Master en Pharmacie

Travail Personnel de Recherche

Optimisation du processus de préparation des solutions du melphalan destinées à l'administration intra-vitréenne dans le traitement de rétinoblastome et étude de leur stabilité

présenté à la

Faculté des Sciences de
L'Université de Genève

par

Coralie Brönnimann

Unité de recherche

Pharmacie centrale du CHUV

Directeur de l'unité

Prof. Farshid Sadeghipour

Autres responsables

Dr. Lina Berger
Dr. Gregory Podilsky

Genève
2016

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les différentes personnes qui m'ont aidée, soutenue et permis de réaliser ce travail de Master.

En premier lieu, je souhaiterais remercier le Professeur Farshid Sadeghipour, Pharmacien-Chef du Service de la pharmacie du CHUV, pour son accueil au sein de son unité ainsi que pour m'avoir donné l'opportunité de découvrir le monde de la pharmacie en milieu hospitalier.

Je remercie également le Docteur Lina Berger, Pharmacienne responsable de l'Unité de Contrôle de Qualité de la pharmacie centrale du CHUV, pour la proposition du sujet traité lors de ce travail. Je la remercie également pour ses conseils, le temps qu'elle a pu m'accorder afin de répondre à mes différentes questions et pour son aide.

Je tenais à remercier Camille Fauchère qui m'a également soutenue tout au long de ce travail et qui m'a donné de précieux conseils.

Je remercie également le Docteur Gregory Podilsky, Responsable des préparations magistrales cytotoxiques, pour son accueil au sein de l'Unité de Fabrication.

Je voulais remercier toute l'équipe du laboratoire de Contrôle de Qualité, sans qui ce travail de Master n'aurait pas été pareil. Je les remercie beaucoup de m'avoir permis de m'intégrer au sein de cette équipe et de m'avoir aidée dans diverses manipulations.

Il m'est aussi indispensable de remercier Isra et Iva, sans qui cette expérience n'aurait pas été la même. Je les remercie pour leur soutien durant ce travail et pour les discussions et les rires qu'on aura partagés.

Merci aussi aux étudiants de Pharmacie qui effectuaient leur travail de Master à la PMU, pour les pauses et leur soutien, et merci plus particulièrement à Caroline qui a toujours été là pour me soutenir.

Je remercie également ma famille qui m'a supportée durant les moments difficiles tout au long de mes études et plus particulièrement Damien, sans qui tout ce travail et toutes ces études n'auraient pas été pareils.

Résumé

Introduction

Le rétinoblastome est un cancer rare de la rétine mais, cependant, la tumeur intra-oculaire la plus fréquente. Ce cancer est diagnostiqué, généralement, dans les premières années de vie de l'enfant. Il possède une base génétique et 40 % des rétinoblastomes sont héréditaires. Si tel est le cas, il se manifeste majoritairement par un cancer bilatéral ; sinon, il est toujours unilatéral. Divers traitements existent, certains plus invasifs que d'autres. Les buts principaux des traitements sont de sauver la vie de l'enfant, sauver ses yeux, garder la meilleure qualité de vue possible et la meilleure qualité de vie autant pendant qu'après le traitement. L'hôpital ophtalmique de Lausanne demande très régulièrement à l'unité de fabrication du CHUV de reconstituer l'Alkeran® qui est un agent alkylant utilisé dans divers cancers. Ce melphalan présente une faible stabilité ce qui nécessite une administration du médicament dans l'heure et demie qui suit sa reconstitution. Le but est donc d'étudier sa stabilité et si possible, de proposer une alternative afin d'augmenter cette stabilité.

Matériels et Méthodes

La chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (C18) a été utilisée selon une méthode analytique optimisée à partir de celle fournie par la Ph. Eur. 8.8. La détection s'est faite par UV-DAD à une longueur d'onde de 260 nm. La spécificité de cette méthode a été testée avec un blanc et le melphalan pour conformité du système. La méthode analytique a été validée avec un modèle de régression linéaire passant par 0, ajustée en utilisant uniquement le niveau 3, soit une solution à 30 µg/mL. Les limites de quantifications sont de 5.707 à 30.00 µg/mL. Des essais de dégradation et de stabilité du melphalan ont été effectués. Pour cela, la solution de melphalan reconstituée a été conservée à T° ambiante et injectées à t0, 6 et 48 heures. Pour l'étude de stabilité du melphalan au congélateur, les deux concentrations extrêmes utilisées lors du traitement du rétinoblastome ont été testées, soit 15 µg/mL et 200 µg/mL. Les solutions ont été conservées dans leurs conditionnements finaux et ont été gardées au congélateur à -18 °C. Les solutions ont été injectées toutes les semaines sur 1 mois. Des essais de décongélation et de stabilité du L-PAM après décongélation ont été faits. Deux modes de conservation ont été comparés, soit le réfrigérateur et à T° ambiante.

Résultats et Discussion

Le melphalan est une molécule instable qui se dégrade très rapidement. Lors de sa conservation à T° ambiante, après 5.80 heures, seulement 70.00 % de la concentration initiale sont encore présents. Il a été remarqué que la stabilité du L-PAM augmente lorsque ce médicament se trouve en milieu acide. En effet, le melphalan présentait encore 98.14 % de la concentration initiale après avoir été conservé 6.28 heures à T° ambiante. Les solutions de melphalan, directement congelées après reconstitution, sont stables sur une période d'un mois, autant les solutions à 15 µg/mL que celles à 200 µg/mL. En effet, toutes les concentrations se trouvent entre 90-110 % de la concentration initiale, même après un mois de conservation au congélateur. De plus, après décongélation des seringues, il a été remarqué que les solutions sont stables sur 5.00 heures lorsqu'elles sont conservées au réfrigérateur, à une T° de 4.6 °C.

Conclusion et Perspectives

Les essais de stabilité sur le melphalan pendant un mois se sont révélés positifs, ce qui permet une modification du mode de préparation de ce médicament. Elles pourront, dorénavant, être préparées à l'avance et conservées au congélateur à une température de -18 °C. Les poches de perfusion stériles devront être remplies avec le volume adéquat de solution de NaCl 0.9 % et placées au réfrigérateur au préalable. Le volume nécessaire de solution melphalan 5 mg/mL devra être ajouté dans les poches pour obtenir les concentrations voulues. Les poches devront être mélangées de manière adéquate et lors du prélèvement de solution, les seringues devront directement être placées au congélateur. Il est préférable que la décongélation se fasse au réfrigérateur car c'est dans celui-ci que les solutions devront être conservées avant leur administration.

Liste des abréviations

ACN : Acétonitrile
ADN : Acide Désoxyribonucléique
AUC : Aire sous la courbe (Area Under Curve)
CHUV : Centre Hospitalier Universitaire Vaudois
CV : Coefficient de Variation
DAD : Détecteur à Barrette de Diode (Diode Array Detector)
HCl : Hydrochloride
HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance (High-Performance Liquid Chromatography)
L-PAM : L-PhenylAlanine Mustard
MeOH : Méthanol
Min : Minute
mL : Millilitre
MS : Spectrométrie de masse (Mass Spectrometry)
NaCl : Chlorure de Sodium
Ph. Eur : Pharmacopée Européenne
Ph. Helv : Pharmacopée Helvétique
T° : Température
Tr : Temps de rétention
UV : Ultra-violet
°C : Degré Celsius

Table des Matières

1. Introduction 4
1.1. Rétinoblastome 4
1.1.1. Génétique 4
1.1.2. Symptômes 4
1.1.3. Traitements du rétinoblastome 5
1.2. Melphalan 5
1.2.1. Stabilité 6
1.2.2. Mode d'action 7
1.3. Méthode analytique 7
1.3.1. Fonctionnement 7
1.3.2. Étalon interne 9
1.4. Contexte et but du travail 9
2. Matériel et méthode 10
2.1. Matériel 10
2.2. Produits 10
2.3. Analytique 10
2.3.1. Appareillage 10
2.3.2. Conditions chromatographiques et optimisation de la méthode analytique 10
2.3.3. Test des colonnes 11
2.3.4. Etude de stabilité 11
2.3.4.1. Propylparabène – Etalon interne 11
2.3.4.2. Blanc 11
2.3.4.3. Melphalan dans sa phase finale d'injection 12
2.3.5. Validation de la méthode 12
2.3.5.1. Spécificité 12
2.3.5.2. Standard de calibration 12
2.3.5.3. Standard de validation 12
2.4. Fabrication 12
2.4.1. Temps de remplissage des seringues 12
2.4.2. Temps pour congélation de 10 seringues selon 2 modes 12

2.4.3. Temps pour congélation poche de perfusion 13
2.4.4. Etude de dégradation du melphalan à température ambiante 13
2.4.5. Etude de stabilité du melphalan au congélateur 13
2.4.5.1. Poche de perfusion à 15 µg/mL 13
2.4.5.2. Poche de perfusion à 200 µg/mL 13
2.4.6. Temps pour décongélation des seringues et étude de stabilité du melphalan après décongélation 13
2.5. Points critiques et améliorations 14
3. Résultats 15
3.1. Analytique 15
3.1.1. Optimisation de la méthode analytique 15
3.1.2. Test des colonnes 16
3.1.3. Etude de stabilité 16
3.1.3.1. Propylparabène – Etalon interne 16
3.1.3.2. Blanc 17
3.1.3.3. Melphalan dans sa phase finale d'injection 17
3.1.4. Validation de la méthode 18
3.1.4.1. Spécificité 18
3.1.4.2. Standard de calibration et standard de validation 18
3.2. Fabrication 19
3.2.1. Temps de remplissage des seringues 19
3.2.2. Temps pour congélation de 10 seringues selon 2 modes 20
3.2.3. Temps pour congélation poche de perfusion 20
3.2.4. Etude de dégradation du melphalan à température ambiante 20
3.2.5. Etude de stabilité du melphalan au congélateur 21
3.2.5.1. Poche de perfusion à 15 µg/mL 21
3.2.5.2. Poche de perfusion à 200 µg/mL 22
3.2.6. Temps pour décongélation des seringues et étude de stabilité du melphalan après décongélation 22
4. Discussion 24
4.1. Analytique 24
4.1.1. Optimisation méthode analytique 24

4.1.2. Test des colonnes 24
4.1.3. Etude de stabilité 24
4.1.3.1. Propylparabène – Etalon interne 24
4.1.3.2. Blanc 25
4.1.3.3. Melphalan dans sa phase finale d'injection 25
4.1.4. Validation de la méthode 26
4.1.4.1. Spécificité 26
4.1.4.2. Standard de calibration et standard de validation 26
4.2. Fabrication 27
4.2.1. Temps de remplissage des seringues 27
4.2.2. Temps pour congélation de 10 seringues selon 2 modes 27
4.2.3. Temps pour congélation poche de perfusion 28
4.2.3.1. Etude de dégradation du melphalan à température ambiante 28
4.2.4. Etude de stabilité du melphalan au congélateur 28
4.2.4.1. Poche de perfusion à 15 µg/mL 28
4.2.4.2. Poche de perfusion à 200 µg/mL 29
4.2.5. Temps pour décongélation des seringues et étude de stabilité du melphalan après décongélation 30
5. Conclusion et perspectives 31
6. Bibliographie 33
7. Annexes 35

1. Introduction

1.1. Rétinoblastome

Le rétinoblastome est un cancer rare de la rétine ; il touche 1 enfant sur 20'000 naissances. En revanche, c'est la tumeur intraoculaire la plus fréquente dans le monde. Elle se manifeste, généralement, dans les premières années de vie de l'enfant, soit avant 4 ans (1, 2). Différentes formes de rétinoblastome existent : unilatérale (un œil atteint), bilatérale (les 2 yeux atteints) ou trilatérale (touchant la glande pinéale). Ce cancer peut également être unifocal ou multifocal avec une moyenne de 6 tumeurs par enfants (2-4). Sur la figure 1 ci-dessous, une photo d'une tumeur plurifocale.

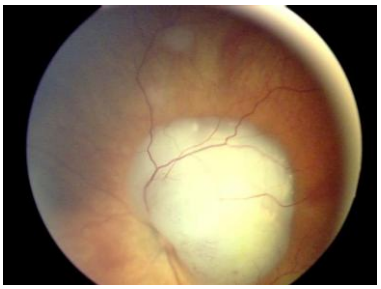


Figure 1 : Rétinoblastome plurifocal photographié par caméra RETCAM® (3)

1.1.1. Génétique

40 % des cancers de ce type sont héréditaires, ce qui engendre, le plus souvent, une tumeur bilatérale. Par ailleurs, il peut également être non-héréditaire et cela produit toujours des tumeurs unilatérales (2-4). Le rétinoblastome apparaît après deux mutations sur le gène Rb1. Ce dernier, jouant un rôle de suppresseur de tumeur, se trouve sur le chromosome 13q14 (1, 5). La première mutation, qui est germinale, confère une prédisposition pour le type héréditaire du rétinoblastome. La transmission se fait de manière autosomique dominante. Le cancer se développe lorsqu'une deuxième mutation se fait dans les tissus somatiques (1, 6). Une mutation sur ce gène représente également un facteur de risque pour le développement de cancer secondaire dû à la perte de son activité suppresseur de tumeur (5).

1.1.2. Symptômes

Le signe principal d'une atteinte par le rétinoblastome est la leucocorie ou « œil de chat amaurotique ». Ce dernier se manifeste par une tâche blanchâtre dans l'œil, correspondant à la visualisation directe de la tumeur à travers l'œil. Ce signe est essentiellement mis en évidence en présence d'une lumière intense telle que le flash d'une photo. Dans 20 % des cas, la tumeur se traduit par un strabisme (2, 3, 5, 7). La prise en charge de ces symptômes le plus rapidement possible est importante afin d'éviter l'étendue de la tumeur et permettre ainsi, la diminution de la morbidité due aux traitements (3, 5). Sur la figure 2 ci-dessous, la tumeur est visible à travers l'œil.

Figure 2: Photo d'un enfant présentant une leucocorie (6)

1.1.3. Traitements du rétinoblastome

La prise en charge doit être adaptée à chaque cas de cancer et doit être réévaluée en fonction de la réponse au traitement (8). Ce dernier a différents buts tels que sauver la vie de l'enfant, sauver les organes atteints, garder la meilleure vue possible et conférer la meilleure qualité de vie pour l'enfant autant pendant, qu'après le traitement (2).

L'énucléation était le traitement de choix afin d'éviter que la tumeur ne se propage dans le reste de l'organisme. A l'heure actuelle, elle est encore pratiquée pour les cas avancés de rétinoblastome et lorsqu'un traitement conservateur n'est pas envisageable (2-4, 8). Un examen histologique de la pièce d'énucléation est effectué pour décider du traitement postopératoire (7). Par ailleurs, cette énucléation diminue drastiquement la qualité de vie du patient puisque son/ses œil/yeux est/sont enlevé(s) (6).

La radiothérapie externe a largement été utilisée comme traitement de premier choix. Cela a été possible car la tumeur de la rétine présente une hypersensibilité aux rayons X. Cette technique induit des effets indésirables graves pouvant être de l'ordre endocrinien, ophtalmologique, esthétique et/ou induire des tumeurs secondaires (2, 4, 7, 8). Dû aux conséquences citées ci-dessus, le développement de nouvelles méthodes s'est révélé nécessaire afin de minimiser le recours à cette technique et de préserver au maximum la vision. Cette pratique est, par ailleurs, toujours utilisée lors de récidive de la tumeur. Avant d'utiliser un traitement conservateur, une première phase de chimiothérapie néoadjuvante peut être appliquée afin de diminuer la taille de la tumeur et ainsi, la rendre accessible aux traitements conservateurs (3, 8). Ce traitement est constitué d'une combinaison de 2 ou 3 médicaments tels que la vincristine, l'étoposide et le carboplatine (7) qui causent différents effets indésirables (9).

Divers traitements conservateurs existent comme la thermothérapie qui consiste à élever la température de l'œil ou de la tumeur entre 45 et 60 °C à l'aide d'un rayon laser (8, 10), ou la thermochimiothérapie qui est l'application de la thermothérapie une à deux heures après l'administration de carboplatine par perfusion intraveineuse. L'élévation de la température semblerait augmenter la perméabilité des membranes et donc, l'augmentation de la perméabilité de l'agent chimiothérapeutique (8). Il existe aussi la cryothérapie, qui consiste à diminuer la température jusqu'à -80 °C, et la curiethérapie consistant en l'implantation d'un disque d'iode ou ruthénium (3, 4, 7). Le choix du traitement adjuvant dépend, entre autres, du nombre de tumeur, de leur localisation, de la présence d'un décollement de la rétine, de l'âge ou des antécédents.

Il est important de savoir qu'avec ces différents traitements, le taux de survie est de 95 % pour les personnes atteintes du rétinoblastome dans les pays industrialisés (3, 6, 7, 11).

1.2. Melphalan

Le melphalan est un agent alkylant aussi bien utilisé chez l'adulte que chez l'enfant pour le traitement de tumeurs solides (12). Il est, entre autres, recommandé dans le traitement du myélome multiple, du carcinome ovarien avancé et du carcinome mammaire. Kaneko & al ont découvert que le melphalan était l'agent chimiothérapeutique le plus efficace dans le traitement du rétinoblastome, après avoir testés 12 agents différents (9, 13). Ils l'ont alors utilisé pour la première fois par voie intra-artérielle, dans le traitement du rétinoblastome et celui-ci a montré un bon contrôle de la tumeur avec peu d'effets indésirables sévères (11, 14). L'avantage majeur de l'utilisation du L-PAM par administration sélective dans l'œil est d'éviter la toxicité systémique induite par la chimioréduction (6, 11). Le

melphalan, injecté par voie intra-vitréenne, semblerait augmenter le pourcentage d'œil sauvé lors de rétinoblastome (15).

1.2.1. Stabilité

Par ailleurs, le problème majeur de ce médicament est sa stabilité. En effet, il se dégrade très rapidement par hydrolyse spontanée, lorsqu'il se trouve en milieu aqueux. Cela génère deux produits de dégradation : le monohydroxymelphalan qui est instable et qui se dégrade ensuite, en dihydroxymelphalan (12, 16-18). De nombreuses études sur la stabilité du melphalan ont été effectuées et elles ont révélé que sa stabilité est augmentée lorsqu'il se trouve dans une solution de NaCl, conservé au réfrigérateur et à l'abri de la lumière (12, 18, 19). Il semblerait également que la dégradation du melphalan diminue s'il se trouve dans des conditions acides (20). La concentration du médicament aurait également une influence sur sa stabilité. En effet, les poches contenant une concentration plus élevée en L-PAM présentent une meilleure stabilité et cela serait dû à une vitesse plus élevée de diminution du pH suite à la libération du ion chlorure dans les solutions (12, 18). Sur la figure 3 ci-après, le mécanisme de substitution nucléophile et la formation des produits d'hydrolyses sont montrés.

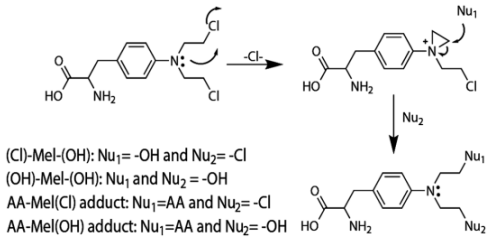
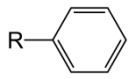
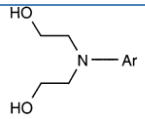
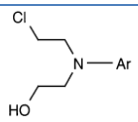
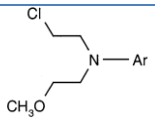
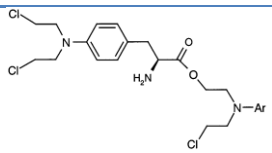


Figure 3 : Réaction de substitution nucléophile et formation des produits d'hydrolyse (17)

Diverses impuretés se retrouvent dans les solutions de melphalan. Elles viennent soit de la dégradation, soit de la synthèse, ou encore des deux (20). Dans le tableau 1 ci-dessous, sont présentées les impuretés principales trouvées dans le melphalan ainsi que leur structure et leur origine.

