

Maîtrise universitaire d'études avancées en pharmacie hospitalière
(MAS)

Session 2014-2016

Etude des substances extractibles et diffusibles dans divers contenants pharmaceutiques

Camille Fauchère

Pharmacienne

DIRECTION

Prof. Farshid Sadeghipour

SUPERVISION

Dr Markoulina Berger

Lausanne, janvier 2017

Résumé

De nombreuses substances du contenant primaire peuvent être extraites ou diffuser dans le produit. Ces substances sont dénommées les « extractables » (= extractibles) et les « leachables » (= diffusibles) (abrégées en L/E) dans le langage analytique. Ces substances peuvent causer une dégradation du produit (réaction d'oxydation, aggrégation...) et/ou être toxiques pour le patient. Afin d'améliorer la qualité et la sécurité des préparations pharmaceutiques, des études sur les substances L/E contenues dans les préparations fabriquées en milieu hospitalier devraient être réalisées.

Le but de ce travail était de rechercher, d'identifier et de quantifier (parmi les substances pouvant potentiellement être retrouvées dans les contenants étudiés) quatre substances L/E (le BHT, l'Antioxydant 425, l'acide myristique et l'acide caprylique) dans 5 solutions différentes (tampon phosphate à pH 3, à pH 8, un mélange isopropanol/eau 50:50, une solution d'insuline à 1 [UI/mL] et du NaCl 0.9%) conditionnées dans trois contenants différents (les seringues BD Perfusion[®], les seringues BD Sterifill[®] et les flacons COC, Promens/Elpack[®]).

L'acide myristique et l'acide caprylique ont été extraits par extraction liquide-liquide et analysés par GC/MS. Le BHT et l'Antioxydant 425 ont été extraits par extraction en phase solide (SPE) et analysés par HPLC/UV.

Aucune trace d'acide caprylique, ni de BHT n'a été détectée dans les échantillons testés. De l'acide myristique et de l'Antioxydant 425 ont été détectés dans les différents contenants testés et majoritairement dans les seringues BD Perfusion[®]. Les concentrations en acide myristique et en Antioxydant 425 détectées sont variables et parfois élevées (jusqu'à 40 [µg/mL] d'Antioxydant 425 dans les seringues conditionnées dans le mélange isopropanol/eau 50:50). Ces substances étant peu toxiques, les doses estimées en Antioxydant 425 et en acide myristique administrées au patient restent nettement inférieures au seuil de toxicité.

Cette étude comporte plusieurs limites. Tout d'abord, seule une estimation des concentrations d'acide myristique et d'acide caprylique a pu être réalisée, car la méthode d'analyse par GC/MS n'a pas pu être validée. Les raisons en sont une perte de sensibilité de la méthode observée au cours du temps, une variabilité de la réponse des échantillons au réactif de dérivation, une élution trop rapide de l'acide caprylique et des erreurs systématiques induites par la méthode de préparation d'échantillons. Au niveau de la méthode HPLC/UV, la limite de détection est nettement en-dessus de l'AET (Analytical

Evaluation Threshold). Afin de pouvoir améliorer la sensibilité de la méthode, le recours à un spectromètre de masse est nécessaire.

Ainsi, les données obtenues dans le cadre de cette étude sont plutôt rassurantes. Cependant, seules quatre substances ont été « screenées » dans le cadre de cette étude. Beaucoup d'autres substances L/E, souvent inconnues, sont extraites de ces contenants. Afin de pouvoir garantir avec certitude la sécurité des préparations pharmaceutiques fabriquées, le profil L/E complet de toutes les substances L/E ayant diffusé dans les solutions testées devrait être réalisé. De plus, afin de connaître les doses en substances L/E réellement administrées aux patients, des études de toxico-cinétique devraient être mises en place chez les patients exposés.

Glossaire

A425 :	Antioxydant 425
ADI :	« Acceptable Daily Intake » = Dose journalière acceptable
AET :	« Analytical Evaluation Threshold » = Seuil d'évaluation analytique
BHT :	Butylhydroxytoluène
BPM :	Bisphénol M
BSTFA : TMCS :	N,O-bis(triméthylsilyl)-trifluoro-acétamide et triméthylchlorosilane
COC :	« Cyclic Olefin Copolymer » = Copolymère d'oléfine
COP :	« Cyclic Olefin Polymer » = Polymère d'oléfine cyclique
CV :	Coefficient de variation
C_x :	Concentration d'une solution
DMF :	Diméthylformamide
EMA :	« European Medicines Agency » = Agence européenne pour l'évaluation des médicaments
FDA :	« Food & Drug Administration » = Office de contrôle des médicaments et des aliments
GC/MS :	« Gas Chromatography with Mass Spectrometer » = Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse
HPLC/UV-DAD :	« High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector » = Chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrettes de diodes
ICH :	« International Conference on Harmonisation » = Conférence internationale sur l'harmonisation
ISTD :	« Internal Standard » = Standard interne
L/E :	« Leachable and extractable » = diffusible et extractible
LD₅₀ :	« Median Lethal Dose » = Dose létale médiane
LDPE :	« Low Density Polyethylene » = Polyéthylène à basse densité
LLE :	« Liquid-Liquid Extraction » = Extraction liquide-liquide
LOD :	« Limit of detection » = Limite de détection

LOQ :	« Limit of quantification » = Limite de quantification
MS :	« Mass spectrometer » = Spectromètre de masse
PE :	Polyéthylène
PQRI :	«The Product Quality Research Institute» = Institut de recherche sur la qualité des produits
PTFE :	PolyTétraFluoroEthylène
PVC :	«PolyVinyl Chloride» = Poly(Chlorure de Vinyle)
QC :	«Quality Control sample» = Echantillon de contrôle de la qualité
SCT :	« Safety Concern Threshold » = Seuil de sécurité
SF :	Solution fille
SFSTP :	Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques
SPE :	« Solid-phase extraction » = extraction en phase solide
SST :	« System Suitability Test » = Test d'adéquation du système
STD :	Standard d'étalonnage
t_R :	Temps de rétention
USP :	« United States Pharmacopeia » = Pharmacopée américaine
VLD :	Standard de validation
V_x :	Volume d'une solution

Remerciements

Un petit mot pour tous ceux qui m'ont permis de réaliser ces 150 LLE, ces 150 SPE, ces 825 injections GC et ces 1250 injections HPLC.

Je souhaiterais remercier en premier lieu, le Prof. Farshid Sadeghipour de m'avoir offert la possibilité d'effectuer un travail de recherche sur ce sujet si vaste et passionnant. Je le remercie aussi pour les remarques constructives et les conseils avisés qu'il m'a donnés au cours de ce travail et durant tout le cursus du MAS.

Je remercie également le Dr. Lina Berger pour son enthousiasme et son engagement pour mon travail, ainsi que pour la qualité de l'encadrement qu'elle m'a offert durant toute cette année. Son expertise scientifique m'a permis de mener à bien ce travail. Je la remercie aussi de m'avoir offert la possibilité d'intégrer le « L/E group for hospital pharmacies in Europe ». Je souhaite encore la remercier pour l'écoute, le soutien et les encouragements qu'elle m'a apportés tout au long de mon travail.

Je remercie toute l'équipe du laboratoire CQ du Service de Pharmacie, en particulier Mme Brigitte Reuge pour sa patience, ses conseils et son écoute.

J'adresse mes remerciements au Dr. Luiz Felipe De Alencastro pour la mise à disposition d'une GC/MS de son laboratoire. Mes remerciements vont aussi à M. Dominique Grandjean pour m'avoir formée à l'utilisation de la GC/MS, pour sa disponibilité et pour les nombreux remplissages de flacons de solvants de rinçage de l'injecteur GC.

Je remercie les Prof. André Pannatier et Prof. Bernard Testa pour leurs contributions au projet de demande de soutien financier à la Loterie Romande. Je souhaite aussi remercier le Prof. Bernard Testa pour ses remarques pertinentes et ses conseils sur mon travail.

Je remercie le Prof. Serge Rudaz pour ses conseils avisés à propos de la validation de méthodes analytiques.

Mes remerciements vont aussi aux MAS, ex-MAS, doctorants et collègues pour leur soutien.

Un merci particulier à Alma Feka, Béatrice et Fanny Fauchère pour la relecture de ce travail.

Finalement, merci à ma famille et à Pierrick.

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	1
1.1. GENERALITES	1
1.2. LES INTERACTIONS CONTENANTS-MEDICAMENTS	2
1.2.1. Terminologie	2
1.2.2. Défis engendrés par l'étude des substances L/E	3
1.2.3. Exigences légales.....	4
1.2.3.1. USP <1663> : Etude des extractibles associés aux contenants pharmaceutiques et aux dispositifs d'administration de médicaments ^{9,18}	7
1.2.3.1.1. Génération de l'extrait.....	7
1.2.3.1.2. Caractérisation de l'extrait	8
1.2.3.2. USP <1664> : Etude des diffusibles associés aux contenants pharmaceutiques et aux dispositifs d'administration de médicaments ^{10,18}	9
1.2.3.2.1. Conception de l'étude.....	9
1.2.3.2.2. Seuil de sécurité	10
1.2.3.2.3. Caractérisation des substances diffusibles	11
1.2.3.3. Validation des méthodes analytiques.....	12
2. CONTEXTE DE L'ETUDE	13
2.1. INTRODUCTION	13
2.2. ETUDE DES SUBSTANCES L/E D'UNE PREPARATION PHARMACEUTIQUE	13
2.2.1. Choix de la préparation pharmaceutique	14
2.2.2. Choix des contenants	15
2.2.2.1. Flacon COC, Promens/Elpack®	15
2.2.2.2. Seringue BD Perfusion®	17
2.2.2.3. Seringue BD Sterifill®	18
2.2.3. Calcul de l'AET	19
2.2.4. Choix des substances L/E cibles et évaluation de leur toxicité.....	20
2.2.4.1. Butylhydroxytoluène (BHT)	20
2.2.4.2. Antioxydant 425.....	21
2.2.4.3. Acide myristique	22
2.2.4.4. Acide caprylique	23
3. BUTS	24

4.	DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE PREPARATION D'ECHANTILLONS ET DE DOSAGE POUR L'ANALYSE DU BHT ET DE L'ANTIOXYDANT 425 PAR HPLC/UV-DAD	25
4.1.	INTRODUCTION	25
4.2.	MATERIEL ET PRODUITS.....	25
4.3.	APPAREILS ET EQUIPEMENTS	26
4.4.	METHODE.....	27
4.4.1.	<i>Méthode initiale d'analyse par HPLC/UV-DAD</i>	<i>27</i>
4.4.2.	<i>Méthodes de préparation d'échantillons</i>	<i>27</i>
4.4.2.1.	Développement d'une méthode de préparation d'échantillons par extraction liquide-liquide : Méthode initiale de préparation d'échantillons par LLE.....	28
4.4.2.1.1.	Méthode d'extraction	28
4.4.2.1.2.	Rendement d'extraction LLE.....	30
4.4.2.1.3.	Prévalidation de la méthode d'extraction liquide-liquide.....	31
4.4.2.2.	Développement d'une méthode de préparation d'échantillons par SPE : méthode initiale de préparation d'échantillons par SPE	31
4.4.2.2.1.	Méthode d'extraction	31
4.4.2.2.2.	Rendement d'extraction SPE.....	33
4.4.2.2.3.	Prévalidation de la méthode d'extraction par SPE	33
4.5.	RESULTATS ET DISCUSSION	33
4.5.1.	<i>Optimisation de la méthode d'analyse par HPLC/UV-DAD</i>	<i>33</i>
4.5.2.	<i>Optimisation de la méthode de préparation d'échantillons par LLE.....</i>	<i>36</i>
4.5.2.1.	Rendement d'extraction LLE.....	36
4.5.2.2.	Prévalidation de la méthode d'extraction liquide-liquide.....	37
4.5.3.	<i>Optimisation de la méthode de préparation d'échantillons par SPE.....</i>	<i>38</i>
4.5.3.1.	Rendement d'extraction SPE.....	38
4.5.3.2.	Prévalidation de la méthode d'extraction SPE	40
4.6.	CONCLUSIONS	41
5.	VALIDATION DE LA METHODE DE DOSAGE POUR L'ANALYSE DU BHT ET DE L'ANTIOXYDANT 425 PAR HPLC/UV-DAD	42
5.1.	INTRODUCTION	42
5.2.	MATERIEL, PRODUITS, EQUIPEMENTS ET APPAREILS	42
5.3.	METHODE.....	42
5.3.1.	<i>Spécificité</i>	<i>42</i>
5.3.1.1.	Pureté des pics.....	42
5.3.1.2.	Blanc	43

5.3.1.3. Essai de dégradation accélérée.....	44
5.3.2. <i>Standards d'étalonnage et de validation</i> ⁶⁹	45
5.3.3. <i>Linéarité</i> ⁶⁹	47
5.3.4. <i>LOQ</i>	48
5.3.5. <i>Stabilité</i>	48
5.4. RESULTATS ET DISCUSSION.....	48
5.4.1. <i>Spécificité</i>	48
5.4.1.1. Pureté des pics.....	48
5.4.1.2. Blanc.....	49
5.4.1.3. Essai de dégradation.....	49
5.4.2. <i>Standards d'étalonnage et de validation</i>	50
5.4.3. <i>LOQ</i>	52
5.4.4. <i>Stabilité</i>	53
5.5. CONCLUSIONS.....	53
6. DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE PREPARATION D'ECHANTILLONS ET DE DOSAGE POUR L'ANALYSE DE L'ACIDE CAPRYLIQUE ET DE L'ACIDE MYRISTIQUE PAR GC/MS.....	54
6.1. INTRODUCTION.....	54
6.2. MATERIEL ET PRODUITS.....	55
6.3. APPAREILS ET EQUIPEMENTS.....	56
6.4. METHODE.....	56
6.4.1. <i>Méthode initiale de préparation d'échantillons par LLE</i> ^{21,71}	56
6.4.1.1. Méthode d'extraction.....	56
6.4.1.1.1. Standards internes.....	56
6.4.1.2. Réaction de dérivatisation.....	57
6.4.1.3. Rendement d'extraction.....	59
6.4.2. <i>Méthode initiale d'analyse par GC/MS</i>	59
6.4.3. <i>Méthode de rinçage de l'injecteur</i>	60
6.5. RESULTATS ET DISCUSSION.....	61
6.5.1. <i>Optimisation de la méthode de préparation d'échantillons</i>	61
6.5.1.1. Optimisation de la réaction de dérivatisation.....	61
6.5.1.2. Rendement d'extraction.....	63
6.5.2. <i>Optimisation de la méthode d'analyse par GC/MS</i>	65
6.5.3. <i>Optimisation de la méthode de rinçage de l'injecteur</i>	68
6.6. CONCLUSIONS.....	70

7.	VALIDATION DE LA METHODE DE DOSAGE POUR L'ANALYSE DE L'ACIDE MYRISTIQUE ET CAPRYLIQUE PAR GC/MS	71
7.1.	INTRODUCTION	71
7.2.	MATERIEL, PRODUITS, EQUIPEMENTS ET APPAREILS	71
7.3.	METHODE	71
7.3.1.	<i>Spécificité</i>	71
7.3.1.1.	Identification	71
7.3.1.2.	Blanc	72
7.3.1.3.	Essai de dégradation accélérée	75
7.3.2.	<i>Standards d'étalonnage et de validation</i>	77
7.3.3.	LOQ	79
7.3.4.	<i>Répétabilité des résultats pour un même échantillon</i>	80
7.3.5.	<i>Stabilité</i>	80
7.4.	RESULTATS ET DISCUSSION	81
7.4.1.	<i>Spécificité</i>	81
7.4.1.1.	Identification	81
7.4.1.2.	Blanc	82
7.4.1.3.	Essai de dégradation	83
7.4.2.	<i>Standards d'étalonnage et de validation</i>	84
7.4.3.	LOQ	85
7.4.4.	<i>Répétabilité des résultats pour un même échantillon</i>	85
7.4.5.	<i>Stabilité</i>	86
7.5.	CONCLUSIONS	87
8.	ETUDE DES SUBSTANCES EXTRACTIBLES	88
8.1.	INTRODUCTION	88
8.2.	MATERIEL ET PRODUITS	88
8.3.	APPAREILS ET EQUIPEMENTS	89
8.4.	METHODE	90
8.4.1.	<i>Choix des solvants d'extraction</i>	90
8.4.2.	<i>Choix des conditions d'extraction</i>	90
8.4.3.	<i>Plan d'échantillonnage</i>	91
8.5.	IDENTIFICATION ET DOSAGE PAR HPLC/UV-DAD DU BHT ET DE L'ANTIOXYDANT 425 EXTRAITS DES CONTENANTS REMPLIS AVEC DES SOLUTIONS FORTEMENT POLAIRES OU A DES PH EXTREMES	92
8.5.1.	<i>Méthode de préparation d'échantillons</i>	92

8.5.1.1. Préparations des échantillons conditionnés dans du tampon phosphate à pH 3 ou à pH 8.....	92
8.5.1.2. Préparation des échantillons stockés dans un mélange d'isopropanol/eau 50:50	92
8.5.2. Méthode d'analyse par HPLC/UV-DAD	93
8.5.2.1. Conditions d'analyse.....	93
8.5.2.2. Courbe d'étalonnage	93
8.5.2.3. SST	93
8.5.2.4. QC.....	94
8.5.2.5. Blanc	94
8.5.3. Résultats et discussion.....	94
8.5.3.1. SST, QC, Blanc, Courbe d'étalonnage.....	94
8.5.3.2. Echantillons passés aux ultrasons, à 0 [°C]	94
8.5.3.3. Echantillons stockés pendant 3 jours à l'étuve à 55 [°C]	96
8.6. IDENTIFICATION PAR GC/MS DE L'ACIDE MYRISTIQUE ET CAPRYLIQUE EXTRAITS DES CONTENANTS REMPLIS AVEC DES SOLUTIONS FORTEMENT POLAIRES OU A DES PH EXTREMES	98
8.6.1. Méthode de préparation d'échantillons	98
8.6.1.1. Préparation des échantillons stockés dans du tampon phosphate à pH 3 ou à pH 8.....	98
8.6.1.2. Préparation des échantillons stockés dans un mélange d'isopropanol/eau 50:50	98
8.6.2. Méthode d'analyse par GC/MS.....	99
8.6.2.1. Conditions d'analyse.....	99
8.6.2.2. Courbe d'étalonnage	99
8.6.2.3. SST	100
8.6.2.4. QC.....	100
8.6.2.5. Blanc	100
8.6.3. Résultats et discussion.....	100
8.6.3.1. SST, QC, Blanc, Courbe d'étalonnage.....	100
8.6.3.2. Echantillons passés aux ultrasons à 0 [°C]	101
8.6.3.3. Echantillons stockés pendant 3 jours à l'étuve à 55 [°C]	103
8.7. CONCLUSIONS	106
9. ETUDE DES SUBSTANCES DIFFUSIBLES	107
9.1. INTRODUCTION	107
9.2. MATERIEL ET PRODUITS.....	108

9.3. APPAREILS ET EQUIPEMENTS	109
9.4. METHODE	110
9.4.1. <i>Solvants d'extraction</i>	110
9.4.1.1. Préparation de la solution d'insuline	110
9.4.2. <i>Choix des conditions d'extraction</i>	110
9.4.3. <i>Plan d'échantillonnage</i>	110
9.5. IDENTIFICATION ET DOSAGE PAR HPLC/UV-DAD DU BHT ET DE L'ANTIOXYDANT 425 DANS DU NaCl 0.9% ET UNE SOLUTION D'INSULINE A 1 [UI/ML]	111
9.5.1. <i>Méthode de préparation d'échantillons</i>	111
9.5.1.1. Préparation des échantillons stockés dans du NaCl 0.9% et de l'insuline à 1 [UI/mL].....	111
9.5.2. <i>Méthode d'analyse par HPLC/UV-DAD</i>	111
9.5.2.1. Conditions d'analyse.....	111
9.5.2.2. Courbe d'étalonnage	111
9.5.2.3. SST	111
9.5.2.4. QC.....	111
9.5.2.5. Blanc	111
9.5.3. <i>Résultats et discussion</i>	112
9.5.3.1. SST, QC, Blanc, Courbe d'étalonnage.....	112
9.5.3.2. Echantillons stockés dans du NaCl 0.9% et de la solution d'insuline à 1 [UI/mL].....	112
9.6. IDENTIFICATION PAR GC/MS DE L'ACIDE MYRISTIQUE ET CAPRYLIQUE DANS DU NaCl 0.9% ET UNE SOLUTION D'INSULINE A 1 [UI/ML].....	112
9.6.1. <i>Méthode de préparation d'échantillons</i>	112
9.6.1.1. Préparation des échantillons stockés dans du NaCl 0.9%	112
9.6.1.2. Préparation des échantillons stockés dans une solution d'insuline à 1 [UI/mL].....	112
9.6.2. <i>Méthode d'analyse par GC/MS</i>	113
9.6.2.1. Conditions d'analyse.....	113
9.6.2.2. Courbe d'étalonnage	113
9.6.2.3. SST	113
9.6.2.4. QC.....	113
9.6.2.5. Blanc	113
9.6.3. <i>Résultats et discussion</i>	113
9.6.3.1. SST, QC, Blanc, Courbe d'étalonnage.....	113
9.6.3.2. Echantillons stockés dans du NaCl 0.9%.....	113
9.6.3.3. Echantillons stockés dans une solution d'insuline à 1 [UI/mL].....	114

9.7.	CONCLUSIONS	116
10.	CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	117
11.	BIBLIOGRAPHIE	120
12.	ANNEXES ET TABLE DES MATIERES DES ANNEXES.....	126

1. Introduction

1.1. Généralités

Les pharmaciens hospitaliers fabriquent depuis de nombreuses années des médicaments pour les patients hospitalisés et ambulatoires. Depuis quelques années, le secteur de fabrication de la pharmacie doit faire face à de nouveaux défis : l'introduction du dose-banding et des seringues prêtes à l'emploi. Ce type de préparations présente de nombreux avantages : elles améliorent la sécurité par la réduction du nombre d'erreurs de dilution/doses et offrent un gain de temps pour les soignants (diminution du temps de préparation des produits par les soignants dans les unités de soins).¹

Au niveau pratique, ces préparations prêtes à l'emploi sont fabriquées par lot et stockées à long terme (jusqu'à 1 année) dans différents contenants (seringues, poches de perfusion, flacons, pompes à infusion...). Des analyses sont réalisées sur ces préparations afin d'en garantir la conformité. Ces analyses se focalisent principalement sur la stabilité du principe actif dans la formulation. Peu de travaux concernant l'interaction contenant-contenu sont réalisés. Pourtant, cette problématique n'est pas de moindre importance.

Nous savons que certains principes actifs peuvent être adsorbés, voire absorbés, par le contenant (exemple bien connu du diazépam).^{2,3} A l'inverse, certaines substances provenant du contenant peuvent diffuser au cours du temps dans la préparation. Ces substances peuvent engendrer des effets indésirables aux patients (irritations cutanées, choc anaphylactique...) et peuvent même être toxiques. *Casadevall N.* rapporte des cas d'aplasie cellulaire auto-immune induite par l'époétine, dont l'origine pourrait être liée au relargage d'une substance provenant du piston de la seringue conditionnant la formulation commerciale d'époétine alpha (Eprex®).^{4,5} *Kongsgaard U.* évoque une dysgueusie chez certains patients lors du rinçage des tubulures avec des seringues de solutions salines prêtes à l'emploi. Le relargage dans la solution saline de certaines substances volatiles non toxiques issues du plastique de la seringue en serait la cause.⁶

Hormis la sécurité, la qualité et la stabilité des préparations pharmaceutiques peuvent être influencées par la diffusion de substances provenant du contenant dans la préparation pharmaceutique. Des réactions chimiques (par exemple l'oxydation) ou physiques (par exemple l'agrégation) peuvent survenir et engendrer la dégradation du produit.⁵ *Zhao X.* décrit par exemple, que le trouble observé dans des solutions injectables de ceftriaxone serait lié au relargage dans la préparation du BHT, un antioxydant contenu dans le septum des vials.⁷ *Corredor C.* relate le fait que le bisulfure de thiuram utilisé pour la fabrication des

septums peut réagir avec le groupe thiol du captopril, notamment à pH acide, et ainsi former du captopril-TMTD.⁸ Cela peut induire une baisse d'efficacité du médicament.

Que ce soit pour des raisons de sécurité ou de qualité du produit, ces exemples permettent d'illustrer l'importance de l'étude des interactions contenant-contenu. Face à la demande croissante de mise en place de nouvelles préparations prêtes à l'emploi et en raison du risque au niveau de la sécurité, il nous paraît alors essentiel d'effectuer un travail de recherche sur d'éventuelles interactions entre les médicaments que nous fabriquons et leur contenant.

1.2. Les interactions contenants-médicaments

1.2.1. Terminologie

Le but d'une étude des interactions entre le contenant et le médicament est d'identifier, et si possible, de quantifier des substances du contenant primaire (principalement des contenants en matière plastique), qui peuvent être extraites ou diffuser dans la préparation. Ces substances sont dénommées "leachable" (diffusibles) et "extractable" (extractibles) (abrégées en L/E) dans le langage analytique.⁵ Selon l'USP, les termes « extractible » et « diffusible » peuvent être définis de la manière suivante :^{9,10}

- **Un extractible** est une substance chimique organique ou inorganique, qui peut être extraite d'un contenant ou d'un de ces composants dans des conditions de stockage souvent exagérées ou accélérées (par exemple, à une température de stockage élevée ou dans un solvant aqueux à un pH extrême etc...) par rapport aux conditions de stockage normales du produit pharmaceutique. Les extractibles peuvent potentiellement diffuser dans la préparation pharmaceutique dans des conditions normales de stockage, et ainsi devenir un diffusible.
- **Un diffusible** est une substance chimique organique ou inorganique ayant diffusé du contenant primaire ou secondaire ou d'un de leurs composants dans la préparation pharmaceutique dans des conditions normales de stockage. Les diffusibles sont présents dans la préparation pharmaceutique en raison de l'action directe du produit sur la source du diffusible. Les diffusibles sont souvent des substances dérivées des extractibles ou appartiennent à une classe chimique similaire.

Ainsi, l'étude des substances L/E consiste donc en l'identification et la quantification des substances pouvant être extraites ou pouvant diffuser dans la préparation pharmaceutique

dans des conditions normales et accélérées de stockage. Mener ce type d'étude n'est pas une tâche facile et engendre de nombreux défis.

1.2.2. Défis engendrés par l'étude des substances L/E

Les principales difficultés rencontrées lors d'étude des substances extractibles et diffusibles sont les suivantes^{5,11} :

- 1) **La composition des contenants est souvent inconnue et/ou maintenue secrète par le fabricant** : de nombreux additifs (antioxydants, lubrifiants, etc...) sont ajoutés lors de la fabrication d'un contenant polymérique. Ces substances peuvent être de structure chimique très variée (amines, phénol, etc...). Afin de pouvoir établir un profil L/E complet d'une préparation pharmaceutique et de pouvoir identifier le maximum de substances L/E, des méthodes analytiques orthogonales doivent être utilisées.¹¹
- 2) **Les substances L/E sont souvent présentes sous forme de traces dans la préparation pharmaceutique.** Le recours à des techniques analytiques très sensibles est indispensable pour permettre le dosage des substances L/E.
- 3) **Le risque de contamination des échantillons lors de la préparation d'échantillons est élevé.**⁵ Il est primordial d'utiliser du matériel de laboratoire de haute qualité (en verre borosilicaté) et des solvants de haute pureté. Un rinçage de la verrerie avec de l'acétone et du méthanol est préconisé. Des témoins négatifs et blancs de référence doivent être utilisés pour prouver l'absence d'interférences avec l'échantillon.¹² Lors d'études L/E réalisées sur de nouveaux matériaux, le verre borosilicaté de type I est utilisé comme blanc de référence.^{5,13}
- 4) **Le profil L/E d'une préparation pharmaceutique est variable**⁵ : le profil L/E d'une préparation pharmaceutique peut varier d'un lot de production à l'autre. La variation du profil L/E d'un produit donné dépend des conditions de stress auxquelles une préparation est soumise au cours de son cycle de vie (fabrication, transport, stockage). Tous ces paramètres rendent l'élaboration d'un profil L/E d'une préparation pharmaceutique très complexe, car tout changement même mineur peut induire une variation du profil L/E d'un produit.

Actuellement, les nouvelles technologies, telles que la spectrométrie de masse en tandem, offrent la possibilité d'identifier et de quantifier des substances, même présentes à l'état de traces. Cela facilite la réalisation des études sur les substances L/E. Mais, jusqu'à quel

point devons-nous identifier les substances L/E et qu'en est-il de la législation dans ce domaine ?

1.2.3. Exigences légales

Les exigences légales sur l'analyse et l'identification des substances L/E sont limitées. La FDA et l'EMA ont émis deux documents (« Guidance for Industry : Container Closure Systems for Packaging of Human Drugs and Biologics », FDA, 1999¹⁴ et « Guideline on Plastic Immediate Packaging Materials, EMA, 2005¹⁵) spécifiant quelles sont les exigences requises lors de la soumission d'un dossier d'un contenant destiné à usage humain aux autorités. Ces documents relèvent le fait que les contenants doivent être sûrs d'usage et ne pas induire une baisse de la qualité du produit suite à une interaction contenant-contenu.

Une classification du risque propre à un contenant en fonction de sa voie d'administration et de la probabilité d'interaction contenant-contenu est proposée dans ces textes¹⁴ :

Tableau 1 : Risque propre à un contenant

Niveau de risque en fonction de la voie d'administration	Probabilité d'interactions contenant-contenu		
	Haut	Moyen	Bas
Le plus haut	Solutions inhalées et aérosols inhalés, solutions injectables et suspensions injectables	Poudres stériles pour injection, poudres pour inhalation	
Haut	Solutions et suspensions ophtalmiques, patchs transdermiques, aérosols et sprays nasaux		
Bas	Solutions et aérosols à application topique, solutions et suspensions orales	Poudres à application topique ou orale	Comprimés ou gélules

Selon, le tableau ci-dessus, les formulations liquides sont considérées comme les plus critiques.

Cet aspect est confirmé par l’algorithme décisionnel, illustré ci-dessous, proposé par l’EMA dans lequel au minimum une étude des interactions contenant-contenu (comprenant les études de diffusion des substances du contenant dans la préparation et les études d’adsorption d’un composant de la formulation au contenant) est requise pour toutes les formes liquides.¹⁵

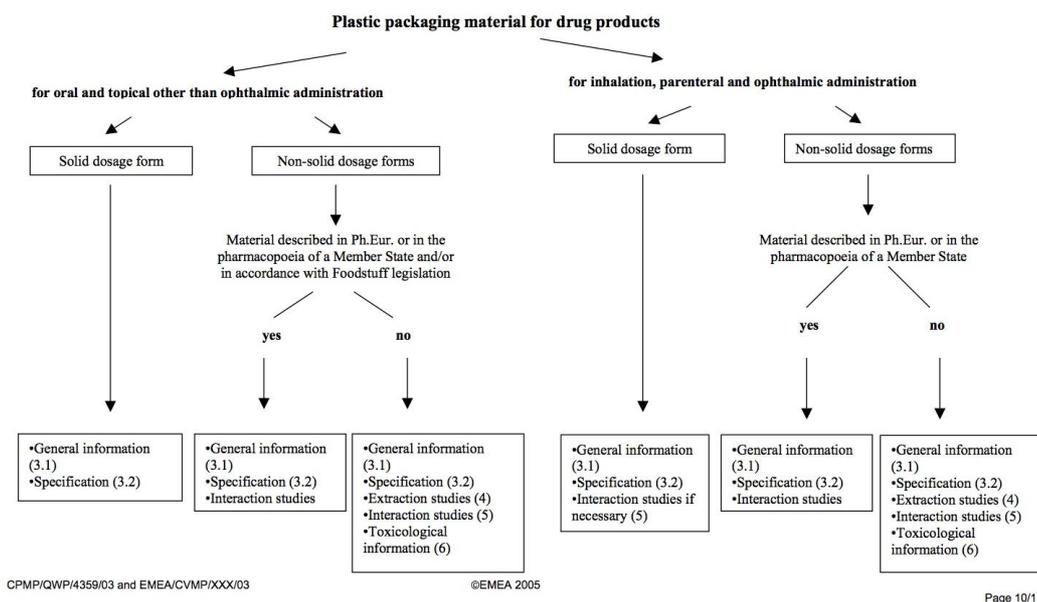


Figure 1 : Algorithme décisionnel

Malgré le fait que ces textes permettent de guider l’analyste sur les informations à fournir lors de la soumission d’un dossier d’un contenant, ils n’apportent aucune information sur la manière dont une étude sur les substances L/E doit être menée, ni sur les critères d’acceptation.

C’est pourquoi, face au manque d’arguments permettant de statuer sur la toxicité d’une substance L/E identifiée, un groupe de travail du PQRI (The Product Quality Research Institute¹), a élaboré initialement des recommandations pour l’étude des substances L/E dans les préparations nasales et inhalées, puis, plus récemment, dans les préparations injectables et ophtalmiques.^{5,16,17}

¹ Le PQRI est un consortium d’organisation à but non lucratif, ayant pour but d’échanger et de fournir des informations permettant d’améliorer la qualité des médicaments.

Ce document permet de classer les substances diffusibles en quatre catégories de toxicité. En fonction du risque propre à chaque substance, un seuil de sécurité journalier maximal est défini ¹⁷ :

Tableau 2 : Catégories de toxicité

Basse toxicité	Toxicité modérée	Toxicité marquée	Génotoxique
150 [µg/jour]	50 [µg/jour]	5 [µg/jour]	0.15 [µg/jour]

Récemment, le PQRI a simplifié les catégories de toxicité en les regroupant de la manière suivante¹⁷ :

Tableau 3 : Nouvelles catégories de toxicité

Toxicité générale	Allergisant	Génotoxique
150 [µg/jour]	5 [µg/jour]	1.5 [µg/jour]

Ainsi, les documents émis par le PQRI ont permis de contribuer à l'uniformisation des pratiques d'évaluation de la toxicité des substances L/E.

Au niveau des Pharmacopées, la Pharmacopée européenne dispose d'un chapitre consacré aux matériaux (le chapitre 3). Ce chapitre décrit la composition des principaux matériaux des contenants utilisés couramment en pharmacie (Polypropylène, polyéthylène, etc...). Une liste des additifs pouvant être utilisés pour la fabrication de ces contenants polymériques, ainsi que leur teneur maximale autorisée, figure dans ce chapitre.⁵

La Pharmacopée européenne ne dispose pas de chapitres spécifiques aux substances L/E, contrairement à la Pharmacopée américaine (USP), dans laquelle deux monographies sur l'évaluation des substances extractibles et diffusibles dans les préparations pharmaceutiques ont été récemment publiées :

- USP <1663> : Etude des extractibles associés aux contenants pharmaceutiques et aux dispositifs d'administration de médicaments⁹
- USP <1664> : Etude des diffusibles associés aux contenants pharmaceutiques et aux dispositifs d'administration de médicaments¹⁰

Ces textes décrivent la marche à suivre pour réaliser une étude sur les substances diffusibles et extractibles. Ils permettent d'apporter des éclaircissements sur les différents aspects pratiques et techniques à évaluer en cas d'établissement du profil L/E d'un produit pharmaceutique. Ces textes ne font pas office de loi. Il s'agit uniquement de recommandations. Ces textes sont donc à considérer comme un guide de bonnes pratiques pour réaliser des études sur les substances L/E d'un contenant pharmaceutique.

Les chapitres ci-dessous résumant, de manière plus détaillée, le contenu de ces monographies.

1.2.3.1. USP <1663> : Etude des extractibles associés aux contenants pharmaceutiques et aux dispositifs d'administration de médicaments ^{9,18}

Cette monographie a pour but de décrire les bonnes pratiques pour l'étude des substances extractibles pouvant être extraites du contenant pharmaceutique. Ce type d'étude permet de caractériser l'emballage primaire, de faciliter le choix des matériaux du contenant et de décrire le comportement d'un emballage primaire lorsqu'il est soumis à un stress (variation de température ou stérilisation...). Ce type d'étude permet aussi d'obtenir des informations préliminaires sur les potentiels diffusibles pouvant diffuser dans la préparation au cours du stockage.⁵

Au niveau pratique, le chapitre décrit dans un premier temps les étapes à suivre pour générer un extrait de substances extractibles, puis dans un deuxième temps, pour le caractériser.

1.2.3.1.1. Génération de l'extrait

Les extractibles peuvent provenir de différentes sources (silicones extraites du verre, additifs provenant des élastomères ou du verre, impuretés provenant du processus de fabrication, etc...). Afin de pouvoir extraire un maximum de substances, il est important de choisir les paramètres d'extraction les plus optimaux.

L'extraction dépend de nombreux paramètres (choix du solvant, la durée d'exposition au solvant, la température, etc...).^{5,16} Le choix du solvant pour générer l'extrait est le paramètre le plus critique. Le solvant d'extraction devrait idéalement avoir des propriétés d'extraction similaires à celles de la formulation. Pour ce faire, il faudrait recourir à des solvants d'extraction simulant au mieux les propriétés physico-chimiques du véhicule de la formulation, notamment au niveau du pH, de la force ionique et de la polarité.^{5,16}

Dans le cas où l'on souhaite caractériser un contenant destiné à contenir différents produits ou dans le cas des contenants destinés au stockage des produits à haut risque au niveau de la voie d'administration (injectables, aérosols, etc...), il est recommandé d'utiliser des solvants d'extraction ayant des propriétés variées (pH acide et basique, solvant polaire, etc...) afin de pouvoir extraire le maximum de composés du contenant et pouvoir anticiper au mieux le profil en substances diffusibles de la préparation pharmaceutique.^{5,16,19-21}

La température est un autre paramètre à prendre en considération lors de la génération de l'extrait : plus la température est élevée, plus il y a de substances extraites. Le recours à des températures élevées permet d'imiter le comportement du contenant suite à une stérilisation à la chaleur.⁵

Différentes méthodes sont utilisées pour l'extraction (Soxhlet, reflux, macération, ultrasons, etc...). Le choix de la méthode d'extraction dépend de l'objectif, ainsi que des avantages et des limites de chaque méthode. Par exemple, le reflux n'est pas une méthode adaptée à la recherche de certaines substances organiques, car il peut engendrer une dégradation thermique de ces substances.⁵

1.2.3.1.2. Caractérisation de l'extrait

Une fois que l'extrait a été généré, ce dernier doit être caractérisé. Face à la diversité et la multiplicité des substances extraites, le recours à des techniques analytiques orthogonales est indispensable. Le choix de l'instrument dépend du type de substances que l'on souhaite identifier : l'utilisation d'une GC/MS est préférée à celle d'une LC/MS pour l'étude des composés volatils.

Seule une partie des substances extraites pourra être identifiée et quantifiée tant la diversité et la multiplicité des substances extraites sont grandes. De plus, de nombreuses substances ne disposent pas de témoins ou de standards de référence. Il n'est donc pas possible de confirmer leur identité.^{5,11}

Face à ces difficultés, trois niveaux de confiance (expérimental, sûr ou confirmé) peuvent être utilisés pour l'identification des substances en cas d'analyse par GC-MS ou LC-MS. La classification d'une substance dans un niveau de confiance est déterminée à l'aide des critères ci-dessous :^{16,22}

- a) Génération d'un spectre de masse et interprétation du spectre par un expert en MS
- b) Confirmation du poids moléculaire
- c) Confirmation de la composition élémentaire
- d) Le spectre de masse est identique à un spectre de la littérature ou de la librairie
- e) Le spectre de masse et le temps de rétention d'une substance sur un chromatogramme sont identiques à celui d'un témoin
- f) Les informations spectrales obtenues à l'aide d'une méthode orthogonale sont confirmées.

Une substance est classée dans le niveau de confiance « **expérimental** » lorsque seuls les critères a) ou d) sont remplis. Elle est classée dans le niveau de confiance « **sûr** » lorsqu'elle répond aux critères a) ou d), et aux critères b), c) ou f). Elle est classée dans le niveau de confiance « **confirmé** » si elle répond au moins au critère e).^{16,22}

Au niveau de la quantification, seuls les composés bien séparés et pour lesquels il existe une relation dose-réponse, peuvent être dosés. L'étalonnage se fait à l'aide de solutions témoins. Dans certains cas, un ou plusieurs standards internes sont nécessaires afin d'améliorer la qualité des résultats.^{16,22}

1.2.3.2. USP <1664> : Etude des diffusibles associés aux contenants pharmaceutiques et aux dispositifs d'administration de médicaments^{10,18}

Cette monographie a pour but de décrire les bonnes pratiques d'étude des substances diffusibles. L'étude des substances diffusibles permet d'identifier et de quantifier les diffusibles qui peuvent être relargués dans la préparation lors du stockage à long terme. La réalisation d'études sur les substances diffusibles est facilitée si une étude des extractibles du contenant a été réalisée au préalable pour cette même formulation.

Ce type d'étude est principalement effectué pour les préparations dont le risque d'interactions avec le contenant primaire est élevé et/ou documenté, ainsi que pour les préparations dont la voie d'administration représente un haut risque (préparations pour inhalation, préparations injectables, etc...)^{5,14,15}

Ce chapitre énonce les principales étapes pour réaliser une étude sur les diffusibles. Il décrit comment déterminer le seuil de quantification des diffusibles, quels sont les principes généraux de développement et de validation des méthodes analytiques et comment fixer des critères d'acceptation pour l'identification et la quantification des diffusibles.

1.2.3.2.1. Conception de l'étude

L'étude doit être réalisée selon les conditions suivantes : ^{5,15}

- 1) Elle doit être réalisée avec le produit pharmaceutique étudié et non pas avec une simulation
- 2) Elle doit être réalisée avec un contenant identique à celui utilisé pour la préparation pharmaceutique
- 3) Les lots des contenants doivent être identiques à ceux utilisés lors de la production de la préparation pharmaceutique.
- 4) Le produit analysé doit suivre le même cycle de vie que le produit pharmaceutique (de la production à la distribution).

Les études des substances diffusibles sont souvent initiées au début de la conception d'une nouvelle préparation pharmaceutique, surtout pour les préparations à haut risque. En effet, le fait de mener ce type d'étude permet de choisir le contenant ayant un profil en substances diffusibles le plus favorable pour stocker la préparation. Les études sur les substances diffusibles sont ensuite poursuivies sur un échantillon du lot de la préparation pharmaceutique prête à être commercialisée.⁵

Dans la majorité des cas, ces études sont réalisées sur le contenant primaire. Cependant, dans certains cas, il peut être nécessaire d'étudier les substances diffusibles provenant du contenant secondaire ou même tertiaire. C'est le cas par exemple, pour les emballages primaires constitués de polymères semi-perméables, tels que les flacons en polyéthylène à basse densité pour lesquels une évaluation des diffusibles provenant des encres, adhésifs etc... de l'emballage secondaire est recommandée.⁵

Au niveau chimique, la diversité des propriétés physico-chimiques des substances diffusibles complexifie la mise en place d'études sur les substances diffusibles. De manière générale, la diffusion des substances dans la préparation peut être influencée principalement par deux paramètres : le temps de contact (continu ou transitoire) et la nature du contact (direct ou indirect). En cas de contact indirect entre la formulation et l'emballage, des composés majoritairement volatils diffusent dans la préparation. En cas de contact direct, des composés volatils et non volatils diffusent dans la préparation.⁵

Ainsi, une prise en considération de l'ensemble de ces aspects permet la mise en évidence des substances ayant diffusé du contenant dans la préparation. Mais jusqu'à quel point devons-nous nous focaliser sur les substances diffusibles ? Avec les moyens analytiques actuels, des quantités infimes peuvent être dosées. Il n'est pas envisageable de pouvoir quantifier l'ensemble des substances diffusibles retrouvées dans une préparation pharmaceutique. C'est pourquoi, un seuil de sécurité au-dessus duquel les substances diffusibles doivent être dosées, a été établi par le PQRI.

1.2.3.2.2. Seuil de sécurité

Le seuil de sécurité est dépendant à la fois des critères de sécurité (données toxicologiques, risques liés au produit et à la voie d'administration) et de critères analytiques (limite de sensibilité de l'instrument). Selon le PQRI, pour les préparations à haut risque, le seuil de sécurité (Safety Concern Threshold = SCT) est fixé à 0.15 [$\mu\text{g}/\text{j}$]. En-dessous du SCT, une identification ou une évaluation de la sécurité des substances diffusibles ne sont pas requises.

Le seuil de sécurité est exprimé en unité d'exposition journalière et non en unité de concentration. Afin de pouvoir traiter ces données au niveau analytique pour un produit donné, le SCT doit être converti en un seuil de quantification analytique, appelé l'AET (Analytical Evaluation Threshold), exprimé en unité de concentration.^{5,16,17}

La formule générale permettant cette conversion est la suivante :

$$AET [\mu\text{g} / \text{contenant}] = \left(\frac{SCT}{Dose \text{ journalière}} \right) \cdot \left(\frac{Volume \text{ contenant}}{Masse \text{ contenant}} \right)$$

Ainsi, toutes les substances diffusibles, dont la concentration est supérieure à l'AET doivent être identifiées et quantifiées.

Il existe une exception pour certains composés ou classes de composés, dont le risque de toxicité est connu. Ces composés sont appelés « les cas spéciaux » et doivent être quantifiés quelque soit l'AET. Ces composés sont les hydrocarbures polycycliques aromatiques, les composés aromatiques polynucléaires (PAHs ou PNAs), les N-nitrosamines et le 2-mercaptobenzothiazole.^{5,16,17}

1.2.3.2.3. Caractérisation des substances diffusibles

Suite à la détermination de l'AET, il est primordial d'identifier et de quantifier les substances diffusibles, dont la concentration est supérieure à l'AET, via des techniques analytiques orthogonales. Dans la mesure où une étude du profil des extractibles a été réalisée au préalable pour ce type de contenant, la même méthode analytique ou une méthode similaire à celle utilisée lors de l'étude des extractibles peuvent être utilisées.^{5,16}

Concernant la préparation d'échantillons, la difficulté principale réside au niveau de l'élimination de l'effet matrice lié à la présence d'excipients et du principe actif. Les excipients et les principes actifs sont contenus en quantités bien supérieures aux substances diffusibles. C'est pourquoi, il est important de mettre au point une méthode de préparation d'échantillons permettant de séparer les substances diffusibles de la matrice.

Pour les solutions aqueuses, il est courant de recourir à une extraction liquide-liquide à l'aide de solvants non miscibles et de l'eau. Une acidification ou une basification de la solution peuvent parfois être nécessaires afin d'augmenter le rendement d'extraction. La phase organique est ensuite évaporée et les échantillons sont analysés par GC ou HPLC, selon des méthodes analytiques validées pour le dosage des substances diffusibles.⁵

Ainsi, les monographies de la Pharmacopée américaine permettent de donner les lignes directrices pour mener à bien une étude des substances extractibles et diffusibles.

1.2.3.3. Validation des méthodes analytiques

La validation de la méthode analytique permet de garantir que la méthode développée est adaptée à son utilisation. Selon le PQRI, les méthodes d'analyse permettant le dosage de substances L/E doivent être validées de la même manière que les impuretés et conformément aux normes ICH Q2 (R1).^{16,23} Etant donné la complexité des méthodes analytiques développées pour le dosage des substances L/E, plusieurs auteurs recommandent de ne valider que les critères suivants : le LOQ/LOD, la spécificité, la linéarité, la précision, la justesse et la linéarité de la méthode d'analyse.²⁴

L'évaluation de ces différents critères permet de valider une méthode analytique pour le dosage des substances L/E contenues dans une préparation pharmaceutique.

2. Contexte de l'étude

2.1. Introduction

Face aux risques de sécurité et au niveau de la qualité (c.f. 1.1. Généralités, p.1), il paraît nécessaire de s'intéresser de manière plus approfondie à la problématique de l'interaction contenant-contenu surtout en raison de l'augmentation du nombre de préparations par lot fabriquées par les hôpitaux et destinées au stockage à long terme (généralement pour une durée d'une année).

A titre d'exemple, le CHUV fabrique environ 150 préparations pharmaceutiques par lot différentes, ce qui correspond à environ 300 lots fabriqués par an. Les types de contenants utilisés pour ces fabrications sont fort variés : flacons en COC, seringues en polypropylène, ampoules en verre, poches en polyéthylène, etc... Pour des raisons de coût, il n'est pas rare que les fournisseurs des contenants utilisés changent au cours du temps. La diversité des préparations pharmaceutiques fabriquées au CHUV, la multitude de contenants utilisés pour la fabrication de ces préparations et les changements fréquents de fournisseurs rendent infinies les possibilités de recherche dans le domaine des substances L/E. Chaque préparation pharmaceutique a un profil en substance L/E qui lui est propre. Ce profil dépend des propriétés physico-chimiques de la solution stockée, du type et du lot du contenant utilisé, des étapes de production, de transport et de stockage de la préparation.⁵

Le travail à réaliser dans ce domaine de recherche est alors conséquent et n'est pas spécifique au CHUV. Il concerne l'ensemble des hôpitaux qui fabriquent des médicaments. C'est pourquoi un groupe européen, le « L/E group for hospital pharmacies in Europe » (dont la pharmacie du CHUV fait partie), a été fondé en janvier 2015 pour promouvoir la recherche dans ce domaine et partager les données expérimentales obtenues au sein de leurs équipes. Cette précieuse collaboration permettra de progresser dans ce domaine de recherche.²⁵

2.2. Etude des substances L/E d'une préparation pharmaceutique

La lecture et la compréhension des textes législatifs a permis de poser les bases pour la mise en place d'une étude sur les substances extractibles et diffusibles d'une préparation pharmaceutique fabriquée en milieu hospitalier. Parmi les préparations pharmaceutiques réalisées au CHUV, il faut définir sur quelle préparation et sur quels contenants nous allons nous focaliser en premier lieu.

2.2.1. Choix de la préparation pharmaceutique

La majorité des préparations fabriquées par lot à l'hôpital sont destinées aux patients pédiatriques. C'est pourquoi il a été choisi de travailler sur une préparation destinée à être administrée à cette population. Il a été décidé de se focaliser en priorité sur les préparations injectables liquides, car il s'agit de la voie présentant le plus haut niveau de risque.¹⁴ Etant donné que la dose en principe actif peut avoir une influence sur le profil L/E, seules les préparations pour lesquelles une dose standardisée existait ont été retenues comme candidates potentielles : il s'agit du midazolam, du chlorure de potassium, de l'amphotéricine B, du phénobarbital, de la morphine, de la ciclosporine et de l'insuline.

Une recherche dans la littérature a été effectuée pour les molécules précitées. Les mots-clés suivants ont été introduits sur la base de données Scifinder Scholar : « leachable » et « principe actif recherché ». Parallèlement, une recherche sur le site de « Stabilis » a été effectuée pour chaque molécule : des interactions entre le contenant et le contenu ont été retrouvées pour la morphine, l'insuline et la ciclosporine.²⁶⁻³⁵

La ciclosporine étant cytotoxique, il y a un risque d'exposition important. Il a été jugé plus favorable d'étudier dans un premier temps, le profil L/E d'une substance non-cytotoxique. La morphine étant un stupéfiant, des contraintes administratives s'ajoutent si l'on choisit cette substance. Ainsi, face à l'absence de contraintes administratives et au vu du faible risque lié à la manipulation de cette substance, l'insuline a été retenue comme candidate pour l'étude des substances L/E. De nombreux exemples d'interactions entre l'insuline et le contenant sont retrouvés dans la littérature notamment sur la problématique de l'adsorption.

L'insuline peut, selon plusieurs auteurs, s'adsorber au contenant plastique notamment en PVC ou en PE ce qui engendre une perte importante en principe actif, surtout au début de la perfusion de la solution d'insuline.³²⁻³⁴ Ce phénomène est amplifié en cas d'utilisation de faibles doses et en cas d'administration de la solution à un faible débit, car le temps d'interaction de l'insuline avec la surface plastique est plus grand.³⁴ Peu d'articles décrivent le phénomène inverse, c'est-à-dire que des substances provenant du contenant diffusent dans la préparation d'insuline au cours du temps. *Airaud C.* relate toutefois que des traces d'une substance cancérigène, le 2-mercaptobenzothiazole, auraient été retrouvées dans des préparations d'insuline stockées dans certaines seringues. Le mercaptobenzothiazole serait issu du caoutchouc du piston de la seringue.³¹

Dans le cadre de cette étude, la préparation de la solution d'insuline est réalisée à l'aide de la spécialité commerciale Actrapid® de la firme Novo Nordisk. Il s'agit de la spécialité

pharmaceutique utilisée dans la majorité des hôpitaux de Suisse romande. Elle contient, comme principe actif, de l'insuline humaine monocomposée à une concentration de 100 [UI/mL]. Les excipients sont le métacrésol à une concentration de 3 [mg/mL], le zinc, le glycérol et l'eau pour HPLC. La concentration standard pour l'administration de l'insuline en pédiatrie est de 1 [UI/mL].³⁶ Elle est préparée par dilution de la spécialité commerciale soit dans du chlorure de sodium à 0.9%, soit dans du glucose à 5%. Dans le cadre de cette étude, la solution d'insuline sera préparée à une concentration de 1 [UI/mL] dans 50 [mL] de NaCl à 0.9%.

2.2.2. Choix des contenants

La solution d'insuline à 1 [UI/mL] est généralement administrée via un pousse-seringue et dans un volume de 50 [mL]. Au CHUV, la plupart des préparations injectables d'un volume de 50 [mL] sont réalisées dans des flacons COC Promens/Elpack[®] ou dans des seringues BD Perfusion[®]. C'est pourquoi, il a été choisi d'étudier le profil L/E de l'insuline dans ces deux contenants.

Toutefois, les seringues BD Perfusion[®] ne sont pas indiquées pour le stockage de préparations pharmaceutiques à long terme. La société BD l'a rappelé suite à une alerte récente de la FDA mentionnant une perte d'efficacité de certains produits stockés dans les seringues BD Plastipak[®] de différents volumes. La diffusion d'un composant du piston des seringues BD dans la préparation pharmaceutique en serait la cause.³⁷ C'est pourquoi, une seringue commercialisée pour le stockage des préparations pharmaceutiques à long terme, la seringue BD Sterifill[®], a été retenue comme troisième contenant pour l'étude du profil L/E de la solution d'insuline.

Une description plus approfondie des propriétés de chaque contenant est présentée ci-après.

2.2.2.1. Flacon COC, Promens/Elpack[®]

Les flacons COC sont composés de polymères amorphes (Cyclique Oléfine Co-polymère). Il s'agit d'un nouveau matériel fabriqué par polymérisation d'un alcène cyclique avec un alcène tel que le polypropylène ou le polyéthylène.²¹ Le COC a pour avantage d'être transparent, résistant à la chaleur, léger et plus résistant à la casse que le verre.²¹ Selon le fabricant, le taux de substances extractibles d'un contenant en COC est faible, malgré la présence de certains additifs (lubrifiants ou pigments).^{21,38}

Plusieurs auteurs ont décrit les substances L/E pouvant être retrouvées dans les préparations pharmaceutiques conditionnées dans un flacon COC. Ces dernières sont référencées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 4 : Substances L/E, COC

Nom de la substance	CAS	Références
(9Z)-9-octadécénamide	301-02-0	21
2,4,6-Tris(2-méthyl-2-propanyl)phénol	732-26-3	39
2,6-di-tert-butyl-1,4-benzoquinone	719-22-2	39
2,6-di-tert-butyl-4-éthylphénol	4130-42-1	39
7,9-di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)déca-6,9-diène-2,8-dione	82304-66-3	39
Acétone	67-64-1	39
Acide 3-[4-hydroxy-3,5-bis(2-méthyl-2-propanyl)phényl]propanoïque	20170-32-5	39
Acide 3,5-Bis(1,1-diméthyléthyl)-4-hydroxy-benzène-propanoïque.	20170-32-5	21
Acide acétique	64-19-7	39
Acide formique	64-18-6	39
Acrylate de dodécyle	2156-97-0	39
Bis(tert-butyl)phénol	128-39-2	39
Bisphénol A	80-05-7	39
Cis-décahydronaphtalène	493-01-6	21
Décahydronaphtalène	91-17-8	39
Irganox 1010	6683-19-8	21
Metilox	6386-38-5	21
Mono-(2-éthylhexyl) phtalate	4376-20-9	21
t-Butanol	75-65-0	39
Téréphtalate de diméthyle	120-61-6	21
Trans-décahydronaphtalène	493-02-7	21

Au CHUV, les flacons COC sont fermés, comme illustré ci-dessous, à l'aide d'un septum gris (Flaigg), composé de FM 257/2 et de bromobutyl et d'un bouchon Lyoseal bleu (West) en polyoxyméthylène, préalablement stérilisés par autoclavage.

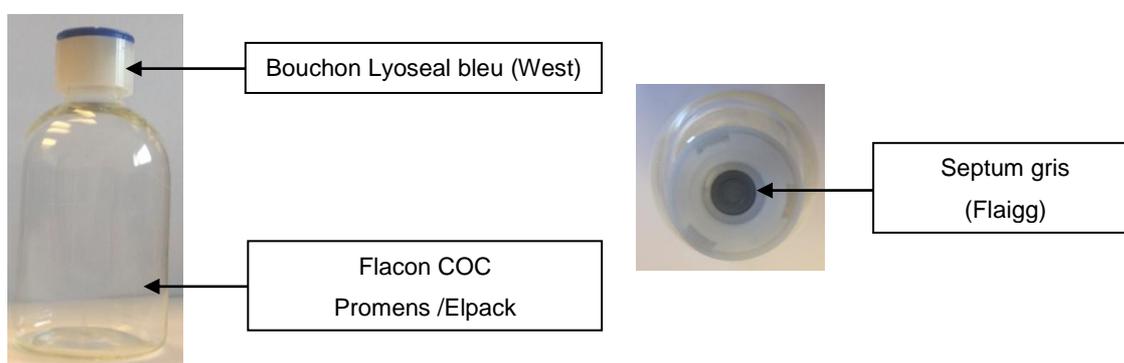


Figure 2 : Flacon COC, Promens/Elpack® et Septum gris, Flaigg

Il est à noter que de nombreuses substances L/E retrouvées dans une préparation peuvent aussi provenir du septum en caoutchouc. Une liste des substances L/E connues pour diffuser du caoutchouc dans une préparation figure en annexe I.²¹

La fiche technique de ce produit se trouve en annexe II.

2.2.2.2. Seringue BD Perfusion[®]

Les seringues BD Perfusion[®] sont à utiliser pour le prélèvement et l'injection des fluides. La composition de la seringue varie en fonction des différents éléments de la seringue : le corps de la seringue est composé de polypropylène, le piston, de polyéthylène et de polypropylène, le joint du piston, d'isoprène synthétique (sans latex) et le lubrifiant, de silicone.⁴⁰ Ces seringues sont compatibles avec les poussettes-seringues utilisés au CHUV (Agilia de Fresenius Kabi et Pilot C de Fresenius Kabi).

En ce qui concerne les substances L/E retrouvées, une liste de substances potentiellement retrouvées dans les seringues en polypropylène et en polyéthylène est proposée par *Jenke D.*, dans le livre « Compatibility of pharmaceutical products and Contact Materials ». ⁵ (Cf annexe III)

Les travaux de *Trittler R.* effectués en collaboration avec *Hauk A.* ont permis de mettre en évidence une substance L/E provenant des seringues BD Plastipak[®] : il s'agit de l'Antioxydant 425.^{41,42}

Au CHUV, les seringues préparées par la pharmacie sont fermées à l'aide d'un bouchon mâle/femelle Combi Lock[®] stérile (Codan Medical) en polypropylène selon la figure ci-dessous :

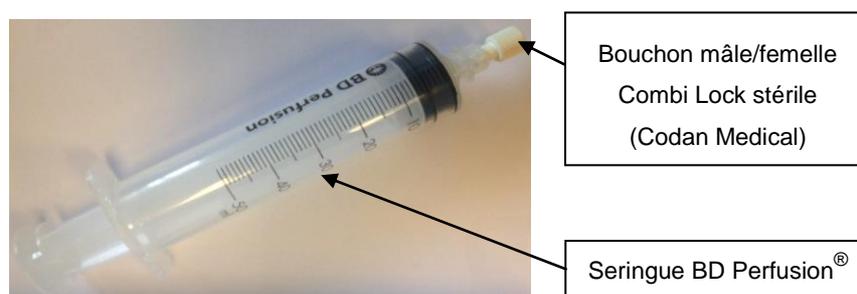


Figure 3 : Seringue BD Perfusion[®]

La fiche technique de ce produit se trouve en annexe IV.

