours, 20°C pendant 24 heures et 30°C pendant 24 heures. Les échantillons sont ensuite stockés au congélateur à -15°C à -25°C et sont décongelés à température ambiante pour une analyse par CE ultérieure.

5.2.1 Tests de dégradations

Afin de déterminer le temps d'analyse pour les standards d'étalonnage ainsi que pour les standards de validation, des tests de dégradations sont effectués. Ces tests font partie dans la phase de développement d'une méthode analytique et effectuée en amont de la validation proprement dite. Le tableau ci-dessous représente les conditions de dégradations choisis en fonction de la littérature [33].

Tableau 18 : Conditions opératoire de dégradation dans le développement de la méthode de dosage de la ceftazidime par CE

Lieu de conservation	Conditions test pour les produits de dégradations [°C]	Temps de conservation [h]
Frigo	4	7
Température du labo.	20	1
Four thermostaté	30	1

La concentration choisie est de 60 mg/ml, correspondant à une administration de cet antibiotique à un enfant de 40 kg. La dose journalière utilisée en thérapeutique est de 150 mg/kg/jour, multiplié par 40, équivaut à 6 grammes dans un volume de 100 ml et ceci administré pendant 24 heures.

5.2.2 Préparations des solutions

100.0 mg de ceftazidime sont dissous dans environ 10 ml d'eau, 1.17 ml NaCl 0.9% et complété au trait de jauge à 100 ml d'eau ; cette solution est appelée solution mère (S1). La concentration obtenue est de 1 mg/ml. Quant à la préparation de la solution de pyridine à 50 µg/ml, consiste à peser une solution de 500 mg et de la diluer avec de l'eau ad 50.0 ml, ensuite de prélever de cette solution 500 µg et de la diluer à nouveau à 50.0 ml avec de l'eau. Le tampon borate 25 mM pH 9.2 est préparé en diluant 251.5 mg de tétraborate dans 50.0 ml d'eau.

6. Validation de la méthode

Standards de calibrations

La concentration visée est de 100 µg/ml, donc prendre des concentrations à 140% et 80% selon la pharmacopée Européenne, c'est-à-dire entre 140 µg/ml et 80 µg/ml. La SFSTP exige au minimum 2 séries (2 solutions filles, SF₁₋₂) obtenu par la dilution de la solution mère (S1) en 2 solutions filles. Dans chaque série, 4 niveaux de concentrations sont exigés (bas, médian et haut) et à chaque niveau 2 répétitions indépendantes (2 vials différents) et chacun injecté 2 fois. Le nombre total d'électrophérogrammes obtenus est de 16 par jour de validation. Le nombre de jours étant de 3, le nombre d'électrophérogrammes totales pour les standards de calibrations est de 48.

Le tableau ci-dessous représente les différentes dilutions effectuées pour obtenir les différentes concentrations de ceftazidime et de pyridine.

Tableau 19 : Concentration de ceftazidime pour le standard de calibration

Niveau	Concentration de ceftazidime [µg/ml]	Volume SF ceftazidime [µl]	Concentration de pyridine [µg/ml]	Volume SF pyridine [ml]	Volume total [ml]	nombre répétitions indépendantes
bas	80	800	10.0	2.0	10	2
médian	100	1000	12.5	2.5	10	2
haut	120	1200	15.0	3	10	2
haut	140	1400	17.5	3.5	10	2
blanc	-	-	-	-	1	1

Standards de validations

Les standards de validations doivent toutes être effectuées dans la matrice, c'est-à-dire dans du NaCl 0.9%. Une deuxième solution mère (S2) est préparée selon les mêmes conditions que précédemment. Comme dans les standards de calibrations, la concentration visée est de 100 µg/ml et les concentrations des standards de validations sont préparés de la même façon que ceux précitée ci-dessus.

Le tableau ci-dessous représente les différentes dilutions effectuées pour obtenir les différentes concentrations de ceftazidime et de pyridine pour les standards de validations.

Tableau 20 : Concentration de ceftazidime pour le standard de validation

Niveau	Concentration de ceftazidime [µg/ml]	Volume SF ceftazidime [µl]	Concentration de pyridine [µg/ml]	Volume SF pyridine [ml]	Volume total [ml]	nombre répétitions indépendantes
bas	80	800	10.0	2.0	10	3
médian	100	1000	12.5	2.5	10	3
haut	120	1200	15.0	3	10	3
haut	140	1400	17.5	3.5	10	3
blanc	-	-	-	-	1	1

Le nombre d'électrophérogrammes par les 3 jours de validation sont de 72 (3 séries à 4 niveaux à 3 répétitions indépendantes → 3 vials, et injecter 2 fois). La validation est effectuée sur 3 séries, afin de déterminer la fidélité intermédiaire.

Rapport de validation de la ceftazidime



Nom: Lina Berger
Société: HOSPICES CANTONAUX
Département: -
Phase: Validation
Numéro de référence: XXX

31 / 34

Annexe 6 - Résumé

Modèle sélectionné: Régression linéaire passant par 0 ajustée en utilisant uniquement le niveau 3

1 Fonction de réponse

Modèle sélectionné	Indice d'Exactitude	Limites inférieures et supérieures de quantifications (LOQ) (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	0.5810	[101.1 , 140.7]	1.000	0.1965	0.9982

Série	Pente	r ²	d.d.l. résiduels	SCR
1	0.5115	ND	1	0.1513
2	0.4907	ND	1	0
3	0.4895	ND	1	0.1800

2 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	101.1	101.0	-0.1041	-0.1030	99.90	[96.66 , 103.1]
2.0	120.7	119.2	-1.552	-1.286	98.71	[95.47 , 102.0]
3.0	140.7	138.9	-1.801	-1.280	98.72	[95.95 , 101.5]

3 Fidélité

Niveau de concentration (ug/ml)	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Répétabilité (CV%)	Fidélité Intermédiaire (CV%)
1.0	101.1	1.261	4.806
2.0	120.7	1.288	4.810

Identifiant d'exploitation:
ENOV-V3.0a PROD-2013139383414

e noval V3.0a PROD
Rapport v1.4 FR

19 mai 2013 14:35 (CEST)
© Ariënda 2001-2011.



Nom: Lina Berger
Société: HOSPICES CANTONNAUX
Département: -
Phase: Validation
Numéro de référence: XXX

32 / 34

Niveau de concentration (ug/ml)	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Répétabilité (CV%)	Fidélité Intermédiaire (CV%)
3.0	140.7	1.947	4.001

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	101.1	1.275	4.688	13.32	4.838
2.0	120.7	1.555	5.595	12.95	5.807
3.0	140.7	2.740	4.918	3.222	5.630

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	101.1	2.442	20.98
2.0	120.7	2.978	25.05
3.0	140.7	5.248	22.92

Niveau de concentration (ug/ml)	Série	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Concentration calculée (ug/ml)	Taux de recouvrement (%)
1.0	1	101.4	99.84	98.77
1.0	2	100.3	96.91	95.87
1.0	3	101.6	106.2	105.1
1.0	Moyenne des séries	101.1	101.0	99.90
2.0	1	120.7	115.9	95.99
2.0	2	120.1	115.9	96.02
2.0	3	121.3	125.7	104.1
2.0	Moyenne des séries	120.7	119.2	98.71
3.0	1	141.2	140.2	99.66
3.0	2	140.3	133.2	94.67
3.0	3	140.6	143.3	101.8
3.0	Moyenne des séries	140.7	138.9	98.72

Identifiant d'exploitation:
ENOV-V3.0a PROD-2013139383414

e noval V3.0a PROD
Rapport v1.4 FR

19 mai 2013 14:35 (CEST)
© Arlanda 2001-2011.



Nom: Lina Berger
Société: HOSPICES CANTONAUUX
Département: -
Phase: Validation
Numéro de référence: XXX

33 / 34

4 Incertitude de mesure

Niveau de concentration (ug/ml)	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Incertitude du biais (ug/ml)	Incertitude (ug/ml)	Incertitude étendue (ug/ml)	Incertitude relative étendue (%)
1.0	101.1	2.740	5.578	11.16	11.04
2.0	120.7	3.271	6.665	13.33	11.04
3.0	140.7	2.983	6.371	12.74	9.055

5 Exactitude

Niveau de concentration (ug/ml)	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Limites de tolérance 'Beta-expectation' (ug/ml)	Limites de tolérance 'Beta-expectation' relative (%)	Risque (%)
1.0	101.1	[78.92 , 123.0]	[-21.93 , 21.72]	3.806
2.0	120.7	[92.90 , 145.5]	[-23.05 , 20.48]	3.811
3.0	140.7	[117.7 , 160.1]	[-16.33 , 13.77]	1.433

6 Linéarité des résultats

Intercept	Slope	r ²	SCR
4.011	0.9573	0.9205	559.4

7 Limite de détection (LD) et limites de quantification (LQ)

LD (ug/ml)	LQ inférieure (ug/ml)	LQ supérieure (ug/ml)
2.441	101.1	140.7

Rapport de validation de la pyridine



Nom: Lina Berger
Société: HOSPICES CANTONNAUX
Département: -
Phase: Validation
Numéro de référence: XXX

31 / 34

Annexe 6 - Résumé

Modèle sélectionné: Régression linéaire passant par 0 ajustée en utilisant uniquement le niveau 3

1 Fonction de réponse

Modèle sélectionné	Indice d'Exactitude	Limites inférieures et supérieures de quantifications (LOQ) (ug/ml)	Indice d'Intervalle de Dosage	Indice de Fidélité	Indice de Justesse
Régression linéaire passant par 0 ajustée en utilisant uniquement le niveau 3	0.8095	[10.11 , 17.64]	1.000	0.5445	0.9743

Série	Pente	r ²	d.d.l. résiduels	SCR
1	0.4293	ND	1	0.03125
2	0.3979	ND	1	0.001250
3	0.4155	ND	1	0.001250

2 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	10.11	10.49	0.3767	3.725	103.7	[100.7 , 106.8]
2.0	15.26	15.54	0.2784	1.825	101.8	[100.7 , 102.9]
3.0	17.64	17.57	-0.06927	-0.3926	99.61	[97.52 , 101.7]

3 Fidélité

Niveau de concentration (ug/ml)	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Répétabilité (CV%)	Fidélité Intermédiaire (CV%)
1.0	10.11	3.710	4.050
2.0	15.26	1.424	1.424

Identifiant d'exploitation:
ENOV-V3.0a PROD-2013139563913

e noval V3.0a PROD
Rapport v1.4 FR

19 mai 2013 13:40 (CEST)
© Arlenda 2001-2011.



Nom: Lina Berger
Société: HOSPICES CANTONNAUX
Département: -
Phase: Validation
Numéro de référence: XXX

32 / 34

Niveau de concentration (ug/ml)	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Répétabilité (CV%)	Fidélité Intermédiaire (CV%)
3.0	17.64	1.804	2.953

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	10.11	0.3752	0.1644	0.1919	0.4097
2.0	15.26	0.2172	0	0	0.2172
3.0	17.64	0.3184	0.4125	1.679	0.5211

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	10.11	0.7187	1.248
2.0	15.26	0.3717	0.3717
3.0	17.64	0.6098	2.012

Niveau de concentration (ug/ml)	Série	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Concentration calculée (ug/ml)	Taux de recouvrement (%)
1.0	1	10.02	10.30	101.9
1.0	2	10.22	10.37	102.5
1.0	3	10.10	10.80	106.8
1.0	Moyenne des series	10.11	10.49	103.7
2.0	1	15.22	15.45	101.2
2.0	2	15.43	15.66	102.7
2.0	3	15.12	15.50	101.6
2.0	Moyenne des series	15.26	15.54	101.8
3.0	1	17.56	18.05	102.3
3.0	2	17.79	17.16	97.24
3.0	3	17.58	17.51	99.27
3.0	Moyenne des series	17.64	17.57	99.61



Nom: Lina Berger
Société: HOSPICES CANTONNAUX
Département: -
Phase: Validation
Numéro de référence: XXX

33 / 34

4 Incertitude de mesure

Niveau de concentration (ug/ml)	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Incertitude du biais (ug/ml)	Incertitude (ug/ml)	Incertitude étendue (ug/ml)	Incertitude relative étendue (%)
1.0	10.11	0.1570	0.4387	0.8774	8.676
2.0	15.26	0.07241	0.2290	0.4579	3.001
3.0	17.64	0.2607	0.5827	1.165	6.605

5 Exactitude

Niveau de concentration (ug/ml)	Moyenne des concentrations introduites (ug/ml)	Limites de tolérance 'Beta-expectation' (ug/ml)	Limites de tolérance 'Beta-expectation' relative (%)	Risque (%)
1.0	10.11	[9.444 , 11.54]	[-6.626 , 14.08]	2.036
2.0	15.26	[15.00 , 16.07]	[-1.658 , 5.308]	0.001633
3.0	17.64	[15.84 , 19.31]	[-10.21 , 9.424]	1.505

6 Linéarité des résultats

Intercept	Slope	r ²	SCR
0.9528	0.9472	0.9846	3.742

7 Limite de détection (LD) et limites de quantification (LQ)

LD (ug/ml)	LQ inférieure (ug/ml)	LQ supérieure (ug/ml)
0.5857	10.11	17.64

Annexe 11 : Données brutes du dosage de la ceftazidime et de la pyridine à 4°C par HPLC et CE respectivement

	Temps de rétention pyridine [min]	Aire pyridine [mAu]	Temps de rétention ceftazidime [min]	Aire ceftazidime [mAu]
Cefta_t0h_a_4°C			13.491	182390304
Cefta_t0h_a_4°C			13.377	182324208
Cefta_t0h_b_4°C			13.336	183554000
Cefta_t0h_b_4°C			13.251	183468848
Cefta_1_t12h_a_4°C	5.273	1705282	13.213	180426896
Cefta_1_t12h_a_4°C	5.289	1724791	13.241	181295072
Cefta_1_t12h_b_4°C	5.280	1719716	13.489	180888960
Cefta_1_t12h_b_4°C	5.276	1734785	12.968	181100016
Cefta_1_t24h_a_4°C	5.293	1869720	12.773	175789504
Cefta_1_t24h_a_4°C	5.285	1878189	12.785	175184960
Cefta_1_t24h_b_4°C	5.277	1858576	12.787	178103552
Cefta_1_t24h_b_4°C	5.283	1869655	12.739	177768848
Cefta_2_t12h_a_4°C	-	-	12.705	183884784
Cefta_2_t12h_a_4°C	5.280	1769710	12.661	182914496
Cefta_2_t12h_b_4°C	5.276	1777036	12.643	181693952
Cefta_2_t12h_b_4°C	5.267	1786539	12.601	181775696
Cefta_2_t24h_a_4°C	5.281	1914559	12.616	177964816
Cefta_2_t24h_a_4°C	5.265	1908630	12.577	177553664
Cefta_2_t24h_b_4°C	5.275	1908704	12.640	175818544
Cefta_2_t24h_b_4°C	5.271	1919434	12.629	-
Cefta_3_t12h_a_4°C	5.265	1931053	12.648	-
Cefta_3_t12h_a_4°C	5.277	1925836	12.672	186751488
Cefta_3_t12h_b_4°C	5.268	1925153	12.657	189686432
Cefta_3_t12h_b_4°C	5.280	1933148	12.580	189551264
Cefta_3_t24h_a_4°C	5.272	1933232	12.676	179076992
Cefta_3_t24h_a_4°C	5.264	1939372	12.531	178156672
Cefta_3_t24h_b_4°C	5.275	1950253	12.533	-
Cefta_3_t24h_b_4°C	5.260	1944227	12.512	-