Tableau 1 : Principales impuretés présentent dans le melphalan, leur structure chimique et leur origine

Nom composé	Structure chimique (20)	Origine (20)
Aryle		
Dihydroxymelphalan		Synthèse et dégradation
Monohydroxymelphalan		Synthèse et dégradation
Methoxymelphalan		Dégradation
Dimère de Melphalan		Synthèse et dégradation

1.2.2. Mode d'action

Les agents alkylants sont des molécules hautement électrophiles qui interagissent avec des groupements nucléophiles, tels que les groupements –SH, -OH, -COOH, -NH pour former des liaisons covalentes. Ils réagissent essentiellement avec l'ADN et les protéines. Lors de la substitution nucléophile, les agents alkylants transfèrent des groupements alkyles comme des méthyles ou éthyles. La liaison covalente avec ces molécules engendre l'arrêt de la division cellulaire, la réparation de l'ADN et donc, la réparation des dommages faits par le cancer ou encore, induit l'apoptose des cellules. Le melphalan fait partie de la famille des moutardes azotées et c'est le motif bis(2-chloroéthyle)amino qui est responsable de son activité. L'atome d'azote est capable de substituer un ion chlorure pour donner naissance à un ion aziridinium hautement électrophile qui peut alkyler l'ADN ou les protéines. Le melphalan comporte 2 groupes alkylants qui interagissent chacun avec une guanine de la chaîne d'ADN et donc, rattachent les 2 brins, ce qui empêche le désenroulement de ce dernier lors de la réplication ou de la transcription (17, 21-23). Sur la figure 4 ci-contre, le mécanisme de formation du ion aziridinium et l'alkylation de l'ADN par le médicament est représenté.

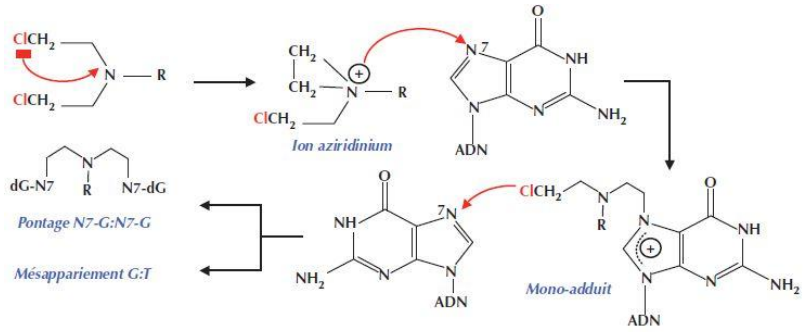


Figure 4 : Mécanisme de formation du ion aziridinium et alkylation en position 7 de la guanine (22)

1.3. Méthode analytique

1.3.1. Fonctionnement

Différentes méthodes analytiques ont été décrites dans la littérature pour l'étude de stabilité du melphalan, mais l'HPLC-RP est la technique la plus couramment utilisée en étant couplée à un détecteur, soit UV, soit fluorescent. Selon les différentes Pharmacopées, l'HPLC est la méthode de choix. Lors de ce travail, c'est une HPLC en phase inverse couplée à un détecteur UV-DAD qui va être utilisée, car c'est le matériel disponible dans le laboratoire et que cette méthode est décrite dans la Ph. Eur. 8.8 pour l'étude du melphalan.

L'HPLC en phase inverse est la méthode séparative chromatographique la plus répandue pour les analyses pharmaceutiques, autant pour l'identification des impuretés que pour le contrôle de qualité (24-26). Cette technique est très sensible et facilement adaptable aux analyses quantitatives. De plus, elle permet de séparer aussi bien des molécules non-volatiles que thermosensibles (26). Le but de l'HPLC est de séparer et de quantifier les différents analytes présents dans un échantillon (24).

L'HPLC consiste en une séparation physique conduite par une phase liquide. Les molécules sont séparées grâce aux interactions entre la phase mobile et la phase stationnaire (24). La phase stationnaire apolaire est généralement obtenue par une réaction de silylation (27). Pour éluer les molécules, la phase mobile doit avoir une polarité inverse à la phase apolaire ; c'est pour cela qu'elle

est, en principe, constituée d'eau et de solvants organiques tels que le méthanol, l'éthanol, l'acétonitrile et le tétrahydrofurane (25, 28). Ces solvants doivent être de qualité HPLC afin d'éviter des interactions ou de perturber la séparation des analytes (27).

Un détecteur en ligne permet de mesurer les concentrations de chaque molécule séparée dans la colonne et cela génère un chromatogramme. Généralement, les pics ont une forme gaussienne dont la largeur des pics (w_b) devient plus grande lorsque le temps de rétention augmente.

Le mode gradient est, en général, utilisé car il permet la séparation de solutés ayant des polarités très différentes. Cela permet aussi d'augmenter la résolution, diminuer le temps d'analyse et d'améliorer la sensibilité. Une phase de lavage est, en revanche, nécessaire afin d'éviter la présence de pics artéfacts (27).

Le temps de rétention d'un analyte correspond au temps qu'il met pour atteindre le détecteur. Il est nécessaire d'injecter une molécule qui n'est pas retenue dans la colonne pour obtenir le temps mort nécessaire au calcul du temps de rétention des analytes séparés. Le temps de rétention permet d'identifier les composés mais dépend du débit de la phase mobile et des dimensions de la colonne. De ce fait, il est préférable d'utiliser le facteur de rétention qui est définit selon l'équation suivante :

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \qquad (1)$$

Où t_R est le temps de rétention des analytes et t_0 le temps mort de la colonne. Les valeurs de k' doivent, généralement, se trouver entre 1 et 20. Plus la valeur de k' augmente, plus le composé est retenu (24).

Le facteur de sélectivité mesure l'efficacité du processus de séparation entre deux molécules. Pour avoir une séparation des molécules, il est nécessaire que les valeurs de k pour chaque composé soient différentes. Le facteur de sélectivité est déterminé par l'équation 2 ci-dessous :

$$\alpha = \frac{k2}{k1} = \frac{t_{r2} - t_0}{t_{r1} - t_0} \qquad (2)$$

Ce facteur doit être supérieur à 1.0 pour permettre la séparation de deux pics. Ce dernier dépend de la nature de la phase stationnaire et de la composition de la phase mobile (24, 27).

Le nombre de plateaux théoriques (N) est une mesure quantitative de l'efficacité de la colonne. Ce nombre doit être optimisé soit en augmentant la taille de la colonne, soit en utilisant des colonnes packées avec des molécules de diamètre inférieur. La colonne est très importante en termes de résolution de séparation. En effet, plus la colonne est longue, plus le nombre de plateaux théoriques est grand et plus la résolution est élevée. En revanche, plus la colonne est longue, plus le temps de rétention sera long et par conséquent, celui de l'analyse le sera aussi. L'efficacité de la colonne est donnée par l'équation 3 suivante :

$$N = \frac{L}{H} = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2 = 16\left(\frac{t_R}{w_b}\right)^2 = 5.54\left(\frac{t_R}{w_{1/2}}\right)^2 \qquad (3)$$

Où $w_{1/2}$ représente la hauteur du pic à mi-hauteur.

La résolution en HPLC représente le degré de séparation entre deux pics adjacents et est définit dans l'équation 4 ci-après :

$$Rs = \frac{t_{R1} - t_{R2}}{\left(\frac{w_{b1} + w_{b2}}{2}\right)} = \frac{\Delta t_R}{w_b} \qquad (4)$$

Une valeur de R_s de 1.5 signifie que la séparation à la base, entre deux pics, est complète. L'efficacité de la séparation d'une analyse HPLC est dépendante aussi bien des facteurs thermodynamiques que des facteurs cinétiques. La relation est représentée dans l'équation 5 suivante :

$$R_s = \left(\frac{k'}{k'+1}\right)\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)\left(\frac{\bar{N}}{4}\right) \qquad (5)$$

La résolution est donc contrôlée par la rétention, la sélectivité et l'efficacité (24, 27).

Dans ce travail, le détecteur d'absorption UV-DAD sera utilisé. Il mesure la portion de lumière UV/visible absorbée après que le rayon lumineux ait traversé l'échantillon. Ce détecteur est très sensible mais peu sélectif. Ce type de détecteur permet de mesurer simultanément toutes les longueurs d'ondes UV (27).

1.3.2. Étalon interne

L'étalon interne est une molécule ajoutée à une solution, dont la concentration est connue, et présentant un facteur de sélectivité différent de celui des molécules d'intérêts. De plus, son temps de rétention ne doit pas être beaucoup plus grand que celui de la molécule d'intérêt. Il est utilisé en calculant le ratio des aires, soit l'AUC de la molécule d'intérêt divisé par l'AUC du standard interne (29). De plus, la molécule doit avoir une réponse similaire envers le détecteur à la molécule d'intérêt, soit le melphalan. Il est également nécessaire que la molécule utilisée soit stable en solution (30). Les étalons internes sont essentiellement utilisés pour corriger d'éventuelles différences de volume d'injection ou corriger les différences obtenues lors de procédures d'extractions (30).

1.4. Contexte et but du travail

Les solutions d'Alkeran® sont essentiellement reconstituées dans l'unité de fabrication du CHUV et sont utilisées dans le cadre de divers cancers tel que le rétinoblastome à l'hôpital ophtalmique de Lausanne. Le problème majeur de ce médicament est, comme mentionné précédemment, sa stabilité. De plus, une faible quantité de la solution reconstituée est utilisée afin de ne prélever qu'un mL de la solution après diverses dilutions. En plus d'un problème de stabilité, il y a donc une perte considérable du produit.
Ce travail de recherche a pour but d'optimiser la méthode analytique utilisée pour l'étude de stabilité du melphalan. Un essai de validation de la méthode analytique va également être fait. Une étude de stabilité du L-PAM va être effectuée, et il va être recherché d'optimiser la méthode de préparation des solutions de melphalan.
Le but final de ce travail est d'éventuellement proposer des changements dans la méthode de préparation des solutions d'Alkeran® au sein de l'unité de fabrication du CHUV, ainsi que de formuler des recommandations pour la conservation de ce médicament.

2. Matériel et méthode

2.1. Matériel

La balance analytique utilisée est la Metler Toledo AX205 DeltaRange® (Metler Toledo AG, Columbus, Etats-Unis) ; le bain à ultrasons vient de Metler Toledo (Metler Toledo AG, Columbus, Etats-Unis) ; les filtres GHP sont obtenus chez Pall (Pall Corporation, New York, Etats-Unis) ; la plaque à agitation IKA®RET vient de chez IKA (IKA Works, Breisgau, Allemagne) ; les seringues Luer-Lock™ en polypropylène de 1 mL, 5 mL, 10 mL, 50 mL ainsi que les aiguilles Microlance 3 (1.1 x 4.0 mm) viennent de chez BD (BD, Franklin Lakes, Etats-unis) ; les seringues de 1 mL Omnifix®-F Tuberculin de chez BBraun (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Allemagne) ; les bouchons pour seringues Combi-Lock stériles en polypropylène sont fournis par Codan (Codan pvb Medical GmbH, Lensahn, Allemagne) ; les poches de perfusion de 150 mL sont obtenues chez Fresenius (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg vor der Höhe, Allemagne) ; les appli Mask viennent de chez Applimed (Applimed SA, Châtel-Saint-Denis, Suisse) ; les poches de perfusion de NaCl 0.9 % viennent de chez BBraun (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Allemagne) ; le cryocongélateur provient de chez Arctiko (Arctiko A/S, Esbjerg, Danemark) ; les tubes de 10 mL en polypropylène viennent de chez Sarstedt (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Allemagne) ; les pipettes Falcon de 1, 2, 5 et 10 mL viennent de chez Corning (Pittsburgh Corning SA, Etat de New-York, Etats-Unis) ; les micropipettes viennent de chez Socorex (Socorex Isba SA, Ecublens, Suisse) ; Le réfrigérateur et congélateur viennent de chez FORS Mediline (FORS AG, Studen, Suisse).

2.2. Produits

L'eau, l'acétonitrile et l'isopropanol de qualité HPLC sont fournis par Merck, comme l'acide acétique glacial (Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne) ; la triéthylamine et l'acétate d'ammonium ont été fourni par Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Etats-Unis) ; l'acide acétique glacial vient de chez Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne) ; le propylparahydroxybenzoate, le melphalan hydrochloride et le melphalan pour conformité du système ont été obtenus auprès des laboratoires de la Pharmacopée Européenne (EDQM, Pharmacopée Européenne, Strasbourg, France) ; la solution de NaCl 0.9 % vient de chez Bichsel (Bichsel AG, Interlaken, Suisse) ; l'Alkeran® provient de chez Pro Concepta (Pro Concepta Zug AG, Baar, Suisse) ; le povidone K12 vient de chez BASF (BASF, Ludwigshafen, Allemagne).

2.3. Analytique

2.3.1. Appareillage

Toutes les analyses ont été effectuées sur l'appareillage de chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC) comprenant : une pompe HPLC Prostar 230, un injecteur automatique HPLC Prostar 410, un détecteur UV/VIS Prostar 310, un détecteur photodiode Prostar 335, deux colonnes en ligne en phase inverse post-greffées avec des chaînes alkyles C18 (Merck, Chromolith® Rp-18 e, 100-4.6 mm) qui sont protégées par une pré-colonne (Merck).

2.3.2. Conditions chromatographiques et optimisation de la méthode analytique

La méthode d'analyse, préalablement améliorée par Sarah Wellnitz (31) basée sur la Pharmacopée Européenne 8.5 a été optimisée. La phase mobile utilisée était composée des 2 phases décrites ci-contre et la préparation s'est faite selon le protocole se trouvant en annexe 1 :

- Solution A : 5 volumes d'acétonitrile et 95 volumes d'eau contenant 0.01 % (v/v) de triéthylamine, 0.05 % (m/m) d'acétate d'ammonium et 0.05 % (v/v) d'acide acétique glacial
- Solution B : 60 volumes d'acétonitrile et 40 volumes d'eau R contenant 0.01 % (v/v) de triéthylamine, 0.05 % (m/m) d'acétate d'ammonium et 0.05 % (v/v) d'acide acétique glacial.

La méthode utilisait un mode gradient définit dans le tableau 2 ci-dessous :

Tableau 2 : Méthode analytique avant optimisation

Intervalle [min]	Phase A [% v/v]	Phase B [% v/v]
0-20	100 → 0	0 → 100
20-25	0	100

Débit de phase mobile : 1.5 mL/min avec un détecteur spectrophotomètre à 260 nm et un volume d'injection de 20 µL. Le temps d'équilibration était de 35 minutes. Le temps total de la méthode était de 1 heure.

La méthode analytique optimisée utilisait le mode gradient et les conditions chromatographiques du tableau 3 ci-dessous :

Tableau 3 : Méthode analytique finale = méthode analytique optimisée

Intervalle [min]	Phase mobile A (% v/v)	Phase mobile B (% v/v)
0-15	100 → 25	0 →75

Débit de la phase mobile : 2.5 mL/min avec un détecteur spectrophotomètre à 260 nm et un volume d'injection de 20 µL. Le temps d'équilibration était de 5 minutes. La séparation a été faite sur deux colonnes en ligne maintenues à 4 °C. Le logiciel LC-Workstation Multi Instrument Version 6.41 Varian ProStar a été utilisé pour l'acquisition ainsi que le traitement des données. Le temps total de la méthode analytique était de 20 minutes.

2.3.3. Test des colonnes

Un test des colonnes a été fait en suivant le certificat d'analyse ci-contre : injection d'un mélange de thiourée 10 µg/mL, de progestérone 100 µg/mL et d'anthracène 10 µg/mL avec une phase mobile ACN/Eau (60/40) à un débit de 2 mL/min, avec une détection UV à 254 nm. Le mélange a été injecté 10 fois et les temps de rétention des molécules ont été relevés pour calculer la moyenne, l'écart-type et le CV.

2.3.4. Etude de stabilité

Des études de stabilité ont été effectuées pour 3 produits ; l'étalon interne, le blanc ainsi que le melphalan dans sa phase finale d'injection. La méthode optimisée a été appliquée à ces études.

2.3.4.1. Propylparabène – Etalon interne

Une solution de 10 µg/mL de propylparabène a été faite selon le protocole en annexe 2. 20 µL de cette solution ont été injectés à t0, 1, 3, 24, 48, 72 et 144 heures sur l'HPLC. Les AUC obtenues ont été comparées à celles eues à t0. La moyenne, l'écart-type et le CV ont été calculés.

2.3.4.2. Blanc

Une solution du blanc a été préparée d'après le protocole en annexe 3. 20 µL ont été injectés selon la méthode optimisée sur l'HPLC à t0, 24, 48 et 72 heures. Les chromatogrammes obtenus ont été superposés.

2.3.4.3. Melphalan dans sa phase finale d'injection

La stabilité du melphalan dans une solution 2 % acide acétique (v : v) MeOH sur une journée a été testée. Une solution d'Alkeran® à 100 µg/mL a été faite selon l'annexe 4. Cette solution a été injectée à différents temps durant la journée à raison de 20 µL. L'idée de cette solution venait de article dans lequel le propylparabène a été cité comme étalon interne, soit la référence (32). La moyenne des AUC, l'écart-type et le CV ont été calculés.

2.3.5. Validation de la méthode

2.3.5.1. Spécificité

Une solution à 1 mg/mL de melphalan pour conformité du système dans une solution 2 % acide acétique (v : v) MeOH a été faite et placée 15 min à l'étuve à 60 °C. 20 µL ont été injectés sur HPLC et les chromatogrammes ont été analysés. Le chromatogramme obtenu pour le blanc a aussi été analysé.

2.3.5.2. Standard de calibration

Trois niveaux de concentrations ont été faits, soit 5, 15 et 30 µg/mL. Deux séries ont été effectuées et les dilutions ont été faites dans une solution 2 % acide acétique (v : v) MeOH selon le protocole se trouvant en annexe 5. Les ratios des AUC du melphalan sur le propylparabène ont été calculés et insérés dans le programme de validation. Les AUC du melphalan ont également été insérées dans le programme Enoval pour évaluer la validation de la méthode analytique.

2.3.5.3. Standard de validation

Trois niveaux de concentrations ont été faits, soit 5, 15 et 30 µg/mL selon le protocole se trouvant en annexe 6. Deux séries ont été effectuées. Les ratios des AUC du melphalan sur le propylparabène ont été calculés et insérés dans le programme Enoval pour évaluer la validation. Les AUC du melphalan seules ont également été insérées dans le programme pour regarder la validation de la méthode analytique.

2.4. Fabrication

2.4.1. Temps de remplissage des seringues

Le temps nécessaire pour remplir 100 seringues en prélevant dans une poche de perfusion et ôter les aiguilles pour les remplacer par des bouchons Combi-Lock a été évalué. Les 100 seringues ont été préparées à l'avance en plaçant les aiguilles sur les seringues. Les bouchons Combi-Lock ont été sortis de leur emballage au préalable. Le temps a été mesuré avec un chronomètre depuis le prélèvement de la première seringue jusqu'à la dernière. Le temps a été mesuré pour remplir 100 seringues une seule fois pour le comparer à 5 remplissages de 20 seringues. Dans un 2ème temps, le temps nécessaire pour remplir 50 seringues a été évalué avec la poche Freka® préalablement remplie avec de l'eau distillée.

2.4.2. Temps pour congélation de 10 seringues selon 2 modes

Le temps nécessaire pour congeler 10 seringues de 1 mL remplies de solution de NaCl 0.9 % a été mesuré. La solution NaCl était soit à T° ambiante, soit refroidie au préalable (une nuit au réfrigérateur). Le temps de congélation a été comparé entre deux modes de congélation : le cryocongélateur et de la neige carbonique contenue dans une boîte en Sagex.

2.4.3. Temps pour congélation poche de perfusion

Le temps nécessaire pour congeler une poche de perfusion remplie de solution NaCl 0.9 % a été évalué. Pour cela, deux poches de perfusions de 100 mL ont été placées au congélateur à une T° de -22 °C pendant 20 et 60 minutes.

2.4.4. Etude de dégradation du melphalan à température ambiante

La dégradation du melphalan a été observée à température ambiante après sa reconstitution. Cette dernière a été faite selon le protocole de l'annexe 7. Une solution de melphalan à 20 µg/mL a été injectée en triplicata à t0. Le tube contenant la solution de melphalan à 5 mg/mL a été gardé à T° ambiante sous la chapelle. Le protocole de l'annexe 7 a été répété à t6 et 48 heures.

2.4.5. Etude de stabilité du melphalan au congélateur

L'étude de stabilité du melphalan a été faite en ajoutant le volume nécessaire de solution reconstituée d'Alkeran® dans les poches de perfusion remplies de solution NaCl et refroidies au préalable. Les concentrations extrêmes d'utilisation des solutions ont été étudiées, soit 15 µg/mL et 200 µg/mL.

2.4.5.1. Poche de perfusion à 15 µg/mL

Les poches ont été préalablement remplies avec 99.7 mL de solution NaCl 0.9 % et 0.3 mL de solution d'Alkeran® 5 mg/mL a été ajouté dans la poche. Cette dernière a été mélangée efficacement et des volumes de 1 mL ont été prélevés dans des seringues en polypropylène (Omnifix®-F Tuberculin). Lors du prélèvement de la solution, les seringues ont directement été placées dans de la neige carbonique puis, ont été amenées dans un congélateur à -18 °C. Les solutions à 15 µg/mL ont été diluées 2 fois avant d'être injectées sur HPLC, soit 5 mL de solution 15 µg/mL dilué ad 10 mL avec solution 2 % acide acétique (v : v) MeOH. L'étude de stabilité a été faite sur 1 mois, soit à t0, 1, 2, 3 et 4 semaines. Le pourcentage relatif par rapport à la concentration obtenue à t0 a été étudié.