2.2.2.3. Seringue BD Sterifill®

Les seringues BD Sterifill® sont indiquées pour le stockage à long terme de préparations pharmaceutiques. Elles sont légères, compatibles avec les pousses-seringues et sont composées de COP (Cyclic Olefin Polymer). Il s'agit d'un polymère amorphe obtenu par polymérisation par ouverture de cycle par métathèse, suivi d'une hydrogénation.⁴³ Ce matériel possède des propriétés similaires au COC, c'est-à-dire qu'il est transparent, résistant à la casse et a une bonne stabilité thermique.⁴³ Selon le fabricant, le taux d'extractibles est faible dans ces contenants.⁴⁴

Kiminami H. a publié récemment un article confirmant le fait que le profil en substances extractibles et diffusibles des contenants en COP est très faible.¹⁹ Dans cet article, il met aussi en évidence, quelques substances L/E pouvant être extraites d'une seringue en COP (PLAJEX™).¹⁹ Il s'agit du Triméthylsilanol, du N,N-Dibutylformamide et du BHT aux concentrations respectives de 5 [µg/L], 4 [µg/L] et 3 [µg/L].¹⁹ Le Triméthylsilanol serait issu de la dégradation d'un des composants de l'huile de silicone utilisé pour lubrifier le piston. Le Dibutylformamide et le BHT proviendraient du caoutchouc en isoprène-isobutène chloré.¹⁹

Les seringues BD Sterifill® sont composées de trois parties de composition différente : le corps de la seringue est en COP, le piston est en polypropylène et le stopper est en FM457. Les seringues sont délivrées non-assemblées. L'utilisateur assemble les différentes parties lors du remplissage des seringues. Ces seringues ne sont actuellement pas utilisées en routine à la pharmacie du CHUV (produit non disponible sur le marché suisse, coût élevé, etc...).

Ces seringues sont fermées à l'aide d'un bouchon fourni directement par le fabricant, selon la figure ci-dessous :

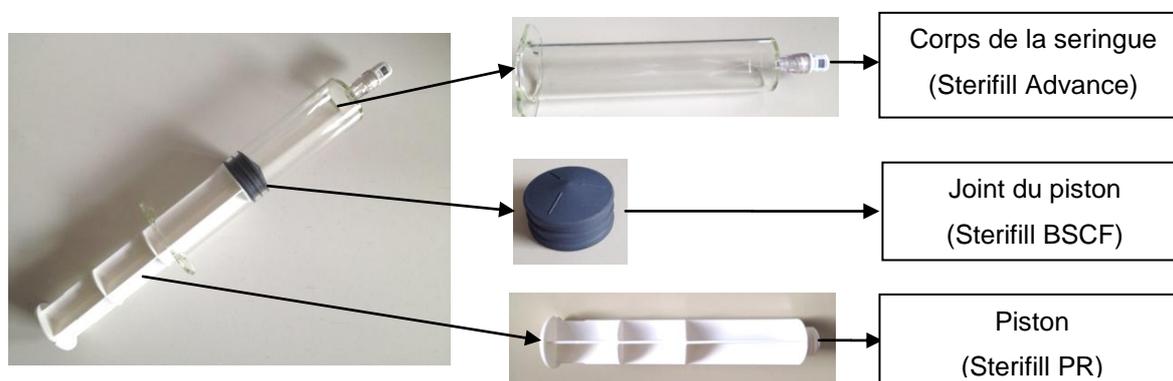


Figure 4 : Seringue BD Sterifill

La fiche technique de ce produit se trouve en annexe V.

Dans le cadre de cette étude, le profil L/E d'une solution d'insuline à 1 [UI/mL] conditionnée dans trois contenants différents : les seringues BD Perfusion[®], les seringues BD Sterifill[®] et les flacons COC Promens/Elpack[®] va être établi.

2.2.3. Calcul de l'AET

Afin de déterminer la limite d'identification et de quantification des substances L/E extraites des contenants dans lesquels la solution d'insuline est conditionnée, l'AET doit être calculé pour chaque contenant selon la formule suivante :

$$AET [\mu g / mL] = \left(\frac{SCT [\mu g / j]}{Dose\ journali\ere [mL / j]} \right) \cdot \left(\frac{Volume\ contenant [mL]}{Masse\ contenant [g]} \right)$$

Où :

- **AET** = Analytical Evaluation Threshold = Limite au-dessus de laquelle un opérateur devrait commencer à identifier une substance L/E.
- **SCT (Safety Concern Threshold)** = Limite en-dessous de laquelle un diffusible a une concentration trop basse pour présenter un risque de toxicité
- **Dose journalière** = Dose journalière maximale (Posologie estimée pour un enfant de 10 [kg] prenant une dose de 10 [UI] d'insuline par jour)
- **Volume contenant** = Volume total de la solution d'insuline
- **Masse contenant** = Poids du contenant

Ainsi, le tableau ci-dessous résume les AET au-dessus desquels une substance L/E contenue dans la solution d'insuline à 1 [UI/mL] doit être identifiée et quantifiée :

Tableau 5 : Résumé des AET

Contenant	AET [ppm]
Seringue BD Perfusion [®]	0.02
Seringue BD Sterifill [®]	0.02
Flacon COC, Promens/Elpack [®]	0.04

Les calculs détaillés de l'AET figurent en annexe VI.

Etablir un profil L/E complet est très complexe et nécessite le recours à des techniques de pointe, telles qu'un spectromètre de masse de type MS/MS. Faute de moyens à disposition et par soucis de temps, il a été décidé, dans le cadre de cette étude sur les substances L/E d'une solution d'insuline conditionnée dans trois contenants différents, de cibler les substances L/E que l'on va rechercher. Ainsi, une sélection des substances extractibles et

diffusibles à « screener », identifier et quantifier dans le cadre de cette étude va être effectuée. Mais, quelles substances choisir ?

2.2.4. Choix des substances L/E cibles et évaluation de leur toxicité

Les contenants sélectionnés sont constitués de plusieurs matériaux différents : le COC, le COP, le polypropylène, le polyéthylène, l'isoprène synthétique, le silicone et le lubrifiant. De nombreuses substances L/E peuvent être extraites ou diffuser de ces contenants, comme l'illustre les diverses listes de substances L/E élaborées par *Jenke D.*⁵

Comme dit précédemment, réaliser un profil L/E complet des substances L/E extraites des trois contenants retenus dans le cadre de cette étude n'est pas possible faute de temps et de moyens. C'est pourquoi, parmi les listes de substances L/E pouvant potentiellement être extraites des contenants étudiés, quatre substances ont été retenues : le Butylhydroxytoluène (BHT), l'Antioxydant 425, l'acide myristique et l'acide caprylique. Ces composés ont été choisis parmi la liste des substances L/E pour les raisons suivantes :

- Il s'agit de composés pour lesquels des témoins de référence existent sur le commerce. Une identification de ces composés à l'aide d'une solution témoin est alors possible.
- Il s'agit de composés pour lesquels des protocoles de méthodes d'extraction et d'analyse par HPLC/UV ou GC/MS existent dans la littérature.^{20,21,45, 46-49}
- Il s'agit de composés connus pour diffuser des contenants constitués des mêmes matériaux que ceux testés dans le cadre de cette étude.^{21,41,42}

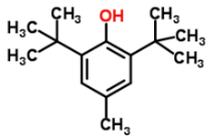
Une description plus détaillée de chaque composé est effectuée ci-dessous.

2.2.4.1. Butylhydroxytoluène (BHT)

Le BHT est utilisé comme antioxydant des matières plastiques et en caoutchouc.⁵⁰ Il peut être retrouvé dans de nombreux contenants pharmaceutiques notamment dans les contenants en polypropylène, dans les élastomères et dans les caoutchouc.⁵ Selon la monographie 3.1.6. de la Pharmacopée européenne, le BHT est un additif pouvant être utilisé pour la fabrication du polypropylène.⁵¹ Il ne doit pas être contenu à une teneur supérieure à 0.125%.⁵¹ Selon la littérature citée dans le chapitre 2.2.2., il peut être extrait du polypropylène qui est contenu dans les seringues BD Perfusion[®] et BD Sterifill[®] (piston), ainsi que du caoutchouc du septum des flacons COC et des stoppers des deux types de seringues BD.^{5,21}

Les caractéristiques physico-chimiques du BHT sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 6 : Propriétés physico-chimiques du BHT

Structure ⁵²	
CAS ⁵²	[128-37-0]
Nom chimique ⁵²	4-Méthyl-2,6-bis(2-méthyl-2-propanyl)phénol
Solubilité ^{52,53}	Insoluble dans l'eau. Soluble dans l'éthanol, dans l'acétone et dans le DMSO
pKa ⁵²	12.75
Log(P) ⁵²	5.32

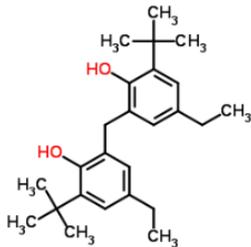
Au niveau toxicologique, le BHT peut avoir des effets délétères sur le foie et les poumons. Des études réalisées chez l'animal démontrent une augmentation de la taille du foie et une diminution de l'activité des enzymes hépatiques lors d'ingestions répétées de faibles doses de BHT par les rats.⁵⁴ Une augmentation dose-dépendante de la taille des poumons, ainsi qu'une augmentation de l'activité des enzymes pulmonaires (glutathion peroxydase ou le glucose-6-phosphate-déshydrogénase) ont été observées chez les souris ayant reçu une dose unique de BHT par voie intrapéritonéale.⁵⁵ Le BHT n'est pas considéré comme cancérogène, ni comme génotoxique.⁵⁶ L'ADI (Acceptable Daily Intake) est fixé à 0.05 [mg/kg].⁵³

2.2.4.2. Antioxydant 425

L'Antioxydant 425 est utilisé comme antioxydant des matériaux en caoutchouc synthétique et comme stabilisateur thermique du polyéthylène.⁵³ Selon les travaux de *Trittler R.* et *Hauk A.*, l'Antioxydant 425 peut être extrait des seringues BD Plastipak.^{41,42}

Les caractéristiques physico-chimiques de l'Antioxydant 425 sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 7 : Propriétés physico-chimiques de l'Antioxydant 425

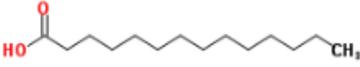
Structure ⁵²	
CAS ⁵²	[88-24-4]
Nom chimique ⁵²	2,2'-Méthylènebis[4-éthyl-6-(2-méthyl-2-propanyl)phénol]
Solubilité ⁵³	Insoluble dans l'eau, soluble dans l'alcool et dans d'autres solvants organiques
pKa ⁵²	11.49
Log(P) ⁵²	8.09

Au niveau toxicologique, l'Antioxydant 425 peut induire des affections rénales chez les souris mâles lors de l'administration chronique de faibles doses.⁵³ Une perte de poids, ainsi qu'une anémie ont aussi été observées en cas d'administration chronique.⁵³ Lors d'administration de doses élevées d'Antioxydant 425 à court terme, une baisse de la spermatogénèse et une atrophie testiculaire ont été observées chez les rats mâles.^{53,57} L'Antioxydant 425 n'est pas connu pour être cancérigène.^{53,57} Le LD₅₀ pour les essais de toxicité aiguë est > 10 [g/kg] de poids corporel chez les rats.⁵³

2.2.4.3. Acide myristique

L'acide myristique est utilisé dans la fabrication des lubrifiants.⁵³ Selon la littérature citée dans le chapitre 2.2.2., il peut être extrait du caoutchouc du septum des flacons COC et des stoppers des deux types de seringues BD, ainsi que du polypropylène contenu dans les seringues BD.^{5,21} Les caractéristiques physico-chimiques de l'acide myristique sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 8 : Propriétés physico-chimiques de l'acide myristique

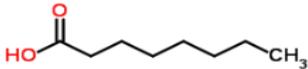
Structure ⁵²	
CAS ⁵²	[544-63-8]
Nom chimique ⁵²	Acide tétradécanoïque
Solubilité ⁵⁸	Soluble dans l'alcool à 96%
pKa ⁵²	4.90
Log(P) ⁵²	6.09

Au niveau toxicologique, l'acide myristique est considéré comme peu toxique, même en cas d'exposition à de hautes doses.⁵⁹ Il peut provoquer des irritations de la peau et des yeux.⁵⁹ Il ne semble pas provoquer de mutations.⁵⁹ L'ADI est estimé à 0.58 [mg/kg/jour].⁵⁹

2.2.4.4. Acide caprylique

L'acide caprylique est utilisé comme produit chimique intermédiaire lors de la production de colorants.⁵³ Il peut aussi être extrait du polypropylène contenu dans les seringues BD.⁵ Les caractéristiques physico-chimiques de l'acide caprylique sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 9 : Propriétés physico-chimiques de l'acide caprylique

Structure ⁵²	
CAS ⁵²	[124-07-2]
Nom chimique ⁵²	Acide octanoïque
Solubilité ⁵³	Insoluble dans l'eau et soluble dans l'alcool
pKa ⁵²	4.89
Log(P) ⁵²	2.90

Au niveau de la toxicité, l'administration orale de hautes doses d'acide caprylique à des rats a engendré des cas de crises d'épilepsie cloniques, des paresthésies, puis la mort.⁵³ Une congestion des organes viscéraux, ainsi qu'une nécrose rénale et intestinale ont été décrites suite à l'administration d'une dose unique élevée d'acide caprylique à des rats.⁵³ En cas d'exposition chronique de rats à des doses faibles d'acide caprylique, une dystrophie pulmonaire, rénale et cardiaque ont été observées.⁵³ L'acide caprylique n'est pas tératogène. Etant donné qu'il est contenu dans de nombreux aliments et qu'il peut être métabolisé par l'organisme, aucun ADI n'a été fixé pour l'acide caprylique.⁶⁰ Le LD₅₀ pour les essais de toxicité aiguë et pour une prise *per os* est fixé à 10.08 [g/kg].⁶¹

Ainsi, malgré la présence de nombreuses substances L/E dans les contenants étudiés, seuls le BHT, l'Antioxydant 425, l'acide myristique et l'acide caprylique vont être recherchés, identifiés et quantifiés dans la solution d'insuline à 1 [UI/mL] stockée dans les différents contenants (Flacons COC Promens/Elpack[®], Seringues BD Perfusion[®] et Seringues BD Sterifill[®]).

Les analyses du BHT et de l'Antioxydant 425 vont être effectuées par HPLC/UV-DAD, car ils possèdent des chromophores. Les analyses de l'acide caprylique et de l'acide myristique vont être réalisées par GC/MS suite à une réaction de dérivation.

3. Buts

L'objectif principal de ce travail est d'identifier et de quantifier le BHT, l'Antioxydant 425, l'acide myristique et l'acide caprylique dans une solution d'insuline à 1 [UI/mL] conditionnée dans trois contenants différents :

- Les seringues, BD Sterifill[®], 50 [mL]
- Les seringues BD Perfusion[®], 50 [mL]
- Les flacons COC, Promens /Elpack[®], 50 [mL]

Une comparaison des résultats obtenus pour chaque contenant va être effectuée. Pour les seringues BD Perfusion[®], étant donné que 3 lots différents sont disponibles, une comparaison des résultats obtenus entre les lots va être réalisée.

Afin de pouvoir mener une étude exhaustive des quatre substances L/E retenues, cette étude se subdivise en **6 grandes parties distinctes** :

- 1) Développement d'une méthode de préparation d'échantillons et de dosage pour l'analyse du BHT et de l'Antioxydant 425 par HPLC/UV-DAD.
- 2) Validation de la méthode de dosage du BHT et de l'Antioxydant 425 par HPLC/UV-DAD.
- 3) Développement d'une méthode de préparation d'échantillons et de dosage pour l'analyse de l'acide myristique et caprylique par GC/MS.
- 4) Validation de la méthode de dosage de l'acide myristique et caprylique par GC/MS.
- 5) Etude des substances extractibles : identification et dosage du BHT, de l'Antioxydant 425, de l'acide myristique et caprylique extraits des contenants remplis avec des solutions fortement polaires ou à des pH extrêmes.
- 6) Etude des substances diffusibles : identification et dosage du BHT, de l'Antioxydant 425, de l'acide myristique et caprylique ayant diffusé des contenants remplis avec du NaCl 0.9% ou une solution d'insuline à 1 [UI/mL].

4. Développement d'une méthode de préparation d'échantillons et de dosage pour l'analyse du BHT et de l'Antioxydant 425 par HPLC/UV-DAD

4.1. Introduction

Le BHT et l'Antioxydant 425 sont analysés par HPLC/UV-DAD en raison de la présence de chromophores. Afin de pouvoir avoir un bon rendement d'extraction et des conditions d'analyse HPLC optimales, une méthode de préparation d'échantillons et d'analyse HPLC doivent être développées.

4.2. Matériel et produits

Le tableau ci-dessous résume la liste du matériel employé pour cette étude :

Tableau 10 : Liste du matériel employé

Matériel	n° de lot	Fournisseur	Référence fournisseur	Pays
3 Lots de seringues BD Perfusion®	1602209P	BD	300136	Irlande
	1601255P			
	1603204P			
Bouchons mâle/femelle Combi Lock stériles	L87254-1	Codan Medical AG Division Homedica	16/5280	Allemagne
Bouchon septum gris 3 [mm]	30672030	Flaigg	342-V9048	Suisse
Lyoseal bleu 20 [mm]	11F090	West	3000-00000133251	USA
Pré-colonne Zorbax Eclipse Plus C-18, 2.1 x 2.5 [mm], 5 [µm]	USUQB05330	Agilent	821125-936	USA
Colonne Agilent Zorbax eclipse Plus C18, 100x3.0 [mm], 3,5 [µm]	B15216	Agilent	959961-302	USA
Vials Agilent "Deactivated vials amber, write-on spot, 2 [mL] Wide opening screw top glass vials"	000015363	Agilent	5183-2072	USA
	000015356			
Insert "Certified microvolume inserts for wide opening vials, deactivated glass flat bottom insert 440 [µL]"	2086652290	Agilent	5183-2086	USA
Bouchon "Screw caps for 2 [mL] vials, blue, PTFE/silicone/PTFE septa"	193936	Agilent	5185-5862	USA
Filtre GH Polypro 0.45 [mm], diam. 47 [mm]	T307771	PALL	66548	Mexique
Filtre Whatman, diam. 125 [mm]	69969344	Whatman	10314744	Allemagne
Bandelettes pH McolorpHast	H0697426	Merck	1.09535.0001	Allemagne
Tube SPE Supelclean LC18, 1 [mL]	6759201	Sigma/Supelco	504270	USA

Le tableau ci-dessous résume la liste des produits employés pour cette étude :

Tableau 11 : Liste des produits employés

Produit	n° de lot	Fournisseur	Référence fournisseur	Pays
Isopropanol (=2-propanol)	K47208640544	Merck	1.01040.2500	Allemagne
Sodium phosphate dibasique dihydraté (=Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O)	K46477153 603	Merck	1.19753.0250	Allemagne
Eau pour HPLC	Z0366633605	Merck	1.15333.2500	Allemagne
	Z0375533610			
Dichlorométhane pour HPLC	K47623144610	Merck	1.060442500	Allemagne
Méthanol	I780018518	Merck	1.06018.2500	Allemagne
	I803918518			
Sodium sulfate anhydre	AM0876649604	Merck	1.06649.0500	Allemagne
Acide chlorhydrique 5 [M]	HC44262011	Merck	1.09911.0001	Allemagne
Sodium hydroxyde 5 [M]	HC54854813	Merck	1.09137.1000	Allemagne
Sel d'ammonium acétate	BCBQ3068V	Sigma	17836	Hollande
Bisphénol M (CAS : 13595-25-0)	BCBN1490V	Sigma	23454	Japon
Irganox 415 (CAS : 96-69-5)	20160109	Chemos	132912	Allemagne
Butylhydroxytoluène	1.7	EDQM	B1215000	France
Antioxydant 425	MKBC8969V	Sigma Aldrich	1001847278	USA

4.3. Appareils et équipements

Le tableau ci-dessous résume la liste des appareils et équipements employés pour cette étude :

Tableau 12 : Appareils et équipements

Appareils et équipements	Numéro de série	Fabricant	Pays
Balance de précision Mettler Toledo AX 504	112 1091337	Mettler Toledo	USA
Balance standard Mettler PG 1003 S	1125020066	Mettler Toledo	USA
pH-mètre de laboratoire Mettler Toledo Sevenmulti	1232035453	Mettler	Suisse
Bains ultrasons B5200 Branson	C-120/86	Branson	USA
Chromatographie en phase liquide Agilent 1100 séries	DE11109565	Agilent	USA
Autoclave à vapeur FOAF 3/B Fedegari	NA1312AN	Fedegari	Italie
Etuve (EP), Memmert ULP 400	G401.0246	Memmert	Allemagne
Etuve (EP) Rumed 4101	0412/07	Rumed	Allemagne
Rotavapeur	7441655	KNF	Suisse
SPE Supelco Visiprep 24 DL	-	Sigma/Supelco	USA
Vortex	0100	VWR	USA

4.4. Méthode

4.4.1. Méthode initiale d'analyse par HPLC/UV-DAD

De nombreuses méthodes d'analyse du BHT et de l'Antioxydant 425 sont décrites dans la littérature.^{20,21,45,62} Une méthode développée par *Jenke D.* et *Norwood D.* s'applique à l'analyse de toutes les substances L/E extraites de différents matériaux pharmaceutiques, dont le BHT.²¹

Cette même méthode est retrouvée dans la Pharmacopée américaine dans la monographie «USP <1663> : Etude des extractibles associés aux contenants pharmaceutiques et aux dispositifs d'administration de médicaments »⁹, et est illustrée dans le tableau ci-dessous :

Tableau 13 : Conditions d'analyse HPLC/UV-DAD selon USP

Colonne	Agilent Zorbax Eclipse Plus C ₁₈ , 100 x 3.0 [mm], 3.5 [µm] particules	
Phase mobile	Tampon d'acétate d'ammonium à 10 [mM] à pH 4.8 (= Solution A)	Acétonitrile pour HPLC (=Solution B)
Gradient	Temps	% de solution B
	0.0	5.0
	8.4	100.0
	35.0	100.0
	36.0	5.0
	39.0	5.0
Débit	0.8 [mL/min]	
Volume d'injection	10-50 [µL]	
Détection UV	205-300 [nm], avec des spectres enregistrés aux longueurs d'onde suivantes : 210, 220, 230, 250 et 270 [nm].	

Cette méthode est testée initialement dans le cadre de cette étude. Comme il s'agit d'une méthode adaptée à l'étude de toutes les substances L/E contenues dans un extrait, elle n'est pas directement applicable au dosage du BHT et de l'Antioxydant 425. Ainsi, des adaptations y sont apportées afin de la rendre applicable à l'analyse du BHT, de l'Antioxydant 425 et des standards internes choisis dans le cadre de cette étude.

4.4.2. Méthodes de préparation d'échantillons

Ce chapitre se divisera en deux sous-chapitres :

- 1) Développement d'une méthode de préparation d'échantillons par LLE (« Liquid-Liquid Extraction » ou Extraction liquide-liquide)
- 2) Développement d'une méthode de préparation d'échantillons par SPE (« Solid-phase extraction » ou extraction en phase solide)

4.4.2.1. Développement d'une méthode de préparation d'échantillons par extraction liquide-liquide : Méthode initiale de préparation d'échantillons par LLE

Plusieurs exemples de préparations d'échantillons pour le BHT et l'Antioxydant 425 sont détaillés dans la littérature.^{21,45,62,63} Les méthodes de préparation d'échantillons les plus fréquemment utilisées sont l'extraction liquide-liquide ou la SPE. Parmi les méthodes de préparation d'échantillons retrouvées dans la littérature, la méthode d'extraction LLE proposée par *Jenke D.* semble être la méthode la plus appropriée. En effet, *Jenke D.* propose dans son article, une méthode d'extraction par LLE de tous les composés apolaires contenus dans un extrait de différents matériaux pharmaceutiques (PVC, COC...), ainsi qu'une méthode de quantification des composés extraits à l'aide de deux standards internes, le Bisphénol M, et l'Irganox 415 (Annexe VII).²¹ Aux vues des propriétés physico-chimiques du BHT et de l'Antioxydant 425, cette méthode de préparation d'échantillons peut être testée pour l'extraction du BHT et de l'Antioxydant 425. Elle peut aussi être appliquée à l'extraction de l'acide myristique et de l'acide caprylique, ce qui la rend d'autant plus intéressante. Cette méthode est donc utilisée comme méthode de préparation d'échantillons initiale et va être adaptée plus spécifiquement à l'extraction du BHT et de l'Antioxydant 425.

4.4.2.1.1. Méthode d'extraction

- **Standards internes**

Etant donné que la méthode développée par *Jenke D.* visait à établir un profil L/E complet des matériaux testés, le choix des standards internes était complexe. Il fallait que ces substances ne soient pas contenues dans les extraits et simulent au mieux le comportement de la majorité des substances extraites. Ainsi, dans le cadre de son étude sur les substances L/E, *Jenke D.* avait sélectionné deux standards internes pour la quantification des composés extraits : le Bisphénol M, utilisé pour évaluer la performance du processus de préparation d'échantillons et l'Irganox 415, utilisé pour vérifier la performance de l'analyse HPLC.²¹

Dans le cadre de l'étude sur les substances L/E, les mêmes standards internes que ceux proposés par *Jenke D.* sont utilisés. Le Bisphénol M, représenté ci-dessous, est choisi comme standard interne pour la préparation d'échantillons, car il est stable et soluble dans les phases organiques et aqueuses. Il est lipophile ($\log(P) = 6.12$)⁵², ce qui signifie qu'il a une forte affinité pour la phase organique. Il est soluble dans du méthanol et possède des chromophores, ce qui signifie qu'il est UV-absorbant.²¹

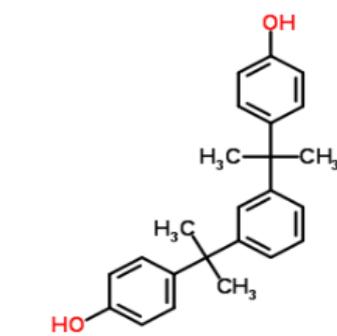


Figure 5 : Bisphénol M⁵²

L'Irganox 415, illustré ci-dessous, est utilisé comme standard interne pour évaluer la performance de l'analyse par HPLC/UV-DAD en raison de sa stabilité, de sa solubilité dans le méthanol et de sa détectabilité en UV (présence de chromophores).²¹

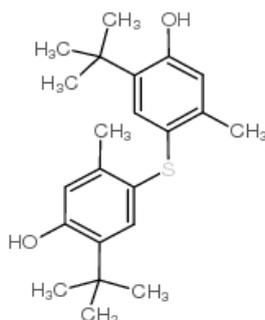


Figure 6 : Irganox 415⁵²

Dans le cadre de l'étude des substances L/E de la solution d'insuline, la solution standard de Bisphénol M est préparée à une concentration de 2 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] dans du méthanol. La solution d'Irganox 415 est préparée à une concentration de 2 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] dans du méthanol. Aucune donnée sur la stabilité de ces solutions n'a été retrouvée dans la littérature.

- **Extraction liquide-liquide**

L'extraction liquide-liquide est une technique de préparation d'échantillons qui a pour but de répartir les composés entre deux phases non miscibles selon la polarité et la solubilité des composés d'intérêt dans les phases utilisées. Pour ce faire, des solvants apolaires (hexane, dichlorométhane etc...) sont mis en contact avec des solvants polaires (solution aqueuse) dans une ampoule à décanter. Après une agitation vigoureuse, l'ampoule est laissée à décanter et une séparation des phases survient. La phase dans laquelle le composé d'intérêt s'est solubilisé, est récoltée. Le choix du solvant d'extraction dépend de la polarité, de la solubilité des composés d'intérêt, ainsi que du point d'ébullition du solvant (pour l'évaporation du solvant).⁶⁴

La méthode d'extraction liquide-liquide développée par *Jenke D.* est la suivante²¹ :

Dans une ampoule à décanter, 50 [mL] de la solution à analyser sont déversés. 1000 [µL] de la solution standard de Bisphénol M à 2 [µg/mL] y sont ajoutés. Le pH de la solution est ajusté à 3 avec de l'HCl 5 [N]. 25 [mL] de dichlorométhane y sont ajoutés. Après agitation pendant 1 minute, la phase organique est récoltée et une nouvelle extraction est réalisée à l'aide de 25 [mL] de dichlorométhane. Le pH de la phase aqueuse est ensuite ajusté à 8 avec du NaOH 5 [N]. Deux nouvelles extractions successives sont réalisées suite à l'ajout de 2x 25 [mL] de dichlorométhane. Les phases organiques sont ensuite rassemblées dans un ballon de 200 [mL]. Une spatule de sodium sulfate anhydre est ajoutée et la solution est filtrée à l'aide d'un filtre Whatman diam. 125 [mm]. Le solvant est ensuite évaporé à sec. L'échantillon est repris avec 1 [mL] de méthanol. 200 [µL] de cette solution sont prélevés et déposés dans un vial ambré. 200 [µL] de la solution standard d'Irganox 415 à 2 [µg/mL] sont ajoutés. La solution est ensuite injectée. La concentration finale de l'Irganox 415 et du Bisphénol M est de 1 [µg/mL].

4.4.2.1.2. Rendement d'extraction LLE

Afin d'évaluer la performance de l'extraction liquide/liquide pour l'Antioxydant 425, le BHT et le Bisphénol M, dix extractions successives d'un échantillon de 50 [mL] d'eau pour HPLC spikés avec une solution contenant 10 [µg/mL] de BHT, de Bisphénol M, et d'Antioxydant 425 (= Solution standard 1) sont réalisées selon la méthode d'extraction LLE décrite dans le chapitre 4.4.2.1.1 Méthode d'extraction. Les échantillons sont ensuite analysés par la méthode d'analyse HPLC/UV-DAD.

Afin de pouvoir calculer le rendement exact, la solution standard 1 « pure » doit être injectée. Pour ce faire, 200 [µL] de la solution standard 1 sont prélevés et déposés dans un

vial. Après adjonction de 200 [µL] d'une solution d'Irganox 415 à 2 [µg/mL], la solution est injectée.

La concentration finale de l'Antioxydant 425, du BHT et du Bisphénol M est de 5 [µg/mL]. La concentration finale de l'Irganox 415 est de 1 [µg/mL].

4.4.2.1.3. Prévalidation de la méthode d'extraction liquide-liquide

Quatre milieux d'extraction différents sont utilisés dans le cadre de l'étude des substances diffusibles et extractibles de la solution d'insuline. Il s'agit du tampon phosphate à pH 3, du tampon phosphate à pH 8, d'un mélange isopropanol/eau 50:50 et de la solution d'insuline à 1 [UI/mL] (c.f. chapitre 8. et 9.). Afin de s'assurer que le milieu d'extraction utilisé n'ait pas d'influence sur le rendement d'extraction, une pré-validation de la méthode d'extraction liquide-liquide est réalisée. Pour ce faire, les pentes obtenues avec 4 standards d'étalonnage de 4 niveaux de concentrations différents et n'ayant pas subi d'extraction LLE sont comparées avec les pentes obtenues avec 4 standards d'étalonnage de 4 niveaux de concentrations différents ayant été extraits selon la méthode d'extraction LLE dans les différents milieux testés dans le cadre de cette étude.

Pour exclure l'influence du milieu d'extraction sur le rendement de l'extraction, les rapports entre la pente des quatre solutions standard à quatre niveaux de concentration (non extraits par LLE) et la pente des quatre solutions standard à quatre niveaux de concentration extraits par LLE doit être égal à 1. Le protocole de prévalidation détaillé figure en annexe VIII.

4.4.2.2. Développement d'une méthode de préparation d'échantillons par SPE : méthode initiale de préparation d'échantillons par SPE

Une méthode d'extraction SPE est développée suite aux résultats insatisfaisants obtenus lors de la prévalidation de la méthode LLE et du calcul du rendement. (c.f. point 4.5. résultats et discussion)

4.4.2.2.1. Méthode d'extraction

- **Standards internes**

L'Irganox 415 est utilisé comme standard interne pour vérifier la performance de l'analyse HPLC et la performance de la méthode de préparation d'échantillons.

- **Extraction SPE**

Etant donné que peu de données figurent dans la littérature sur l'extraction par SPE du BHT et de l'Antioxydant 425, la méthode d'extraction par SPE est initialement développée sur la base de nos propres connaissances.

La SPE est une technique de préparation d'échantillons qui permet de séparer les substances contenues dans une solution ou dans une suspension en utilisant une colonne en silice. La séparation fonctionne selon un principe d'adsorption des composés sur la colonne. Seuls les composés ayant une forte affinité pour la colonne sont retenus. Les autres sont élués. De nombreux type de colonnes existent sur le marché (Colonnes en phase normale, en phase inverse LC-18 etc...). Le choix de la colonne dépend des propriétés physico-chimiques des composés à extraire.⁶⁵

Dans le cas présent, les composés à extraire étant apolaires, une colonne SPE LC-18 (phase inverse) est sélectionnée pour l'extraction des échantillons. Une bonne affinité du BHT et de l'Antioxydant 425 avec la phase stationnaire est attendue. Le méthanol est choisi comme éluant en raison de la solubilité du BHT et de l'Antioxydant 425 dans ce solvant.

Le protocole ci-dessous a été développé initialement :

La colonne SPE LC-18 est activée avec 2 x 1 [mL] de méthanol pour HPLC, puis par l'ajout de 2 x 1 [mL] d'eau pour HPLC. 2 x 1 [mL] du milieu étudié sont ajoutés (tampon phosphate à pH 3 etc...), puis 1 [mL] d'un échantillon (dans le cas présent : une solution standard contenant 5 [µg/mL] de BHT et d'Antioxydant 425) est ajouté. Finalement, 100 [µL] d'une solution d'Irganox 415 (le standard interne) à 10 [µg/mL] sont ajoutés. La cartouche est laissée à sécher. Une fois sèche, le vide est coupé et un tube en verre propre est placé sous la cartouche. 2 x 1 [mL] de méthanol sont ajoutés dans la cartouche. Le système est mis sous vide. La cartouche est laissée à sécher. Une fois sèche, le vide est coupé. La solution méthanolique est évaporée à sec avec de l'azote. 1 [mL] de méthanol est ajouté pour reprendre la solution. Après agitation, la solution est injectée.

La concentration finale de l'Antioxydant 425 et du BHT est de 5 [µg/mL]. La concentration finale de l'Irganox 415 est de 1 [µg/mL].

En fonction des résultats obtenus en utilisant cette méthode de préparation d'échantillons, des améliorations vont y être apportées afin d'optimiser au maximum les conditions d'extraction du BHT et de l'Antioxydant 425.

4.4.2.2. Rendement d'extraction SPE

Afin d'évaluer la performance de l'extraction SPE pour l'Antioxydant 425 et le BHT, dix extractions successives d'un échantillon (correspondant à 1 [mL] d'eau pour HPLC spiké avec 5 [µg/mL] de BHT et d'Antioxydant 425 (= Solution standard 1)) sont réalisées selon la méthode d'extraction SPE optimisée. Les échantillons sont ensuite analysés par la méthode d'analyse HPLC/UV-DAD. La concentration finale de l'Antioxydant 425 et du BHT est de 5 [µg/mL]. La concentration de l'Irganox 415 est de 1 [µg/mL].

Afin de pouvoir calculer le rendement exact, la solution standard 1 « pure » doit être injectée. Pour ce faire, une solution standard 1 contenant 5 [µg/mL] de BHT et d'Antioxydant 425 et 1 [µg/mL] d'Irganox 415 est préparée dans du méthanol et est injectée.

4.4.2.3. Prévalidation de la méthode d'extraction par SPE

Afin de s'assurer que le milieu d'extraction utilisé n'ait pas d'influence sur le rendement d'extraction, une prévalidation de la méthode SPE optimisée est réalisée avec les quatre milieux testés dans le cadre de cette étude (tampon phosphate à pH 3 etc...). Pour ce faire, les pentes obtenues avec 4 standards d'étalonnage de 4 niveaux de concentrations différents et n'ayant pas subi d'extraction SPE sont comparées avec les pentes obtenues avec 4 standards d'étalonnage de 4 niveaux de concentrations différents ayant été extraits selon la méthode d'extraction SPE optimisée dans les différents milieux testés dans le cadre de cette étude. Le protocole de prévalidation détaillé figure en annexe IX.

Les rapports entre la pente des quatre solutions standard à quatre niveaux de concentration (non extraits par SPE) et la pente des quatre solutions standard à quatre niveaux de concentration extraits par SPE doit être égal à 1 pour exclure l'influence du milieu d'extraction sur le rendement de l'extraction.

4.5. Résultats et discussion

4.5.1. Optimisation de la méthode d'analyse par HPLC/UV-DAD

Différentes améliorations ont été apportées à la méthode d'analyse par HPLC/UV-DAD : le débit a été diminué de 0.8 [mL/min] à 0.4 [mL/min]. Le gradient a été modifié : il passe de 5% à 100% d'acétonitrile en 60 minutes, puis il est maintenu à 100% d'acétonitrile pendant 5 minutes. Il s'ensuit une phase de 10 minutes d'équilibration de la colonne avec 5% d'acétonitrile. Avec cette méthode, les temps de rétention du Bisphénol M, de l'Irganox 415, du BHT et de l'Antioxydant 425 sont respectivement de 38.4 minutes, de 46.3 minutes, de

48.8 minutes et de 55.4 minutes. Le volume d'injection a été passé de 10 [µL] à 50 [µL]. Seule la longueur d'onde de 210 [nm] a été retenue. A cette longueur d'onde, la sensibilité de détection est suffisante pour tous les composés recherchés. Finalement, une précolonne, la Zorbax Eclipse Plus C-18, 2.1 x 2.5 [mm], 5 [µm] a été ajoutée afin de protéger la colonne.

De nombreux composés « non-identifiés » éluaient dans les premières 20 minutes de l'analyse et proche des temps de rétention des composés d'intérêt. Sur le blanc de la solution d'insuline, un composé éluait très proche du temps de rétention de celui du Bisphénol M. Il y avait un risque de co-élution entre le Bisphénol M et ce composé. Afin d'améliorer la sélectivité de la méthode et d'éliminer le risque d'interférences, il a été décidé de ralentir l'élution des composés d'intérêt. C'est pourquoi le débit a été ralenti et la pente du gradient augmentée. Le volume d'injection a été augmenté de 10 [µL] à 50 [µL] afin d'améliorer la sensibilité de détection des composés, sans pour autant induire une surcharge de la colonne.⁶⁴

Dans cette configuration, une bonne séparation des pics de chaque composé analysé est observée comme illustré ci-dessous :

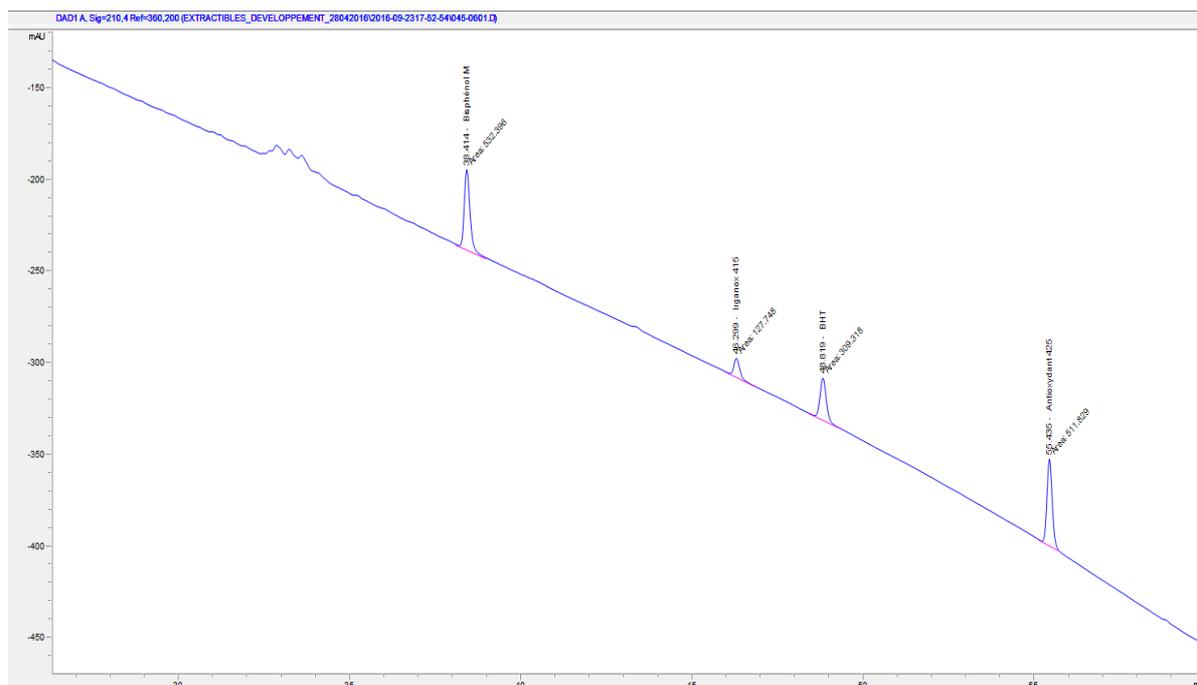


Figure 7 : Exemple de chromatogramme d'un échantillon

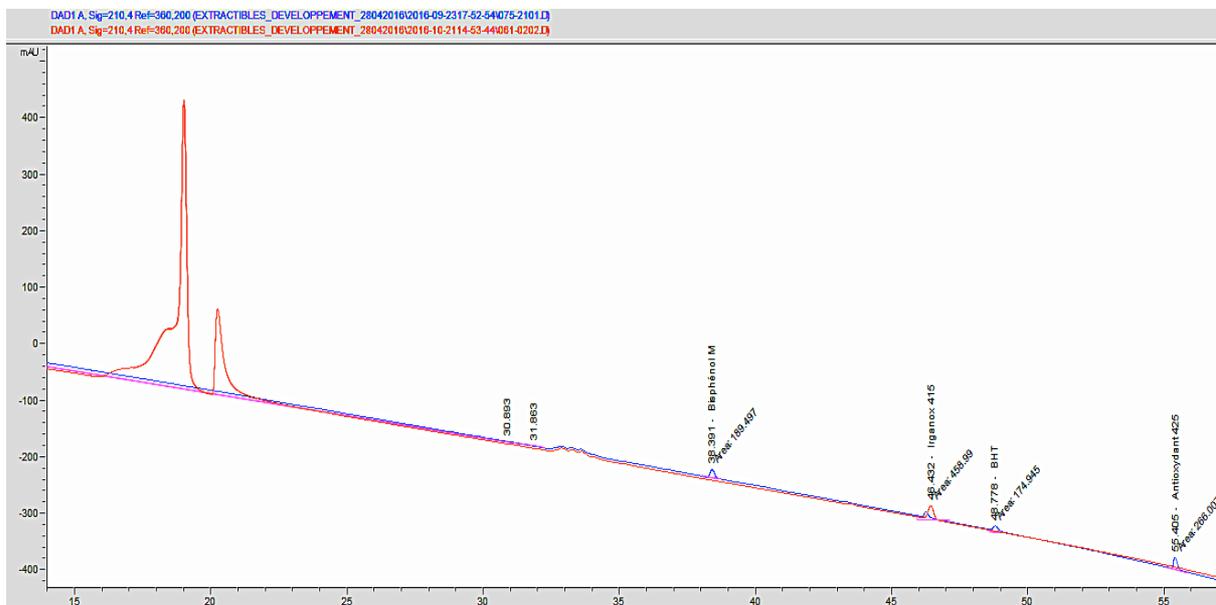


Figure 8 : Chromatogramme d'un échantillon superposé au chromatogramme du blanc de la solution d'insuline

La qualité de la séparation des pics peut être évaluée par le facteur de sélectivité α . Il s'agit d'un indicateur de la séparation entre deux pics. Idéalement, le facteur de sélectivité doit être supérieur à 1 pour que la séparation des pics soit considérée comme acceptable.⁶⁶

Les facteurs de sélectivité obtenus pour chaque composé analysé figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 14 : Facteurs de sélectivité

Composé	Facteur de sélectivité (par rapport au pic d'avant)	Facteur de sélectivité (Par rapport au pic d'après)
Irganox 415	1.20	1.05
Bisphénol M	1.20	1.27
BHT	1.27	1.13
Antioxydant 425	1.14	1.32

Les facteurs de sélectivité obtenus sont tous supérieurs à 1. Ainsi, une bonne séparation des pics est observée. Il n'y a pas de co-élutions des pics suite à l'augmentation du volume d'injection de 10 [µL] à 50 [µL].

Cinq injections d'une solution standard contenant 5 [µg/mL] de BHT, d'Antioxydant 425 et de Bisphénol M et 1 [µg/mL] d'Irganox 415 ont été effectuées afin de vérifier la répétabilité des temps de rétention. Les résultats détaillés figurent en annexe X.

Des CVs compris entre 0.03% et 0.08% ont été obtenus. La répétabilité des temps de rétention est bonne, car le CV est inférieur à 2% pour tous les composés analysés. Cela signifie que les temps de rétention sont reproductibles et que le temps d'équilibration de la colonne de 10 minutes est suffisant.

4.5.2. Optimisation de la méthode de préparation d'échantillons par LLE.

4.5.2.1. Rendement d'extraction LLE

Les rendements d'extraction suivants ont été obtenus suite à l'extraction de 50 [mL] d'eau spikés avec une solution de BHT, d'Antioxydant 425 et du Bisphénol M à 10 [µg/mL] :

Tableau 15 : Rendement d'extraction

Extraction	C _{échantillon Bisphénol M} [µg/mL]	C _{échantillon BHT} [µg/mL]	C _{échantillon Antioxydant 425} [µg/mL]
Moyenne ± IC₉₅	2.15 ± 0.04	0.98 ± 0.07	1.28 ± 0.02
Ecart-type	0.06	0.09	0.02
CV [%]	2.60%	9.33%	1.85%
Rendement [%]	43.76%	20.07%	28.24%

Les résultats détaillés figurent en annexe XI.

La concentration finale théorique attendue est de 5 [µg/mL] de Bisphénol M, de BHT et d'Antioxydant 425.

Les rendements d'extraction obtenus pour le Bisphénol M, le BHT et l'Antioxydant 425 sont très faibles, mais répétables (CV < 10%). Ces résultats sont étonnants aux vues des propriétés physico-chimiques des composés d'intérêt. Des investigations supplémentaires, notamment sur la stabilité des solutions à pH acide ou basique et sur la volatilité des composés (volatilisation dans le rotavapeur) sont nécessaires pour pouvoir expliquer le bas rendement d'extraction. Le rendement d'extraction pouvant aussi être influencé par le milieu d'extraction, les résultats de la prévalidation peuvent contribuer à l'explication du bas rendement d'extraction.

4.5.2.2. Prévalidation de la méthode d'extraction liquide-liquide

Les rapports des pentes entre la pente des quatre solutions standard à quatre niveaux de concentration (non extraits par LLE) et la pente des quatre solutions standard à quatre niveaux de concentration extraits par LLE figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 16 : Résultats

Série	BPM	BHT	Antioxydant 425	Médiane du rapport des pentes
	Rapport Pente STD/Pente Extrait	Rapport Pente STD/Pente Extrait	Rapport Pente STD/Pente Extrait	
Série 1 (Milieu : tampon phosphate à pH 8)	2.71	2.20	2.66	2.66
Série 2 (Milieu : tampon phosphate à pH 3)	2.55	2.21	2.54	2.54
Série 3 (Milieu : mélange isopropanol/eau 50:50)	1.08	/	1.29	1.08
Série 4 (Milieu : Insuline à 1 [UI/mL])	2.57	2.37	2.51	2.51

Les résultats détaillés figurent en annexe XII.

Les résultats obtenus pour la prévalidation démontrent que le milieu d'extraction influence le rendement d'extraction. En effet, les rapports entre les pentes des solutions standard et celles des solutions extraites est supérieur à 1 quelque soit le milieu d'extraction testé. La courbe d'étalonnage tracée avec des solutions standard préparées dans du méthanol ne peut donc être utilisée pour calculer les concentrations des échantillons extraits par LLE, car elle sous-évalue d'un facteur d'environ 2.5 les résultats des échantillons extraits en solution aqueuse et d'un facteur d'environ 1.1 les résultats des échantillons extraits en milieu organique.

Afin de pouvoir calculer le rendement avec exactitude en cas d'utilisation de la méthode de préparation d'échantillons par extraction liquide-liquide, il faudrait procéder à un dosage des échantillons selon la méthode des ajouts dosés. Cela rend très complexe la mise au point et la validation de la méthode de préparation d'échantillons en raison de la multiplicité des milieux et des contenants utilisés dans le cadre de cette étude (4 milieux d'extraction et 3 contenants différents).

D'autre part, lors de la réalisation de la série 3 de prévalidation, c'est-à-dire en effectuant une extraction LLE avec le milieu isopropanol/eau, aucune trace de BHT n'a été retrouvée

dans les échantillons dosés. Aucune trace de BHT n'a été retrouvée non plus dans la phase aqueuse, ce qui semblait évident en raison du caractère apolaire du BHT. Aucune trace de BHT n'a été retrouvée suite à l'évaporation du dichlorométhane à froid. Selon une recherche de littérature, le BHT a une basse température de sublimation (située entre 55 et 70[°C]).⁶⁷ Il est donc probable que ce dernier sublime lors de l'évaporation au rotavapeur.

Au niveau moléculaire, la capacité du BHT à sublimer peut être expliquée par le fait que l'encombrement stérique au niveau de son groupement –OH est très important.^{67,68} Cela limite les possibilités d'interactions moléculaires du BHT avec son environnement lors de l'évaporation de la phase aqueuse et entraîne sa sublimation. Ce phénomène pourrait être diminué soit par la dérivatisation du BHT (par désalkylation en 2-tert-butyl-4-méthylphénol par exemple)⁶⁸ ou par l'ajout d'une substances retenant le BHT lors de l'évaporation.

Ce phénomène de sublimation ne s'est observé que lors des extractions réalisées dans le mélange isopropanol/eau 50:50, car le volume de solvant à évaporer est plus important (125 [mL] au lieu de 100 [mL] en raison de la miscibilité de l'isopropanol avec le dichlorométhane). Le temps d'évaporation de l'échantillon est plus long. Toutefois, il n'est pas exclu qu'une partie du BHT se sublime lorsque les extractions sont réalisées dans les mélanges aqueux.

Ainsi, la méthode de préparation d'échantillons par extraction liquide-liquide ne semble donc pas appropriée pour le dosage du BHT et de l'Antioxydant 425, c'est pourquoi elle a été remplacée par une méthode de préparation d'échantillons par SPE. En raison des difficultés d'extraction rencontrées avec le mélange isopropanol/eau, il a été décidé de procéder à une injection directe des extraits des différents contenants remplis avec le mélange isopropanol/eau 50:50.

4.5.3. Optimisation de la méthode de préparation d'échantillons par SPE

4.5.3.1. Rendement d'extraction SPE

Lors de l'injection du premier échantillon préparé selon le protocole décrit au chapitre 4.4.2.2.1 Extraction SPE, il a été constaté que le rendement du BHT était de 0%. Une nouvelle extraction SPE a été réalisée. Les 2 [mL] de méthanol extraits par SPE ont été dosés avant évaporation. Le rendement d'extraction du BHT était proche de 100% dans cette solution. Lorsque cette même solution a été évaporée à l'azote, reprise dans 1 [mL] de méthanol et injectée, plus aucune trace de BHT n'a été détectée. Une sublimation du BHT survient lors de l'évaporation du méthanol avec un gaz neutre. Afin d'éviter ce phénomène, il a été décidé d'éluer le BHT et l'Antioxydant 425 avec 1 [mL] de méthanol (au lieu de 2 [mL] de méthanol). Le volume de la solution est ensuite ajusté à 1 [mL] et la

solution est injectée directement. En procédant ainsi, il n'est pas nécessaire de reconcentrer l'échantillon et l'étape d'évaporation de l'échantillon peut alors être évitée.

Les 10 extractions successives d'un échantillon (correspondant à 1 [mL] d'eau pour HPLC contenant 5 [µg/mL] de BHT et d'Antioxydant 425 (= Solution standard 1)) ont été réalisées selon la méthode d'extraction SPE optimisée. Les rendements d'extraction suivants ont été obtenus suite aux 10 extractions :

Tableau 17 : Rendement d'extraction

Extraction	C_{échantillon BHT} [µg/mL]	C_{échantillon Antioxydant 425} [µg/mL]
Moyenne ± IC₉₅	4.34 ± 0.24	5.80 ± 0.33
Ecart-type	0.34	0.46
CV [%]	7.85%	7.92%
Rendement [%]	87.51%	101.87%

Les résultats détaillés figurent en annexe XIII. La concentration finale théorique attendue est de 5 [µg/mL] de BHT et d'Antioxydant 425.

Les résultats obtenus pour le rendement d'extraction du BHT et de l'Antioxydant 425 par SPE sont satisfaisants. Une bonne répétabilité a aussi été observée car les coefficients de variations obtenus sont inférieurs à 10%. L'absence d'influence du milieu d'extraction sur le rendement devra être confirmé par la prévalidation.

4.5.3.2. Prévalidation de la méthode d'extraction SPE

Les rapports des pentes entre la pente des quatre solutions standard à quatre niveaux de concentration (non extraits par SPE) et la pente des quatre solutions standard à quatre niveaux de concentration extraits par SPE figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 18 : Résultats

Série	BHT	Antioxydant 425	Médiane du rapport des pentes
	Rapport Pente STD/Pente Extrait	Rapport Pente STD/Pente Extrait	
Série 1 (Milieu : tampon phosphate à pH 8)	1.0	1.0	1.0
Série 2 (Milieu : tampon phosphate à pH 3)	1.0	1.0	1.0
Série 3 : (Milieu : Insuline à 1 [UI/mL])	0.9	0.8	0.8

Les rapports des pentes obtenues pour la solution d'insuline étant inférieurs à 1, il a été décidé de modifier la méthode de préparation d'échantillons : l'ajout de 2 x 1 [mL] de la solution d'insuline à 1 [UI/mL] lors du conditionnement de la colonne a été remplacé par 2 x 1 [mL] de solution tampon phosphate à pH 3. Cela permet de modifier l'état d'ionisation du BHT et de l'Antioxydant 425 et ainsi d'améliorer leur solubilité dans le méthanol. L'élution de ces composés est alors facilitée.

Les résultats suivants ont été obtenus suite à ce changement :

Tableau 19 : Résultats

Série	BHT	Antioxydant 425	Médiane du rapport des pentes
	Rapport Pente STD/Pente Extrait	Rapport Pente STD/Pente Extrait	
Série 1 (Milieu : tampon phosphate à pH 8)	1.0	1.0	1.0
Série 2 (Milieu : tampon phosphate à pH 3)	1.0	1.0	1.0
Série 3 : (Milieu : Insuline à 1 [UI/mL])	1.0	1.0	1.0

Les résultats détaillés de la prévalidation figurent en annexe XIV.

Suite à l'optimisation de la méthode SPE pour les extractions réalisées avec la solution d'insuline, les résultats obtenus pour la prévalidation démontrent que le milieu d'extraction n'influence pas le rendement d'extraction. En effet, les rapports entre les pentes des solutions standard et celles des solutions extraites est égal à 1 quelque soit le milieu d'extraction testé. Cela signifie que la courbe d'étalonnage des solutions standard

préparées dans du méthanol peut être utilisée pour le dosage du BHT et de l'Antioxydant dans les échantillons extraits par SPE.

4.6. Conclusions

Ainsi, la méthode d'analyse du BHT et de l'Antioxydant a été optimisée. Une bonne sélectivité des pics, ainsi qu'une bonne répétabilité au niveau des temps de rétention ont été obtenues. A terme, une diminution du temps d'analyse de la méthode développée pourrait être envisagé, car actuellement le temps d'une analyse est long (65 minutes avec une phase de rinçage de 10 minutes).

Une préparation d'échantillons par SPE a été développée au détriment de la méthode d'extraction par LLE (suite aux mauvais rendements d'extraction obtenus). De bons rendements d'extraction du BHT et de l'Antioxydant 425 ont été obtenus avec la méthode SPE. La prévalidation de la méthode a permis de démontrer que le milieu d'extraction n'avait pas d'influence sur le rendement d'extraction.

Afin de pouvoir garantir la fiabilité et la reproductibilité de la méthode de dosage, la méthode doit être validée.

5. Validation de la méthode de dosage pour l'analyse du BHT et de l'Antioxydant 425 par HPLC/UV-DAD

5.1. Introduction

La méthode analytique doit être validée pour l'identification et le dosage du BHT et de l'Antioxydant 425, ainsi que pour l'identification et le dosage du standard interne d'injection, l'Irganox 415. La validation de la méthode est effectuée selon les critères établis par le protocole SFSTP, 2003.⁶⁹

5.2. Matériel, produits, équipements et appareils

Le matériel, les produits et les équipements utilisés sont identiques à ceux utilisés pour le développement de la méthode d'analyse (c.f. chapitre 4.2 et 4.3). La méthode analytique est validée à l'aide du logiciel e-noval.

5.3. Méthode

Selon le protocole SFSTP, la spécificité de la méthode doit être déterminée en premier lieu. Elle est évaluée pour l'Irganox 415, le BHT, l'Antioxydant 425 et leurs produits de dégradation.⁶⁹

5.3.1. Spécificité

La spécificité est évaluée au moyen de trois essais : la pureté des pics, l'absence d'interférences au niveau des pics d'intérêt dans les chromatogrammes des blancs et par des essais de dégradation forcée des composés d'intérêt. Les essais sont décrits ci-dessous :

5.3.1.1. Pureté des pics

La pureté des pics est évaluée à l'aide du logiciel Chemstation (Version C.01.05) de l'appareil HPLC pour un échantillon contenant 5 [µg/mL] d'Antioxydant 425 et de BHT et 1 [µg/mL] d'Irganox 415. Elle est calculée selon un facteur de pureté. Le facteur de pureté correspond à la moyenne des valeurs de pureté (obtenue en effectuant la moyenne de 5 spectres sélectionnés sur un pic déterminé) de tous les spectres compris dans la limite de pureté. Le facteur de pureté doit être supérieur à 990 pour être considéré comme conforme.

5.3.1.2. Blanc

Un blanc doit être préparé en suivant la méthode d'extraction SPE, afin d'exclure toute contamination de l'échantillon lors de sa préparation. Le blanc permet de prouver l'absence d'interférences au niveau des pics des composés d'intérêt. Il est préparé pour chaque milieu testé dans le cadre de l'étude des substances extractibles et diffusibles (Tampon phosphate à pH 3, tampon phosphate à pH 8, mélange isopropanol/eau 50:50, NaCl 0.9% et solution d'insuline à 1 [UI/mL]) selon les protocoles suivants (c.f. chapitre 8. et 9. Etude des substances extractibles et diffusibles) :

- Préparation du blanc tampon phosphate à pH 3 et à pH 8 :

Des liners en teflon sont placés sur la valve de contrôle du débit de la SPE. Une cartouche Supelclean LC-18 est connectée sur le liner. Le système SPE est mis sous vide en allumant la pompe à vide. La colonne SPE est activée par l'ajout de 2 x 1 [mL] de méthanol pour HPLC, puis par l'ajout de 2 x 1 [mL] d'eau pour HPLC. 2 x 1 [mL] du tampon phosphate à pH 3 ou du tampon phosphate à pH 8, puis 1 [mL] de tampon phosphate à pH 3 ou du tampon phosphate à pH 8 sont ajoutés. Finalement, 100 [µL] d'une solution d'Irganox 415 (le standard interne) à 10 [µg/mL] sont ajoutés. La cartouche est laissée à sécher. Une fois sèche, le vide est coupé et un tube en verre propre est placé sous la cartouche. 1 [mL] de méthanol est ajouté dans la cartouche. Le système est mis sous vide. La cartouche est laissée à sécher. Une fois sèche, le vide est coupé. Le volume est ajusté à 1 [mL] avec du méthanol. Après agitation, la solution est injectée.

- Préparation du blanc NaCl 0.9% et insuline 1 [UI/mL] :

Des liners en teflon sont placés sur la valve de contrôle du débit de la SPE. Une cartouche Supelclean LC-18 est connectée sur le liner. Le système SPE est mis sous vide en allumant la pompe à vide. La colonne SPE est activée par l'ajout de 2 x 1 [mL] de méthanol pour HPLC, puis par l'ajout de 2 x 1 [mL] d'eau pour HPLC. 2 x 1 [mL] du tampon phosphate à pH 3, puis 1 [mL] de la solution d'insuline à 1 [UI/mL] ou du NaCl 0.9% sont ajoutés. Finalement, 100 [µL] d'une solution d'Irganox 415 (le standard interne) à 10 [µg/mL] sont ajoutés. La cartouche est laissée à sécher. Une fois sèche, le vide est coupé et un tube en verre propre est placé sous la cartouche. 1 [mL] de méthanol est ajouté dans la cartouche. Le système est mis sous vide. La cartouche est laissée à sécher. Une fois sèche, le vide est coupé. Le volume est ajusté à 1 [mL] avec du méthanol. Après agitation, la solution est injectée.