	Temps de rétention pyridine [min]	Aire pyridine [mAu]	Temps de rétention ceftazidime [min]	Aire ceftazidime [mAu]
Cefta_t0h_a_4	2.936	1.8	4.010	64.9
Cefta_t0h_a_4	2.934	1.9	3.858	63.2
Cefta_1_t12h_a_4	2.932	1.9	3.836	60.8
Cefta_1_t12h_a_4	2.931	1.8	3.812	57.4
Cefta_1_t24h_a_4	2.935	1.3	3.821	58.7
Cefta_1_t24h_a_4	3.188	1.4	3.809	63.7
Cefta_2_t12h_a_4	3.220	4.0	3.808	61.0
Cefta_2_t12h_a_4	3.112	3.4	3.809	59.3
Cefta_2_t24h_a_4	3.117	3.7	3.806	65.2
Cefta_2_t24h_a_4	3.130	3.7	3.808	64.0
Cefta_3_t12h_a_4	3.123	3.2	3.809	57.9
Cefta_3_t12h_a_4	3.122	3.3	3.811	7.9
Cefta_3_t24h_a_4	3.122	3.4	3.812	62.8
Cefta_3_t24h_a_4	3.115	3.4	3.810	61.5

Annexe 12 : Données brutes du dosage de la ceftazidime et de la pyridine à 25°C par HPLC et CE respectivement

	Temps de rétention pyridine [min]	Aire pyridine [mAu]	Temps de rétention ceftazidime [min]	Aire ceftazidime [mAu]
Cefta_t0h_a_25	-	-	13.489	196988256
Cefta_t0h_a_25	-	-	13.523	196370512
Cefta_t0h_b_25	-	-	13.488	196428912
Cefta_t0h_b_25		-	13.431	196934496
Cefta_1_t12h_a_25	5.313	5054364	13.452	187346112
Cefta_1_t12h_a_25	5.309	5017090	13.424	187351664
Cefta_1_t12h_b_25	5.340	5034954	13.435	185198656
Cefta_1_t12h_b_25	5.323	5030015	13.376	185603232
Cefta_1_t24h_a_25	5.317	9364466	13.365	184062432
Cefta_1_t24h_a_25	5.315	9290974	13.336	184840960
Cefta_1_t24h_b_25	5.325	9380982	13.200	184456304
Cefta_1_t24h_b_25	5.320	9330714	13.189	184102896
Cefta_2_t12h_a_25	5.327	4970647	13.219	186428640
Cefta_2_t12h_a_25	5.337	4999079	13.221	187344000
Cefta_2_t12h_b_25	5.317	5007423	13.208	185082032
Cefta_2_t12h_b_25	5.328	4955695	13.151	185756384
Cefta_2_t24h_a_25	5.317	9135208	13.219	182239984
Cefta_2_t24h_a_25	5.331	9074642	13.261	180947440
Cefta_2_t24h_b_25	5.333	9162399	13.229	183131072
Cefta_2_t24h_b_25	5.324	9068543	13.201	183396736
Cefta_3_t12h_a_25	5.328	5117966	13.221	182876336
Cefta_3_t12h_a_25	5.345	5106104	13.128	182935680
Cefta_3_t12h_b_25	5.335	5179992	12.947	184757520
Cefta_3_t12h_b_25	5.347	5178437	12.877	185276656
Cefta_3_t24h_a_25	5.339	9396110	12.795	182797072
Cefta_3_t24h_a_25	5.337	9387372	12.764	182908224
Cefta_3_t24h_b_25	5.332	9464798	12.709	182618640
Cefta_3_t24h_b_25	5.351	9449395	12.720	183342416

	Temps de rétention pyridine [min]	Aire pyridine [mAu]	Temps de rétention ceftazidime [min]	Aire ceftazidime [mAu]
Cefta_t0h_25	2.996	2.7	3.846	289.4
Cefta_t0h_25	3.003	2.7	3.828	146.6
Cefta_1_t12h_a_25	3.106	7.6	3.825	117.8
Cefta_1_t12h_a_25	3.018	7.5	3.827	106.8
Cefta_1_t24h_a_25	3.017	12.4	3.790	75.4
Cefta_1_t24h_a_25	3.014	12.3	3.786	67.2
Cefta_2_t12h_a_25	3.018	6.6	3.786	66.8
Cefta_2_t12h_a_25	3.016	6.4	3.785	65.1
Cefta_2_t24h_a_25	3.011	12.3	3.778	63.1
Cefta_2_t24h_a_25	3.007	12.0	3.778	60.7
Cefta_3_t12h_a_25	3.008	6.2	3.776	64.6
Cefta_3_t12h_a_25	3.005	6.3	3.777	64.2
Cefta_3_t24h_a_25	3.045	1.6	3.779	64.2
Cefta_3_t24h_a_25	3.048	1.0	3.784	81.5

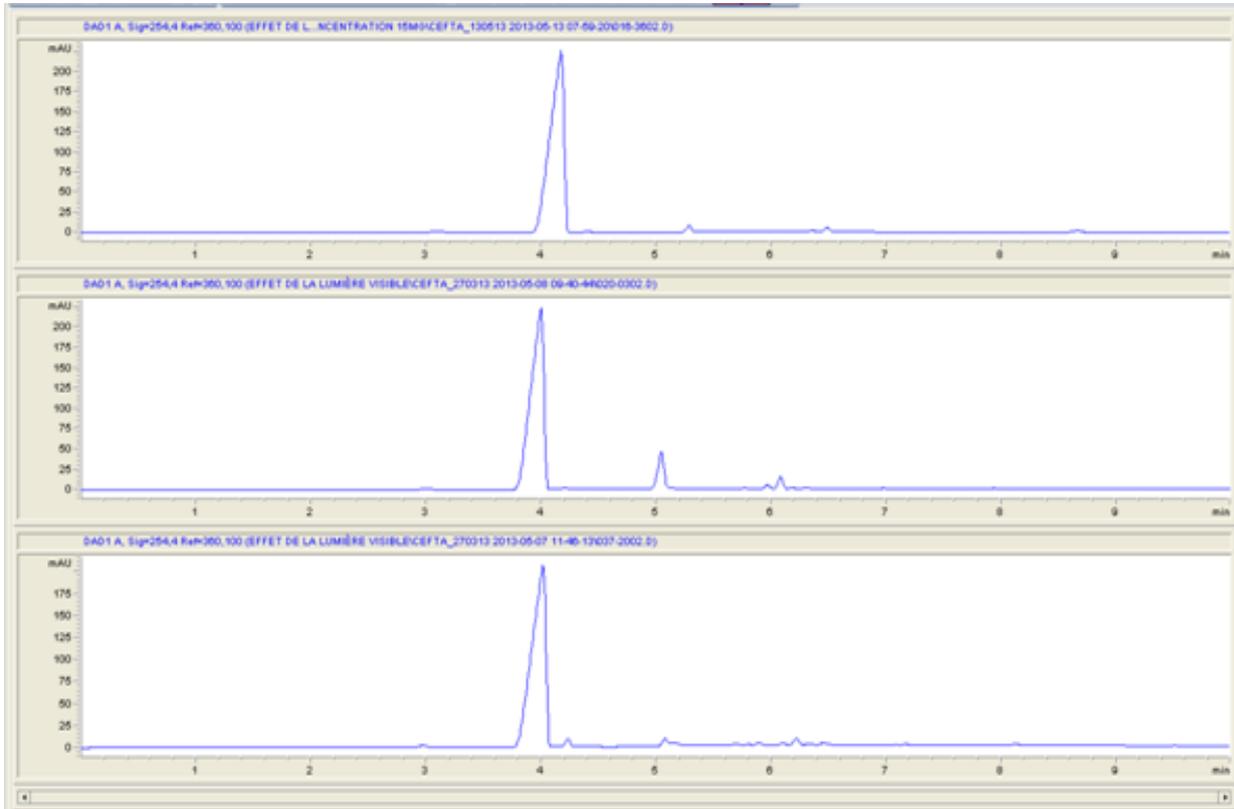
Annexe 13 : Données brutes du dosage de la ceftazidime et de la pyridine à 30°C par HPLC et CE

	Temps de rétention pyridine [min]	Aire pyridine [mAu]	Temps de rétention ceftazidime [min]	Aire ceftazidime [mAu]
Cefta_t0h_a_30	-	-	12.885	86721080
Cefta_t0h_a_30	-	-	12.940	87094784
Cefta_t0h_b_30	-	-	12.881	87411232
Cefta_t0h_b_30	-	-	12.951	87374208
Cefta_1_t12h_a_30	5.188	6307738	12.945	80794648
Cefta_1_t12h_a_30	5.201	6288131	12.905	80851544
Cefta_1_t12h_b_30	5.200	6305989	12.965	80010392
Cefta_1_t12h_b_30	5.211	6330405	12.927	-
Cefta_1_t24h_a_30	5.200	10924889	13.051	76470968
Cefta_1_t24h_a_30	5.199	10868688	13.149	76510600
Cefta_1_t24h_b_30	5.192	10950035	13.109	75874640
Cefta_1_t24h_b_30	5.208	10966896	13.188	75822568
Cefta_2_t12h_a_30	5.215	6312630	13.212	76813080
Cefta_2_t12h_a_30	5.217	6226635	13.193	78940824
Cefta_2_t12h_b_30	5.212	6357627	13.271	79475800
Cefta_2_t12h_b_30	5.219	6343017	13.251	79113808
Cefta_2_t24h_a_30	5.211	11060820	13.313	74609280
Cefta_2_t24h_a_30	5.215	11068354	13.347	74586744
Cefta_2_t24h_b_30	5.227	11078619	13.387	73708624
Cefta_2_t24h_b_30	5.224	10996610	-	74361968
Cefta_3_t12h_a_30	5.204	6298585	13.229	79000416
Cefta_3_t12h_a_30	5.201	6317267	-	78781248
Cefta_3_t12h_b_30	5.236	6322483	13.331	78940416
Cefta_3_t12h_b_30	5.228	6309205	13.341	79258848
Cefta_3_t24h_a_30	5.203	11092890	13.371	72644528
Cefta_3_t24h_a_30	5.217	11039898	13.361	72601192
Cefta_3_t24h_b_30	5.203	11285806	-	72539984
Cefta_3_t24h_b_30	5.213	11281933	-	72902856

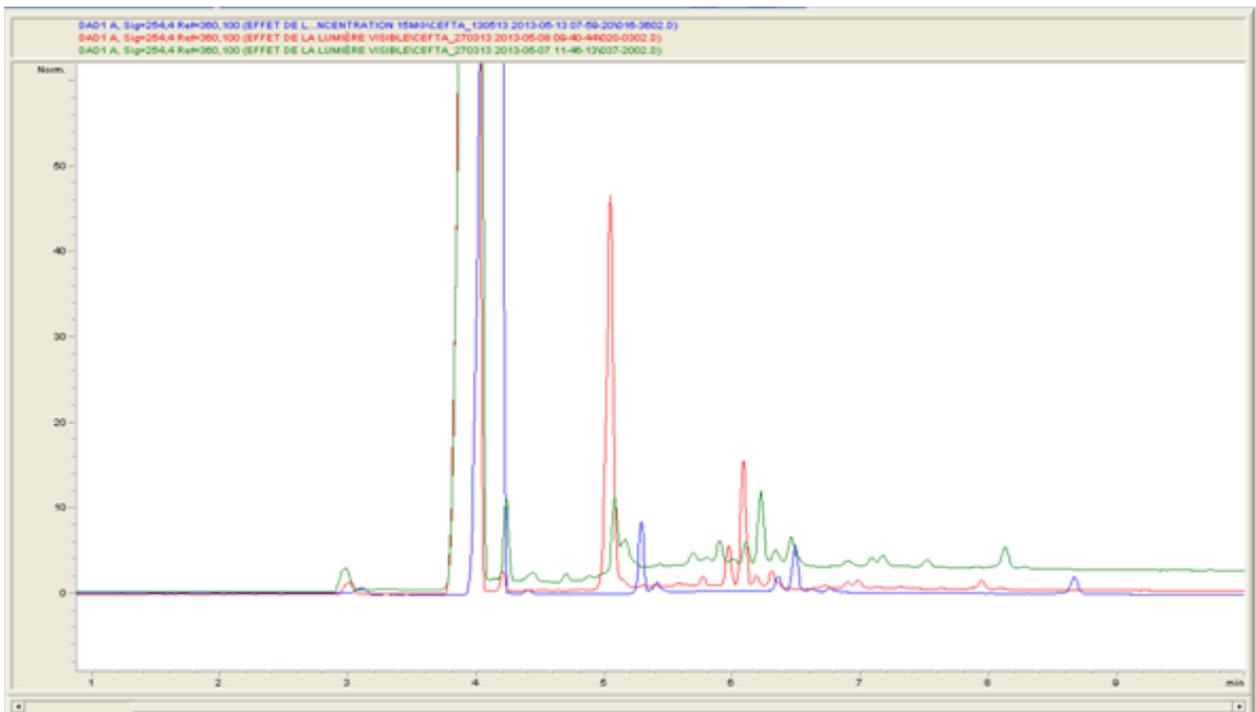
	Temps de rétention pyridine [min]	Aire pyridine [mAu]	Temps de rétention ceftazidime [min]	Aire ceftazidime [mAu]
Cefta_t0h_a_30	3.001	3.9	3.867	61.7
Cefta_t0h_a_30	3.091	4.2	3.880	82.4
Cefta_1_t12h_a_30	2.992	8.9	3.844	61.6
Cefta_1_t12h_a_30	3.088	8.9	3.845	59.0
Cefta_1_t24h_a_30	3.083	14.4	3.856	54.9
Cefta_1_t24h_a_30	2.993	14.0	3.861	44.9
Cefta_2_t12h_a_30	3.076	8.7	3.850	66.6
Cefta_2_t12h_a_30	2.988	9.1	3.851	66.4
Cefta_2_t24h_a_30	2.983	14.8	3.848	59.3
Cefta_2_t24h_a_30	2.982	14.1	3.853	57.5
Cefta_3_t12h_a_30	2.981	8.6	3.855	63.8
Cefta_3_t12h_a_30	2.981	8.7	3.858	62.8
Cefta_3_t24h_a_30	2.978	14.1	3.861	60.9
Cefta_3_t24h_a_30	2.975	14.0	4.055	54.2

Annexe 14 : Electrophérogrammes à 4, 25 et 30°C après 24 heures d'exposition

La figure ci-dessous représente trois exemples de spectres à 4, 25 et 30°C.