2.4.5.2. Poche de perfusion à 200 µg/mL

Le même mode de préparation que pour les solutions à 15 µg/mL a été suivi. 4 mL de solution reconstituée de melphalan (5 mg/mL) ont été ajoutés dans une poche de perfusion contenant 96 mL de solution NaCl 0.9 % refroidie. Après prélèvement, les seringues ont été placées au congélateur. Pour l'étude de stabilité, les solutions de melphalan 200 µg/mL ont été diluées 10 fois puis injectées. La dilution a été faite en mettant 1 mL de solution 200 µg/mL dilué ad 10 mL de solution 2 % acide acétique (v : v) MeOH. L'étude de stabilité a été faite en comparant les concentrations des t0 avec les concentrations obtenues après 1, 2, 3 et 4 semaines de congélation.

2.4.6. Temps pour décongélation des seringues et étude de stabilité du melphalan après décongélation

Le temps nécessaire à la décongélation de trois seringues à T° ambiante et à T° réfrigérée a été mesuré. Des seringues contenant des solutions à 200 µg/mL ont été sorties du congélateur et ont été laissées à l'air libre. Le temps de décongélation a été mesuré dès que les seringues ont été sorties du congélateur jusqu'à ce que le liquide se trouvant dans la seringue ait été entièrement décongelé. Le même procédé a été répété pour d'autres seringues mais à une température de 4.6 °C.

Une fois les seringues décongelées, un essai de stabilité du melphalan a été effectué sur les solutions conservées à T° réfrigérée et à T° ambiante. Pour cela, dès que la première seringue a été décongelée, elle a été injectée sur l'HPLC après la préparation de l'échantillon comme précisé en annexe 8. Le même procédé a été répété après t0.5, 1, 1.5, 3, 3.5, 4.5 et 5 heures.

2.5. Points critiques et améliorations

Lors de l'ancien travail effectué sur ce sujet, différents éléments critiques ont été relevés. Pour commencer, un étalon interne n'avait pu être obtenu dans les temps impartis. Lors de ce travail, le standard interne sera le propylparabène.

De plus, la méthode analytique n'avait pas été validée et donc, seulement le pourcentage relatif par rapport aux AUC obtenues pour le t0 avaient été fait. Lors de ce travail, un essai de validation de la méthode va être fait et le pourcentage relatif par rapport aux concentrations obtenues à t0 va être étudié.

D'une autre part, le blanc n'avait pas été effectué correctement. Il n'était donc pas certain que les composés présents dans les solutions de melphalan n'interféraient pas avec ce dernier. C'est pour cela que le povidone K12 a été ajouté au blanc.

De plus, seules des mesures indicatives sur la stabilité du melphalan à des T° de -20 °C et -80 °C ont été faites. En plus de cela, les seringues qui avaient été utilisées pour effectuer ces essais ne correspondaient pas au conditionnement final utilisé au CHUV. Dans ce travail, c'est essentiellement cette partie qui va être étudiée, soit la stabilité de solutions d'Alkeran® à des températures basses (-20 °C).

3. Résultats

3.1. Analytique

3.1.1. Optimisation de la méthode analytique

Le melphalan a été injecté à une concentration de 20 µg/mL selon l'optimisation faite par Sarah (31). Le temps durant lequel 100 % de phase B passe à travers la colonne a été enlevé. Le débit est augmenté pour arriver à 2.5 mL/min avec un temps d'équilibration de 5 minutes. Les différentes molécules présentent dans l'échantillon injecté sont bien séparées et sont toutes détectées avant les 13 minutes de run. Dû à cela, le gradient passe de 100 à 25 % de phase A et de 0 à 75 % de phase B car il est arrêté après 15 minutes. La séparation des molécules du melphalan, ses produits de dégradation ainsi que le propylparabène est visible sur la figure 5 ci-dessous et a été faite selon la méthode analytique optimisée. Les pics 1 et 2 présentent un facteur de sélectivité de 4.38 selon l'équation 2. Les pics 2 et 3 ont un facteur de sélectivité de 1.08, les pics 3 et 4 ont une valeur de 2.18 et pour finir, les pics 4 et 5 présentent une valeur de 1.42. Les calculs se trouvent en annexe 9. La répétabilité des temps de rétention des molécules a également été évaluée en injectant plusieurs fois le même échantillon avec la méthode analytique optimisée. Cela est visible sur la figure 5 ci-dessous, car les chromatogrammes ont été superposés et les pics sortent toujours aux mêmes temps de rétention.

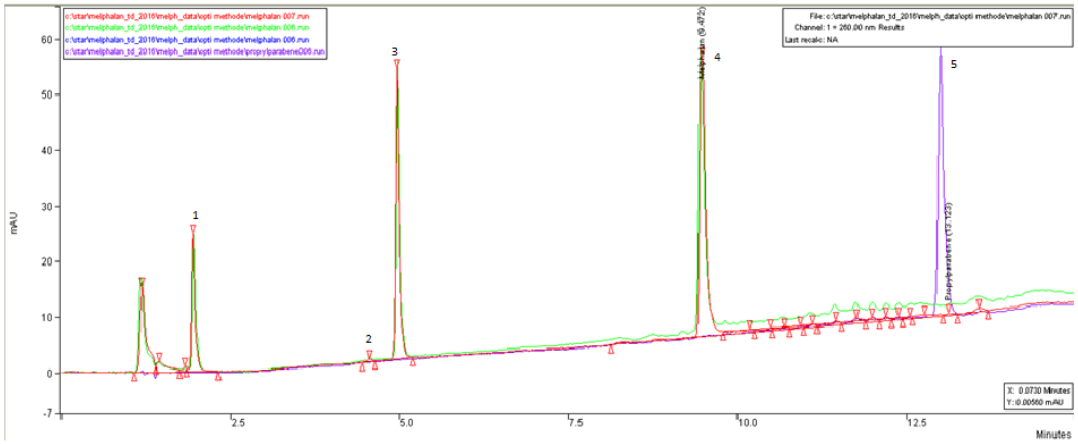


Figure 5 : Chromatogramme du melphalan et propylparabène selon la méthode analytique optimisée

3.1.2. Test des colonnes

Dans le tableau 4 ci-dessous, les temps de rétention des différents analytes, soit le thiourée, la progestérone et l'anthracène sont présentés. La moyenne, l'écart-type et les CVs des temps de rétention de chaque molécule ont été calculés et sont montrés dans le tableau 4 suivant.

Tableau 4 : Résultats temps de rétention pour le test des colonnes

N° injection		Thiourée	Progestérone	Anthracène
1	Temps rétention [min]	1.503	3.949	6.167
2		1.519	3.939	6.130
3		1.527	4.011	6.271
4		1.520	3.949	6.150
5		1.526	3.940	6.119
6		1.523	3.943	6.133
7		1.520	3.942	6.135
8		1.520	3.954	6.174
9		1.527	3.996	6.201
10		1.528	3.967	6.169
Moyenne [Min]		**1.521**	**3.959**	**6.165**
Ecart-type		**0.007**	**0.025**	**0.045**
CV [%]		**0.478**	**0.632**	**0.728**

3.1.3. Etude de stabilité

3.1.3.1. Propylparabène – Etalon interne

Dans le tableau 5 ci-contre, les AUC obtenues pour les injections de propylparabène lors de l'étude de sa stabilité sur plusieurs jours sont présentées, ainsi que la moyenne, l'écart-type et le CV.

Tableau 5 : AUC du propylparabène pour son étude de stabilité

Date	Heure d'injection	Temps [heure]	Moyenne AUC [mAu]	Pourcentage [%]
15.03.2016	09:34	0	3378979.33	100.00
15.03.2016	11:13	2	3328135.67	98.50
15.03.2016	14:04	5	3311080.00	97.99
16.03.2016	11:08	24	3438096.33	101.75
17.03.2016	10:33	49	3368566.00	99.69
17.03.2016	13:06	51	3347973.00	99.08
18.03.2016	10:21	72	3339211.33	98.82
21.03.2016	10:04	144	3347113.00	99.06
Moyenne			**3357394.33**	**99.36**
Ecart-type			**38968.32**	**1.15**
CV [%]			**1.16**	**1.16**

3.1.3.2. Blanc

Les résultats obtenus pour la stabilité du blanc sont présentés sur la figure 6 ci-dessous. Ici, les chromatogrammes obtenus à t0, 22, 48 et 72 heures sont superposés.

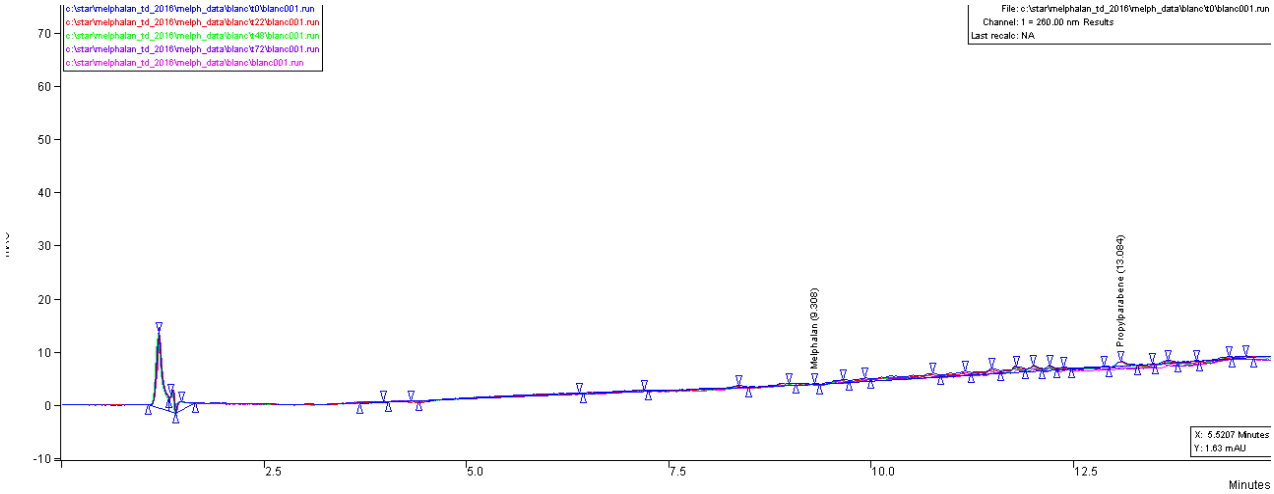


Figure 6 : Superposition des chromatogrammes du blanc obtenus à t0, 22, 48 et 72 heures

3.1.3.3. Melphalan dans sa phase finale d'injection

Dans le tableau 6 ci-dessous, sont présentés les résultats obtenus pour l'étude de stabilité du melphalan dans une solution 2 % acide acétique (v : v) MeOH durant une journée (6 heures). La moyenne, l'écart-type et le CV ont été calculés.

Tableau 6 : AUC du melphalan 100 µg/mL dans solution 2 % acide acétique (v : v) MeOH

Date	Heure d'injection	Temps [h]	AUC melphalan [mAu]	% restant [%]
22.03.2016	10:54	0.00	27459356.00	100.00
22.03.2016	11:16	0.37	27407254.00	99.81
22.03.2016	11:59	1.08	28980598.00	105.54
22.03.2016	12:21	1.45	27428240.00	99.89
22.03.2016	13:16	2.37	28480472.00	103.72
22.03.2016	13:38	2.73	27090390.00	98.66
22.03.2016	14:21	3.45	26795496.00	97.58
22.03.2016	14:43	3.82	26817658.00	97.66
22.03.2016	15:06	4.20	27014264.00	98.38
22.03.2016	15:28	4.57	26937844.00	98.10
22.03.2016	15:51	4.95	26941386.00	98.11
22.03.2016	16:13	5.32	27624688.00	100.60
22.03.2016	16:49	5.92	27686594.00	100.83
22.03.2016	17:11	6.28	26948930.00	98.14
Moyenne			**27400940.70**	**99.79**
Ecart-type			**643265.02**	**2.34**
CV [%]			**2.35**	**2.35**

3.1.4. Validation de la méthode

3.1.4.1. Spécificité

Le chromatogramme du blanc sur la figure 6 auparavant montre qu'aucun pic ne sort aux temps de rétention correspondant à ceux du melphalan et du propylparabène.

Sur la figure 7 ci-dessous, est présenté le chromatogramme obtenu avec la méthode analytique optimisée pour une solution de melphalan pour conformité du système ayant subit une dégradation. Deux chromatogrammes sont superposés, soit, en rouge, celui obtenu avec la méthode analytique optimisée et en bleu, la même méthode analytique à laquelle 5 minutes où 100 % de phase mobile B passent ont été ajoutés. Le chromatogramme fournit par la Ph. Eur. a été comparé aux chromatogrammes obtenus lors de cette étude et se trouve en annexe 10.

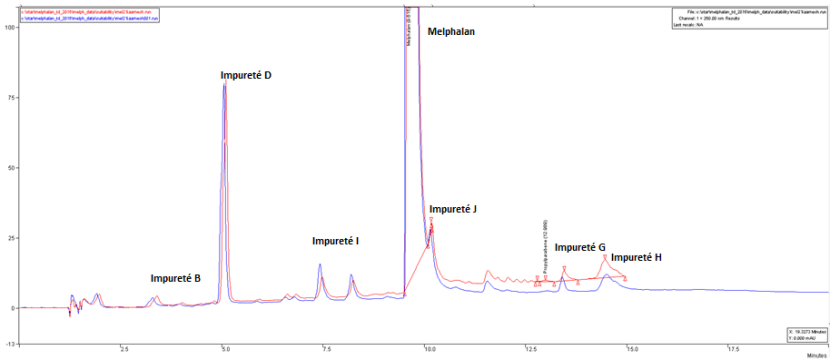


Figure 7 : Chromatogrammes obtenus pour le melphalan pour conformité du système ayant subit une dégradation forcée

3.1.4.2. Standard de calibration et standard de validation

Le rapport complet Enoval de validation de la méthode analytique se trouve en annexe 11. Les valeurs obtenues pour les standards de calibration et de validation qui ont été insérées sur le programme Enoval se trouvent en annexe 12. Sur la figure 8 ci-dessous, est présenté le profil d'exactitude en considérant le modèle de régression linéaire passant par 0 ajustée en utilisant le niveau le plus haut, soit 30 µg/mL.

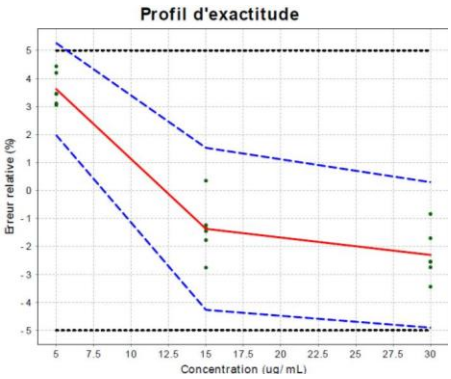


Figure 8 : Profil d'exactitude en considérant le modèle de régression linéaire passant par 0 ajustée en utilisant uniquement le niveau le plus haut

Dans la figure 9 ci-contre, est présenté le profil de risque en utilisant le modèle de régression linéaire passant par 0 ajustée en utilisant le niveau 3.

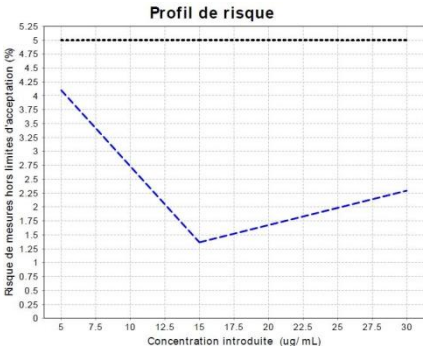


Figure 9 : Profil de risque obtenu en considérant le modèle de régression linéaire passant par 0 ajustée en utilisant uniquement le niveau le plus haut

3.2. Fabrication

3.2.1. Temps de remplissage des seringues

Dans le tableau 7 ci-dessous, sont présentés les temps nécessaires au remplissage de 20 et 100 seringues (temps extrapolés à partir des 20 seringues). La moyenne, l'écart-type et le CV ont été calculés.

Tableau 7 : Temps nécessaires pour remplir 20 seringues et 100 seringues avec poche de perfusion BBraun

N° essais	Temps pour 20 seringues [min]	Temps pour 100 seringues [min]
1	12.72	63.60
2	8.23	41.15
3	7.57	37.85
4	7.05	35.25
5	8.58	42.90
Moyenne [min]	**8.83**	**44.15**
Ecart-type	**2.25**	**11.27**
CV [%]	**25.52**	**25.52**

Le temps nécessaire pour remplir 100 seringues avec la poche de perfusion préalablement remplie de solution NaCl 0.9 % de chez BBraun a été de 44.67 minutes.

Dans le tableau 8 ci-dessous, les temps nécessaires au remplissage de 50 et 100 seringues (temps extrapolés depuis les 50 seringues) avec la poche de perfusion Freka® préalablement remplie d'eau distillée sont exposés. Le tableau contient aussi les moyennes, les écart-types et les CVs calculés.

Tableau 8 : Temps nécessaire au remplissage de 50 et 100 seringues avec poche de perfusion Freka®

N° Essais	Temps 50 seringues [min]	Temps 100 seringues [min]
1	23.66	47.32
2	21.37	42.74
Moyenne [min]	**22.52**	**45.03**
Ecart-type	**1.62**	**3.24**
CV [%]	**7.19**	**7.19**

3.2.2. Temps pour congélation de 10 seringues selon 2 modes

Dans le tableau 9 ci-contre, sont présentés les temps nécessaires à la congélation selon deux modes de congélation, le cryocongélateur et la neige carbonique, de 10 seringues remplies de solution NaCl 0.9 %, qui était soit à T° ambiante soit refroidie.

Tableau 9 : Temps nécessaire à la congélation de 10 seringues selon 2 modes de congélation

Mode de congélation	T° Poche NaCl 0.9 %	Temps congélation [min]
Cryocongélateur	Ambiante	39
	Refroidie	35
Neige Carbonique	Ambiante	19
	Refroidie	13

3.2.3. Temps pour congélation poche de perfusion

Les deux poches de perfusion placées au congélateur étaient congelées lorsqu'elles en ont été sorties après 20 et 60 minutes. Dans les embouts, la solution de NaCl 0.9 % était congelée, empêchant ainsi, le prélèvement de solution pour mesurer la température à l'intérieur de la poche.

3.2.4. Etude de dégradation du melphalan à température ambiante

Dans le tableau 10 ci-dessous, sont présentés les résultats obtenus lors de l'étude de dégradation du melphalan à T° ambiante. La moyenne, l'écart-type et le coefficient de variation ont été calculés et se trouvent dans le tableau ci-dessous.

Tableau 10 : Résultats de dégradation du melphalan en fonction du temps

Date	Heure injection	T [h]	AUC melphalan [mAu]	Moyenne [mAu]	% relatif [%]
19.04.2016	10.42	0.00	8304769.00	8226985.67	100.00
19.04.2016	11.04		8145322.00		
19.04.2016	11.26		8230866.00		
19.04.2016	16.30	5.80	5813285.00	5758492.00	70.00
19.04.2016	16.52		5741440.00		
19.04.2016	17.14		5720751.00		
21.04.2016	9.58	47.25	3599140.00	3559339.00	43.26
21.04.2016	10.19		3562426.00		
21.04.2016	10.41		3516451.00		
Moyenne			5848272.22	5848272.22	71.09
Ecart-type			2022916.98	2335118.14	0.28
CV [%]			34.59	39.93	39.93

3.2.5. Etude de stabilité du melphalan au congélateur

3.2.5.1. Poche de perfusion à 15 µg/mL

Dans le tableau 11 ci-contre, sont présentés les pourcentages relatifs obtenus lors de l'étude de stabilité sur un mois des solutions à 15 µg/mL de melphalan, ainsi que les concentrations calculées. Les résultats complets obtenus lors de cette étude de stabilité se trouvent en annexe 13.