5.3.1.3. Essai de dégradation accélérée

Une solution standard, contenant le Butylhydroxytoluène, l'Antioxydant 425 et l'Irganox 415 est soumise à différentes conditions de dégradation :

- 1) **Dégradation à la chaleur** : Une solution contenant 5 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] de Butylhydroxytoluène, d'Antioxydant 425 et de l'Irganox 415 à 1 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] est préparée. Cette solution est placée à 80 [$^{\circ}\text{C}$] pendant 24 heures. La solution est ensuite injectée.
- 2) **Dégradation aux UVs** : Une solution contenant 5 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] de Butylhydroxytoluène, d'Antioxydant 425 et d'Irganox 415 à 1 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] est préparée. Cette solution est soumise aux UVs à 270 et à 365 [nm] pendant 24 heures. La solution est ensuite injectée.
- 3) **Dégradation à l'acide** : 50 [μL] d'une solution mère de Butylhydroxytoluène, d'Antioxydant 425 à 1000 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] et 10 [μL] d'Irganox 415 à 1000 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] sont mélangés avec 50 [μL] d'HCl 1 [M] dans un ballon jaugé. Après 3 heures, le pH est ajusté à 7 avec du NaOH 1 [M] (Ajout de 50 [μL] de NaOH 1 [M]). Le volume est complété à 10 [mL] avec du méthanol. La solution est ensuite injectée.
- 4) **Dégradation avec une base** : 50 [μL] d'une solution mère de Butylhydroxytoluène, d'Antioxydant 425 à 1000 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] et 10 [μL] d'Irganox 415 à 1000 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] sont mélangés avec 50 [μL] de NaOH 1 [M] dans un ballon jaugé. Après 3 heures, le pH est ajusté à 7 avec du HCl 1 [M] (Ajout de 50 [μL] d'HCl 1 [M]). Le volume est complété à 10 [mL] avec du méthanol. La solution est ensuite injectée.
- 5) **Oxydation du produit** : 50 [μL] d'une solution mère de Butylhydroxytoluène, d'Antioxydant 425 à 1000 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] et 10 [μL] d'Irganox 415 à 1000 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] sont mélangés avec 50 [μL] d' H_2O_2 3% dans un ballon jaugé. Après 3 heures, le volume est ajusté à 10 [mL] avec du méthanol.

Afin de pouvoir quantifier la dégradation en BHT et en Antioxydant 425 dans les différentes conditions, une solution standard contenant 5 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] d'Antioxydant 425 et de BHT et 1 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] d'Irganox 415 est préparée et injectée.

5.3.2. Standards d'étalonnage et de validation⁶⁹

La validité de la méthode est déterminée à l'aide des standards de validation. Le logiciel enoal est utilisé pour le traitement des données.

1) Préparation des standards d'étalonnage

Le standard interne d'injection doit tout d'abord être préparé. Pour ce faire, une solution mère d'Irganox 415, le standard interne d'injection, à 1 [mg/mL] est préparée selon le protocole ci-dessous :

Solution mère d'Irganox 415 : Dissoudre exactement **10.0 [mg]** d'Irganox 415 dans 10 [mL] de méthanol.

Une solution fille d'Irganox 415 à 100 [µg/mL] est ensuite préparée selon le protocole ci-dessous :

Solution fille d'Irganox 415 à 100 [µg/mL] : Prélever 1000 [µL] de la solution mère d'Irganox 415 et compléter à 10 [mL] avec du méthanol.

Deux solutions mères des substances d'intérêt (BHT, Antioxydant 425) sont ensuite préparées selon le protocole ci-dessous :

1) **Solution mère de Butylhydroxytoluène** : Dissoudre exactement **10.0 [mg]** de BHT dans 10 [mL] de méthanol.

2) **Solution mère d'Antioxydant 425** : Dissoudre exactement **10.0 [mg]** d'Antioxydant 425 dans 10 [mL] de méthanol.

Une solution fille contenant un mélange de BHT et d'Antioxydant 425 est ensuite préparée selon le protocole ci-dessous :

Solution fille d'Antioxydant 425 et de BHT à 100 [µg/mL] : Prélever 1000 [µL] de chaque solution mère et compléter à 10 [mL] avec du méthanol.

Les standards d'étalonnage sont ensuite préparés à partir de la solution fille à 100 [µg/mL] selon le schéma de dilution figurant dans le tableau ci-dessous :

Tableau 20 : Standards d'étalonnage

Standard d'étalonnage	Concentration du standard d'étalonnage [µg/mL]	Volume de solution fille de BHT et d'Antioxydant 425 [µL]	Concentration du standard interne d'injection [µg/mL]	Volume de la solution fille d'Irganox 415 [µL]	Volume diluant (Méthanol) [mL]
STD1	5.0	1000	1	200	Ad 20
STD2	2.0	400			
STD3	1.0	200			
STD4	0.5	100			
Blanc	1000 [µL] de méthanol + 200 [µL] de la solution fille d'Irganox 415 ad 20 [mL] de méthanol.				

Prélever 400 [µL] dans chaque ballon jaugé et les déposer dans un vial.

Les concentrations finales des standards d'étalonnage sont de 5 [µg/mL], 2 [µg/mL], 1 [µg/mL] et 0.5 [µg/mL]. La concentration finale du standard d'injection est de 1 [µg/mL]. Chaque solution standard est préparée **en duplicata** depuis la solution fille et est **injectée deux fois**. Trois séries indépendantes sont réalisées.

2) Préparation des standards de validation

Le standard interne d'injection doit tout d'abord être préparé. Pour ce faire, une solution mère d'Irganox 415, le standard interne d'injection, à 1 [mg/mL] est préparée selon le protocole ci-dessous :

Solution mère d'Irganox 415 : Dissoudre exactement **10.0 [mg]** d'Irganox 415 dans 10 [mL] de méthanol.

Une solution fille d'Irganox 415 à 100 [µg/mL] est ensuite préparée selon le protocole ci-dessous :

Solution fille d'Irganox 415 à 100 [µg/mL] : Prélever 1000 [µL] de la solution mère d'Irganox 415 et compléter à 10 [mL] avec du méthanol.

Deux solutions mères des substances d'intérêt (BHT, Antioxydant 425) sont ensuite préparées selon le protocole ci-dessous :

- 1) **Solution mère de Butylhydroxytoluène** : Dissoudre exactement **10.0 [mg]** de BHT dans 10 [mL] de méthanol.
- 2) **Solution mère d'Antioxydant 425** : Dissoudre exactement **10.0 [mg]** d'Antioxydant 425 dans 10 [mL] de méthanol.

Une solution fille contenant un mélange de BHT et d'Antioxydant 425 est ensuite préparée selon le protocole ci-dessous :

Solution fille d'Antioxydant 425 et de BHT à 100 [µg/mL] : Prélever 1000 [µL] de chaque solution mère et compléter à 10 [mL] avec du méthanol.

Les standards d'étalonnage sont ensuite préparés à partir de la solution fille à 100 [µg/mL] selon le schéma de dilution figurant dans le tableau ci-dessous :

Tableau 21 : Standards de validation

Standard de validation	Concentration du standard de validation [µg/mL]	Volume de solution fille de BHT et d'Antioxydant 425 à prélever [µL]	Concentration du standard interne d'injection [µg/mL]	Volume de la solution fille d'Irganox 415 à prélever [µL]	Volume diluant (Méthanol) [mL]
VLD1	5.0	1000	1	200	Ad 20
VLD2	2.0	400			
VLD3	1.0	200			
VLD4	0.5	100			
Blanc	1000 [µL] de méthanol + 200 [µL] de la solution fille d'Irganox 415 ad 20 [mL] de méthanol.				

Prélever 400 [µL] dans chaque ballon jaugé et les déposer dans un vial.

Les concentrations finales des standards de validation sont de 5 [µg/mL], 2 [µg/mL], 1 [µg/mL] et 0.5 [µg/mL]. La concentration finale du standard d'injection est de 1 [µg/mL]. Chaque solution standard est préparée **en triplicata** depuis la solution fille, puis est **injectée deux fois**. Trois séries indépendantes sont réalisées.

5.3.3. Linéarité⁶⁹

La linéarité de la méthode est évaluée à l'aide des standards de validation.

5.3.4. LOQ

Le LOQ correspond à la plus petite quantité de l'analyte pouvant être quantifiée. Il est déterminé par le rapport S/N. Ce rapport doit être supérieur ou égal à 10:1 pour 6 répétitions.²⁴

5.3.5. Stabilité

Une solution standard contenant 5 [$\mu\text{g/mL}$] de BHT et d'Antioxydant 425, ainsi qu'1 [$\mu\text{g/mL}$] d'Irganox 415 est préparée. Cette solution est injectée à t_0 , puis à $t_{24 \text{ heures}}$, $t_{48 \text{ heures}}$, $t_{72 \text{ heures}}$ et $t_{7 \text{ jours}}$ afin d'évaluer la stabilité du BHT, de l'Antioxydant 425 et de l'Irganox au cours du temps. Les concentrations obtenues doivent être comprises entre 90% et 110% pour être considérées comme acceptables.

5.4. Résultats et discussion

5.4.1. Spécificité

La spécificité a pour but d'assurer, selon le protocole SFSTP, que le composé détecté corresponde bien au composé recherché. Elle permet de démontrer la pureté du pic du composé d'intérêt, et ainsi de prouver l'absence d'interférences au niveau du pic du composé d'intérêt.⁶⁹

Les résultats suivants ont été obtenus pour la spécificité :

5.4.1.1. Pureté des pics

Les facteurs de pureté obtenus pour l'Antioxydant 425, le BHT et l'Irganox 415 sont de 993.713, 995.183 et de 991.115. Les résultats détaillés de la pureté des pics figurent en annexe XV.

Les facteurs de pureté obtenus pour les pics du BHT, de l'Antioxydant 425 et de l'Irganox 415 sont tous supérieurs à 990. Ainsi, les pics du BHT, de l'Irganox 415 et de l'Antioxydant 425 de l'échantillon testé sont purs.

5.4.1.2. Blanc

Les chromatogrammes des blancs préparés dans les différents milieux testés (tampon phosphate à pH 3 etc...) sont illustrés ci-dessous :

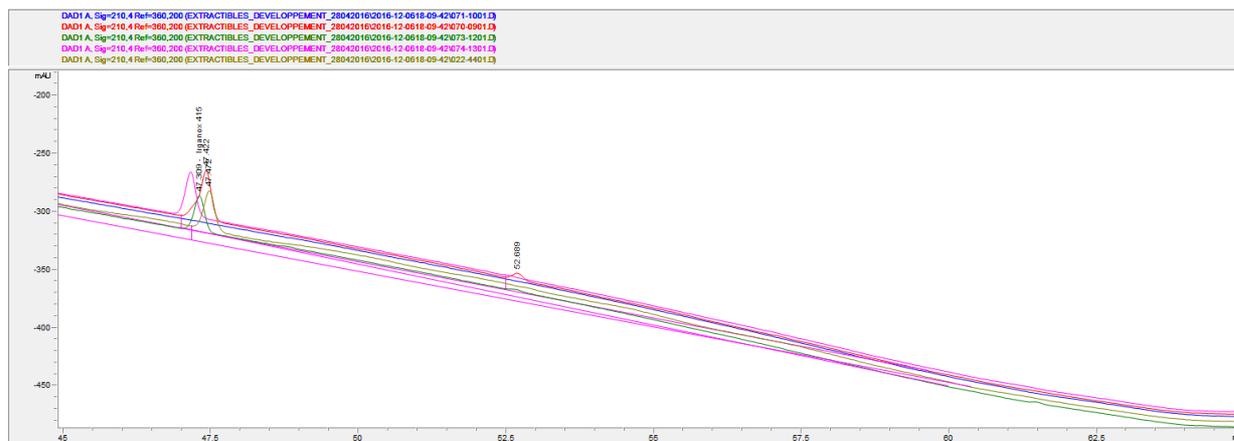


Figure 9 : Chromatogrammes des blancs préparés dans les différents milieux

Aucun pic figurant sur les chromatogrammes des blancs n'interfère avec les pics du BHT et de l'Antioxydant 425. Cela signifie qu'aucune substance provenant du matériel et/ou des produits utilisés pour effectuer l'extraction par SPE n'interfère avec les pics des composés d'intérêt.

5.4.1.3. Essai de dégradation

Les résultats obtenus pour les essais de dégradation figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 22 : Résultats

Essai de dégradation	BHT			Antioxydant 425		
	C_{BHT} moyenne [µg/mL]	C_{solution} standard moyenne [µg/mL]	Recouvrement en [%]	C_{A425} moyenne [µg/mL]	C_{solution} standard moyenne [µg/mL]	Recouvrement en [%]
Effet de l'acide	5.05	5.07	99.68%	5.00	4.97	100.63%
Effet d'une base	0.33		6.46%	5.01		100.92%
Effet de la chaleur	4.91		96.99%	4.93		99.27%
Effet des UVs	5.00		98.76%	4.94		99.48%
Effet de l'H ₂ O ₂	5.06		99.87%	4.94		99.48%

Les résultats détaillés figurent en annexe XVI.

L'essai de dégradation met en évidence le fait que l'Antioxydant 425 est stable dans toutes les conditions de dégradation testées. En effet, tous les recouvrements obtenus pour ces essais sont compris entre 99.27% et 100.92%.

Le BHT, par contre, est fortement dégradé en solution basique. Une perte supérieure à 90% en BHT a été observée en cas d'exposition du BHT à une base forte. La prévalidation a permis de mettre en évidence que le milieu d'extraction utilisé n'avait pas d'influence sur le rendement d'extraction. Cela signifie qu'il n'y a pas de dégradation marquée du BHT lorsqu'il est dilué dans une solution tampon phosphate à pH 8. Dans les autres conditions de dégradation testées, les recouvrements du BHT sont tous compris entre 96.99% et 99.87%. Il peut donc être considéré comme stable.

5.4.2. Standards d'étalonnage et de validation

Le logiciel e-noval a été utilisé pour la validation de la méthode. Le rapport détaillé pour le BHT figure en annexe XVII et pour l'Antioxydant 425 en annexe XVIII. Les rapports d'aires et de concentrations introduits dans le logiciel e-noval pour le BHT se trouvent en annexe XIX et en annexe XX pour l'Antioxydant 425. La validation du BHT et de l'Antioxydant 425 a été calculée sur 3 séries et 3 niveaux de concentrations selon un modèle de régression linéaire. Les aires obtenues pour le 4^{ème} niveau de concentration étaient inférieures au seuil de quantification de la méthode. Des variations trop importantes des rapports d'aires étaient observées pour ce niveau de concentration, c'est pourquoi il a été retiré.

Les profils d'exactitude et de risque ci-dessous ont été obtenus pour le BHT :

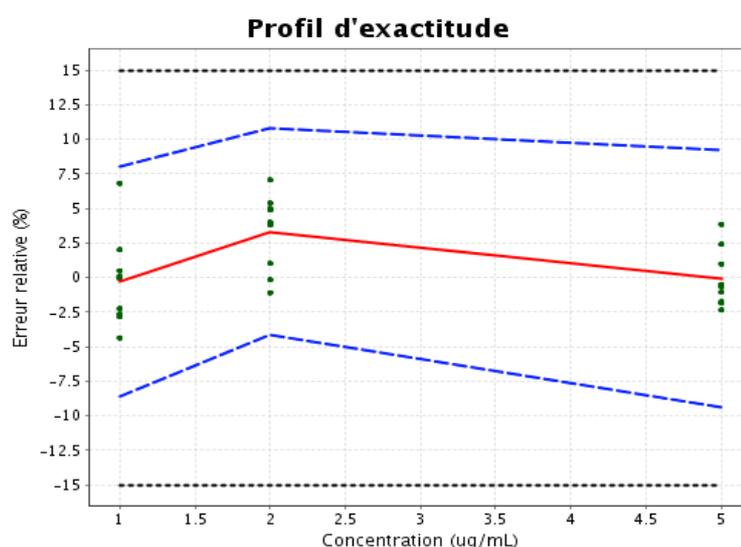


Figure 10 : Profil d'exactitude du BHT

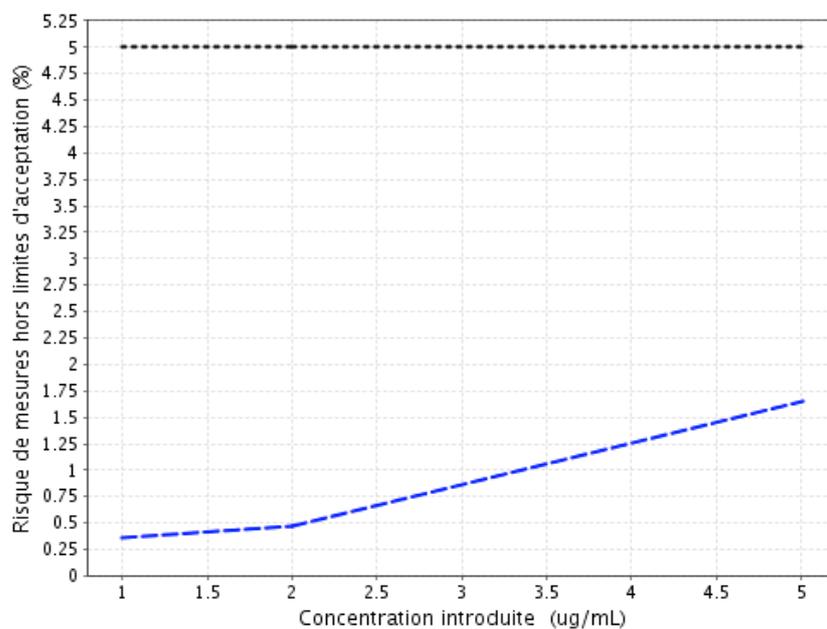


Figure 11 : Profil de risque du BHT

Les profils d'exactitude et de risque, ci-dessous ont été obtenus pour l'Antioxydant 425 :

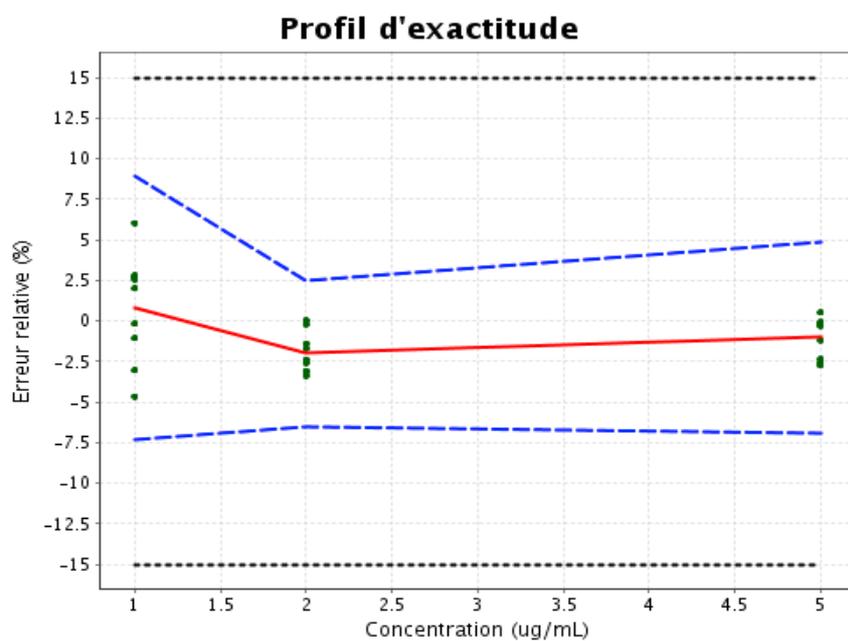


Figure 12 : Profil d'exactitude de l'Antioxydant 425

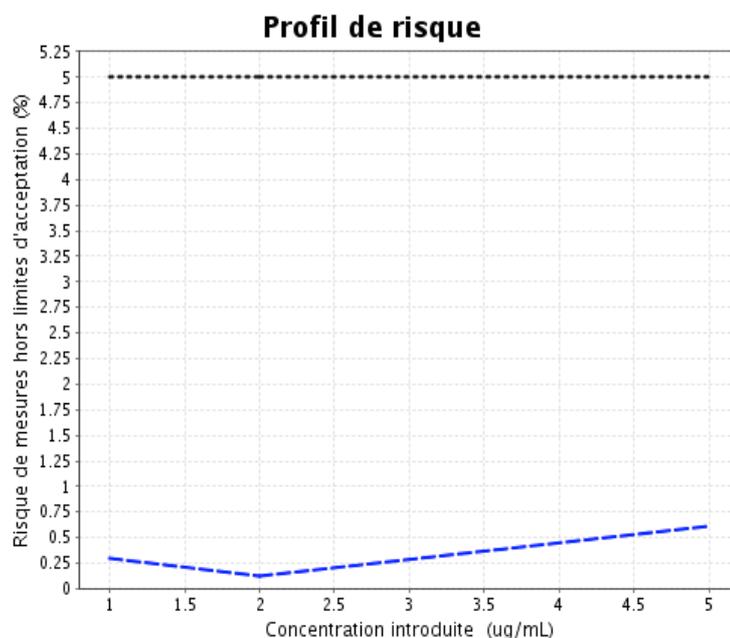


Figure 13 : Profil de risque de l'Antioxydant 425

La justesse se définit, selon le protocole SFSTP, « comme l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée « valeur conventionnellement vraie » »⁶⁹. Le recouvrement devrait se situer dans un intervalle de tolérance compris entre 70 et 130% pour des substances présentes à l'état de traces pour être considéré comme valide.^{24,69}

Les profils d'exactitude obtenus pour le BHT et l'Antioxydant 425 démontrent la validité de la méthode. En effet, la dispersion des valeurs autour de la valeur considérée comme vraie est faible. L'ensemble des rapports d'aires obtenus figurent dans l'intervalle de tolérance fixé de 15%. Selon les profils de risque obtenus pour le BHT et l'Antioxydant 425, il y a moins de 5% de risque qu'une valeur ne soit pas comprise dans les limites d'acceptation pour la gamme de concentration de 1 à 5 [µg/mL]. Ainsi, la méthode développée pour l'analyse du BHT et de l'Antioxydant 425 peut être considérée comme valide dans la gamme de concentration de 1 à 5 [µg/mL] en BHT et en Antioxydant 425.

5.4.3. LOQ

Le LOQ de la méthode a été calculé à 1.001 [µg/mL] pour le BHT et à 1.000 [µg/mL] pour l'Antioxydant 425. Le LOQ calculé sur la base de l'AET ne peut être atteint avec la méthode actuelle. La sensibilité du détecteur DAD n'est pas suffisante pour atteindre de tels niveaux de concentration. Un détecteur plus sensible, tel qu'un spectromètre de masse, devrait être utilisé pour permettre d'atteindre le LOQ de 0.04 [ppm].

5.4.4. Stabilité

Les résultats obtenus pour la stabilité de l'Antioxydant 425 et du BHT au cours du temps sont illustrés sur le schéma ci-dessous :

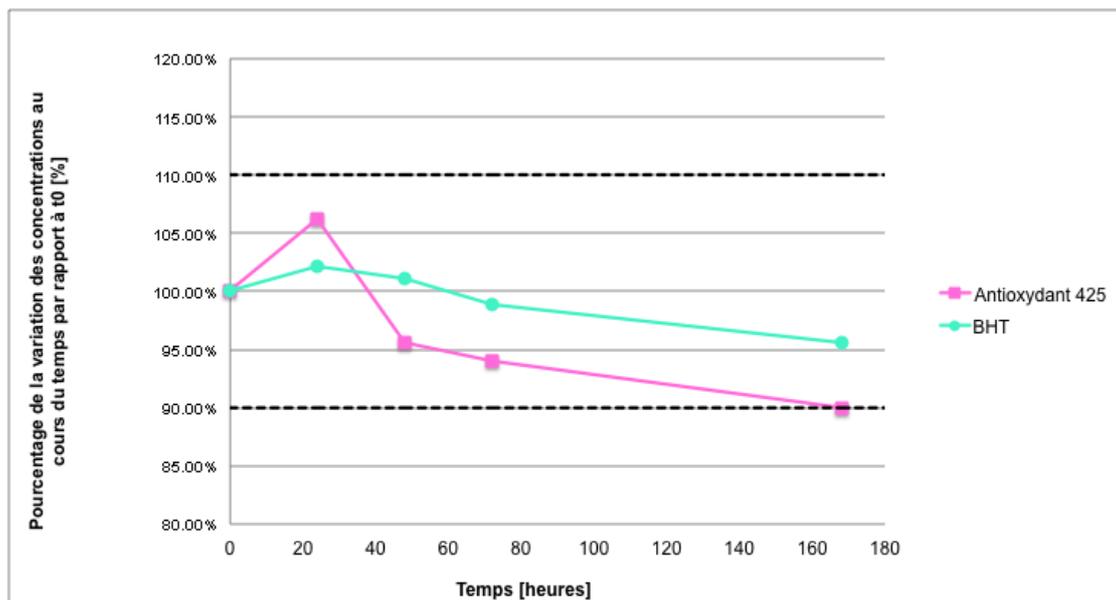


Figure 14 : Stabilité du BHT et de l'Antioxydant 425 au cours du temps

Les résultats détaillés figurent en annexe XXI.

Vu que la durée d'une série complète de validation est de trois jours, une durée de stabilité des échantillons d'au moins 3 jours est nécessaire. Les solutions de BHT et d'Antioxydant 425 peuvent être considérées comme stables à température ambiante pendant une durée d'au moins 7 jours, car les valeurs de pourcentage obtenues sont toutes comprises dans l'intervalle fixé de $\pm 10\%$.

5.5. Conclusions

Ainsi, la méthode d'analyse permettant le dosage du BHT et de l'Antioxydant 425 par HPLC/UV-DAD a été validée pour les gammes de concentration en Antioxydant 425 et en BHT de 1 à 5 $[\mu\text{g}/\text{mL}]$. Le BHT et l'Antioxydant 425 contenus dans les échantillons peuvent donc être dosés de manière fiable et reproductible avec cette méthode. Afin de pouvoir augmenter la sensibilité de la détection, le recours à un détecteur plus sensible, tel qu'un spectromètre de masse devrait être envisagé.

6. Développement d'une méthode de préparation d'échantillons et de dosage pour l'analyse de l'acide caprylique et de l'acide myristique par GC/MS

6.1. Introduction

Le recours à des techniques analytiques orthogonales est essentiel pour mener à bien une étude sur les substances L/E. En effet, les substances L/E peuvent avoir des structures physico-chimiques très variées et ainsi, ne peuvent pas être analysées sur tous les équipements. Dans le cas présent, il a été choisi d'analyser l'acide myristique et l'acide caprylique par GC/MS suite à une réaction de dérivation, en raison de l'absence de chromophores sur ces molécules, ce qui les rend indétectables en UV-DAD. Il est vrai que des méthodes d'analyse par HPLC/UV-DAD de l'acide caprylique et de l'acide myristique suite à une réaction de dérivation peuvent être retrouvées dans la littérature. Ces méthodes auraient pu être utilisées dans le cas présent.⁷⁰

Cependant, comme déjà mentionné dans le chapitre 4.4.2.1, *Jenke D.* a développé une méthode LLE permettant l'extraction de certains acides gras, dont l'acide myristique, contenus dans différents matériaux couramment utilisés en pharmacie. Dans cet article, la quantification de l'acide myristique est réalisée par GC/MS, à l'aide de deux standards internes, le Bisphénol M et l'Irganox 415, suite à une dérivation avec du BSTFA/TMCS 99 :1. Etant donné que le protocole d'extraction LLE développé par *Jenke D.* a déjà été testé pour l'extraction du BHT et de l'Antioxydant 425 par HPLC/UV-DAD dans la première partie de notre étude, il a été décidé d'analyser l'acide myristique et l'acide caprylique sur la base de cette même méthode, car le matériel et les produits nécessaires étaient déjà à disposition.²¹

6.2. Matériel et produits

Le tableau ci-dessous résume la liste du matériel employé pour cette étude :

Tableau 23 : Liste du matériel employé

Matériel	n° de lot	Fournisseur	Référence fournisseur	Pays
Seringues BD Perfusion®	1603204P	BD	300136	Irlande
Bouchons mâle/femelle Combi Lock stériles	L87254-1	Codan Medical AG Division Homedica	16/5280	Allemagne
ZB-5MS, 20 [m] × 0.18 [mm] id, 0.18 [µm] film thickness	252824	Phenomenex	7FD-G002-08	USA
Vials 2 [mL] ambrés	GTG015111226	GTG GmbH	8002-CV-D	Suisse
Bouchon pour vials en caoutchouc et PTFE	1114-331	Infochroma AG	G003-ACY-Ru/TE	Allemagne
Filtre GH Polypro 0.45 [mm], diam. 47 [mm]	T307771	Pall	66548	Mexique
Filtre Whatman, diam. 125 [mm]	69969344	Whatman	10314744	Allemagne
Bandelettes pH McolorpHast	H0697426	Merck	1.09535.0001	Allemagne

Le tableau ci-dessous résume la liste des produits employés pour cette étude :

Tableau 24 : Liste des produits employés

Produit	n° de lot	Fournisseur	Référence fournisseur	Pays
Isopropanol (=2-propanol)	K47208640544	Merck	1.01040.2500	Allemagne
Sodium phosphate dibasique dihydraté (=Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O)	K46477153603	Merck	1.19753.0250	Allemagne
Eau pour HPLC	Z0366633605	Merck	1.15333.2500	Allemagne
	Z0375533610			
Dichlorométhane pour HPLC	K47623144610	Merck	1.060442500	Allemagne
Méthanol	I780018518	Merck	1.06018.2500	Allemagne
	I803918518			
n-Hexane pour HPLC	16D060882	VWR	83992.320	Belgique
Sodium sulfate anhydre	AM0876649604	Merck	1.06649.0500	Allemagne
Acide chlorhydrique 5 [M]	HC44262011	Merck	1.09911.0001	Allemagne
Sodium hydroxyde 5 [M]	HC54854813	Merck	1.09137.1000	Allemagne
Bisphénol M (CAS : 13595-25-0)	BCBN1490V	Sigma	23454	Japon
Acide myristique	CC0613V	Sigma	490873	Allemagne
Irganox 415 (CAS : 96-69-5)	20160109	Chemos	132912	Allemagne
Acide caprylique	TP1168V	Sigma	296457	Allemagne
Acide myristique D27	BCBR5799V	Sigma	68698	USA
Diméthylformamide pour HPLC	BCBR1134V	Sigma	101673993	Allemagne
N,O-bis(triméthylsilyl)-trifluoro-acétamide (BSTFA) containing 1% triméthylchlorosilane (TMCS)	BCBQ7235V	Sigma	T6381	Allemagne
Acétone pour GC/MS	I842958632	Merck	1.00658.1000	Allemagne
Toluène pour GC/MS	I845649631	Merck	1.00849.1000	Allemagne

6.3. Appareils et équipements

Le tableau ci-dessous résume la liste des appareils et équipements employés pour cette étude :

Tableau 25 : Liste des appareils et équipements

Appareil	Numéro de série	Fabricant	Pays
Balance de précision Mettler Toledo AX 504	112 1091337	Mettler Toledo	USA
Balance standard Mettler PG 1003 S	1125020066	Mettler Toledo	USA
Bain à ultrasons B5200 Branson	C-120/86	Branson	USA
Etuve (EP), Memmert ULP 400	G401.0246	Memmert	Allemagne
Etuve (EP) Runmed 4101	0412/07	Rumed	Allemagne
Rotavapeur RC-900	7441655	KNF	Suisse
Varian CP-3800 + quadropole MS 1200 L	00480	Varian	USA
Vortex	0100	VWR	USA

6.4. Méthode

6.4.1. Méthode initiale de préparation d'échantillons par LLE^{21,71}

Comme expliqué précédemment, la méthode d'extraction liquide-liquide proposée par *Jenke D.* est utilisée comme méthode de préparation d'échantillons initiale (Annexe VII).^{21,71}

La méthode de *Jenke D.* a été mise en place pour l'étude de toutes les substances L/E contenues dans les différents matériaux pharmaceutiques testés. Le choix des standards internes et des conditions d'analyse découlaient de cet objectif.

Dans le cadre de notre étude, seuls l'acide myristique et l'acide caprylique sont extraits par cette méthode. La méthode va être optimisée afin de la rendre applicable à l'extraction de l'acide myristique et de l'acide caprylique.

6.4.1.1. Méthode d'extraction

6.4.1.1.1. Standards internes

Les mêmes standards internes que ceux décrits dans le chapitre 4.4.2.1.1. ont été choisis. En plus des propriétés décrites précédemment, ces standards peuvent être dérivatisés avec le BTSFA/TMCS 99 :1. Cela permet d'augmenter leur volatilité et ainsi de les rendre détectables en GC/MS.²¹

Dans le cadre de l'étude des substances L/E de la solution d'insuline à 1 [UI/mL], la solution standard de Bisphénol M est préparée à une concentration de 1 [µg/mL] dans du méthanol. La solution d'Irganox 415 est préparée à une concentration de 1 [µg/mL] dans du méthanol. Aucune donnée sur la stabilité de ces solutions n'a été retrouvée dans la littérature.

La méthode d'extraction liquide-liquide est la suivante²¹ :

50 [mL] de l'échantillon sont déversés dans une ampoule à décanter. 1000 [µL] de la solution standard de Bisphénol M à 1 [µg/mL] y sont ajoutés. Le pH de la solution est ajusté à 3 avec de l'HCl 5 [N]. 25 [mL] de dichlorométhane y sont ajoutés. Après agitation pendant 1 minute, la phase organique est récoltée et une nouvelle extraction est réalisée à l'aide de 25 [mL] de dichlorométhane. Le pH de la phase aqueuse est ensuite ajusté à 8 avec du NaOH 5 [N]. Deux nouvelles extractions successives sont réalisées suite à l'ajout de 2x 25 [mL] de dichlorométhane. Les phases organiques sont ensuite rassemblées dans un ballon de 200 [mL]. Une spatule de sodium sulfate anhydre est ajoutée et la solution est filtrée à l'aide d'un filtre Whatman diam. 125 [mm]. Le solvant est ensuite évaporé à sec. L'échantillon est repris avec 1 [mL] de méthanol. 500 [µL] de cette solution sont prélevés et déposés dans un vial ambré. 500 [µL] de la solution standard d'Irganox 415 à 1 [µg/mL] sont ajoutés (Concentration finale de l'Irganox 415 et du Bisphénol M : 0.5 [µg/mL]). La solution est ensuite dérivatisée.²¹

6.4.1.2. Réaction de dérivatisation

La faible volatilité de l'acide myristique et de l'acide caprylique ne permettent pas, de manière générale, une analyse par injection directe en chromatographie gazeuse. Certains articles relatent la possibilité d'analyser les acides gras par injection GC directe grâce à l'utilisation de colonnes particulières composées de polyéthylène glycol lié à de l'acide 2-nitrotéréphtalique, mais il s'agit d'exceptions.⁴⁶ Plus fréquemment, les acides gras sont dérivatisés avant injection.

Il existe plusieurs réactions de dérivatisation permettant d'augmenter la volatilité de l'acide myristique et l'acide caprylique. Les réactions les plus connues sont la méthode FAME et la silylation.⁷²

Le but de la méthode FAME est de provoquer une estérification des acides gras en présence d'un alcool et d'un catalyseur (le BCl₃) comme illustré ci-dessous⁷³ :

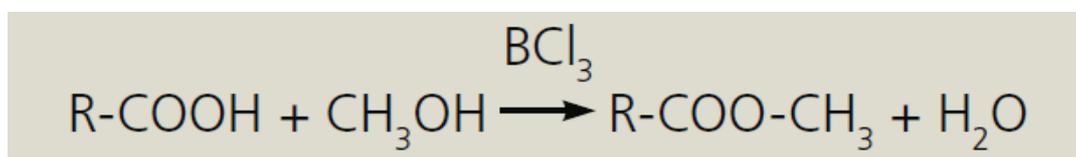


Figure 15 : Méthode FAME

La volatilité des acides gras est ainsi augmentée suite à l'estérification.

La silylation consiste en l'ajout d'un groupement silyl au niveau du groupement –OH de l'acide gras. L'agent de dérivation le plus couramment employé pour les réactions de dérivation de type silylation est le BSTFA (N,N-bis-(triméthyl-silyl)trifluoro-acétamide).⁷² Du TMCS est parfois ajouté au BSTFA afin de catalyser la réaction, notamment pour les composés dont l'encombrement stérique peut être important (pour les alcools secondaires par exemple).⁷²

La réaction de silylation est illustrée ci-dessous⁷² :

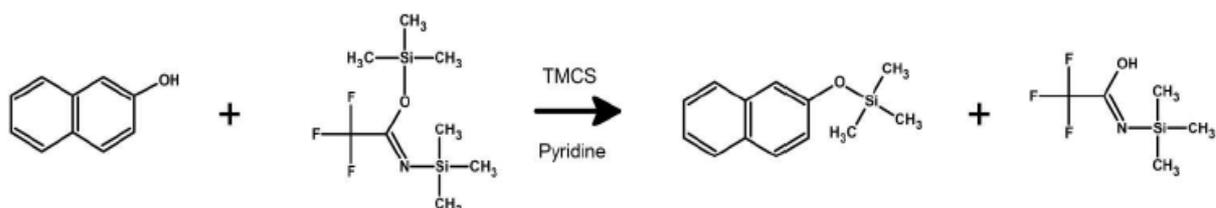


Figure 16 : Réaction de silylation

Le rendement de la réaction de dérivation peut être amélioré par l'ajout d'un catalyseur tel que le Diméthylformamide ou la Pyridine, ainsi que par l'augmentation de la température.⁷²

Dans le cadre de cette étude, si l'on se base sur la méthode de préparation d'échantillons proposé par *Jenke D.*, l'acide myristique et l'acide caprylique sont dérivatisés par silylation selon le protocole initial suivant : 100 [µL] de diméthylformamide sont ajoutés à l'échantillon. L'échantillon est vortexé. Ce dernier est ensuite évaporé à sec à l'aide d'un gaz neutre (N₂). Une fois que la totalité de l'échantillon s'est évaporée, 100 [µL] de BSTFA : TMCS (99 :1) sont ajoutés. L'échantillon est vortexé. Le vial est ensuite scellé, puis placé à l'étuve à 70 [°C] pendant 1 heure. 900 [µL] d'hexane sont ajoutés. L'échantillon est vortexé, puis il est injecté.²¹

La méthode de dérivation développée par *Jenke D.* n'est pas propre au dosage de l'acide myristique et l'acide caprylique. Elle s'applique à l'ensemble des substances L/E contenues dans les matériaux évalués. Différentes conditions de dérivation de l'acide caprylique et de l'acide myristique (choix du catalyseur, élévation de la température...) vont être testées afin d'obtenir les conditions de dérivation les plus optimales pour le dosage de l'acide caprylique et de l'acide myristique.

6.4.1.3. Rendement d'extraction

Afin d'évaluer la performance de l'extraction liquide/liquide pour l'acide caprylique, l'acide myristique et le Bisphénol M, cinq extractions successives d'un échantillon de 50 [mL] d'eau pour HPLC spikés avec une solution contenant 1 [µg/mL] d'acide myristique, de Bisphénol M, d'acide caprylique (= Solution standard 1) sont réalisées selon la méthode d'extraction LLE décrite dans le chapitre 6.4.1.1. Méthode d'extraction. Les échantillons sont ensuite dérivatisés et analysés par la méthode d'analyse GC/MS.

Afin de pouvoir calculer le rendement exact, la solution standard 1 « pure » doit être dérivatisée et injectée. Pour ce faire, 500 [µL] de la solution standard 1 sont prélevés et déposés dans un vial. Après adjonction de 500 [µL] d'une solution du standard interne d'injection, l'Irganox 415, à 1 [µg/mL], la solution est dérivatisée et analysée par la méthode d'analyse GC/MS.

La concentration finale de l'acide myristique, de l'acide caprylique, du Bisphénol M et de l'Irganox 415 est de 0.5 [µg/mL].

6.4.2. Méthode initiale d'analyse par GC/MS

Plusieurs méthodes d'analyse des acides gras, dont l'acide myristique et l'acide caprylique, ont été retrouvées dans la littérature.^{20, 21, 46-49} Certaines de ces méthodes sont appliquées au dosage de l'acide myristique et de l'acide caprylique extraits de différents matériaux plastiques.^{20, 21} La méthode d'analyse publiée par des auteurs membres du PQRI, tels que *Jenke D.* ou *Norwood D.* en est un exemple.^{20, 21} Cette méthode est adaptée pour l'étude des substances extractibles issues de différents matériaux pharmaceutiques couramment employés tels que le COC, le LDPE ou le PVC.^{20, 21}

Cette méthode a d'ailleurs été reprise comme méthode de référence par la Pharmacopée américaine dans la monographie « USP <1663> : Etude des extractibles associés aux contenants pharmaceutiques et aux dispositifs d'administration de médicaments »⁹, comme illustré dans le tableau ci-dessous :

Tableau 26 : Conditions d'analyse GC/FID-MS selon USP

Colonne	J&W DB-5HT, 30 [m] × 0.25 [mm], 0.25 [µm] film thickness
Température du four à colonne	Débuter à 50 [°C], maintenir cette température pendant 1 [min]; augmenter ensuite de 12 [°C/min] jusqu'à 315 [°C], maintenir cette température pendant 16 minutes
Gaz vecteur	He à 1.2 [mL/min]
Injection	Split (1:5); 1 [µL]
Température de l'injecteur	300 [°C]
Température détecteur FID	N/A
Température de la ligne de transfert MS	180 [°C]
Détecteur MS	70 eV (+) EI, rapport m/z de 33–650 amu (3.0 [min] de délai d'acquisition)
Préparation échantillon	Dérivatisation TMS

Selon cette méthode, le temps de rétention de l'acide myristique et de l'acide caprylique est d'environ 16 minutes. Il a été décidé d'utiliser la méthode de la Pharmacopée américaine dans le cadre de cette étude et de l'optimiser si nécessaire.

6.4.3. Méthode de rinçage de l'injecteur

La seringue de l'injecteur de la GC/MS est rincée, avant l'analyse, avec trois fois 5 [µL] d'iso-octane. Après l'analyse, elle est rincée avec trois fois 5 [µL] d'iso-octane.

6.5. Résultats et discussion

6.5.1. Optimisation de la méthode de préparation d'échantillons

6.5.1.1. Optimisation de la réaction de dérivation

Selon la littérature, il est possible d'agir principalement sur trois paramètres pour améliorer la réaction de dérivation : la température d'incubation, la durée d'incubation et l'ajout d'un catalyseur.^{72,74} En se basant sur ces paramètres, plusieurs conditions différentes de la réaction de dérivation ont été testées sur quatre solutions standard indépendantes contenant 0.5 [$\mu\text{g/mL}$] d'acide caprylique et d'acide myristique et 0.5 [$\mu\text{g/mL}$] du standard interne d'injection :

Tableau 27 : Conditions de dérivation testées

Conditions de dérivation	Température d'incubation [°C]	Temps d'incubation [min]	Catalyseur
Conditions initiales	70	60	DMF
Conditions 1	70	30	DMF
Conditions 2	70	30	Pyridine
Conditions 3	120	30	DMF

Les rapports d'aires moyens ci-dessous ont été obtenus pour les échantillons d'acide caprylique et d'acide myristique préparés dans les différentes conditions de dérivation :

Tableau 28 : Résultats

Acide caprylique	Rapport Aire Acide caprylique			
	Conditions initiales (70 [°C], 60 [min], DMF)	Conditions 1 (70 [°C], 30 [min], DMF)	Conditions 2 (70 [°C], 30 [min], Pyridine)	Conditions 3 (120 [°C], 30 [min], DMF)
Moyenne [$\mu\text{g/mL}$] \pm IC ₉₅	2.54 \pm 0.45	2.76 \pm 0.08	2.27 \pm 0.49	2.68 \pm 0.27
Ecart-type	0.15	0.03	0.16	0.09
CV [%]	5.83%	0.93%	7.04%	3.34%
Acide myristique	Rapport Aire Acide myristique			
	Conditions initiales (70 [°C], 60 [min], DMF)	Conditions 1 (70 [°C], 30 [min], DMF)	Conditions 2 (70 [°C], 30 [min], Pyridine)	Conditions 3 (120 [°C], 30 [min], DMF)
Moyenne [$\mu\text{g/mL}$] \pm IC ₉₅	0.83 \pm 0.11	0.83 \pm 0.04	0.91 \pm 0.29	1.14 \pm 0.09
Ecart-type	0.04	0.02	0.12	0.04
CV [%]	4.34%	1.86%	13.05%	3.30%

Les résultats détaillés figurent en annexe XXII.

Selon les tests statistiques réalisés en annexe XXIII, il a été démontré que les résultats obtenus pour les échantillons dérivatisés dans les conditions initiales ne sont pas significativement différents des résultats obtenus dans les conditions de dérivatisation 1. ($t_{\text{théorique}} (= 2.78)$ est supérieur au $t_{\text{observé}} (= 2.59)$ pour l'acide caprylique et $t_{\text{théorique}} (= 2.78)$ est supérieur au $t_{\text{observé}} (= 0.42)$ pour l'acide myristique).

Les tests statistiques permettent aussi de mettre en évidence que les résultats obtenus pour les échantillons dérivatisés dans les conditions de dérivatisation 1 (70 [°C], 30 [min], DMF) ne sont pas significativement différents pour l'acide myristique, des résultats obtenus dans les conditions de dérivatisation 2 (70 [°C], 30 [min], Pyridine) ($t_{\text{théorique}} (= 2.78)$ est supérieur au $t_{\text{observé}} (= 1.03)$). Par contre, ils le sont pour l'acide caprylique, car le $t_{\text{théorique}} (= 2.78)$ est inférieur au $t_{\text{observé}} (= 5.27)$.

Finalement, l'analyse statistique réalisée entre les résultats des échantillons dérivatisés dans les conditions de dérivatisation 2 (70 [°C], 30 [min], Pyridine) et ceux dérivatisés dans les conditions de dérivatisation 3 (120 [°C], 30 [min], DMF) sont significativement différents. ($t_{\text{théorique}} (= 2.78)$ est inférieur au $t_{\text{observé}} (= 3.84)$ pour l'acide caprylique et $t_{\text{théorique}} (= 2.78)$ est inférieur au $t_{\text{observé}} (= 3.29)$ pour l'acide myristique).

Selon les analyses statistiques, les résultats obtenus pour les échantillons préparés dans les conditions de dérivatisation 3, c'est-à-dire à une température de 120 [°C] pendant 30 minutes et en utilisant du DMF comme catalyseur, ont donné les résultats les plus optimaux. En effet, les rapports d'aires obtenus dans ces conditions de dérivatisation sont significativement supérieurs à ceux obtenus dans les autres conditions de dérivatisation. Une bonne répétabilité des résultats a été observée dans les conditions de dérivatisation 3, car le coefficient de variation est inférieur à 5%. Les conditions de dérivatisation 3 (120 [°C], 30 minutes, DMF) ont donc été retenues pour la suite de cette étude.

Il est important de souligner que la réaction de dérivatisation doit être réalisée dans chaque vial indépendamment. En effet, lors de la dilution en plusieurs solutions standard de niveaux de concentration différents d'une solution mère préalablement dérivatisée, plus aucun pic n'a été observé lors de l'analyse par chromatographie gazeuse. La réaction de dérivatisation est probablement réversible : lors de la dilution de la solution, la concentration en catalyseur est diminuée, ce qui induit une inversion de la réaction.

6.5.1.2. Rendement d'extraction

Les concentrations obtenues pour les échantillons extraits et spikés avec une solution standard contenant 1 [µg/mL] d'acide myristique et d'acide caprylique figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 29 : Résultats

	C _{Acide caprylique} [µg/mL]	C _{Acide myristique} [µg/mL]	C _{Bisphénol M} [µg/mL]
Moyenne ± IC ₉₅	0.37 ± 0.08	0.66 ± 0.03	0.20 ± 0.10
Ecart-type	0.05	0.02	0.06
CV [%]	13.10%	3.02%	30.41%
Rendement	55.64%	100.36%	38.97%

La concentration finale attendue en acide caprylique, en acide myristique et en Bisphénol M est de 0.5 [µg/mL]. Les résultats détaillés figurent en annexe XXIV.

Un très bon rendement d'extraction a été obtenu pour l'acide myristique (100.4%). Par contre, un faible rendement a été obtenu pour l'acide caprylique (55.6%) et le Bisphénol M (39.0%). De plus, une forte variation a été observée au niveau du rendement d'extraction de l'acide caprylique et du Bisphénol M : les CVs sont nettement supérieurs à 10%. Suite à ces résultats, le standard interne d'injection, l'Irganox 415, a été changé.

L'Irganox 415 avait été choisi, comme standard interne, par *Jenke D.* notamment en raison de l'absence d'interférences de ce composé avec les substances L/E recherchées et en raison de sa détectabilité en GC/MS et en HPLC/UV-DAD.²¹ Dans le cas présent, seuls l'acide myristique et l'acide caprylique sont dosés. Les chromatogrammes obtenus sont donc moins complexes. L'Irganox ne semble plus être un standard interne adéquat.

En effet, l'Irganox 415 a une structure chimique très différente de l'acide myristique et de l'acide caprylique. Il ne simule pas le comportement de l'acide myristique et de l'acide caprylique correctement. Il possède un temps de rétention de 22.30 [min], ce qui est très éloigné des temps de rétention de l'acide caprylique ($t_R = 3.56$ [min]) et de l'acide myristique ($t_R = 9.45$ [min]). Sa réponse au réactif de dérivation est moins bonne en raison de l'encombrement stérique plus important. Ainsi, l'Irganox 415 n'est pas un standard interne adéquat pour l'analyse de l'acide myristique et de l'acide caprylique.

Un autre standard interne d'injection a été choisi. Il s'agit de l'acide myristique D27, illustré ci-dessous :

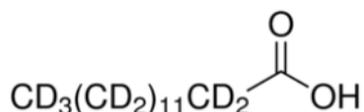


Figure 17 : Acide myristique D27⁷⁵

Il possède une structure proche des composés d'intérêt, l'acide myristique et l'acide caprylique. Sa réponse au réactif de dérivatisation est similaire à celle de l'acide caprylique et de l'acide myristique en raison de la similarité de structure. Il est soluble dans l'hexane. Une bonne séparation de l'acide myristique D27 des composés d'intérêt est observée sur les chromatogrammes.

Aux vues des mauvais rendements d'extraction obtenus avec le Bisphénol M, ce dernier n'est plus utilisé comme standard interne pour évaluer la performance de l'extraction liquide-liquide de l'acide myristique et de l'acide caprylique. En effet, il possède une structure trop différente de celles de l'acide myristique et de l'acide caprylique et est plus lipophile. Il ne peut pas simuler correctement la performance de la préparation d'échantillons pour l'acide myristique et l'acide caprylique. De plus, la réponse du Bisphénol M au réactif de dérivatisation est probablement différente de celle des composés d'intérêt en raison de l'encombrement stérique plus important. C'est pourquoi, il a été retiré de la méthode de préparation d'échantillons.

Etant donné les faibles rendements obtenus pour le Bisphénol M et pour l'acide caprylique, un nouvel essai a été réalisé en remplaçant le standard interne d'injection, l'Irganox 415, par l'acide myristique D27 et en retirant le Bisphénol M de la préparation d'échantillons. Avec ces nouvelles conditions, trois extractions LLE de 50 [mL] d'eau pour HPLC spikés avec une solution standard contenant 1 [µg/mL] d'acide myristique et d'acide caprylique ont été réalisées. Les résultats obtenus figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 30 : Résultats

	C _{Acide caprylique} [µg/mL]	C _{Acide myristique} [µg/mL]
Moyenne ± IC₉₅	0.60 ± 0.14	0.66 ± 0.11
Ecart-type	0.06	0.05
CV [%]	9.12%	6.83%
Rendement [%]	93.51%	96.91%

La concentration finale attendue en acide caprylique et en acide myristique est de 0.5 [µg/mL]. Les résultats détaillés figurent en annexe XXV.

Les résultats obtenus suite à l'extraction de trois solutions spikées avec de l'acide myristique et de l'acide caprylique à 1 [µg/mL] et en utilisant l'acide myristique D27 comme standard interne d'injection sont satisfaisants. En effet, des rendements de 93.91% pour l'acide caprylique et de 96.91% pour l'acide myristique ont été obtenus. La variation des aires obtenues est bien corrigée par le standard interne, car les coefficients de variation obtenus sont inférieurs à 10% pour l'acide myristique et l'acide caprylique.

Ainsi, les rendements d'extraction obtenus démontrent la performance de la méthode d'extraction liquide-liquide, car les rendements d'extraction de l'acide caprylique et de l'acide myristique sont supérieurs à 90% . Cette méthode peut donc être utilisée pour la préparation des échantillons.

6.5.2. Optimisation de la méthode d'analyse par GC/MS

La méthode d'analyse a été optimisée suite au changement du standard interne d'injection de l'Irganox 415 à l'acide myristique D27.

Une colonne analytique proposée par la Pharmacopée Américaine, J&W DB-5HT (30 [m] × 0.25 [mm] i.d., 0.25 [µm] film thickness) a été remplacée par la colonne ZB-5MS (20 [m] × 0.18 [mm] i.d., 0.18 [µm] film thickness). La polarité de la colonne ZB-5MS (20 [m] × 0.18 [mm] i.d., 0.18 [µm] film thickness) est similaire à celle de la colonne J&W DB-5HT (30 [m] × 0.25 [mm] i.d., 0.25 [µm] film thickness).^{76,77} Une bonne affinité de ces composés pour la colonne est attendue au vu de la lipophilie des composés d'intérêt.

Le débit d'Hélium a été diminué de 1.2 [mL/min] à 1 [mL/min]. Le gradient de température du four a été modifié : il est initié à 50[°C]. Cette température est maintenue pendant 1 [min]. La température est augmentée de 50 [°C/min] jusqu'à 150 [°C], puis elle est augmentée de 5 [°C/min] jusqu'à 300 [°C]. La température est ensuite maintenue à 300 [°C] pendant 3 minutes. La température de l'injecteur a été diminuée à 280 [°C].

Afin d'éviter une élution trop rapide des composés suite à la diminution de la longueur de la colonne, le débit d'Hélium a été diminué à 1 [mL/min] et le gradient modifié. Ces modifications ont permis de réduire de moitié le temps de rétention de l'acide myristique et de l'acide caprylique par rapport à la méthode proposée initialement par la Pharmacopée américaine et de réduire le temps d'analyse de 39 minutes à 33 minutes.

Après injection d'une solution standard contenant 5 [µg/mL] d'acide caprylique, d'acide myristique et d'acide myristique D27 dans ces conditions d'analyse, il est possible de constater que les pics des composés d'intérêt sont bien séparés, comme l'illustre les chromatogrammes ci-dessous :

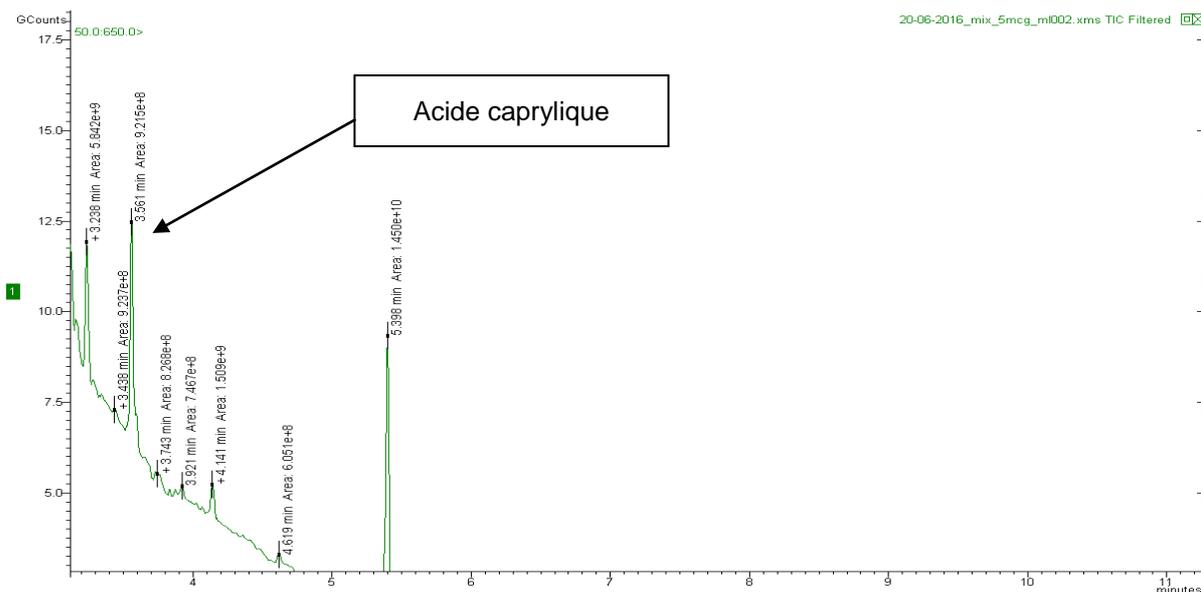


Figure 18 : Chromatogramme de l'acide caprylique

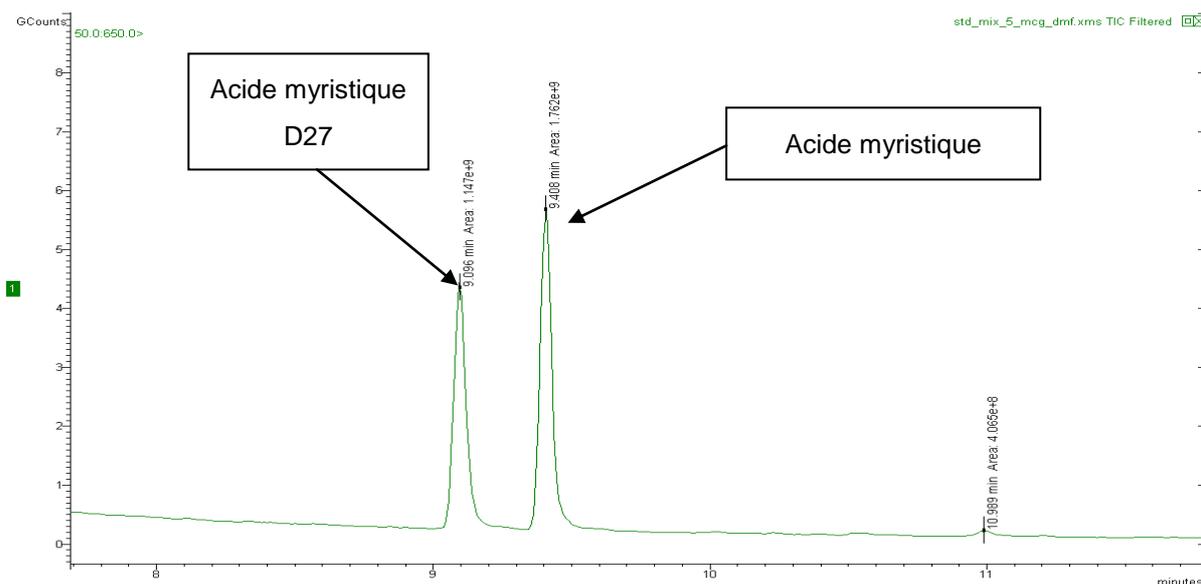


Figure 19 : Chromatogramme de l'acide myristique et de l'acide myristique D27

Dans ces conditions d'analyse, l'acide caprylique a un temps de rétention de 3.5 minutes, l'acide myristique D27, un temps de rétention de 9.1 minutes et l'acide myristique, un temps de rétention de 9.4 minutes.

La méthode est ensuite passée du mode SCAN au mode SIM afin d'augmenter la sensibilité de la méthode. Pour l'acide caprylique, les rapports m/Z de 73, 118 et 202 ont été retenus, pour l'acide myristique et l'acide myristique D27, les rapports m/Z de 73, 118, 286 et 312.5 ont été sélectionnés.