Les figures ci-dessous représentent les électrophérogrammes en fonction de la température à 4°C (bleu), 25°C (rouge) et à 30°C (vert).



Annexe 15 : Données brutes du dosage de la ceftazidime et de la pyridine à 15 mg/ml par HPLC et CE respectivement

	Temps de rétention pyridine [min]	Aire pyridine [mAu]	Temps de rétention ceftazidime [min]	Aire ceftazidime [mAu]
Cefta_t0h_a_15mg/ml	-	-	12.321	201758336
Cefta_t0h_a_15mg/ml	-	-	12.273	202975024
Cefta_t0h_b_15mg/ml	-	-	12.219	203136688
Cefta_t0h_b_15mg/ml	-	-	12.163	203869792
Cefta_1_t12h_a_15mg/ml	5.260	2031672	12.135	191638112
Cefta_1_t12h_a_15mg/ml	5.239	2023626	12.100	191604928
Cefta_1_t12h_b_15mg/ml	5.231	2070347	12.400	187884944
Cefta_1_t12h_b_15mg/ml	5.252	2108471	-	189838288
Cefta_1_t24h_a_15mg/ml	5.247	3526437	12.479	184745056
Cefta_1_t24h_a_15mg/ml	5.243	3516030	12.544	186019984
Cefta_1_t24h_b_15mg/ml	5.257	3489113	12.593	181114432
Cefta_1_t24h_b_15mg/ml	5.256	3428831	12.613	180933632
Cefta_2_t12h_a_15mg/ml	5.253	2164022	12.645	194146704
Cefta_2_t12h_a_15mg/ml	5.253	2171034	12.672	194729808
Cefta_2_t12h_b_15mg/ml	5.267	2189101	12.643	194154960
Cefta_2_t12h_b_15mg/ml	5.259	2181765	12.683	194654608
Cefta_2_t24h_a_15mg/ml	5.268	3447958	12.705	189848784
Cefta_2_t24h_a_15mg/ml	5.264	3480768	12.707	190138032
Cefta_2_t24h_b_15mg/ml	5.260	3472731	12.753	193971104
Cefta_2_t24h_b_15mg/ml	5.268	3446371	12.772	195011728
Cefta_3_t12h_a_15mg/ml	5.265	2133866	12.780	190178176
Cefta_3_t12h_a_15mg/ml	5.267	2145017	12.783	189291136
Cefta_3_t12h_b_15mg/ml	5.279	2120009	12.812	192239680
Cefta_3_t12h_b_15mg/ml	5.272	2119587	12.819	193924608
Cefta_3_t24h_a_15mg/ml	5.271	3414757	12.857	190183712
Cefta_3_t24h_a_15mg/ml	5.265	3436930	12.859	189906112
Cefta_3_t24h_b_15mg/ml	5.279	3448808	12.880	189266704
Cefta_3_t24h_b_15mg/ml	5.273	3436662	12.911	189674976

	Temps de rétention pyridine [min]	Aire pyridine [mAu]	Temps de rétention ceftazidime [min]	Aire ceftazidime [mAu]
Cefta_t0h_15mg/ml	2.986	1.7	3.833	55.7
Cefta_t0h_15mg/ml	2.983	1.5	4.001	28.4
Cefta_1_t12h_a_15mg/ml	2.991	2.9	3.971	51.4
Cefta_1_t12h_a_15mg/ml	2.994	2.8	3.809	50.7
Cefta_1_t24h_a_15mg/ml	-	-	3.976	25.0
Cefta_1_t24h_a_15mg/ml	-	-	3.994	27.5
Cefta_2_t12h_a_15mg/ml	-	-	3.979	42.0
Cefta_2_t12h_a_15mg/ml	3.108	2.2	3.978	37.5
Cefta_2_t24h_a_15mg/ml	3.043	2.9	3.843	23.4
Cefta_2_t24h_a_15mg/ml	-	-	3.987	30.7
Cefta_3_t12h_a_15mg/ml	3.019	1.8	3.828	52.2
Cefta_3_t12h_a_15mg/ml	3.105	2.4	3.830	51.7
Cefta_3_t24h_a_15mg/ml	3.113	3.1	3.990	29.5
Cefta_3_t24h_a_15mg/ml	3.118	2.6	3.835	28.1

Annexe 16 : Données brutes du dosage de la ceftazidime et de la pyridine à 120 mg/ml par HPLC et CE respectivement

	Temps de rétention pyridine [min]	Aire pyridine [mAu]	Temps de rétention ceftazidime [min]	Aire ceftazidime [mAu]
Cefta_t0h_a_120mg/ml	-	-	12.567	392371904
Cefta_t0h_a_120mg/ml	-	-	12.447	391186016
Cefta_t0h_b_120mg/ml	-	-	12.484	390835360
Cefta_t0h_b_120mg/ml	-	-	12.531	393671040
Cefta_1_t12h_a_120mg/ml	5.229	11518617	12.58	383939488
Cefta_1_t12h_a_120mg/ml	5.241	11512821	12.611	382843968
Cefta_1_t12h_b_120mg/ml	5.244	11596846	12.639	383503520
Cefta_1_t12h_b_120mg/ml	5.239	11423379	12.672	383334336
Cefta_1_t24h_a_120mg/ml	5.223	19978710	12.672	391367264
Cefta_1_t24h_a_120mg/ml	5.231	19957984	12.679	394844352
Cefta_1_t24h_b_120mg/ml	5.227	19944880	12.693	390951072
Cefta_1_t24h_b_120mg/ml	5.223	19890084	12.708	391586816
Cefta_2_t12h_a_120mg/ml	5.241	11351493	12.701	398286208
Cefta_2_t12h_a_120mg/ml	5.247	11522402	12.736	400077632
Cefta_2_t12h_b_120mg/ml	5.241	11519222	12.757	396264160
Cefta_2_t12h_b_120mg/ml	5.239	11405181	12.775	395101888
Cefta_2_t24h_a_120mg/ml	5.228	19544776	12.835	364126112
Cefta_2_t24h_a_120mg/ml	5.248	19506532	12.843	364624576
Cefta_2_t24h_b_120mg/ml	5.245	19508088	12.847	365082688
Cefta_2_t24h_b_120mg/ml	5.24	19363532	12.867	363369152
Cefta_3_t12h_a_120mg/ml	5.244	11235810	12.855	385702144
Cefta_3_t12h_a_120mg/ml	5.251	11263204	12.871	383415424
Cefta_3_t12h_b_120mg/ml	5.255	11290068	12.871	388404320
Cefta_3_t12h_b_120mg/ml	5.247	11315441	12.888	385597600
Cefta_3_t24h_a_120mg/ml	5.235	19621872	12.913	364820256
Cefta_3_t24h_a_120mg/ml	5.237	19327788	12.909	364327008
Cefta_3_t24h_b_120mg/ml	5.237	19587212	12.947	368664864
Cefta_3_t24h_b_120mg/ml	5.253	19639026	12.928	369221120

	Temps de rétention pyridine [min]	Aire pyridine [mAu]	Temps de rétention ceftazidime [min]	Aire ceftazidime [mAu]
t0	2.973	1.6	3.836	952.3
t0	2.971	1.3	3.845	925.3
Cefta_1_t12h_120mg/ml	2.969	3.2	3.950	150.4
Cefta_1_t12h_120mg/ml	2.972	3.2	3.950	148.5
Cefta_1_t24h_120mg/ml	3.008	10.7	3.912	562.6
Cefta_1_t24h_120mg/ml	3.008	9.0	3.916	606.7
Cefta_2_t12h_120mg/ml	2.977	2.1	3.936	765.7
Cefta_2_t12h_120mg/ml	2.980	-	3.943	741.5
Cefta_2_t24h_120mg/ml	3.008	13.7	3.893	299.9
Cefta_2_t24h_120mg/ml	-	13.4	3.896	289.8
Cefta_3_t12h_120mg/ml	2.985	5.2	3.940	564.3
Cefta_3_t12h_120mg/ml	2.981	4.8	3.959	562.2
Cefta_3_t24h_120mg/ml	2.975	14.5	4.076	259.1
Cefta_3_t24h_120mg/ml	2.975	14.5	4.083	253.0

Annexe 17 : Données brutes du dosage de la ceftazidime et de la pyridine en fonction de la lumière UV par HPLC

	Temps de rétention pyridine [min]	Aire pyridine [mAu]	Temps de rétention ceftazidime [min]	Aire ceftazidime [mAu]
Cefta_t0h_a_UV	-	-	13.239	191875008
Cefta_t0h_a_UV	-	-	13.239	191493440
Cefta_t0h_b_UV	-	-	13.264	191933056
Cefta_t0h_b_UV	-	-	13.297	192290832
Cefta_t0h_b_UV	-	-	13.292	-
Cefta_1_t12h_a_UV	5.263	3287813	13.293	194270256
Cefta_1_t12h_a_UV	5.245	3301572	13.316	194941648
Cefta_1_t12h_b_UV	5.253	3273933	13.311	193048928
Cefta_1_t12h_b_UV	5.240	3269045	13.319	193011808
Cefta_1_t24h_a_UV	5.249	5593375	13.360	176783808
Cefta_1_t24h_a_UV	5.244	5613031	13.356	176159008
Cefta_1_t24h_b_UV	5.253	5538788	13.368	176549344
Cefta_1_t24h_b_UV	5.251	5545132	13.384	175975536
Cefta_2_t12h_a_UV	5.261	3289337	13.379	190654464
Cefta_2_t12h_a_UV	5.247	3334197	13.397	190205360
Cefta_2_t12h_b_UV	5.245	3383437	13.400	191065248
Cefta_2_t12h_b_UV	5.249	3377144	13.409	192127360
Cefta_2_t24h_a_UV	5.241	5616321	13.411	176506688
Cefta_2_t24h_a_UV	5.263	5580240	13.396	176624656
Cefta_2_t24h_b_UV	5.268	5632164	13.388	177286224
Cefta_2_t24h_b_UV	5.253	5654705	-	-
Cefta_3_t12h_a_UV	5.244	3393827	-	190272288
Cefta_3_t12h_a_UV	5.241	3345715	12.237	-
Cefta_3_t12h_b_UV	5.235	3404570	12.304	190459536
Cefta_3_t12h_b_UV	5.251	3374604	12.264	190390672
Cefta_3_t24h_a_UV	5.237	5684913	12.193	175846016
Cefta_3_t24h_a_UV	5.245	5645244	12.191	173377872
Cefta_3_t24h_b_UV	5.271	5630035	-	-
Cefta_3_t24h_b_UV	5.256	5734918	-	-

Annexe 18 : Données brutes de dosage de la ceftazidime et de la pyridine en fonction de la lumière visible par HPLC et CE respectivement

	Temps de rétention pyridine [min]	Aire pyridine [mAu]	Temps de rétention ceftazidime [min]	Aire ceftazidime [mAu]
Cefta_t0h_a_vis	-	-	13.187	191393264
Cefta_t0h_a_vis	-	-	13.301	191008528
Cefta_t0h_b_vis	-	-	13.184	191099472
Cefta_t0h_b_vis	-	-	13.275	191274176
Cefta_1_t12h_a_vis	5.255	2874093	13.339	183923456
Cefta_1_t12h_a_vis	5.268	2873882	13.312	184796288
Cefta_1_t12h_b_vis	5.257	2866674	13.300	184304256
Cefta_1_t12h_b_vis	5.272	2862062	13.268	184243424
Cefta_1_t24h_a_vis	5.248	4525543	13.285	186604528
Cefta_1_t24h_a_vis	5.263	4498750	13.233	187175616
Cefta_1_t24h_b_vis	5.265	449498	13.117	187609792
Cefta_1_t24h_b_vis	5.253	4531413	13.121	187537120
Cefta_2_t12h_a_vis	5.253	2915250	13.228	183204032
Cefta_2_t12h_a_vis	5.257	2925313	13.179	183020704
Cefta_2_t12h_b_vis	5.268	2989818	13.224	183791808
Cefta_2_t12h_b_vis	5.271	2928965	13.237	183558032
Cefta_2_t24h_a_vis	5.241	4536235	13.168	187814560
Cefta_2_t24h_a_vis	5.272	4608161	12.955	188900688
Cefta_2_t24h_b_vis	5.251	4643318	-	-
Cefta_2_t24h_b_vis	5.263	4556301	13.216	187422992
Cefta_3_t12h_a_vis	5.269	2930435	12.892	182625504
Cefta_3_t12h_a_vis	5.276	2930062	12.836	183125744
Cefta_3_t12h_b_vis	5.265	2930862	12.793	184996896
Cefta_3_t12h_b_vis	5.273	2911276		
Cefta_3_t24h_a_vis	5.244	4497984	12.795	189127968
Cefta_3_t24h_a_vis	5.268	4508048	12.772	189800208
Cefta_3_t24h_b_vis	5.247	4514744	12.836	189936040
Cefta_3_t24h_b_vis	5.256	4495722	12.749	189510992

	Temps de rétention pyridine [min]	Aire pyridine [mAu]	Temps de rétention ceftazidime [min]	Aire ceftazidime [mAu]
Cefta_t0h_vis	3.099	2.6	3.963	85.3
Cefta_t0h_vis	-	-	3.981	89.5
Cefta_1_t12h_a_vis	3.098	4.5	3.972	81.4
Cefta_1_t12h_a_vis	3.012	4.0	3.973	70.2
Cefta_1_t24h_a_vis	3.096	7.2	3.950	64.6
Cefta_1_t24h_a_vis	3.096	6.8	3.965	61.4
Cefta_2_t12h_a_vis	2.940	2.7	3.965	64.0
Cefta_2_t12h_a_vis	-	-	3.965	63.3
Cefta_2_t24h_a_vis	3.076	7.7	3.953	63.2
Cefta_2_t24h_a_vis	3.080	7.5	3.977	62.2
Cefta_3_t12h_a_vis	3.120	1.9	3.990	55.5
Cefta_3_t12h_a_vis	3.127	1.7	3.827	62.5
Cefta_3_t24h_a_vis	3.007	5.4	3.830	63.2
Cefta_3_t24h_a_vis	3.114	3.9	4.001	62.3

Annexe 19 : Données brutes du dosage de la ceftazidime et de la pyridine à pH 1.38 par HPLC et CE respectivement