Tableau 11 : Pourcentage relatif des concentrations en fonction de la concentration de t0 et concentration calculées

Temps [semaines]	0		1		2		3		4	
N° Lot	Conc [µg/mL]	% relatif [%]	Conc [µg/mL]	% relatif [%]	Conc [µg/mL]	% relatif [%]	Conc [µg/mL]	% relatif [%]	Conc [µg/mL]	% relatif [%]
1	13.73	100.00	13.35	97.19	13.57	98.84	13.36	97.31	14.08	102.53
2	16.45	100.00	15.82	96.16	15.87	96.49	15.75	95.76	15.09	91.77
3	15.82	100.00	14.77	93.33	15.32	96.80	15.41	97.40	15.20	96.04
4	16.39	100.00	16.01	97.66	16.51	100.74	16.42	100.18	16.19	98.75
Moyenne	**15.60**	**100.00**	**14.98**	**96.09**	**15.32**	**98.2**	**15.24**	**97.66**	**15.14**	**97.27**
Ecart-type	**1.28**	**0.00**	**1.22**	**0.02**	**1.26**	**0.02**	**1.32**	**0.02**	**0.86**	**0.05**
CV [%]	**8.18**	**0.00**	**8.14**	**2.02**	**8.24**	**2.01**	**8.65**	**1.88**	**5.68**	**4.66**

Dans la figure 10 ci-dessous, sont présentés les pourcentages relatifs des concentrations par rapport à celles obtenues pour le t0 des solutions à 15 µg/mL.

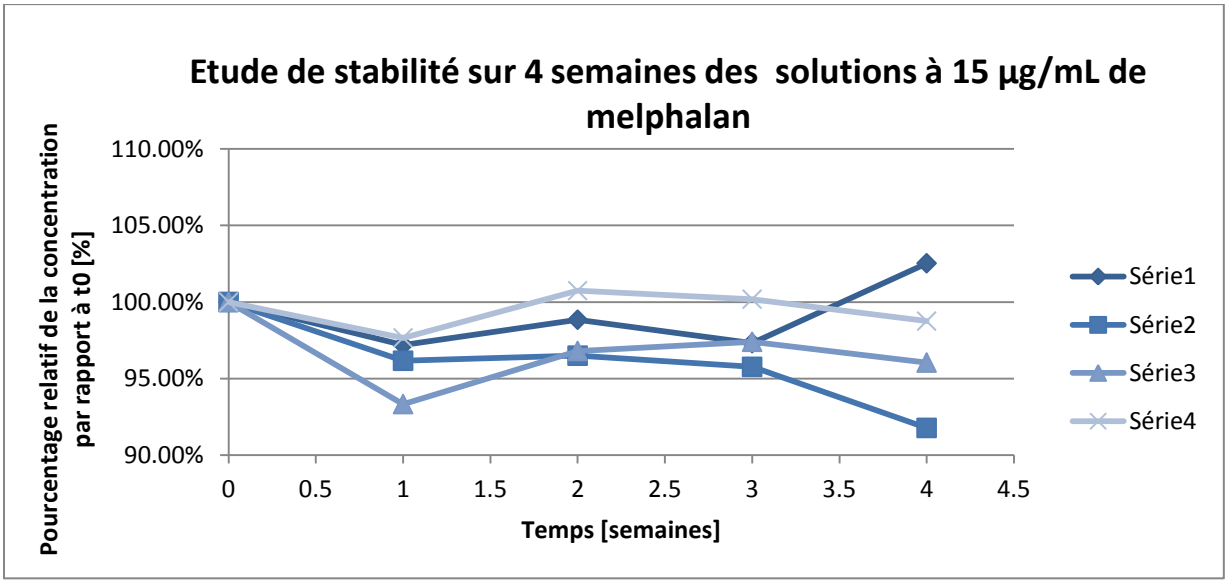


Figure 10 : Etude de stabilité sur 1 mois des poches de perfusion d'une concentration de 15 µg/mL de melphalan

3.2.5.2. Poche de perfusion à 200 µg/mL

Dans le tableau 12 ci-dessous, sont présentés les résultats obtenus pour les 4 poches de perfusion contenant une concentration de 200 µg/mL de melphalan en fonction du temps pour l'étude de stabilité. Autant les pourcentages relatifs par rapport aux concentrations initiales que les concentrations calculées sont présentés. Les résultats complets obtenus pour cette étude se trouvent en annexe 14.

Tableau 12 : Pourcentage relatif des concentrations en fonction de la concentration de t0 et concentrations calculées

Temps [semaines]	0		1		2		3		4	
N° Lot	Conc [µg/mL]	% relatif [%]	Conc [µg/mL]	% relatif [%]	Conc [µg/mL]	% relatif [%]	Conc [µg/mL]	% relatif [%]	Conc [µg/mL]	% relatif [%]
1	227.67	100.00	223.39	98.12	220.93	97.04	228.02	100.16	234.87	103.16
2	232.86	100.00	223.56	96.01	219.34	94.19	223.21	95.86	220.75	94.80
3	233.58	100.00	217.09	92.94	219.19	93.84	222.26	95.15	219.18	93.83
4	229.16	100.00	218.31	95.27	227.14	99.12	236.39	103.16	232.01	101.24
Moyenne	**230.82**	**100.00**	**220.59**	**95.59**	**221.65**	**96.05**	**227.47**	**98.58**	**226.70**	**98.26**
Ecart-type	**2.86**	**0.00**	**3.37**	**0.02**	**3.74**	**0.02**	**6.46**	**0.04**	**7.89**	**0.05**
CV [%]	**1.24**	**0.00**	**1.53**	**2.24**	**1.69**	**2.60**	**2.84**	**3.82**	**3.48**	**4.72**

Dans la figure 11 ci-contre, sont présentés les pourcentages relatifs des concentrations par rapport à t0 en fonction du temps.

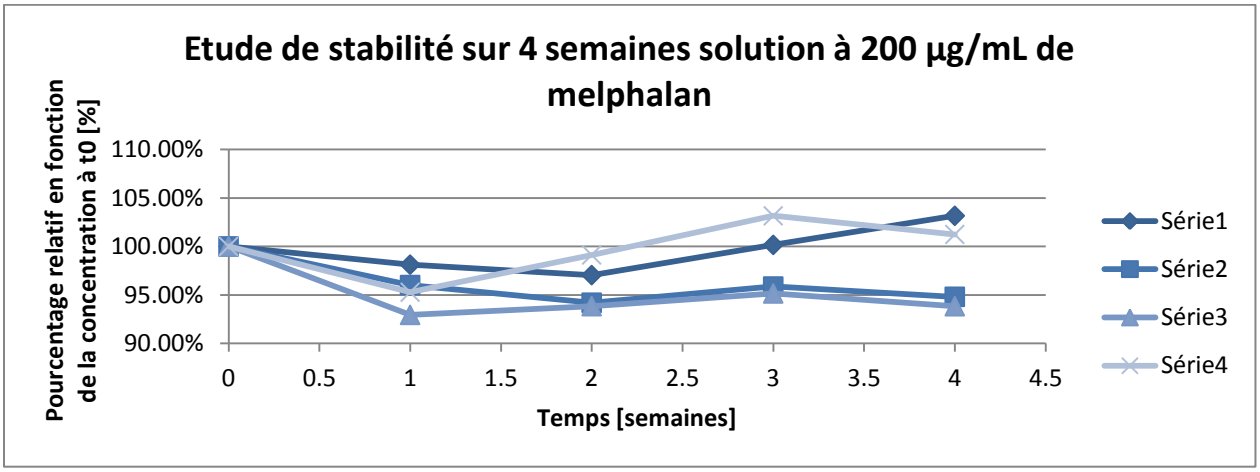


Figure 11 : Etude de stabilité sur 1 mois des solutions d'une concentration de 200 µg/mL de melphalan

3.2.6. Temps pour décongélation des seringues et étude de stabilité du melphalan après décongélation

Dans le tableau 13 ci-dessous, sont présentés les temps nécessaires à la décongélation de 3 différentes seringues gardées soit à T°ambiante soit à 4.6 °C. Les moyennes, écart-type et CVs ont été calculés.

Tableau 13 : Temps nécessaire à la décongélation de seringues soit à T° ambiante, soit à 4.6°C

Mode décongélation	N°	Temps [min]	Moyenne [min]	Ecart-type	CV [%]
T°ambiante	1	9.37	9.35	0.11	1.13
	2	9.24			
	3	9.45			
4 °C	1	49.20	50.37	1.75	3.48
	2	49.53			
	3	52.39			

Dans le tableau 14 ci-dessous, les résultats obtenus pour la stabilité du melphalan après décongélation et conservation au frigo à 4.6 °C sont montrés. Les moyennes, écart-type et CVs ont été calculés.

Tableau 14 : AUC et concentrations du melphalan en fonction du temps après décongélation et conservation au réfrigérateur

N° injection	Temps [heures]	AUC melphalan [mAu]	Concentration [µg/mL]	% Relatif [%]
1	0.0	5469669.00	230.52	100.00
2	0.5	5473996.00	230.70	100.08
3	1.0	5481136.00	231.00	100.21
4	1.5	5396051.00	227.42	98.65
5	3.0	5541276.00	233.54	101.31
6	3.5	5380247.00	226.75	98.37
7	4.5	5497366.00	231.69	100.51
8	5.0	5539322.00	233.45	101.27
Moyenne		**5472382.88**	**230.63**	**100.05**
Ecart-type		**58862.34**	**2.48**	**1.08**
CV [%]		**1.08**	**1.08**	**1.08**

Dans le tableau 15 ci-dessous, les résultats obtenus pour la stabilité du melphalan après décongélation et conservation à T° ambiante sont présentés. Les moyennes, écart-types et CVs ont été calculés.

Tableau 15 : AUC et concentrations du melphalan en fonction du temps après décongélation et conservation à T° ambiante

N° injection	Temps [heures]	AUC melphalan [mAu]	Concentration [µg/mL]	% relatif [%]
1	0.0	5409920.00	215.53	100.00
2	0.5	5485603.00	218.55	101.40
3	1.0	5408520.00	215.47	99.97
4	1.5	5279491.00	210.33	97.59
5	3.0	4817881.00	191.94	89.06
6	3.5	4804055.00	191.39	88.80
7	4.0	4568544.00	182.01	84.45
8	4.5	4693185.00	186.75	86.75
Moyenne		**5058399.88**	**201.53**	**93.50**
Ecart-type		**372906.66**	**14.86**	**0.07**
CV [%]		**7.37**	**7.37**	**7.37**

Sur la figure 12 ci-contre, sont représentées les deux courbes de stabilité obtenues selon deux modes de conservation, soit le réfrigérateur et à température ambiante.

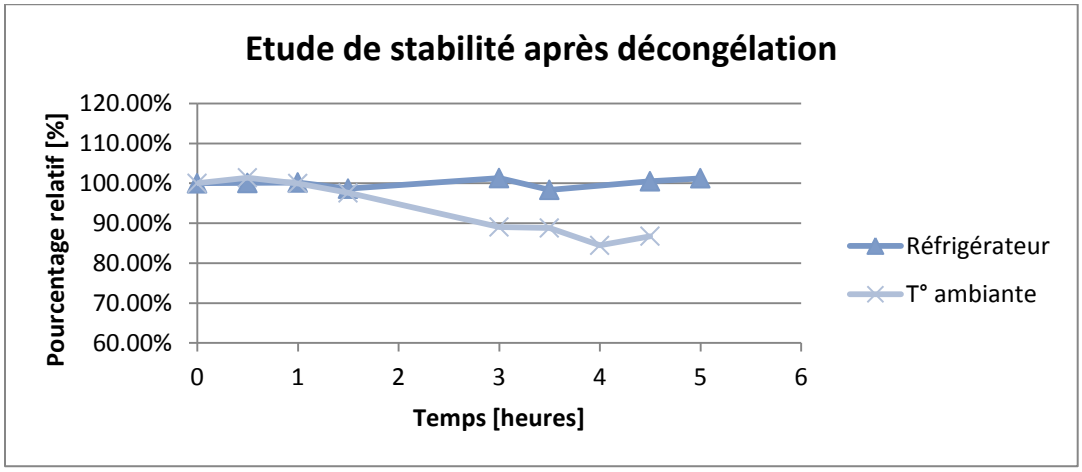


Figure 12 : Graphique représentant la stabilité du melphalan après décongélation et conservation selon 2 modes

4. Discussion

4.1. Analytique

4.1.1. Optimisation méthode analytique

Le temps durant lequel 100 % de phase mobile B passait a été enlevé de la méthode car aucune molécule ne sortait pendant cette période. Cela vient du fait que les molécules ne sont plus retenues dans les colonnes parce qu'elles ne sont pas autant apolaires que la phase mobile et donc, ont déjà élué. Le débit de la phase mobile est augmenté, permettant aux molécules d'être détectées plus rapidement par le détecteur UV-DAD et ainsi, engendre une diminution du temps d'analyse. De plus, comme toutes les molécules sortent avant 15 minutes d'analyse lorsque le débit de la phase mobile est de 2.5 mL/min, il a été décidé d'arrêter le gradient à ce moment-là. Par conséquent, le gradient passe de 100 % de phase mobile A à 25 % et de 0 à 75 % de phase mobile B. Ceci permet de gagner du temps lors de l'analyse. Les facteurs de sélectivité entre chacun des pics sont supérieurs à 1, ce qui démontre une bonne séparation de ceux-ci. Comme cette dernière est suffisante, le débit élevé de phase mobile peut être conservé. Le temps d'équilibration a pu être diminué à 5 minutes étant donné que les chromatogrammes sont reproductibles, ce qui se voit lors de leur superposition. Le tout permet d'arriver à un total de 15 minutes d'analyse et 5 minutes d'équilibration. La méthode analytique est, alors, passée de 1 heure à 20 minutes. Le temps d'analyse est un facteur important car il peut avoir un impact important sur les résultats obtenus parce qu'il peut grandement influencer la stabilité du médicament. En effet, plus l'analyse est longue, plus le melphalan a le temps de se dégrader et donc, les résultats obtenus peuvent être biaisés. Le fait de passer d'une analyse de 60 à 20 minutes est alors bénéfique pour l'étude de stabilité ou de dégradation du médicament.
Le test de répétabilité lors d'injections consécutives de la solution de melphalan montre que les analytes sortent toujours aux mêmes temps de rétention. En effet, en superposant les chromatogrammes obtenus à différents moments, il est visible que les pics se trouvent toujours au même endroit sur le chromatogramme. Cela prouve, une nouvelle fois, que la méthode analytique optimisée peut être utilisée et que le temps d'équilibration est suffisant pour obtenir des chromatogrammes reproductibles.

4.1.2. Test des colonnes

Cet essai des colonnes a été fait dans le but de s'assurer qu'elles permettaient une bonne séparation des analytes et qu'elles répondaient aux exigences de conformité. Les deux colonnes en ligne ont permis de séparer le mélange des 3 composés. Le temps de rétention moyen pour les 10 injections du mélange, est de 1.521 ± 0.478 minutes pour le thiourée, pour la progestérone, il est de 3.959 ± 0.632 minutes et pour l'anthracène, il est de 6.165 ± 0.728 minutes. Les coefficients de variations sont inférieurs à 1 %, ce qui montre une très légère variation des temps de rétention des molécules. De plus, au vu de ces valeurs, les deux colonnes en ligne permettent une séparation reproductible et optimale du mélange de molécules. Ces colonnes répondent donc aux exigences de conformité, permettant leur utilisation pour la suite des expériences.

4.1.3. Etude de stabilité

4.1.3.1. Propylparabène – Etalon interne

La moyenne des AUC au cours du temps des solutions de propylparabène est de 3357394.33 ± 1.16 mAu. Le pourcentage relatif par rapport à la première injection présente une moyenne de 99.36 ± 1.16

%. Dû aux valeurs de CV inférieures à 2 %, il est possible d'affirmer que les solutions de propylparabène sont stables au cours du temps. Ceci permet une préparation des solutions de propylparahydroxybenzoate à l'avance et de les utiliser au cours du temps. Il n'est donc pas nécessaire de préparer des solutions fraîches chaque jour.
Le propylparabène a été choisi comme étalon interne car il présente un facteur de rétention différent du melphalan. En effet, le k' pour le propylparabène est de 9.83, alors que celui du melphalan est de 6.92. Cela vient du fait que le propylparabène est une molécule plus apolaire que le melphalan et donc, est retenue davantage par les motifs C18 présents dans les colonnes. Les calculs des facteurs de rétention se trouvent en annexe 15. Le facteur de rétention de l'étalon interne est suffisamment différent de celui de la molécule d'intérêt et son temps de rétention n'est pas excessif par rapport à celui obtenu pour le L-PAM. De ce fait, l'utilisation de cette molécule n'augmente pas de manière significative le temps d'analyse. Le propylparabène présente également une bonne stabilité lorsqu'il se trouve en solution. De plus, cette molécule est bien détectée par UV à la longueur d'onde de détection du melphalan, soit 260 nm. Tout cela fait que le propylparabène est une molécule adéquate pour être utilisée comme étalon interne. L'idée de cette molécule comme étalon interne vient de deux différents articles, soit les références (32, 33). En revanche, au vu des variations des AUC du propylparabène remarquées lors de la validation, et que cette dernière soit passée sans étalon interne, l'idée d'utiliser cette molécule a été abandonnée. De plus, la RP-HPLC utilisée étant récente, l'utilisation d'un étalon interne ne s'est pas révélée nécessaire. En effet, comme mentionné en introduction, les étalons internes sont utilisés soit pour corriger le volume d'injection, soit lors d'extraction. Comme il a été remarqué que le volume d'injection du melphalan était constant, il n'est plus nécessaire d'utiliser l'étalon interne. La variation des AUC du propylparabène peut venir de l'utilisation inadéquate des pointes de micropipettes qui absorbaient un certain volume de solution dans le filtre.

4.1.3.2. Blanc

Lors de la superposition des chromatogrammes acquis pour la solution de blanc, aucun pic n'apparaît en fonction du temps. Au vu de ces chromatogrammes, le blanc est stable car il n'y a pas de différence visible entre celui obtenu à t0 et celui à t144 heures.

4.1.3.3. Melphalan dans sa phase finale d'injection

L'essai de stabilité du melphalan dans une solution acide a été fait dans le but d'évaluer s'il était possible de préparer les solutions à l'avance, soit le matin pour les injecter au cours de la journée. Il s'est révélé que le melphalan se trouvant dans une solution 2 % acide acétique (v : v) MeOH présente une stabilité augmentée. En effet, lorsque les solutions ont été injectées sur une journée, l'AUC moyenne des pics du melphalan est de 27400940.70 ± 2.35 mAu. De plus, la moyenne du pourcentage relatif par rapport à la première injection est de 99.79 ± 2.35 %. Ces coefficients de variation inférieurs à 5 % montrent que le melphalan est stable en fonction du temps lorsqu'il se trouve dans cette solution contenant du méthanol et de l'acide acétique glaciale. En effet, même après 6.28 heures, il reste 98.14 % de la concentration initiale. Grâce à ces résultats très satisfaisants, il est possible de préparer les solutions à l'avance et de les injecter durant la journée sans craindre un problème de dégradation du médicament. Cela n'aurait pu être le cas si les solutions se trouvaient dans une solution de NaCl 0.9 %, comme il a été remarqué après, lors de l'essai de dégradation du melphalan à température ambiante. En effet, comme

il sera discuté plus loin, après 5.80 heures, seul 70.00 % de la concentration initiale restent dans la solution. Cela vient conforter les données trouvées dans la littérature et discutées dans l'introduction de ce travail. Effectivement, il avait été trouvé que le melphalan avait une stabilité augmentée lorsqu'il se trouvait en condition acide.

4.1.4. Validation de la méthode

4.1.4.1. Spécificité

La spécificité d'une méthode analytique est sa capacité à mesurer la réponse de l'analyte d'intérêt, soit le melphalan, en présence de ses produits de dégradations, des impuretés ou de la matrice (34). Le chromatogramme de la figure 6 du blanc montre qu'aucun pic ne sort aux temps de rétention correspondant à ceux du melphalan et du propylparabène. Il n'y a donc aucun composant qui n'interfère avec les pics d'intérêts et, par conséquent, aucun problème pour l'identification et la quantification des molécules. En effet, ni les excipients présents dans les solutions commerciales Alkeran®, ni les solvants de dilution n'interfèrent avec le melphalan.

La conformité du système a été vérifiée en injectant des solutions pour conformité du système de la Ph. Eur. 8.8 selon la méthode analytique optimisée. Sur le chromatogramme en figure 7, il a été possible d'identifier les différentes impuretés en le comparant au chromatogramme obtenu par la Ph. Eur. 8.8 se trouvant en annexe 10. Par ailleurs, la séparation entre le melphalan et l'impureté J n'est pas optimale. Le problème aurait pu être résolu avant de commencer les études de stabilité si le produit pour conformité du système avait été reçu plus rapidement. En effet, il a été réceptionné après que les temps 0 pour l'étude de stabilité du melphalan ait été fait. De ce fait, la méthode analytique n'a pu être modifiée pour optimiser la séparation de ces 2 pics. En revanche, en allongeant le temps d'analyse à 20 minutes, soit 5 minutes à 100 % de phase mobile B en plus (en bleu sur le chromatogramme), aucun pic ne sort après les 15 minutes. Le temps et le gradient de la méthode optimisée permettent donc à toutes les molécules de sortir et d'être détectées. Il n'est donc pas nécessaire de passer les 5 minutes à 100 % de phase mobile B.