Les chromatogrammes obtenus en mode SIM pour une solution standard contenant 0.5 [µg/mL] d'acide caprylique, d'acide myristique et d'acide myristique D27 sont illustrés ci-dessous :

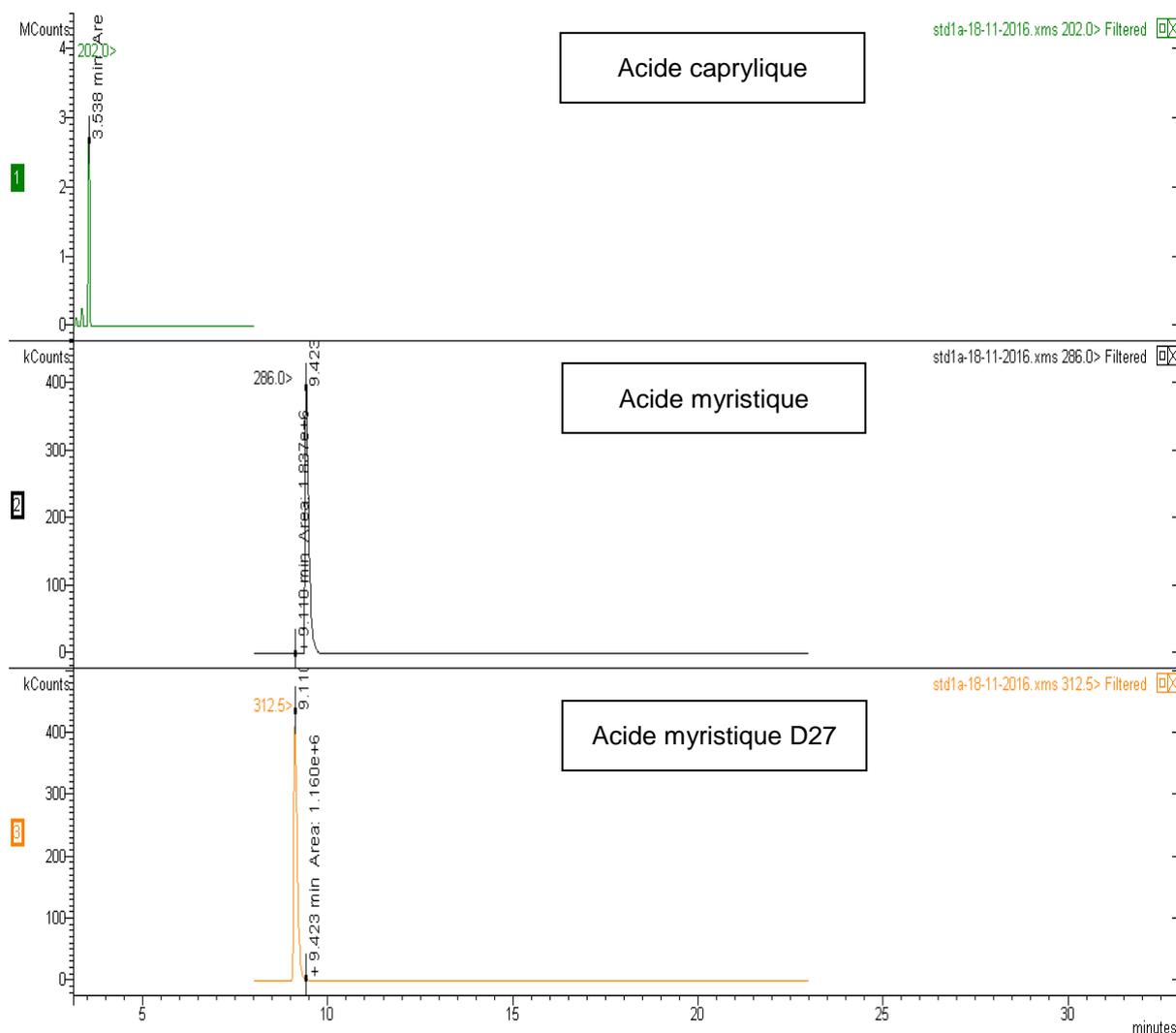


Figure 20 : Chromatogramme en mode SIM

Afin de s'assurer de la répétabilité de la méthode d'analyse au niveau du temps de rétention suite à la diminution du temps d'équilibration de la colonne à 3 minutes, dix injections successives d'une solution standard contenant 0.5 [µg/mL] d'acide myristique, d'acide caprylique et d'acide myristique D27 sont réalisées. Les CVs obtenus pour les

temps de rétention de l'acide caprylique et de l'acide myristique ne doivent pas être supérieurs à 2%.

Une bonne répétabilité des temps de rétention a été obtenue, car les CVs des temps de rétention obtenus sont tous inférieurs à 2%. Les résultats détaillés figurent en annexe XXVI. Ainsi, les temps de rétention sont reproductibles et le temps d'équilibration de la colonne de 3 minutes est suffisant.

6.5.3. Optimisation de la méthode de rinçage de l'injecteur

Après une série d'injections (> 20 échantillons), une obstruction de la seringue de l'injecteur est observée. Selon la littérature, le BSTFA pourrait être à l'origine de l'obstruction de la seringue de l'injecteur GC. En effet, le BSTFA est connu pour ses propriétés corrosives.⁷⁸ Il attaque le métal du piston de la seringue de l'injecteur GC. Plusieurs solutions sont proposées dans littérature pour contrer ce phénomène :

- 1) Recourir à des seringues pour l'injecteur en PTFE
- 2) Faire un rinçage préliminaire avec du toluène, puis en post-injection, rincer la seringue avec du toluène et de l'acétone.⁷⁹
- 3) Faire un rinçage avec du méthanol, puis du dichlorométhane.⁷⁸

Il a été décidé de rincer la seringue, avant l'injection, trois fois avec 5 [µL] de toluène et trois fois avec 5 [µL] d'acétone. Après injection de l'échantillon, la seringue est ensuite rincée dix fois avec 5 [µL] de toluène et dix fois avec 5 [µL] d'acétone.

Cependant, le rinçage était insuffisant avec cette méthode : des pics interférents au niveau du pic de l'acide myristique étaient retrouvés sur les chromatogrammes des blancs, comme illustré ci-dessous :

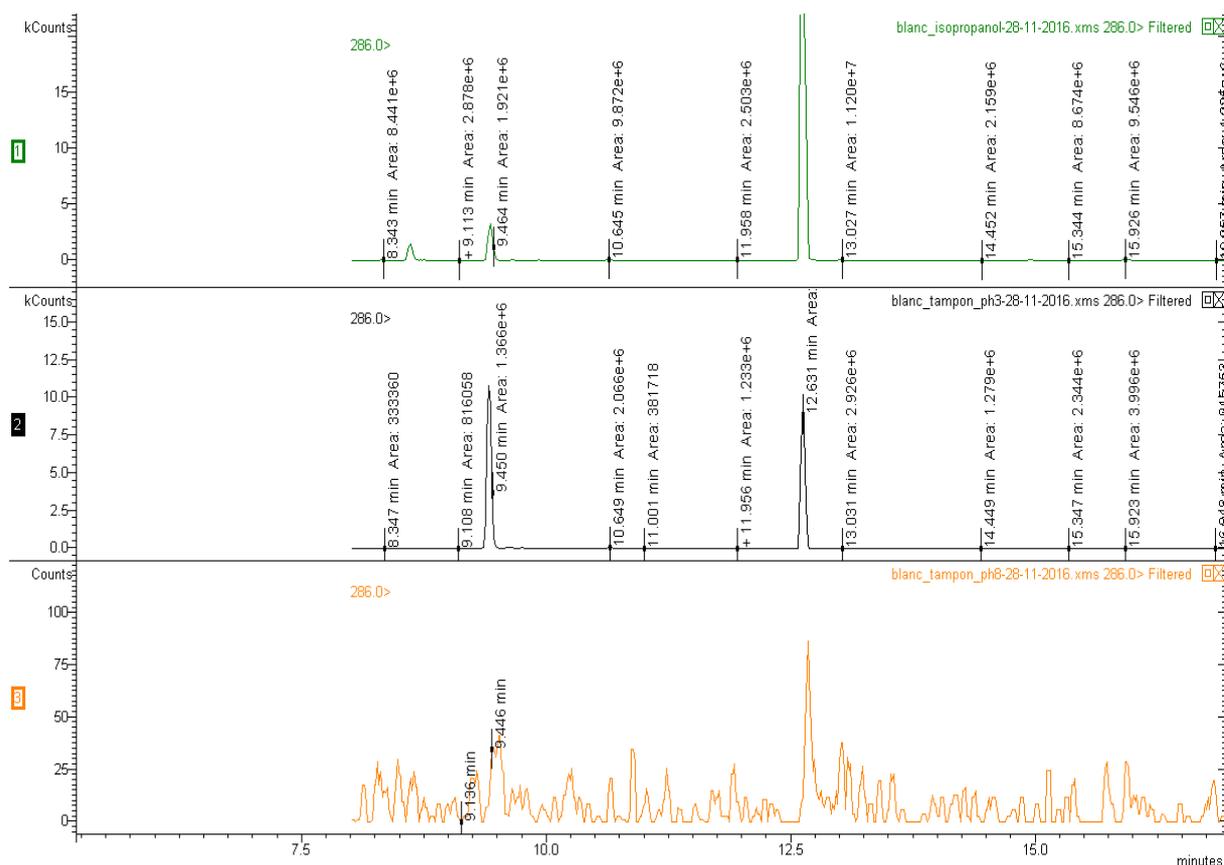


Figure 21 : Chromatogrammes des blancs d'isopropanol/eau 50:50, du tampon phosphate à pH 8 et à pH 3

Une nouvelle méthode de rinçage a été testée : avant l'injection, la seringue est rincée trois fois avec 5 [µL] de toluène, trois fois avec 5 [µL] d'acétone, puis trois fois avec 5 [µL] d'hexane. Après injection de l'échantillon, la seringue est ensuite rincée dix fois avec 5 [µL] de toluène, dix fois avec 5 [µL] d'acétone et dix fois avec 5 [µL] d'hexane.

Avec cette méthode de rinçage, plus aucun pic interférent n'a été observé, comme illustré ci-dessous :

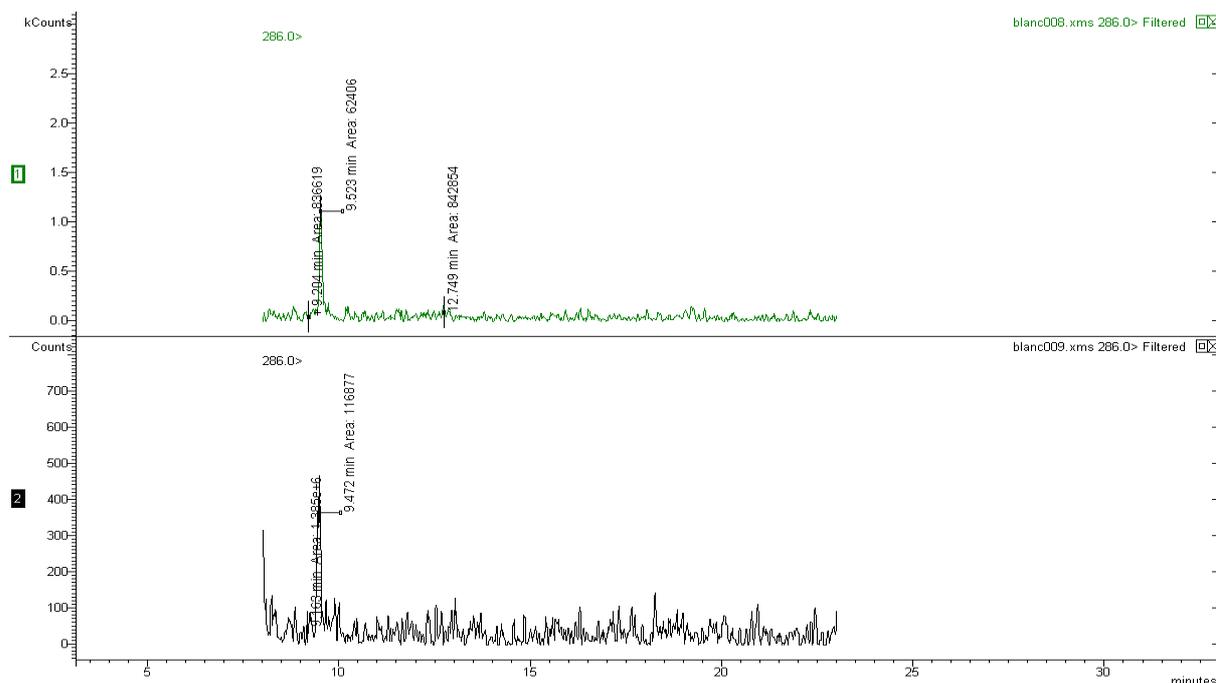


Figure 22 : Chromatogramme des blancs d'isopropanol/eau 50:50 et du tampon phosphate à pH 3

Plus aucun problème de corrosion de la seringue de l'injecteur GC n'a été observé suite à la mise au point de cette méthode de rinçage de la seringue de l'injecteur GC.

Le rinçage de la seringue testé initialement avec de l'iso-octane uniquement ne permettait pas d'éliminer le réactif de dérivatisation, ce qui a causé une obstruction de la seringue lors de l'analyse d'une séquence de plusieurs échantillons. Le remplacement du solvant de rinçage de l'aiguille avec du toluène et de l'acétone a permis d'éliminer le réactif de dérivatisation résiduel dans la seringue. Cela a résolu le problème de corrosion. Cependant, le rinçage n'était pas suffisant pour éliminer l'acide myristique résiduel de la seringue. C'est pourquoi, un rinçage supplémentaire de la seringue avec de l'hexane a été rajouté. Cela permet de solubiliser l'acide myristique résiduel dans la seringue et ainsi d'éliminer les interférences au niveau des pics d'intérêt dans le blanc.

6.6. Conclusions

Ainsi, la méthode de préparation d'échantillons et la méthode d'analyse ont pu être optimisées et adaptées au dosage de l'acide myristique et de l'acide caprylique. Afin de pouvoir garantir la reproductibilité et la fiabilité de la méthode de dosage développée, la méthode doit désormais être validée.

7. Validation de la méthode de dosage pour l'analyse de l'acide myristique et caprylique par GC/MS

7.1. Introduction

La méthode analytique doit être validée pour l'identification et le dosage de l'acide myristique et l'acide caprylique, ainsi que pour l'identification et le dosage du standard interne d'injection, l'acide myristique D27 selon les recommandations du protocole SFSTP 2003.⁶⁹

7.2. Matériel, produits, équipements et appareils

Idem à ceux utilisés pour le développement de la méthode d'analyse (c.f. chapitre 6.2 et 6.3). Le logiciel e-noval est utilisé pour le traitement des données de la validation de la méthode.

7.3. Méthode

Selon les recommandations du protocole SFSTP, la spécificité doit être évaluée en premier lieu. Elle doit être déterminée pour l'acide myristique, l'acide caprylique, l'acide myristique D27 et leurs produits de dégradation.

7.3.1. Spécificité

La spécificité est évaluée au moyen de trois essais : l'identification des pics, l'absence d'interférences au niveau des pics d'intérêt dans les chromatogrammes des blancs et par des essais de dégradation forcée des composés d'intérêt.

Les essais sont décrits ci-dessous.

7.3.1.1. Identification

Pour chaque molécule (acide myristique, acide caprylique, acide myristique D27), les rapports m/Z caractérisant le composé d'intérêt sont sélectionnés. Le tableau ci-dessous résume les rapports m/Z sélectionnés pour chaque composé d'intérêt :

Tableau 31 : Rapport m/Z sélectionnés

Composé	Rapports m/Z sélectionnés
Acide caprylique	73, 118, 202
Acide myristique	73, 118, 286
Acide myristique D27	73, 118, 312.5

L'identification d'un composé est ensuite effectuée à l'aide de trois critères : le N-R, qui correspond à la procédure au cours de laquelle les formes neutres des ions sélectionnés sont formées, puis ionisées, l'abondance relative des ions et le temps de rétention. Les spécifications suivantes sont fixées pour l'acide caprylique, l'acide myristique et l'acide myristique D27 :

Tableau 32 : Spécifications pour l'identification des composés

Acide caprylique	
Critères	Spécifications
m/Z : 73.1 : 214.1%	144.7%-244.7%
m/Z : 202 : 85.5%	55.5%-115.5%
N-R	≥ 700
Temps de rétention	3.560 ± 0.200
Acide myristique	
Critères	Spécifications
m/Z : 73.0 : 103.1%	73.1%-103.1%
m/Z : 286 : 34.8%	4.8%-64.8%
N-R	≥ 700
Temps de rétention	9.446 ± 0.200
Acide myristique D27	
Critères	Spécifications
m/Z : 118 : 13.8%	9.4%-69.4%
m/Z : 312.5 : 39.4%	0.1%-43.8%
N-R	≥ 700
Temps de rétention	9.136 ± 0.200

L'identification des pics d'intérêt est réalisée pour une solution standard contenant 0.5 [µg/mL] d'acide caprylique, d'acide myristique et d'acide myristique D27, ainsi que pour un échantillon obtenu par extraction LLE d'une seringue BD Perfusion (Lot : 1603204P) contenant 50 [mL] d'une solution de tampon phosphate à pH 3 et stockée pendant 3 jours à 55 [°C] à l'étuve.

7.3.1.2. Blanc

Un blanc doit être préparé en suivant la procédure d'extraction liquide-liquide, afin d'exclure toute contamination de l'échantillon lors de sa préparation. Le blanc permet de prouver l'absence d'interférences au niveau des pics des composés d'intérêt.

Il a été préparé pour chaque milieu testé dans le cadre de l'étude des substances extractibles et diffusibles (Tampon phosphate à pH 3, tampon phosphate à pH 8, mélange isopropanol/eau 50:50, NaCl 0.9% et insuline 1 [UI/mL]) (c.f. chapitre 8. et 9. Etude des substances extractibles et diffusibles) selon les protocoles suivants :

- Préparation du blanc tampon phosphate à pH 3 :

Dans une ampoule à décanter, 50 [mL] de tampon phosphate à pH 3 sont déversés. 25 [mL] de dichlorométhane y sont ajoutés. Après agitation, la phase organique est récoltée et une nouvelle extraction est réalisée à l'aide de 25 [mL] de dichlorométhane. Le pH de la solution est ajusté à 8 avec du NaOH 5 [N]. Deux nouvelles extractions successives sont réalisées suite à l'ajout de 2x 25 [mL] de dichlorométhane. Les phases organiques sont ensuite rassemblées. Une spatule de sodium sulfate anhydre est ajoutée et la solution est filtrée à l'aide d'un filtre Whatman diam. 125 [mm]. Le solvant est ensuite évaporé à sec. 1 [mL] de méthanol est ajouté. 0.5 [mL] de cette solution sont prélevés et déposés dans un vial. 0.5 [mL] d'une solution d'acide myristique D27 à 1 [µg/mL] y sont ajoutés. La solution est ensuite dérivatisée. Pour ce faire, 100 [µL] de diméthylformamide y sont ajoutés. La solution est vortexée. Le contenu de chaque vial est évaporé à sec avec de l'azote, puis 100 [µL] de BSTFA avec 1% de TMCS sont ajoutés. La solution est vortexée. Le vial est ensuite scellé et placé à 120 [°C] pendant 30 minutes. 900 [µL] d'hexane sont ajoutés. Après agitation, la solution est injectée.

- Préparation du blanc tampon phosphate à pH 8 :

Dans une ampoule à décanter, 50 [mL] de tampon phosphate à pH 8 sont déversés. 25 [mL] de dichlorométhane y sont ajoutés. Après agitation, la phase organique est récoltée et une nouvelle extraction est réalisée à l'aide de 25 [mL] de dichlorométhane. Le pH de la solution est ajusté à 3 avec du HCl 5 [N]. Deux nouvelles extractions successives sont réalisées suite à l'ajout de 2x 25 [mL] de dichlorométhane. Les phases organiques sont ensuite rassemblées. Une spatule de sodium sulfate anhydre est ajoutée et la solution est filtrée à l'aide d'un filtre Whatman diam. 125 [mm]. Le solvant est ensuite évaporé à sec. 1 [mL] de méthanol est ajouté. 0.5 [mL] de cette solution sont prélevés et déposés dans un vial. 0.5 [mL] d'une solution d'acide myristique D27 à 1 [µg/mL] y sont ajoutés. La solution est ensuite dérivatisée selon le protocole de dérivatisation et est injectée.

- Préparation du blanc isopropanol/eau 50:50 ou NaCl 0.9% :

Dans une ampoule à décanter, 50 [mL] du milieu étudié (isopropanol/eau 50:50 ou du NaCl 0.9%) sont déversés. Le pH de la solution est ajusté à 3 avec du HCl 5 [N]. 25 [mL] de dichlorométhane y sont ajoutés. Après agitation, la phase organique est récoltée et une nouvelle extraction est réalisée à l'aide de 25 [mL] de dichlorométhane. Le pH de la solution est ajusté à 8 avec du NaOH 5 [N]. Deux nouvelles extractions successives sont réalisées suite à l'ajout de 2x 25 [mL] de dichlorométhane. Les phases organiques sont ensuite rassemblées. Une spatule de sodium sulfate anhydre est ajoutée et la solution est filtrée à l'aide d'un filtre Whatman diam. 125 [mm]. Le solvant est ensuite évaporé à sec. 1 [mL] de méthanol est ajouté. 0.5 [mL] de cette solution sont prélevés et déposés dans un vial. 0.5 [mL] d'une solution d'acide myristique D27 à 1 [µg/mL] y sont ajoutés. La solution est ensuite dérivatisée selon le protocole de dérivatisation et est injectée.

- Préparation du blanc insuline à 1 [UI/mL]

Dans une ampoule à décanter, 50 [mL] de la solution d'insuline à 1 [UI/mL] sont déversés. Le pH de la solution est ajusté à 3 avec du HCl 5 [N]. 5 [mL] d'une solution de NaCl saturée sont ajoutés. 25 [mL] de dichlorométhane y sont ajoutés. Après agitation, la phase organique est récoltée et une nouvelle extraction est réalisée à l'aide de 25 [mL] de dichlorométhane. Le pH de la solution est ajusté à 8 avec du NaOH 5 [N]. Deux nouvelles extractions successives sont réalisées suite à l'ajout de 2x 25 [mL] de dichlorométhane. Les phases organiques sont ensuite rassemblées. Une spatule de sodium sulfate anhydre est ajoutée et la solution est filtrée à l'aide d'un filtre Whatman diam. 125 [mm]. Le solvant est ensuite évaporé à sec. 1 [mL] de méthanol est ajouté. 0.5 [mL] de cette solution sont prélevés et déposés dans un vial. 0.5 [mL] d'une solution d'acide myristique D27 à 1 [µg/mL] y sont ajoutés. La solution est ensuite dérivatisée selon le protocole de dérivatisation et est injectée.

7.3.1.3. Essai de dégradation accélérée

Différents essais de dégradation sont réalisés sur une solution standard d'acide myristique et d'acide caprylique :

1) Dégradation à la chaleur : Une solution standard contenant 2 [µg/mL] d'acide myristique et d'acide caprylique est préparée. 500 [µL] de cette solution sont prélevés et déposés dans un vial contenant 500 [µL] de méthanol. 500 [µL] d'une solution standard d'acide myristique D27 (standard interne d'injection) à 1 [µg/mL] y sont ajoutés. Cette solution est ensuite placée à 80 [°C] pendant 24 heures. Après 24 heures, elle est dérivatisée selon le protocole de dérivatisation et est injectée.

La concentration finale de l'acide caprylique, de l'acide myristique et de l'acide myristique D27 est de 0.5 [µg/mL].

2) Dégradation aux UVs : Une solution standard contenant 2 [µg/mL] d'acide myristique et d'acide caprylique est préparée. 500 [µL] de cette solution sont prélevés et déposés dans un vial contenant 500 [µL] de méthanol. 500 [µL] d'une solution standard d'acide myristique D27 (standard interne d'injection) à 1 [µg/mL] y sont ajoutés. Cette solution est soumise aux UVs à 270 et à 365 [nm] pendant 24 heures. Après 24 heures, elle est dérivatisée selon le protocole de dérivatisation et injectée.

La concentration finale de l'acide caprylique, de l'acide myristique et de l'acide myristique D27 est de 0.5 [µg/mL].

3) Effet de l'H₂O₂ à 3%: 50 [µL] d'une solution fille d'acide myristique et d'acide caprylique à 100 [µg/mL] et 50 [µL] d'une solution fille d'acide myristique D27 à 100 [µg/mL] sont mélangés avec 50 [µL] d'H₂O₂ à 3% dans un ballon jaugé de 10 [mL]. Après 3 heures, le volume est complété à 10 [mL] avec du méthanol. 1 [mL] de cette solution est prélevé et déposé dans un vial. La solution est dérivatisée selon le protocole de dérivatisation et injectée.

La concentration finale de l'acide caprylique, de l'acide myristique et de l'acide myristique D27 est de 0.5 [µg/mL].

4) Effet de l'acide : 50 [µL] d'une solution fille d'acide myristique et d'acide caprylique à 100 [µg/mL] et 50 [µL] d'une solution fille d'acide myristique D27 à 100 [µg/mL] sont mélangés avec 50 [µL] d'HCl 1 [M] dans un ballon jaugé de 10 [mL]. Après 3 heures, le pH est ajusté à 7 avec du NaOH 1 [M] (Ajout de 50 [µL] de NaOH 1 [M]), puis le volume est complété à 10 [mL] avec du méthanol. 1 [mL] de cette solution est prélevé

et déposé dans un vial. La solution est dérivatisée selon le protocole de dérivatisation et injectée.

La concentration finale de l'acide caprylique, de l'acide myristique et de l'acide myristique D27 est de 0.5 [µg/mL].

5) Effet d'une base : 50 [µL] d'une solution fille d'acide myristique et d'acide caprylique à 100 [µg/mL] et 50 [µL] d'une solution fille d'acide myristique D27 à 100 [µg/mL] sont mélangés avec 50 [µL] de NaOH dans un ballon jaugé de 10 [mL]. Après 3 heures, le pH est ajusté à 7 avec du HCl 1 [M] (Ajout de 50 [µL] d'HCl 1 [M]). Le volume est ensuite complété à 10 [mL] avec du méthanol. 1 [mL] de cette solution est prélevé et déposé dans un vial. La solution est dérivatisée selon le protocole de dérivatisation et injectée.

La concentration finale de l'acide caprylique, de l'acide myristique et de l'acide myristique D27 est de 0.5 [µg/mL].

Afin de pouvoir quantifier la dégradation en acide caprylique et en acide caprylique dans les différentes conditions de dégradation, une solution standard contenant 0.5 [µg/mL] d'acide caprylique, d'acide myristique et d'acide myristique D27 est préparée et dérivatisée selon le protocole de dérivatisation. Elle est ensuite injectée.

La concentration finale de l'acide caprylique, de l'acide myristique et de l'acide myristique D27 est de 0.5 [µg/mL]. Cette solution standard sert de solution de référence pour quantifier le pourcentage de dégradation de l'acide caprylique et de l'acide myristique dans les différentes conditions de dégradation.

7.3.2. Standards d'étalonnage et de validation

La validité de la méthode est déterminée à l'aide des standards de validation. Le logiciel enoal est utilisé pour le traitement des données.

1) Préparation des standards d'étalonnage

Deux solutions mères des substances d'intérêt (Acide myristique et caprylique) sont préparées selon le protocole ci-dessous :

- 1) **Solution mère d'acide myristique** : Dissoudre exactement **10.0 [mg]** d'acide myristique dans 10 [mL] d'hexane.
- 2) **Solution mère d'acide caprylique** : Dissoudre exactement **10.0 [mg]** d'acide caprylique dans 10 [mL] d'hexane.

Une solution fille contenant un mélange d'acide myristique et d'acide caprylique est ensuite préparée selon le protocole ci-dessous :

Solution fille d'acide myristique et d'acide caprylique à 2 [µg/mL] : Prélever 50 [µL] de chaque solution mère et compléter à 25 [mL] avec du méthanol.

Les standards d'étalonnage sont ensuite préparés à partir de la solution fille à 2 [µg/mL] selon le schéma de dilution figurant dans le tableau ci-dessous :

Tableau 33 : Standards d'étalonnage

Standard d'étalonnage	Concentration du standard d'étalonnage [µg/mL]	Volume de solution fille à prélever [µL]	Volume de méthanol à prélever [µL]	Volume total [µL]
STD1	1.00	250	250	500
STD2	0.40	100	400	
STD3	0.20	50	450	
STD4	0.10	25	475	
STD5	0.04	10	490	
STD6	0.02	5	495	
Blanc	500 [µL] de méthanol + 500 [µL] d'hexane ayant subi la réaction de dérivation			

Le standard interne d'injection doit ensuite être ajouté à chaque standard d'étalonnage. Pour ce faire, une solution mère d'acide myristique D27, le standard interne d'injection, à 1 [mg/mL] est préparée selon le protocole ci-dessous :

Solution mère d'acide myristique D27 : Dissoudre exactement **10.0 [mg]** d'acide myristique D27 dans 10 [mL] d'hexane.

Une solution fille de l'acide myristique D27 à 1 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] est ensuite préparée selon le protocole ci-dessous :

Solution fille d'acide myristique D27 à 1 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] : Prélever 25 [μL] de chaque solution mère et compléter à 25 [mL] avec du méthanol.

500 [μL] de la solution fille d'acide myristique D27 à 1 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] sont ajoutés dans chaque vial. La solution est ensuite dérivatisée selon le protocole de dérivatisation et injectée.

Les concentrations finales des standards d'étalonnage sont de 0.5 [$\mu\text{g}/\text{mL}$], 0.2 [$\mu\text{g}/\text{mL}$], 0.1 [$\mu\text{g}/\text{mL}$], 0.05 [$\mu\text{g}/\text{mL}$], 0.02 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] et 0.01 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]. La concentration finale du standard d'injection est de 0.5 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]. Chaque solution standard est préparée **en duplicata** depuis la solution fille et est **injectée deux fois**. Trois séries indépendantes sont réalisées.

2) Préparation des standards de validation

Deux solutions mères des substances d'intérêt (Acide myristique et caprylique) sont préparées selon le protocole ci-dessous :

- 1) **Solution mère d'acide myristique** : Dissoudre exactement **10.0 [mg]** d'acide myristique dans 10 [mL] d'hexane.
- 2) **Solution mère d'acide caprylique** : Dissoudre exactement **10.0 [mg]** d'acide caprylique dans 10 [mL] d'hexane.

Une solution fille contenant un mélange d'acide myristique et d'acide caprylique est ensuite préparée selon le protocole ci-dessous :

Solution fille d'acide myristique et d'acide caprylique à 2 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] : Prélever 50 [μL] de chaque solution mère et compléter à 25 [mL] avec du méthanol.

Les standards de validation sont ensuite préparés à partir de la solution fille à 2 [µg/mL] selon le schéma de dilution figurant dans le tableau ci-dessous :

Tableau 34 : Standards de validation

Standard de validation	Concentration du standard de validation [µg/mL]	Volume de solution fille à prélever [µL]	Volume de méthanol à prélever [µL]	Volume total [µL]
VLD1	1.00	250	250	500
VLD2	0.40	100	400	
VLD3	0.20	50	450	
VLD4	0.10	25	475	
VLD5	0.04	10	490	
VLD6	0.02	5	495	
Blanc	500 [µL] de méthanol + 500 [µL] d'hexane ayant subi la réaction de dérivatisation			

Le standard interne d'injection doit ensuite être ajouté à chaque standard de validation. Pour ce faire, une solution mère d'acide myristique D27, le standard interne d'injection, à 1 [mg/mL] est préparée selon le protocole ci-dessous :

Solution mère d'acide myristique D27 : Dissoudre exactement **10.0 [mg]** d'acide myristique D27 dans 10 [mL] d'hexane.

Une solution fille de l'acide myristique D27 à 1 [µg/mL] est ensuite préparée selon le protocole ci-dessous :

Solution fille d'acide myristique D27 à 1 [µg/mL] : Prélever 25 [µL] de chaque solution mère et compléter à 25 [mL] avec du méthanol.

500 [µL] de la solution fille d'acide myristique D27 à 1 [µg/mL] sont ajoutés dans chaque vial. La solution est ensuite dérivatisée selon le protocole de dérivatisation et injectée.

Les concentrations finales des standards de validation sont de 0.5 [µg/mL], 0.2 [µg/mL], 0.1 [µg/mL], 0.05 [µg/mL], 0.02 [µg/mL] et 0.01 [µg/mL]. La concentration finale du standard d'injection est de 0.5 [µg/mL]. Chaque solution standard est préparée **en triplicata** depuis la solution fille et est **injectée deux fois**. Trois séries indépendantes sont réalisées.

7.3.3. LOQ

La limite de quantification de la méthode est déterminée par l'AET. L'AET est de 0.02 [ppm] (= 0.02 [µg/mL]) pour les seringues BD Perfusion® et les seringues BD Sterifill® et de 0.04 [ppm] (= 0.04 [µg/mL]) pour les flacons COC, Promens/Elpack®. La méthode doit donc être

suffisamment sensible pour permettre de quantifier les composés d'intérêt jusqu'à une concentration de 0.02 [$\mu\text{g}/\text{mL}$].

7.3.4. Répétabilité des résultats pour un même échantillon

Etant donné que la méthode développée pour la chromatographie gazeuse peut être sujette à des variations (en raison de la réaction de dérivation notamment), un échantillon est injecté six fois afin de vérifier la répétabilité des résultats pour un même échantillon. Pour ce faire, un échantillon contenant 0.5 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] d'acide myristique, d'acide caprylique et d'acide myristique D27 est préparé, dérivatisé et injecté six fois.

Le coefficient de variation du rapport d'aire pour les six injections réalisées ne doit pas être supérieur à 10%.

7.3.5. Stabilité

Une solution standard contenant l'acide myristique, caprylique et l'acide myristique D27 à une concentration de 0.5 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] est préparée et stockée à température ambiante. Cette solution est injectée à t_0 , puis à $t_{24 \text{ heures}}$, $t_{48 \text{ heures}}$, $t_{72 \text{ heures}}$ et $t_{7 \text{ jours}}$ afin d'évaluer la stabilité de l'acide myristique, caprylique et de l'acide myristique D27 au cours du temps. Les rapports d'aires obtenus pour la solution après chaque injection sont comparés à ceux obtenus à t_0 . La dégradation de l'acide myristique et de l'acide caprylique est calculée en pourcentage relatif par rapport au rapport d'aire obtenu à t_0 . Ce pourcentage doit être compris entre 90% et 110% pour être considéré comme acceptable.

7.4. Résultats et discussion

7.4.1. Spécificité

7.4.1.1. Identification

Les résultats suivants ont été obtenus pour l'identification des pics, suite à l'injection d'une solution standard contenant 0.5 [µg/mL] d'acide myristique, d'acide caprylique et d'acide myristique D27 et d'un échantillon (Extrait obtenu par extraction LLE d'une seringue BD Perfusion (Lot : 1603204P)) :

Tableau 35 : Résultats identification

Acide caprylique			
Critères	Spécifications	Résultats solution standard	Résultats échantillon
m/Z : 73.1 : 214.1%	144.7%-244.7%	203.7%	Non détectable
m/Z : 202 : 85.5%	55.5%-115.5%	83.7%	
N-R	≥ 700	743	
Temps de rétention	3.560 ± 0.200	3.555	
Acide myristique			
Critères	Spécifications	Résultats solution standard	Résultats échantillon
m/Z : 73.0 : 103.1%	73.1%-133.1%	106.0%	97.9%
m/Z : 286 : 34.8%	4.8%-64.8%	39.8%	7.6%
N-R	≥ 700	999	998
Temps de rétention	9.446 ± 0.200	9.447	9.374
Acide myristique D27			
Critères	Spécifications	Résultats solution standard	Résultats échantillon
m/Z : 118 : 13.8%	0.1%-43.8%	17.2%	9.0%
m/Z : 312.5 : 39.4%	9.4%-69.4%	67.6%	34.8%
N-R	≥ 700	875	877
Temps de rétention	9.136 ± 0.200	9.138	9.149

Les résultats obtenus pour l'identification des pics de l'acide myristique, de l'acide myristique D27 et de l'acide caprylique sont conformes aux spécifications fixées pour la solution standard. Il en est de même pour les résultats de l'échantillon. Aucune trace d'acide caprylique n'a été retrouvée dans l'échantillon de la seringue BD Perfusion® (Lot : 1603204P), c'est pourquoi il est indétectable. Ainsi, la méthode permet d'identifier de manière fiable les pics de l'acide caprylique, de l'acide myristique et de l'acide myristique D27 par rapport aux trois critères fixés (Temps de rétention, abondance relative et N-R).

7.4.1.2. Blanc

Les chromatogrammes des blancs préparés dans du tampon phosphate à pH 3, tampon phosphate à pH 8 et dans le mélange isopropanol/eau 50:50 ont déjà été présentés dans le chapitre 6.5.3. « optimisation de la méthode de rinçage de l'injecteur ».

Les chromatogrammes des blancs préparés dans du NaCl 0.9% et de l'insuline à 1 [UI/mL], figurent ci-dessous :

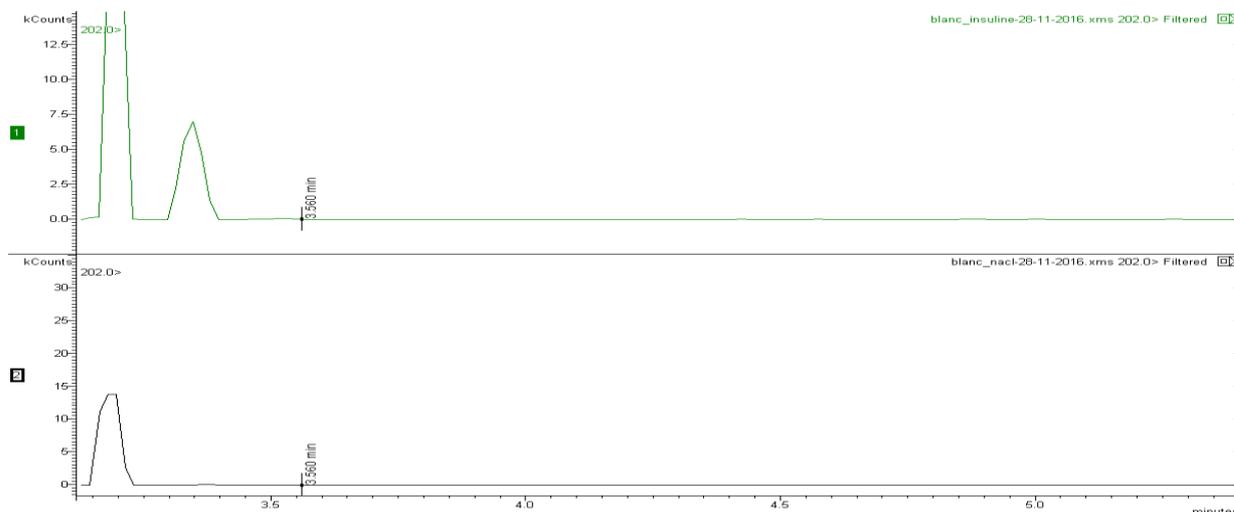


Figure 23 : Chromatogrammes des blancs (NaCl 0.9% et insuline à 1 [UI/mL]) pour l'acide caprylique

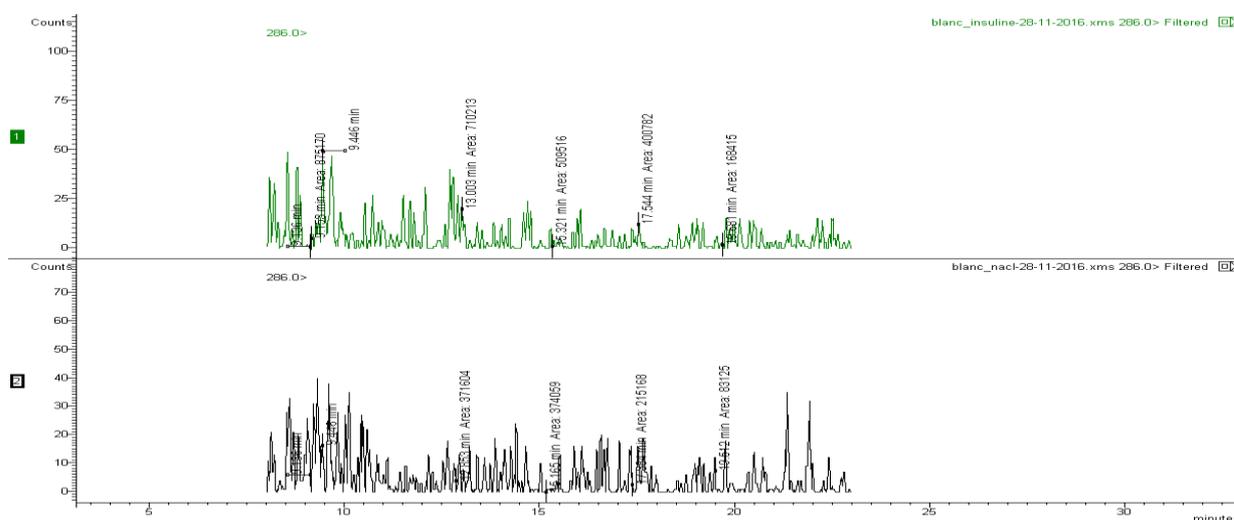


Figure 24 : Chromatogrammes des blancs (NaCl 0.9% et insuline à 1 [UI/mL]) pour l'acide myristique

Aucun pic provenant des blancs préparés à partir des différents milieux (Tampon phosphate à pH 3, tampon phosphate à pH 8, mélange isopropanol/eau 50:50) n'interfère avec les pics des composés d'intérêt. Il en est de même pour les blancs préparés dans du NaCl 0.9% et dans une solution d'insuline à 1 [UI/mL]. Cela signifie qu'aucune substance provenant du matériel et des produits utilisés pour effectuer l'extraction LLE n'interfère avec les pics des composés d'intérêt.

7.4.1.3. Essai de dégradation

Les résultats des essais de dégradation sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 36 : Résultats

Essai de dégradation	Acide caprylique			Acide myristique		
	C _{Acide caprylique} moyenne [µg/mL]	C _{Solution standard} moyenne [µg/mL]	Recouvrement [%]	C _{Acide myristique} moyenne [µg/mL]	C _{Solution standard} moyenne [µg/mL]	Recouvrement [%]
Effet de l'acide	0.34	0.38	90.96%	0.47	0.46	102.49%
Effet d'une base	0.06		15.65%	0.50		108.62%
Effet de la chaleur	0.41		109.18%	0.47		103.29%
Effet des UVs	0.35		93.77%	0.49		108.27%
Effet de l'H ₂ O ₂	0.29		77.56%	0.47		103.54%

Les résultats détaillés pour les essais de dégradation se trouvent en annexe XXVII.

Selon les essais de dégradation, l'acide caprylique est sensible aux conditions basiques et à l'oxydation. En effet, une diminution de la concentration de l'acide caprylique d'environ 23% se produit en cas d'exposition à l'eau oxygénée. Une diminution de la concentration en acide caprylique d'environ 84% a été observée lorsque l'acide caprylique est mis en solution fortement basique. Vu que le rendement d'extraction de l'acide caprylique a été évalué à 93% précédemment (c.f. 6.5.1.2. rendement d'extraction), il est possible d'exclure une baisse de la concentration en l'acide caprylique lors de l'étape de basification de l'échantillon à pH 8 effectuée au cours de la préparation d'échantillons. Dans les autres conditions de dégradation (acide, chaleur et UV), les recouvrements de l'acide caprylique sont compris entre 91.0% et 109.2%. L'acide caprylique peut être considéré comme stable dans ces conditions.

L'acide myristique ne se dégrade pas dans toutes les conditions testées. En effet, les recouvrements obtenus sont tous compris entre 102.5 et 108.6%.

7.4.2. Standards d'étalonnage et de validation

Le logiciel e-noval a été utilisé pour la validation de la méthode. Le rapport détaillé pour l'acide myristique figure en annexe XXVIII. Les rapports d'aires et de concentrations introduits dans le logiciel e-noval pour l'acide myristique se trouvent en annexe XXIX. Les rapports d'aires et de concentrations introduits dans le logiciel e-noval pour l'acide caprylique se trouvent en annexe XXX.

Etant donné la forte variation des résultats obtenus, le profil de risque et d'exactitude n'ont pas pu être tracés pour l'acide caprylique.

Le profil d'exactitude de l'acide myristique a été établi sur deux séries et 3 niveaux de concentration selon un modèle de régression linéaire, car la sensibilité de la méthode a fortement diminué entre la première et la dernière série de validation. Les résultats des niveaux de concentration 4, 5 et 6 étaient trop faibles et trop variables pour être pris en compte dans la validation. Ils ont donc été exclus.

Le profil d'exactitude de l'acide myristique obtenu pour deux séries de validation et 3 niveaux de concentration démontre que la validation de la méthode n'est pas conforme. La méthode est inexacte avec un intervalle de confiance de $\pm 30\%$. Un risque d'erreur pouvant aller jusqu'à 30% a été observé pour l'acide myristique, notamment sur les rapports d'aires de 0.4.

Plusieurs causes peuvent expliquer l'échec de la validation. Tout d'abord, les standards de validation ont été préparés dans un volume final de 1 [mL]. Cela augmente fortement le risque d'erreurs, notamment le risque d'erreurs systématiques. Ensuite, chaque vial a été dérivatisé individuellement. Il peut y avoir une variation de la réponse du composé au réactif de dérivatisation entre les différents échantillons. La dilution d'une solution mère préalablement dérivatisée n'est pas envisageable dans le cas présent, en raison de la réversibilité de la réaction de dérivatisation. De plus, pour l'acide caprylique, la variation des résultats peut être expliquée par le fait qu'il est élué très rapidement. Il se peut que certains composés interfèrent avec le dosage de ce composé. Une optimisation de la méthode d'analyse devrait être effectuée afin de retarder l'élution de l'acide caprylique.

Finalement, une perte de sensibilité a été observée entre la première et la dernière série de validation. En effet, la réponse du détecteur aux faibles concentrations en acide myristique est fortement diminuée entre la première série de validation et la dernière série. Une maintenance de la source d'ion aurait dû être effectuée afin de résoudre le problème de perte de sensibilité. Malheureusement, par manque de temps et de disponibilité de

l'équipement, il n'a pas été possible de refaire la validation de la méthode d'analyse de l'acide caprylique et de l'acide myristique.

Ainsi, seules les identifications des pics de l'acide myristique et de l'acide caprylique peuvent être réalisées sur les échantillons analysés par la méthode d'analyse développée en GC/MS. Une estimation des concentrations en acide myristique et en acide caprylique contenues dans ces échantillons peut être effectuée. Pour être considérées comme valides, les concentrations estimées doivent être confirmées soit par l'emploi d'une technique d'analyse orthogonale, soit par l'utilisation d'une méthode d'analyse par GC/MS validée.

7.4.3. LOQ

Etant donné l'échec de la validation de la méthode d'analyse de l'acide myristique et de l'acide caprylique, le LOQ de la méthode n'a pas pu être évalué.

7.4.4. Répétabilité des résultats pour un même échantillon

Les résultats obtenus pour les rapports d'aires d'acide caprylique et d'acide myristique suite aux six injections d'une solution standard d'acide caprylique et d'acide myristique à 0.5 [µg/mL] figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 37 : Résultats

Répétabilité	Rapport d'aire Acide caprylique	Rapport d'aire Acide myristique
Moyenne ± IC ₉₅	3.22 ± 0.32	1.39 ± 0.08
Ecart-type	0.31	0.08
CV [%]	9.56%	5.66%

Les résultats détaillés figurent en annexe XXXI.

Selon les résultats obtenus, la répétabilité est conforme aux exigences, car le coefficient de variation obtenu suite à six injections successives d'une solution standard d'acide caprylique et d'acide myristique à 0.5 [µg/mL] est inférieur à 10%.

7.4.5. Stabilité

Les résultats obtenus pour la stabilité de l'acide myristique et de l'acide caprylique au cours du temps sont illustrés sur le schéma ci-dessous :

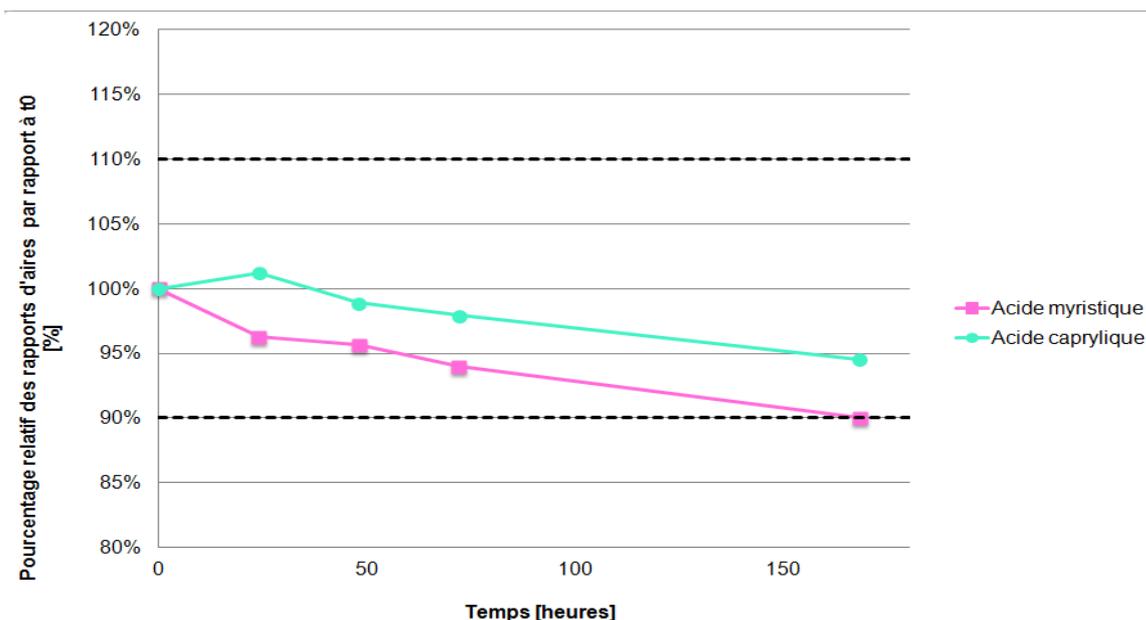


Figure 25 : Stabilité de l'acide myristique et de l'acide caprylique au cours du temps

Les résultats détaillés figurent en annexe XXXII.

Aucune donnée sur la stabilité de l'acide myristique et de l'acide caprylique en solution n'a été retrouvée dans la littérature, c'est pourquoi une évaluation de la stabilité des solutions d'acide caprylique et d'acide myristique devait être effectuée. De plus, la durée d'une analyse par GC/MS est de 33 minutes. Cela signifie qu'il était important de connaître la stabilité de la solution sur une durée d'au minimum 3 jours afin de pouvoir garantir la stabilité des solutions pendant toute une série de validation. Les résultats des pourcentages relatifs obtenus pour la stabilité d'une solution d'acide myristique et d'acide caprylique démontrent que les solutions sont stables pendant une durée d'au moins 7 jours à température ambiante, car les valeurs de pourcentage obtenues sont toutes comprises dans l'intervalle fixé de $\pm 10\%$.

7.5. Conclusions

Ainsi, la méthode développée pour l'analyse de l'acide caprylique par GC/MS n'a malheureusement pas pu être validée selon les critères d'acceptation du protocole SFSTP. En effet, de trop fortes variations des rapports d'aires ont été observées entre la première et la dernière série de validation. Plusieurs améliorations devraient être apportées à la méthode afin de pouvoir la valider dans le futur, notamment pour le dosage de l'acide caprylique, dont l'élution est actuellement trop rapide. Toutefois, la répétabilité des injections, la stabilité et la spécificité de la méthode ont pu être démontrées. Cela signifie que cette méthode d'analyse peut être utilisée pour identifier l'acide myristique et l'acide caprylique dans les échantillons. Une quantification précise et exacte de l'acide myristique et de l'acide caprylique ne peut toutefois pas être réalisée.

8. Etude des substances extractibles

8.1. Introduction

L'insuline est administrée par voie parentérale. Il s'agit d'une voie d'administration à haut risque. Il est alors recommandé par l'USP d'effectuer une étude complète des substances extractibles pouvant être extraites des seringues BD Perfusion[®] et Sterifill[®], ainsi que des flacons COC, Promens/Elpack[®].⁹ Pour ce faire, des solvants d'extraction ayant des propriétés physico-chimiques différentes (polarité, pH etc...) sont utilisés pour l'extraction afin d'extraire le maximum de composés et ainsi d'anticiper au mieux les substances pouvant diffuser dans la préparation dans des conditions normales de stockage. Dans le cadre de cette étude, seuls le BHT, l'Antioxydant 425, l'acide myristique et l'acide caprylique sont recherchés dans les échantillons préparés.

8.2. Matériel et produits

Le tableau ci-dessous résume la liste du matériel employé pour cette étude :

Tableau 38 : Liste du matériel employé

Matériel	n° de lot	Fournisseur	Référence fournisseur	Pays
1 Lot de flacons COC	00254776	Elpack/Promens	024061	Danemark
3 Lots de seringues BD Perfusion [®]	1602209P	BD	300136	Irlande
	1601255P			
	1603204P			
Sterifill advance 50 [mL]	6060032	BD France	47406001	France
Sterifill BSCF	30683647	BD France	47402605	France
Sterifill PR	OFM03185	BD France	47396308	France
Bouchons Combi Lock	L87254-1	Codan Med. AG	16/5280	Allemagne
Bouchon septum gris 3 [mm]	30672030	Flaigg	342-V9048	Suisse
Lyoseal bleu 20 [mm]	11F090	West	3000-00000133251	USA
Pré-colonne Zorbax Eclipse Plus C-18, 2.1 x 2.5 [mm], 5 [µm]	USUQB05330	Agilent	821125-936	USA
Colonne Agilent Zorbax eclipse Plus C18, 100x3.0 [mm], 3,5 [µm]	B15216	Agilent	959961-302	USA
Vials Agilent "Deactivated vials amber, write-on spot, 2 [mL] Wide opening screw top glass vials"	000015363	Agilent	5183-2072	USA
	000015356			
Insert 440 [µL]	2086652290	Agilent	5183-2086	USA
Bouchon "Screw caps for 2 [mL] vials, blue, PTFE/silicone/PTFE septa"	193936	Agilent	5185-5862	USA
ZB-5MS, 20 [m] x 0.18 [mm] id, 0.18 [µm] film thickness	252824	Phenomenex	7FD-G002-08	USA
Vials 2 [mL] ambrés	GTG015111226	GTG GmbH	8002-CV-D	Suisse
Bouchon pour vials en caoutchouc et PTFE	1114-331	Infochroma AG	G003-ACY-Ru/TE	Allemagne
Filtre GH Polypro 0.45 [mm], diam. 47 [mm]	T307771	Pall	66548	Mexique
Tube SPE Supelclean LC18, 1 [mL]	6759201	Sigma/Supelco	504270	USA
Disposable flow control valve liners	-	Sigma/Supelco	57028	USA

Le tableau ci-dessous résume la liste des produits employés pour cette étude :

Tableau 39 : Liste des produits employés

Produit	n° de lot	Fournisseur	Référence fournisseur	Pays
Isopropanol (=2-propanol)	K47208640544	Merck	1.01040.2500	Allemagne
Sel d'ammonium acétate	BCBQ3068V	Sigma	17836	Hollande
Bisphénol M (CAS : 13595-25-0)	BCBN1490V	Sigma	23454	Japon
Irganox 415 (CAS : 96-69-5)	20160109	Chemos	132912	Allemagne
Butylhydroxytoluène	1.7	EDQM	B1215000	France
Antioxydant 425	MKBC8969V	Sigma Aldrich	1001847278	USA
Sodium phosphate dibasique dihydraté (=Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O)	K46477153603	Merck	1.19753.0250	Allemagne
Eau pour HPLC	Z0366633605 Z0375533610	Merck	1.15333.2500	Allemagne
Dichlorométhane pour HPLC	K47623144610	Merck	1.060442500	Allemagne
Méthanol	I780018518 I803918518	Merck	1.06018.2500	Allemagne
n-Hexane pour HPLC	16D060882	VWR	83992.320	Belgique
Sodium sulfate anhydre	AM0876649604	Merck	1.06649.0500	Allemagne
Acide chlorhydrique 5 [M]	HC44262011	Merck	1.09911.0001	Allemagne
Sodium hydroxyde 5 [M]	HC54854813	Merck	1.09137.1000	Allemagne
Acide myristique	CC0613V	Sigma	490873	Allemagne
Acide caprylique	TP1168V	Sigma	296457	Allemagne
Acide myristique D27	BCBR5799V	Sigma	68698	USA
Diméthylformamide pour HPLC	BCBR1134V	Sigma	101673993	Allemagne
N,O-bis(triméthylsilyl)-trifluoroacétamide (BSTFA) containing 1% triméthylchlorosilane (TMCS)	BCBQ7235V	Sigma	T6381	Allemagne
Acétone pour GC/MS	I842958632	Merck	1.00658.1000	Allemagne
Toluène pour GC/MS	I845649631	Merck	1.00849.1000	Allemagne

8.3. Appareils et équipements

Le tableau ci-dessous résume la liste des appareils et équipements employés pour cette étude :

Tableau 40 : Liste des appareils et équipements

Appareil	Numéro de série	Fabricant	Pays
Balance de précision Mettler Toledo AX 504	112 1091337	Mettler Toledo	USA
Balance standard Mettler PG 1003 S	1125020066	Mettler Toledo	USA
Bains ultrasons B5200 Branson	C-120/86	Branson	USA
Etuve (EP), Memmert ULP 400	G401.0246	Memmert	Allemagne
Etuve (EP) Runmed 4101	0412/07	Rumed	Allemagne
Rotavapeur RC-900	7441655	KNF	Suisse
Varian CP-3800 + quadrupôle MS 1200 L	00480	Varian	USA
Chromatographie en phase liquide Agilent 1100 séries	DE11109565	Agilent	USA
SPE Supelco Visiprep 24 DL	-	Sigma/Supelco	USA
Vortex	0100	VWR	USA

8.4. Méthode

8.4.1. Choix des solvants d'extraction

Selon l'USP, il est recommandé de sélectionner comme solvant d'extraction, une solution aqueuse à pH 5.2, à pH 9.5 et un mélange d'isopropanol/eau 50:50 pour l'étude des extractibles des préparations injectables.⁹

Dans l'étude sur les substances extractibles issues de différents matériaux pharmaceutiques de *Jenke D.*, l'extraction est réalisée dans une solution tampon à pH 2.5 et à pH 9.5, ainsi que dans un mélange isopropanol/eau 50:50.²¹ En se basant sur les recommandations de l'USP et sur le protocole d'extraction de *Jenke D.*, les solvants ci-dessous ont été utilisés dans le cadre de cette étude :

- 1) Un mélange isopropanol/eau 50:50:** ce mélange de solvant permet de simuler l'effet des substances tensioactives ou de solutions contenant une faible teneur en alcool. Les préparations pharmaceutiques contiennent fréquemment des tensioactifs ou des agents solubilisants qui peuvent avoir une influence sur la quantité de substances pouvant potentiellement diffuser dans la préparation.⁹
- 2) Un tampon phosphate à pH 3 et à pH 8 :** Ces pHs ont été choisis, car la plupart des préparations pharmaceutiques fabriquées ont un pH compris entre 3 et 8. Le pH de 9.5 proposé par l'USP semblait trop extrême par rapport aux pH des préparations pharmaceutiques fabriquées en milieu hospitalier, c'est pourquoi il a été abaissé à 8 dans le cadre de cette étude. Des solutions tampons stables à ces pH ont ensuite été choisies : l'acide phosphorique a un pKa de 2.15 et un pKa de 7.09.⁶¹ Il a donc un bon effet tampon au pH de 3 et 8.