	Temps de rétention pyridine [min]	Aire pyridine [mAu]	Temps de rétention ceftazidime [min]	Aire ceftazidime [mAu]
Cefta_to_pH1.38 av	5.2280	1181841	13.712	202846224
Cefta_to_pH1.38 av	5.2070	1184937	13.713	202897344
Cefta_to_pH1.38 av	5.2110	1196134	13.684	203886768
Cefta_to_pH1.38 av	5.2040	1151447	13.824	198289120
Cefta_to_pH1.38	5.2150	1812250	13.877	170905280
Cefta_to_pH1.38	5.2080	1826955	13.735	174189648
Cefta_to_pH1.38	5.2030	1821784	13.595	176034320
Cefta_to_pH1.38	5.2110	10177350	13.725	173072720
Cefta_1_t12_a_pH1.38	5.2080	10164490	13.712	157716272
Cefta_1_t12_a_pH1.38	5.2030	10219258	13.723	158192480
Cefta_1_t12_b_pH1.38	5.1990	10206849	13.629	159328640
Cefta_1_t12_b_pH1.38	5.1987	10206849	13.643	159589088
Cefta_1_t24_a_pH1.38	5.1920	17784416	13.613	148667680
Cefta_1_t24_a_pH1.38	5.2080	17770584	13.583	148952416
Cefta_1_t24_b_pH1.38	5.1707	8914688	13.473	147787968
Cefta_1_t24_b_pH1.38	5.2070	8902745	13.459	147811408
Cefta_2_t12_a_pH1.38	5.2120	10136415	13.507	165564736
Cefta_2_t12_a_pH1.38	5.2080	10146835	13.505	165242000
Cefta_2_t12_b_pH1.38	5.2130	10146207	13.508	163968912
Cefta_2_t12_b_pH1.38	5.2030	10138104	13.416	162763920
Cefta_2_t24_a_pH1.38	5.1867	18113642	13.340	152644992
Cefta_2_t24_a_pH1.38	5.1933	18090774	13.432	151478736
Cefta_2_t24_b_pH1.38	5.1880	18097696	13.437	152216864
Cefta_2_t24_b_pH1.38	5.1787	18067508	13.480	151917728
Cefta_3_t12_a_pH1.38	5.1893	10315997	13.395	164827808
Cefta_3_t12_a_pH1.38	5.1773	10292471	13.347	165001408
Cefta_3_t12_b_pH1.38	5.1827	10286703	13.316	164812368
Cefta_3_t12_b_pH1.38	5.1813	10328314	13.332	164985328
Cefta_3_t24_a_pH1.38	5.1800	18170566	13.272	154401968
Cefta_3_t24_a_pH1.38	5.1880	18122830	13.304	153502560
Cefta_3_t24_b_pH1.38	5.1800	18120194	13.268	153771040
Cefta_3_t24_b_pH1.38	5.1573	18077134	13.264	154353680

	Temps de rétention pyridine [min]	Aire pyridine [mAu]	Temps de rétention ceftazidime [min]	Aire ceftazidime [mAu]
Cefta_to_pH1.38 av	2.977	3.1	3.798	80.2
Cefta_to_pH1.38 av	2.976	3.1	3.798	70.4
Cefta_to_pH1.38	2.965	4.3	3.797	61.3
Cefta_to_pH1.38	2.961	4.3	3.798	60.8
Cefta_1_t12_a_pH1.38	2.953	13.9	3.796	57.0
Cefta_1_t12_a_pH1.38	2.953	13.8	3.798	57.0
Cefta_1_t24_a_pH1.38	2.948	22.5	3.803	49.9
Cefta_1_t24_a_pH1.38	2.948	22.3	3.807	49.6
Cefta_2_t12_a_pH1.38	2.946	13.6	3.802	57.2
Cefta_2_t12_a_pH1.38	2.942	13.5	3.800	56.5
Cefta_2_t24_a_pH1.38	2.941	22.2	3.800	52.3
Cefta_2_t24_a_pH1.38	2.942	22.0	3.803	50.9
Cefta_3_t12_a_pH1.38	2.943	13.1	3.799	54.2
Cefta_3_t12_a_pH1.38	2.943	13.1	3.796	53.9
Cefta_3_t24_a_pH1.38	2.942	21.6	3.798	48.0
Cefta_3_t24_a_pH1.38	2.942	21.5	3.797	48.0

Annexe 20 : Données brutes du dosage de la ceftazidime et de la pyridine à pH 6.8 par HPLC et CE respectivement

	Temps de rétention pyridine [min]	Aire pyridine [mAu]	Temps de rétention ceftazidime [min]	Aire ceftazidime [mAu]
Cefta_to_pH6.8	5.205	1379447	13.765	209844816
Cefta_to_pH6.8	5.211	1413001	13.792	207992800
Cefta_to_pH6.8	5.211	1412229	13.796	206274704
Cefta_to_pH6.8	5.215	1408122	13.820	206012560
Cefta_1_t12_a_pH6.8	5.197	4974960	13.807	210432448
Cefta_1_t12_a_pH6.8	5.219	4987983	13.791	213027552
Cefta_1_t12_b_pH6.8	5.213	4994813	13.728	214538880
Cefta_1_t12_b_pH6.8	5.207	5014550	13.711	215123120
Cefta_1_t24_a_pH6.8	5.207	8774030	13.769	197453664
Cefta_1_t24_a_pH6.8	5.211	8783740	13.783	196955920
Cefta_1_t24_b_pH6.8	5.201	4365961	13.787	195299824
Cefta_1_t24_b_pH6.8	5.187	4380593	13.799	195308496
Cefta_2_t12_a_pH6.8	5.193	4954203	13.779	203816400
Cefta_2_t12_a_pH6.8	5.223	4964830	13.775	204415840
Cefta_2_t12_b_pH6.8	5.195	4979803	13.781	205168000
Cefta_2_t12_b_pH6.8	5.187	4984846	13.755	206493408
Cefta_2_t24_a_pH6.8	5.211	8582110	13.759	197103456
Cefta_2_t24_a_pH6.8	5.189	8575672	13.753	198217248
Cefta_2_t24_b_pH6.8	5.180	8682961	13.759	195679584
Cefta_2_t24_b_pH6.8	5.172	8628462	13.761	196225904
Cefta_3_t12_a_pH6.8	5.209	5063867	13.705	209467680
Cefta_3_t12_a_pH6.8	5.189	5042136	13.713	212172464
Cefta_3_t12_b_pH6.8	5.189	5063312	13.725	207437024
Cefta_3_t12_b_pH6.8	5.185	4994652	13.707	207929904
Cefta_3_t24_a_pH6.8	5.192	8162529	13.736	195182400
Cefta_3_t24_a_pH6.8	5.187	8172262	13.732	195369776
Cefta_3_t24_b_pH6.8	5.184	8105382	13.745	195261984
Cefta_3_t24_b_pH6.8	5.185	8110545	13.735	195780128

	Temps de rétention pyridine [min]	Aire pyridine [mAu]	Temps de rétention ceftazidime [min]	Aire ceftazidime [mAu]
Cefta_to_pH6.8	3.088	3.2	3.818	71.2
Cefta_to_pH6.8	3.058	3.2	3.839	65.8
Cefta_1_t12_a_pH6.8	3.008	7.1	3.960	66.7
Cefta_1_t12_a_pH6.8	3.008	7.0	3.830	63.5
Cefta_1_t24_a_pH6.8	3.053	11.4	3.831	62.1
Cefta_1_t24_a_pH6.8	2.983	11.1	3.836	62.1
Cefta_2_t12_a_pH6.8	2.994	6.7	3.836	63.7
Cefta_2_t12_a_pH6.8	2.990	6.6	3.997	62.3
Cefta_2_t24_a_pH6.8	2.991	10.6	3.994	65.7
Cefta_2_t24_a_pH6.8	3.040	11.3	3.836	61.7
Cefta_3_t12_a_pH6.8	3.050	6.9	3.836	62.0
Cefta_3_t12_a_pH6.8	2.988	7.0	3.824	62.9
Cefta_3_t24_a_pH6.8	2.981	11.4	4.005	55.8
Cefta_3_t24_a_pH6.8	2.984	11.1	3.976	64.7

Annexe 21 : Données brutes du dosage de la ceftazidime et de la pyridine à pH 12.7 par HPLC

	Temps de rétention pyridine [min]	Aire pyridine [mAu]	Temps de rétention ceftazidime [min]	Aire ceftazidime [mAu]
Cefta_to_pH12.7 av	5.112	871321	13.540	136978304
Cefta_to_pH12.7 av	5.116	903483	13.569	137564064
Cefta_to_pH12.7 av	5.129	925148	13.571	137482736
Cefta_to_pH12.7 av	5.125	907716	13.592	137506128
Cefta_to_pH12.7	5.125	134475776	14.420	7471417
Cefta_to_pH12.7	5.124	133891984	14.420	6150907
Cefta_to_pH12.7	5.120	134070816	14.380	6682825
Cefta_to_pH12.7	5.131	134000176	14.403	9718145
Cefta_1_t12_a_pH12.7	5.127	132939984	14.403	6192033
Cefta_1_t12_a_pH12.7	5.123	132932912	14.271	7356234
Cefta_1_t12_b_pH12.7	5.135	132678384	14.257	8205875
Cefta_1_t12_b_pH12.7	5.128	132677728	14.408	5496347
Cefta_1_t24_a_pH12.7	5.129	133858096	14.452	4707757
Cefta_1_t24_a_pH12.7	5.125	133321672	14.429	4250134
Cefta_1_t24_b_pH12.7	5.119	133420416	14.325	7139302
Cefta_1_t24_b_pH12.7	5.105	133074768	14.465	4527925
Cefta_2_t12_a_pH12.7	5.103	134254064	14.479	4467415
Cefta_2_t12_a_pH12.7	5.132	134136448	14.488	3633258
Cefta_2_t12_b_pH12.7	5.127	134294576	14.495	3571306
Cefta_2_t12_b_pH12.7	5.124	134159320	14.387	4187854
Cefta_2_t24_a_pH12.7	5.141	133508744	14.501	4119396
Cefta_2_t24_a_pH12.7	5.116	133873048	14.493	3313577
Cefta_2_t24_b_pH12.7	5.111	133563416	14.391	5804263
Cefta_2_t24_b_pH12.7	5.127	133019552	14.508	3947882
Cefta_3_t12_a_pH12.7	5.208	134219136	14.488	3544652
Cefta_3_t12_a_pH12.7	5.207	134208560	14.536	3522121
Cefta_3_t12_b_pH12.7	5.220	133703728	14.535	3054411
Cefta_3_t12_b_pH12.7	5.217	134178664	14.563	2686202
Cefta_3_t24_a_pH12.7	5.121	124431912	14.517	2377285
Cefta_3_t24_a_pH12.7	5.156	124345424	14.527	2938453
Cefta_3_t24_b_pH12.7	5.133	123651264	14.521	2945758
Cefta_3_t24_b_pH12.7	5.151	123957496	14.545	3029165

Annexe 22 : Données brutes du dosage de la ceftazidime et de la pyridine à 5N HCl pendant 15 minutes par HPLC et CE respectivement

	Temps de rétention pyridine [min]	Aire pyridine [mAu]	Temps de rétention ceftazidime [min]	Aire ceftazidime [mAu]
Cefta_t0_a_5N_HCl	5.325	194220	12.836	100155328
Cefta_t0_a_5N_HCl	5.331	191655	12.845	100628624
Cefta_t0_b_5N_HCl	5.320	192136	12.883	99899840
Cefta_t0_b_5N_HCl	-	-	12.900	100492432
Cefta_1_a_5N_HCl	5.313	1323747	12.905	115464768
Cefta_1_a_5N_HCl	5.321	1328732	12.927	115542928
Cefta_1_b_5N_HCl	5.324	1326448	12.987	115697760
Cefta_1_b_5N_HCl	5.331	1339588	13.005	115761048
Cefta_2_a_5N_HCl	5.333	2034744	13.051	116104424
Cefta_2_a_5N_HCl	5.339	2043706	13.060	115911784
Cefta_2_b_5N_HCl	5.331	2044618	13.075	115991864
Cefta_2_b_5N_HCl	5.329	2051059	13.089	115424672
Cefta_3_a_5N_HCl	5.331	1905087	13.100	115888272
Cefta_3_a_5N_HCl	5.328	1910721	13.117	116079416
Cefta_3_b_5N_HCl	5.335	1920882	13.127	114180208
Cefta_3_b_5N_HCl	5.325	1918065	13.121	114475568

	Temps de rétention pyridine [min]	Aire pyridine [mAu]	Temps de rétention ceftazidime [min]	Aire ceftazidime [mAu]
Cefta_t0_5N_HCl	3.014	1.2	3.849	75.5
Cefta_t0_5N_HCl	3.010	1.1	3.857	73.5
Cefta_1_5N_HCl	3.002	3.1	3.860	46.6
Cefta_1_5N_HCl	3.000	3.1	3.863	41.3
Cefta_2_5N_HCl	3.002	2.4	3.863	42.1
Cefta_2_5N_HCl	3.002	2.3	3.860	41.5
Cefta_3_5N_HCl	3.002	2.2	3.862	42.6
Cefta_3_5N_HCl	3.002	2.7	3.863	44.2

Annexe 23 : Données brutes du dosage de la ceftazidime et de la pyridine 5N NaOH pendant 15 minutes par HPLC et CE respectivement

	Temps de rétention pyridine [min]	Aire pyridine [mAu]	Temps de rétention ceftazidime [min]	Aire ceftazidime [mAu]
Cefta_t0_a_5N_NaOH	5.309	1091682	13.195	96319168
Cefta_t0_a_5N_NaOH	5.321	1098970	13.196	96091512
Cefta_t0_b_5N_NaOH	5.335	1133854	13.217	95192872
Cefta_t0_b_5N_NaOH	5.323	1108098	13.236	95881600
Cefta_1_a_5N_NaOH	5.272	63523576	13.599	2374484
Cefta_1_a_5N_NaOH	5.279	63394484	13.617	2330119
Cefta_1_b_5N_NaOH	5.281	64892380	13.607	2223158
Cefta_1_b_5N_NaOH	5.276	64981628	13.616	2253811
Cefta_2_a_5N_NaOH	5.269	65383908	13.620	2345779
Cefta_2_a_5N_NaOH	5.283	65474896	13.625	2302057
Cefta_2_b_5N_NaOH	5.272	65363824	13.631	2326262
Cefta_2_b_5N_NaOH	5.273	65101476	13.627	2294093
Cefta_3_a_5N_NaOH	5.280	65781852	13.657	2274309
Cefta_3_a_5N_NaOH	5.284	65410480	13.683	2268792
Cefta_3_b_5N_NaOH	5.280	65577876	13.881	2244181
Cefta_3_b_5N_NaOH	5.276	65905840	13.841	2321627

	Temps de rétention pyridine [min]	Aire pyridine [mAu]	Temps de rétention ceftazidime [min]	Aire ceftazidime [mAu]
Cefta_t0_a_5N_NaOH	3.020	1.4	3.861	73.3
Cefta_t0_a_5N_NaOH	3.019	1.8	3.863	69.1
Cefta_1_a_5N_NaOH	2.992	81.1	3.858	6.1
Cefta_1_a_5N_NaOH	2.987	80.9	3.860	5.7
Cefta_1_b_5N_NaOH	-	-	3.816	5.6
Cefta_1_b_5N_NaOH	-	-	3.817	5.4
Cefta_2_a_5N_NaOH	2.986	81.1	3.860	5.7
Cefta_2_a_5N_NaOH	2.984	80.3	3.862	6.4
Cefta_2_b_5N_NaOH	-	-	3.819	5.3
Cefta_2_b_5N_NaOH	-	-	3.815	5.3
Cefta_3_a_5N_NaOH	2.981	77.5	3.862	5.7
Cefta_3_a_5N_NaOH	2.979	77.3	3.866	5.7
Cefta_3_b_5N_NaOH	-	-	3.818	5.3
Cefta_3_b_5N_NaOH	-	-	3.820	5.2