4.1.4.2. Standard de calibration et standard de validation

Seulement deux séries de validation ont pu être effectuées car, lors de l'essai de validation, un problème est survenu pour la série 3. De ce fait, un nouveau produit nécessaire au standard de calibration a été commandé, mais dû à une rupture de stock du melphalan hydrochloride, il n'a pu être réceptionné dans les temps impartis et donc, par manque de temps, il n'a pas été possible de refaire cette 3ème série.

Le modèle utilisé pour la validation de la méthode analytique est une régression linéaire passant par 0 ajustée en utilisant uniquement le niveau 3. Cela signifie qu'un seul point est nécessaire pour faire la courbe de calibration, soit une solution d'une concentration de 30 µg/mL de melphalan HCl.

L'exactitude montre l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée comme telle (35). Le profil d'exactitude obtenu en considérant le modèle de régression linéaire passant par 0 ajustée en utilisant uniquement le niveau le plus haut montre que la méthode est valide dans l'intervalle de dosage. En effet, tous les points se trouvent dans l'intervalle des 5 % définit comme étant l'intervalle de tolérance. Avec cela, seulement 5 % des futures valeurs de dosages de solutions seront en dehors des limites, ce qui est généralement accepté lors d'essais en Sciences Pharmaceutiques.

Il est visible sur le profil de risque que, pour toutes les concentrations entre 5.0 et 30.0 µg/mL, le risque d'avoir des mesures en dehors des limites d'acceptations à chaque niveau est inférieur à 5 %.
La méthode analytique est considérée comme valide et peut donc, être utilisée pour l'usage auquel elle a été prévue, soit le dosage du melphalan en solution. Autant les ratios melphalan/propylparabène que les AUC du melphalan ont été testés pour la validation de la méthode analytique. Cette dernière a été validée avec les AUC du melphalan et non avec les ratios. Pour cette raison, l'étalon interne n'a pas besoin d'être ajouté et l'idée de son utilisation a été abandonnée. Cela vient d'une forte variation des AUC du propylparabène remarquée lors de l'essai de validation. Cette variation peut venir de l'utilisation inadéquate des pointes de micropipettes qui n'étaient pas adaptée au volume prélevé de solution. Ces dernières, contenant un filtre, ont absorbé une certaine quantité de solution et donc, le volume ajouté n'était pas celui voulu. Cela n'ayant pas été remarqué immédiatement, les résultats pour le propylparabène deviennent inutilisables.

4.2. Fabrication

4.2.1. Temps de remplissage des seringues

Le temps pour remplir 20 seringues est de 8.83 ± 25.52 minutes, ce qui fait 44.15 ± 25.52 minutes pour les 100 seringues. Cette valeur de CV élevée est due au remplissage manuel des seringues et qu'il est indispensable de s'habituer à les manipuler ainsi que d'utiliser des poches de perfusion. C'est pour cela que l'essai a été fait 5 fois. De plus, le temps nécessaire pour remplir 100 seringues en utilisant la même poche de perfusion est de 44.67 minutes. Cette valeur est donc très proche de celle obtenue en faisant la moyenne des 5 remplissages de 20 seringues. L'extrapolation est donc possible et permet d'éviter l'utilisation de 300, voire 500 seringues/aiguilles/bouchons inutilement.
Le temps moyen de remplissage de deux fois 50 seringues à partir de la poche de perfusion Freka®, qui sera utilisée ultérieurement, est de 22.52 ± 7.19 minutes, soit 45.03 ± 7.19 minutes pour les 100 seringues. En comparant cette durée par rapport à celle obtenue pour la poche de perfusion BBraun, il est possible d'affirmer que ces temps sont proches et que ce dernier test n'était pas indispensable. Il permet tout de même de s'assurer que c'était une bonne prévision du temps nécessaire au remplissage des seringues. Ces différents tests ont été effectués car l'idée de départ était de prélever 100 seringues et de les congeler pour éviter la perte de solution. Par après, au vu de ces temps relativement longs lors du prélèvement des seringues, il a été décidé de ne prélever que 20 seringues. En effet, durant cette période de prélèvement, dû à la faible stabilité du médicament, une dégradation peut déjà se faire. De plus, l'étude de stabilité se faisant seulement sur 1 mois, seul 20 seringues sont nécessaires.

4.2.2. Temps pour congélation de 10 seringues selon 2 modes

Le test de congélation de 10 seringues n'a été fait qu'une seule fois pour chaque mode et chaque température de la solution de NaCl 0.9 %. Par conséquent, aucune moyenne, écart-type, CV n'ont été calculés. Pour le cryocongélateur, avec la solution à T° ambiante, 39 minutes ont été nécessaires pour une congélation totale des seringues. Lorsque la solution de NaCl était refroidie, un gain de 4 minutes a été observé, car seul 35 minutes sont indispensables. Avec la neige carbonique, seulement 19 minutes sont nécessaires pour la congélation complète des 10 seringues remplies de NaCl à T°ambiante. Il n'a fallu que 13 minutes, soit un gain de 6 minutes pour les solutions de NaCl 0.9 % refroidies. Il est donc visible qu'avec la neige carbonique, il faut 2.1 fois moins de temps pour les solutions à T° ambiante et

2.7 fois moins de temps pour les solutions préalablement refroidies qu'avec le cryocongélateur. La différence entre les solutions à T° ambiante et refroidies vient du fait que, lorsque les solutions sont froides, moins d'énergie n'est nécessaire à la congélation des solutions de NaCl que pour celles à T° ambiante. La différence de temps entre le cryocongélateur et la neige carbonique vient du fait qu'avec la neige carbonique, la surface disponible pour déposer les seringues est plus grande ; cela permet de les entreposer à plat. Au contraire, avec le cryocongélateur, la place est restreinte et les seringues sont les unes sur les autres. Par conséquent, cela ne permet pas une bonne répartition du froid pour une congélation homogène. De plus, la place disponible dans le cryocongélateur étant très faible, ne permet pas de remplir les seringues avec 1 mL de solution. En effet, lors de la congélation, la solution NaCl va se dilater et alors, pousser le piston de la seringue ; il n'est donc pas possible de les remplir davantage. Dû au temps plus rapide de congélation, une surface plus grande et une utilisation plus aisée, la neige carbonique dans une boîte en sagex est choisie comme moyen de congélation pour la suite des expériences. De plus, ce sera avec des solutions refroidies au réfrigérateur durant une nuit que seront faites les solutions de melphalan car cela permettra une congélation plus rapide des seringues et donc, une dégradation moindre du médicament.

4.2.3. Temps pour congélation poche de perfusion

Étant donné que les poches de perfusion remplies de solution NaCl placées au congélateur pendant 20 et 60 min étaient congelées, il n'a pas été possible de prélever du liquide. Par conséquent, la température à l'intérieur de la poche n'a pu être mesurée. L'idée de congeler les poches avant la préparation des solutions de melphalan a donc été abandonnée car il n'est pas possible de standardiser cette étape. Cet essai a été testé dans le but d'accélérer la congélation des solutions de melphalan et donc, de diminuer la dégradation du médicament. Le plus important est donc de placer les poches de perfusion au frigo au préalable et, si tel n'aurait pas été le cas et qu'un cas d'urgence surviendrait, il serait possible de placer la poche de perfusion durant 5 minutes au congélateur avant la préparation de la solution.

4.2.3.1. Etude de dégradation du melphalan à température ambiante

Le melphalan est un médicament qui se dégrade très rapidement. Il est observé que l'aire sous la courbe du pic du melphalan diminue très rapidement au cours du temps. En effet, après 5.80 heures, une perte considérable du produit est visible puisqu'il ne reste plus que 70.00 % de la concentration initiale. Par ailleurs, après 47.30 heures, plus de la moitié de la concentration initiale est perdue. Cela montre et prouve que, lorsque le melphalan est conservé à température ambiante pendant une courte période, il n'est pas stable et ne peut être utilisé longtemps après sa reconstitution. De plus, les CVs élevés trouvés pour les AUC et les pourcentages relatifs montrent l'instabilité du produit. En effet, si le L-PAM était stable, le coefficient de variation serait faible, ce qui n'est pas le cas ici, comme il vaut 39.93 %. Cela montre la nécessité de trouver des solutions pour augmenter la stabilité du L-PAM.

4.2.4. Etude de stabilité du melphalan au congélateur

4.2.4.1. Poche de perfusion à 15 µg/mL

L'étude de stabilité pour les poches de perfusion conservées au congélateur montre que les solutions de melphalan sont stables. En effet, au vu de la figure 10, tous les pourcentages relatifs par rapport à la concentration de t0 se trouvent entre 110 et 90 %. Selon la définition de la Ph. Helv. 10, « un

médicament est considéré comme pratiquement stable lorsque, en un laps de temps déterminé, ses propriétés essentielles ne changent pas ou changent au plus dans des proportions tolérables ; de plus, il est entendu que le médicament doit être conservé dans des conditions appropriées et prescrites de température, d'humidité et d'exposition à la lumière et qu'un récipient convenable a été utilisé ». L'intervalle de tolérance a été déterminé comme étant de 10 %. Comme les pourcentages relatifs des concentrations par rapport au t0 se trouvent dans cet intervalle, il peut être conclu que le médicament est stable au congélateur, pour cette concentration, durant un laps de temps correspondant à 4 semaines. Par ailleurs, il y a une certaine variation entre les séries. En effet, les concentrations entre les poches ne sont pas exactement les mêmes. Cela peut venir d'une certaine inhomogénéité dans la poche de perfusion, et différents paramètres peuvent entrer en compte. Le premier est le remplissage manuel des poches de perfusion vides avec la solution NaCl 0.9 %. Une variation peut venir de l'imprécision des seringues utilisées, soit celles de 50 mL. De plus, dû au manque d'expérience, il est également possible que la concentration de départ du melphalan n'était pas exactement la même lors de la reconstitution des différents flacons. Effectivement, il est possible que le volume de diluant prélevé pour chaque flacon fût différent comme il a été prélevé avec des seringues. Par après, les volumes prélevés de solution reconstituée pouvaient avoir une légère variation, malgré qu'ils aient été prélevés avec des micropipettes. Par ailleurs, il a également été remarqué que les concentrations initiales dans les poches de perfusion étaient supérieures à celles voulues, soit 15 µg/mL. Cela peut venir, comme dit précédemment, de divers facteurs. Le plus important est de voir que les solutions sont stables pendant 1 mois si le melphalan est conservé au congélateur à une température de -18°C. Cela mène a affirmer que des modifications du mode de préparation est possible, ou, quoi qu'il en soit, de conserver les Alkeran® reconstitués au congélateur pour les utiliser ultérieurement.

4.2.4.2. Poche de perfusion à 200 µg/mL

Les résultats obtenus pour les poches de perfusion de 200 µg/mL montrent que les solutions sont stables au cours du temps lorsqu'elles sont conservées au congélateur. En effet, durant la conservation, les pourcentages relatifs par rapport à la concentration au temps initial se situent entre 90 et 110 %. De ce fait, il est possible d'affirmer que les solutions sont stables une fois stockées au congélateur à une température de -18 °C. En effet, il est visible sur le graphique de la figure 9 qu'aucune valeur ne se trouve en dehors de l'intervalle déterminé comme étant l'écart de stabilité. Par contre, il est visible que pour la poche n°3, le pourcentage relatif obtenu à t1 semaine par rapport au t0 est plus faible que pour les autres poches. Cela vient probablement d'une erreur de dilution. En effet, il est possible, soit que le volume prélevé de la solution du melphalan avec la micropipette ait été faussé, soit que le remplissage au trait de jauge n'ait pas été fait de la manière la plus consciencieuse qui soit. Quoi qu'il en soit, au vu de ces résultats hautement positifs, une proposition de modification du mode de préparation est envisageable. Comme pour les poches à 15 µg/mL, les concentrations obtenues pour les différentes poches sont supérieures aux valeurs voulues. Cela provient des mêmes facteurs énumérés ci-dessus. De plus, il y a également une variation des concentrations entre les différentes poches. Par ailleurs, tous les coefficients de variations se trouvent en dessous de 5 %, ce qui montre l'homogénéité entre les poches au niveau des concentrations.

4.2.5. Temps pour décongélation des seringues et étude de stabilité du melphalan après décongélation

Pour décongeler une seringue à température ambiante, seulement 9.35 ± 1.13 minutes sont nécessaires, alors que pour la décongeler au réfrigérateur (à une T° de 4.6 °C), 50.37 ± 3.48 minutes sont nécessaires. L'écart entre ces deux temps est la conséquence d'une différence de température plus importante entre les seringues et l'air pour les seringues se trouvant à T° ambiante que pour celles au réfrigérateur. Cette différence plus conséquente permet au liquide se trouvant dans la seringue de se réchauffer plus rapidement et, par conséquent, de se décongeler plus vite. De plus, les coefficients de variation pour les 2 différents modes de décongélation sont inférieurs à 5 %, ce qui montre une faible variation. Par ailleurs, le CV est plus important pour la décongélation à 4.6 °C car les seringues se trouvaient dans un sachet plastique et, les 10 seringues nécessaires à l'étude de stabilité étaient les unes à côté des autres. Si elles avaient été espacées dans le frigo, la décongélation aurait, probablement, été plus homogène et plus rapide. En effet, en étant les unes à côté des autres, il est possible que les seringues gardent le froid et donc, la décongélation se fait moins rapidement. Cette étude sur le temps de décongélation donne une idée pour les recommandations nécessaires si une modification du mode de préparation est faite.

Le pourcentage relatif par rapport à la concentration du melphalan à temps 0 montre que, si le produit est conservé à 4.6 °C, il est stable. En effet, le pourcentage relatif montre une moyenne de 100.05 ± 1.08 %. Cette faible variation du coefficient de variation mène à affirmer qu'il est possible de garder les solutions au réfrigérateur après décongélation si elles ne sont pas directement administrées. La solution peut, dans tous les cas, être conservée pendant 5 heures au frigo, car il reste encore 101.27 % de la concentration initiale. Cette augmentation de concentration peut venir de la possible inhomogénéité dans la poche de perfusion. De ce fait, la concentration de la solution à l'intérieur de la seringue pouvait être légèrement plus élevée que celle dans la seringue utilisée à t0. En effet, les solutions injectées viennent de seringues différentes étant donné que seul 1 mL sont contenus dans chaque seringue et que la totalité est utilisée pour être diluée 10 fois.

De plus, si l'on compare les deux modes de conservation, il est visible qu'à température ambiante, le produit n'est pas stable. En effet, la concentration diminue graduellement, comme il était le cas lors de l'étude de dégradation du melphalan à T° ambiante. Si la solution est conservée à l'air libre, il n'est plus possible de l'utiliser après 2.50 heures pour une utilisation sûre. C'est pour cela qu'il faudra conserver les seringues de melphalan au réfrigérateur après décongélation pour une utilisation sûre et adéquate du médicament s'il n'est pas administré directement après sa décongélation.

5. Conclusion et perspectives

Lors de ce travail, le premier objectif était d'optimiser la méthode analytique prescrite par la Ph. Eur. 8.8. Pour cela, la méthode améliorée par Sarah Wellnitz a été optimisée. Le temps d'équilibration a été diminué à 5 minutes, ce qui est suffisant pour avoir des chromatogrammes reproductibles. De plus, le débit a été augmenté à 2.5 mL/min, permettant aux molécules d'intérêts d'être détectées avant 15 minutes de run. Cela a permis d'arrêter le gradient à 15 minutes, et donc, de passer de 100 à 25 % de phase mobile A et de 0 à 75 % de phase mobile B. Avec ces modifications, la méthode passe de 1 heure d'analyse à 20 minutes. Cela est bénéfique pour la stabilité du melphalan qui subit une dégradation très rapide. Par ailleurs, la méthode analytique aurait pu être davantage optimisée et ainsi, permettre une séparation complète entre le melphalan et l'impureté J si le melphalan pour conformité du système avait été réceptionné plus tôt. Des essais en diminuant le débit de la phase mobile peuvent être faits afin d'améliorer cette séparation, ou une augmentation de la taille des colonnes peut également être testée. Un changement de phase mobile est également envisageable.

La spécificité de la méthode analytique a été démontrée avec le chromatogramme du blanc, où il est visible qu'aucun pic ne sort aux temps de rétention des molécules d'intérêts. Cela permet alors, une quantification et identification des analytes voulus. De plus, les impuretés principales ont pu être identifiées en comparant le chromatogramme obtenu avec le melphalan pour conformité du système et le chromatogramme fournit par la Ph. Eur. La méthode analytique a ensuite été validée avec un modèle de régression linéaire passant par 0 ajustée en utilisant uniquement le niveau 3, soit une concentration de 30 µg/mL. Le profil d'exactitude considérant ce modèle montre que la méthode est valide dans l'intervalle de dosage, soit entre 5.0 et 30.0 µg/mL. En effet, tous les points vont se trouver dans l'intervalle des 5 % définit comme étant l'intervalle de tolérance. De plus, le profil de risque montre que le risque d'avoir des mesures en dehors des limites d'acceptation est inférieur à 5 %. La validation de la méthode analytique peut être optimisée en la faisant avec les 3 séries nécessaires à une validation. De plus, un autre modèle de validation pourrait également être testé.

Un essai de dégradation du melphalan a été effectué à température ambiante avant de procéder aux études de stabilité de celui-ci. Il a été remarqué que ce médicament se dégrade très rapidement car après 5.80 heures, seulement 70.00 % de la concentration initiale sont encore présents. Cette dégradation rapide confirme ce qui a été trouvé dans la littérature et ne permet pas une utilisation sur une longue période après reconstitution. Par ailleurs, il a été trouvé que, si le melphalan se trouvait dans une solution contenant 2 % d'acide acétique, il était stable sur une journée. Cela permet alors, une préparation des solutions du L-PAM à l'avance lors de l'étude de stabilité.

Les essais de stabilité du melphalan sur un mois se sont révélés positifs. En effet, autant pour les solutions à 15 µg/mL que pour les solutions à 200 µg/mL, les concentrations se situent toujours entre 90 et 110 % de la concentration initiale même après conservation au congélateur pendant 4 semaines. L'étude de stabilité pourrait être poursuivie pour évaluer si les solutions sont stables sur une durée plus importante de conservation. Mais les résultats positifs obtenus sur 4 semaines sont déjà un bon point pour la reconstitution du melphalan qui n'était pas stable plus de 1.5 heure après la reconstitution selon le fabricant.

Pour décongeler les seringues au réfrigérateur, 50.37 ± 3.48 minutes sont nécessaires. Ce temps est relativement élevé mais au vu des résultats obtenus pour l'étude de stabilité lorsque les solutions sont

conservées au réfrigérateur, cela n'a pas d'impact. En effet, après 5.00 heures, il reste 101.27 % de la concentration initiale. C'est pourquoi, même si le temps de décongélation est assez long, les solutions de melphalan restent tout de même stables et peuvent être utilisées ultérieurement.

Grâce à ces résultats positifs, des recommandations peuvent être formulées. Les solutions de melphalan peuvent être directement effectuées dans des poches de perfusion stériles contenant le volume adéquat de solution NaCl 0.9 %. Ces dernières doivent être placées au réfrigérateur au préalable avant le mélange. Un volume approprié de solution reconstituée de melphalan est ensuite ajouté et la poche doit être mélangée de manière appropriée. Des volumes de 1 mL peuvent être prélevés à l'aide des seringues en polypropylène et les aiguilles vont être remplacées par des bouchons. Les seringues doivent immédiatement être congelées pour éviter au maximum la dégradation du produit. Les seringues devront être décongelées au réfrigérateur où elles devront être conservées en attendant l'administration du médicament.