8.4.2. Choix des conditions d'extraction

Plusieurs méthodes d'extraction sont proposées dans l'USP (Soxhlet, ultrasons, reflux etc...)⁹ La méthode d'extraction permet de simuler les stress auxquels sont soumis les contenants au cours du stockage. (Variation de température, agitation etc...). Dans le protocole développé par *Jenke D.*, plusieurs conditions d'extractions sont proposées (bains ultrasons, reflux, etc...)²¹

Dans le cas présent, la solution d'insuline n'est pas autoclavée et est stockée au frigo ou à température ambiante. Elle subit donc des stress au niveau thermique (variation de température entre température ambiante et frigo) et au niveau du transport et de la manipulation (agitation). Il paraît donc important d'étudier l'effet de la température et de

l'agitation sur les différents contenants de la solution d'insuline. C'est pourquoi, les méthodes d'extraction suivantes ont été retenues parmi les conditions d'extraction proposées par l'USP et par *Jenke D.* dans son protocole d'étude :

- 1) **Bains ultrasons** : les échantillons sont placés dans un bécher d'eau dont la température est maintenue à 0 [°C] avec de la glace pendant 2 heures. La température du bain à ultrasons est fixée à 0 [°C].²¹ Cela permet d'éviter une accélération de l'extraction liée à l'augmentation de la température du bain. En effet, il est connu que lorsqu'un échantillon est soumis aux ultrasons pendant plus de 30 minutes, la température de ce dernier augmente.⁸⁰ En maintenant la température à 0 [°C], il n'y a plus de variations de température et seul l'effet des ultrasons sur le contenant est étudié.²¹
- 2) **Etuve à 55 [°C] pendant 3 jours**⁷¹ : les échantillons sont placés dans l'étuve à 55 [°C] pendant trois jours. Cette méthode d'extraction permet d'évaluer dans des conditions accélérées l'effet de la température sur les différents contenants testés.

8.4.3. Plan d'échantillonnage

Comme illustré dans le tableau ci-dessous, trois seringues BD Perfusion[®] de trois lots différents, trois seringues BD Sterifill[®] du même lot et trois flacons COC, Promens/Elpack[®] du même lot ont été remplis avec 50 [mL] de chaque solvant d'extraction testé dans le cadre de cette étude et soumis aux techniques d'extraction suivantes :

Tableau 41 : Plan d'échantillonnage

Etude des substances extractibles des différents contenants					
Méthode d'extraction	Bain à ultrasons		Contenant à 55°C		
Solvant	Tampon phosphate à pH 3	Tampon phosphate à pH 8	Tampon phosphate à pH 3	Tampon phosphate à pH 8	Isopropanol/H ₂ O (50:50)
Flacon COC, Promens/Elpack [®]	3	3	3	3	3
Seringue BD Perfusion [®]	3+3+3	3+3+3	3+3+3	3+3+3	3+3+3
Seringue BD Sterifill [®]	3	3	3	3	3

Les seringues BD Perfusion[®] ont été fermées à l'aide d'un bouchon mâle/femelle Combi-Lock stérile[®] (Codan Medical), les seringues BD Sterifill[®] à l'aide du bouchon fourni avec la seringue et les flacons COC, Promens Elpack[®] à l'aide d'un septum gris (Flaigg) et d'un bouchon Lyoseal bleu (West), préalablement stérilisés par autoclavage.

Il a été décidé de maintenir assemblées les différentes parties des contenants étudiés, car cela reflète mieux les conditions réelles de stockage des préparations.⁹

Ces échantillons sont préparés en duplicata. La première série est utilisée pour l'identification et le dosage du BHT et de l'Antioxydant 425 extraits des différents contenants testés. La deuxième série est utilisée pour l'identification de l'acide myristique et l'acide caprylique extraits des différents contenants testés.

8.5. Identification et dosage par HPLC/UV-DAD du BHT et de l'Antioxydant 425 extraits des contenants remplis avec des solutions fortement polaires ou à des pH extrêmes

8.5.1. Méthode de préparation d'échantillons

8.5.1.1. Préparations des échantillons conditionnés dans du tampon phosphate à pH 3 ou à pH 8

Des liners en teflon sont placés sur la valve de contrôle du débit de la SPE. Une cartouche Supelclean LC-18 est connectée sur le liner. Le système SPE est mis sous vide en allumant la pompe à vide. La colonne SPE est activée par l'ajout de 2 x 1 [mL] de méthanol pour HPLC, puis par l'ajout de 2 x 1 [mL] d'eau pour HPLC. 2 x 1 [mL] du tampon phosphate à pH 3 ou du tampon phosphate à pH 8, puis 1 [mL] de l'échantillon sont ajoutés. Finalement, 100 [µL] d'une solution d'Irganox 415 (le standard interne) à 10 [µg/mL] sont ajoutés. La cartouche est laissée à sécher. Une fois sèche, le vide est coupé et un tube en verre propre est placé sous la cartouche. 1 [mL] de méthanol sont ajoutés dans la cartouche. Le système est mis sous vide. La cartouche est laissée à sécher. Une fois sèche, le vide est coupé. Le volume est ajusté à 1 [mL] avec du méthanol. Après agitation, la solution est injectée.

La concentration finale de l'Irganox 415 est de 1 [µg/mL].

8.5.1.2. Préparation des échantillons stockés dans un mélange d'isopropanol/eau 50:50

1 [mL] d'un échantillon rempli avec le mélange isopropanol/eau 50:50 est prélevé et déposé dans un ballon jaugé de 25 [mL]. 250 [µL] d'une solution d'Irganox 415 à 100

[$\mu\text{g}/\text{mL}$] sont prélevés. Le volume est complété à 25 [mL] avec du méthanol. 400 [μL] de cette solution sont prélevés et déposés dans un vial.

La concentration finale de l'Irganox 415 est de 1 [$\mu\text{g}/\text{mL}$].

8.5.2. Méthode d'analyse par HPLC/UV-DAD

8.5.2.1. Conditions d'analyse

Les conditions d'analyse ci-dessous sont utilisées :

Tableau 42 : Conditions d'analyse

Précolonne et Colonne	Pré-colonne Zorbax Eclipse Plus C-18, 2.1 x 2.5 [mm], 5 [μm] et colonne Agilent Zorbax Eclipse Plus C ₁₈ , 100 x 3.0 [mm], 3.5 [μm] particules	
Phase mobile	Tampon d'acétate d'ammonium à 10 [mM] à pH 4.8	Acétonitrile
Gradient	Temps	% de solution B
	0.0	5.0
	60.0	100.0
	65.0	100.0
	10 minutes de rinçage	
Débit	0.4 [mL/min]	
Volume d'injection	50 [μL]	
Détection UV	210 [nm]	
Préparation d'échantillons	Aucune, injection directe	

8.5.2.2. Courbe d'étalonnage

Conformément aux résultats de la validation de la méthode, une courbe d'étalonnage est tracée pour le BHT et l'Antioxydant 425 à partir de trois solutions standard de trois niveaux de concentration différents (à 5 [$\mu\text{g}/\text{mL}$], 2 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] et 1 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] d'Antioxydant 425 et de BHT). Le r^2 doit être supérieur à 0.999 pour être conforme.

8.5.2.3. SST

Une solution standard contenant 5 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] de BHT et d'Antioxydant 425 et 1 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] d'Irganox 415 est préparée et injectée trois fois afin de vérifier la conformité du système.

Pour être considéré comme conforme, le coefficient de variation obtenu pour les rapports d'aire du BHT et de l'Antioxydant 425 doit être inférieur à 3% et le coefficient de variation du temps de rétention doit être inférieur à 2%.

8.5.2.4. QC

Une solution standard contenant 2 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] d'Antioxydant 425 et de BHT et 1 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] d'Irganox 415 est préparée et injectée deux fois. La concentration obtenue en BHT et en Antioxydant 425 doit être comprise entre 1.80 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] et 2.20 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] pour être considérée comme conforme.

8.5.2.5. Blanc

Un blanc de chaque milieu d'extraction est préparé selon la même méthode d'extraction qu'indiquée dans le chapitre 5.3.1.2. Blanc.

8.5.3. Résultats et discussion

8.5.3.1. SST, QC, Blanc, Courbe d'étalonnage

Les résultats obtenus pour le SST, le QC et le blanc sont conformes pour le BHT et l'Antioxydant 425 et figurent en annexe XXXIII. Le r^2 obtenu pour la courbe d'étalonnage de l'Antioxydant 425 et du BHT sont conformes car ils sont > 0.999 .

8.5.3.2. Echantillons passés aux ultrasons, à 0 [°C]

Les résultats détaillés figurent en annexe XXXIV.

- **Echantillons conditionnés dans la solution tampon phosphate à pH 3**

Les résultats obtenus pour l'Antioxydant 425 dans les différents conditionnements primaires remplis avec du tampon phosphate à pH 3 et soumis aux ultrasons figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 43 : Résultats pour l'Antioxydant 425

Concentration estimée en acide myristique	Seringue BD Perfusion [®] Lot : 1602209P	Seringue BD Perfusion [®] Lot : 1603204P	Seringue BD Perfusion [®] Lot : 1601255P	Flacon COC	Seringue BD Sterifill [®]
Echantillon 1 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	0.25	0.00	0.00	0.00	0.00
Echantillon 2 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	0.25	0.63	0.00	0.00	0.00
Echantillon 3 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	0.00	0.63	0.00	0.00	0.00

Aucune trace de BHT n'a été détectée.

- **Echantillons conditionnés dans la solution tampon phosphate à pH 8**

Les résultats obtenus dans les différents conditionnements primaires remplis avec du tampon phosphate à pH 8 et soumis aux ultrasons figurent dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 44 : Résultats pour l'Antioxydant 425

Concentration estimée en acide myristique	Seringue BD Perfusion® Lot : 1602209P	Seringue BD Perfusion® Lot : 1603204P	Seringue BD Perfusion® Lot : 1601255P	Flacon COC	Seringue BD Sterifill®
Echantillon 1 [µg/mL]	0.77	0.52	0.53	0.00	0.00
Echantillon 2 [µg/mL]	0.64	0.00	0.00	0.00	0.00
Echantillon 3 [µg/mL]	0.57	0.00	1.10	0.00	0.00

Aucune trace de BHT n'a été détectée.

Une forte variation est observée au niveau des concentrations en Antioxydant 425 entre les lots et même au sein d'un même lot. En effet, au sein du même lot d'un produit, les concentrations fluctuent fortement (De 0.00 à 1.10 [µg/mL] par exemple). Cela peut s'expliquer par le fait que les conditions d'extraction n'ont pas été standardisées. Les contenants ont été placés aléatoirement dans le bain à ultrasons. En fonction de la position des contenants dans le bain à ultrasons, l'exposition aux ultrasons a pu varier. De plus, la température du bain à ultrasons était contrôlée par l'ajout régulier de glace et au moyen d'un thermomètre. L'homogénéité de la température du bain ne peut être garantie. Ainsi, il n'est pas exclu que certains échantillons aient été exposés à de plus hautes températures. Finalement, la procédure d'échantillonnage des contenants n'a pas été standardisée. La sélection des contenants dans le carton a été faite de manière aléatoire. Il est probable qu'en fonction de la localisation de l'échantillon dans le carton, le profil en substance L/E varie.⁵

Seules des traces d'Antioxydant 425 ont été détectées dans les échantillons testés et uniquement pour les seringues BD Perfusion®. Les concentrations d'Antioxydant 425 détectées fluctuent entre 0.20 [µg/mL] et 0.60 [µg/mL] dans les conditions acides et entre 0.50 [µg/mL] et 1.10 [µg/mL] dans les conditions basiques. Les concentrations en Antioxydant 425 détectées sont dans la majorité des cas en dessous du seuil de quantification de 1 [µg/mL].

Les concentrations maximales estimées en Antioxydant 425 dans 50 [mL] de chaque contenant sont les suivantes :

Tableau 45 : Concentrations maximales en acide myristique

Contenant	Seringue BD Perfusion®	Flacon COC	Seringue BD Sterifill®
Concentration maximale estimée [µg/mL]	1.1	0.0	0.0
Concentration maximale estimée dans 50 [mL] [µg/ 50 mL]	55.0	0.0	0.0
Dose administrée [µg/kg/j] (Pour un enfant de 10 [kg] et pour une seringue de 50 [mL])	5.5	0.0	0.0

Les doses administrées calculées en Antioxydant 425 pour ces contenants remplis avec 50 [mL] d'un tampon acide ou basique sont très faibles. Dans la mesure où dans des conditions extrêmes de stockage, le taux d'Antioxydant 425 extrait reste très faible, il y a, à priori, peu de risques que les concentrations en Antioxydant 425 et en BHT soient significativement plus élevées dans les préparations stockées dans des conditions normales de stockage.

8.5.3.3. Echantillons stockés pendant 3 jours à l'étuve à 55 [°C]

Les résultats détaillés figurent en annexe XXXV.

- **Echantillons conditionnés dans l'isopropanol/eau 50:50**

Les résultats de l'Antioxydant 425 détecté dans un mélange isopropanol/eau 50:50 conditionné dans les différents contenants et stocké à l'étuve à 55 [°C] pendant trois jours figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 46 : Résultats pour l'Antioxydant 425

Concentration en Antioxydant 425	Seringue BD Perfusion® Lot : 1602209P	Seringue BD Perfusion® Lot : 1603204P	Seringue BD Perfusion® Lot : 1601255P	Flacon COC	Seringue BD Sterifill®
Echantillon 1 [µg/mL]	43.08	44.24	42.55	0.00	0.00
Echantillon 2 [µg/mL]	44.24	43.56	44.08	0.00	0.00
Echantillon 3 [µg/mL]	44.28	43.92	43.18	0.00	0.00
Moyenne ± IC ₉₅ [µg/mL]	43.86 ± 2.10	43.91 ± 2.29	43.27 ± 2.29	0.00	0.00
Ecart-type	0.84	0.92	0.92	0.00	0.00
CV [%]	1.93%	2.10%	2.13%	0.00	0.00

Aucune trace de BHT n'a été détectée.

- **Echantillons conditionnés dans la solution tampon phosphate à pH 3**

Aucune trace de BHT, ni d'Antioxydant 425 n'a été détectée.

- **Echantillons conditionnés dans la solution tampon phosphate à pH 8**

Aucune trace de BHT, ni d'Antioxydant 425 n'a été détectée.

Aucune trace de BHT, ni d'Antioxydant 425 n'a été détectée dans les échantillons stockés pendant trois jours à une température de 55 [°C] dans une solution tampon phosphate à pH 3 et à pH 8. Aucune trace d'Antioxydant 425, ni de BHT n'a été détectée dans les flacons COC et dans les seringues BD Sterifill[®]. Par contre, une forte concentration en Antioxydant 425 a été détectée dans les échantillons de seringue BD Perfusion[®] remplies avec un mélange d'isopropanol/eau 50:50. En effet, des concentrations d'Antioxydant 425 allant jusqu'à 43 [µg/mL] ont été détectées dans ces échantillons. Les résultats sont reproductibles entre les lots, car la différence entre les résultats obtenus pour les différents lots n'est pas significative (selon les tests de statistiques réalisés et figurant en annexe XXXV). Cela signifie que dans 50 [mL] de cette solution, 2 [mg] d'Antioxydant 425 sont retrouvés, ce qui est très élevé. Ces résultats rejoignent ceux retrouvés par *Trittler R.* lors de l'analyse d'extrait de seringues BD Plastipak[®] remplies avec de l'éthanol.⁴²

Au niveau de la toxicité, le LD₅₀ de l'Antioxydant 425 obtenu lors d'essais de toxicité aiguë est supérieur à 10 [g/kg] de poids corporel chez les rats. Un enfant de 10 [kg] recevant 50 [mL] d'une solution conditionnée dans les seringues BD Perfusion recevrait une dose de 0.002 [g], ce qui est nettement inférieur au LD₅₀ de l'Antioxydant 425. Ainsi, les concentrations en Antioxydant 425 retrouvées dans les seringues BD Perfusion[®] restent nettement en dessous du seuil de toxicité.⁵³

Peu de solutions fabriquées par lot contiennent une teneur aussi élevée en alcool. Lors d'études futures, l'analyse de contenants remplis avec des teneurs en alcool correspondant aux teneurs en alcool couramment utilisées en pharmacie devrait être effectuée.

Afin de vérifier si la même teneur en Antioxydant 425 était retrouvée dans les seringues BD Perfusion[®] remplies avec du NaCl 0.9%, 3 seringues BD Perfusion[®] de chaque lot ont été remplies avec 50 [mL] de NaCl 0.9% et ont été placées à l'étuve à 55 [°C] pendant trois jours. Les solutions ont ensuite été préparées de la même manière que les seringues remplies avec le mélange isopropanol/eau 50:50, c'est-à-dire en les diluant 25x. Une dilution de 2x a aussi été testée. Aucune trace d'Antioxydant 425 n'a été retrouvée dans les solutions de NaCl 0.9% stockées à 55 [°C] pendant trois jours. Les résultats détaillés figurent en annexe XXXV.

Ainsi, les données retrouvées semblent être rassurantes. Dans la mesure où dans des conditions extrêmes de stockage, la concentration en Antioxydant 425 extrait reste faible et le BHT est indétectable, il y a, à priori peu de risques que les concentrations en Antioxydant 425 et en BHT soient significativement plus élevées pour les solutions stockées dans des conditions normales de stockage. Cela est confirmé par le fait qu'aucune trace d'Antioxydant 425 n'a été retrouvée dans les seringues BD Perfusion® remplies avec du NaCl 0.9% et stockées pendant 3 jours à l'étuve à 55 [°C] .

8.6. Identification par GC/MS de l'acide myristique et caprylique extraits des contenants remplis avec des solutions fortement polaires ou à des pH extrêmes

8.6.1. Méthode de préparation d'échantillons

8.6.1.1. Préparation des échantillons stockés dans du tampon phosphate à pH 3 ou à pH 8

Le contenu de chaque contenant étudié (50 [mL]) est déversé dans une ampoule à décanter. 25 [mL] de dichlorométhane y sont ajoutés. Après agitation, la phase organique est récoltée et une nouvelle extraction est réalisée à l'aide de 25 [mL] de dichlorométhane. Le pH de la solution acide est ajusté à 8 avec du NaOH 5 [N] et le pH de la solution basique est ajusté à 3 avec de l'HCl 5 [N]. Deux nouvelles extractions successives sont réalisées suite à l'ajout de 2x 25 [mL] de dichlorométhane. Les phases organiques sont ensuite rassemblées. Une spatule de sodium sulfate anhydre est ajoutée et la solution est filtrée à l'aide d'un filtre Whatman diam. 125 [mm]. Le solvant est ensuite évaporé à sec. 0.5 [mL] de cette solution sont prélevés et déposés dans un vial. 0.5 [mL] d'une solution standard d'acide myristique D27 à 1 [µg/mL] y sont ajoutés. La solution est ensuite dérivatisée selon le protocole de dérivatisation et est injectée.

8.6.1.2. Préparation des échantillons stockés dans un mélange d'isopropanol/eau 50:50

Le contenu de chaque contenant étudié (50 [mL]) est déversé dans une ampoule à décanter. Le pH de la solution est ajusté à 3 avec de l'HCl 5 [N]. 25 [mL] de dichlorométhane y sont ajoutés. Après agitation, la phase organique est récoltée et une nouvelle extraction est réalisée à l'aide de 25 [mL] de dichlorométhane. Le pH de la solution est ajusté à 8 avec du NaOH 5 [N]. Deux nouvelles extractions successives sont réalisées suite à l'ajout de 2x 25 [mL] de dichlorométhane. Les phases organiques sont ensuite rassemblées. Une spatule de sodium sulfate anhydre est ajoutée et la solution est filtrée à l'aide d'un filtre Whatman diam. 125 [mm]. Le solvant est ensuite évaporé à sec.

0.5 [mL] de cette solution sont prélevés et déposés dans un vial. 0.5 [mL] d'une solution standard d'acide myristique D27 à 1 [µg/mL] y sont ajoutés. La solution est dérivatisée selon le protocole de dérivatisation et est injectée.

8.6.2. Méthode d'analyse par GC/MS

8.6.2.1. Conditions d'analyse

Les conditions d'analyse ci-dessous ont été utilisées dans le cadre de cette étude des substances extractibles :

Tableau 47 : Conditions d'analyse des échantillons par GC/MS

Colonne	Colonne ZB-5MS, 20 [m] × 0.18 [mm], 0.18 [µm], lot : 252824
Température du four à colonne	Maintenir une température de 50 [°C] pendant 1 [min], puis augmentation de 50 [°C/min] jusqu'à 150 [°C], en 2 minutes, puis augmentation de 5 [°C/min] jusqu'à 300 [°C] en 30 minutes. Maintenir cette température pendant 3 [min].
Gaz vecteur	He à 1.0 [mL/min]
Injection	Split (20 [µL]); 3 [µL]
Température de l'injecteur	280 [°C]
Température de la ligne de transfert MS	180 [°C]
Détecteur MS	En mode SIM (m/z : 73, 118, 202, 286, 312.5) (3.0 [min] de délai d'acquisition)
Dwell time	0.5
Préparation échantillon	Réaction de dérivatisation
Solvant de rinçage de l'aiguille	Toluène, Acétone, Hexane

8.6.2.2. Courbe d'étalonnage

Afin de pouvoir estimer les concentrations en acide myristique et en acide caprylique contenues dans les échantillons, une courbe d'étalonnage comprenant trois niveaux de concentration est préparée à partir d'une solution fille contenant 2 [µg/mL] d'acide myristique et d'acide caprylique :

Tableau 48 : Courbe d'étalonnage

Standard d'étalonnage	Concentration du standard d'étalonnage [µg/mL]	Volume de solution fille à prélever [µL]	Volume de méthanol à prélever [µL]
STD1	1.00	250	250
STD2	0.40	100	400
STD3	0.20	50	450

500 [µL] de la solution fille d'acide myristique D27 à 1 [µg/mL] sont ajoutés dans chaque vial. La dérivation des échantillons est ensuite effectuée selon le protocole de dérivation. L'échantillon est injecté.

Les concentrations finales des standards d'étalonnage sont de 0.5 [µg/mL], 0.2 [µg/mL] et 0.1 [µg/mL]. La concentration finale du standard d'injection est de 0.5 [µg/mL].

8.6.2.3. SST

Une solution standard contenant 0.5 [µg/mL] d'acide caprylique, d'acide myristique et d'acide myristique D27 est préparée, dérivatisée et injectée trois fois afin de vérifier la conformité du système.

Pour être considéré comme conforme, le coefficient de variation obtenu pour les rapports d'aires de l'acide caprylique et de l'acide myristique doit être inférieur à 3% et le coefficient de variation du temps de rétention doit être inférieur à 2%.

8.6.2.4. QC

Une solution standard contenant 0.20 [µg/mL] d'acide caprylique et d'acide myristique et 0.50 [µg/mL] d'acide myristique D27 a été préparée, dérivatisée et injectée deux fois. La concentration obtenue en acide myristique et en acide caprylique doit être comprise entre 0.18 [µg/mL] et 0.22 [µg/mL] pour être considérée comme conforme.

8.6.2.5. Blanc

Un blanc de chaque milieu d'extraction a été préparé selon la même méthode d'extraction qu'indiquée dans le chapitre 7.3.1.2. Blanc.

8.6.3. Résultats et discussion

8.6.3.1. SST, QC, Blanc, Courbe d'étalonnage

Les résultats obtenus pour le SST, le QC et le blanc sont conformes pour l'acide caprylique et l'acide myristique et figurent en annexe XXXVI. Le r^2 obtenu pour l'acide myristique est conforme car il est > 0.999 .

8.6.3.2. Echantillons passés aux ultrasons à 0 [°C]

Les concentrations réelles d'acide myristique et en acide caprylique extraits n'ont pas pu être établies en raison de l'inexactitude de la méthode de dosage. Seule une estimation des concentrations en acide myristique a pu être réalisée.

Les résultats détaillés figurent en annexe XXXVII.

- **Echantillons conditionnés dans la solution tampon phosphate à pH 3**

Les résultats obtenus pour l'acide myristique dans les différents conditionnements primaires remplis avec du tampon phosphate à pH 3 et soumis aux ultrasons figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 49 : Résultats pour l'acide myristique

Concentration estimée en acide myristique	Seringue BD Perfusion® Lot : 1602209P	Seringue BD Perfusion® Lot : 1603204P	Seringue BD Perfusion® Lot : 1601255P	Flacon COC	Seringue BD Sterifill®
Echantillon 1 [µg/mL]	0.00	NA	0.00	0.16	0.00
Echantillon 2 [µg/mL]	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Echantillon 3 [µg/mL]	0.00	0.17	0.15	0.15	0.16

Aucune trace d'acide caprylique n'a été détectée.

- **Echantillons conditionnés dans la solution tampon phosphate à pH 8**

Les résultats obtenus dans les différents conditionnements primaires remplis avec du tampon phosphate à pH 8 et soumis aux ultrasons figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 50 : Résultats pour l'acide myristique

Concentration estimée en acide myristique	Seringue BD Perfusion® Lot : 1602209P	Seringue BD Perfusion® Lot : 1603204P	Seringue BD Perfusion® Lot : 1601255P	Flacon COC	Seringue BD Sterifill®
Echantillon 1 [µg/mL]	0.20	0.13	0.13	0.00	0.12
Echantillon 2 [µg/mL]	0.10	NA	0.12	NA	NA
Echantillon 3 [µg/mL]	0.00	0.31	NA	0.00	0.00

Aucune trace d'acide caprylique n'a été détectée.

Que ce soit dans les seringues BD Perfusion®, dans les seringues BD Sterifill® ou dans les flacons COC, une forte variation des concentrations en acide myristique dans chaque échantillon indépendant est observée. En effet, au sein du même lot d'un produit, les

concentrations fluctuent fortement (De 0.00 à 0.17 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] par exemple). La méthode de dosage étant inexacte, cela peut expliquer en partie la variation des concentrations observées.

D'autres causes peuvent aussi expliquer les variations des résultats : les conditions d'extraction n'ont pas été standardisées. Les contenants ont été placés aléatoirement dans le bain à ultrasons. En fonction de la position des contenants dans le bain à ultrasons, l'exposition aux ultrasons a pu varier. De plus, la température du bain à ultrasons était contrôlée par l'ajout régulier de glace et au moyen d'un thermomètre. L'homogénéité de la température du bain ne peut être garantie. Ainsi, il n'est pas exclu que certains échantillons aient été exposés à de plus hautes températures. Finalement, la procédure d'échantillonnage des contenants n'a pas été standardisée. La sélection des contenants dans le carton a été faite de manière aléatoire. Il est probable qu'en fonction de la localisation de l'échantillon dans le carton, le profil en substance L/E varie.⁵

De manière générale, l'acide myristique est moins fréquemment détecté dans les flacons COC que dans les seringues BD. L'extraction semble être plus importante pour les seringues remplies avec du tampon phosphate à pH 8 que dans celles remplies avec du tampon phosphate à pH 3. En effet, la concentration maximale estimée en acide myristique pour les seringues BD Perfusion[®] contenant du tampon phosphate à pH 8 est de 0.31 [$\mu\text{g}/\text{mL}$], tandis qu'elle est de 0.17 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] dans celles stockées dans du tampon phosphate à pH 3. La majorité des préparations pharmaceutiques fabriquées étant des solutions neutres ou légèrement acides, ces résultats sont plutôt rassurants.

Les concentrations maximales estimées en acide myristique dans 50 [mL] de chaque contenant sont les suivantes :

Tableau 51 : Concentrations maximales en acide myristique

Contenant	Seringue BD Perfusion[®]	Flacon COC	Seringue BD Sterifill[®]
Concentration maximale estimée en [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	0.3	0.2	0.2
Concentration maximale estimée dans 50 [mL] en [$\mu\text{g}/50 \text{ mL}$]	15.5	8.0	8.0
Dose administrée en [$\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$] (Pour un enfant de 10 [kg] et pour une seringue de 50 [mL])	1.6	0.8	0.8

Les doses administrées calculées d'acide myristique pour ces contenants remplis avec 50 [mL] d'un tampon acide ou basique sont très faibles. Dans la mesure où dans des conditions extrêmes de stockage, le taux d'acide myristique extrait reste très faible, il y a, à

priori, peu de risques que les concentrations en acide caprylique et en acide myristique soient significativement plus élevées dans les préparations stockées dans des conditions normales de stockage.

8.6.3.3. Echantillons stockés pendant 3 jours à l'étuve à 55 [°C]

Les concentrations réelles extraites d'acide myristique et d'acide caprylique n'ont pas pu être établies en raison de l'inexactitude de la méthode de dosage. Seule une estimation des concentrations en acide myristique a pu être réalisée

Les résultats détaillés figurent en annexe XXXVIII.

- **Echantillons conditionnés dans l'isopropanol/eau 50:50**

Les résultats de l'acide myristique détecté dans un mélange isopropanol/eau 50:50 conditionné dans les différents contenants et stocké à l'étuve à 55 [°C] pendant trois jours figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 52 : Résultats pour l'acide myristique

Concentration estimée en acide myristique	Seringue BD Perfusion® Lot : 1602209P	Seringue BD Perfusion® Lot : 1603204P	Seringue BD Perfusion® Lot : 1601255P	Flacon COC	Seringue BD Sterifill®
Echantillon 1 [µg/mL]	0.18	1.35	0.21	0.00	0.21
Echantillon 2 [µg/mL]	0.11	0.26	0.12	0.00	0.13
Echantillon 3 [µg/mL]	0.34	0.99	NA	0.00	0.11

Aucune trace d'acide caprylique n'a été détectée.

- **Echantillons conditionnés dans la solution tampon phosphate à pH 3**

Les résultats de l'acide myristique détecté dans une solution de tampon phosphate à pH 3 conditionnée dans les différents contenants et stockée à l'étuve à 55 [°C] pendant trois jours figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 53 : Résultats pour l'acide myristique

Concentration estimée en acide myristique	Seringue BD Perfusion® Lot : 1602209P	Seringue BD Perfusion® Lot : 1603204P	Seringue BD Perfusion® Lot : 1601255P	Flacon COC	Seringue BD Sterifill®
Echantillon 1 [µg/mL]	0.00	0.00	DéTECTABLE	0.00	0.00
Echantillon 2 [µg/mL]	DéTECTABLE	0.12	0.13	0.15	0.14
Echantillon 3 [µg/mL]	DéTECTABLE	0.00	NA	0.00	0.00

Aucune trace d'acide caprylique n'a été détectée.

- **Echantillons conditionnés dans la solution tampon phosphate à pH 8**

Les résultats obtenus pour l'acide myristique dans les différents conditionnements primaires remplis avec une solution de tampon phosphate à pH 8 et stockés à l'étuve à 55 [°C] pendant trois jours figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 54 : Résultats pour l'acide myristique

Concentration estimée en acide myristique	Seringue BD Perfusion® Lot : 1602209P	Seringue BD Perfusion® Lot : 1603204P	Seringue BD Perfusion® Lot : 1601255P	Flacon COC	Seringue BD Sterifill®
Echantillon 1 [µg/mL]	0.40	0.13	0.12	0.00	0.00
Echantillon 2 [µg/mL]	1.00	0.41	0.00	0.11	0.00
Echantillon 3 [µg/mL]	0.21	0.15	0.00	NA	NA

Aucune trace d'acide caprylique n'a été détectée.

Une forte variation des concentrations en acide myristique est observée quelque soit le milieu de stockage et le contenant. Hormis le fait que la méthode d'analyse est inexacte, le fait que les conditions d'extraction n'ont pas été standardisées peut aussi en être la cause. Les contenants ont été placés de manière aléatoire dans l'étuve. Il se peut que certains contenants se soient retrouvés proche de points chauds et d'autres proche de points froids. L'extraction ne s'est pas produite de manière homogène dans tous les échantillons. De plus, l'échantillonnage des contenants n'a pas été standardisé. En fonction de la

localisation de l'échantillon dans le carton, le profil en substance L/E d'un contenant peut varier.⁵

A nouveau, l'acide myristique est moins fréquemment détecté dans les flacons COC.

L'extraction semble plus importante dans les seringues remplies avec le mélange isopropanol/eau 50:50 que dans celles remplies avec un tampon phosphate à pH 3. En effet, la concentration maximale estimée en acide myristique dans les seringues BD Perfusion[®] contenant un mélange d'isopropanol/eau est de 1.35 [µg/mL], tandis qu'elle est de 0.13 [µg/mL] dans celles remplies avec du tampon phosphate à pH 3. Toutefois, ces résultats ne reflètent que peu la réalité. Peu de solutions fabriquées par lot contiennent une teneur aussi élevée en alcool. Lors d'études futures, l'analyse de contenants remplis avec des teneurs en alcool correspondant aux teneurs en alcool couramment utilisées en pharmacie devrait être effectuée.

Pour les flacons COC, l'extraction est plus importante dans le tampon phosphate à pH 3, dans lequel une concentration maximale estimée de 0.15 [µg/mL] a été observée.

Les concentrations maximales en acide myristique dans 50 [mL] de chaque contenant sont les suivantes :

Tableau 55 : Concentrations maximales en acide myristique

Contenant	Seringue BD Perfusion [®]	Flacon COC	Seringue BD Sterifill [®]
Concentration maximale estimée en [µg/ mL]	1.4	0.2	0.2
Concentration maximale estimée dans 50 [mL] en [µg/ 50 mL]	67.5	7.5	10.5
Dose administrée en [µg/kg/j] (Pour un enfant de 10 [kg] et pour une seringue de 50 [mL])	6.8	0.75	1.1

Les doses administrées d'acide myristique estimées pour ces contenants remplis avec 50 [mL] soit d'un mélange isopropanol/eau, soit d'un tampon acide ou basique sont relativement faibles. Dans la mesure où dans des conditions extrêmes de stockage la concentration en acide myristique reste faible et l'acide caprylique est indétectable, il y a, à priori peu de risques que les concentrations en acide myristique et en acide caprylique soient significativement plus élevées pour les solutions stockées dans des conditions normales de stockage.

8.7. Conclusions

Face à la fluctuation des résultats obtenus, une standardisation des conditions d'extraction et de la procédure d'échantillonnage devraient être effectuées afin d'uniformiser les résultats.

Aucune trace d'acide caprylique, ni de BHT n'a été détectée dans les échantillons testés.

De l'acide myristique a pu être extrait et identifié dans les échantillons des différents contenants testés. Il semblerait que les flacons COC soient les contenants relarguant le moins d'acide myristique.

Une quantité élevée d'Antioxydant 425 a été extraite des seringues conditionnées dans un mélange d'isopropanol/eau 50:50. Une plus faible quantité d'Antioxydant 425 a aussi été extraite des seringues BD Perfusion[®] soumises aux ultrasons et conditionnées dans du tampon phosphate à pH 3 et à pH 8. Aucune trace d'Antioxydant 425 n'a été détectée dans les échantillons des seringues BD Sterifill[®] et des flacons COC.

Ainsi, les données obtenues sont plutôt rassurantes et laissent penser que dans les conditions normales de stockage, une faible quantité des substances recherchées va être détectée.

9. Etude des substances diffusibles

9.1. Introduction

Etant donné qu'une étude des substances extractibles a été réalisée dans ces contenants, il est possible d'utiliser les mêmes méthodes d'extraction et d'analyse pour l'étude des substances diffusibles.¹⁰ La préparation d'échantillons correspond à une étape critique de cette étude, car il peut y avoir un important effet matrice lié au fait que le principe actif et l'excipient sont présents en plus grandes quantités que les substances diffusibles.¹⁰ Il est alors important de bien séparer les substances diffusibles de la matrice (principe actif et excipients).¹⁰ L'étude des substances va être faite sur une solution d'insuline à 1 [UI/mL] conditionnée dans les différents contenants testés, ainsi que sur une solution de NaCl 0.9% conditionnée dans les mêmes contenants. Seuls le BHT, l'Antioxydant 425, l'acide myristique et l'acide caprylique sont recherchés dans le cadre de cette étude.

L'étude des substances diffusibles est réalisée à long terme dans les différents contenants et selon les conditions de l'ICH Q1A (R2)⁸¹. Les analyses des échantillons sont réalisées à t_0 et à t_3 mois.

9.2. Matériel et produits

Le tableau ci-dessous résume la liste du matériel employé pour cette étude :

Tableau 56 : Liste du matériel employé

Matériel	n° de lot	Fournisseur	Référence fournisseur	Pays
1 Lot de flacons COC	00254776	Elpack/Promens	024061	Danemark
3 Lots de seringues BD Perfusion®	1602209P	BD	300136	Irlande
	1601255P			
	1603204P			
Sterifill advance 50ml	6060032	BD France	47406001	France
Sterifill BSCF	30683647	BD France	47402605	France
Sterifill PR	OFM03185	BD France	47396308	France
Bouchons male/femelle Combi Lock stériles	L87254-1	Codan Medical AG Division Homedica	16/5280	Allemagne
Bouchon septum gris 3 [mm]	30672030	Flaigg	342-V9048	Suisse
Lyoseal bleu 20 [mm]	11F090	West	3000- 00000133251	USA
Pré-colonne Zorbax Eclipse Plus C-18, 2.1 x 2.5 [mm], 5 [µm]	USUQB05330	Agilent	821125-936	USA
Colonne Agilent Zorbax eclipse Plus C18, 100x3.0 [mm], 3,5 [µm]	B15216	Agilent	959961-302	USA
Vials Agilent "Deactivated vials amber, write-on spot, 2 [mL] Wide opening screw top glass vials"	000015363	Agilent	5183-2072	USA
	000015356			
Insert "Certified microvolume inserts for wide opening vials, deactivated glass flat bottom insert 440 [µL]"	2086652290	Agilent	5183-2086	USA
Bouchon "Screw caps for 2 mL vials, blue, PTFE/silicone/PTFE septa"	193936	Agilent	5185-5862	USA
ZB-5MS, 20 [m] x 0.18 [mm] id, 0.18 [µm] film thickness	252824	Phenomenex	7FD-G002-08	USA
Vials 2 [mL] ambrés	GTG015111226	GTG Glastechnik Gräfenroda GmbH	8002-CV-D	Suisse
Bouchon pour vials en caoutchouc et PTFE	1114-331	Infochroma AG	G003-ACY- Ru/TE	Allemagne
Filtre GH Polypro 0.45 [mm], diam. 47 [mm]	T307771	Pall	66548	Mexique
Tube SPE Supelclean LC18, 1 [mL]	6759201	Sigma/Supelco	504270	USA
Disposable flow control valve liners pour les Visiprep-DL	-	Sigma/Supelco	57028	USA

Le tableau ci-dessous résume la liste des produits employés pour cette étude :

Tableau 57 : Liste des produits employés

Produit	n° de lot	Fournisseur	Référence fournisseur	Pays
Isopropanol (=2-propanol)	K47208640544	Merck	1.01040.2500	Allemagne
Sel d'ammonium acétate	BCBQ3068V	Sigma	17836	Hollande
Bisphénol M (CAS : 13595-25-0)	BCBN1490V	Sigma	23454	Japon
Irganox 415 (CAS : 96-69-5)	20160109	Chemos	132912	Allemagne
Butylhydroxytoluène	1.7	EDQM	B1215000	France
Antioxydant 425	MKBC8969V	Sigma Aldrich	1001847278	USA
Sodium phosphate dibasique dihydraté (=Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O)	K46477153603	Merck	1.19753.0250	Allemagne
Eau pour HPLC	Z0366633605	Merck	1.15333.2500	Allemagne
	Z0375533610			
Dichlorométhane pour HPLC	K47623144610	Merck	1.060442500	Allemagne
Méthanol	I780018518	Merck	1.06018.2500	Allemagne
	I803918518			
n-Hexane pour HPLC	16D060882	VWR	83992.320	Belgique
Sodium sulfate anhydre	AM0876649604	Merck	1.06649.0500	Allemagne
Acide chlorhydrique 5 [M]	HC44262011	Merck	1.09911.0001	Allemagne
Sodium hydroxyde 5 [M]	HC54854813	Merck	1.09137.1000	Allemagne
Acide myristique	CC0613V	Sigma	490873	Allemagne
Acide caprylique	TP1168V	Sigma	296457	Allemagne
Acide myristique D27	BCBR5799V	Sigma	68698	USA
Diméthylformamide pour HPLC	BCBR1134V	Sigma	101673993	Allemagne
N,O-bis(triméthylsilyl)-trifluoroacétamide (BSTFA) containing 1% triméthylchlorosilane (TMCS)	BCBQ7235V	Sigma	T6381	Allemagne
Acétone pour GC/MS	I842958632	Merck	1.00658.1000	Allemagne
Toluène pour GC/MS	I845649631	Merck	1.00849.1000	Allemagne

9.3. Appareils et équipements

Le tableau ci-dessous résume la liste des appareils et équipements employés pour cette étude :

Tableau 58 : Liste des appareils et équipements

Appareil	Numéro de série	Fabricant	Pays
Balance de précision Mettler Toledo AX 504	112 1091337	Mettler Toledo	USA
Balance standard Mettler PG 1003 S	1125020066	Mettler Toledo	USA
Machine à laver les instruments ultrasons B5200 Branson	C-120/86	Branson	USA
Etuve (EP), Memmert ULP 400	G401.0246	Memmert	Allemagne
Etuve (EP) Runmed 4101	0412/07	Rumed	Allemagne
Rotavapeur RC-900	7441655	KNF	Suisse
Varian CP-3800 + quadrupôle MS 1200 L	00480	Varian	USA
Chromatographie en phase liquide Agilent 1100 séries	DE11109565	Agilent	USA
SPE Supelco Visiprep 24 DL	-	Sigma/Supelco	USA
Flux laminaire	13287	Skan	Suisse
Vortex	0100	VWR	USA

9.4. Méthode

9.4.1. Solvants d'extraction

Les solvants d'extraction sont du NaCl 0.9%, utilisé comme diluant de la solution d'insuline et une solution d'insuline à 1 [UI/mL]. La solution commerciale d'insuline, Actrapid[®], étant 100 fois trop concentrée, une dilution préalable dans du NaCl 0.9% est nécessaire :

9.4.1.1. Préparation de la solution d'insuline

La solution d'insuline est préparée de manière aseptique dans du chlorure de sodium à 0.9% à partir de l'insuline Actrapid[®] à 100 [UI/mL] (Dilution 1/100). La solution est diluée sous flux laminaire.

9.4.2. Choix des conditions d'extraction

Les solutions sont stockées pendant 3 mois à 30 [°C] (± 2 [°C])/ 65% (± 5 %) RH à la lumière du jour.^{10,81} Ces solutions sont extraites et analysées au temps t_0 et $t_{3 \text{ mois}}$.

9.4.3. Plan d'échantillonnage

Comme illustré dans le tableau ci-dessous, trois seringues BD Perfusion[®] de trois lots différents, trois seringues BD Sterifill[®] du même lot et trois flacons COC, Promens/Elpack[®] du même lot ont été remplis avec 50 [mL] de chaque solution testée dans le cadre de cette étude et soumis aux conditions d'extraction suivantes :

Tableau 59 : Plan d'échantillonnage

Etude des substances diffusibles de la solution d'insuline à 1 [UI/mL] dans les différents contenants		
Conditions de stockage	30 [°C] (± 2 [°C])/ 65% (± 5 %) RH	
Temps	t_0	$t_{3 \text{ mois}}$
Flacon COC, Promens/Elpack [®]	3	3
Seringue BD Perfusion [®]	3+3+3	3+3+3
Seringue BD Sterifill [®]	3	3

Les seringues BD Perfusion[®] ont été fermées à l'aide d'un bouchon mâle/femelle Combi-Lock stérile[®] (Codan Medical), les seringues BD Sterifill[®] à l'aide du bouchon fourni avec la seringue et les flacons COC, Promens Elpack[®] à l'aide d'un septum gris (Flaigg) et d'un bouchon Lyoseal bleu (West), préalablement stérilisés par autoclavage.

Ces échantillons sont préparés en duplicata. La première série est utilisée pour l'identification et le dosage du BHT et de l'Antioxydant 425 extraits des différents

contenants testés. La deuxième série est utilisée pour l'identification de l'acide myristique et l'acide caprylique extraits des différents contenants testés.

9.5. Identification et dosage par HPLC/UV-DAD du BHT et de l'Antioxydant 425 dans du NaCl 0.9% et une solution d'insuline à 1 [UI/mL]

9.5.1. Méthode de préparation d'échantillons

9.5.1.1. Préparation des échantillons stockés dans du NaCl 0.9% et de l'insuline à 1 [UI/mL]

Des liners en teflon sont placés sur la valve de contrôle du débit de la SPE. Une cartouche Supelclean LC-18 est connectée sur le liner. Le système SPE est mis sous vide en allumant la pompe à vide. La colonne SPE est activée par l'ajout de 2 x 1 [mL] de méthanol pour HPLC, puis par l'ajout de 2 x 1 [mL] d'eau pour HPLC. 2 x 1 [mL] du tampon phosphate à pH 3, puis 1 [mL] de l'échantillon sont ajoutés. Finalement, 100 [µL] d'une solution d'Irganox 415 (le standard interne) à 10 [µg/mL] sont ajoutés. La cartouche est laissée à sécher. Une fois sèche, le vide est coupé et un tube en verre propre est placé sous la cartouche. 1 [mL] de méthanol est ajouté dans la cartouche. Le système est mis sous vide. La cartouche est laissée à sécher. Une fois sèche, le vide est coupé. Le volume est ajusté à 1 [mL] avec du méthanol. Après agitation, la solution est injectée.

9.5.2. Méthode d'analyse par HPLC/UV-DAD

9.5.2.1. Conditions d'analyse

Les mêmes conditions d'analyse que dans le chapitre 8.5.2.1. sont utilisées.

9.5.2.2. Courbe d'étalonnage

Idem au chapitre 8.5.2.2.

9.5.2.3. SST

Idem au chapitre 8.5.2.3.

9.5.2.4. QC

Idem au chapitre 8.5.2.4.

9.5.2.5. Blanc

Un blanc de chaque milieu d'extraction a été préparé selon la même méthode d'extraction qu'indiquée dans le chapitre 5.3.1.2. Blanc.

9.5.3. Résultats et discussion

9.5.3.1. SST, QC, Blanc, Courbe d'étalonnage

Les résultats obtenus pour le SST, le QC et le blanc sont conformes pour le BHT et l'Antioxydant 425 et figurent en annexe XXXIX. Le r^2 obtenu pour la courbe d'étalonnage de l'Antioxydant 425 et du BHT sont conformes car ils sont > 0.999 .

9.5.3.2. Echantillons stockés dans du NaCl 0.9% et de la solution d'insuline à 1 [UI/mL]

Aucune trace de BHT, ni d'Antioxydant 425 n'a été détectée dans les échantillons conditionnés dans du NaCl 0.9% et dans la solution d'insuline à 1 [UI/mL] à t_0 et t_3 mois. Les résultats détaillés figurent en annexe XL et XLI.

Ces données sont donc rassurantes. Cependant, des études supplémentaires devraient être réalisées afin de pouvoir confirmer la non-déteçtabilité de l'Antioxydant 425 et le BHT au cours du temps, c'est-à-dire après 6 mois de stockage de la solution d'insuline.

9.6. Identification par GC/MS de l'acide myristique et caprylique dans du NaCl 0.9% et une solution d'insuline à 1 [UI/mL]

9.6.1. Méthode de préparation d'échantillons

9.6.1.1. Préparation des échantillons stockés dans du NaCl 0.9%

Idem à la méthode de préparation d'échantillons décrite dans le chapitre 8.6.1.2.

9.6.1.2. Préparation des échantillons stockés dans une solution d'insuline à 1 [UI/mL]

Dans une ampoule à décanter, le contenu de chaque contenant étudié (50 [mL]) est déversé. 5 [mL] d'une solution de NaCl saturée sont ajoutés en raison de la mousse induite par l'insuline. 25 [mL] de dichlorométhane y sont ajoutés. Après agitation, la phase organique est récoltée et une nouvelle extraction est réalisée à l'aide de 25 [mL] de dichlorométhane. Le pH de la solution acide est ajusté à 8 avec du NaOH 5 [N] et le pH de la solution basique est ajusté à 3 avec de l'HCl 5 [N]. Deux nouvelles extractions successives sont réalisées suite à l'ajout de 2x 25 [mL] de dichlorométhane. Les phases organiques sont ensuite rassemblées. Une spatule de sodium sulfate anhydre est ajoutée et la solution est filtrée à l'aide d'un filtre Whatman diam. 125 [mm]. Le solvant est ensuite évaporé à sec. 0.5 [mL] de cette solution sont prélevés et déposés dans un vial. 0.5 [mL]

d'une solution standard d'acide myristique D27 à 1 [µg/mL] y sont ajoutés. L'échantillon est dérivatisé selon le protocole de dérivatisation et est injectée.

9.6.2. Méthode d'analyse par GC/MS

9.6.2.1. Conditions d'analyse

Idem au chapitre 8.6.2.1.

9.6.2.2. Courbe d'étalonnage

Idem au chapitre 8.6.2.2.

9.6.2.3. SST

Idem au chapitre 8.6.2.3.

9.6.2.4. QC

Idem au chapitre 8.6.2.4.

9.6.2.5. Blanc

Un blanc de chaque milieu d'extraction a été préparé selon les mêmes protocoles qu'indiqué dans le chapitre 7.3.1.2. Blanc.

9.6.3. Résultats et discussion

9.6.3.1. SST, QC, Blanc, Courbe d'étalonnage

Les résultats obtenus pour le SST, le QC et le blanc sont conformes pour l'acide caprylique et l'acide myristique et figurent en annexe XLII. Le r^2 obtenu pour l'acide myristique est conforme car il est > 0.999 .

9.6.3.2. Echantillons stockés dans du NaCl 0.9%

Les concentrations réelles extraites d'acide myristique et d'acide caprylique n'ont pas pu être établies en raison de l'inexactitude de la méthode de dosage. Seule une estimation des concentrations en acide myristique a pu être réalisée

Les résultats détaillés figurent en annexe XLIII.

Aucune trace d'acide myristique, ni d'acide caprylique n'a été retrouvée dans les solutions de NaCl 0.9% conditionnées dans les différents contenants testés. Le pH du NaCl 0.9% étant neutre, il semble plausible que le pouvoir d'extraction du NaCl 0.9% soit faible.

9.6.3.3. Echantillons stockés dans une solution d'insuline à 1 [UI/mL]

Les concentrations réelles extraites d'acide myristique et d'acide caprylique n'ont pas pu être établies en raison de l'inexactitude de la méthode de dosage. Seule une estimation des concentrations en acide myristique a pu être réalisée

Les résultats détaillés, ainsi que les résultats des tests statistiques figurent en annexe XLIV.

Les résultats obtenus dans les différents conditionnements primaires remplis avec une solution d'insuline à 1 [UI/mL] aux temps t_0 et $t_{3 \text{ mois}}$ figurent dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 60 : Résultats pour l'acide myristique, t_0

Concentration estimée en acide myristique	Seringue BD Perfusion® Lot : 1602209P	Seringue BD Perfusion® Lot : 1603204P	Seringue Perfusion® Lot : 1601255P	Flacon COC	Seringue BD Sterifill®
Echantillon 1 [$\mu\text{g/mL}$]	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Echantillon 2 [$\mu\text{g/mL}$]	0.00	0.00	NA	0.00	NA
Echantillon 3 [$\mu\text{g/mL}$]	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Tableau 61 : Résultats pour l'acide myristique, $t_{3 \text{ mois}}$

Concentration estimée en Acide myristique	Seringue BD Perfusion® Lot : 1602209P	Seringue BD Perfusion® Lot : 1603204P	Seringue Perfusion® Lot : 1601255P	Flacon COC	Seringue BD Sterifill®
Echantillon 1 [$\mu\text{g/mL}$]	0.12	0.11	0.11	0.00	0.00
Echantillon 2 [$\mu\text{g/mL}$]	0.11	0.11	0.12	0.00	0.00
Echantillon 3 [$\mu\text{g/mL}$]	0.11	0.11	0.11	NA	0.00
Moyenne [$\mu\text{g/mL}$] \pm IC₉₅	0.11 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01		
Variance	0.00	0.00	0.00		
Ecart-type	0.00	0.00	0.00		
CV [%]	3.35%	2.63%	4.09%		

Aucune trace d'acide caprylique n'a été détectée.

Selon les résultats obtenus, l'acide myristique a été retrouvé uniquement dans les seringues BD Perfusion®. Aucune trace d'acide myristique n'a été retrouvée dans les flacons COC et les seringues BD Sterifill®. Selon les tests statistiques réalisés, la différence des concentrations estimées en acide myristique entre les différents lots n'est pas significative. Cela signifie que l'extraction se déroule de manière uniforme quelque soit le lot utilisé.

Les concentrations en acide myristique retrouvées dans la solution d'insuline à 1 [UI/mL] ont augmenté au cours du temps pour les seringues BD Perfusion[®]. Aucune trace d'acide myristique n'était détectée au temps t_0 contre 0.11 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] au temps $t_{3 \text{ mois}}$. Cela signifie que l'insuline a la capacité d'extraire de l'acide myristique au cours du temps. Le pH de la solution d'insuline étant proche de la neutralité (pH = 6), il est peu probable que le pH ait un effet sur l'extraction de l'acide myristique dans le cas présent. Les excipients contenus dans la solution d'Actrapid[®] pourraient avoir une influence sur l'extraction de l'acide myristique. En effet, plusieurs excipients différents sont contenus dans l'Actrapid[®], notamment le glycérol et le métacrésol. Le glycérol, étant un alcool, on peut s'attendre à ce qu'il ait un effet similaire au mélange isopropanol/eau 50:50 sur les différents contenants.

L'Actrapid[®] sous sa forme non diluée a une concentration en glycérol de 16 [mg/mL]. Cela signifie que la concentration en glycérol dans la solution d'insuline à 1 [UI/mL] est de 0.16 [mg/mL], ce qui correspond à 0.02%. En l'absence de données sur le taux d'extraction d'une solution ayant une teneur en alcool inférieure à 50%, il n'est pas possible d'exclure que le glycérol contribue à l'extraction de l'acide myristique.

Il existe peu de données sur la toxicité intraveineuse de l'acide myristique. Un article mentionne l'apparition de thrombopénies transitoires suite à l'administration intraveineuse de doses d'acide myristique comprises entre 1 et 5 [mg/kg] chez des lapins.⁸² Dans le cas présent, la dose journalière d'insuline généralement administrée à un enfant de 10 [kg] est de 10 [UI], soit 10 [mL]. Avec une concentration estimée en acide myristique de 0.11 [$\mu\text{g}/\text{mL}$], on a alors 0.11 [$\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$] d'acide myristique qui sont alors administrés au patient. Cela correspond à une dose nettement inférieure à celle administrée dans le cadre de l'étude sur les lapins. Au niveau des données per os, l'ADI de l'acide myristique est de 580 [$\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$]. La concentration en acide myristique extraite des seringues BD Perfusion[®] est nettement inférieure à l'ADI.

Ainsi, les données obtenues sur la concentration en acide myristique dans les seringues BD Perfusion[®] d'insuline à 1 [UI/mL] sont rassurantes. Cependant, étant donné qu'aucune trace d'acide myristique n'a été retrouvée dans les flacons COC, ni dans les seringues BD Sterifill[®], il serait préférable de conditionner la solution d'insuline à 1 [UI/mL] dans les flacons COC ou les seringues BD Sterifill[®], afin de diminuer le risque d'exposition des patients.

9.7. Conclusions

Les données obtenues pour les composés recherchés sont rassurantes. Aucune trace d'acide caprylique, ni de BHT n'a été retrouvée. Aucune trace d'acide myristique, ni d'Antioxydant 425 n'a été retrouvée dans les flacons COC et les seringues BD Sterifill®. Aucune trace d'Antioxydant 425 n'a été retrouvée dans les seringues BD Perfusion®. Une faible concentration en acide myristique a été retrouvée dans les seringues BD Perfusion®.

Des essais supplémentaires devraient être réalisés afin de vérifier l'évolution de la concentration en acide myristique et celle des autres composés recherchés au cours du temps dans la solution d'insuline à 1 [UI/mL], c'est-à-dire après 6 mois et 1 année de stockage.

10. Conclusions générales et perspectives

Les buts principaux de cette étude étaient de rechercher, d'identifier et de quantifier, parmi les substances pouvant potentiellement être retrouvées dans les contenants étudiés, quatre substances L/E : l'Antioxydant 425, le BHT, l'acide myristique et l'acide caprylique et ceci dans trois contenants différents (les flacons COC, Promens/Elpack[®], les seringues BD Sterifill[®] et les seringues BD Perfusion[®]) remplis dans un premier temps, avec soit du tampon phosphate à pH 3, soit à pH 8, soit dans un mélange d'isopropanol/eau 50:50 (Etude des substances extractibles). Dans un deuxième temps, l'étude a été réalisée sur les mêmes contenants remplis avec une solution d'insuline à 1 [UI/mL] ou du NaCl 0.9%. (Etude des substances diffusibles).

L'acide myristique et l'acide caprylique ont été extraits par extraction liquide-liquide et analysés par GC/MS. Le BHT et l'Antioxydant 425 ont été extraits sur phase solide (SPE) et analysés par HPLC/UV-DAD. Au niveau analytique, plusieurs améliorations devront être apportées à terme aux méthodes développées, notamment pour la méthode d'analyse par GC/MS. Cette dernière n'a pas pu être validée suite à une perte de sensibilité observée au cours du temps et en raison de la variabilité de la réaction de dérivatisation. Des améliorations devraient être apportées à la méthode d'analyse afin de pouvoir la valider. Une diminution du temps d'analyse de la méthode HPLC/UV-DAD développée pourrait aussi être envisagée, car actuellement le temps d'analyse est de 65 minutes, avec une phase de rinçage de 10 minutes.

En utilisant les méthodes développées, aucune trace d'acide caprylique, ni de BHT n'a été détectée. Par contre, l'acide myristique et l'Antioxydant 425 ont pu être mis en évidence à des concentrations variables, parfois élevées, principalement dans les seringues BD Perfusion[®]. L'exemple le plus flagrant est celui des seringues BD Perfusion[®] remplies avec un mélange d'isopropanol/eau 50:50 pour lesquelles une concentration d'environ 40 [µg/mL] en Antioxydant 425 a été détectée. Toutefois, ces concentrations ne sont pas considérées comme inquiétantes, car hormis le fait que l'Antioxydant 425 est considéré comme une substance peu toxique, il est rare que des solutions administrées au patient contiennent une teneur en alcool aussi élevée.

Dans le cas de cette étude, les doses administrées au patient ont été estimées par rapport aux concentrations obtenues en acide myristique et en Antioxydant 425. Il ne s'agit pas de la dose en substances L/E réellement administrées et absorbées par le patient. Lors d'études futures, il serait intéressant de pouvoir mettre en place des études permettant de connaître avec plus de précision, la dose d'une substance L/E réellement administrée au

patient. Ce type d'études sont dénommées « études de toxico-cinétiques ». Au cours de ces études, des échantillons d'urines ou de sang sont prélevés chez des patients traités par une solution contenant les substances recherchées, par exemple la solution d'insuline à 1 [UI/mL]. Les substances contenues dans les échantillons d'urine et de sang sont ensuite extraites par différentes méthodes de préparations d'échantillons (la SPE par exemple) et analysés par une technique séparative telle que l'HPLC/MS ou la GC/MS. La mise en place de ce type d'étude permettrait d'évaluer avec précision, la présence des substances L/E chez les patients exposés.^{83,84} Cependant, ce type d'étude sont complexes à mettre en place, notamment pour le recrutement des patients volontaires et pour le développement des méthodes de préparation d'échantillons dans des matrices plasmatiques. En prenant en considération ces aspects, la faisabilité de ces études est à évaluer en fonction des moyens à disposition.

Au cours de cette étude, seuls quatre composés, l'acide myristique, l'acide caprylique, le BHT et l'Antioxydant 425, ont été « screenés » et identifiés et avec des méthodes d'analyse, dont le LOQ est nettement supérieur à l'AET. Il est clair que le profil en substances L/E des contenants étudiés ne se limite pas seulement à ces quatre composés. De nombreux autres composés non identifiés sont détectés dans les contenants étudiés. Nous sommes encore loin de pouvoir établir un profil L/E complet des contenants étudiés. Le prochain défi serait, pour chaque contenant étudié, de mettre au point des méthodes d'analyse permettant l'identification et la quantification de l'ensemble des substances détectées et dont la concentration est supérieure à l'AET. Pour ce faire, le recours à des techniques de pointe telles que l'utilisation d'un spectromètre de masse de type MS/MS serait nécessaire. En effet, ces technique permettraient d'obtenir des informations structurales sur les composés inconnus extraits et aideraient à leur identification. Grâce à l'utilisation de ces techniques, il deviendrait possible d'établir un profil L/E complet des préparations pharmaceutiques étudiées.

Bien que l'établissement d'un profil L/E soit facilité par l'utilisation de ces technologies, cela reste un projet de grande ampleur, qui nécessite beaucoup de temps et d'investissement. La mise en place d'une collaboration avec l'industrie, qui dispose de connaissances solides dans ce domaine et avec les membres du « L/E group for hospital pharmacies in Europe » est nécessaire pour permettre l'avancement de ce projet.