Annexe 24 : Données brutes du dosage de la ceftazidime et de la pyridine à 90°C pendant 15 minutes par HPLC et CE respectivement

	Temps de rétention pyridine [min]	Aire pyridine [mAu]	Temps de rétention ceftazidime [min]	Aire ceftazidime [mAu]
Cefta_t0_a_5N_90°C	5.225	1246807	12.667	200665920
Cefta_t0_a_5N_90°C	5.220	1264306	-	-
Cefta_t0_b_5N_90°C	5.215	1258275	12.700	197647744
Cefta_t0_b_5N_90°C	5.223	1276326	-	-
Cefta_1_a_5N_90°C	5.213	3547878	12.617	203337664
Cefta_1_a_5N_90°C	5.215	3568514	-	-
Cefta_1_b_5N_90°C	5.223	3606745	12.644	206244992
Cefta_1_b_5N_90°C	5.221	3661009	-	-
Cefta_2_a_5N_90°C	5.216	3573120	12.640	193536144
Cefta_2_a_5N_90°C	5.231	3539153	-	-
Cefta_2_b_5N_90°C	5.223	3616325	12.629	194284480
Cefta_2_b_5N_90°C	5.236	3622003	-	-
Cefta_3_a_5N_90°C	5.224	3677432	12.595	198543248
Cefta_3_a_5N_90°C	5.225	3670916	-	-
Cefta_3_b_5N_90°C	5.235	3709292	12.579	200281056
Cefta_3_b_5N_90°C	5.231	3717568	-	-

	Temps de rétention pyridine [min]	Aire pyridine [mAu]	Temps de rétention ceftazidime [min]	Aire ceftazidime [mAu]
Cefta_t0_a_5N_90°C	2.985	3.0	3.955	69.7
Cefta_t0_a_5N_90°C	3.022	2.8	3.944	69.3
Cefta_1_a_5N_90°C	3.073	6.7	3.954	68.9
Cefta_1_a_5N_90°C	3.077	6.7	3.957	67.6
Cefta_2_a_5N_90°C	2.980	4.2	3.957	68.3
Cefta_2_a_5N_90°C	2.979	4.1	3.828	54.2
Cefta_3_a_5N_90°C	3.060	4.3	3.800	69.8
Cefta_3_a_5N_90°C	3.059	4.4	3.799	68.0

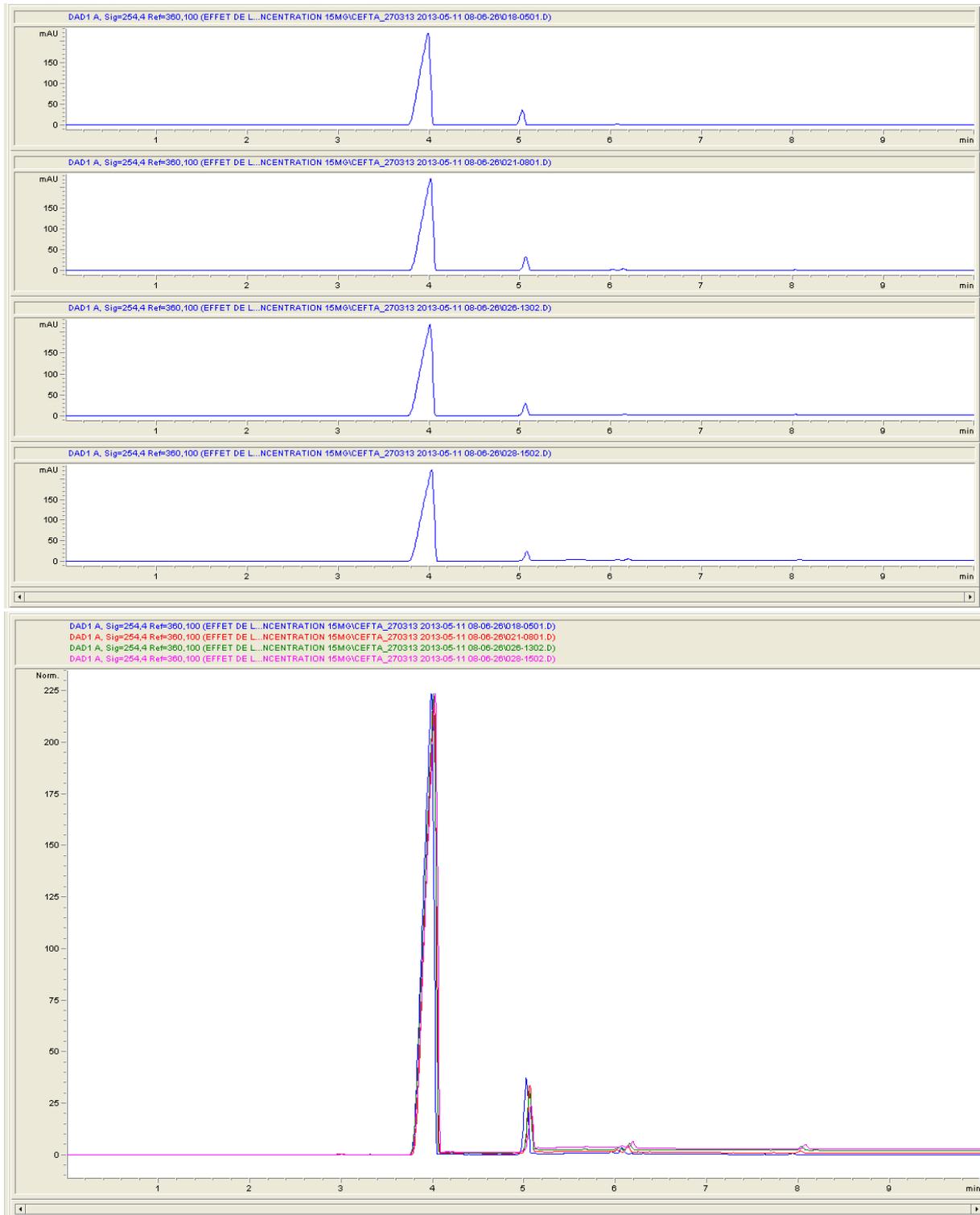
Annexe 25 : Données brutes du dosage de la ceftazidime et de la pyridine en fonction de la reconstitution par HPLC et CE respectivement

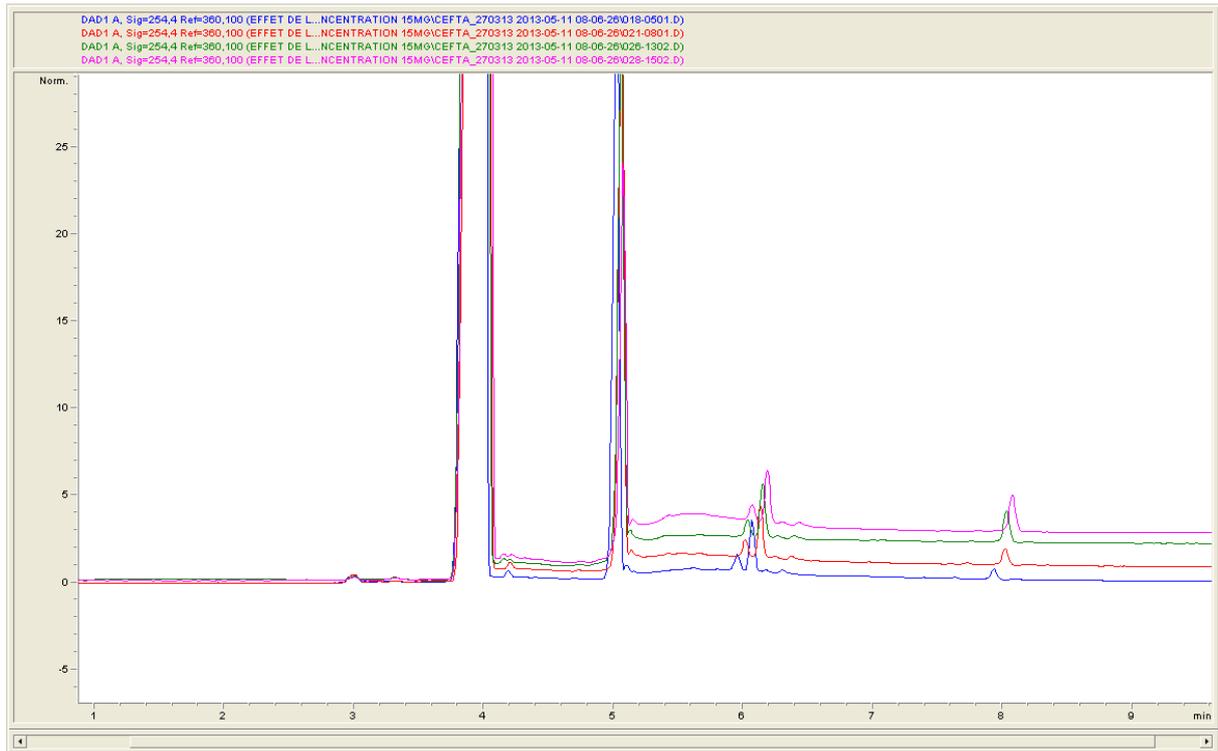
	Temps de rétention pyridine [min]	Aire pyridine [mAu]	Temps de rétention ceftazidime [min]	Aire ceftazidime [mAu]
Cefta_1_a_serin_eau	5.233	725590	13.385	188812896
Cefta_1_a_serin_eau	5.229	768948	13.384	189336288
Cefta_1_b_serin_eau	5.235	791456	-	-
Cefta_1_b_serin_eau	5.235	795488	-	-
Cefta_2_a_serin_eau	5.227	910502	13.336	188985664
Cefta_2_a_serin_eau	5.229	933839	13.312	189349712
Cefta_2_b_serin_eau	5.240	911093	-	-
Cefta_2_b_serin_eau	5.211	917452	-	-
Cefta_3_a_serin_eau	5.227	836539	13.320	185164144
Cefta_3_a_serin_eau	5.219	851950	13.349	185090416
Cefta_3_b_serin_eau	5.209	921686	-	-
Cefta_3_b_serin_eau	5.211	924031	-	-
Cefta_1_a_serin_NaC	5.220	897375	13.392	180062416
Cefta_1_a_serin_NaC	5.207	906335	13.411	180250544
Cefta_1_b_serin_NaC	5.207	443615	-	-
Cefta_1_b_serin_NaC	5.193	469042	-	-
Cefta_2_a_serin_NaC	5.201	908624	13.417	185621696
Cefta_2_a_serin_NaC	5.212	889724	13.439	186393056
Cefta_2_b_serin_NaC	5.221	894485	-	-
Cefta_2_b_serin_NaC	5.243	911045	-	-
Cefta_3_a_serin_NaC	5.213	718836	13.452	185931648
Cefta_3_a_serin_NaC	5.205	719130	13.436	186231408
Cefta_3_b_serin_NaC	5.231	894950	-	-
Cefta_3_b_serin_NaC	5.221	896036	-	-
Cefta_1_a_pipet_eau	5.227	919921	13.373	188837696
Cefta_1_a_pipet_eau	5.208	932865	13.399	189244656
Cefta_1_b_pipet_eau	5.224	926622	-	-
Cefta_1_b_pipet_eau	5.188	982194	-	-
Cefta_2_a_pipet_eau	5.213	983126	13.432	187742480
Cefta_2_a_pipet_eau	5.213	971202	13.444	187532080
Cefta_2_b_pipet_eau	5.213	996707	-	-
Cefta_2_b_pipet_eau	5.215	1001887	-	-
Cefta_3_a_pipet_eau	5.208	973312	13.447	192111552
Cefta_3_a_pipet_eau	5.203	1011044	13.439	192437424
Cefta_3_b_pipet_eau	5.183	1010216	-	-
Cefta_3_b_pipet_eau	5.205	1024868	-	-
Cefta_1_a_pipet_NaC	5.205	1109675	13.447	202568208
Cefta_1_a_pipet_NaC	5.203	1133349	13.441	202721424
Cefta_1_b_pipet_NaC	5.215	1116025	-	-
Cefta_1_b_pipet_NaC	5.213	1148203	-	-
Cefta_2_a_pipet_NaC	5.189	1112311	13.432	196761328
Cefta_2_a_pipet_NaC	5.215	1102717	13.407	196790288
Cefta_2_b_pipet_NaC	5.207	1138634	-	-
Cefta_2_b_pipet_NaC	5.203	1148182	-	-
Cefta_3_a_pipet_NaC	5.196	1167885	13.405	193979024
Cefta_3_a_pipet_NaC	5.192	1168500	13.388	195734064
Cefta_3_b_pipet_NaC	5.219	1208179	-	-
Cefta_3_b_pipet_NaC	5.213	1227202	-	-

	Temps de rétention ceftazidime [min]	Aire ceftazidime [mAu]
Cefta_1_a_serin_eau	3.998	1672.6
Cefta_1_a_serin_eau	3.998	1627.6
Cefta_2_a_serin_eau	4.199	1571.0
Cefta_2_a_serin_eau	4.209	1864.9
Cefta_3_a_serin_eau	4.009	1746.5
Cefta_3_a_serin_eau	4.006	1835.4
Cefta_1_a_serin_NaC	4.148	1935.9
Cefta_1_a_serin_NaC	4.015	1925.3
Cefta_2_a_serin_NaC	4.020	1902.3
Cefta_2_a_serin_NaC	4.024	1928.6
Cefta_3_a_serin_NaC	4.028	2062.1
Cefta_3_a_serin_NaC	4.020	1928.5
Cefta_1_a_pipet_eau	3.984	1706.8
Cefta_1_a_pipet_eau	3.983	1699.4
Cefta_2_a_pipet_eau	3.988	1567.0
Cefta_2_a_pipet_eau	3.979	1688.6
Cefta_3_a_pipet_eau	3.992	1655.9
Cefta_3_a_pipet_eau	3.345	1557.6
Cefta_1_a_pipet_NaC	4.012	1784.0
Cefta_1_a_pipet_NaC	4.035	1770.9
Cefta_2_a_pipet_NaC	4.012	1750.1
Cefta_2_a_pipet_NaC	4.013	1771.6
Cefta_3_a_pipet_NaC	4.010	1875.5
Cefta_3_a_pipet_NaC	4.198	1959.0