6. Bibliographie

1. Quinonez-Silva G, Davalos-Salas M, Recillas-Targa F, Ostrosky-Wegman P, Aranda DA, Benitez-Bribiesca L. Monoallelic germline methylation and sequence variant in the promoter of the RB1 gene: a possible constitutive epimutation in hereditary retinoblastoma. Clinical epigenetics. 2016;8:1.
2. Meunier F, editor Rétinoblastome défier l'orthodoxie pour progresser 2016; Lausanne.
3. Doz F. Retinoblatoma: a review. Archives de pediatrie : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie. 2006;13(10):1329-37.
4. Zucker JM, Desjardins L, Stoppa-Lyonnet D, Doz F. Rétinoblastome. EMC - Pédiatrie. 2005;2(4):322-31.
5. Dimaras H, Kimani K, Dimba EA, Gronsdahl P, White A, Chan HS, et al. Retinoblastoma. Lancet. 2012;379(9824):1436-46.
6. Wilson MW. Retinoblastoma: Springer US; 2010. 156 p.
7. Aerts I, Lumbroso-Le Rouic L, Gauthier-Villars M, Brisse H, Doz F. Retinoblastoma update. Archives de pediatrie : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie. 2016;23(1):112-6.
8. Balmer A, Munier F, Zografos L. Nouvelles stratégies dans le traitement du rétinoblastome. J Fr Ophtalmol. 2002;25:187-93.
9. Monroy JE, Orbach DB, VanderVeen D. Complications of intra-arterial chemotherapy for retinoblastoma. Seminars in ophthalmology. 2014;29(5-6):429-33.
10. Lumbroso L, Doz F, Levy C, Dendale R, Vedrenne J, Bours D, et al. Thermothérapie et thermochimiothérapie au laser diode dans le traitement du rétinoblastome. J Fr Ophtalmol. 2003;26(2):154-9.
11. Shields CL, Fulco EM, Arias JD, Alarcon C, Pellegrini M, Rishi P, et al. Retinoblastoma frontiers with intravenous, intra-arterial, periocular, and intravitreal chemotherapy. Eye. 2013;27(2):253-64.
12. Desmaris RP, Mercier L, Paci A. Stability of Melphalan in 0.9% Sodium Chloride Solutions Prepared in Polyvinyl Chloride Bags for Intravenous Injection. Drugs in R&D. 2015;15(3):253-9.
13. Schaiquevich P, Buitrago E, Taich P, Torbidoni A, Ceciliano A, Fandino A, et al. Pharmacokinetic analysis of melphalan after superselective ophthalmic artery infusion in preclinical models and retinoblastoma patients. Investigative ophthalmology & visual science. 2012;53(7):4205-12.
14. Muen WJ, Kingston JE, Robertson F, Brew S, Sagoo MS, Reddy MA. Efficacy and complications of super-selective intra-ophthalmic artery melphalan for the treatment of refractory retinoblastoma. Ophthalmology. 2012;119(3):611-6.
15. Francis JH, Abramson DH, Gaillard MC, Marr BP, Beck-Popovic M, Munier FL. The classification of vitreous seeds in retinoblastoma and response to intravitreal melphalan. Ophthalmology. 2015;122(6):1173-9.
16. Boschmans J, de Bruijn E, Van Schil P, Lemière F. Analysis of novel melphalan hydrolysis products formed under isolated lung perfusion conditions using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. 2013.

17. Dewaele D, Sobott F, Lemiere F. Covalent adducts of melphalan with free amino acids and a model peptide studied by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid communications in mass spectrometry : RCM. 2016;30(6):719-30.
18. Bosanquet AG. Stability of melphalan solutions during preparation and storage. J Pharm Sci. 1985;74(3):348-51.
19. Bosanquet AG. Stability of solutions of antineoplastic agents during preparation and storage for in vitro assays. General considerations, the nitrosoureas and alkylating agents. Cancer Chemother Pharmacol. 1985;14(2):83-95.
20. Brightman K, Finlay G, Jarvis I, Knowlton T, Manktelow CT. A stability-indicating method for the determination of melphalan and related impurity content by gradient HPLC. J Pharm Biomed Anal. 1999;20(3):439-47.
21. Ben Abid F, Gazzah A, Ousbane A, Gutierrez M, Brain E. Les alkylants. Oncologie. 2007;9(11):751-7.
22. Pourquier P. Alkylating agents. Bulletin du cancer. 2011;98(11):1237-51.
23. Patrick GL, Depovere P. Chimie pharmaceutique: De Boeck; 2002.
24. Ahuja S, Dong M. Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC: Elsevier Science; 2005.
25. Fallon A, Booth RFG, Bell LD. Applications of HPLC in Biochemistry: Elsevier Science; 1987.
26. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Principes d'analyse instrumentale: De Boeck; 2003.
27. Mendham J, Toullec J, Mottet M. Analyse chimique quantitative de Vogel: De Boeck Supérieur; 2005.
28. Corradini D, Eksteen E, Eksteen R, Schoenmakers P, Miller N. Handbook of HPLC: CRC Press; 2011.
29. Schirmer RE. Modern Methods of Pharmaceutical Analysis, Second Edition: Taylor & Francis; 1990.
30. McPolin O. An Introduction to HPLC for Pharmaceutical Analysis: Mourne Training Services; 2009.
31. Wellnitz S. Etude de stabilité des solutions de melphalan destinées à l'administration intra-vitréenne dans le traitement du rétinoblastome 2015.
32. Sparidans RW, Silvertand L, Dost F, Rothbarth J, Mulder GJ, Schellens JH, et al. Simple high-performance liquid chromatographic assay for melphalan in perfusate, rat liver and tumour tissue. Biomedical chromatography : BMC. 2003;17(7):458-64.
33. Pinguet F, Joulia JM, Martel P, Grosse PY, Astre C, Bressolle F. High-performance liquid chromatographic assay for melphalan in human plasma. Application to pharmacokinetic studies. Journal of chromatography B, Biomedical applications. 1996;686(1):43-9.
34. Bouaissi W, Abidi M, Ben Hamida N. Optimisation et Validation d'une méthode de dosage par HPLC/DAD d'un antihypertenseur le zofenopril Journal de la Société Chimique de Tunisie. 2013;15:39-50.
35. ICH. ICH Q2 (R1) guideline [cited 2016 23.05.2016]. Available from: www.ich.org.
36. GlaxoSmithKline. Melphalan - Prescribing Information. 2011.

7. Annexes

Annexe 1 : Préparation de la phase mobile 36
Annexe 2 : Préparation solution étalon interne – propylparabène 37
Annexe 3 : Préparation du Blanc 38
Annexe 4 : Préparation solution melphalan dans solution 2 % acide acétique (v : v) dans MeOH 39
Annexe 5 : Schéma de Standard de Calibration pour validation 40
Annexe 6 : Standard de validation 41
Annexe 7 : Préparation des solutions de melphalan 42
Annexe 8 : Préparation solutions melphalan pour injection sur HPLC pour l'étude de stabilité 43
Annexe 9 : Calculs facteur de sélectivité figure 5 44
Annexe 10 : Chromatogramme pour conformité du système fournit par la Ph. Eur. 8.8 45
Annexe 11 : Rapport de Validation Enoval 46
Annexe 12 : Valeurs obtenues pour la validation de la méthode analytique 78
Annexe 13 : Résultats étude de stabilité melphalan sur 1 mois, poche de perfusion à 15 µg/mL 79
Annexe 14 : Résultats étude de stabilité melphalan sur 1 mois, poche de perfusion à 200 µg/mL 80
Annexe 15 : Calculs des facteurs de rétention 81

Annexe 1 : Préparation de la phase mobile

Phase mobile A : 95 % de phase aqueuse et 5 % d'acétonitrile
Phase mobile B : 40 % de phase aqueuse et 60 % d'acétonitrile

Phase aqueuse : Eau contenant 0.01 % v/v de triéthylamine, 0.05 % v/v d'acide acétique glaciale et 0.05 % m/m d'acétate d'ammonium

I. Les bouteilles d'eau HPLC et d'ACN HPLC sont mises à dégazer 30 minutes dans un bain à ultrasons
II. 500 mL d'eau HPLC sont mis dans un ballon jaugé de 2 L mis préalablement sur une plaque à agitation
III. Peser 1.0 g d'acétate d'ammonium et l'ajouter dans le ballon jaugé sous agitation magnétique
IV. Ajouter 200 µL de triéthylamine (micropipette)
V. Rincer le col du ballon avec de l'eau HPLC
VI. Agiter légèrement sous agitation magnétique car très volatile
VII. Ajouter 1000 µL d'acide acétique glaciale (micropipette)
VIII. Mélanger sous agitation magnétique
IX. Enlever l'agitateur et le rincer avec de l'eau HPLC
X. Ajuster au trait de jauge avec de l'eau HPLC
XI. Filtrer la phase aqueuse avec des filtres GHP
XII. Conditionner dans une bouteille

Phase A : Prendre 950 mL de solution aqueuse avec un cylindre gradué de 1 L, ajouter 50 mL d'acétonitrile et placer le tout sous agitation magnétique pendant 5 minutes

Phase B : Prélever 400 mL de phase aqueuse avec cylindre gradué de 500 mL, ajouter 600 mL d'acétonitrile et mettre le tout sous agitation magnétique durant 5 minutes.

Annexe 2 : Préparation solution étalon interne – propylparabène

Solution Stock de 1 mg/mL :

I. Peser 100 mg de propylparabène
II. Dissoudre et diluer ad 100 mL avec solution 2 % acide acétique (v : v) MeOH

Solution 100 µg/mL :

I. Prélever 5 mL de solution stock
II. Diluer ad 50 mL avec solution avec solution 2 % acide acétique (v : v) MeOH

Annexe 3 : Préparation du Blanc

Solution mère de povidone K12 20 mg/mL :

I. Peser 200 mg de PVP K12
II. Placer le PVP dans un ballon de 10 mL
III. Dissoudre et diluer ad 10 mL avec solution 10 % NaCl 0.9 % (v : v) dans solution 2 % acide acétique (v : v) MeOH

Préparation blanc

I. **Solution 1 :** 0.1 mL de solution mère de PVP K12 dans un ballon jaugé de 10 mL + 1 mL de solution diluante d'Alkeran® ad 10 mL avec solution 10 % NaCl 0.9 % (v : v) dans solution 2 % acide acétique (v : v) MeOH → **concentration de PVP : 0.2 mg/mL**
II. **Solution 2 :** 4 mL de solution 1 ad 10 mL solution 10 % NaCl 0.9 % (v : v) dans solution 2 % acide acétique (v : v) MeOH → **concentration de PVP de 0.08 mg/mL**
III. **Solution 2 diluée 10 x :** 1 mL de solution 2 ad 10 ml solution 10 % NaCl 0.9 % (v : v) dans solution 2 % acide acétique (v : v) MeOH

La quantité de povidone K12 présente dans les formulations commerciales de melphalan a été trouvée dans les informations de prescriptions de chez GlaxoSmithKline (36).

Annexe 4 : Préparation solution melphalan dans solution 2 % acide acétique (v : v) dans MeOH

I. Solution 1 : Reconstituer la solution Alkeran® : 10 mL de diluant dans le flacon de melphalan → **Concentration : 5 mg/mg**
II. Solution 2 : 2 mL de solution 1 diluée ad 10 mL avec solution 2 % acide acétique (v : v) MeOH → **Concentration : 1 mg/mL**
III. Solution 3 : 1 mL de solution 2 diluée ad 10 mL de solution 2 % acide acétique (v : v) MeOH → **Concentration : 100 µg/mL**

Annexe 5 : Schéma de Standard de Calibration pour validation

Solution mère 1 mg/mL : 50 mg melphalan HCl ad 50 mL solution 2 % acide acétique (v : v) MeOH

Solution fille 100 µg/mL : 2 mL SM ad 20 mL solution 2 % acide acétique (v : v) MeOH

Solution fille 100 µg/mL : 2 mL SM ad 20 mL solution 2 % acide acétique (v : v) MeOH

Solution fille 100 µg/mL : 2 mL SM ad 20 mL solution 2 % acide acétique (v : v) MeOH

Solution 30 µg/mL : 0.6 mL SF ad 2 mL solution 2 % acide acétique (v : v) MeOH

Solution 30 µg/mL : 0.6 mL SF ad 2 mL solution 2 % acide acétique (v : v) MeOH

Solution 30 µg/mL : 0.6 mL SF ad 2 mL solution 2 % acide acétique (v : v) MeOH

Solution 15 µg/mL : 0.3 mL SF ad 2 mL solution 2 % acide acétique (v : v) MeOH

Solution 15 µg/mL : 0.3 mL SF ad 2 mL solution 2 % acide acétique (v : v) MeOH

Solution 15 µg/mL : 0.3 mL SF ad 2 mL solution 2 % acide acétique (v : v) MeOH

Solution 5 µg/mL : 0.1 mL SF ad 2 mL solution 2 % acide acétique (v : v) MeOH

Solution 5 µg/mL : 0.1 mL SF ad 2 mL solution 2 % acide acétique (v : v) MeOH

Solution 5 µg/mL : 0.1 mL SF ad 2 mL solution 2 % acide acétique (v : v) MeOH

Annexe 6 : Standard de validation

I. **Reconstitution de 2 flacons d'Alkeran®** → Concentration 100 mg de melphalan
II. **Solution mère (SM) 1 mg/mL :** Prélever la totalité (20 mL des Alkeran® reconstitués) + rincer les fioles avec solution 2 % acide acétique (v : v) MeOH ad 100 mL sol. 2 % acide acétique (v : v) MeOH
III. **Solution fille (SF) 0.1 mg/mL :** 2 mL SM ad 20 mL
IV. **Solution 30 µg/mL :** 0.6 mL SF ad 2 mL
V. **Solution 15 µg/mL :** 0.3 mL SF ad 2 mL
VI. **Solution 5 µg/mL :** 0.1 mL SF ad 2 mL

Solution diluante pour standard de Calibration : Solution 2 % acide acétique (v : v) dans MeOH - 40 mL d'acide acétique glaciale dilué ad 2000 mL de MeOH

Annexe 7 : Préparation des solutions de melphalan

I. Reconstitution : 10 mL de solution diluante dans flacon de melphalan → 5 mg/mL
II. **Solution 1, 1 mg/mL :** 400 µL solution reconstituée ad 2 mL (1.6 mL solution 2 % acide acétique (v : v) MeOH)
III. **Solution 2, 100 µg/mL :** 200 µL solution 1 ad 2 mL (1.8 mL solution 2% acide acétique (v : v) MeOH
IV. **Solution 3, 20 µg/mL :** 400 µL solution 2 ad 2 mL (1.6 mL solution 2 % acide acétique (v : v) MeOH

Annexe 8 : Préparation solutions melphalan pour injection sur HPLC pour l'étude de stabilité

I. Seringue décongelée : liquide mis dans un flacon fermé
II. Vortexer le flacon 30 secondes
III. Prélever 1 mL avec micropipette et mettre dans ballon de 10 mL
IV. Diluer et ajuster au trait de jauge avec solution 2 % acide acétique (v : v) MeOH

Annexe 9 : Calculs facteur de sélectivité figure 5

Calculs du facteur de sélectivité selon équation 2 :

$$\propto_{1-2} = \frac{4.7 - 1.2}{2.0 - 1.2} = 4.38$$

$$\propto_{2-3} = \frac{5.0 - 1.2}{4.7 - 1.2} = 1.08$$

$$\propto_{3-4} = \frac{9.5 - 1.2}{5.0 - 1.2} = 2.18$$

$$\propto_{4-5} = \frac{13.0 - 1.2}{9.5 - 1.2} = 1.42$$

Annexe 10 : Chromatogramme pour conformité du système fournit par la Ph. Eur. 8.8

Annex 1:

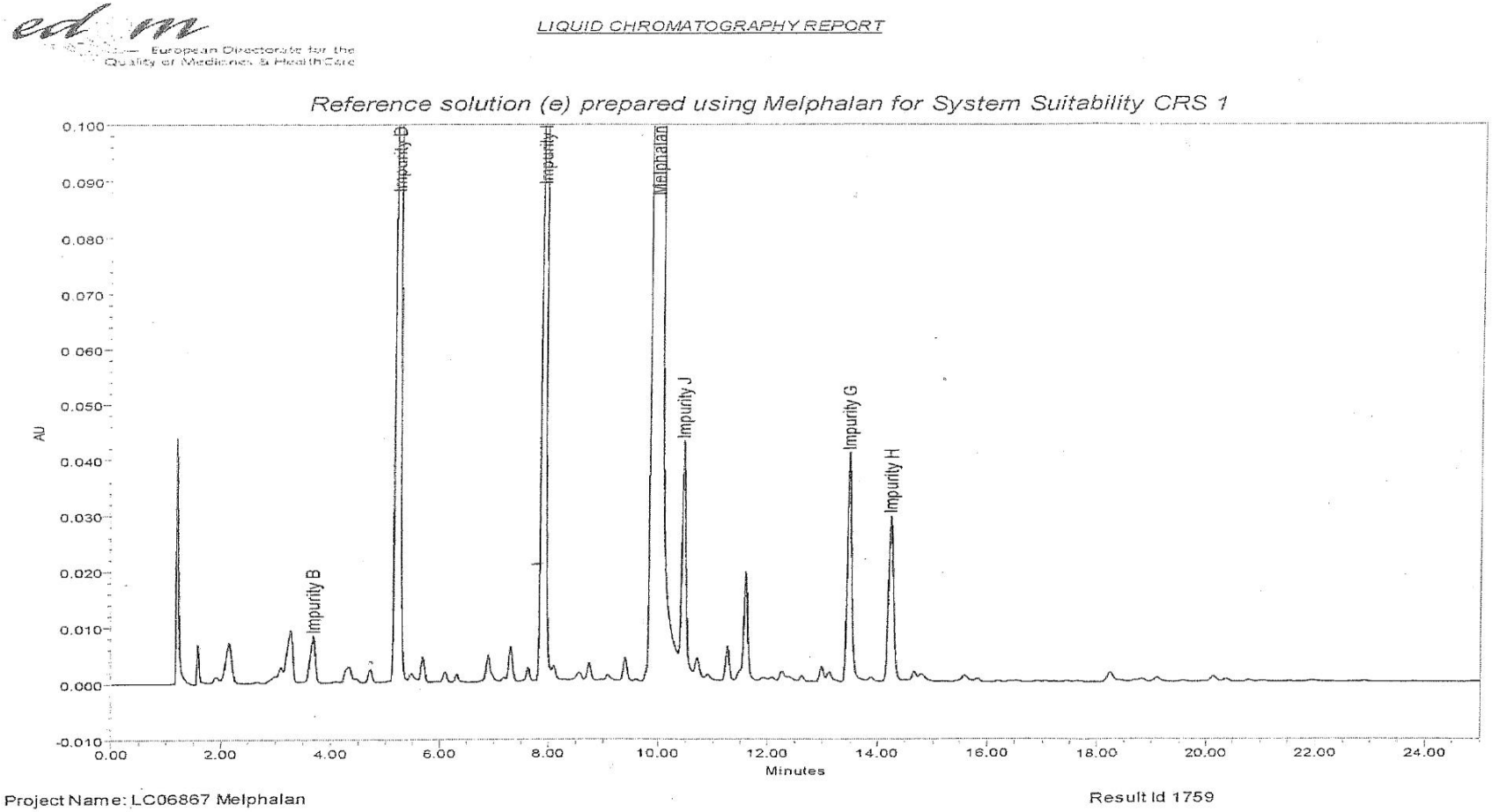


Figure 13 : Chromatogramme fournit par la Ph. Eur. 8.8 pour la conformité du système

Annexe 11 : Rapport de Validation Enoval

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: 1CBRO

1 / 32

DOSAGE DE L'ALKERAN

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: 1CBRO
Méthode: HPLC-DAD
Protocole: Validation Alkeran Solution
Produit: Alkeran
Composé: Melphalan
Matrice: Acide Acétique + povidone + NaCl

Identifiant d'exploitation: ENOV-V3.0b PROD-2016141550715
e-noval V3.0b PROD Rapport v1.4 FR
20 mai 2016 15:08 (CEST)
© Arlenda 2001-2013.

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: 1CBRO

Table des matières

1. Introduction 4
2. Plan d'expériences 5
3. Fonction de réponse 6
4. Justesse 8
5. Fidélité 9
6. Incertitude de mesure 11
7. Exactitude 12
8. Linéarité des résultats 14
9. Limite de détection (LD), limites de quantification (LQ) et intervalle de dosage .. 16
10. Références bibliographiques 17
Annexe 1 Données 19
Annexe 2 Sélection du modèle d'étalonnage 22
Annexe 3 Concentrations calculées pour le modèle selectionné 23
Annexe 4 Diagnostics 24
Annexe 5 Statistiques 25
Annexe 6 Résumé 29

Table des tableaux

Tableau I - Standards d'étalonnage 5
Tableau II - Standards de Validation 5
Tableau III - Modèles d'étalonnage triés par 'Indice d'Exactitude' 6
Tableau IV - Paramètres de régression 6
Tableau V - Justesse 8
Tableau VI - Répétabilité et Fidélité intermédiaire relatives 9
Tableau VII - Répétabilité et Fidélité Intermédiaire absolues 9
Tableau VIII - Limite supérieure de confiance à 95% 9
Tableau IX - Taux de recouvrement par série 10
Tableau X - Incertitude 11
Tableau XI - Exactitude de la méthode obtenue en considérant le modèle Régression linéaire passant par 0 Ajustée en utilisant uniquement le niveau le plus haut 13
Tableau XII - Standards d'étalonnage 19
Tableau XIII - Standards de Validation 19
Tableau XIV - Alignement des données [1] 20
Tableau XV - Concentrations calculées [1] 23
Tableau XVI - Résidus standardisés pour le modèle d'étalonnage choisi 24

© Arlenda 2001-2013.