Ainsi, l'acquisition de connaissances dans l'étude des substances L/E extraites de contenants pharmaceutiques utilisés fréquemment en milieu hospitalier est primordiale pour pouvoir garantir la sécurité et la qualité des préparations pharmaceutiques. Les compétences développées suite à la mise en place de méthodes d'analyse des substances

L/E, permettront de donner au pharmacien des outils facilitant le choix du contenant pharmaceutique pour une préparation donnée. Il pourra ainsi sélectionner le contenant ayant le profil L/E le plus favorable. La sécurité et la qualité de nos préparations en seront grandement améliorées, car actuellement, dans le fond, que savons-nous des substances diffusibles contenues dans nos préparations ? Pouvons-nous affirmer avec certitude que ces substances ne sont pas toxiques pour le patient ?

11. Bibliographie

1. Makwana S et al. Prefilled syringes: An innovation in parenteral packaging. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2011;1(4):200-206.
2. Winsnes M et al. Diazepam Adsorption to Infusion Sets and Plastic Syringes. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*. 1981;25(2):93-96.
3. Jin S-E et al. Diazepam sorption to PVC- and non-PVC-based tubes in administration sets with quantitative determination using a high-performance liquid chromatographic method. *International Journal of Pharmaceutics*. 2016;506(1-2):414-419.
4. Casadevall N et al. Epoetin-Induced Autoimmune Pure Red Cell Aplasia. *Journal of American Society of Nephrology*. 2005;16 (Suppl 1) :S67-S69.
5. Jenke D et al. Compatibility of Pharmaceutical Products and Contact Materials. *John&Wiley Sons*. 2009.
6. Kongsgaard UE et al. Experience of unpleasant sensations in the mouth after injection of saline from prefilled syringes. *BMC Nursing*. 2010;9:1.
7. Zhao X et al. The Effect of Rubber Closures on the Haze State of Ceftriaxone Sodium. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2007;33(1):35-44.
8. Corredor C et al. Drug interactions with potential rubber closure extractables. Identification of thiol-disulfide exchange reaction products of captopril and thiurams. *Journal of Chromatography A*. 2009;1216(1):43-48.
9. USP. USP <1663> Assessment of Extractables Associated With Pharmaceutical Packaging / Delivery Systems. *USP 38 -NF 33*. 2015;(c):7166-7181.
10. USP. USP <1664> Assessment of Drug Product Leachables Associated With Pharmaceutical Packaging / Delivery Systems. *USP 38 -NF 33*. 2015;(c):7181-7193.
11. Norwood DL et al. HPLC and LC/MS Analysis of Pharmaceutical Container Closure System Leachables and Extractables. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 2009;32(11-12):1768-1827.
12. Wilczewska K et al. Troubleshooting of the determination of bisphenol A at ultra-trace levels by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2016;408(3):1009-1013.
13. Al. KH et al. Low Leachable Container System Consisting of a Polymer-Based Syringe with Chlorinated Isoprene Isobutene Rubber Plunger. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 2015;69(6):713-724.
14. FDA. Guidance for Industry : Container Closure Systems for Packaging Human Drugs and Biologics. 1999.
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070551.pdf>. consulté le 03.12.2016.
15. EMEA. Guideline on Plastic Immediate Packaging Materials. 2005.
www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003448.pdf. consulté le 03.12.2016.

16. Product Quality Research Institute (PQRI). Safety Thresholds and Best Practices for Extractables and Leachables in Orally Inhaled and Nasal Drug Products. 2006. http://pqri.org/wp-content/uploads/2015/08/pdf/LE_Recommendations_to_FDA_09-29-06.pdf, consulté le 10.02.2016.
17. Paskiet D et al. The Product Quality Research Institute (PQRI) Leachables and Extractables Working Group Initiatives for Parenteral and Ophthalmic Drug Product (PODP). *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 2013;67(5):430-447.
18. Jenke D et al. USP Plastic Packaging General Chapters: An Overview. 2013. http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/meetings/workshops/stim_article_661_final.pdf, consulté le 06.01.2016.
19. Kiminami H et al. Low Leachable Container System Consisting of a Polymer-Based Syringe with Chlorinated Isoprene Isobutene Rubber Plunger Stopper. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 2015;69(6):713-724.
20. Norwood DL et al, Controlled Extraction Study on Cyclic Olefin Copolymer (COC). 2015. http://pqri.org/wp-content/uploads/2015/11/Cyclic_Olefin_Copolymer.pdf, consulté le 11.12.2016.
21. Jenke D et al. Extractables Characterization for Five Materials of Construction Representative of Packaging Systems Used for Parenteral and Ophthalmic Drug Products. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 2013;67(5):448-511.
22. Ball DJ et al. Leachables and Extractables Handbook: Safety Evaluation, Qualification, and Best Practices Applied to Inhalation Drug Products. *John&Wiley Sons*. 2012.
23. ICH. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology. 1994. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf, consulté le 03.12.2016.
24. Riley CM et al. Specification of drug substances and products: Development and validation of analytical methods. *Elsevier*. 2013.
25. Vigneron J et al. The L/E-meeting in Spain, Granada, 2016. *Infostab Newsletter*. 2016;32 : 5. <http://www.stabilis.org/sourcesPDF/Fichier.10914.3.pdf>, consulté le 03.12.2016.
26. Fauvel M et al. 2% cyclosporine eye-drops: low density polyethylene packaging validation. *Journal de Pharmacie Clinique*. 2008;27(4):221-226.
27. Kawano K et al. The Effect of the Drip Condition (Drip Rate, Concentration) on the Leaching of Diethylhexyl Phthalate from the Administration Set into the Intravenous Cyclosporine Solutions. *Japanese Journal of Hospital Pharmacy*. 1992;18(6):658-660.
28. Hung C et al. Stability of morphine solutions in plastic syringes determined by reversed-phase ion-pair liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1988;77(8):719-723.
29. Le Hoang MD et al. Stability of morphine hydrochloride solutions in portable single-use PCA systems. Additives leaching into the morphine solutions. *Journal de Pharmacie Clinique*. 1998;17(1):35-39.

30. Hecq JD et al. Long-term stability of morphine hydrochloride in 0.9% NaCl infusion polyolefin bags after freeze-thaw treatment and in polypropylene syringes at 5 degrees C + 3 degrees C. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*. 2014;18(1):78-82.
31. Airaudo CB et al. Leaching of antioxidants and vulcanization accelerators from rubber closures into drug preparations. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 1990;1(4):231-241.
32. Tol A et al. Adsorption of human and porcine insulins to intravenous administration sets. *Pharmaceutisch Weekblad Sci Ed*. 1988;10(5):213-216.
33. Hirsch J et al. Insulin adsorption to polyolefin infusion bottles and polyvinyl chloride administration sets. *American Journal of Hospital Pharmacy*. 1981;38(7):995-997.
34. Zahid N et al. Adsorption of insulin onto infusion sets used in adult intensive care unit and neonatal care settings. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2008;80(3):359-367.
35. Li M et al. Stability of cyclosporine solutions stored in polypropylene-polyolefin bags and polypropylene syringes. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 2011;68(17):1646-1650.
36. Information professionnelle du Compendium Suisse des Médicaments. Insuline actrapid HM. 2015. <https://compendium.ch/prod/insuline-actrapid-hm/fr>, consulté le 08.12.2016.
37. FDA. FDA expands warning on Becton-Dickinson (BD) syringes being used to store compounded or repackaged drugs. 2015. <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm458952.htm>, consulté le 10.03.2016.
38. Promens. Clearvial. 2016. <http://www.packaging.promens.com/>, consulté le 27.01.2016.
39. Feutry F et al. Stability of 10 mg / mL cefuroxime solution for intracameral injection in commonly used polypropylene syringes and new ready-to-use cyclic olefin copolymer sterile vials using the LC-UV stability-indicating method. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2016;42(1):166-174.
40. BD. Catalogue des produits. 2016. <http://www.bd.com/fr/products/products.asp>, consulté le 03.12.2016.
41. Trittler R et al. Leachables—ein weltweites Problem. 2015. http://www.adka.de/solva_docs/ADKAPosterMannheim2015_19.pdf, consulté le 19.08.2015.
42. Trittler R et al. Leachables/extractables in products of the hospital pharmacy. *Krankenhauspharmazie*. 2016;37(11):479-484.
43. Yang J et al. Synthesis of cyclic olefin polymers with high glass transition temperature by ring-opening metathesis copolymerization and subsequent hydrogenation. *Journal of Polymer Science*. 2014;52(18):2654-2661.
44. BD. Plastic prefillable syringe systems. 2016 <http://www.bd.com/pharmaceuticals/products/plastic-prefillable.asp>, consulté le 03.12.2016.

45. Dopico-García MS et al. Antioxidant content of and migration from commercial polyethylene, polypropylene, and polyvinyl chloride packages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007;55(8):3225-3231.
46. Zhang H et al. Development and validation of a GC-FID method for quantitative analysis of oleic acid and related fatty acids. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2015;5(4):223-230.
47. Lalitharani S et al. GC-MS analysis of ethanolic extract of Pothos scandens leaf. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology*. 2009;3(2):159-160.
48. Bosch-Fusté J et al. Volatile profiles of sparkling wines obtained by three extraction methods and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis. *Food Chemistry*. 2007;105(1):428-435.
49. Ansorena D et al. Analysis of volatile compounds by GC-MS of a dry fermented sausage: Chorizo de Pamplona. *Food Research International*. 2001;34(1):67-75.
50. Jobling S et al. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environmental Health Perspectives*. 1995;103(6):582-587.
51. Ph. Eur. 3.1.6. Polypropylene for containers and closures for parenteral preparations and ophthalmic preparations. *Pharmacopée européenne 9.1*. 2008 : 403-406.
52. Chemspider. 2016. www.chemspider.com, consulté le 03.12.2016.
53. Sheftel OV. Indirect Food Additives and Polymers: Migration and Toxicology. *CRC Press*. 2000.
54. Lanigan RS et al. *Final Report on the Safety Assessment of BHT (1)*. *International Journal of Toxicology*. 2002; 21(Suppl 2):19-94.
55. Omaye ST et al. Effect of butylated hydroxytoluene and other antioxidants on mouse lung metabolism. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 1977;3(5-6):829-836.
56. Williams GM et al. Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives. *Food and Chemical Toxicology*. 1999;37(9-10):1027-1038.
57. Takagit A et al. Chronic Oral Toxicity of a Synthetic Antioxidant, 2,2'-Methylenebis(4-ethyl-6-tert-butylphenol), in Rats. *Journal of Applied Toxicology*. 1996;16(1):15-23.
58. Seidell A et al. Solubilities of inorganic and metal organic compounds: a compilation of quantitative solubility data from the periodical literature. *Van Nostrand Company*. 1940.
59. Burdock GA et al. Safety assessment of myristic acid as a food ingredient. *Food Chemical Toxicology*. 2007;45(4):517-529.
60. Maga J et al. Food additive toxicology. *Marcel Dekker*. 1995.
61. O'Neil MJ et al. The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. *Taylor & Francis*. 12^{ème} Edition. 1996.

62. Schabron JF et al. Determination of BHT, Irganox 1076, and Irganox 1010 Antioxidant Additives in Polyethylene by High Performance Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*. 1980;52(9):1411-1415.
63. Fries E et al. Analysis of the antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT) in water by means of solid phase extraction combined with GC/MS. *Water Research*. 2002;36(9):2319-2327.
64. Snyder LR et al. Practical HPLC method development. 2^{ème} édition. *John Wiley&Sons*. 2012.
65. Humbert L. Revue générale Extraction en phase solide (SPE): théorie et applications. *Annales de Toxicologie Analytique*. 2010;22(2):61-68.
66. Satinder A et al. Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC. *Elsevier Academic Press*. 1^{ère} édition. 2005.
67. Sun Y. Advances in Power and Energy Engineering : Proceedings of the 8th Asia-Pacific Power and Energy Engineering Conference. *CRC Press*. 2016.
68. Mizutani T et al. Derivatization of butylated hydroxytoluene for gas chromatography with electron-capture detection and HPLC/UV. *Journal of Chromatography A*. 1985; 333:171-174.
69. Hubert P et al. Validation des procédures analytiques quantitative. Harmonisation des démarches. *STP Pharma Pratiques*. 2003;13(3):101-138.
70. Tarola AM et al. High performance liquid chromatography determination of fatty acids in drying oils following lipase action. *Journal of Chromatographic Science*. 2012;50(4):294-300.
71. Jenke D et al. Experimental Protocol for Qualitative Controlled Extraction Studies on Material Test Articles Representative of Prefilled Syringe (PFS) and Small Volume Parenteral (SVP) Container Closure Systems : Extraction Methods and Analytical Testing Procedures.2015.
http://pqri.org/wp-content/uploads/2015/11/Experimental_Protocol_1.pdf, consulté le 03.12.2016.
72. Orata F et al. Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis. *Advanced Gas Chromatography- Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*. 2007:84-108.
73. Supelco/Sigma Aldrich. Fatty Acid/FAME Application Guide. 2007. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/General_Information/t408126.pdf, consulté le 03.12.2016.
74. Supelco/Sigma Aldrich. BSTFA: Product Specification. 1997. <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4800/4746.pdf>, consulté le 03.12.2016.
75. Sigma Aldrich. Myristic-d₂₇ acid. 2016 <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/68698?lang=fr®ion=CH>, consulté le 03.12.2016.
76. Agilent. Agilent J&W GC Column Selection Guide : Speed your selection with this one-stop resource https://www.agilent.com/cs/library/catalogs/Public/5990-9867EN_GC_CSG.pdf, consulté le 03.12.2016.

77. Phenomenex. Zebron GC column. 2016. <http://www.phenomenex.com/Products/Part/7FD-G010-08?returnURL=/Application/Detail/20810>, consulté le 03.12.2016.
78. Rizwan S et al. Metabolomic and trace element analysis of camel and bovine tear by GC–MS and ICP–MS. *SAUDI Journal of Biological Sciences*. 2015.
79. Basheer C et al. Analysis of endocrine disrupting alkylphenols , chlorophenols and bisphenol-A using hollow fiber-protected liquid-phase microextraction coupled with injection port-derivatization gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2004;1057(1-2):163-169.
80. Santos HM et al. *Ultrasound in Chemistry: Analytical Applications*. Wiley. 2009.
81. ICH. ICH Topic Q1A (R2) - Stability Testing of New Drug Substances and Products. 2003.http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2__Guideline.pdf, consulté le 03.12.2016.
82. Zbtnden G. Transient thrombopenia after intravenous injection of certain fatty acids. *The Journal of Lipid Research*. 1964;5(3):378-384.
83. Völkel W et al. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chemical Research in Toxicology*. 2002;15(10):1281-1287.
84. Pouech C. Développement de méthodologies analytiques pour l'étude de la migration depuis des contenants en matière plastique prévus pour des applications pharmaceutiques vers des solutions aqueuses et des fluides biologiques. 2014. <http://www.theses.fr/2014LYO10118>, consulté le 10.12.2016.

12. Annexes et table des matières des annexes

ANNEXE I :	Liste des substances L/E extraites du caoutchouc ²¹	129
ANNEXE II :	Fiche technique des flacons COC, Promens/Elpack®	131
ANNEXE III :	Liste de substances potentiellement retrouvées dans les seringues en polypropylène et en polyéthylène ⁵	132
ANNEXE IV :	Fiche technique des seringues BD Perfusion®	135
ANNEXE V :	Fiche technique des seringues BD Sterifill®	136
ANNEXE VI :	Calcul détaillé de l'AET	138
ANNEXE VII :	Protocole de la méthode de préparation d'échantillons élaboré par <i>Jenke D.</i>	139
ANNEXE VIII :	Protocole de prévalidation de la méthode de préparation d'échantillons par LLE	140
ANNEXE IX :	Protocole de prévalidation de la méthode de préparation d'échantillons par SPE.....	144
ANNEXE X :	Résultats détaillés de la répétabilité des temps de rétention avec la méthode HPLC/UV-DAD	147
ANNEXE XI :	Résultats détaillés pour le rendement d'extraction par LLE.....	148
ANNEXE XII :	Résultats détaillés de la prévalidation de la méthode LLE.....	151
ANNEXE XIII :	Résultats détaillés du rendement d'extraction SPE	154
ANNEXE XIV :	Résultats détaillés de la prévalidation SPE.....	156
ANNEXE XV :	Résultats détaillés de la pureté des pics	158
ANNEXE XVI :	Résultats détaillés de l'essai de dégradation.....	160
ANNEXE XVII :	Rapport e-noval obtenu pour la validation de la méthode d'analyse du BHT	162
ANNEXE XVIII :	Rapport e-noval obtenu pour la validation de la méthode d'analyse de l'Antioxydant 425	178
ANNEXE XIX :	Rapports d'aires et de concentrations introduits dans le logiciel e-noval pour le BHT	194
ANNEXE XX :	Rapports d'aires et de concentrations introduits dans le logiciel e-noval pour l'Antioxydant 425	195

ANNEXE XXI :	Résultats détaillés obtenus pour la stabilité	196
ANNEXE XXII :	Résultats détaillés pour les échantillons testés dans différentes conditions de dérivation	197
ANNEXE XXIII :	Analyse statistique des résultats des échantillons testés dans les différentes conditions de dérivation	200
ANNEXE XXIV :	Résultats détaillés du rendement d'extraction	202
ANNEXE XXV :	Résultats détaillés du rendement d'extraction	205
ANNEXE XXVI :	Résultats détaillés de la répétabilité des temps de rétention	208
ANNEXE XXVII :	Résultats détaillés de l'essai de dégradation.....	209
ANNEXE XXVIII :	Rapport e-noval obtenu pour la validation de l'acide myristique .	211
ANNEXE XXIX :	Rapports d'aires et de concentrations introduits dans le logiciel e-noval pour l'acide myristique.....	227
ANNEXE XXX :	Rapports d'aires et de concentrations introduits dans le logiciel e-noval pour l'acide caprylique	228
ANNEXE XXXI :	Résultats détaillés pour la répétabilité des injections.....	229
ANNEXE XXXII :	Résultats détaillés obtenus pour la stabilité	230
ANNEXE XXXIII :	Résultats détaillés du SST, QC, de la courbe d'étalonnage et du blanc.....	231
ANNEXE XXXIV :	Résultats détaillés des extraits soumis aux ultrasons pendant 2 heures à 0 [°C]	233
ANNEXE XXXV :	Résultats détaillés des extraits mis a l'étuve a 55 [°C] pendant 3 jours	237
ANNEXE XXXVI :	Résultats détaillés du SST, QC, de la courbe d'étalonnage et du blanc	247
ANNEXE XXXVII :	Résultats détaillés des extraits soumis aux ultrasons pendant 2 heures à 0 [°C]	249
ANNEXE XXXVIII :	Résultats détaillés des extraits mis a l'étuve a 55 [°C] pendant 3 jours	253
ANNEXE XXXIX :	Résultats détaillés du SST, QC, de la courbe d'étalonnage et du blanc	259
ANNEXE XL :	Résultats détaillés des extraits de la solution de NaCl 0.9%	261

ANNEXE XLI :	Résultats détaillés des extraits de la solution d'insuline à 1 [UI/mL].....	265
ANNEXE XLII :	Résultats détaillés du SST, QC, de la courbe d'étalonnage et du blanc.....	269
ANNEXE XLIII :	Résultats détaillés des extraits de la solution de NaCl 0.9%	271
ANNEXE XLIV :	Résultats détaillés des extraits de la solution d'insuline à 1 [UI/mL].....	275

Annexe I : Liste des substances L/E extraites du caoutchouc ²¹

TABLE XI
Information Related to the GC Peaks Associated with Organic Extractables from the Rubber

Peak #		Identification	CAS RN	Highest Concentration In Extract	
Set A ^a	Set B ^b			Medium	Type
28	8	Octadecanoic (Stearic) acid ^d	57-11-4	Hexane	Soxhlet
21	5	Hexadecanoic (Palmitic) acid ^c	57-10-3	Hexane	Soxhlet
—	3	C-21 oligomer ^{d,f}	—	Hexane	Soxhlet
—	13	Oleamide ^c	301-02-0	IPA	Soxhlet
24	7	Isopropyl palmitate ^c	142-91-6	Hexane	Soxhlet
—	6 ^h	Unsaturated aliphatic hydrocarbon	—	Hexane	Soxhlet
—	15	Octadecane ^d	593-45-3	IPA	Soxhlet
—	16	Octacosane ^c	630-02-4	IPA	Soxhlet
36	17	1-(4-Morpholinyl)-octanoic acid ^d	5299-54-7	IPA	Soxhlet
—	1	Morpholine ^c	110-91-8	IPA	Reflux
—	14	Tetracosane ^c	646-31-1	IPA	Soxhlet
—	19	Aliphatic hydrocarbon ^c	—	IPA	Soxhlet
—	12	10-Oxo-octadecanoic acid ^d	870-10-0	IPA	Reflux
—	18	4,4'-Dioclyldiphenylamine ^c	101-67-7	IPA	Reflux
—	2	C13-oligomer, brominated ^{d,g}	—	IPA	Reflux
—	10	Hexadecanamide ^c	629-54-9	IPA	Reflux
—	11	Docosane ^d	629-97-0	IPA	Reflux
20	4	Methyl-n-hexadecanoate ^c	112-39-0	IPA	Reflux
26	9	Octadecanoic acid, methyl ester ^d	112-61-8	Hexane	Soxhlet
33	—	Nonadecanoic acid ^d	646-30-0	pH 9.5	Sealed
11	—	Diethyl phthalate ^d	84-66-2	pH 2.5	Sealed
32	—	9-Oxo-octadecanoic acid, methyl ester ^c	1842-70-2	IPA/Water	Sealed
17	—	Tri-tert-butyl-di-hydroxy benzene ^e	24851-96-5	IPA/Water	Sealed
10	—	Dodecanoic acid ^d	143-07-7	pH 9.5	Sealed
38	—	n-Decanoyl morpholine ^e	5299-65-0	IPA/Water	Sealed

Notes:

Figure 1 : Liste des substances extraites du caoutchouc (Analyse par GC)²¹

Summary of Identified Organic Extractables from the Rubber, LC Analysis

Peak		Identification ^c	CAS RN
Set A ^a	Set B ^b		
— ^f	1 ^g	Hexanoic acid morpholide	17598-10-6
—	2 ^g	Dihydroxy stearic acid	858802-85-4 ⁱ
—	3 ^g	9,10-Epoxy stearic acid (cis/trans)	13980-07-9
—	4 ^g	9,10-Epoxy stearic acid (cis/trans)	24560-98-3
—	5	3,5-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxy-benzaldehyde ^e	1620-98-0
—	6 ^g	2,6-Di-tert-butylbenzoquinone ^d	719-22-2
—	7	2,6-Bis-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-phenol, BHT ^e	128-37-0
7	8 ^g	Hexadecanoic (Palmitic) acid ^e	57-10-3
—	9 ^g	Oleamide ^e	301-02-0
—	10 ^g	Palmitic acid morpholide ^d	5299-68-3
12	11 ^g	Octadecanoic (Stearic) acid ^e	57-11-4
—	12 ^g	Stearic acid morpholide ^d	5299-54-7
—	13	3,5-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxy-benzenepropanoic acid, 1,1'-[2-[[3-[3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxyphenyl]-1-oxopropoxy]methyl]-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediyl] ester ^e	84633-54-5
—	14	Diocetyldiphenylamine ^e	101-67-7
—	15 ^g	Diglyceride, epoxidized	N/A
—	16 ^g	Diglyceride, epoxidized	N/A
—	17	3,5-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxy-benzenepropanoic acid, 1,1'-[2,2-bis[[3-[3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxyphenyl]-1-oxopropoxy]methyl]-1,3-propanediyl] ester, Irganox 1010 ^e	6683-19-8
1 ^h	—	Morpholine ^d	110-91-8
3	—	Tetradecanoic (Myristic) acid ^e	544-63-8
5,6	—	Unspecified oligomers	—

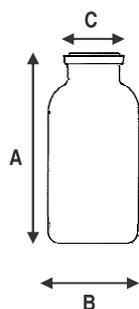
Figure 2 : Liste des substances extraites du caoutchouc (Analyse par HPLC)²¹

Annexe II : Fiche technique des flacons COC, Promens/Elpack®



COC / COP VIALS

3ml, 5ml, 10ml, 20ml, 25ml, 50ml, 100ml



Ref. n°	1874	1875	1876	1877	1878	1879	1880
Volume	3 ml	5 ml	10 ml	20 ml	25 ml	50 ml	100 ml
Material	COC / COP	COC / COP	COC / COP	COC / COP	COC / COP	COC / COP	COC / COP
Colour	Natural/Amber	Natural/Amber	Natural/Amber	Natural/Amber	Natural/Amber	Natural/Amber	Natural/Amber
Dimension A (mm)	35	40	45	55	65	73	94.5
Dimension B (mm)	19.3	22	26	31	41	43	52.6
Dimension C (mm)	Ø16	Ø22	Ø24	Ø30	Ø30	Ø42.5	Ø51.6
Neck (mm)	Ø13	Ø20	Ø20	Ø20	Ø20	Ø20	Ø20
Weight (gr)	2.05	2.74	3.92	5.48	6.25	10.1	14.8
Packing * (pcs/brick)	230	230	162	98	85	55	41
Packing * (pcs/carton)	5,750	4,140	2,592	1,372	1,105	605	492
Volume of carton (m ³)	0.094	0.094	0.094	0.094	0.094	0.094	0.144
Carton dimension l x w x h (mm)	600x400x391	600x400x391	600x400x391	600x400x391	600x400x391	600x400x391	800x400x450
Carton weight filled (kg)	12.5	12.3	11.2	8.5	7.9	6.0	7.0
Cartons/ EUR pallet	20	20	20	20	20	20	15
Quantity/ EUR pallet *	115,000	82,800	51,840	27,440	22,100	12,100	7,380
Sterilization	Irradiation / Autoclaving						
Rubber disc or stopper-cap	The bottles fit rubber plugs according to ISO 8362-2 and aluminium caps according to ISO 8362-3/6						

The data set forth herein has been carefully compiled by Promens Medical Packaging A/S. However, there is no warranty of any kind either express or implied, applicable to its use and the user assumes all risk and liability in connection therewith.

* subject to change



Annexe III : Liste de substances potentiellement retrouvées dans les seringues en polypropylène et en polyéthylène ⁵

TABLE A4. Extractables Associated with Polypropylene (PP) Materials

Chemical Name	Popular Name	CAS RN	Chemical Formula	Molecular Weight
2,5-Cyclohexanedione-1,4-dione				
4-Methyl-2,3-pentanone				
Acetic acid-(1-ethylhexyl) ester				
Acid amide				
N,N'-bis-(2-hydroxyethyl)-C ₁₂ -C ₁₄ -amine				
Polyethylene glycol	PEG	25322-68-3	(C ₂ H ₄ O) _n H ₂ O	
3-Methyl-2-butanone		563-80-4	C ₆ H ₁₀ O	86.13
3-Methyl-4-methylene-hexane-2-one		141-79-7	C ₈ H ₁₆ O	98.14
3-Methyl-butanoic acid	Isovaleric acid	503-74-2	C ₇ H ₁₄ O ₂	102.13
Acetic anhydride		108-24-7	C ₄ H ₆ O ₃	102.09
4-Hydroxy-4-methyl-pentanone		123-42-2	C ₈ H ₁₆ O ₂	116.16
Octanoic acid	Caprylic acid	124-07-2	C ₈ H ₁₆ O ₂	144.21
2-(2-Butoxyethoxy)ethanol		112-34-5	C ₈ H ₁₈ O ₃	162.23
2(3)-tert-Butyl-4-methoxyphenol	BHA	25013-16-5	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	180.25
1,3-Di-tert-butyl benzene		1014-60-4	C ₁₄ H ₂₂	190.32
2,4-Di-tert-butyl phenol		96-76-4	C ₁₄ H ₂₀ O	206.33
2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol	BHT	128-37-0	C ₁₅ H ₂₄ O	220.35
Tetradecanoic acid	Myristic acid	544-63-8	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228.37
3-Hexadecanol		593-03-3	C ₁₆ H ₃₄ O	242.44
Benzopyrene		50-32-8	C ₂₀ H ₁₂	252.31
Hexadecanoic acid	Palmitic acid	57-10-3	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.42
Lauryl hydrogen sulfate		151-41-7	C ₁₂ H ₂₅ O ₂ S	266.40
7,9-di-t-Butyl-1-oxaspiro[4.5] deca-6,9-diene-2,8-dione	Irganox degradate	82304-66-3	C ₁₇ H ₁₆ O ₃	276.37
3-(3',5'-di-t-Butyl-4'-hydroxyphenyl) propanoic acid	Irganox degradate	20170-32-5	C ₁₇ H ₂₀ O ₃	278.39
Octadecanoic acid	Stearic acid	57-11-4	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284.48
3-(3',5'-di-t-Butyl-1'-hydroxy-4'-oxacyclohexa-2',5'-dienyl) propanoic acid	Irganox degradate	83237-15-4	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	294.39
Eicosanoic acid	Arachidic acid	506-30-9	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	312.53
2-Hydroxy-4-n-octoxy-benzophenone	Chimassorb 81	1843-05-6	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	326.43
13-Docosenamide	Erucamide	112-84-5	C ₂₂ H ₄₂ NO	337.58
Didodecyl 3,3'-thiodipropionate	Irganox PS800	123-28-4	C ₂₆ H ₅₀ O ₄ S	514.84
3,5-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxybenzenepropanoic acid octadecyl ester	Irganox 1076	2082-79-3	C ₂₈ H ₄₈ O ₃	530.86
Tris(2,4-di-tert-butylphenyl) phosphite	Irgafos 168	31570-04-4	C ₄₀ H ₆₀ O ₃ P	646.93
2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)-phenol, 1,1',1''-phosphate	Irgafos 168 Phosphate	95906-11-9	C ₄₂ H ₆₀ O ₄ P	662.92
Tetrakis(2,4-di-tert-butylphenyl)-1,1-biphenyl-4,4'-diylbisphosphonite	PEPQ	38613-77-3	C ₆₈ H ₁₀₂ O ₄ P ₂	1035.41
Pentaerythritol tetrakis(3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate)	Irganox 1010	6683-19-8	C ₇₃ H ₁₀₈ O ₁₂	1177.65

351

Figure 1 : Liste des substances extractibles associées au polypropylène ⁵

TABLE A5. Extractables Associated with Polyethylene (PE) Materials

Chemical Name	Popular Name	CAS RN	Chemical Formula	Molecular Weight
Acid amide				
Acetaldehyde		75-07-0	C ₂ H ₄ O	44.05
Ethanol		64-17-5	C ₂ H ₆ O	46.07
Propane		74-98-6	C ₃ H ₈	44.10
Propanal		123-38-6	C ₃ H ₆ O	58.08
n-Butane		106-97-8	C ₄ H ₁₀	58.12
Acetic acid		64-19-7	C ₂ H ₄ O ₂	60.05
2-Propanol	IPA	67-63-0	C ₃ H ₈ O	60.10
Butyraldehyde		123-72-8	C ₄ H ₈ O	72.11
Methylethylketone		78-93-3	C ₄ H ₈ O	72.11
Propionic acid		79-09-4	C ₃ H ₆ O ₂	74.08
Butanol		71-36-3	C ₄ H ₁₀ O	74.12
Benzene		71-43-2	C ₆ H ₆	78.11
Hexene		592-41-6	C ₆ H ₁₂	84.16
3-Pentanone		96-22-0	C ₅ H ₁₀ O	86.13
n-Pentanal		110-62-3	C ₅ H ₁₀ O	86.13
Hexane		110-54-3	C ₆ H ₁₄	86.18
n-Butyric acid		107-92-6	C ₄ H ₈ O ₂	88.11
Toluene		108-88-3	C ₇ H ₈	92.14
Phenol		108-95-2	C ₆ H ₆ O	94.11
1-Heptene		592-76-7	C ₇ H ₁₄	98.19
2-Hexanone		591-78-6	C ₆ H ₁₂ O	100.16
3-Hexanone		589-38-8	C ₆ H ₁₂ O	100.16
Hexanal		66-25-1	C ₆ H ₁₂ O	100.16
n-Heptane		142-82-5	C ₇ H ₁₆	100.20
Pentanoic acid	n-Valeric acid	109-52-4	C ₅ H ₁₀ O ₂	102.13
Hexanol		626-93-7	C ₆ H ₁₄ O	102.17
Styrene		100-42-5	C ₈ H ₈	104.15
Diethylene glycol	DEG	111-46-6	C ₄ H ₁₀ O ₃	106.12
Ethyl benzene		100-41-4	C ₈ H ₁₀	106.17

1-Octene		111-66-0	C ₈ H ₁₆	112.21
Caprolactam		105-60-2	C ₈ H ₁₁ NO	113.16
3-Heptanone		106-35-4	C ₇ H ₁₄ O	114.19
Heptanal		111-71-7	C ₇ H ₁₄ O	114.19
3-Ethylhexane		619-99-8	C ₈ H ₁₈	114.23
Octane		111-65-9	C ₈ H ₁₈	114.23
2-Butoxyethanol		111-76-2	C ₈ H ₁₈ O ₂	118.17
4-Methylbenzaldehyde		104-87-0	C ₈ H ₈ O	120.15
1-Phenyl-1,2-Epoxyethane	Epoxyethane	96-09-3	C ₈ H ₈ O	120.15
Cumene		98-82-8	C ₉ H ₁₂	120.19
3-Octanone		106-68-3	C ₈ H ₁₆ O	128.21
n-Nonane		111-84-2	C ₉ H ₂₀	128.26
6-Aminocaproic acid		60-32-2	C ₈ H ₁₅ NO ₂	131.17
Butoxypropanol		29387-86-8	C ₇ H ₁₆ O ₂	132.20
Tetramethyl succinonitrile		3333-52-6	C ₈ H ₁₂ N ₂	136.19
Isophorone		78-59-1	C ₉ H ₁₆ O	138.21
Decene		872-05-9	C ₁₀ H ₂₀	140.27
1-Nonanal		124-19-6	C ₉ H ₁₈ O	142.24
n-Decane		129-18-5	C ₁₀ H ₂₂	142.28
2,4,6-Trimethylbenzaldehyde	Mesityl aldehyde	487-68-3	C ₁₀ H ₁₂ O	148.20
Ethylbenzoate		93-89-0	C ₉ H ₁₀ O ₂	150.17
n-Undecane		1120-21-4	C ₁₁ H ₂₄	156.31
Dodecene		6842-15-5	C ₁₂ H ₂₄	168.32
2,2,4,6,6-Pentamethyl heptane		13475-82-6	C ₁₂ H ₂₆	170.33
n-Dodecane		112-40-3	C ₁₂ H ₂₆	170.33
2-cyclohexylidene-cyclohexanone		1011-12-7	C ₁₂ H ₁₈ O	178.27
Benzophenone		119-61-9	C ₁₃ H ₁₀ O	182.22
n-Tridecane		629-50-5	C ₁₃ H ₂₈	184.36
1,3-Di-tert-butyl benzene		1014-60-4	C ₁₄ H ₂₂	190.32
Ethyl-4-ethoxybenzoate		23676-09-7	C ₁₇ H ₁₈ O ₃	194.23
2,5-Dibutylthiophene		6911-45-1	C ₁₂ H ₂₀ S	196.35

Figure 2 : Liste des substances extractibles associées au polyéthylène (Partie 1)⁵

TABLE A5. *Continued*

Chemical Name	Popular Name	CAS RN	Chemical Formula	Molecular Weight
N,N-dimethyl-p-toluenesulfonamide		599-69-9	C ₉ H ₁₃ NO ₂ S	199.27
Dodecanoic acid	Lauric acid	143-07-7	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	200.32
2-(2-Butoxyethoxy)-ethyl acetate		124-17-4	C ₁₀ H ₂₀ O ₄	204.26
tert-Butylphenyl glycidylether		3101-60-8	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	206.28
2,6-di-t-Butyl phenol		128-39-2	C ₁₄ H ₂₂ O	206.32
2,4-Di-tert-butyl phenol		96-76-4	C ₁₄ H ₂₂ O	206.33
2-(1-Hydroxycyclohexyl)-aceto phenone		57213-26-0	C ₁₄ H ₁₈ O ₂	218.29
2,6-Di-tert-butylbenzoquinone		719-22-2	C ₁₄ H ₂₀ O ₂	220.31
Diethyl phthalate	DEP	84-66-2	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	222.24
Tetradecanoic acid	Myristic acid	544-63-8	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228.37
Hexadecanoic acid	Palmitic acid	57-10-3	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.42
Diisobutyl adipate		141-04-8	C ₁₄ H ₂₆ O ₄	258.35
7,9-Di-tert-butyl-1-oxasoiro[4,5] deca-6,9-diene-2,8-dione	Irganox degradate	82304-66-3	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	276.37
Dibutyl phthalate	DBP	84-74-2	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278.34
di-Isobutyl phthalate		84-69-5	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278.34
3-(3',5'-di-t-Butyl-4'-hydroxyphenyl) propanoic acid	Irganox degradate	20170-32-5	C ₁₇ H ₂₀ O ₃	278.39
3-(3',5'-di-t-Butyl-1'-hydroxy-4'- oxacyclohexa-2',5'-dienyl) propanoic acid	Irganox degradate	83237-15-4	C ₁₇ H ₂₀ O ₄	294.39
Triphenyl phosphate		115-86-6	C ₁₈ H ₁₅ O ₄ P	326.29
2-Hydroxy-4-n-octoxy-benzophenone	Chimassorb 81	1843-05-6	C ₂₁ H ₂₉ O ₃	326.43
3,3',5,5'-Tetrakis(tert-butyl) stilbenequinone		809-73-4	C ₃₀ H ₄₀ O ₂	434.65
Didodecyl 3,3'-thiodipropionate	Irganox PS800	123-28-4	C ₃₀ H ₅₈ O ₄ S	514.84
3,5-Bis(1,1-dimethylethyl)-4- hydroxybenzenepropanoic acid octadecyl ester	Irganox 1076	2082-79-3	C ₃₅ H ₆₂ O ₃	530.86
Tris(2,4-di-tert-butylphenyl) phosphite	Irgafos 168	31570-04-4	C ₄₂ H ₆₃ O ₃ P	646.93
1,3,5-Dimethyl-2,4,6-tris(3,5-tert- butyl-4-hydroxybenzyl)benzene	Irganox 1330	1709-70-2	C ₅₄ H ₇₈ O ₃	775.20
Pentaerythritol tetrakis(3-(3,5-di-tert-butyl-4- hydroxyphenyl)propionate)	Irganox 1010	6683-19-8	C ₇₃ H ₁₀₈ O ₁₂	1177.65

Figure 3 : Liste des substances extractibles associées au polyéthylène (Partie 2)⁵

Annexe IV : Fiche technique des seringues BD Perfusion[®]



BD Plastipak[™] 20, 30, 50, 100 ml

Seringues 3 pièces grande capacité
Stérile, usage unique



Classe I (seringues sans aiguille)
selon la directive européenne 93/42/CEE sur les dispositifs médicaux.

Marquage CE :

Selon la directive européenne 93/42/CEE
(procédure de conformité annexe V et VII)

• **Certificats :** n° 95 Q 252.156 et n° Q 252.231
(références 309661 & 309620) ; certifié par NSAI (n°0050)

• **Fabricants :** Becton Dickinson, Drogheda, Irlande et
Becton Dickinson, Columbus, USA
(références 309661 & 309620)

• **Certification :**

Drogheda : ISO 9001 : 2008, Certificat n°ES-0264/1994,
certifié par IQNet & AENOR et I.S. EN ISO 13485 : 2003 ;
Certificat n° MD 19.1609 ; certifié par NSAI

Columbus : ISO 9001 : 2008, Certificat n°19.2143, certifié par
NSAI et I.S. EN ISO 13485 : 2003 ; Certificat n° MD 19.2143 ;
certifié par NSAI

• **Stérilisation :** Oxyde d'éthylène (ETO)
Radiation Gamma (réf. 309661 & 309620)

• **Conditions de stockage :** Tenir au sec et éviter les
températures extrêmes

• **Péremption :** 5 ans après stérilisation

Indications :

Pour injecter et prélever des fluides médicamenteux.
Les seringues 50 ml Luer Lock sont particulièrement
adaptées pour les appareils automatiques de perfusion :
pousse-seringues, pompes, ...
Elles sont homologuées avec toutes les grandes marques
de pousse-seringues.

Composition des différents éléments :

- Corps de la seringue : Polypropylène (PP)
- Piston : Polypropylène (PP)
Polyéthylène (PE) - (réf. : 300137, 300139)
- Joint de piston : Isoprène synthétique (sans latex)
- Lubrifiant : Silicone
- Emballage individuel : Papier de GSM
Film en Polyéthylène (PE) / Polyamide (PA)

Certifié :

- Sans Latex
- Sans DEHP
- Sans Phtalate



BD
BD Medical
Pharmaceutical Systems
 11, rue Aristide Bergès - ZI des Iles
 38800 Le Pont de Claix FR

CONFORMITY CERTIFICATE

Product Name	:	STERIFILL ADVANCE 50ML		
Catalog Number	:	47406001		
Batch Number	:	6060032		
Expiration Date	:	2018/03/31		
Characteristic	Unit	Value	LowLimit	HighLimit
Sterilization Date		2016/04/04		
<u>BD STERIFILL ADVANCE 50 ML SCF SYRINGE BARREL WITH LUER TIP, LUER LOCK ADAPTOR AND SCREWED TIP CAP (S-LOK)</u>				
<p>We hereby certify that the BD STERIFILL ADVANCE 50 mL SCF crystal clear polymer syringe barrel with Luer Lock Adaptor and screwed tip cap (S-Lok) conforms to specifications in effect.</p> <p>SYRINGE BARREL, SCREWED TIP CAP (S-LOK) AND LUER LOCK ADAPTOR (LLA) MATERIALS CONFORMITY</p> <p>The plastic material of the barrel meets the identification tests according to the US Pharmacopeia USP <661> (containers - plastics) and the BD Monograph for polycycloolefin resin developed based on European Pharmacopeia - current editions.</p> <p>The elastomeric part of the tip cap:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Meets the identification tests according to ISO 8871-2 standard, - Has been qualified according to the Eur. Ph. 3.2.9 and USP < 381>, physicochemical testing for elastomeric closures type I - current editions. <p>LUER LOCKS CONFORMITY</p> <p><u>Internal barrel lubricant</u>: silicone gel. Viscosity at 25°C: 500 - 2000 Pa.s. Before irradiation, the lubricant is compliant with internal BD Monograph.</p> <p>SYRINGE BARREL (WITH LUER LOCK ADAPTOR) CONFORMITY</p> <p>The SCFTM device (barrel, luer lock adaptor, screwed tip cap (S-Lok), lubricant) has been qualified according to the biological testing of the ISO 10993 applicable standards (parts 4, 5, 10 and 11) - current editions: Biological evaluation of Medical Device.</p> <p>The SCFTM device is compliant with:</p> <ul style="list-style-type: none"> - ISO 594 (Luer fittings - part 2) applicable standard - current edition. <p>Through control strategy including product verification, process validation, and routine manufacturing inspections (BD and certified suppliers), BD Sterifill Advance syringe barrel conforms to specifications and/or drawings in effect for the following characteristics:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Visual, -Dimensional, -Leak test, -Lubrication, -Particulate count. 				

Creation Date: 2016/04/15 14:00:11



BD
BD Medical
Pharmaceutical Systems
11, rue Aristide Bergès - ZI des Iles
38800 Le Pont de Claix FR

CONFORMITY CERTIFICATE

Page: 2 of 2

Product Name : STERIFILL ADVANCE 50ML
Catalog Number : 47406001
Batch Number : 6060032
Expiration Date : 2018/03/31

Results not communicated on this Certificate are recorded on relevant files at the concerned BD site.

STERILITY

The referenced lot is certified sterile. The sterilization process by Gamma radiation has been validated following ISO 11137 to achieve a 10⁻⁶ SAL (Sterility Assurance Level).

BACTERIAL ENDOTOXINS

Bacterial endotoxins search are based on the European Pharmacopoeia (2.6.14 Bacterial endotoxins), and the USP (85. Bacterial endotoxins test), current editions. It meets the limit of no more than 1 EU/ barrel.

BD Medical- Pharmaceutical Systems
Quality Assurance
Release date: 2016/04/15
Name (Electronic Signature): Lydie Mounier

BD STERIFILL and SCF are trademarks of BECTON DICKINSON and Company.
This certificate is produced electronically and is valid without signature.
103.MQC.320 rev 03

Creation Date: 2016/04/15 14:00:11

Annexe VI : Calcul détaillé de l'AET

- **pour les seringues BD Perfusion[®] :**

$$AET_{\text{seringue BD perfusion}} = \left(\frac{0.15 [\mu\text{g} / \text{j}]}{10.00 [\text{mL} / \text{j}]} \right) \cdot \left(\frac{50.00 [\text{mL}]}{39.20 [\text{g}]} \right) = 0.02 [\mu\text{g} / \text{g}] = 0.02 [\text{ppm}]$$

L'AET est de 0.02 [ppm] pour les produits conditionnés dans les seringues BD Perfusion[®].

- **pour les seringues BD Sterifill[®] :**

$$AET_{\text{seringue BD Sterifill}} = \left(\frac{0.15 [\mu\text{g} / \text{j}]}{10.00 [\text{mL} / \text{j}]} \right) \cdot \left(\frac{50.00 [\text{mL}]}{40.45 [\text{g}]} \right) = 0.02 [\mu\text{g} / \text{g}] = 0.02 [\text{ppm}]$$

L'AET est de 0.02 [ppm] pour les produits conditionnés dans les seringues BD Sterifill[®].

- **pour les flacons COC, Promens/Elpack[®] :**

$$AET_{\text{flacons COC}} = \left(\frac{0.15 [\mu\text{g} / \text{j}]}{10.00 [\text{mL} / \text{j}]} \right) \cdot \left(\frac{50.00 [\text{mL}]}{21.41 [\text{g}]} \right) = 0.04 [\mu\text{g} / \text{g}] = 0.04 [\text{ppm}]$$

L'AET est de 0.04 [ppm] pour les produits conditionnés dans les flacons COC Promens/Elpack[®].

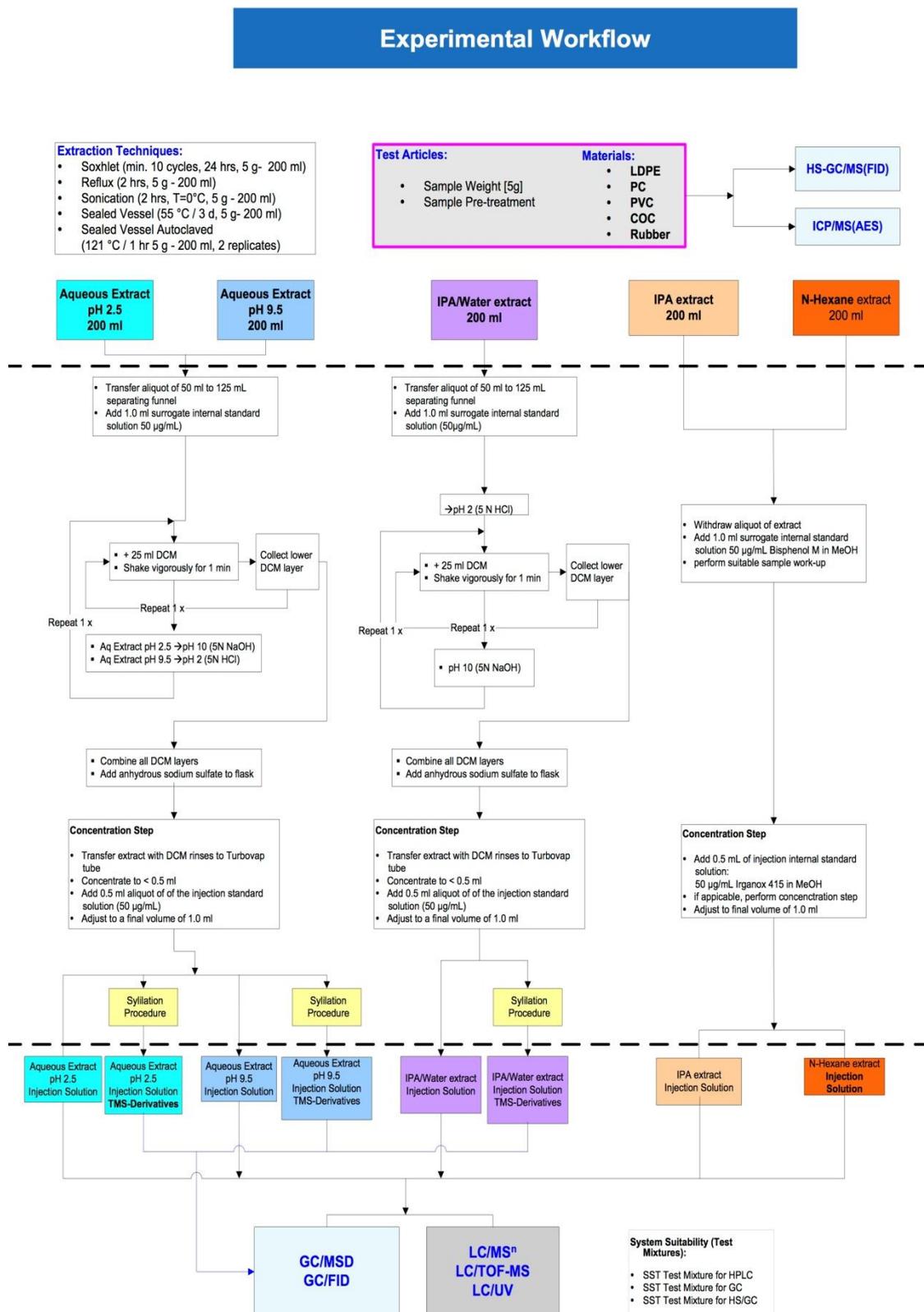


Figure 1 : Protocole d'étude^{21,71}

Annexe VIII : Protocole de prévalidation de la méthode de préparation d'échantillons par LLE

Le protocole de prévalidation ci-dessous a été suivi :

1. Préparation des standards d'étalonnage

Des solutions mères des substances d'intérêt (BHT, Antioxydant 425) et du standard interne de préparation d'échantillons (Bisphénol M) sont préparées selon le protocole ci-dessous :

- 1) **Solution mère de Butylhydroxytoluène** : Dissoudre exactement **10.0 [mg]** de BHT dans 10 [mL] de méthanol.
- 2) **Solution mère d'Antioxydant 425** : Dissoudre exactement **10.0 [mg]** d'Antioxydant 425 dans 10 [mL] de méthanol.
- 3) **Solution mère de Bisphénol M** : Dissoudre exactement **10.0 [mg]** de Bisphénol M dans 10 [mL] de méthanol.

Une solution fille contenant un mélange de BHT, d'Antioxydant 425 et de Bisphénol M est ensuite préparée selon le protocole ci-dessous :

Solution fille à 100 [µg/mL] : Prélever 1000 [µL] de chaque solution mère et compléter à 10 [mL] avec du méthanol.

Les standards d'étalonnage sont ensuite préparés à partir de la solution fille à 100 [µg/mL] selon le schéma de dilution figurant dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 : Standard d'étalonnage

Standard d'étalonnage	Concentration du standard d'étalonnage [µg/mL]	Volume de solution fille à prélever [µL]	V _{Méthanol} [mL]
STD1	10.0	1000	Ad 10
STD2	4.0	400	
STD3	2.0	200	
STD4	1.0	100	
Blanc	1000 [µL] de méthanol		

Prélever 200 [µL] de chaque solution standard d'étalonnage et le déposer dans un vial.

Le standard interne d'injection doit ensuite être ajouté à chaque standard d'étalonnage. Pour ce faire, une solution mère d'Irganox 415, le standard interne d'injection, à 1 [mg/mL] est préparée selon le protocole ci-dessous :

Solution mère d'Irganox 415 : Dissoudre exactement **10.0 [mg]** d'Irganox 415 dans 10 [mL] de méthanol.

Une solution fille d'Irganox 415 à 2 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] est ensuite préparée selon le protocole ci-dessous :

Solution fille d'Irganox 415 à 2 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] : Prélever 50 [μL] de la solution mère et compléter à 25 [mL] avec du méthanol.

Ajouter 200 [μL] de la solution fille d'Irganox 415 à 2 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] dans chaque vial.

Les concentrations finales des standards d'étalonnage sont de 5 [$\mu\text{g}/\text{mL}$], 2 [$\mu\text{g}/\text{mL}$], 1 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] et 0.5 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]. La concentration finale du standard d'injection est de 1 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]. Chaque solution standard est préparée **en duplicata** depuis la solution fille et est **injectée deux fois**. Quatre séries indépendantes sont réalisées.

2. Préparation des standards d'étalonnage extraits par LLE

Les mêmes standards d'étalonnage que ceux préparés au point 1. Préparation des standards d'étalonnage (tableau 1) sont utilisés et sont extraits selon le protocole ci-dessous :

2.1. Répartition des milieux d'extraction en fonction des jours

Les milieux d'extraction sont répartis entre les séries selon le plan ci-dessous :

Tableau 2 : Plan d'échantillonnage

Jour	Série	Milieu testé
J1	1	Tampon phosphate à pH 8
J2	2	Tampon phosphate à pH 3
J3	3	Mélange isopropanol/eau 50:50
J4	4	Solution d'insuline à 1 [UI/mL]

2.2. Protocole d'extraction

1) Pour les milieux tampon phosphate à pH 3 et à pH 8 :

○ Préparation d'échantillons :

50 [mL] du milieu étudié (tampon phosphate à pH 3 ou à pH 8) sont déversés dans une ampoule à décanter. 1000 [μL] de la solution standard 1 y sont ajoutés. 25 [mL] de dichlorométhane y sont ajoutés. Après agitation pendant 1 minute, la phase organique est récoltée et une nouvelle extraction est réalisée à l'aide de 25 [mL] de dichlorométhane. Le pH de la phase aqueuse est ensuite ajusté à 8 avec du NaOH 5 [N] pour la solution acide. Il est ajusté à 3 avec du HCl 5 [M] pour la solution basique. Deux nouvelles extractions successives sont réalisées suite à l'ajout de 2x 25 [mL] de dichlorométhane. Les phases organiques sont ensuite rassemblées dans un ballon de 200 [mL]. Une spatule de sodium sulfate anhydre est ajoutée et la solution est filtrée à l'aide d'un filtre Whatman diam. 125 [mm]. Le solvant est ensuite évaporé à sec. L'échantillon est repris avec 1 [mL] de méthanol. 200 [μL] de cette solution sont prélevés et déposés dans un vial ambré. 200 [μL] de la solution standard d'Irganox 415 à 2 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] sont ajoutés. La solution est ensuite injectée.

Répéter cette procédure pour les standards 2, 3 et 4.

- **Préparation du blanc :**

50 [mL] du milieu étudié (tampon phosphate à pH 3 ou à pH 8) sont déversés dans une ampoule à décanter. 25 [mL] de dichlorométhane y sont ajoutés. Après agitation pendant 1 minute, la phase organique est récoltée et une nouvelle extraction est réalisée à l'aide de 25 [mL] de dichlorométhane. Le pH de la phase aqueuse est ensuite ajusté à 8 avec du NaOH 5 [N] pour la solution acide. Il est ajusté à 3 avec du HCl 5 [M] pour la solution basique. Deux nouvelles extractions successives sont réalisées suite à l'ajout de 2x 25 [mL] de dichlorométhane. Les phases organiques sont ensuite rassemblées dans un ballon de 200 [mL]. Une spatule de sodium sulfate anhydre est ajoutée et la solution est filtrée à l'aide d'un filtre Whatman diam. 125 [mm]. Le solvant est ensuite évaporé à sec. L'échantillon est repris avec 1 [mL] de méthanol. 200 [µL] de cette solution sont prélevés et déposés dans un vial ambré. 200 [µL] de la solution standard d'Irganox 415 à 2 [µg/mL] sont ajoutés. La solution est ensuite injectée.

2) Pour le milieu isopropanol/eau 50:50 :

- **Préparation d'échantillons :**

50 [mL] du mélange isopropanol/eau 50:50 sont déversés dans une ampoule à décanter. 1000 [µL] de la solution standard 1 y sont ajoutés. Le pH de la solution est ajusté à 3 avec de l'HCl 5 [N]. 25 [mL] de dichlorométhane y sont ajoutés. Après agitation pendant 1 minute, la phase organique est récoltée et une nouvelle extraction est réalisée à l'aide de 25 [mL] de dichlorométhane. Le pH de la phase aqueuse est ensuite ajusté à 8 avec du NaOH 5 [N]. Deux nouvelles extractions successives sont réalisées suite à l'ajout de 2x 25 [mL] de dichlorométhane. Les phases organiques sont ensuite rassemblées dans un ballon de 200 [mL]. Une spatule de sodium sulfate anhydre est ajoutée et la solution est filtrée à l'aide d'un filtre Whatman diam. 125 [mm]. Le solvant est ensuite évaporé à sec. L'échantillon est repris avec 1 [mL] de méthanol. 200 [µL] de cette solution sont prélevés et déposés dans un vial ambré. 200 [µL] de la solution standard d'Irganox 415 à 2 [µg/mL] sont ajoutés. La solution est ensuite injectée.

Répéter cette procédure pour les standards 2, 3 et 4.

- **Préparation du blanc :**

50 [mL] du mélange isopropanol/eau 50:50 sont déversés dans une ampoule à décanter. Le pH de la solution est ajusté à 3 avec de l'HCl 5 [N]. 25 [mL] de dichlorométhane y sont ajoutés. Après agitation pendant 1 minute, la phase organique est récoltée et une nouvelle extraction est réalisée à l'aide de 25 [mL] de dichlorométhane. Le pH de la phase aqueuse est ensuite ajusté à 8 avec du NaOH 5 [N]. Deux nouvelles extractions successives sont réalisées suite à l'ajout de 2x 25 [mL] de dichlorométhane. Les phases organiques sont ensuite rassemblées dans un ballon de 200 [mL]. Une spatule de sodium sulfate anhydre est ajoutée et la solution est filtrée à l'aide d'un filtre Whatman diam. 125 [mm]. Le solvant est ensuite évaporé à sec. L'échantillon est repris avec 1 [mL]

de méthanol. 200 [µL] de cette solution sont prélevés et déposés dans un vial ambré. 200 [µL] de la solution standard d'Irganox 415 à 2 [µg/mL] sont ajoutés. La solution est ensuite injectée.

Répéter cette procédure pour les standards 2, 3 et 4.

3) Pour le milieu solution d'insuline à 1 [UI/mL]

○ Préparation d'échantillons :

50 [mL] de la solution d'insuline à 1 [UI/mL] sont déversés dans une ampoule à décanter. 1000 [µL] de la solution standard 1 y sont ajoutés. 5 [mL] d'une solution de NaCl saturée sont ajoutés. Le pH de la solution est ajusté à 3 avec de l'HCl 5 [N]. 25 [mL] de dichlorométhane y sont ajoutés. Après agitation pendant 1 minute, la phase organique est récoltée et une nouvelle extraction est réalisée à l'aide de 25 [mL] de dichlorométhane. Le pH de la phase aqueuse est ensuite ajusté à 8 avec du NaOH 5 [N]. Deux nouvelles extractions successives sont réalisées suite à l'ajout de 2x 25 [mL] de dichlorométhane. Les phases organiques sont ensuite rassemblées dans un ballon de 200 [mL]. Une spatule de sodium sulfate anhydre est ajoutée et la solution est filtrée à l'aide d'un filtre Whatman diam. 125 [mm]. Le solvant est ensuite évaporé à sec. L'échantillon est repris avec 1 [mL] de méthanol. 200 [µL] de cette solution sont prélevés et déposés dans un vial ambré. 200 [µL] de la solution standard d'Irganox 415 à 2 [µg/mL] sont ajoutés. La solution est ensuite injectée.

Répéter cette procédure pour les standards 2, 3 et 4.

○ Préparation du blanc :

50 [mL] de la solution d'insuline à 1 [UI/mL] sont déversés dans une ampoule à décanter. 5 [mL] d'une solution de NaCl saturée sont ajoutés. Le pH de la solution est ajusté à 3 avec de l'HCl 5 [N]. 25 [mL] de dichlorométhane y sont ajoutés. Après agitation pendant 1 minute, la phase organique est récoltée et une nouvelle extraction est réalisée à l'aide de 25 [mL] de dichlorométhane. Le pH de la phase aqueuse est ensuite ajusté à 8 avec du NaOH 5 [N]. Deux nouvelles extractions successives sont réalisées suite à l'ajout de 2x 25 [mL] de dichlorométhane. Les phases organiques sont ensuite rassemblées dans un ballon de 200 [mL]. Une spatule de sodium sulfate anhydre est ajoutée et la solution est filtrée à l'aide d'un filtre Whatman diam. 125 [mm]. Le solvant est ensuite évaporé à sec. L'échantillon est repris avec 1 [mL] de méthanol. 200 [µL] de cette solution sont prélevés et déposés dans un vial ambré. 200 [µL] de la solution standard d'Irganox 415 à 2 [µg/mL] sont ajoutés. La solution est ensuite injectée.