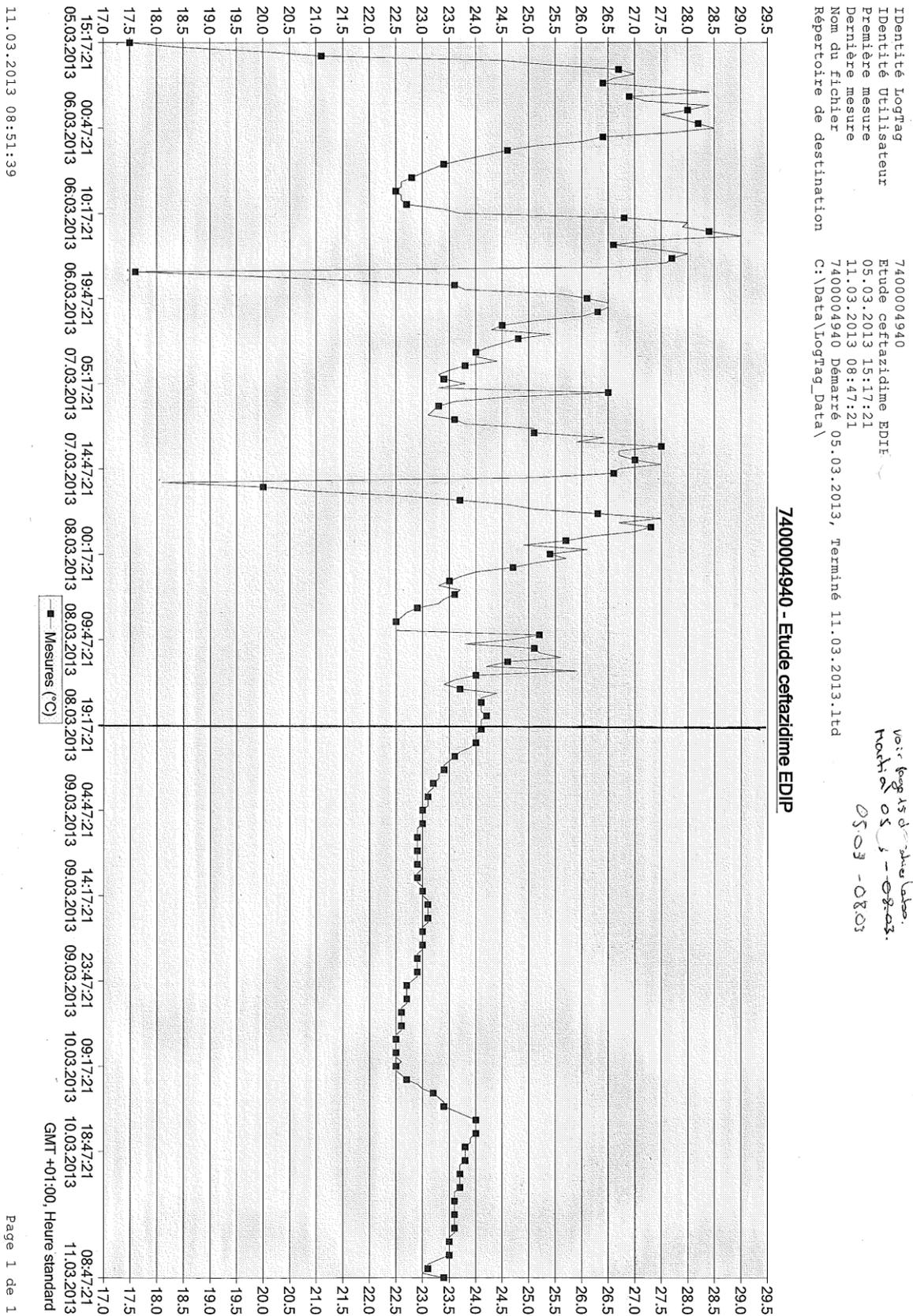
Annexe 26 : Electrophérogrammes en fonction de la procédure de reconstitution de l'antibiotique par CE

La figure ci-dessous représente les électrophérogrammes en fonction de la reconstitution de la solution : seringue-NaCl 0.9% (bleu), seringue-eau (rouge), pipette en verre-NaCl 0.9% (vert) et pipette en verre-eau (violet).





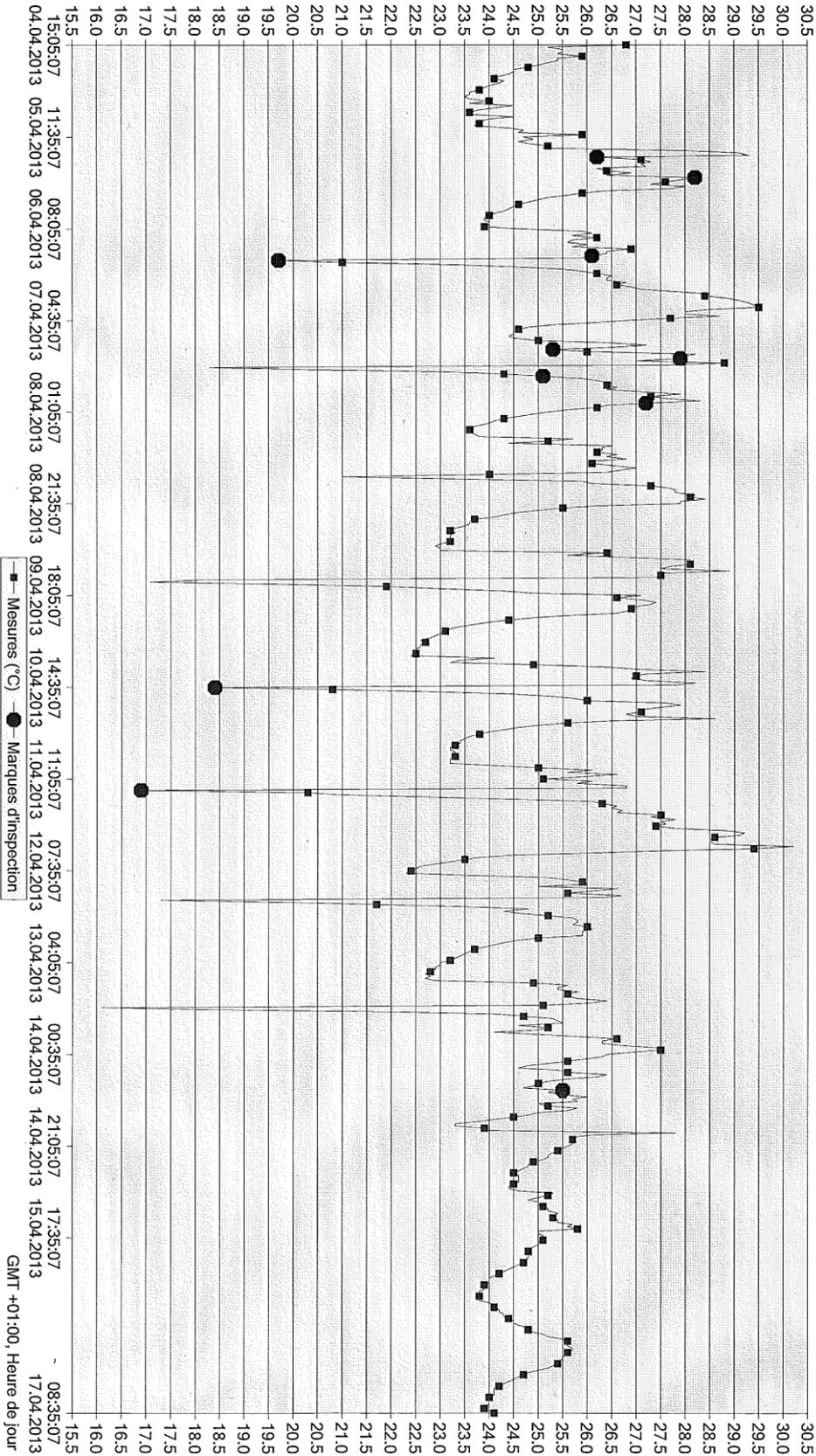
Annexe 27 : Suivi de la température chez Mger, Cmou, Tsan et Abue



Identité LogTag
 Identité Utilisateur
 Première mesure
 Dernière mesure
 Nom du fichier
 Répertoire de destination

7400004943
 Etude ceftazidime EDIP
 04.04.2013 15:05:07
 17.04.2013 08:35:07
 7400004943 Démarré 04.04.2013, Terminé 17.04.2013, *Redri go (Seth d'wanda Mwalyi)*
 C:\Data\LogTag_Data\

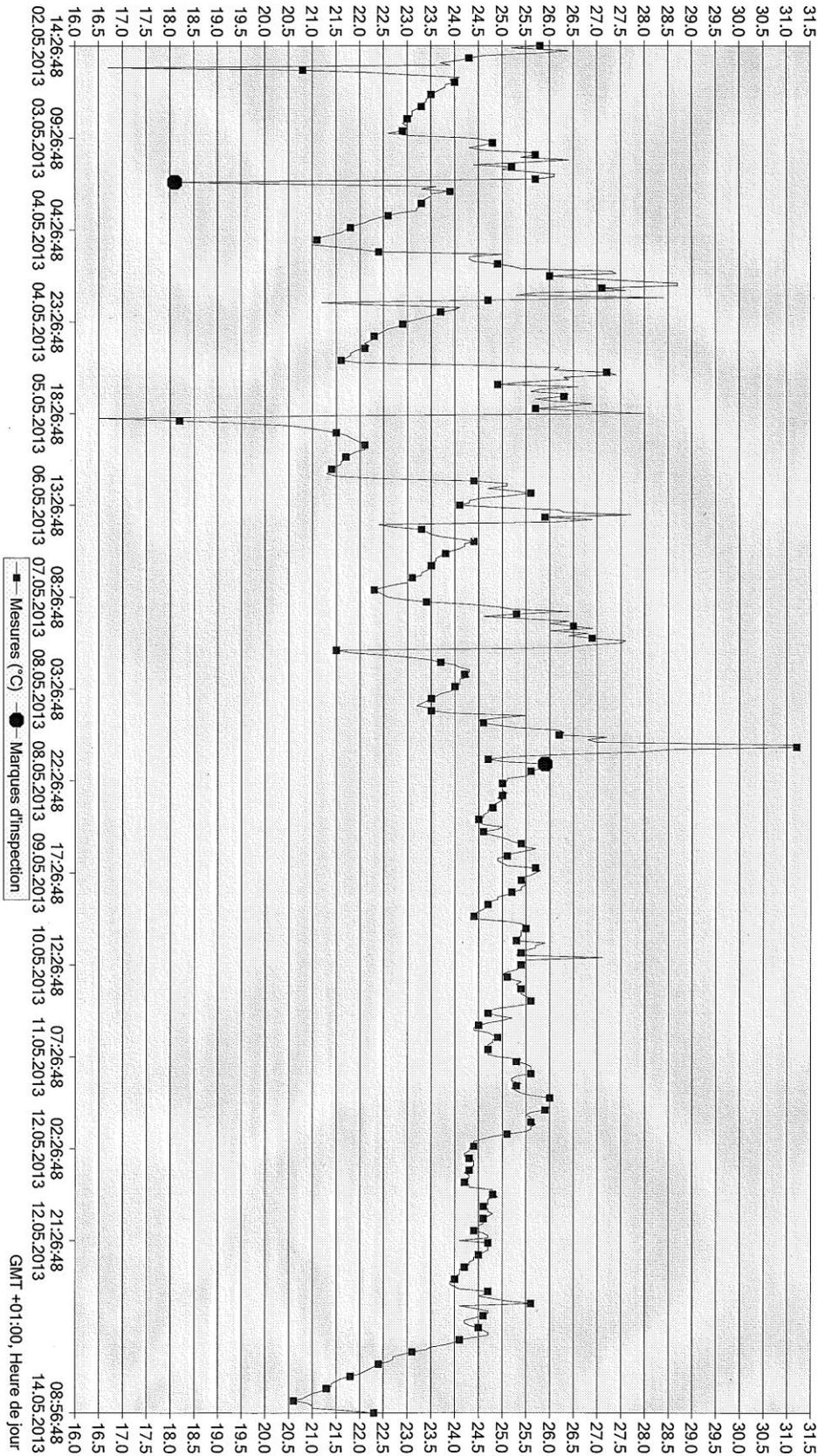
7400004943 - Etude ceftazidime EDIP



17.04.2013 08:36:40

Identité LogTag 7400004940
 Identité Utilisateur Etude ceftazidime EDIP
 Première mesure 02.05.2013 14:26:48
 Dernière mesure 14.05.2013 08:56:48
 Nom du fichier 7400004940 Démarré 02.05.2013, Terminé 14.05.2013.ltd
 Répertoire de destination C:\Data\LogTag_Data\

7400004940 - Etude ceftazidime EDIP



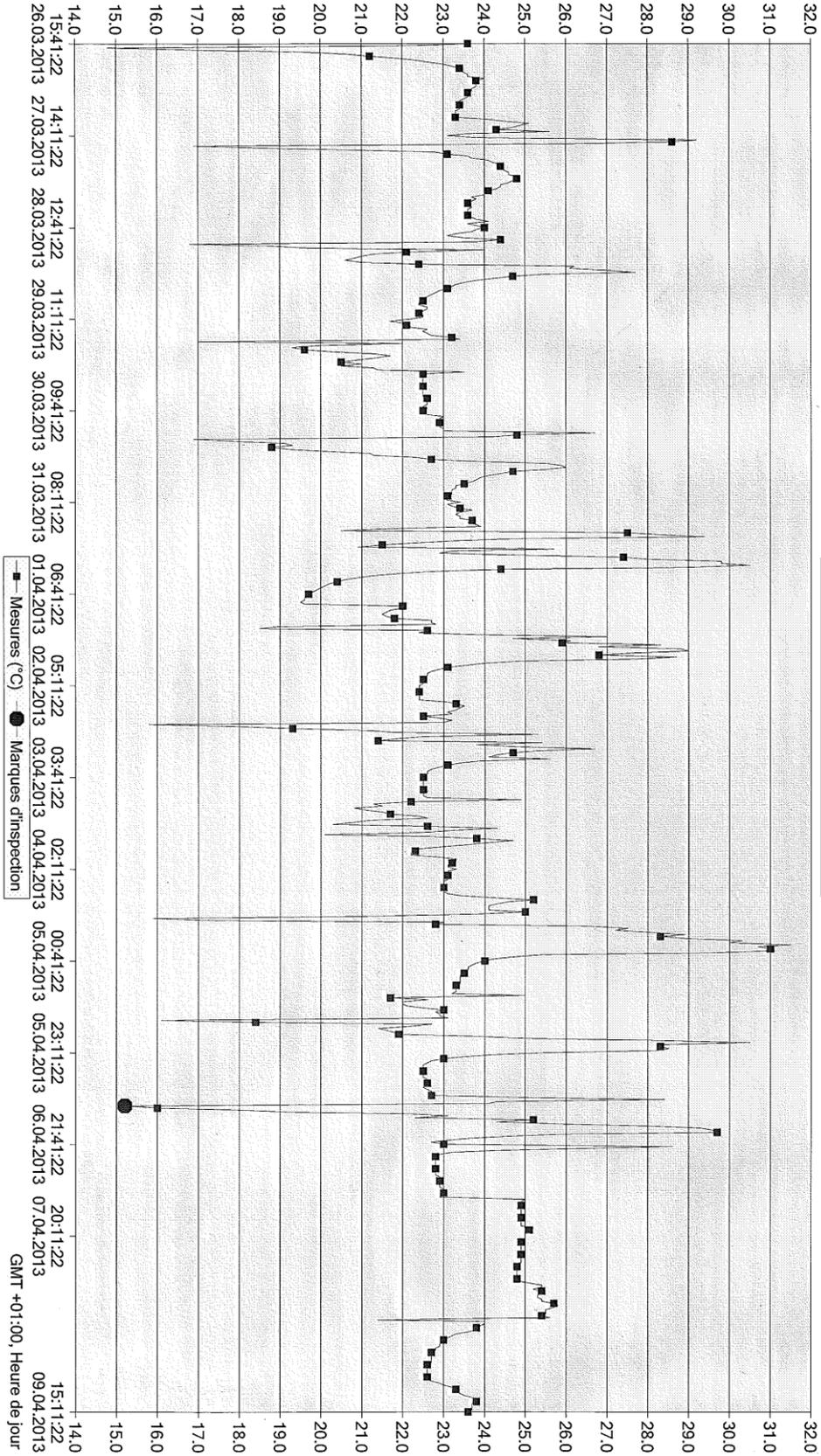
14.05.2013 10:05:21

Page 1 de 1

Identité LogTag 7400004940
 Identité Utilisateur Etude cefazidime EDIP
 Première mesure 26.03.2013 15:41:22
 Dernière mesure 09.04.2013 15:11:22
 Nom du fichier 7400004940 Démarré 26.03.2013, Terminé 09.04.2013.ltd
 Répertoire de destination C:\Data\LogTag_Data\