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: 1CBRO

Table des figures

Figure 1 - Courbes d'étalonnage....7
Figure 2 - Profil d'exactitude obtenu en considérant le modèle: Régression linéaire passant par 0 Ajustée en utilisant uniquement le niveau le plus haut 12
Figure 3 - Profil de risque obtenu en considérant le modèle: Régression linéaire passant par 0 Ajustée en utilisant uniquement le niveau le plus haut 13
Figure 4 - Relation entre les concentrations introduites et calculées....14
Figure 5 - Graphe de linearité....15
Figure 6 - Résidus standardisés....24

© Arlenda 2001-2013.

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: 1CBRO

Dosage de l'Alkeran

1. Introduction

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

Les critères de validation présentés dans ce rapport sont :

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

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

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

© Arlenda 2001-2013.

2. Plan d'expériences

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

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

La matrice est : Acide Acétique + povidone + NaCl

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

Tableau I - *Standards d'étalonnage*

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

Le nombre total d'observations est 18.

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

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

Tableau II - *Standards de Validation*

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

Le nombre total d'observations est 18.

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

© Arlenda 2001-2013.

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: 1CBRO

3. Fonction de réponse

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

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

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

Modèle	Indice d'Exactitude	Limite inférieure et supérieure de quantification (ug/mL)	Indice d'Intervalle de Dosage	Indice de Fidélité	Indice de Justesse
Regression linéaire passant par 0 ajustee en utilisant uniquement le niveau 3	0.7068	[5.707 , 30.00]	0.9717	0.4982	0.7295

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

Le modèle d'étalonnage sélectionné est: **Régression linéaire passant par 0 ajustée en utilisant uniquement le niveau 3**

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

$Y = bX$

où Y = réponse analytique (en mAu) et X = concentration introduite (en ug/mL)

Tableau IV - *Paramètres de régression*

Série	Pente	r^2	d.d.l. résiduels	SCR
1	2.4097E+05	ND	2	8.0979E+09
2	2.4013E+05	ND	2	3.6207E+09

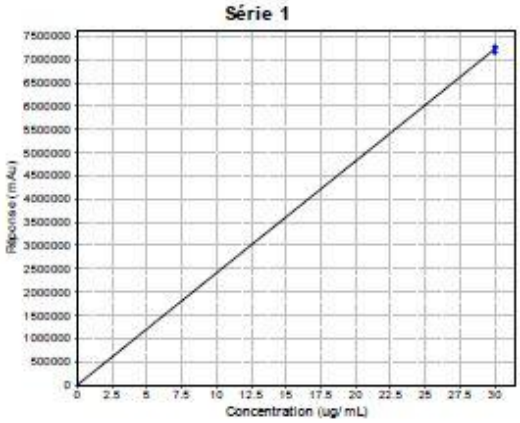
r^2 = coefficient de détermination; d.d.l. = degrés de liberté; SCR = somme des carrés des résidus

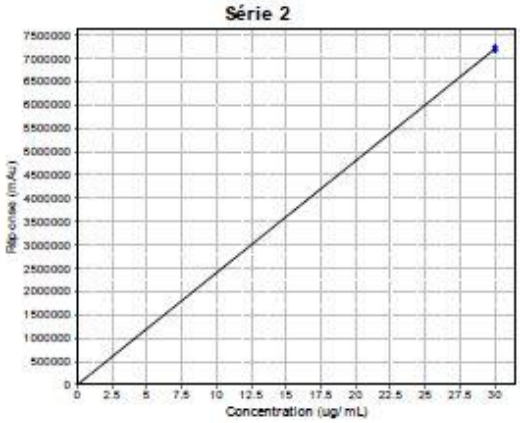
© Arlenda 2001-2013.

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: 1CBRO

7 / 32

Figure 1 - *Courbes d'étalonnage*





Identifiant d'exploitation: ENOV-V3.0b PROD-2016141550715
e-noval V3.0b PROD Rapport v1.4 FR
20 mai 2016 15:08 (CEST)
© Arlenda 2001-2013.

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: 1CBRO

4. Justesse

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

Comme indiqué dans le tableau V, la justesse est exprimée en terme de biais absolu (ug/mL), de biais relatif (%) ou de taux de recouvrement (%) pour chaque niveau de concentration des standards de validation.

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

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

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

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

Tableau V - *Justesse*

Niveau de concentration (ug/mL)	Moyenne des concentrations introduites (ug/mL)	Moyenne des concentrations calculées (ug/mL)	Biais absolu (ug/mL)	Biais relatif (%)	Taux de recouvrement (%)	Intervalle de confiance à 95% des Recouvrements (%)
1.0	5.000	5.181	0.1809	3.618	103.6	[103.0 , 104.2]
2.0	15.00	14.79	-0.2060	-1.373	98.63	[97.57 , 99.68]
3.0	30.00	29.31	-0.6915	-2.305	97.69	[96.75 , 98.64]

© Arlenda 2001-2013.

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: 1CBRO

5. Fidélité

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

Comme présenté dans le tableau VI et le tableau VII, la fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) peut être exprimée en écart type (SD) et en terme de coefficient de variation (CV).

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

Tableau VI - *Répétabilité et Fidélité intermédiaire relatives*

Niveau de concentration (ug/mL)	Moyenne des concentrations introduites (ug/mL)	Répétabilité (CV%) [1]	Fidélité Intermédiaire (CV%) [1]
1.0	5.000	0.5733	0.5733
2.0	15.00	1.006	1.007
3.0	30.00	0.9051	0.9051

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

Tableau VII - *Répétabilité et Fidélité Intermédiaire absolues*

Niveau de concentration (ug/mL)	Moyenne des concentrations introduites (ug/mL)	Répétabilité (SD - ug/mL)	Inter-Séries (SD - ug/mL)	Ratio des composants de la variance (Inter / Intra)	Fidélité Intermédiaire (SD - ug/mL)
1.0	5.000	0.02867	0	0	0.02867
2.0	15.00	0.1509	0.006917	0.002101	0.1511
3.0	30.00	0.2715	0	0	0.2715

Tableau VIII - *Limite supérieure de confiance à 95%*

Niveau de concentration (ug/mL)	Moyenne des concentrations introduites (ug/mL)	Limite supérieure de confiance à 95% de la répétabilité (SD - ug/mL)	Limite supérieure de confiance à 95% de la fidélité intermédiaire (SD - ug/mL)
1.0	5.000	0.05989	0.05989

© Arlenda 2001-2013.

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: 1CBRO

Niveau de concentration (ug/mL)	Moyenne des concentrations introduites (ug/mL)	Limite supérieure de confiance à 95% de la répétabilité (SD - ug/mL)	Limite supérieure de confiance à 95% de la fidélité intermédiaire (SD - ug/mL)
2.0	15.00	0.3580	1.400
3.0	30.00	0.5673	0.5673

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

Tableau IX - *Taux de recouvrement par série*

Niveau de concentration (ug/mL)	Série	Moyenne des concentrations introduites (ug/mL)	Concentration calculée (ug/mL)	Taux de recouvrement (%)
1.0	1	5.000	5.183	103.7
1.0	2	5.000	5.178	103.6
1.0	Moyenne des series	5.000	5.181	103.6
2.0	1	15.00	14.73	98.21
2.0	2	15.00	14.86	99.04
2.0	Moyenne des series	15.00	14.79	98.63
3.0	1	30.00	29.23	97.43
3.0	2	30.00	29.39	97.96
3.0	Moyenne des series	30.00	29.31	97.69

© Arlenda 2001-2013.

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: 1CBRO

6. Incertitude de mesure

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

Tableau X - *Incertitude*

Niveau de concentration (ug/mL)	Moyenne des concentrations introduites (ug/mL)	Incertitude du biais (ug/mL)	Incertitude (ug/mL)	Incertitude étendue (ug/mL)	Incertitude étendue relative (%)
1.0	5.000	0.01170	0.03096	0.06193	1.239
2.0	15.00	0.06180	0.1632	0.3265	2.176
3.0	30.00	0.1108	0.2933	0.5865	1.955

© Arlenda 2001-2013.

7. Exactitude

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée comme telle, appelée également "valeur conventionnellement vraie". L'exactitude prend en compte l'erreur totale, c'est à dire l'erreur systématique et l'erreur aléatoire liées au résultat. Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité. Elle est estimée à partir du profil d'exactitude présenté en figure 2.

Les limites d'acceptation ont été fixées à ± 5 %, et ceci en accord avec l'objectif de la procédure analytique.

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

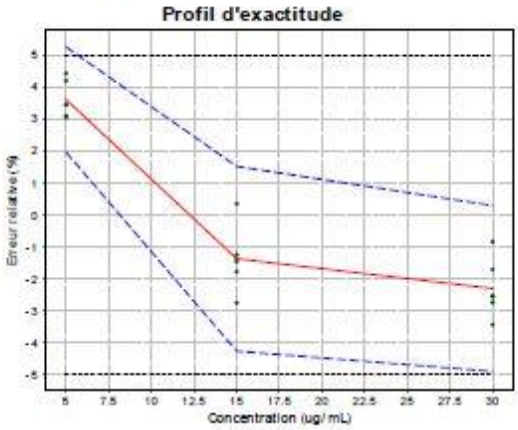
La formule utilisée pour le calcul de cet intervalle de tolérance est:

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

L'explication de k et CV_{FI} peut être trouvée dans l'annexe 5.

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

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



© Arlenda 2001-2013.

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: 1CBRO

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

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

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

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

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

Niveau de concentration (ug/mL)	Moyenne des concentrations introduites[1] (ug/mL)	Limites de tolérance "Beta-expectation" (ug/mL)	Limites de tolérance "Beta-expectation" relatives (%)	Risque[2] (%)
1.0	5.000	[5.099 , 5.263]	[1.971 , 5.264]	4.101
2.0	15.00	[14.36 , 15.23]	[-4.269 , 1.522]	1.365
3.0	30.00	[28.53 , 30.09]	[-4.904 , 0.2943]	2.294

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

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

© Arlenda 2001-2013.

8. Linéarité des résultats

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

Un modèle de régression linéaire (cf. Figure 4) a été ajusté sur les concentrations calculées en fonction des concentrations introduites dans le but d'obtenir l'équation suivante:

$Y = 0.3394 + 0.9653\ X$

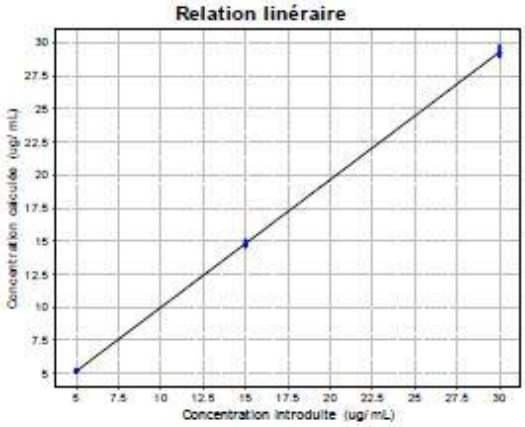
où Y = concentrations calculées (ug/mL) et X = concentrations introduites (ug/mL).

Le coefficient de détermination (r^2) est égal à 0.9997 .

La somme des carrés des résidus (SCR) est égale à 0.4924 .

Les concentrations calculées figurent en annexe 3.

Figure 4 - *Relation entre les concentrations introduites et calculées*

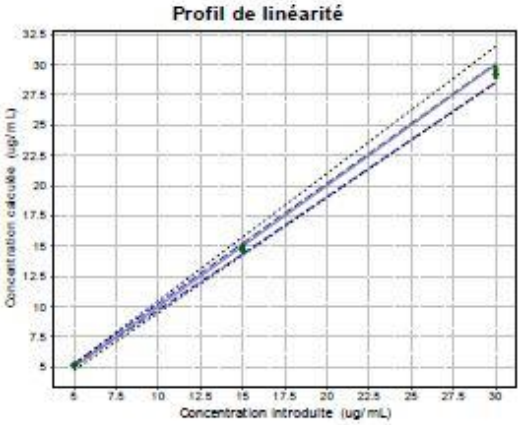


Dans le but de démontrer la linéarité de la méthode, l'approche basée sur l'intervalle de tolérance attendu au niveau β exprimé en valeur absolue peut-être utilisé et est illustré dans la figure 5.

© Arlenda 2001-2013.

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: 1CBRO

Figure 5 - *Graphe de linearité*



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

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

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

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

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

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

© Arlenda 2001-2013.

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

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

Il existe deux façons de calculer la LD :

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

L'application choisit la plus petite valeur.

LD (ug/mL) = 0.6619

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

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

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

Limite inférieure de quantification (LQ_{Inf}) (ug/mL) = 5.707

Limite supérieure de quantification (LQ_{Sup}) (ug/mL) = 30.00

© Arlenda 2001-2013.

10. Références bibliographiques

1. Burdik RK, Graybill FA. Confidence interval on variance components. New York: CRC Press;1992.
2. Derringer D, Suich R. Simultaneous optimization of several response variables. Journal of quality technology. 1980;12:214-219.
3. Feinberg M, Boulanger B, Dewe W, Hubert P. New advances in method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical data. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2004;380:502-514.
4. Gonzalez Gustavo A, Herrador Angeles M. Accuracy profile from uncertainty measurement. Talanta, 2006 Nov; 70(4):896-901.
5. Hubert Ph, Nguyen-Huu JJ. Validation of quantitative analytical procedures. Harmonization of approaches. STP Pharma Pratiques. 2003 May;13(3):101-138.
6. Mee RW. Beta-expectation and beta-content tolerance limits for balanced one-way ANOVA random model. Technometrics. 1984;26:251-254.
7. Miller JC, Miller JN. Statistics for Analytical Chemistry. 3rd edn. New York:Ellis Horwood;1993.
8. Miller K, Bowsher R, Celniker R, Gibbons J, Gupta S, Lee J, et al. Workshop on Bioanalytical Methods Validation for Macromolecules : Summary Report. Pharmaceutical Research. 2001;18(9):1373-83.
9. Shah VP, Midha KK, Findlay JW, Hill HM, Hulse JD, McGilveray IJ, et al. Bioanalytical Method Validation - A revisit with a decade of progress. Pharmaceutical Research. 2000;17(12):1551-7.
10. Eurachem. The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 1st ed. Eurachem;1998.
11. Eurachem. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 2nd ed. Eurachem;2000.
12. Guidance for industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). 2001 May [cited 2009 Apr 2]. Available from: http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm.
13. Guidance for Industry : Analytical Procedures and Methods Validation (Draft guidance). U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). 2000 Aug [cited 2009 Apr 2]. Available from: http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm.
14. Guidance for Industry Q9 Quality Risk Management. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug

© Arlenda 2001-2013.

Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). 2006 [cited 2009 Apr 2]. Available from: http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html.

15. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 2005 [cited 2009 Apr 2]. Available from: http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html.
16. ISO 5725-1:1994, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 1: General principles and definitions.
17. ISO 5725-2:1994, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.
18. ISO 5725-3:1994, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method.
19. ISO 5725-4:1994, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 4: Basic methods for the determination of the trueness of a standard measurement method.
20. ISO 5725-6:1994, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 6: Use in practice of accuracy values.
21. ISO/IEC 17025:2005, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.

© Arlenda 2001-2013.

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: 1CBRO

Annexe 1 - Données

1 Standards d'étalonnage

Tableau XII - *Standards d'étalonnage*

Référence échantillon	Série	Niveau de concentration (ug/mL)	Concentration introduite (ug/mL)	Réponse (mAu)
API1	1	1.0	5	1191326
API10	2	1.0	5	1183210
API11	2	1.0	5	1177237
API12	2	1.0	5	1179604
API13	2	2.0	15	3518255
API14	2	2.0	15	3528143
API15	2	2.0	15	3488353
API16	2	3.0	30	7196204
API17	2	3.0	30	7165749
API18	2	3.0	30	7249791
API2	1	1.0	5	1218567
API3	1	1.0	5	1185568
API4	1	2.0	15	3566299
API5	1	2.0	15	3596840
API6	1	2.0	15	3535990
API7	1	3.0	30	7273787
API8	1	3.0	30	7156239
API9	1	3.0	30	7257246

La matrice est : Acide Acétique + povidone + NaCl.

2 Standards de Validation

Tableau XIII - *Standards de Validation*

Référence échantillon	Série	Niveau de concentration (ug/mL)	Concentration introduite (ug/mL)	Réponse (mAu)
PROD1	1	1.0	5	1258303
PROD10	2	1.0	5	1237328
PROD11	2	1.0	5	1242038
PROD12	2	1.0	5	1251114
PROD13	2	2.0	15	3614486
PROD14	2	2.0	15	3549532

© Arlenda 2001-2013.

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: 1CBRO

Référence échantillon	Série	Niveau de concentration (ug/mL)	Concentration introduite (ug/mL)	Réponse (mAu)
PROD15	2	2.0	15	3537981
PROD16	2	3.0	30	7021047
PROD17	2	3.0	30	7143174
PROD18	2	3.0	30	7006062
PROD2	1	1.0	5	1242312
PROD3	1	1.0	5	1246492
PROD4	1	2.0	15	3565481
PROD5	1	2.0	15	3514845
PROD6	1	2.0	15	3569716
PROD7	1	3.0	30	7044376
PROD8	1	3.0	30	7105715
PROD9	1	3.0	30	6980396

3 Alignement des données (en utilisant la fonction de réponse sélectionnée)

Quand les valeurs introduites à chaque niveau ne sont pas identiques pour toutes les séries, il est nécessaire d'aligner les observations sur la moyenne de la concentration pour chaque niveau. C'est à dire de transformer les réponses obtenues pour chaque série dans le but de les aligner sur les concentrations moyennes.

Tableau XIV - *Alignement des données* [1]

Référence échantillon	Série	Niveau de concentration (ug/mL)	Concentration introduite (ug/mL)	Concentration alignée(ug/mL)	Réponse (mAu)	Réponse alignée (mAu)
PROD1	1	1.0	5	5.000	1258303	1.2583E+06
PROD10	2	1.0	5	5.000	1237328	1.2373E+06
PROD11	2	1.0	5	5.000	1242038	1.2420E+06
PROD12	2	1.0	5	5.000	1251114	1.2511E+06
PROD13	2	2.0	15	15.00	3614486	3.6145E+06
PROD14	2	2.0	15	15.00	3549532	3.5495E+06
PROD15	2	2.0	15	15.00	3537981	3.5380E+06
PROD16	2	3.0	30	30.00	7021047	7.0210E+06
PROD17	2	3.0	30	30.00	7143174	7.1432E+06
PROD18	2	3.0	30	30.00	7006062	7.0061E+06
PROD2	1	1.0	5	5.000	1242312	1.2423E+06
PROD3	1	1.0	5	5.000	1246492	1.2465E+06

© Arlenda 2001-2013.

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: 1CBRO

Référence échantillon	Série	Niveau de concentration (ug/mL)	Concentration introduite (ug/mL)	Concentration alignée(ug/mL)	Réponse (mAu)	Réponse alignée (mAu)
PROD4	1	2.0	15	15.00	3565481	3.5655E+06
PROD5	1	2.0	15	15.00	3514845	3.5148E+06
PROD6	1	2.0	15	15.00	3569716	3.5697E+06
PROD7	1	3.0	30	30.00	7044376	7.0444E+06
PROD8	1	3.0	30	30.00	7105715	7.1057E+06
PROD9	1	3.0	30	30.00	6980396	6.9804E+06

[1] La règle d'arrondi, comme définie dans l'introduction, n'est pas appliquée aux concentrations introduites et aux réponses analytiques.

© Arlenda 2001-2013.

Annexe 2 - Sélection du modèle d'étalonnage

Aucun autre modèle excepté que celui retenu et décrit dans la section 3.(Fonction de réponse) n'a été évalué.

© Arlenda 2001-2013.