Les concentrations finales des standards d'étalonnage sont de 5 [µg/mL], 2 [µg/mL], 1 [µg/mL] et 0.5 [µg/mL]. La concentration finale du standard d'injection est de 1 [µg/mL]. Chaque solution standard est préparée **en duplicata** depuis la solution fille et est **injectée deux fois**. Quatre séries indépendantes sont réalisées.

Annexe IX : Protocole de prévalidation de la méthode de préparation d'échantillons par SPE

Le protocole de prévalidation ci-dessous a été suivi :

1. Préparation des standards d'étalonnage (injection directe, sans extraction SPE)

Le standard interne d'injection doit tout d'abord être préparé. Pour ce faire, une solution mère d'Irganox 415, le standard interne d'injection, à 1 [mg/mL] est préparée selon le protocole ci-dessous :

Solution mère d'Irganox 415 : Dissoudre exactement **10.0 [mg]** d'Irganox 415 dans 10 [mL] de méthanol.

Une solution fille d'Irganox 415 à 100 [µg/mL] est ensuite préparée selon le protocole ci-dessous :

Solution fille d'Irganox 415 à 100 [µg/mL] : Prélever 1000 [µL] de la solution mère d'Irganox 415 et compléter à 10 [mL] avec du méthanol.

Deux solutions mères des substances d'intérêt (BHT, Antioxydant 425) sont ensuite préparées selon le protocole ci-dessous :

1) **Solution mère de Butylhydroxytoluène :** Dissoudre exactement **10.0 [mg]** de BHT dans 10 [mL] de méthanol.

2) **Solution mère d'Antioxydant 425 :** Dissoudre exactement **10.0 [mg]** d'Antioxydant 425 dans 10 [mL] de méthanol.

Une solution fille contenant un mélange de BHT et d'Antioxydant 425 est ensuite préparée selon le protocole ci-dessous :

Solution fille (=SF) d'Antioxydant 425 et de BHT à 100 [µg/mL] : Prélever 1000 [µL] de chaque solution mère et compléter à 10 [mL] avec du méthanol.

Les standards d'étalonnage sont ensuite préparés à partir de la solution fille à 100 [µg/mL] selon le schéma de dilution figurant dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 : Standard d'étalonnage

Standard d'étalonnage	Concentration du standard d'étalonnage [µg/mL]	V _{SF} BHT et Antioxydant 425 [µL]	Concentration du standard interne d'injection [µg/mL]	V _{SF} Irganox 415 [µL]	V _{Méthanol} [mL]
STD1	5.0	1000	1	200	Ad 20
STD2	2.0	400			
STD3	1.0	200			
STD4	0.5	100			
Blanc	1000 [µL] de méthanol + 200 [µL] de la solution fille d'Irganox 415 ad 20 [mL] de méthanol.				

Prélever 400 [µL] dans chaque ballon jaugé et les déposer dans un vial. La solution est ensuite injectée directement.

Les concentrations finales des standards d'étalonnage sont de 5 [µg/mL], 2 [µg/mL], 1 [µg/mL] et 0.5 [µg/mL]. La concentration finale du standard d'injection est de 1 [µg/mL]. Chaque solution standard est préparée **en duplicata** depuis la solution fille et est **injectée deux fois**.

2. Préparation des standards d'étalonnage extraits par SPE

Le standard interne d'injection doit tout d'abord être préparé. Pour ce faire, une solution mère d'Irganox 415, le standard interne d'injection, à 1 [mg/mL] est préparée selon le protocole ci-dessous :

Solution mère d'Irganox 415 : Dissoudre exactement **10.0 [mg]** d'Irganox 415 dans 10 [mL] de méthanol.

Une solution fille d'Irganox 415 à 100 [µg/mL] est ensuite préparée selon le protocole ci-dessous :

Solution fille d'Irganox 415 à 100 [µg/mL] : Prélever 1000 [µL] de la solution mère d'Irganox 415 et compléter à 10 [mL] avec le milieu étudié (tampon phosphate à pH 3, à pH8, etc...).

Deux solutions mères des substances d'intérêt (BHT, Antioxydant 425) sont ensuite préparées selon le protocole ci-dessous :

1) **Solution mère de Butylhydroxytoluène** : Dissoudre exactement **10.0 [mg]** de BHT dans 10 [mL] de méthanol.

2) **Solution mère d'Antioxydant 425** : Dissoudre exactement **10.0 [mg]** d'Antioxydant 425 dans 10 [mL] de méthanol.

Une solution fille contenant un mélange de BHT et d'Antioxydant 425 est ensuite préparée selon le protocole ci-dessous :

Solution fille d'Antioxydant 425 et de BHT à 100 [µg/mL] : Prélever 1000 [µL] de chaque solution mère et compléter à 10 [mL] avec le milieu étudié (tampon phosphate à pH 3, à pH 8, etc...).

Les standards d'étalonnage sont ensuite préparés à partir de la solution fille à 100 [µg/mL] selon le schéma de dilution figurant dans le tableau ci-dessous :

Tableau 2 : Standard d'étalonnage

Standard d'étalonnage	Concentration du standard d'étalonnage [µg/mL]	V _{SF} BHT et d'Antioxydant 425 [µL]	Concentration de l'Irganox 415 [µg/mL]	V _{SF} d'Irganox 415 [µL]	Volume diluant (milieu étudié) [mL]
STD1	5.0	1000	1	200	Ad 20
STD2	2.0	400			
STD3	1.0	200			
STD4	0.5	100			
Blanc	1000 [µL] de méthanol + 200 [µL] de la solution fille d'Irganox 415 ad 20 [mL] de méthanol.				

Les solutions sont ensuite extraites selon le protocole ci-dessous :

2.1. Répartition des milieux d'extraction en fonction des jours

Les milieux d'extraction sont répartis entre les séries selon le plan ci-dessous :

Tableau 3 : Plan d'échantillonnage

Jour	Série	Milieu testé
J1	1	Tampon phosphate à pH 8
J2	2	Tampon phosphate à pH 3
J3	3	Solution d'insuline à 1 [UI/mL]

2.2. Méthode d'extraction SPE

○ Préparation d'échantillons :

Des liners en teflon sont placés sur la valve de contrôle du débit de la SPE. Une cartouche Supelclean LC-18 est connectée sur le liner. Le système SPE est mis sous vide en allumant la pompe à vide. La colonne SPE est activée par l'ajout 2 x 1 [mL] de méthanol pour HPLC, puis par l'ajout de 2 x 1 [mL] d'eau pour HPLC. 2 x 1 [mL] du milieu étudié sont ajoutés (tampon phosphate à pH 3 etc...), puis 1 [mL] du STD1 est ajoutés. Finalement, 100 [µL] d'une solution d'Irganox 415 (le standard interne) à 10 [µg/mL] sont ajoutés. La cartouche est laissée à sécher. Une fois sèche, le vide est coupé et un tube en verre propre est placé sous la cartouche. 1 [mL] de méthanol est ajouté dans la cartouche. Le système est mis sous vide. La cartouche est laissée à sécher. Une fois sèche, le vide est coupé. Le volume est ajusté à 1 [mL] avec du méthanol. Après agitation, 400 [µL] de la solution sont prélevés et déposés dans un vial. La solution est ensuite injectée.

Cette procédure est répétée pour les STD2, STD3 et les STD4.

Les concentrations finales des standards d'étalonnage sont de 5 [µg/mL], 2 [µg/mL], 1 [µg/mL] et 0.5 [µg/mL]. La concentration finale du standard d'injection est de 1 [µg/mL]. Chaque solution standard est préparée **en duplicata** depuis la solution fille et est **injectée deux fois**.

○ Préparation du blanc

Des liners en teflon sont placés sur la valve de contrôle du débit de la SPE. Une cartouche Supelclean LC-18 est connectée sur le liner. Le système SPE est mis sous vide en allumant la pompe à vide. La colonne SPE est activée par l'ajout 2 x 1 [mL] de méthanol pour HPLC, puis par l'ajout de 2 x 1 [mL] d'eau pour HPLC. 2 x 1 [mL] du milieu étudié sont ajoutés (tampon phosphate à pH 3 etc...), puis 1 [mL] du milieu étudié est ajouté. Finalement, 100 [µL] d'une solution d'Irganox 415 (le standard interne) à 10 [µg/mL] sont ajoutés. La cartouche est laissée à sécher. Une fois sèche, le vide est coupé et un tube en verre propre est placé sous la cartouche. 1 [mL] de méthanol est ajouté dans la cartouche. Le système est mis sous vide. La cartouche est laissée à sécher. Une fois sèche, le vide est coupé. Le volume est ajusté à 1 [mL] avec du méthanol. Après agitation, 400 [µL] de la solution sont prélevés et déposés dans un vial. La solution est ensuite injectée.

Annexe X : Résultats détaillés de la répétabilité des temps de rétention avec la méthode HPLC/UV-DAD

Le tableau ci-dessous met en évidence les résultats obtenus pour la répétabilité des temps de rétention d'un échantillon injecté 5 fois avec la méthode HPLC/UV-DAD:

Tableau 1 : Résultats

Temps de rétention [min]				
Injection	Bisphénol M	Irganox 415	BHT	Antioxydant 425
1	38.40	46.32	48.83	55.49
2	38.46	46.36	48.87	55.52
3	38.46	46.37	48.86	55.52
4	38.47	46.37	48.88	55.52
5	38.48	46.37	48.88	55.54
Moyenne [min]	38.45	46.36	48.86	55.52
Ecart-type	0.03	0.02	0.02	0.02
CV [%]	0.08%	0.04%	0.04%	0.03%

Annexe XI : Résultats détaillés pour le rendement d'extraction par LLE

La courbe d'étalonnage est préparée de la même manière qu'en annexe VIII, point 1. (Préparation des standards d'étalonnage non extraits par LLE). La droite d'étalonnage ci-dessous a été obtenue :

Tableau 1 : Résultats obtenus pour la droite d'étalonnage

BHT						
STD	Aire BHT	Aire Irganox 415	Rapport Aire	Concentration BHT [µg/mL]	Concentration Irganox 415 [µg/mL]	Rapport concentration
STD1	278.2	127.6	2.2	5.0	1.0	5.0
STD2	148.7	156.4	1.0	2.0	1.0	2.0
STD3	58.8	162.3	0.4	1.0	1.0	1.0
STD4	27.4	151.8	0.2	0.5	1.0	0.5
Pente			0.45			
Ordonnée à l'origine			-0.03			
Coefficient de détermination			1.00			
Antioxydant 425						
STD	Aire Antioxydant 425	Aire Irganox 415	Rapport Aire	Concentration Antioxydant 425 [µg/mL]	Concentration Irganox 415 [µg/mL]	Rapport concentration
STD1	500.4	127.6	3.9	5.0	1.0	5.0
STD2	251.5	156.4	1.6	2.0	1.0	2.0
STD3	135.1	162.3	0.8	1.0	1.0	1.0
STD4	60.3	151.8	0.4	0.5	1.0	0.5
Pente			0.78			
Ordonnée à l'origine			0.03			
Coefficient de détermination			1.00			
Bisphénol M						
STD	Aire Bisphénol M	Aire Irganox 415	Rapport Aire	Concentration Bisphénol M [µg/mL]	Concentration Irganox 415 [µg/mL]	Rapport concentration
STD1	437.7	127.6	3.4	5.0	1.0	5.0
STD2	227.5	156.4	1.5	2.0	1.0	2.0
STD3	122.4	162.3	0.8	1.0	1.0	1.0
STD4	57.2	151.8	0.4	0.5	1.0	0.5
Pente			0.67			
Ordonnée à l'origine			0.07			
Coefficient de détermination			1.00			

A partir de la droite d'étalonnage établie ci-dessus, les concentrations en BHT, en Antioxydant 425 et en Bisphénol M ont pu être calculées pour chaque échantillon extrait. Les résultats obtenus pour les dix échantillons d'eau pour HPLC spikés avec du BHT, de l'Antioxydant 425 et du Bisphénol M à 10 [µg/mL] et extraits sont détaillés dans les deux tableaux ci-dessous :

Tableau 2 : Résultats du rendement d'extraction pour l'Antioxydant 425

Antioxydant 425				
	Aire A425	Aire Irganox 415	Rapport Aire Antioxydant 425	C_{échantillon} A425 [µg/mL]
Extraction 1	221.47	131.70	1.68	1.30
Extraction 2	148.54	87.88	1.69	1.30
Extraction 3	215.50	129.64	1.66	1.28
Extraction 4	175.87	105.72	1.66	1.28
Extraction 5	157.97	93.15	1.70	1.31
Extraction 6	704.18	425.11	1.66	1.28
Extraction 7	166.80	97.63	1.71	1.32
Extraction 8	500.47	309.37	1.62	1.25
Extraction 9	194.65	120.22	1.62	1.25
Extraction 10	233.55	140.19	1.67	1.28
STD	808.21	139.06	5.81	4.55
			Moyenne	1.28
			Ecart-type	0.02
			CV [%]	1.85%
			Rendement	28.24%

Tableau 3 : Résultats du rendement d'extraction pour le BHT

BHT				
	Aire BHT	Aire Irganox 415	Rapport Aire BHT	C_{échantillon} BHT [µg/mL]
Extraction 1	50.20	131.70	0.38	0.92
Extraction 2	34.48	87.88	0.39	0.95
Extraction 3	48.98	129.64	0.38	0.91
Extraction 4	42.80	105.72	0.40	0.97
Extraction 5	36.31	93.15	0.39	0.94
Extraction 6	166.74	425.11	0.39	0.95
Extraction 7	38.96	97.63	0.40	0.96
Extraction 8	159.78	309.37	0.52	1.22
Extraction 9	50.04	120.22	0.42	1.00
Extraction 10	53.62	140.19	0.38	0.92
STD	298.49	139.06	2.15	4.86
			Moyenne	0.98
			Ecart-type	0.09
			CV [%]	9.33%
			Rendement	20.07%

Tableau 4 : Résultats du rendement d'extraction pour le Bisphénol M

Bisphénol M				
	Aire BPM	Aire Irganox 415	Rapport Aire BPM	C_{échantillon Bisphénol M} [µg/mL]
Extraction 1	198.07	131.70	1.50	2.13
Extraction 2	136.92	87.88	1.56	2.21
Extraction 3	195.41	129.64	1.51	2.14
Extraction 4	159.06	105.72	1.50	2.13
Extraction 5	144.93	93.15	1.56	2.21
Extraction 6	634.05	425.11	1.49	2.11
Extraction 7	148.35	97.63	1.52	2.16
Extraction 8	483.82	309.37	1.56	2.22
Extraction 9	180.63	120.22	1.50	2.13
Extraction 10	201.77	140.19	1.44	2.04
STD	468.70	139.06	3.37	4.91
			Moyenne	2.15
			Ecart-type	0.06
			CV [%]	2.60%
			Rendement	43.76%

Annexe XII : Résultats détaillés de la prévalidation de la méthode LLE

Les résultats détaillés de la prévalidation pour chaque série figurent dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 1 : Résultat série 1 (Tampon phosphate à pH 8)

Série 1 : Tampon phosphate à pH 8						
Extrait	Bisphénol M		Antioxydant 425		BHT	
	Rapport Aire BPM	Rapport C_{BPM}	Rapport Aire A425	Rapport C_{A425}	Rapport Aire BHT	Rapport C_{BHT}
	1.27	5.01	1.56	5.01	1.05	5.00
	0.48	2.00	0.76	2.00	0.47	2.00
	0.32	1.00	0.45	1.00	0.29	1.00
0.09	0.50	0.21	0.50	0.09	0.50	
Pente	0.25		0.29		0.20	
Ordonnée origine	0.00		0.13		0.04	
r²	0.99		0.99		0.99	
Standard	Bisphénol M		Antioxydant 425		BHT	
	Rapport Aire BPM	Rapport C_{BPM}	Rapport Aire A425	Rapport C_{A425}	Rapport Aire BHT	Rapport C_{BHT}
	3.52	5.01	3.87	5.01	2.19	5.00
	1.46	2.00	1.56	2.00	0.99	2.00
	0.76	1.00	0.81	1.00	0.38	1.00
0.44	0.50	0.37	0.50	0.19	0.50	
Pente	0.69		0.77		0.45	
Ordonnée origine	0.08		0.01		-0.01	
r²	1.00		1.00		0.99	
Rapport pente STD/pente Extrait	2.71		2.66		2.20	

Tableau 2 : Résultat série 2 (Tampon phosphate à pH 3)

Série 2 : Tampon phosphate à pH 3						
Extraits	Bisphénol M		Antioxydant 425		BHT	
	Rapport Aire BPM	Rapport C_{BPM}	Rapport Aire A425	Rapport C_{A425}	Rapport Aire BHT	Rapport C_{BHT}
	1.35	5.0	1.57	5.0	1.01	5.0
	0.53	2.0	0.76	2.0	0.45	2.0
	0.28	1.0	0.38	1.0	0.25	1.0
0.12	0.5	0.17	0.5	0.08	0.5	
Pente	0.27		0.30		0.20	
Ordonnée origine	0.00		0.07		0.03	
r²	1.00		0.99		0.99	
Standard	Bisphénol M		Antioxydant 425		BHT	
	Rapport Aire BPM	Rapport C_{BPM}	Rapport Aire A425	Rapport C_{A425}	Rapport Aire BHT	Rapport C_{BHT}
	3.48	5.03	3.90	5.03	2.21	5.01
	1.51	2.01	1.62	2.01	0.98	2.00
	0.77	1.01	0.81	1.01	0.44	1.00
0.35	0.50	0.43	0.50	0.22	0.50	
Pente	0.68		0.77		0.44	
Ordonnée origine	0.07		0.05		0.02	
r²	1.00		1.00		1.00	
Rapport pente STD/pente Extrait	2.55		2.54		2.21	

Tableau 3 : Résultat série 3 (Mélange isopropanol/eau 50:50)

Série 3 : Mélange Isopropanol/eau 50:50						
Extraits	Bisphénol M		Antioxydant 425		BHT	
	Rapport Aire BPM	Rapport C_{BPM}	Rapport Aire A425	Rapport C_{A425}	Rapport Aire BHT	Rapport C_{BHT}
	2.87	5.01	2.81	4.99	0.00	5.02
	0.50	2.00	0.62	2.00	0.00	2.01
	0.28	1.00	0.36	1.00	0.00	1.00
0.17	0.50	0.24	0.50	0.00	0.50	
Pente	0.62		0.59		0.00	
Ordonnée origine	-0.37		-0.25		0.00	
r²	0.96		0.97		0.00	
Standard	Bisphénol M		Antioxydant 425		BHT	
	Rapport Aire BPM	Rapport C_{BPM}	Rapport Aire A425	Rapport C_{A425}	Rapport Aire BHT	Rapport C_{BHT}
	3.47	5.01	3.87	4.99	0.00	5.02
	1.51	2.00	1.63	2.00	0.00	2.01
	0.79	1.00	0.82	1.00	0.00	1.00
0.42	0.50	0.43	0.50	0.00	0.50	
Pente	0.67		0.76		0.00	
Ordonnée origine	0.12		0.07		0.00	
r²	1.00		1.00		0.00	
Rapport pente STD/pente Extrait	1.08		1.29		0.00	

Tableau 4 : Résultats série 4 (Solution d'insuline à 1 [UI/mL])

Série 4 : Solution d'insuline à 1 [UI/mL]						
Extraits	Bisphénol M		Antioxydant 425		BHT	
	Rapport Aire BPM	Rapport C_{BPM}	Rapport Aire A425	Rapport C_{A425}	Rapport Aire BHT	Rapport C_{BHT}
	1.35	5.00	1.58	4.97	0.99	4.97
	0.54	2.00	0.75	1.99	0.45	1.99
	0.33	1.00	0.36	0.99	0.27	0.99
	0.14	0.50	0.16	0.50	0.11	0.50
Pente	0.26		0.31		0.19	
Ordonnée origine	0.03		0.05		0.05	
r²	1.00		0.99		1.00	
Standard	Bisphénol M		Antioxydant 425		BHT	
	Rapport Aire BPM	Rapport C_{BPM}	Rapport Aire A425	Rapport C_{A425}	Rapport Aire BHT	Rapport C_{BHT}
	3.43	5.00	3.92	4.97	2.18	4.97
	1.45	2.00	1.61	1.99	0.95	1.99
	0.75	1.00	0.83	0.99	0.36	0.99
	0.38	0.50	0.40	0.50	0.18	0.50
Pente	0.67		0.78		0.45	
Ordonnée origine	0.07		0.03		-0.03	
r²	1.00		1.00		1.00	
Rapport pente STD/pente Extrait	2.57		2.51		2.37	

Annexe XIII : Résultats détaillés du rendement d'extraction SPE

La courbe d'étalonnage est préparée de la même manière qu'en annexe IX, point 1. (Préparation des standards d'étalonnage non extraits par SPE). La droite d'étalonnage ci-dessous a été obtenue :

Tableau 1 : Résultats obtenus pour la droite d'étalonnage

BHT						
STD	Aire BHT	Aire Irganox 415	Rapport Aire	Concentration BHT [µg/mL]	Concentration Irganox 415 [µg/mL]	Rapport concentration
STD1	1492.78	568.66	2.63	5.03	1.00	5.0
STD2	649.43	541.63	1.20	2.01	1.00	2.0
STD3	322.83	610.60	0.53	1.01	1.00	1.0
STD4	133.07	582.15	0.23	0.50	1.00	0.5
Pente			0.53			
Ordonnée à l'origine			0.02			
Coefficient de détermination			0.99			
Antioxydant 425						
STD	Aire Antioxydant 425	Aire Irganox 415	Rapport Aire	Concentration Antioxydant 425 [µg/mL]	Concentration Irganox 415 [µg/mL]	Rapport concentration
STD1	2990.12	568.66	5.26	5.01	1.00	5.0
STD2	1120.28	541.63	2.07	2.00	1.00	2.0
STD3	566.18	610.60	0.93	1.00	1.00	1.0
STD4	316.88	582.15	0.54	0.50	1.00	0.5
Pente			1.06			
Ordonnée à l'origine			-0.06			
Coefficient de détermination			1.00			

A partir de la droite d'étalonnage établie ci-dessus, les concentrations en BHT et en Antioxydant 425 ont pu être calculées pour chaque échantillon extrait. Les résultats obtenus pour les dix échantillons contenant du BHT et de l'Antioxydant 425 à 5 [µg/mL] et extraits par SPE sont détaillés dans les deux tableaux ci-dessous :

Tableau 2 : Résultats du rendement d'extraction pour le BHT

BHT				
	Aire BHT	Aire Irganox 415	Rapport Aire BHT	C _{échantillon} BHT [µg/mL]
Extraction 1	990.30	424.30	2.33	4.40
Extraction 2	940.60	439.41	2.14	4.03
Extraction 3	977.60	457.41	2.14	4.02
Extraction 4	1035.29	423.74	2.44	4.61
Extraction 5	922.30	412.04	2.24	4.22
Extraction 6	1044.00	476.12	2.19	4.13
Extraction 7	1027.50	433.80	2.37	4.47
Extraction 8	924.70	368.70	2.51	4.73
Extraction 9	945.43	462.11	2.05	3.85
Extraction 10	1010.60	389.80	2.59	4.89
STD	983.15	444.08	2.63	4.95
			Moyenne	4.34
			Ecart-type	0.34
			CV [%]	7.85%
			Rendement	87.51%

Tableau 3 : Résultats du rendement d'extraction pour l'Antioxydant 425

Antioxydant 425				
	Aire Antioxydant 425	Aire Irganox 415	Rapport Aire Antioxydant 425	C_{échantillon} Antioxydant 425 [µg/mL]
Extraction 1	2544.20	424.30	6.00	5.71
Extraction 2	2773.40	439.41	6.31	6.01
Extraction 3	2434.20	457.41	5.32	5.07
Extraction 4	2805.40	423.74	6.62	6.30
Extraction 5	2794.00	412.04	6.78	6.45
Extraction 6	2515.10	476.12	5.28	5.04
Extraction 7	2720.20	433.80	6.27	5.97
Extraction 8	2200.10	368.70	5.97	5.68
Extraction 9	2824.60	462.11	6.11	5.82
Extraction 10	2433.00	389.80	6.24	5.94
STD	2654.55	444.08	5.98	5.69
			Moyenne	5.80
			Ecart-type	0.46
			CV [%]	7.92%
			Rendement	101.87%

Annexe XIV : Résultats détaillés de la prévalidation SPE

Les résultats détaillés de la prévalidation pour chaque série figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 : Résultat série 1 (Tampon phosphate à pH 8)

Série 1 : Tampon phosphate à pH 8				
Extrait	Antioxydant 425		BHT	
	Rapport Aire A425	Rapport C_{Antioxydant 425}	Rapport Aire BHT	Rapport C_{BHT}
	5.10	5.00	2.56	5.04
	1.93	2.00	0.77	2.02
	0.96	1.00	0.34	1.01
0.45	0.50	0.21	0.50	
Pente	1.04		0.53	
Ordonnée origine	-0.09		-0.17	
Coefficient de détermination	1.00		0.99	
Standard	Antioxydant 425		BHT	
	Rapport Aire A425	Rapport C_{Antioxydant 425}	Rapport Aire BHT	Rapport C_{BHT}
	5.26	5.00	2.63	5.01
	2.07	2.00	1.20	2.01
	0.93	1.00	0.53	1.00
0.54	0.50	0.23	0.50	
Pente	1.06		0.53	
Ordonnée origine	-0.06		0.02	
Coefficient de détermination	1.00		0.99	
Rapport pente STD/pente Extrait	1.02		1.00	

Tableau 2 : Résultat série 2 (Tampon phosphate à pH 3)

Série 2 : Tampon phosphate à pH 3				
Extrait	Antioxydant 425		BHT	
	Rapport Aire A425	Rapport C_{Antioxydant 425}	Rapport Aire BHT	Rapport C_{BHT}
	5.07	4.99	2.45	5.01
	2.26	2.00	0.93	2.00
	1.00	1.00	0.40	1.00
0.50	0.50	0.17	0.50	
Pente	1.01		0.51	
Ordonnée origine	0.05		-0.09	
Coefficient de détermination	1.00		1.00	
Standard	Antioxydant 425		BHT	
	Rapport Aire A425	Rapport C_{Antioxydant 425}	Rapport Aire BHT	Rapport C_{BHT}
	5.26	5.00	2.63	5.01
	2.07	2.00	1.20	2.01
	0.93	1.00	0.53	1.00
0.54	0.50	0.23	0.50	
Pente	1.06		0.53	
Ordonnée origine	-0.06		0.02	
Coefficient de détermination	1.00		0.99	
Rapport pente STD/pente Extrait	1.05		1.04	

Tableau 3 : Résultat série 3 (Solution d'insuline à 1 [UI/mL])

Série 3 : Solution d'insuline à 1 [UI/mL]				
Extrait	Antioxydant 425		BHT	
	Rapport Aire A425	Rapport C_{Antioxydant 425}	Rapport Aire BHT	Rapport C_{BHT}
	6.87	4.98	2.98	4.97
	3.38	1.99	1.17	1.99
	1.44	1.00	0.52	0.99
0.85	0.50	0.33	0.50	
Pente	1.35		0.60	
Ordonnée origine	0.29		-0.02	
Coefficient de détermination	0.99		1.00	
Standard	Antioxydant 425		BHT	
	Rapport Aire A425	Rapport C_{Antioxydant 425}	Rapport Aire BHT	Rapport C_{BHT}
	5.26	5.00	2.63	5.01
	2.07	2.00	1.20	2.01
	0.93	1.00	0.53	1.00
0.54	0.50	0.23	0.50	
Pente	1.06		0.53	
Ordonnée origine	-0.06		0.02	
Coefficient de détermination	1.00		0.99	
Rapport pente STD/pente Extrait	0.78		0.88	

Tableau 4 : Résultat série 3 (Solution d'insuline à 1 [UI/mL] + tampon phosphate à pH 3)

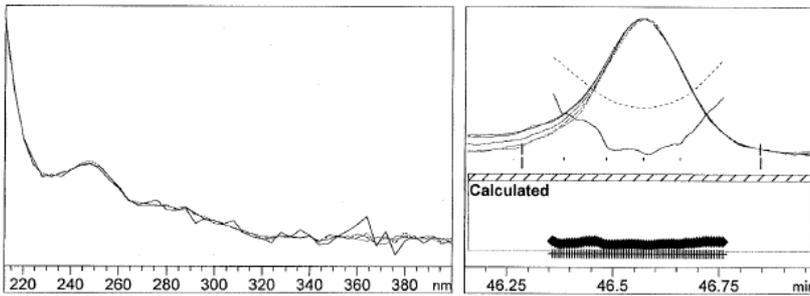
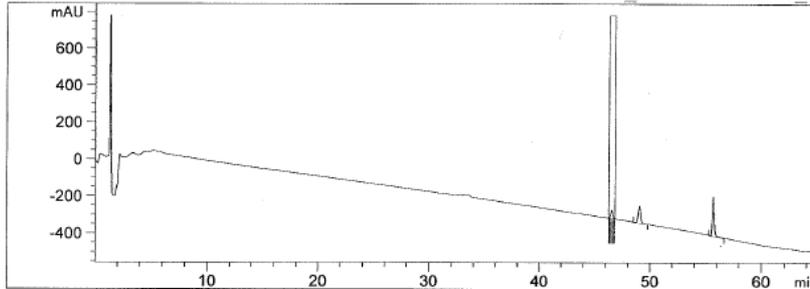
Série 3 : Solution d'insuline à 1 [UI/mL]				
Extrait	Antioxydant 425		BHT	
	Rapport Aire A425	Rapport C_{Antioxydant 425}	Rapport Aire BHT	Rapport C_{BHT}
	5.08	5.0	2.48	5.1
	2.47	2.0	0.91	2.0
	0.97	1.0	0.38	1.0
0.51	0.5	0.17	0.5	
Pente	1.02		0.51	
Ordonnée origine	0.10		-0.12	
Coefficient de détermination	0.99		1.00	
Standard	Antioxydant 425		BHT	
	Rapport Aire A425	Rapport C_{Antioxydant 425}	Rapport Aire BHT	Rapport C_{BHT}
	5.26	5.00	2.63	5.01
	2.07	2.00	1.20	2.01
	0.93	1.00	0.53	1.00
0.54	0.50	0.23	0.50	
Pente	1.06		0.53	
Ordonnée origine	-0.06		0.02	
Coefficient de détermination	1.00		0.99	
Rapport pente STD/pente Extrait	1.04		1.03	

Annexe XV : Résultats détaillés de la pureté des pics

Les résultats détaillés obtenus pour la pureté des pics figurent ci-dessous :

Purity results peak 1 at 46.572 min.

Signal DAD1 A, Sig=210,4 Ref=360,200 (EXTRACTIBLES DEVELOPPEMENT 28042016\2016-11-2420-



-> The purity factor is within the calculated threshold limit. <-

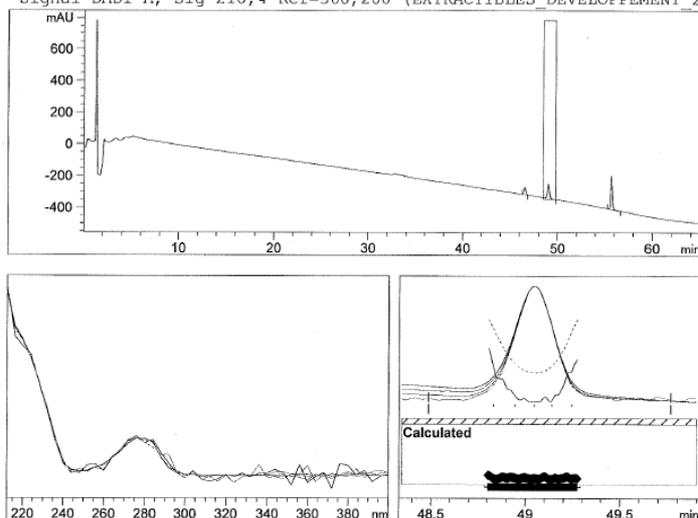
Purity factor : 991.115 (61 of 61 spectra are within the calculated threshold limit.)
Threshold : 839.766 (Calculated with 61 of 61 spectra)
Reference : Peak start and end spectra (integrated) (46.285 / 46.845)
Spectra : 4 (Selection automatic, 5)
Noise Threshold: 0.915 (12 spectra, St.Dev 0.3967 + 3 * 0.1726)

*** End of Report ***

Figure 1 : Pureté de l'Irganox 415

Purity results peak 2 at 49.047 min.

Signal DAD1 A, Sig=210,4 Ref=360,200 (EXTRACTIBLES DEVELOPPEMENT 28042016\2016-11-2420-



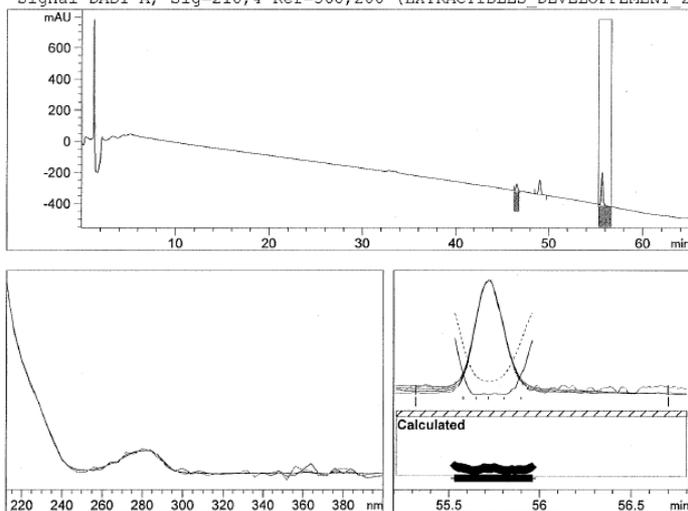
-> The purity factor is within the calculated threshold limit. <-

Purity factor : 995.183 (71 of 71 spectra are within the calculated threshold limit.)
Threshold : 912.912 (Calculated with 71 of 71 spectra)
Reference : Peak start and end spectra (integrated) (48.485 / 49.765)
Spectra : 5 (Selection automatic, 5)
Noise Threshold: 0.915 (12 spectra, St.Dev 0.3967 + 3 * 0.1726)

*** End of Report ***

Figure 2 : Pureté du BHT

Signal DAD1 A, Sig=210,4 Ref=360,200 (EXTRACTIBLES DEVELOPPEMENT 28042016\2016-11-2420-



-> The purity factor is within the calculated threshold limit. <-

Purity factor : 993.713 (65 of 65 spectra are within the calculated threshold limit.)
Threshold : 918.509 (Calculated with 65 of 65 spectra)
Reference : Peak start and end spectra (integrated) (55.319 / 56.699)
Spectra : 5 (Selection automatic, 5)
Noise Threshold: 0.915 (12 spectra, St.Dev 0.3967 + 3 * 0.1726)

*** End of Report ***

Figure 3 : Pureté de l'Antioxydant 425

Annexe XVI : Résultats détaillés de l'essai de dégradation

La courbe d'étalonnage est préparée de la même manière qu'en annexe IX, point 1. (Préparation des standards d'étalonnage non extraits par SPE). La droite d'étalonnage ci-dessous a été obtenue :

Tableau 1 : Résultats obtenus pour la droite d'étalonnage

BHT						
	Aire BHT	Aire Irganox	Rapport Aire	Concentration BHT [µg/mL]	Concentration Irganox 415 [µg/mL]	Rapport concentration
STD1	1455.67	613.72	2.37	5.03	1.00	5.06
	1536.82	647.12	2.37	5.03	1.00	5.06
STD2	700.80	735.07	0.95	2.01	1.00	2.02
	603.62	611.92	0.99	2.01	1.00	2.02
STD3	382.55	801.98	0.48	1.01	1.00	1.01
	382.55	801.98	0.48	1.01	1.00	1.01
Pente			0.47			
Ordonnée à l'origine			0.01			
Coefficient de détermination			1.00			
Antioxydant 425						
	Aire A425	Aire Irganox	Rapport Aire	Concentration A425 [µg/mL]	Concentration Irganox 415 [µg/mL]	Rapport concentration
STD1	2523.58	613.72	4.11	4.97	1.00	4.99
	2648.76	647.12	4.09	4.97	1.00	4.99
STD2	1153.26	735.07	1.57	1.99	1.00	2.00
	982.32	611.92	1.61	1.99	1.00	2.00
STD3	638.78	801.98	0.80	0.99	1.00	1.00
	638.78	801.98	0.80	0.99	1.00	1.00
Pente			0.83			
Ordonnée à l'origine			-0.05			
Coefficient de détermination			1.00			

A partir de la droite d'étalonnage établie ci-dessus, les concentrations en Antioxydant 425 et en BHT ont pu être calculées pour chaque échantillon. Les résultats obtenus pour l'essai de dégradation figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 2 : Résultats de l'essai de dégradation pour le BHT

	BHT	Irganox 415	Rapport Aire BHT	Concentration en BHT [µg/mL]	Concentration moyenne en BHT [µg/mL]
Effet de l'acide					
Echantillon 1	1434.27	596.55	2.40	5.09	5.05
Echantillon 2	1433.74	605.83	2.37	5.01	
Effet d'une base					
Echantillon 1	101.27	614.21	0.16	0.32	0.33
Echantillon 2	103.33	612.63	0.17	0.33	
Effet de la chaleur					
Echantillon 1	1828.20	773.81	2.36	5.00	4.91
Echantillon 2	1651.42	724.20	2.28	4.83	
Effet des UVs					
Echantillon 1	1512.47	636.89	2.37	5.03	5.00
Echantillon 2	1494.43	635.34	2.35	4.98	
Effet de l'H₂O₂					
Echantillon 1	1481.18	626.99	2.36	5.00	5.06
Echantillon 2	1645.67	680.75	2.42	5.12	
Solution standard 1					
Echantillon 1	1400.50	594.28	2.36	4.99	5.07
Echantillon 2	1407.50	579.38	2.43	5.14	

Tableau 3 : Résultats de l'essai de dégradation pour l'Antioxydant 425

	Antioxydant 425	Irganox 415	Rapport Aire A425	Concentration en A425 [µg/mL]	Concentration moyenne en A425 [µg/mL]
Effet de l'acide					
Echantillon 1	2458.6	596.55	4.12	5.00	5.00
Echantillon 2	2498.03	605.83	4.12	5.00	
Effet d'une base					
Echantillon 1	2538.47	614.21	4.13	5.01	5.01
Echantillon 2	2533.72	612.63	4.14	5.02	
Effet de la chaleur					
Echantillon 1	3270.15	773.81	4.23	5.12	4.93
Echantillon 2	2828.32	724.20	3.91	4.74	
Effet des UVs					
Echantillon 1	2589.05	636.89	4.07	4.93	4.94
Echantillon 2	2594.89	635.34	4.08	4.95	
Effet de l'H₂O₂					
Echantillon 1	2549.17	626.99	4.07	4.93	4.94
Echantillon 2	2779.97	680.75	4.08	4.95	
Solution standard 1					
Echantillon 1	2414.5	594.28	4.06	4.93	4.97
Echantillon 2	2392.4	579.38	4.13	5.01	



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

1 / 35

DOSAGE DU BHT

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: 1CFAU
Méthode: HPLC-UV
Protocole: Validation dosage BHT
Produit: BHT
Composé: BHT
Matrice: Méthanol



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

4 / 35

Dosage du BHT

1. Introduction

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

Les critères de validation présentés dans ce rapport sont :

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

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

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



2. Plan d'expériences

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

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

La matrice est : Méthanol

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

Tableau I - Standards d'étalonnage

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

Le nombre total d'observations est 18.

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

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

Tableau II - Standards de Validation

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



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

6 / 35

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

Le nombre total d'observations est 27.

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



3. Fonction de réponse

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

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

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

Modèle	Indice d'Exactitude	Limite inférieure et supérieure de quantification (ug/mL)	Indice d'Intervalle de Dosage	Indice de Fidélité	Indice de Justesse
Regression lineaire	0.7609	[1.001 , 5.005]	1.000	0.4479	0.9835

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**

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

$$Y = a + bX$$

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

Tableau IV - Paramètres de régression

Série	Ordonnée à l'origine	Pente	r ²	d.d.l. résiduels	SCR
1	-0.01306	0.4845	0.9994	4	0.002271
2	0.01156	0.4824	0.9995	4	0.001939
3	0.02681	0.4640	0.9997	4	0.001094

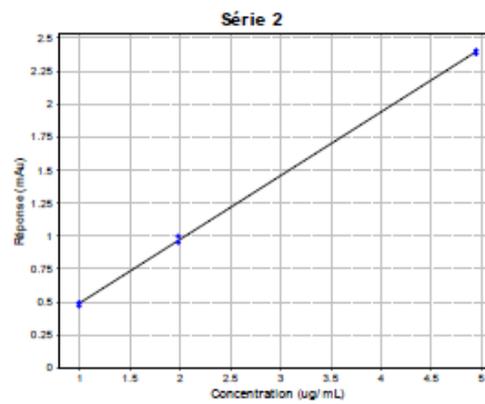
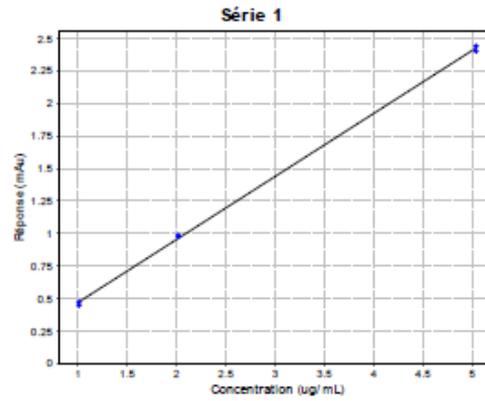
r² = coefficient de détermination; d.d.l. = degrés de liberté; SCR = somme des carrés des résidus



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

8 / 35

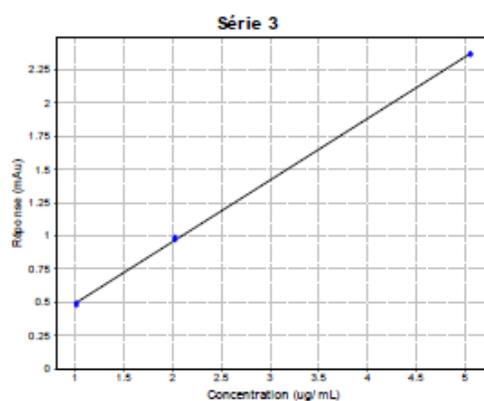
Figure 1 - Courbes d'étalonnage





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

9 / 35



Identifiant d'exploitation:
ENOV-V3.0d PROD-2016352440119

e-nova1 V3.0d PROD
Rapport v1.4 FR

17 déc. 2016 19:02 (CET)
© Arlenda 2001-2016.



4. Justesse

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

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

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

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

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

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

Tableau V - Justesse

Niveau de concentration (ug/mL)	Moyenne des concentrations introduites (ug/mL)	Moyenne des concentrations calculées (ug/mL)	Biais absolu (ug/mL)	Biais relatif (%)	Taux de recouvrement (%)	Intervalle de confiance à 95% des Recouvrements (%)
1.0	5.005	5.000	-0.004875	-0.09740	99.90	[98.29 , 101.5]
2.0	2.002	2.069	0.06656	3.325	103.3	[101.2 , 105.4]
3.0	1.001	0.9980	-0.003042	-0.3039	99.70	[97.14 , 102.3]



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	5.005	1.006	2.348
2.0	2.002	2.483	2.843
3.0	1.001	3.248	3.357

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	5.005	0.05035	0.1062	4.450	0.1175
2.0	2.002	0.04972	0.02772	0.3110	0.05693
3.0	1.001	0.03251	0.008503	0.06839	0.03361

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	5.005	0.09644	0.4880



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

12 / 35

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	2.002	0.09523	0.1817
3.0	1.001	0.06228	0.09595

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	5.010	4.956	99.02
1.0	2	5.000	4.919	98.28
1.0	3	5.005	5.125	102.4
1.0	Moyenne des series	5.005	5.000	99.90
2.0	1	2.004	2.071	103.5
2.0	2	2.000	2.027	101.3
2.0	3	2.002	2.107	105.2
2.0	Moyenne des series	2.002	2.069	103.3
3.0	1	1.002	1.022	102.1
3.0	2	1.000	0.9843	98.33
3.0	3	1.001	0.9879	98.69
3.0	Moyenne des series	1.001	0.9980	99.70



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

13 / 35

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	5.005	0.06357	0.1336	0.2673	5.340
2.0	2.002	0.02304	0.06141	0.1228	6.135
3.0	1.001	0.01190	0.03565	0.07130	7.123



7. Exactitude

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

Les limites d'acceptation ont été fixées à $\pm 15\%$, et ceci en accord avec l'objectif de la procédure analytique.

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

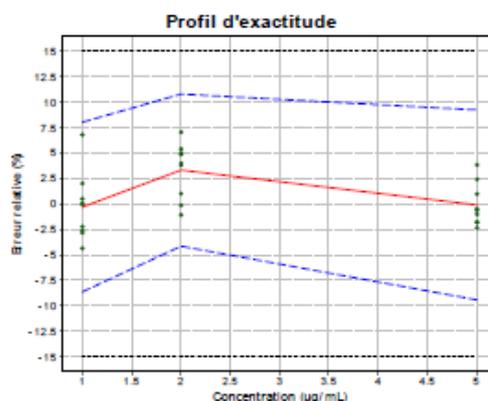
La formule utilisée pour le calcul de cet intervalle de tolérance est:

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

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

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

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





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

15 / 35

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



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

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	5.005	[4.533 , 5.467]	[-9.434 , 9.239]	1.651
2.0	2.002	[1.919 , 2.218]	[-4.151 , 10.80]	0.4776
3.0	1.001	[0.9145 , 1.081]	[-8.640 , 8.032]	0.3562

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

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



8. Linéarité des résultats

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

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

$$Y = 0.03514 + 0.9942 X$$

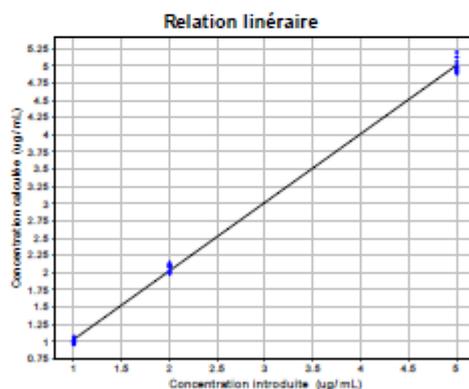
où Y = concentrations calculées (ug/mL) et X = concentrations introduites (ug/mL).

Le coefficient de détermination (r^2) est égal à 0.9981 .

La somme des carrés des résidus (SCR) est égale à 0.1484 .

Les concentrations calculées figurent en annexe 3.

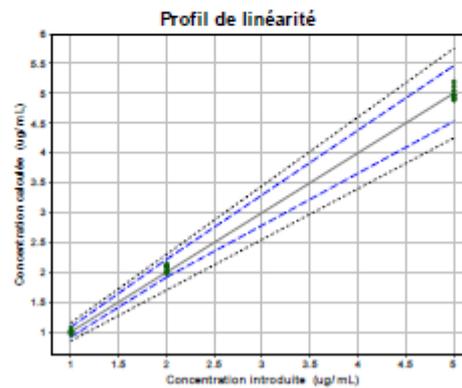
Figure 4 - Relation entre les concentrations introduites et calculées



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



Figure 5 - Graphe de linéarité



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

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

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

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

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

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



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

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

Il existe deux façons de calculer la LD :

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

L'application choisit la plus petite valeur.

LD (ug/mL) = 0.1394

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) = 1.001

Limite supérieure de quantification (LQ_{sup}) (ug/mL) = 5.005

Annexe XVIII : Rapport e-noval obtenu pour la validation de la méthode d'analyse de l'Antioxydant 425



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

1 / 34

DOSAGE DE L'ANTIOXYDANT 425

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: 1CFAU
Méthode: HPLC-UV
Protocole: Validation dosage Antioxydant 425
Produit: Antioxydant 425
Composé: Antioxydant 425
Matrice: Méthanol



Dosage de l'Antioxydant 425

1. Introduction

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

Les critères de validation présentés dans ce rapport sont :

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

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

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



2. Plan d'expériences

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

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

La matrice est : Méthanol

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

Tableau I - Standards d'étalonnage

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

Le nombre total d'observations est 18.

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

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

Tableau II - Standards de Validation

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



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

6 / 34

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

Le nombre total d'observations est 27.

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



3. Fonction de réponse

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

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

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

Modèle	Indice d'Exactitude	Limite inférieure et supérieure de quantification (ug/mL)	Indice d'Intervalle de Dosage	Indice de Fidélité	Indice de Justesse
Régression linéaire passant par 0 ajustée en utilisant uniquement le niveau 3	0.8779	[1.000 , 5.002]	1.000	0.6850	0.9876

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)

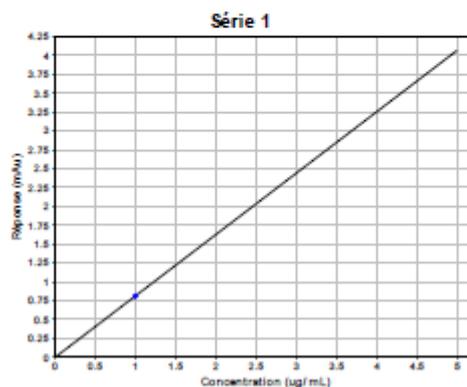
Tableau IV - Paramètres de régression

Série	Pente	r ²	d.d.l. résiduels	SCR
1	0.8142	ND	1	0.00004490
2	0.8097	ND	1	0.00000001
3	0.7997	ND	1	0.00001165

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



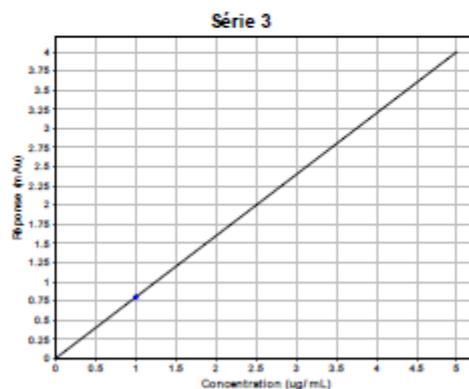
Figure 1 - Courbes d'étalonnage





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

9 / 34



Identifiant d'exploitation:
ENOV-V3.0d PROD-2016341504415

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

6 déc. 2016 15:45 (CET)
© Arlenda 2001-2016.



4. Justesse

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

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

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

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

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

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

Tableau V - Justesse

Niveau de concentration (ug/mL)	Moyenne des concentrations introduites (ug/mL)	Moyenne des concentrations calculées (ug/mL)	Biais absolu (ug/mL)	Biais relatif (%)	Taux de recouvrement (%)	Intervalle de confiance à 95% des Recouvrements (%)
1.0	5.002	5.063	0.06126	1.225	101.2	[100.7, 101.8]
2.0	2.001	1.967	-0.03380	-1.689	98.31	[97.20, 99.42]
3.0	1.000	0.9803	-0.02002	-2.001	98.00	[95.57, 100.4]



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%) [‡]	Fidélité Intermédiaire (CV%) [‡]
1.0	5.002	0.5215	0.8019
2.0	2.001	0.8773	1.588
3.0	1.000	3.153	3.153

[‡] 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	5.002	0.02608	0.03047	1.364	0.04011
2.0	2.001	0.01755	0.02649	2.277	0.03178
3.0	1.000	0.03154	0	0	0.03154

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	5.002	0.04996	0.1517



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

12 / 34

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	2.001	0.03362	0.1261
3.0	1.000	0.05397	0.05397

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	4.990	5.051	101.0
1.0	2	5.005	5.036	100.7
1.0	3	5.010	5.101	102.0
1.0	Moyenne des series	5.002	5.063	101.2
2.0	1	1.996	1.936	96.76
2.0	2	2.002	1.973	98.63
2.0	3	2.004	1.991	99.54
2.0	Moyenne des series	2.001	1.967	98.31
3.0	1	0.9980	0.9908	99.05
3.0	2	1.001	0.9736	97.33
3.0	3	1.002	0.9766	97.62
3.0	Moyenne des series	1.000	0.9803	98.00



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	5.002	0.01962	0.04465	0.08930	1.785
2.0	2.001	0.01637	0.03575	0.07149	3.573
3.0	1.000	0.01051	0.03325	0.06650	6.648



7. Exactitude

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

Les limites d'acceptation ont été fixées à $\pm 15\%$, et ceci en accord avec l'objectif de la procédure analytique.

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

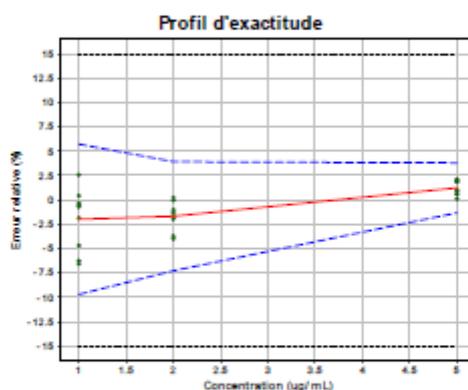
La formule utilisée pour le calcul de cet intervalle de tolérance est:

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

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

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

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

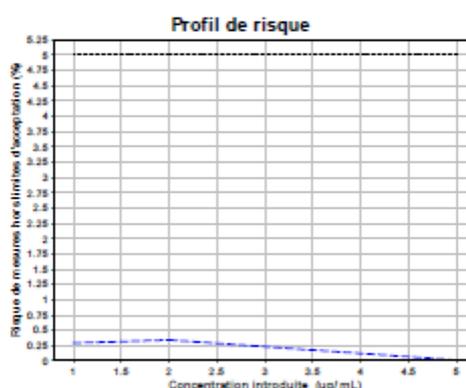




La ligne rouge continue représente le biais, les lignes discontinues bleues définissent les limites de l'intervalle de tolérance attendues au niveau β et les lignes pointillées noires sont les limites d'acceptation. Les points sont quant à eux l'erreur relative des concentrations calculées et sont représentées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

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

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



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

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

Niveau de concentration (µg/mL)	Moyenne des concentrations introduites ¹ (µg/mL)	Limites de tolérance "Beta-expectation" (µg/mL)	Limites de tolérance "Beta-expectation" relatives (%)	Risque ² (%)
1.0	5.002	[4.935 , 5.191]	[-1.338 , 3.788]	0.01349
2.0	2.001	[1.855 , 2.079]	[-7.288 , 3.909]	0.3433
3.0	1.000	[0.9031 , 1.057]	[-9.716 , 5.713]	0.2914

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

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



8. Linéarité des résultats

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

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

$$Y = -0.05870 + 1.023 X$$

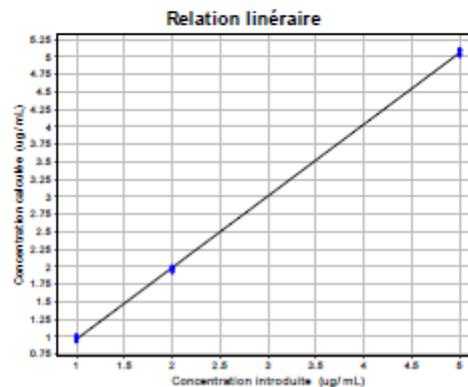
où Y = concentrations calculées (ug/mL) et X = concentrations introduites (ug/mL).

Le coefficient de détermination (r^2) est égal à 0.9996 .

La somme des carrés des résidus (SCR) est égale à 0.03209 .

Les concentrations calculées figurent en annexe 3.

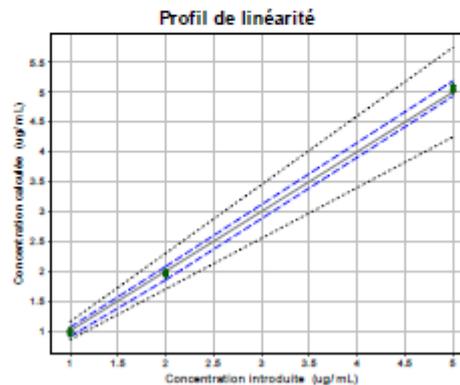
Figure 4 - Relation entre les concentrations introduites et calculées



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



Figure 5 - Graphe de linéarité



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

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

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

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

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

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



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

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

Il existe deux façons de calculer la LD :

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

L'application choisit la plus petite valeur.