Anoine

7400004940 - Etude cefazidime EDIP



11.04.2013 14:06:03

Page 1 de 1

Annexe 28 : Données brutes de dosage de la ceftazidime et de la pyridine mesuré dans des cassettes de perfusion par HPLC et CE respectivement

	Temps de rétention ceftazidime [min]	Aire ceftazidime [mAu]	Temps de rétention pyridine [min]	Aire pyridine [mAu]	ecart-type pyridine	ecart-type ceftazidime
1	13.414	182191300	-	-	-	514304
3	13.369	177064016	5.204	5807569	62572	327278
4	12.848	185315224	5.208	4384930	11893	1050448
8	12.58	212105460	-	-	-	-
10	12.535	207615120	5.205	6811026	28138	516950
11	12.598	208431388	5.199	7353003	39885	546414
12	12.78	201974840	5.204	3868537	14654	294210
13	12.913	219170364	5.204	5161552	28014	705293
14	13.16	155823896	5.196	5839237	74918	977629
15	13.283	166099004	5.202	5793045	15753	644562
16	13.296	171066292	5.194	5306738	17834	1019208
17	13.372	166771004	5.204	5300568	21800	856224
18	13.322	200358804	5.205	4518724	38323	456273
19	13.358	180858096	5.201	6465439	38953	469978
20	12.566	200543128	5.221	4549857	54276	22616
21	12.36	189063200	5.233	5302293	20886	85848
22	12.226	208927624	-	-	-	-
24	12.361	178740352	5.231	4946858	24981	331741
25	12.386	186150136	5.228	3916202	24999	1008017
26	12.323	225143352	5.221	4793634	52316	447061
27	12.449	176875008	5.222	3654610	31859.1087	4306359

	Temps de rétention pyridine [min]	Aire pyridine [mAu]	Temps de rétention ceftazidime [min]	Aire ceftazidime [mAu]
1	2.946	6.6	3.773	67.2
3	2.946	7.0	3.778	67.6
4	2.946	6.2	3.775	67.5
6	2.945	5.7	3.826	67.0
8	2.997	8.4	3.836	56.3
9	3.024	7.7	3.761	58.0
10	3.003	7.4	3.819	55.6
11	3.011	8.2	3.827	65.5
12	2.945	4.5	3.771	72.3
13	3.090	7.2	3.756	67.6
14	3.088	7.2	3.749	53.7
15	3.040	7.0	3.743	52.9
16	2.987	6.7	3.745	53.1
17	2.978	6.8	3.748	49.7
18	2.970	5.9	3.750	55.5
19	3.001	7.1	3.753	51.9
20	2.950	6.0	3.823	60.2
21	2.948	5.6	3.823	59.1
22	2.948	5.6	3.827	60.8
23	2.948	6.9	3.823	56.8
24	2.947	6.0	3.824	55.1
25	2.946	4.8	3.828	55.2
26	2.947	4.8	3.833	63.1
27	2.945	3.7	3.807	50.8

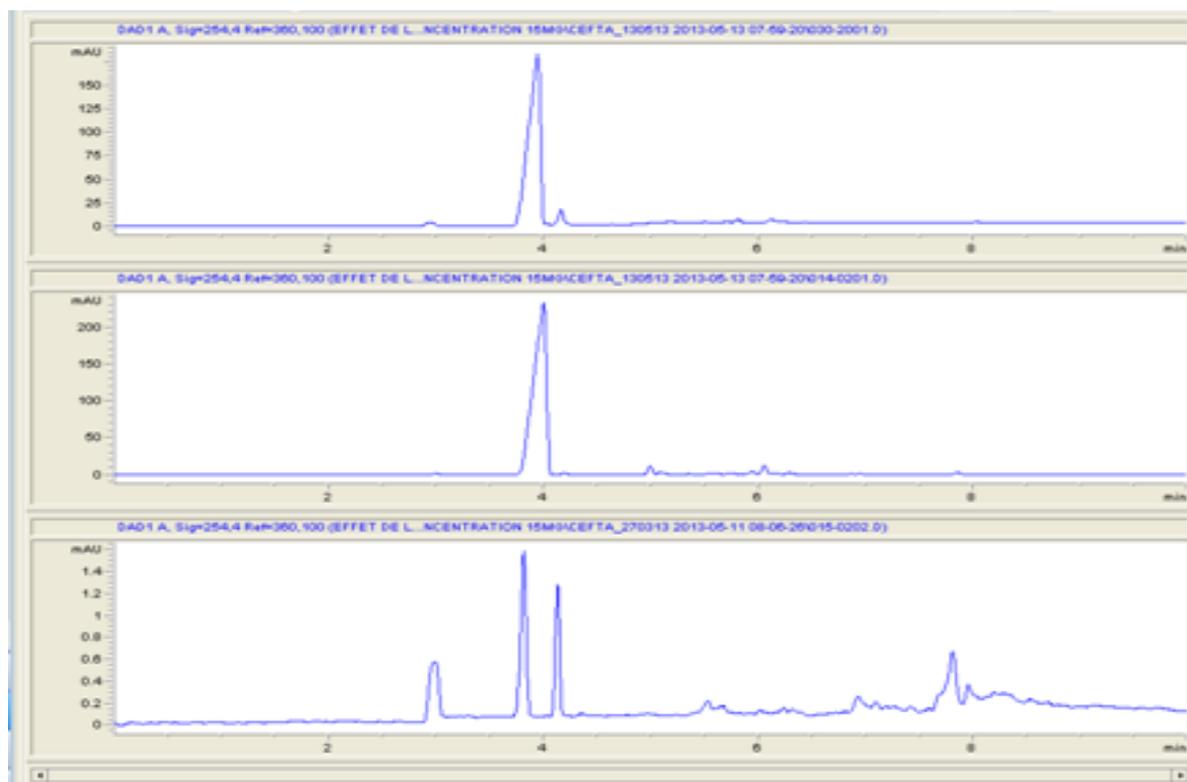
Résumé des dosages par les deux méthodes

Patient	date fabrication	date administration	Quantité de pyridine par HPLC [mg/ml]	Ecart-type quantité par HPLC [mg/ml]	Quantité de pyridine par CE [mg/ml]	Ecart-type quantité par CE [mg/ml]	% de ceftazidime par HPLC [%]	% écart-type de ceftazidime par HPLC [%]	% de ceftazidime par CE [%]	% écart-type de ceftazidime par CE [%]
Mger (42kg)	28.09.2012	30.09.	-	-	0.318	0.007	89.00%	0.05%	90.00%	0.05%
Mger	28.09.2012	02.10.	0.354	0.004	0.336	0.004	87.00%	0.03%	91.00%	0.05%
Mger	28.09.2012	inconnu	0.270	0.001	0.294	0.004	91.00%	0.11%	91.00%	0.00%
Mger	28.09.2012	04.10.	-	-	-	-	-	-	90.00%	0.16%
Mger	05.10.2012	11.10.	0.378	0.004	0.330	0.004	90.00%	0.11%	76.00%	0.04%
Mger	05.10.2012	07.10.	0.300	0.002	0.288	0.000	87.00%	0.03%	74.00%	0.09%
Mger	07.03.2013	09.03.	0.458	0.003	0.403	0.036	100.00%	0.06%	86.00%	0.38%
Tsan (42kg)	01.05.2013	04.05.	-	-	0.376	0.007	-	-	77.00%	0.41%
Tsan	01.05.2013	05.05.	0.420	0.002	0.360	0.025	100.00%	0.05%	73.00%	0.32%
Tsan	06.05.2013	06.05.	-	-	0.412	0.007	-	-	75.00%	0.19%
Cmou (34kg)	05.04.2013	05.04.	0.357	0.001	0.292	0.000	91.00%	0.08%	86.00%	0.22%
Cmou	05.04.2013	08.04.	0.328	0.001	0.292	0.003	97.00%	0.12%	79.00%	0.01%
Cmou	05.04.2013	09.04.	0.352	0.005	0.272	0.006	98.00%	0.12%	86.00%	0.01%
Cmou	05.04.2013	10.04.	0.322	0.001	0.278	0.015	101.00%	0.10%	86.00%	0.04%
Cmou	11.04.2013	12.04.	0.396	0.002	0.268	0.026	106.00%	0.06%	83.00%	0.00%
Cmou	11.04.2013	13.04.	0.223	0.002	0.286	0.000	105.00%	0.53%	82.00%	0.19%
Abue (68kg)	27.03.2013	29.03.	0.320	0.003	0.356	0.029	105.00%	0.07%	89.00%	0.02%
Abue	28.03.2013	02.04.	0.278	0.004	0.290	0.000	97.00%	0.05%	80.00%	0.11%
Abue	03.04.2013	03.04.	0.326	0.002	0.272	0.006	92.00%	0.01%	79.00%	0.09%
Abue	03.04.2013	04.04.	0.275	0.005	0.282	0.000	98.00%	0.00%	75.00%	0.03%
Abue	03.04.2013	06.04.	-	-	-	-	102.00%	-	82.00%	0.05%
Sgun (44kg)	19.11.2012	inconnu	0.234	0.001	0.228	0.004	91.00%	0.03%	74.00%	0.08%
Sgun	21.11.2012	inconnu	0.240	0.002	0.216	0.011	99.00%	0.10%	97.00%	0.03%

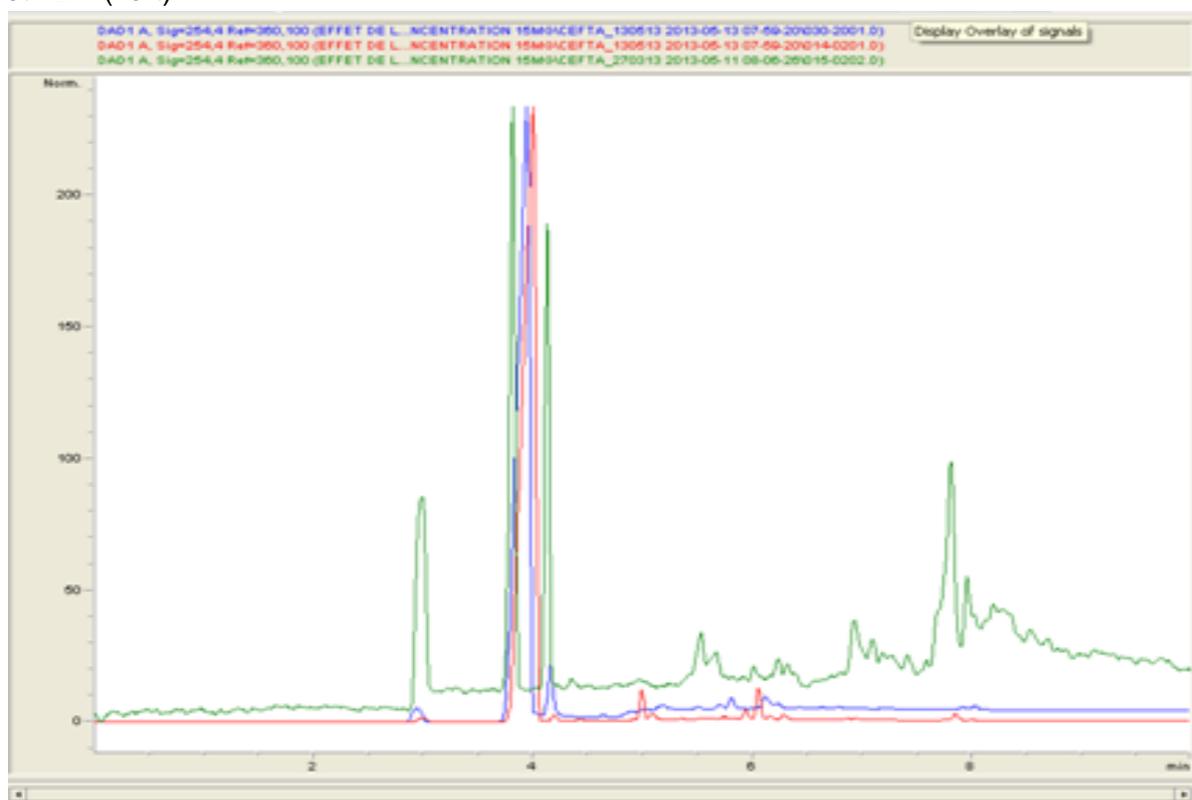
Annexe 29 : Témoin Ph. Eur. de la ceftazidime et de la pyridine selon USP de dosage par HPLC