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: 1CBRO

Annexe 3 - Concentrations calculées pour le modèle selectionné

Tableau XV - *Concentrations calculées* [1]

Référence échantillon	Série	Niveau de concentration (ug/mL)	Concentration introduite (ug/mL)	Concentration alignée (ug/mL)	Concentration calculée (ug/mL)	Erreur relative (%)
PROD1	1	1.0	5.0	5.000	5.222	4.437
PROD10	2	1.0	5.0	5.000	5.153	3.055
PROD11	2	1.0	5.0	5.000	5.172	3.447
PROD12	2	1.0	5.0	5.000	5.210	4.203
PROD13	2	2.0	15.0	15.00	15.05	0.3478
PROD14	2	2.0	15.0	15.00	14.78	-1.455
PROD15	2	2.0	15.0	15.00	14.73	-1.776
PROD16	2	3.0	30.0	30.00	29.24	-2.538
PROD17	2	3.0	30.0	30.00	29.75	-0.8432
PROD18	2	3.0	30.0	30.00	29.18	-2.746
PROD2	1	1.0	5.0	5.000	5.155	3.109
PROD3	1	1.0	5.0	5.000	5.173	3.456
PROD4	1	2.0	15.0	15.00	14.80	-1.357
PROD5	1	2.0	15.0	15.00	14.59	-2.758
PROD6	1	2.0	15.0	15.00	14.81	-1.240
PROD7	1	3.0	30.0	30.00	29.23	-2.555
PROD8	1	3.0	30.0	30.00	29.49	-1.707
PROD9	1	3.0	30.0	30.00	28.97	-3.440

[1] La règle d'arrondi, telle que définie dans l'introduction, n'est pas appliquée aux concentrations introduites.

© Arlenda 2001-2013.

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: 1CBRO

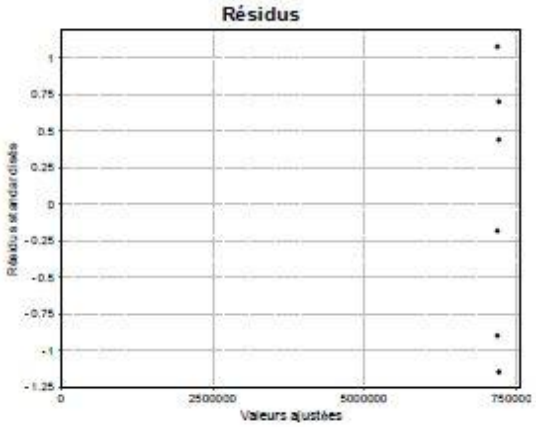
Annexe 4 - Diagnostics

1 Résidus Standardisés

Tableau XVI - *Résidus standardisés pour le modèle d'étalonnage choisi*

Référence échantillon	Série	Niveau de concentration (ug/mL)	Concentration introduite (ug/mL)	Réponse (mAu)	Valeur ajustée (mAu)	Résidu standardisé
API16	2	3.0	30.0	7196204.0	7.2039E+06	-0.1812
API17	2	3.0	30.0	7165749.0	7.2039E+06	-0.8970
API18	2	3.0	30.0	7249791.0	7.2039E+06	1.078
API7	1	3.0	30.0	7273787.0	7.2291E+06	0.7024
API8	1	3.0	30.0	7156239.0	7.2291E+06	-1.145
API9	1	3.0	30.0	7257246.0	7.2291E+06	0.4425

Figure 6 - *Résidus standardisés*



© Arlenda 2001-2013.

Annexe 5 - Statistiques

1 Indices pour le tri des modèles d'étalonnage

1.1 Indice "Intervalle de Dosage"

L'intervalle de dosage (*ID*) est l'intervalle à l'intérieur duquel la méthode est valide. Cet intervalle de dosage est obtenu en calculant la différence entre la borne supérieure et inférieure des limites de quantification. L'**indice d'Intervalle de Dosage** est un nombre sans dimension variant dans l'intervalle [0,1]. L'indice prend la valeur 1 si la procedure d'analyse est apte à doser sur la totalité de l'intervalle envisagé (concentration minimum et maximum introduites). Il est calculé selon la formule :

$$D(ID) = \frac{ID}{C_{max} - C_{min}}$$

où C_{max} et C_{min} sont la plus grande et la plus petite concentration introduite.

Remarque: si un seul niveau de concentration est introduit, l'Indice "Intervalle de Dosage" est fixé à 0 ou 1.

1.2 Indice de Fidélité

L'aire utilisée pour le calcul de l'indice de Fidélité est l'aire, à l'intérieur des limites de quantification, entre la limite inférieure et supérieure du profil d'exactitude. Cette aire est calculée par la règle des trapèzes. L'**indice de Fidélité** est sans dimension et varie dans l'intervalle [0,1]. Plus cet indice est proche de 1, plus la méthode est fidèle. Il est calculé selon la formule :

$$D(aire) = \begin{cases} \dfrac{2\lambda(C_{max} - C_{min}) - aire}{2\lambda(C_{max} - C_{min})} & \text{si } aire \leq 2\lambda(C_{max} - C_{min}) \\ 0 & \text{sinon} \end{cases}$$

où λ est la limite d'acceptation et C_{max} and C_{min} sont les concentrations maximum et minimum.

Remarque: si un seul niveau de concentration est introduit, la formule devient:

$$D(aire) = \begin{cases} 1 - \dfrac{L}{2\lambda} & \text{si } L \leq 2\lambda \\ 0 & \text{sinon} \end{cases}$$

© Arlenda 2001-2013.

où L est la longueur de l'intervalle de Tolérance au niveau estimé et λ la limite d'acceptation.

1.3 Indice de Justesse

La somme du carré des biais (SCB) est calculée en sommant le carré des biais estimés à chaque niveau de concentration. L'**Indice de Justesse** est un nombre sans dimension variant dans l'intervalle [0,1] où 1 est l'optimum et signifie qu'il n'y a pas de biais pour tous les niveaux de concentrations observés. L'indice est calculé de la façon suivante :

$$D(SCB) = \begin{cases} 1 - \dfrac{SCB}{m\lambda^2} & \text{si } SCB \leq m\lambda^2 \\ 0 & \text{sinon} \end{cases}$$

où λ est la limite d'acceptation de la méthode, et m est le nombre de niveau de concentration.

1.4 Indice d'Exactitude

Ces 3 indices sont compilés dans l'**Indice d'Exactitude** qui correspond à la moyenne géométrique D^* des indices respectifs. L'Indice d'Exactitude varie de 0 à 1. Plus l'indice est proche de 1 meilleure est la méthode. Ce chiffre sans dimension est seulement utilisé pour comparer les différents modèles d'étalonnage et non pour comparer les procédures analytiques. L'indice est calculé de la façon suivante:

$$D^* = \sqrt[3]{D(aire) \times D(ID) \times D(SCB)}$$

2 Calcul du profil d'exactitude

Un profil d'Exactitude est obtenu en reliant d'une part les bornes inférieures et d'autre part les bornes supérieures de l'intervalle de tolérance ("β-expectation tolerance intervals") calculé à chaque niveau de concentration. La formule pour calculer ces "β-expectation tolerance intervals" est:

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

où

$$CV_{FI}(\%) = 100\frac{\sqrt{\hat{\sigma}^2_{Inter} + \hat{\sigma}^2_{Intra}}}{\hat{\mu}}$$

et

© Arlenda 2001-2013.

$$k = Q_t\left(\nu; \frac{1+\beta}{2}\right)\sqrt{1+\frac{n\hat{\sigma}^2_{Inter}+\hat{\sigma}^2_{Intra}}{pn\left(\hat{\sigma}^2_{Inter}+\hat{\sigma}^2_{Intra}\right)}}$$

$\hat{\sigma}^2_{Inter}$ et $\hat{\sigma}^2_{Intra}$ sont les estimations des variances intra et inter séries respectivement;

$Q_t\left(\nu; \frac{1+\beta}{2}\right)$ est le quantile β de la distribution de Student à ν degrés de liberté;

L'approximation de Satterthwaite pour le nombre de degrés de libertés est :

$$\nu = \frac{(R+1)^2}{\frac{\left(R+\frac{1}{n}\right)^2}{p-1}+\frac{1-\frac{1}{n}}{pn}}$$

où

R est le ratio de la variance inter-séries sur la variance intra-séries;

p est le nombre de séries et n le nombre de répétitions par séries.

Quand le plan expérimental n'est pas équilibré, c'est à dire qu'il n'y a pas le même nombre de répétitions dans les différentes séries, alors n est estimé comme le nombre moyen de répétitions.

$S_{FI} = \sqrt{\hat{\sigma}^2_{Inter}+\hat{\sigma}^2_{Intra}}$ est l'estimation de l'écart type de la Fidélité Intermédiaire.

La méthode est considérée comme valide à l'intérieur d'un intervalle de dosage pour lequel le profil d'exactitude est inclus dans les limites d'acceptation de la méthode.

3 Calcul du risque

Le risque d'avoir des mesures à l'extérieur des limites d'acceptation est directement dérivé de l'intervalle de tolérance ci-dessus, en utilisant les mêmes estimateurs et la distribution T de Student d'une manière différente, c'est-à-dire en sommant la probabilité d'être au-dessus de la limite supérieure d'acceptation et celle d'être au-dessous de la limite inférieure d'acceptation au lieu de calculer l'intervalle où il est prévu d'observer β% des futures mesures.

La probabilité d'avoir de futures mesures en dehors des limites d'acceptations peut être exprimée de la manière suivante:

© Arlenda 2001-2013.

$$P\left[\left|\frac{X_i-\mu_T}{\mu_T}\right|>\lambda\right]=P\left[\frac{X_i-\mu_T}{\mu_T}<(-\lambda)\right]+P\left[\frac{X_i-\mu_T}{\mu_T}>(+\lambda)\right]$$
$$=P\left[t(\nu)<\frac{-\lambda(\%)-biais(\%)}{CV_{FI}\sqrt{1+\frac{n\hat{\sigma}^2_{Inter}+\hat{\sigma}^2_{Intra}}{pn\left(\hat{\sigma}^2_{Inter}+\hat{\sigma}^2_{Intra}\right)}}}\right]$$
$$+P\left[t(\nu)>\frac{\lambda(\%)-biais(\%)}{CV_{FI}\sqrt{1+\frac{n\hat{\sigma}^2_{Inter}+\hat{\sigma}^2_{Intra}}{pn\left(\hat{\sigma}^2_{Inter}+\hat{\sigma}^2_{Intra}\right)}}}\right]$$

où

X_i est un résultat individuel, μ_T est considéré comme étant la "vrai" valeur,

p est le nombre de séries et n est le nombre de répétitions par série,

λ est la limite d'acceptation,

ν est l'approximation de Satterthwaite des degrés de liberté,

CV_{FI} est le coefficient de variation de la Fidélité Intermédiaire.

© Arlenda 2001-2013.

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: 1CBRO

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 lineaire passant par 0 ajustee en utilisant uniquement le niveau 3	0.7068	[5.707 , 30.00]	0.9717	0.4982	0.7295

Série	Pente	r^2	d.d.l. résiduels	SCR
1	2.4097E+05	ND	2	8.0979E+09
2	2.4013E+05	ND	2	3.6207E+09

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	5.000	5.181	0.1809	3.618	103.6	[103.0 , 104.2]
2.0	15.00	14.79	-0.2060	-1.373	98.63	[97.57 , 99.68]
3.0	30.00	29.31	-0.6915	-2.305	97.69	[96.75 , 98.64]

3 Fidélité

Niveau de concentration (ug/mL)	Moyenne des concentrations introduites (ug/mL)	Répétabilité (CV%)	Fidélité Intermédiaire (CV%)
1.0	5.000	0.5733	0.5733
2.0	15.00	1.006	1.007
3.0	30.00	0.9051	0.9051

Identifiant d'exploitation: ENOV-V3.0b PROD-2016141550715
e·noval V3.0b PROD Rapport v1.4 FR
20 mai 2016 15:08 (CEST)
© Arlenda 2001-2013.

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: 1CBRO

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	5.000	0.02867	0	0	0.02867
2.0	15.00	0.1509	0.006917	0.002101	0.1511
3.0	30.00	0.2715	0	0	0.2715

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	5.000	0.05989	0.05989
2.0	15.00	0.3580	1.400
3.0	30.00	0.5673	0.5673

Niveau de concentration (ug/mL)	Série	Moyenne des concentrations introduites (ug/mL)	Concentration calculée (ug/mL)	Taux de recouvrement (%)
1.0	1	5.000	5.183	103.7
1.0	2	5.000	5.178	103.6
1.0	Moyenne des series	5.000	5.181	103.6
2.0	1	15.00	14.73	98.21
2.0	2	15.00	14.86	99.04
2.0	Moyenne des series	15.00	14.79	98.63
3.0	1	30.00	29.23	97.43
3.0	2	30.00	29.39	97.96
3.0	Moyenne des series	30.00	29.31	97.69

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	5.000	0.01170	0.03096	0.06193	1.239
2.0	15.00	0.06180	0.1632	0.3265	2.176
3.0	30.00	0.1108	0.2933	0.5865	1.955

© Arlenda 2001-2013.

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: 1CBRO

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	5.000	[5.099 , 5.263]	[1.971 , 5.264]	4.101
2.0	15.00	[14.36 , 15.23]	[-4.269 , 1.522]	1.365
3.0	30.00	[28.53 , 30.09]	[-4.904 , 0.2943]	2.294

6 Linéarité des résultats

Intercept	Slope	r^2	SCR
0.3394	0.9653	0.9997	0.4924

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

LD (ug/mL)	LQ inférieure (ug/mL)	LQ supérieure (ug/mL)
0.6619	5.707	30.00

© Arlenda 2001-2013.

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: 1CBRO

Dosage de l'Alkeran

Le rapport généré par le logiciel e·noval est destiné à l'utilisateur.

La garantie est donnée que les données introduites n'ont pas été modifiées par le traitement et qu'elles n'ont pas été stockées par e·noval.

Tous les paragraphes marqués comme commentaires sont introduits sous la responsabilité de Lina Berger.

Tous les calculs ont été réalisés sous SAS ® v9.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

Les données ont été introduites avec le fichier "ENOVAL_VALID_MEL_CONG_AUCMEL_2séries.xls" (MD5="63850a78c9e46d9645856c1586fbfcdd").

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: 1CBRO

Méthode: HPLC-DAD
Protocole: Validation Alkeran Solution
Produit: Alkeran
Composé: Melphalan
Matrice: Acide Acétique + povidone + NaCl

Edité par	Revu par	Approuvé par
Nom:	Nom:	Nom:
Fonction:	Fonction:	Fonction:
Date:	Date:	Date:
Signature:	Signature:	Signature:

© Arlenda 2001-2013.

Annexe 12 : Valeurs obtenues pour la validation de la méthode analytique

Standard de calibration

Tableau 16 : Tableau excel pour validation sur Enoval, Standards de calibration

Calibration Standards				
SampleID	Series	Level	Concentration	Response
API1	1	1	5.0	1191326.0
API2	1	1	5.0	1218567.0
API3	1	1	5.0	1185568.0
API4	1	2	15.0	3566299.0
API5	1	2	15.0	3596840.0
API6	1	2	15.0	3535990.0
API7	1	3	30.0	7273787.0
API8	1	3	30.0	7156239.0
API9	1	3	30.0	7257246.0
API10	2	1	5.0	1183210.0
API11	2	1	5.0	1177237.0
API12	2	1	5.0	1179604.0
API13	2	2	15.0	3518255.0
API14	2	2	15.0	3528143.0
API15	2	2	15.0	3488353.0
API16	2	3	30.0	7196204.0
API17	2	3	30.0	7165749.0
API18	2	3	30.0	7249791.0

Standard de validation

Tableau 17 : Tableau excel pour validation sur Enoval, Standards de validation

Validation standards or QC samples				
SampleID	Series	Level	Concentration	Response
PROD1	1	1	5.0	1258303.0
PROD2	1	1	5.0	1242312.0
PROD3	1	1	5.0	1246492.0
PROD4	1	2	15.0	3565481.0
PROD5	1	2	15.0	3514845.0
PROD6	1	2	15.0	3569716.0
PROD7	1	3	30.0	7044376.0
PROD8	1	3	30.0	7105715.0
PROD9	1	3	30.0	6980396.0
PROD10	2	1	5.0	1237328.0
PROD11	2	1	5.0	1242038.0
PROD12	2	1	5.0	1251114.0
PROD13	2	2	15.0	3614486.0
PROD14	2	2	15.0	3549532.0
PROD15	2	2	15.0	3537981.0
PROD16	2	3	30.0	7021047.0
PROD17	2	3	30.0	7143174.0
PROD18	2	3	30.0	7006062.0

Annexe 13 : Résultats étude de stabilité melphalan sur 1 mois, poche de perfusion à 15 µg/mL

Concentration melphalan

Tableau 18 : Tableau récapitulatifs des résultats en termes de concentration obtenus pour l'étude de stabilité sur un mois des poches de perfusion à 15 µg/mL de melphalan

Conservation	Lot	Echantillon	Conc Melphalan t0 [µg/mL]	Moyenne	%	Conc Melphalan t1 [µg/mL]	Moyenne	%	Conc Melphalan t2 [µg/mL]	Moyenne	%	Conc Melphalan t3 [µg/mL]	Moyenne	%	Conc Melphalan t4 [µg/mL]	Moyenne	%
Congélateur (-18°C)	1	E1	13.73	13.73	100.00	13.47	13.35	97.19	13.72	13.57	98.84	13.15	13.36	97.31	13.97	14.08	102.53
						13.31			13.43			13.44			14.12		
						13.25			13.57			13.50			14.15		
	2	E1	16.45	16.45	100.00	15.75	15.82	96.16	15.80	15.87	96.49	15.69	15.75	95.76	14.78	15.09	91.77
						15.73			16.07			15.86			15.37		
						15.96			15.74			15.70			15.13		
	3	E1	15.82	15.82	100.00	14.78	14.77	93.33	15.16	15.32	96.80	15.51	15.41	97.40	15.24	15.20	96.04
						14.75			15.29			15.31			15.14		
						14.78			15.51			15.41			15.20		
	4	E1	16.29	16.39	100.00	15.92	16.01	97.66	16.57	16.51	100.74	16.52	16.42	100.18	16.00	16.19	98.75
		E2	16.27			15.98			16.62			16.24			16.45		
		E3	16.60			16.13			16.34			16.50			16.11		
			15.86	**Moyenne t0 [%]**	**100.00**		**Moyenne t1 [%]**	**96.08**		**Moyenne t2 [%]**	**98.22**		**Moyenne t3 [%]**	**97.66**		**Moyenne t4 [%]**	**97.27**
			1.08	**SD**	**0.00 %**		**SD**	**1.94%**		**SD**	**1.98%**		**SD**	**1.84%**		**SD**	**4.53%**

Annexe 14 : Résultats étude de stabilité melphalan sur 1 mois, poche de perfusion à 200 µg/mL

Concentration melphalan

Tableau 19 : Tableau récapitulatif des résultats en termes de concentration obtenus pour l'étude de stabilité sur un mois pour les poches de perfusion à 200 µg/mL de melphalan

Conservation	Lot	Echantillon	Conc melphalan t0 [µg/mL]	Moyenne	%	Conc melphalan t1 [µg/mL]	Moyenne	%	Conc melphalan t2 [µg/mL]	Moyenne	%	Conc melphalan t3 [µg/mL]	Moyenne	%	Conc melphalan t4 [µg/mL]	Moyenne	%
Congélateur (-18°C)	1	E1	227.37	227.67	100.00	222.60	223.39	98.12	220.26	220.93	97.04	227.25	228.02	100.16	233.79	234.87	103.16
		E2	229.30			225.15			220.01			229.91			237.86		
		E3	226.34			222.43			222.51			226.92			232.95		
	2	E1	232.89	232.86	100.00	223.12	223.56	96.01	219.41	219.34	94.19	223.49	223.21	95.86	222.09	220.75	94.80
		E2	232.28			222.26			218.21			222.42			219.54		
		E3	233.41			225.30			220.41			223.72			220.61		
	3	E1	234.74	233.58	100.00	216.61	217.09	92.94	218.26	219.19	93.84	222.38	222.26	95.15	219.30	219.18	93.83
		E2	234.80			216.75			220.59			223.80			220.70		
		E3	231.22			217.91			218.72			220.60			217.54		
	4	E1	228.92	229.16	100.00	219.11	218.31	95.27	228.62	227.14	99.12	236.71	236.39	103.16	231.86	232.01	101.24
		E2	229.16			216.87			226.30			236.99			230.95		
		E3	229.40			218.96			226.50			235.47			233.21		
			230.82	**Moyenne t0 [%]**	**100.00**		**Moyenne t1 [%]**	**95.58**		**Moyenne t2 [%]**	**96.05**		**Moyenne t3 [%]**	**98.58**		**Moyenne t4 [%]**	**98.26**
			2.82	**SD**	**0.00 %**		**SD**	**2.14%**		**SD**	**2.50%**		**SD**	**3.77%**		**SD**	**4.64%**

Annexe 15 : Calculs des facteurs de rétention

Calculs du facteur de rétention selon équation 1

$$\kappa' melphalan = \frac{9.5 - 1.2}{1.2} = 6.92$$

$$\kappa' propylparab\grave{e}ne = \frac{13.0 - 1.2}{1.2} = 9.83$$