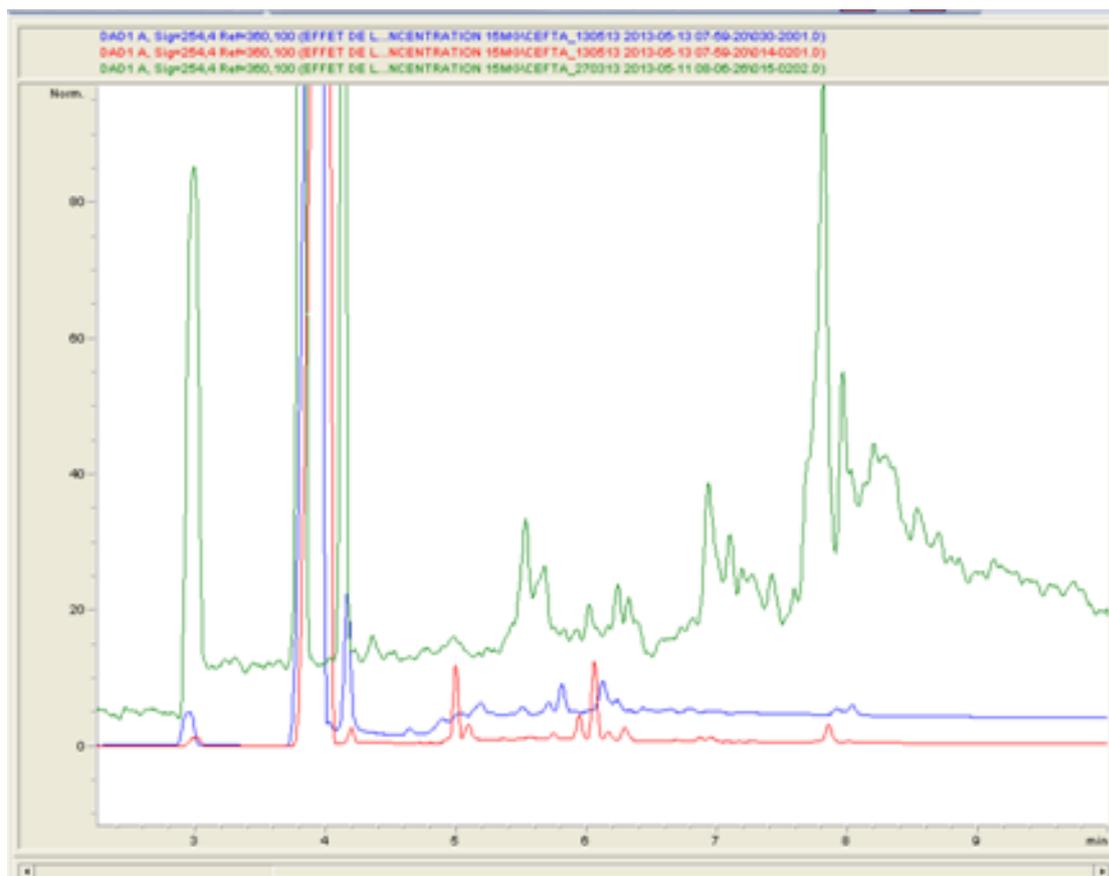
	Ceftazidime 1 mg/ml		Pyridine 25 µg/ml	
	temps rétention [min]	aire [mAu]	temps rétention [min]	aire [mAu]
	12.951	169339728	5.203	8184795
	12.987	169567344	5.201	8182859
	12.965	169464768	5.197	8224710
	12.884	171667264	5.191	8205175
	12.827	171949648	-	-
	12.840	171373024	-	-
Moyenne	12.909	170560296	5.198	8199385
Ecart-type	0.068	1224102	0.005	19671
CV [%]	0.53%	0.72%	0.10%	0.24%

Annexe 30 : Electrophérogrammes après ajustement du pH à 1.38, 6.8 et 12.7



Les figures ci-dessous représentent les électrophérogrammes à pH 1.38 (bleu), 6.8 (rouge) et 12.7 (vert).





Annexe 31 : Chromatogrammes en fonction de la procédure de reconstitution de l'antibiotique par HPLC

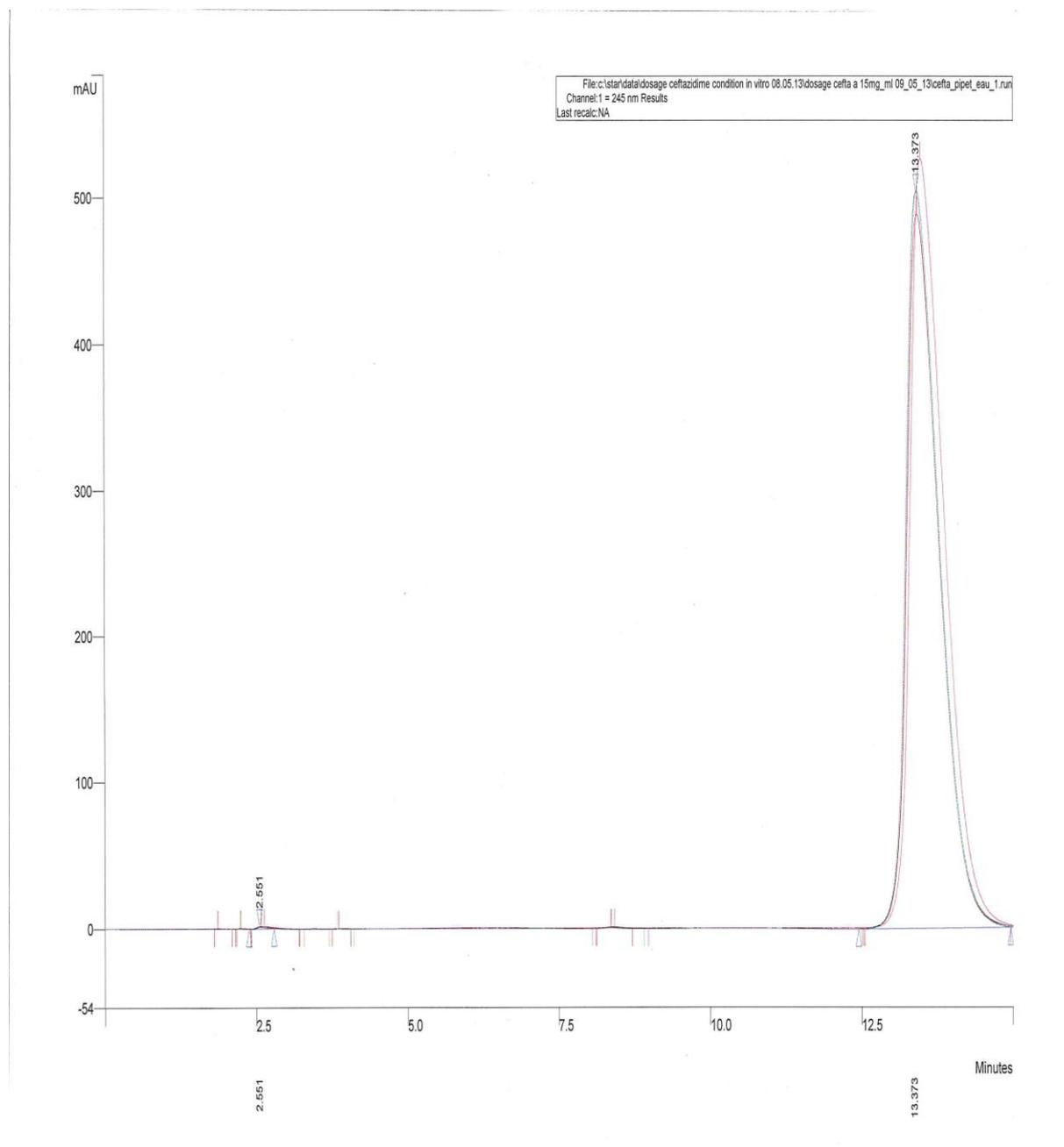


Figure f : Chromatogramme de la ceftazidime dosé par HPLC

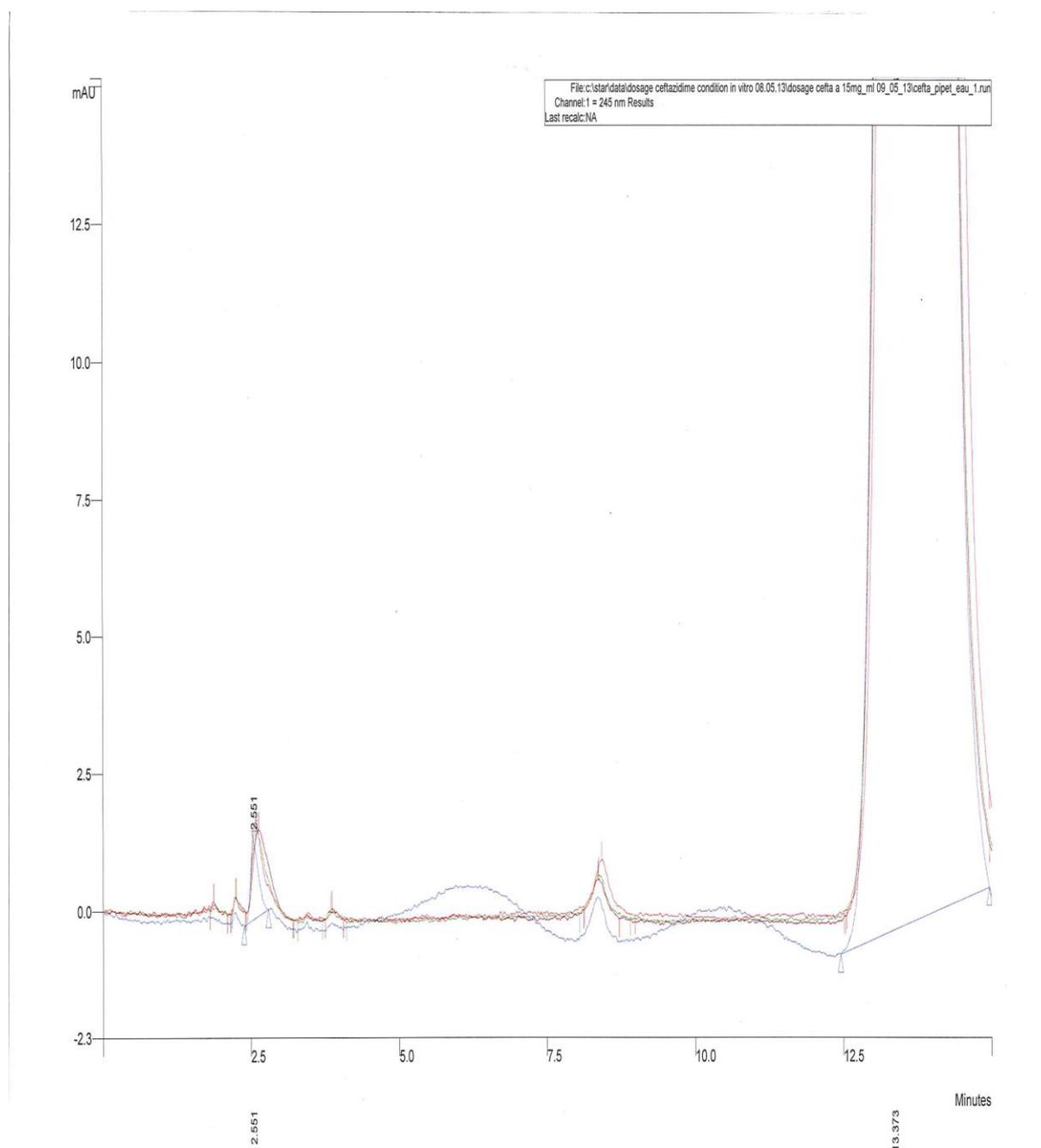


Figure g : Chromatogramme de la ceftazidime dosé par HPLC

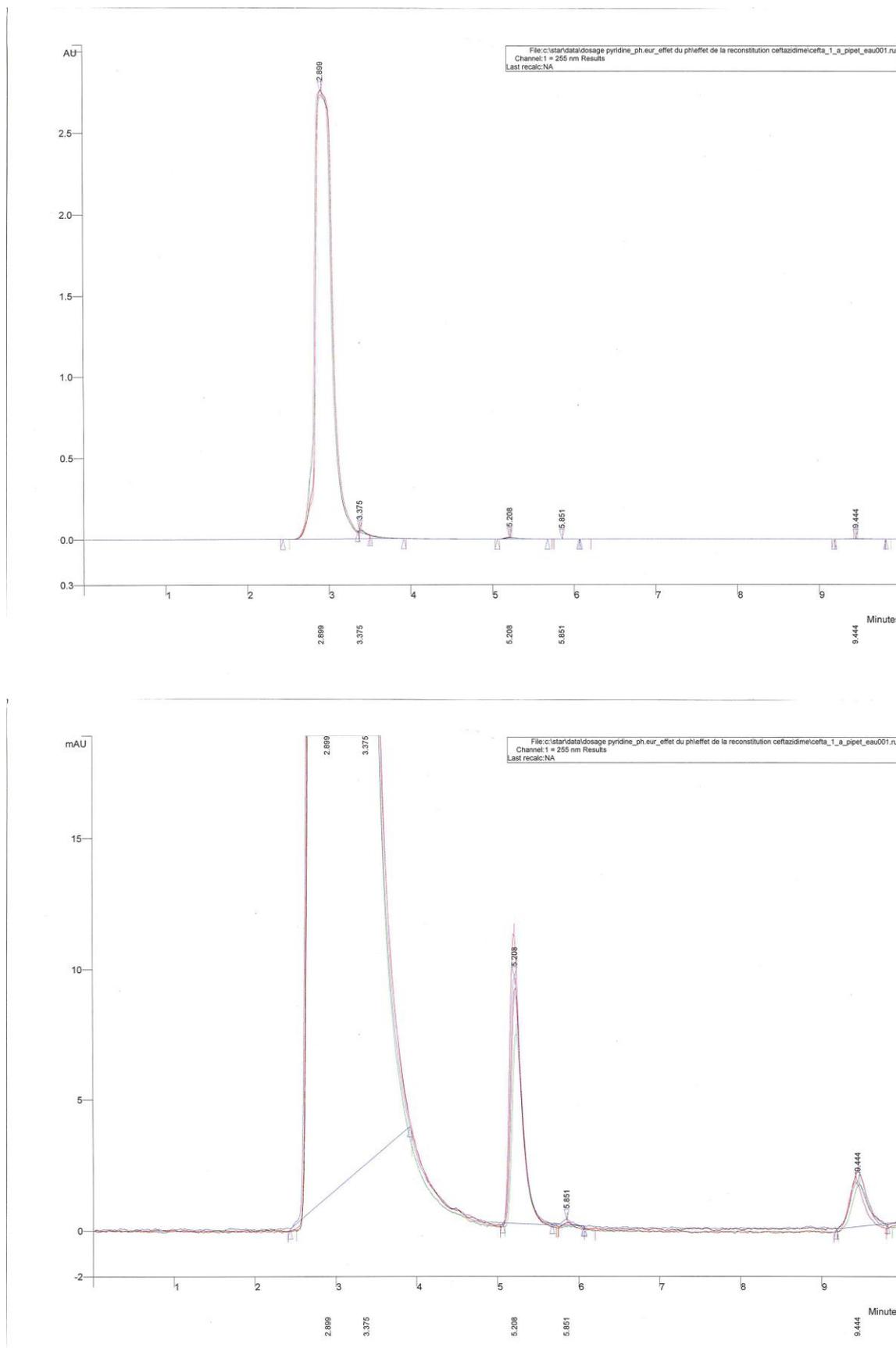


Figure h : Chromatogramme de la pyridine dosé par HPLC