LD (ug/mL) = 0.01264

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) = 1.000

Limite supérieure de quantification (LQ_{sup}) (ug/mL) = 5.002

Annexe XIX : Rapports d'aires et de concentrations introduits dans le logiciel e-noval pour le BHT

Les données ci-dessous ont été introduites dans le logiciel e-noval :

Tableau 1 : Standards d'étalonnage

SampleID	Series	Level	Concentration	Response
API1	1	1	5.04	2.44
API2	1	1	5.04	2.40
API3	1	2	2.01	0.99
API4	1	2	2.01	0.98
API5	1	3	1.01	0.47
API6	1	3	1.01	0.45
API7	2	1	4.95	2.38
API8	2	1	4.95	2.41
API9	2	2	1.98	1.00
API10	2	2	1.98	0.95
API11	2	3	0.99	0.49
API12	2	3	0.99	0.47
API13	3	1	5.06	2.37
API14	3	1	5.06	2.36
API15	3	2	2.02	0.97
API16	3	2	2.02	0.99
API17	3	3	1.01	0.48
API18	3	3	1.01	0.49

Tableau 2 : Standards de validation

SampleID	Series	Level	Concentration	Response
PROD1	1	1	5.01	2.37
PROD2	1	1	5.01	2.40
PROD3	1	1	5.01	2.40
PROD4	1	2	2.00	1.00
PROD5	1	2	2.00	0.97
PROD6	1	2	2.00	1.01
PROD7	1	3	1.00	0.48
PROD8	1	3	1.00	0.51
PROD9	1	3	1.00	0.46
PROD10	2	1	5.00	2.37
PROD11	2	1	5.00	2.40
PROD12	2	1	5.00	2.38
PROD13	2	2	2.00	0.98
PROD14	2	2	2.00	1.02
PROD15	2	2	2.00	0.97
PROD16	2	3	1.00	0.49
PROD17	2	3	1.00	0.48
PROD18	2	3	1.00	0.48
PROD19	3	1	5.00	2.37
PROD20	3	1	5.00	2.41
PROD21	3	1	5.00	2.44
PROD22	3	2	2.00	0.99
PROD23	3	2	2.00	1.02
PROD24	3	2	2.00	1.00
PROD25	3	3	1.00	0.49
PROD26	3	3	1.00	0.49
PROD27	3	3	1.00	0.47

Annexe XX : Rapports d'aires et de concentrations introduits dans le logiciel e-novel pour l'Antioxydant 425

Les données ci-dessous ont été introduites dans le logiciel e-novel :

Tableau 1 : Standards d'étalonnage

SampleID	Series	Level	Concentration	Response
API1	1	1	4.98	4.14
API2	1	1	4.98	4.10
API3	1	2	1.99	1.58
API4	1	2	1.99	1.57
API5	1	3	1.00	0.81
API6	1	3	1.00	0.82
API7	2	1	4.97	4.13
API8	2	1	4.97	4.19
API9	2	2	1.99	1.61
API10	2	2	1.99	1.62
API11	2	3	0.99	0.80
API12	2	3	0.99	0.80
API13	3	1	4.99	4.10
API14	3	1	4.99	4.08
API15	3	2	2.00	1.59
API16	3	2	2.00	1.55
API17	3	3	1.00	0.80
API18	3	3	1.00	0.80

Tableau 2 : Standards de validation

SampleID	Series	Level	Concentration	Response
PROD1	1	1	4.99	4.07
PROD2	1	1	4.99	4.14
PROD3	1	1	4.99	4.11
PROD4	1	2	2.00	1.59
PROD5	1	2	2.00	1.56
PROD6	1	2	2.00	1.56
PROD7	1	3	1.00	0.81
PROD8	1	3	1.00	0.83
PROD9	1	3	1.00	0.77
PROD10	2	1	5.00	4.07
PROD11	2	1	5.00	4.09
PROD12	2	1	5.00	4.08
PROD13	2	2	2.00	1.60
PROD14	2	2	2.00	1.59
PROD15	2	2	2.00	1.60
PROD16	2	3	1.00	0.81
PROD17	2	3	1.00	0.80
PROD18	2	3	1.00	0.76
PROD19	3	1	5.01	4.09
PROD20	3	1	5.01	4.08
PROD21	3	1	5.01	4.09
PROD22	3	2	2.00	1.60
PROD23	3	2	2.00	1.61
PROD24	3	2	2.00	1.58
PROD25	3	3	1.00	0.80
PROD26	3	3	1.00	0.80
PROD27	3	3	1.00	0.75

Annexe XXI : Résultats détaillés obtenus pour la stabilité

Les résultats détaillés obtenus pour la stabilité figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 : Résultats détaillés

BHT					
Stabilité	Aire_{BHT}	Aire_{ISTD}	Rapport aire	C_{BHT} [µg/mL]	Pourcentage de la variation des concentrations au cours du temps par rapport à t₀
t₀	1356.82	508.28	2.67	5.04	
t_{24 heures}	1292.90	490.51	2.64	4.97	102.17%
t_{48 heures}	1424.65	527.90	2.70	5.09	101.11%
t_{72 heures}	1364.77	523.71	2.61	4.92	98.86%
t_{7 jours}	1369.40	530.71	2.58	4.87	95.57%
Antioxydant 425					
Stabilité	Aire_{Antioxydant 425}	Aire_{ISTD}	Rapport aire	C_{Antioxydant 425} [µg/mL]	Pourcentage de la variation des concentrations au cours du temps par rapport à t₀
t₀	2654.47	508.28	5.22	4.98	
t_{24 heures}	2723.23	490.51	5.55	5.29	106.24%
t_{48 heures}	2752.96	527.90	5.21	4.97	95.63%
t_{72 heures}	2580.20	523.71	4.93	4.70	93.99%
t_{7 jours}	2767.41	530.71	5.21	4.97	90.02%

Annexe XXII : Résultats détaillés pour les échantillons testés dans différentes conditions de dérivatisation

Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus pour les échantillons dérivatisés selon les conditions initiales, c'est-à-dire à 70 [°C] pendant 1 heure en utilisant le DMF comme catalyseur :

Tableau 1 : Résultats

Conditions initiales (70 [°C], 60 [min], DMF)			
Acide caprylique			
	Aire_{Acide caprylique}	Aire_{ISTD}	Rapport Aire
Echantillon 1	18410000	6917000	2.66
Echantillon 2	13820000	5821000	2.37
Echantillon 3	12460000	4830000	2.58
		Moyenne [µg/mL]	2.54
		Variance	0.02
		Ecart-type	0.15
		CV [%]	5.83%
Acide myristique			
	Aire_{Acide myristique}	Aire_{ISTD}	Rapport Aire
Echantillon 1	5490000	6917000	0.79
Echantillon 2	4773220	5821000	0.82
Echantillon 3	4153500	4830000	0.86
		Moyenne [µg/mL]	0.83
		Variance	0.00
		Ecart-type	0.04
		CV [%]	4.34%

Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus pour les échantillons dérivatisés selon les conditions 1, c'est-à-dire à 70 [°C] pendant 30 minutes en utilisant le DMF comme catalyseur :

Tableau 2 : Résultats

Conditions 1 (70 [°C], 30 [min], DMF)			
Acide caprylique			
	Aire_{Acide caprylique}	Aire_{ISTD}	Rapport Aire
Echantillon 1	16160000	5801000	2.79
Echantillon 2	17090000	6248000	2.74
Echantillon 3	16290000	5883000	2.77
		Moyenne [µg/mL]	2.76
		Variance	0.00
		Ecart-type	0.03
		CV [%]	0.93%
Acide myristique			
	Aire_{Acide myristique}	Aire_{ISTD}	Rapport Aire
Echantillon 1	4918000	5801000	0.85
Echantillon 2	5109000	6248000	0.82
Echantillon 3	4938000	5883000	0.84
		Moyenne [µg/mL]	0.83
		Variance	0.00
		Ecart-type	0.02
		CV [%]	1.86%

Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus pour les échantillons dérivatisés selon les conditions 2, c'est-à-dire à 70 [°C] pendant 30 minutes en utilisant la pyridine comme catalyseur :

Tableau 3 : Résultats

Conditions 2 (70 [°C], 30 [min], Pyridine)			
Acide caprylique			
	Aire_{Acide caprylique}	Aire_{ISTD}	Rapport Aire
Echantillon 1	18380000	8690000	2.12
Echantillon 2	19070000	8430000	2.26
Echantillon 3	18910000	7768000	2.43
Moyenne [µg/mL]			2.27
Variance			0.03
Ecart-type			0.16
CV [%]			7.04%
Acide myristique			
	Aire_{Acide myristique}	Aire_{ISTD}	Rapport Aire
Echantillon 1	9056000	8690000	1.04
Echantillon 2	6994000	8430000	0.83
Echantillon 3	6573000	7768000	0.85
Moyenne [µg/mL]			0.91
Variance			0.01
Ecart-type			0.12
CV [%]			13.05%

Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus pour les échantillons dérivatisés selon les conditions 3, c'est-à-dire à 120 [°C] pendant 30 minutes en utilisant le DMF comme catalyseur :

Tableau 4 : Résultats

Conditions 3 (120 [°C], 30 [min], DMF)			
Acide caprylique			
	Aire_{Acide caprylique}	Aire_{ISTD}	Rapport Aire
Echantillon 1	18610000	6907000	2.69
Echantillon 2	13420000	4870000	2.76
Echantillon 3	12460000	4830000	2.58
Moyenne [µg/mL]			2.68
Variance			0.01
Ecart-type			0.09
CV [%]			3.34%
Acide myristique			
	Aire_{Acide myristique}	Aire_{ISTD}	Rapport Aire
Echantillon 1	7585000	6907000	1.10
Echantillon 2	5680000	4870000	1.17
Echantillon 3	5604000	4830000	1.16
Moyenne [µg/mL]			1.14
Variance			0.00
Ecart-type			0.04
CV [%]			3.30%

Les résultats des différentes conditions de dérivation sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5 : Résultats

Acide caprylique	Rapport Aire Acide caprylique			
	Conditions initiales (70 [°C], 60 [min], DMF)	Conditions 1 (70 [°C], 30 [min], DMF)	Conditions 2 (70 [°C], 30 [min], Pyridine)	Conditions 3 (120 [°C], 30 [min], DMF)
Moyenne [µg/mL]	2.54	2.76	2.27	2.68
Variance	0.02	0.00	0.03	0.01
Ecart-type	0.15	0.03	0.16	0.09
CV [%]	5.83%	0.93%	7.04%	3.34%
t_(0.05;2)	4.30	4.30	4.30	4.30
IC_{95%}	0.45	0.08	0.49	0.27
Acide myristique	Rapport Aire Acide myristique			
	Conditions initiales (70 [°C], 60 [min], DMF)	Conditions 1 (70 [°C], 30 [min], DMF)	Conditions 2 (70 [°C], 30 [min], Pyridine)	Conditions 3 (120 [°C], 30 [min], DMF)
Moyenne [µg/mL]	0.83	0.83	0.91	1.14
Variance	0.00	0.00	0.01	0.00
Ecart-type	0.04	0.02	0.12	0.04
CV [%]	4.34%	1.86%	13.05%	3.30%
t_(0.05;2)	4.30	4.30	4.30	4.30
IC_{95%}	0.11	0.04	0.29	0.09

Annexe XXIII : Analyse statistique des résultats des échantillons testés dans les différentes conditions de dérivatisation

Le tableau ci-dessous résume les résultats statistiques obtenus suite à la comparaison des résultats obtenus pour les échantillons dérivatisés dans les conditions initiales, c'est-à-dire à 70 [°C] pendant 1 heure en utilisant le DMF comme catalyseur et dans les conditions 1, c'est-à-dire à 70 [°C] pendant 30 minutes en utilisant le DMF comme catalyseur :

Tableau 1 : Analyse statistique

Acide caprylique			Acide myristique	
Comparaison	Conditions initiales	Conditions 1	Conditions initiales	Conditions 1
Moyenne des rapports d'aire [$\mu\text{g/mL}$]	2.54	2.76	0.83	0.83
Variance	0.02	0.00	0.00	0.00
Test de Fisher				
$F_{\text{calculé}}$	33.20		5.32	
$F_{\text{théorique}}$	19.00		19.00	
Test de Student				
$t_{\text{théorique}}$	2.78		2.78	
$t_{\text{observé}}$	2.59		0.42	

Selon les résultats de l'analyse statistique pour l'acide caprylique, la valeur $F_{\text{calculé}}$ est supérieure à la valeur $F_{\text{théorique}}$. Cela signifie que les variances sont différentes. Un test de Student à variances inégales est réalisé. Il démontre que le $t_{\text{théorique}}$ est supérieur au $t_{\text{observé}}$. Cela signifie que la différence n'est pas significative entre les résultats obtenus dans les deux conditions de dérivatisation différentes.

Pour l'acide myristique, un test de Student à variances égales a été réalisé car les variances sont égales ($F_{\text{calculé}} (= 5.32)$ est inférieure à $F_{\text{théorique}} (=19.00)$). Suite au test de Student, il est possible de conclure que la différence n'est pas significative entre les résultats obtenus dans les deux conditions de dérivatisation car le $t_{\text{théorique}}$ est supérieur au $t_{\text{observé}}$.

La comparaison des résultats obtenus dans les conditions de dérivation 1 (70 [°C], 30 [min], DMF) avec ceux obtenus dans les conditions de dérivation 2 (70 [°C], 30 [min], Pyridine) a ensuite été réalisée :

Tableau 2 : Analyse statistique

Acide caprylique			Acide myristique	
Comparaison	Conditions 1	Conditions 2	Conditions 1	Conditions 2
Moyenne des rapports d'aire [$\mu\text{g/mL}$]	2.76	2.27	0.83	0.91
Variance	0.00	0.03	0.00	0.01
Test de Fisher				
F _{calculé}	38.67		57.99	
F _{théorique}	19.00		19.00	
Test de Student				
t _{théorique}	2.78		2.78	
t _{observé}	5.27		1.03	

Selon les résultats de l'analyse statistique pour l'acide caprylique, la valeur $F_{\text{calculé}}$ est supérieure à la valeur $F_{\text{théorique}}$. Cela signifie que les variances sont différentes. Un test de Student à variances inégales est réalisé. Il démontre que le $t_{\text{théorique}}$ est inférieur au $t_{\text{observé}}$. Cela signifie que la différence est significative entre les résultats obtenus dans les deux conditions de dérivation différentes.

Pour l'acide myristique, un test de Student à variances inégales a été réalisé ($F_{\text{calculé}}$ (= 57.99) est supérieur à $F_{\text{théorique}}$ (=19.00)). Suite au test de Student, il est possible de conclure que la différence n'est pas significative entre les résultats obtenus dans les deux conditions de dérivation car le $t_{\text{théorique}}$ est supérieur au $t_{\text{observé}}$.

Finalement, la comparaison des résultats obtenus dans les conditions de dérivation 2 (70 [°C], 30 [min], Pyridine) avec ceux obtenus dans les conditions de dérivation 3 (120 [°C], 30 [min], DMF) a ensuite été réalisée :

Tableau 3 : Analyse statistique

Acide caprylique			Acide myristique	
Comparaison	Conditions 2	Conditions 3	Conditions 2	Conditions 3
Moyenne des rapports d'aire [$\mu\text{g/mL}$]	2.27	2.68	0.91	1.14
Variance	0.03	0.01	0.01	0.00
Test de Fisher				
F _{calculé}	3.20		9.82	
F _{théorique}	19.00		19.00	
Test de Student				
t _{théorique}	2.78		2.78	
t _{observé}	3.84		3.29	

Selon les résultats de l'analyse statistique pour l'acide caprylique et l'acide myristique, la valeur $F_{\text{calculé}}$ est inférieure à la valeur $F_{\text{théorique}}$. Cela signifie que les variances sont égales. Un test de Student à variances égales est réalisé. Il démontre que le $t_{\text{théorique}}$ est inférieur au $t_{\text{observé}}$. Cela signifie que la différence est significative entre les résultats obtenus dans ces deux conditions de dérivation différentes.

Annexe XXIV : Résultats détaillés du rendement d'extraction

Une courbe d'étalonnage doit d'abord être tracée afin de pouvoir calculer la concentration en acide myristique, en acide caprylique et en Bisphénol M obtenue pour chaque échantillon analysé. La droite d'étalonnage est tracée à partir de trois solutions d'étalonnage de 3 niveaux de concentration différents en acide caprylique, acide myristique et en Bisphénol M.

Pour ce faire, trois solutions mères des substances d'intérêt (Acide myristique, Bisphénol M et acide caprylique) sont préparées selon le protocole ci-dessous :

- 1) **Solution mère d'acide myristique** : Dissoudre exactement **10.0 [mg]** d'acide myristique dans 10 [mL] d'hexane.
- 2) **Solution mère d'acide caprylique** : Dissoudre exactement **10.0 [mg]** d'acide caprylique dans 10 [mL] d'hexane.
- 3) **Solution mère de Bisphénol M** : Dissoudre exactement **10.0 [mg]** de Bisphénol M dans 10 [mL] de méthanol.

Une solution fille contenant un mélange d'acide myristique, d'acide caprylique et de Bisphénol M est ensuite préparée selon le protocole ci-dessous :

Solution fille d'acide myristique, de Bisphénol M et d'acide caprylique à 2 [µg/mL] : Prélever 50 [µL] de chaque solution mère et compléter à 25 [mL] avec du méthanol.

Les standards d'étalonnage sont ensuite préparés à partir de la solution fille à 2 [µg/mL] selon le schéma de dilution figurant dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 : Standard d'étalonnage

Standard d'étalonnage	Concentration du standard d'étalonnage [µg/mL]	Volume de solution fille à prélever [µL]	Volume de méthanol à prélever [µL]	Volume total [µL]
STD1	1.00	250	250	500
STD2	0.40	100	400	
STD3	0.20	50	450	
Blanc	500 [µL] de méthanol + 500 [µL] d'hexane ayant subi la réaction de dérivatisation			

Le standard interne d'injection doit ensuite être ajouté à chaque standard d'étalonnage. Pour ce faire, une solution mère d'Irganox 415, le standard interne d'injection, à 1 [mg/mL] est préparée selon le protocole ci-dessous :

Solution mère d'Irganox 415 : Dissoudre exactement **10.0 [mg]** d'Irganox 415 dans 10 [mL] de méthanol.

Une solution fille d'Irganox à 1 [µg/mL] est ensuite préparée selon le protocole ci-dessous :

Solution fille d'Irganox 415 à 1 [µg/mL] : Prélever 25 [µL] de chaque solution mère et compléter à 25 [mL] avec du méthanol.

Ajouter 500 [µL] de la solution fille d'Irganox 415 à 1 [µg/mL] dans chaque vial. Effectuer la réaction de dérivation selon le protocole de dérivation. La solution est ensuite injectée.

Les concentrations finales des standards d'étalonnage sont de 0.5 [µg/mL], 0.2 [µg/mL] et 0.1 [µg/mL]. La concentration finale du standard d'injection est de 0.5 [µg/mL].

Tableau 2 : Résultats obtenus pour la droite d'étalonnage

Acide caprylique						
STD	Aire Acide caprylique	Aire Irganox 415	Rapport Aire	Concentration Acide caprylique [µg/mL]	Concentration Irganox 415 [µg/mL]	Rapport concentration
STD1	65150000	19000000	3.43	0.52	0.50	1.05
STD2	18050000	10400000	1.74	0.21	0.50	0.42
STD3	7560000	10700000	0.71	0.10	0.50	0.21
Pente			3.11			
Ordonnée à l'origine			0.21			
Coefficient de détermination			0.98			
Acide myristique						
STD	Aire Acide myristique	Aire Irganox 415	Rapport Aire	Concentration Acide myristique [µg/mL]	Concentration Irganox 415 [µg/mL]	Rapport concentration
STD1	27150000	19000000	1.43	0.50	0.50	1.01
STD2	8095000	10400000	0.78	0.20	0.50	0.40
STD3	4360000	10700000	0.41	0.10	0.50	0.20
Pente			1.22			
Ordonnée à l'origine			0.21			
Coefficient de détermination			0.98			
Bisphénol M						
STD	Aire BPM	Aire Irganox 415	Rapport Aire	Concentration Bisphénol M [µg/mL]	Concentration Irganox 415 [µg/mL]	Rapport concentration
STD1	19050000	19000000	1.00	0.50	0.50	1.01
STD2	3940000	10400000	0.38	0.20	0.50	0.40
STD3	2225000	10700000	0.21	0.10	0.50	0.20
Pente			0.99			
Ordonnée à l'origine			-0.01			
Coefficient de détermination			1.00			

A partir de la droite d'étalonnage établie ci-dessus, les concentrations en acide myristique, en acide caprylique et en Bisphénol M ont pu être calculées pour chaque échantillon extrait. Les résultats obtenus pour les cinq échantillons spikés avec de l'acide caprylique, de l'acide myristique et du Bisphénol M à 1 [µg/mL] sont détaillés dans les trois tableaux ci-dessous :

Tableau 3 : Résultats du rendement d'extraction pour l'acide caprylique

Acide caprylique				
Extraction*	Aire_{Acide caprylique}	Aire_{ISTD}	Rapport aire_{Acide caprylique}	C_{Acide caprylique} [µg/mL]
Extraction 1	27900000	11600000	2.41	0.35
Extraction 2	28840000	10100000	2.86	0.43
Extraction 4	23560000	9260000	2.54	0.38
Extraction 5	19680000	9199000	2.14	0.31
STD	36600000	8510000	4.30	0.66
Moyenne				0.37
Ecart-type				0.05
CV [%]				13.10%
Rendement [%]				55.64%

*La valeur des aires obtenues pour la 3^{ème} extraction était aberrante et a été retirée.

Tableau 4 : Résultats du rendement d'extraction pour l'acide myristique

Acide myristique				
Extraction*	Aire_{Acide myristique}	Aire_{ISTD}	Rapport aire_{Acide myristique}	C_{Acide myristique} [µg/mL]
Extraction 1	20900000	11600000	1.80	0.65
Extraction 2	17800000	10100000	1.76	0.64
Extraction 4	17400000	9260000	1.88	0.68
Extraction 5	16730000	9199000	1.82	0.66
STD	15400000	8510000	1.81	0.66
Moyenne				0.66
Ecart-type				0.02
CV [%]				3.02%
Rendement				100.36%

*La valeur des aires obtenues pour la 3^{ème} extraction était aberrante et a été retirée.

Tableau 5 : Résultats du rendement d'extraction pour le Bisphénol M

Bisphénol M				
Extraction*	Aire_{Bisphénol M}	Aire_{ISTD}	Rapport aire_{Bisphénol M}	C_{Bisphénol M} [µg/mL]
Extraction 1	4370000	11600000	0.38	0.20
Extraction 2	5690000	10100000	0.56	0.29
Extraction 4	2920000	9260000	0.32	0.16
Extraction 5	2750530	9199000	0.30	0.16
STD	8620000	8510000	1.01	0.52
Moyenne				0.20
Ecart-type				0.06
CV [%]				30.41%
Rendement [%]				38.97%

*La valeur des aires obtenues pour la 3^{ème} extraction était aberrante et a été retirée.

Annexe XXV : Résultats détaillés du rendement d'extraction

Une courbe d'étalonnage doit d'abord être tracée afin de pouvoir calculer la concentration en acide myristique et en acide caprylique obtenue pour chaque échantillon analysé. La droite d'étalonnage est tracée à partir de trois solutions d'étalonnage de 3 niveaux de concentration différents en acide caprylique et acide myristique.

Pour ce faire, deux solutions mères des substances d'intérêt (Acide myristique et caprylique) sont préparées selon le protocole ci-dessous :

- 1) **Solution mère d'acide myristique** : Dissoudre exactement **10.0 [mg]** d'acide myristique dans 10 [mL] d'hexane.
- 2) **Solution mère d'acide caprylique** : Dissoudre exactement **10.0 [mg]** d'acide caprylique dans 10 [mL] d'hexane.

Une solution fille contenant un mélange d'acide myristique et d'acide caprylique est ensuite préparée selon le protocole ci-dessous :

Solution fille d'acide myristique et d'acide caprylique à 2 [µg/mL] : Prélever 50 [µL] de chaque solution mère et compléter à 25 [mL] avec du méthanol.

Les standards d'étalonnage sont ensuite préparés à partir de la solution fille à 2 [µg/mL] selon le schéma de dilution figurant dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 : Standard d'étalonnage

Standard d'étalonnage	Concentration du standard d'étalonnage [µg/mL]	Volume de solution fille à prélever [µL]	Volume de méthanol à prélever [µL]	Volume total [µL]
STD1	1.00	250	250	500
STD2	0.40	100	400	
STD3	0.20	50	450	
Blanc	500 [µL] de méthanol + 500 [µL] d'hexane ayant subi la réaction de dérivatisation			

Le standard interne d'injection doit ensuite être ajouté à chaque standard d'étalonnage. Pour ce faire, une solution mère d'acide myristique D27, le standard interne d'injection, à 1 [mg/mL] est préparée selon le protocole ci-dessous :

Solution mère d'acide myristique D27 : Dissoudre exactement **10.0 [mg]** d'acide myristique D27 dans 10 [mL] d'hexane.

Une solution fille de l'acide myristique D27 à 1 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] est ensuite préparée selon le protocole ci-dessous :

Solution fille d'acide myristique D27 à 1 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] : Prélever 25 [μL] de chaque solution mère et compléter à 25 [mL] avec du méthanol.

Ajouter 500 [μL] de la solution fille d'acide myristique D27 à 1 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] dans chaque vial. Effectuer la réaction de dérivatisation selon le protocole de dérivatisation. La solution est ensuite injectée.

Les concentrations finales des standards d'étalonnage sont de 0.5 [$\mu\text{g}/\text{mL}$], 0.2 [$\mu\text{g}/\text{mL}$] et 0.1 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]. La concentration finale du standard d'injection est de 0.5 [$\mu\text{g}/\text{mL}$].

Les résultats obtenus pour la droite d'étalonnage sont résumés dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 2 : Masse pesée pour la préparation des solutions mères

Masse pesée Acide caprylique [mg]	Masse pesée Acide myristique [mg]	Masse pesée Acide myristique D27 [mg]
10.08	9.94	9.95

Tableau 3 : Résultats obtenus pour la droite d'étalonnage

Acide caprylique						
	Aire Acide caprylique	Aire Acide myristique D27	Rapport Aire	Concentration Acide caprylique [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	Concentration Acide myristique D27 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	Rapport concentration
STD1	3948000.00	1184000.00	3.33	0.50	0.50	1.01
	4064000.00	1303000.00	3.12	0.50	0.50	1.01
STD2	1835000.00	1295000.00	1.42	0.20	0.50	0.41
	2209000.00	1175000.00	1.88	0.20	0.50	0.41
STD3	1047000.00	956132.00	1.10	0.10	0.50	0.20
	957383.00	910867.00	1.05	0.10	0.50	0.20
Pente			2.64			
Ordonnée à l'origine			0.55			
Coefficient de détermination			0.97			
Acide myristique						
	Aire Acide myristique	Aire Acide myristique D27	Rapport Aire	Concentration Acide myristique [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	Concentration Acide myristique D27 [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	Rapport concentration
STD1	1091000.0	1184000.00	0.92	0.50	0.50	1.00
	1165000.0	1303000.00	0.89	0.50	0.50	1.00
STD2	275319.0	1295000.00	0.21	0.20	0.50	0.40
	213915.0	1175000.00	0.18	0.20	0.50	0.40
STD3	16158.0	956132.00	0.02	0.10	0.50	0.20
	16085.0	910867.00	0.02	0.10	0.50	0.20
Pente			1.13			
Ordonnée à l'origine			-0.23			
Coefficient de détermination			1.00			

A partir de la droite d'étalonnage établie ci-dessus, les concentrations en acide myristique et en acide caprylique ont pu être calculées pour chaque échantillon analysé. Les résultats obtenus pour le rendement sont détaillés dans les deux tableaux ci-dessous :

Tableau 4 : Résultats pour l'acide caprylique

Acide caprylique				
Extraction*	Aire_{Acide caprylique}	Aire_{ISTD}	Rapport Aire_{Acide caprylique}	C_{Acide caprylique} [µg/mL]
Extraction 1	26600000	7235000	3.68	0.59
Extraction 2	8818000	2498000	3.53	0.56
Extraction 3	9549000	2332000	4.09	0.67
STD	16000000	4010000	3.99	0.65
			Moyenne	0.60
			Ecart-type	0.06
			CV [%]	9.12%
			Rendement	93.51%

Tableau 5 : Résultats pour l'acide myristique

Acide myristique				
Extraction*	Aire_{Acide myristique}	Aire_{ISTD}	Rapport Aire_{Acide myristique}	C_{Acide myristique} [µg/mL]
Extraction 1	9655500	7235000	1.33	0.69
Extraction 2	2879500	2498000	1.15	0.61
Extraction 3	3091000	2332000	1.33	0.68
STD	5288000	4010000	1.32	0.68
			Moyenne	0.66
			Ecart-type	0.05
			CV [%]	6.83%
			Rendement [%]	96.91%

Annexe XXVI : Résultats détaillés de la répétabilité des temps de rétention

Les résultats détaillés de la répétabilité des temps de rétention figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 : Répétabilité des temps de rétention

Temps de rétention [min]			
Injection	Acide caprylique	Acide myristique	Acide myristique D27
1	3.56	9.39	9.09
2	3.56	9.39	9.08
3	3.58	9.44	9.13
4	3.54	9.39	9.08
5	3.45	9.47	9.10
6	3.56	9.45	9.33
7	3.56	9.42	9.11
8	3.56	9.43	9.13
9	3.56	9.37	9.18
10	3.56	9.45	9.18
Moyenne [min]	3.55	9.42	9.14
Ecart-type	0.04	0.03	0.08
CV [%]	1.02	0.35	0.83

Annexe XXVII : Résultats détaillés de l'essai de dégradation

La courbe d'étalonnage est préparée de la même manière qu'en annexe XXV. La droite d'étalonnage ci-dessous a été obtenue :

Tableau 1 : Résultats obtenus pour la droite d'étalonnage

Acide caprylique						
	Aire Acide caprylique	Aire Acide myristique D27	Rapport Aire	Concentration Acide caprylique [µg/mL]	Concentration Acide myristique D27 [µg/mL]	Rapport concentration
STD1	3948000.00	1184000.00	3.33	0.50	0.50	1.01
	4064000.00	1303000.00	3.12	0.50	0.50	1.01
STD2	1835000.00	1295000.00	1.42	0.20	0.50	0.41
	2209000.00	1175000.00	1.88	0.20	0.50	0.41
STD3	1047000.00	956132.00	1.10	0.10	0.50	0.20
	957383.00	910867.00	1.05	0.10	0.50	0.20
Pente			2.64			
Ordonnée à l'origine			0.55			
Coefficient de détermination			0.97			
Acide myristique						
	Aire Acide myristique	Aire Acide myristique D27	Rapport Aire	Concentration Acide myristique [µg/mL]	Concentration Acide myristique D27 [µg/mL]	Rapport concentration
STD1	1091000.0	1184000.00	0.92	0.50	0.50	1.00
	1165000.0	1303000.00	0.89	0.50	0.50	1.00
STD2	275319.0	1295000.00	0.21	0.20	0.50	0.40
	213915.0	1175000.00	0.18	0.20	0.50	0.40
STD3	16158.0	956132.00	0.02	0.10	0.50	0.20
	16085.0	910867.00	0.02	0.10	0.50	0.20
Pente			1.13			
Ordonnée à l'origine			-0.23			
Coefficient de détermination			1.00			

A partir de la droite d'étalonnage établie ci-dessus, les concentrations en acide myristique et en acide caprylique ont pu être calculées pour chaque échantillon analysé au cours de l'essai de dégradation. Les résultats de ces essais sont détaillés dans les deux tableaux ci-dessous :

Tableau 2 : Résultats de l'essai de dégradation pour l'acide caprylique

Echantillon	Acide caprylique	Acide myristique D27	Rapport Aire Acide caprylique	Concentration en Acide caprylique [µg/mL]	Concentration moyenne en Acide caprylique [µg/mL]
Effet de l'acide					
Echantillon 1	5605000	2482000	2.26	0.32	0.34
Echantillon 2	5743000	2320000	2.48	0.36	
Effet d'une base					
Echantillon 1	805749	3199000	0.25	0.06	0.06
Echantillon 2	925689	4114000	0.23	0.06	
Effet de la chaleur					
Echantillon 1	5232000	1912000	2.74	0.41	0.41
Echantillon 2	5234000	1921000	2.72	0.41	
Effet des UVs					
Echantillon 1	6246000	2788000	2.24	0.32	0.35
Echantillon 2	6050000	2322000	2.61	0.39	
Effet de l'H₂O₂					
Echantillon 1	7787000	3774000	2.06	0.29	0.29
Echantillon 2	7704000	3608000	2.14	0.30	
Solution standard 1					
Echantillon 1	4517000	1789000	2.52	0.37	0.38
Echantillon 2	3636000	1415000	2.57	0.38	

Tableau 3 : Résultats de l'essai de dégradation pour l'acide myristique

Echantillon	Acide myristique	Acide myristique D27	Rapport Aire Acide myristique	Concentration en Acide myristique [µg/mL]	Concentration moyenne en Acide myristique [µg/mL]
Effet de l'acide					
Echantillon 1	2036000	2482000	0.82	0.46	0.47
Echantillon 2	1967000	2320000	0.85	0.47	
Effet d'une base					
Echantillon 1	2412000	3199000	0.75	0.43	0.50
Echantillon 2	4283000	4114000	1.04	0.56	
Effet de la chaleur					
Echantillon 1	1516000	1912000	0.79	0.45	0.47
Echantillon 2	1713000	1921000	0.89	0.49	
Effet des UVs					
Echantillon 1	2521000	2788000	0.90	0.50	0.49
Echantillon 2	2052000	2322000	0.88	0.49	
Effet de l'H₂O₂					
Echantillon 1	3164000	3774000	0.84	0.47	0.47
Echantillon 2	3072000	3608000	0.85	0.47	
Solution standard 1					
Echantillon 1	1446000	1789000	0.81	0.46	0.46
Echantillon 2	1146000	1415000	0.81		



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

1 / 33

DOSAGE DE L'ACIDE MYRISTIQUE

Nom: Lina Berger
Société: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)
Département: Service de Pharmacie (DL)
Phase: Validation
Numéro de référence: 1CFAU
Méthode: GC-MS
Protocole: Validation dosage acide myristique
Produit: Acide myristique
Composé: Acide myristique
Matrice: Hexane



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 sélectionné.....	23
Annexe 4 Diagnostics.....	24
Annexe 5 Statistiques.....	26
Annexe 6 Résumé.....	30

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	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 - Test de Levène.....	24



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

3 / 33

Tableau XVII - Test de manque d'ajustement du modèle de régression linéaire selectionné pour l'étalonnage.....	24
Tableau XVIII - Résidus standardisés pour le modèle d'étalonnage choisi.....	24

Table des figures

Figure 1 - Courbes d'étalonnage.....	7
Figure 2 - Profil d'exactitude obtenu en considérant le modèle: Régression linéaire	12
Figure 3 - Profil de risque obtenu en considérant le modèle: Régression linéaire.....	13
Figure 4 - Relation entre les concentrations introduites et calculées.....	14
Figure 5 - Graphe de linearité.....	15
Figure 6 - Résidus standardisés.....	25



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

4 / 33

Dosage de l'acide myristique

1. Introduction

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

Les critères de validation présentés dans ce rapport sont :

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

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

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



2. Plan d'expériences

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

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

La matrice est : Hexane

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

Tableau I - Standards d'étalonnage

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

Le nombre total d'observations est 12.

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.



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	0.2539	[0.1993 , 0.2127]	0.01676	0.9864	0.9904

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**

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

$$Y = a + bX$$

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

Tableau IV - Paramètres de régression

Série	Ordonnée à l'origine	Pente	r ²	d.d.l. résiduels	SCR
1	0.1407	0.9759	0.9958	4	0.002815
2	-0.1312	1.100	0.9961	4	0.003289

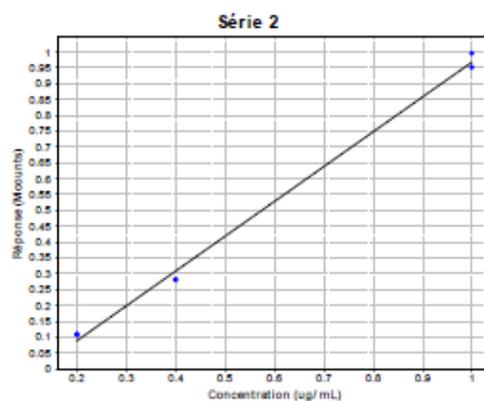
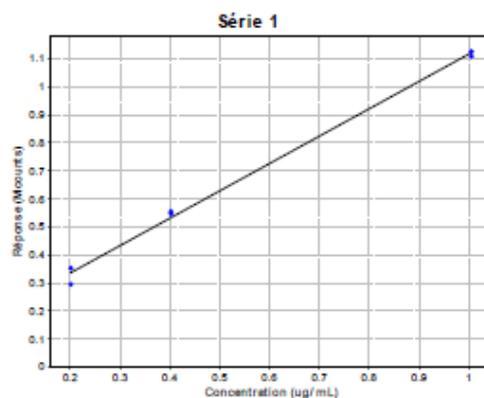
r² = coefficient de détermination; d.d.l. = degrés de liberté; SCR = somme des carrés des résidus



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

7 / 33

Figure 1 - Courbes d'étalonnage





4. Justesse

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

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

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

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

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

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

Tableau V - Justesse

Niveau de concentration (ug/mL)	Moyenne des concentrations introduites (ug/mL)	Moyenne des concentrations calculées (ug/mL)	Biais absolu (ug/mL)	Biais relatif (%)	Taux de recouvrement (%)	Intervalle de confiance à 95% des Recouvrements (%)
1.0	0.9965	0.9584	-0.03808	-3.821	96.18	[88.26 , 104.1]
2.0	0.3986	0.3852	-0.01342	-3.367	96.63	[85.42 , 107.8]
3.0	0.1993	0.1993	0.00002919	0.01464	100.0	[93.06 , 107.0]



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

9 / 33

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	0.9965	2.838	9.457
2.0	0.3986	3.069	13.56
3.0	0.1993	6.627	6.627

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	0.9965	0.02828	0.08990	10.11	0.09424
2.0	0.3986	0.01223	0.05267	18.54	0.05407
3.0	0.1993	0.01321	0	0	0.01321

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	0.9965	0.06709	1.457

Identifiant d'exploitation:
ENOV-V3.0d PROD-2016341003415

e-nova1 V3.0d PROD
Rapport v1.4 FR

6 déc. 2016 15:34 (CET)
© Arlenda 2001-2016.



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

10 / 33

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	0.3986	0.02902	0.8475
3.0	0.1993	0.02760	0.02760

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	0.9970	1.023	102.7
1.0	2	0.9960	0.8938	89.70
1.0	Moyenne des series	0.9965	0.9584	96.18
2.0	1	0.3988	0.4228	106.1
2.0	2	0.3984	0.3476	87.21
2.0	Moyenne des series	0.3986	0.3852	96.63
3.0	1	0.1994	0.1950	97.83
3.0	2	0.1992	0.2037	102.2
3.0	Moyenne des series	0.1993	0.1993	100.0



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	0.9965	0.06461	0.1143	0.2285	22.93
2.0	0.3986	0.03757	0.06584	0.1317	33.04
3.0	0.1993	0.005392	0.01427	0.02853	14.32



7. Exactitude

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

Les limites d'acceptation ont été fixées à $\pm 30\%$, et ceci en accord avec l'objectif de la procédure analytique.

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

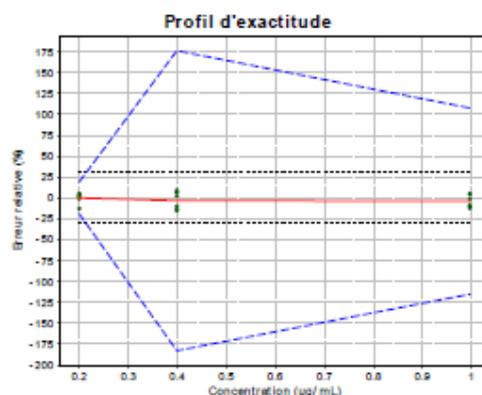
La formule utilisée pour le calcul de cet intervalle de tolérance est:

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

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

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

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





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

13 / 33

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



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

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	0.9965	[-0.1513, 2.068]	[-115.2, 107.5]	21.17
2.0	0.3986	[-0.3303, 1.101]	[-182.9, 176.1]	31.03
3.0	0.1993	[0.1614, 0.2373]	[-19.02, 19.05]	1.075

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

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



8. Linéarité des résultats

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

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

$$Y = 0.007443 + 0.9537 X$$

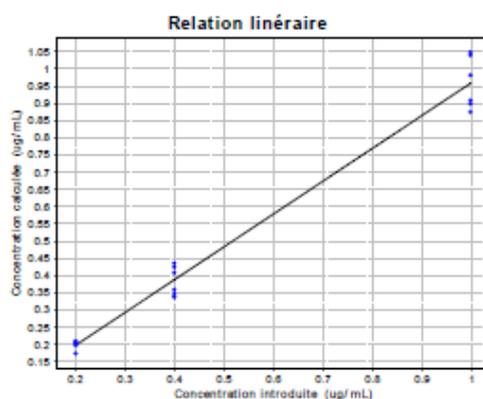
où Y = concentrations calculées (ug/mL) et X = concentrations introduites (ug/mL).

Le coefficient de détermination (r^2) est égal à 0.9801 .

La somme des carrés des résidus (SCR) est égale à 0.03824 .

Les concentrations calculées figurent en annexe 3.

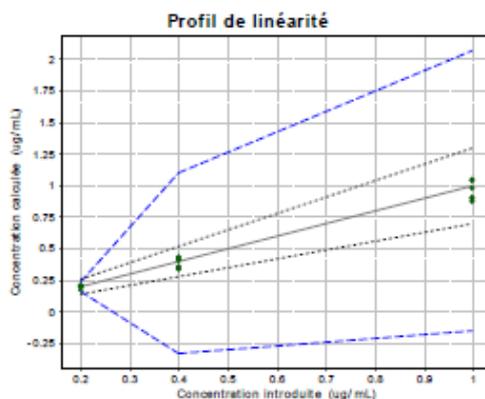
Figure 4 - Relation entre les concentrations introduites et calculées



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



Figure 5 - Graphe de linéarité



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

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

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

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

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

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



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

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

Il existe deux façons de calculer la LD :

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

L'application choisit la plus petite valeur.

LD (ug/mL) = 0.06039

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) = 0.1993

Limite supérieure de quantification (LQ_{sup}) (ug/mL) = 0.2127

Annexe XXIX : Rapports d'aires et de concentrations introduits dans le logiciel e-noval pour l'acide myristique

Tableau 1 : Standards d'étalonnage

SampleID	Series	Level	Concentration	Response
API1	1	1	1.0	1.1
API2	1	1	1.0	1.1
API3	1	2	0.4	0.6
API4	1	2	0.4	0.6
API5	1	3	0.2	0.4
API6	1	3	0.2	0.3
API7	2	1	1.0	1.0
API8	2	1	1.0	1.0
API9	2	2	0.4	0.3
API10	2	2	0.4	0.3
API11	2	3	0.2	0.1
API12	2	3	0.2	0.1

Tableau 2 : Standards de validation

SampleID	Series	Level	Concentration	Response
PROD1	1	1	1.0	1.1
PROD2	1	1	1.0	1.2
PROD3	1	1	1.0	1.2
PROD4	1	2	0.4	0.6
PROD5	1	2	0.4	0.5
PROD6	1	2	0.4	0.6
PROD7	1	3	0.2	0.3
PROD8	1	3	0.2	0.3
PROD9	1	3	0.2	0.3
PROD10	2	1	1.0	0.8
PROD11	2	1	1.0	0.9
PROD12	2	1	1.0	0.9
PROD13	2	2	0.4	0.3
PROD14	2	2	0.4	0.2
PROD15	2	2	0.4	0.2
PROD16	2	3	0.2	0.1
PROD17	2	3	0.2	0.1
PROD18	2	3	0.2	0.1

Annexe XXX : Rapports d'aires et de concentrations introduits dans le logiciel e-noval pour l'acide caprylique

Tableau 1 : Standards d'étalonnage

SampleID	Series	Level	Concentration	Response
API1	1	1	1.0	2.4
API2	1	1	1.0	2.0
API3	1	2	0.4	0.8
API4	1	2	0.4	0.9
API5	1	3	0.2	0.7
API6	1	3	0.2	0.6
API7	2	1	1.0	3.0
API8	2	1	1.0	2.8
API9	2	2	0.4	1.3
API10	2	2	0.4	1.3
API11	2	3	0.2	0.8
API12	2	3	0.2	0.7

Tableau 2 : Standards de validation

SampleID	Series	Level	Concentration	Response
PROD1	1	1	1.0	2.6
PROD2	1	1	1.0	2.8
PROD3	1	1	1.0	2.7
PROD4	1	2	0.4	1.3
PROD5	1	2	0.4	1.5
PROD6	1	2	0.4	1.5
PROD7	1	3	0.2	0.9
PROD8	1	3	0.2	1.0
PROD9	1	3	0.2	0.8
PROD10	2	1	1.0	2.4
PROD11	2	1	1.0	2.3
PROD12	2	1	1.0	2.6
PROD13	2	2	0.4	1.0
PROD14	2	2	0.4	1.2
PROD15	2	2	0.4	1.3
PROD16	2	3	0.2	0.7
PROD17	2	3	0.2	0.6
PROD18	2	3	0.2	0.6

Annexe XXXI : Résultats détaillés pour la répétabilité des injections

Les résultats détaillés obtenus pour chaque injection d'une solution standard contenant 0.5 [µg/mL] d'acide myristique et d'acide caprylique figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 : Résultats

Acide caprylique			
Injection	Aire_{Acide caprylique}	Aire_{ISTD}	Rapport Aire_{Acide caprylique}
Injection 1	61000000	22100000	2.76
Injection 2	65500000	18900000	3.47
Injection 3	64800000	19100000	3.39
Injection 4	54000000	18600000	2.90
Injection 5	34730000	10200000	3.40
Injection 6	36600000	10710000	3.42
		Moyenne	3.22
		Ecart-type	0.31
		CV [%]	9.56%
Acide myristique			
Injection	Aire_{Acide myristique}	Aire_{ISTD}	Rapport Aire_{Acide myristique}
Injection 1	30600000	22100000	1.38
Injection 2	25900000	18900000	1.37
Injection 3	28400000	19100000	1.49
Injection 4	25200000	18600000	1.35
Injection 5	13060000	10200000	1.28
Injection 6	15850000	10710000	1.48
		Moyenne	1.39
		Ecart-type	0.08
		CV [%]	5.66%

Annexe XXXII : Résultats détaillés obtenus pour la stabilité

Les résultats détaillés obtenus pour la stabilité figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 : Résultats détaillés

Acide caprylique				
Stabilité	Aire_{Acide caprylique}	Aire_{ISTD}	Rapport Aire_{Acide caprylique}	Pourcentage relatif des rapports d'aires par rapport à t₀
t₀	11490000.00	2534000.00	4.53	
t_{24 heures}	11940000.00	2601000.00	4.59	101.24%
t_{48 heures}	10980000.00	2449000.00	4.48	98.88%
t_{72 heures}	10790000.00	2430000.00	4.44	97.93%
t_{7 jours}	28480000.00	6645000.00	4.29	94.52%
Acide myristique				
Stabilité	Aire_{Acide myristique}	Aire_{ISTD}	Rapport Aire_{Acide myristique}	Pourcentage relatif des rapports d'aires par rapport à t₀
t₀	3882000.00	2534000.00	1.53	
t_{24 heures}	3835000.00	2601000.00	1.47	96.24%
t_{48 heures}	3588000.00	2449000.00	1.47	95.63%
t_{72 heures}	3499000.00	2430000.00	1.44	93.99%
t_{7 jours}	9164000.00	6645000.00	1.38	90.02%

Annexe XXXIII : Résultats détaillés du SST, QC, de la courbe d'étalonnage et du blanc

Les solutions standard ont été préparées de la même manière qu'en annexe IX. Les résultats détaillés obtenus pour la droite d'étalonnage figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 : Résultats

BHT						
	Aire BHT	Aire Irganox 415	Rapport Aire	Concentration BHT [µg/mL]	Concentration Irganox 415 [µg/mL]	Rapport concentration
STD1	1455.67	613.72	2.37	5.03	1.00	5.06
	1536.82	647.12	2.37	5.03	1.00	5.06
STD2	700.80	735.07	0.95	2.01	1.00	2.02
	603.62	611.92	0.99	2.01	1.00	2.02
STD3	382.55	801.98	0.48	1.01	1.00	1.01
	382.55	801.98	0.48	1.01	1.00	1.01
Pente			0.47			
Ordonnée à l'origine			0.01			
Coefficient de détermination			1.00			
Antioxydant 425						
	Aire Antioxydant 425	Aire Irganox 415	Rapport Aire	Concentration Antioxydant 425 [µg/mL]	Concentration Irganox 415 [µg/mL]	Rapport concentration
STD1	2523.58	613.72	4.11	4.97	1.00	4.99
	2648.76	647.12	4.09	4.97	1.00	4.99
STD2	1153.26	735.07	1.57	1.99	1.00	2.00
	982.32	611.92	1.61	1.99	1.00	2.00
STD3	638.78	801.98	0.80	0.99	1.00	1.00
	638.78	801.98	0.80	0.99	1.00	1.00
Pente			0.83			
Ordonnée à l'origine			-0.05			
Coefficient de détermination			1.00			

Les résultats détaillés du SST figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 2 : Résultats SST

Temps de rétention	Irganox 415	BHT	Antioxydant 425	Rapport d'aire	BHT	Antioxydant 425
SST1 [min]	46.59	49.07	55.75	SST1	2.36	4.06
SST2 [min]	46.71	49.20	55.86	SST2	2.43	4.13
SST3 [min]	46.80	49.28	55.93	SST3	2.40	4.11
Moyenne	46.70	49.18	55.84	Moyenne	2.40	4.10
Ecart-type	0.11	0.11	0.09	Ecart-type	0.04	0.03
CV	0.23%	0.22%	0.16%	CV	1.52%	0.82%
Résultats (Spécification : CV < 2%)	Conforme	Conforme	Conforme	Résultats (Spécification : CV < 3%)	Conforme	Conforme

Les résultats détaillés du QC figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 3 : Résultats

BHT						
QC	Aire _{BHT}	Aire _{ISTD}	Rapport aire BHT	C _{BHT} [µg/mL]	Résultats (Spécifications : 1.80 [µg/mL] ≤ x ≤ 2.20 [µg/mL])	
QC1	693.01	680.10	1.02	2.14	CONFORME	
QC2	588.00	601.00	0.98	2.05	CONFORME	
				Moyenne	2.10	CONFORME
				Ecart-type	0.06	
				CV [%]	2.91%	
Antioxydant 425						
QC	Aire _{Antioxydant 425}	Aire _{ISTD}	Rapport aire Antioxydant 425	C _{Antioxydant 425} [µg/mL]	Résultats (Spécifications : 1.80 [µg/mL] ≤ x ≤ 2.20 [µg/mL])	
QC1	1057.80	680.10	1.56	1.92	CONFORME	
QC2	973.40	601.00	1.62	2.00	CONFORME	
				Moyenne	1.96	CONFORME
				Ecart-type	0.05	
				CV [%]	2.78%	

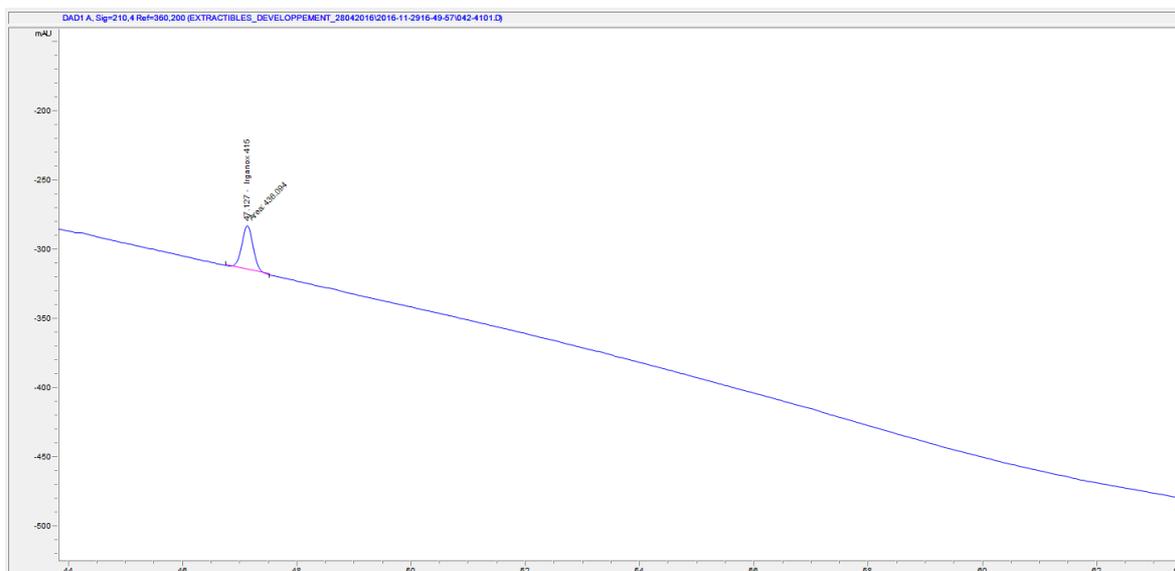


Figure 1 : Exemple d'un blanc (Tampon phosphate pH 8, J3 à 55 [°C])

Annexe XXXIV : Résultats détaillés des extraits soumis aux ultrasons pendant 2 heures à 0 [°C]

Les résultats obtenus pour le BHT et l'Antioxydant 425 dans les différents conditionnements primaires remplis avec du tampon phosphate à pH 3 et soumis aux ultrasons figurent dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 1 : Résultats pour les seringues BD Perfusion®

BHT						
Seringue BD Perfusion®	Echantillon	Aire _{BHT}	Aire _{ISTD}	Rapport aire BHT	C _{BHT} [µg/mL]	Moyenne C _{BHT} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	0.00	702.02	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	686.61	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	627.36	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	628.07	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	628.09	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	601.68	0.00	0.00	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	0.00	575.75	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	596.12	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	605.38	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	575.97	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	577.84	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	593.23	0.00	0.00	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	0.00	577.72	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	560.72	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	558.48	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	576.50	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	680.60	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	673.89	0.00	0.00	
Antioxydant 425						
Seringue BD Perfusion®	Echantillon	Aire _{A425}	Aire _{ISTD}	Rapport aire A425	C _{A425} [µg/mL]	Moyenne C _{A425} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	115.08	702.02	0.16	0.26	0.25
	Echantillon 1	106.35	686.61	0.15	0.24	
	Echantillon 2	97.34	627.36	0.16	0.25	0.25
	Echantillon 2	100.65	628.07	0.16	0.25	
	Echantillon 3	0.00	628.09	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	601.68	0.00	0.00	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	0.00	575.75	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	596.12	0.00	0.00	
	Echantillon 2	286.14	605.38	0.47	0.63	0.63
	Echantillon 2	273.86	575.97	0.48	0.63	
	Echantillon 3	269.86	577.84	0.47	0.62	0.63
	Echantillon 3	283.06	593.23	0.48	0.63	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	0.00	577.72	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	560.72	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	558.48	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	576.50	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	680.60	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	673.89	0.00	0.00	

Tableau 2 : Résultats pour les seringues BD Sterifill®

BHT						
Seringue BD Sterifill®	Echantillon	Aire _{BHT}	Aire _{ISTD}	Rapport aire BHT	C _{BHT} [µg/mL]	Moyenne C _{BHT} [µg/mL]
Lot : 6060032	Echantillon 1	0.00	572.37	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	593.03	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	515.32	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	518.01	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	448.02	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	463.00	0.00	0.00	
Antioxydant 425						
Seringue BD Sterifill®	Echantillon	Aire _{A425}	Aire _{ISTD}	Rapport aire A425	C _{A425} [µg/mL]	Moyenne C _{Antioxydant 425} [µg/mL]
Lot : 6060032	Echantillon 1	0.00	572.37	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	593.03	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	515.32	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	518.01	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	448.02	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	463.00	0.00	0.00	

Tableau 3 : Résultats pour les flacons COC, Promens/Elpack®

BHT						
Flacon COC, Promens/ Elpack®	Echantillon	Aire _{BHT}	Aire _{ISTD}	Rapport aire BHT	C _{BHT} [µg/mL]	Moyenne C _{BHT} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	505.46	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	519.79	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	526.39	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	583.57	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	569.43	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	583.09	0.00	0.00	
Antioxydant 425						
Flacon COC, Promens/ Elpack®	Echantillon	Aire _{A425}	Aire _{ISTD}	Rapport aire A425	C _{A425} [µg/mL]	Moyenne C _{Antioxydant 425} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	505.46	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	519.79	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	526.39	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	583.57	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	569.43	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	583.09	0.00	0.00	

Les résultats obtenus dans les différents conditionnements primaires remplis avec du tampon phosphate à pH 8 et soumis aux ultrasons figurent dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 4 : Résultats pour les seringues BD Perfusion®

BHT						
Seringue BD Perfusion®	Echantillon	Aire _{BHT}	Aire _{STD}	Rapport aire BHT	C _{BHT} [µg/mL]	Moyenne C _{BHT} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	0.00	410.31	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	431.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	403.49	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	424.05	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	430.53	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	454.21	0.00	0.00	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	0.00	437.33	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	445.41	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	393.76	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	492.76	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	491.79	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	505.02	0.00	0.00	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	0.00	564.35	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	454.43	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	400.80	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	430.61	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	440.72	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	428.23	0.00	0.00	
Antioxydant 425						
Seringue BD Perfusion®	Echantillon	Aire _{A425}	Aire _{STD}	Rapport aire A425	C _{A425} [µg/mL]	Moyenne C _{Antioxydant 425} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	242.67	410.31	0.59	0.77	0.77
	Echantillon 1	257.69	431.00	0.60	0.78	
	Echantillon 2	193.18	403.49	0.48	0.63	0.64
	Echantillon 2	204.67	424.05	0.48	0.64	
	Echantillon 3	184.99	430.53	0.43	0.57	0.57
	Echantillon 3	191.57	454.21	0.42	0.56	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	168.80	437.33	0.39	0.52	0.52
	Echantillon 1	173.69	445.41	0.39	0.53	
	Echantillon 2	0.00	393.76	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	492.76	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	491.79	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	505.02	0.00	0.00	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	230.89	564.35	0.41	0.55	0.53
	Echantillon 1	171.90	454.43	0.38	0.51	
	Echantillon 2	0.00	400.80	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	430.61	0.00	0.00	
	Echantillon 3	386.36	440.72	0.88	1.11	1.10
	Echantillon 3	371.03	428.23	0.87	1.10	

Tableau 5 : Résultats pour les seringues BD Sterifill®

BHT						
Seringue BD Sterifill®	Echantillon	Aire_{BHT}	Aire_{ISTD}	Rapport aire BHT	C_{BHT} [µg/mL]	Moyenne C_{BHT} [µg/mL]
Lot : 6060032	Echantillon 1	0.00	513.78	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	524.53	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	501.15	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	562.80	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	423.70	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	509.56	0.00	0.00	
Antioxydant 425						
Seringue BD Sterifill®	Echantillon	Aire_{A425}	Aire_{ISTD}	Rapport aire A425	C_{A425} [µg/mL]	Moyenne C_{A425} [µg/mL]
Lot : 6060032	Echantillon 1	0.00	513.78	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	524.53	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	501.15	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	562.80	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	423.70	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	509.56	0.00	0.00	

Tableau 6 : Résultats pour les flacons COC, Promens/Elpack®

Flacon COC, Promens/Elpack®	Echantillon	Aire_{BHT}	Aire_{ISTD}	Rapport aire BHT	C_{BHT} [µg/mL]	Moyenne C_{BHT} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	580.13	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	475.23	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	620.66	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	542.47	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	433.97	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	582.89	0.00	0.00	
Antioxydant 425						
Flacon COC, Promens/Elpack®	Echantillon	Aire_{A425}	Aire_{ISTD}	Rapport aire A425	C_{A425} [µg/mL]	Moyenne C_{A425} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	580.13	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	475.23	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	620.66	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	542.47	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	433.97	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	582.89	0.00	0.00	

Annexe XXXV : Résultats détaillés des extraits mis à l'étuve à 55 [°C] pendant 3 jours

Les résultats obtenus pour le BHT et l'Antioxydant 425 dans les différents conditionnements primaires remplis avec du tampon phosphate à pH 3 et stockés pendant 3 jours à 55 [°C] figurent dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 1 : Résultats pour les seringues BD Perfusion®

BHT						
Seringue BD Perfusion®	Echantillon	Aire_{BHT}	Aire_{STD}	Rapport aire BHT	C_{BHT} [µg/mL]	Moyenne C_{BHT} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	0.00	534.58	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	530.20	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	413.52	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	409.82	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	501.79	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	503.00	0.00	0.00	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	0.00	748.77	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	727.74	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	509.65	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	491.66	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	467.04	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	457.16	0.00	0.00	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	0.00	517.39	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	538.86	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	567.67	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	547.90	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	445.23	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	440.28	0.00	0.00	
Antioxydant 425						
Seringue BD Perfusion®	Echantillon	Aire_{A425}	Aire_{STD}	Rapport aire A425	C_{Antioxydant 425} [µg/mL]	Moyenne C_{A425} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	0.00	534.58	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	530.20	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	413.52	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	409.82	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	501.79	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	503.00	0.00	0.00	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	0.00	748.77	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	727.74	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	509.65	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	491.66	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	467.04	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	457.16	0.00	0.00	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	0.00	517.39	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	538.86	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	567.67	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	547.90	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	445.23	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	440.28	0.00	0.00	

Tableau 2 : Résultats pour les seringues BD Sterifill®

BHT						
Seringue BD Sterifill®	Echantillon	Aire _{BHT}	Aire _{ISTD}	Rapport aire BHT	C _{BHT} [µg/mL]	Moyenne C _{BHT} [µg/mL]
Lot : 6060032	Echantillon 1	0.00	517.42	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	507.81	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	571.69	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	568.33	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	588.72	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	565.63	0.00	0.00	
Antioxydant 425						
Seringue BD Sterifill®	Echantillon	Aire _{A425}	Aire _{ISTD}	Rapport aire Antioxydant 425	C _{Antioxydant 425} [µg/mL]	Moyenne C _{A425} [µg/mL]
Lot : 6060032	Echantillon 1	0.00	517.42	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	507.81	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	571.69	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	568.33	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	588.72	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	565.63	0.00	0.00	

Tableau 3 : Résultats pour les flacons COC, Promens/Elpack®

BHT						
Flacon COC, Promens/Elpack®	Echantillon	Aire _{BHT}	Aire _{ISTD}	Rapport aire BHT	C _{BHT} [µg/mL]	Moyenne C _{BHT} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	608.06	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	601.75	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	554.98	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	554.23	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	644.28	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	636.86	0.00	0.00	
Antioxydant 425						
Flacon COC, Promens/Elpack®	Echantillon	Aire _{A425}	Aire _{ISTD}	Rapport aire A425	C _{A425} [µg/mL]	Moyenne C _{A425} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	608.06	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	601.75	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	554.98	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	554.23	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	644.28	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	636.86	0.00	0.00	

Les résultats obtenus dans les différents conditionnements primaires remplis avec du tampon phosphate à pH 8 et stockés pendant trois jours à 55 [°C] figurent dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 4 : Résultats pour les seringues BD Perfusion®

BHT						
Seringue BD Perfusion®	Echantillon	Aire_{BHT}	Aire_{ISTD}	Rapport aire BHT	C_{BHT} [µg/mL]	Moyenne C_{BHT} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	0.00	515.37	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	500.76	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	515.37	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	506.04	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	508.68	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	493.90	0.00	0.00	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	0.00	604.69	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	593.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	638.60	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	650.97	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	570.43	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	574.06	0.00	0.00	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	0.00	563.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	541.77	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	588.76	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	573.35	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	527.82	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	509.81	0.00	0.00	
Antioxydant 425						
Seringue BD Perfusion®	Echantillon	Aire_{A425}	Aire_{ISTD}	Rapport aire A425	C_{A425} [µg/mL]	Moyenne C_{Antioxydant 425} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	0.00	515.37	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	500.76	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	515.37	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	506.04	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	508.68	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	493.90	0.00	0.00	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	0.00	604.69	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	593.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	638.60	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	650.97	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	570.43	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	574.06	0.00	0.00	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	0.00	563.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	541.77	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	588.76	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	573.35	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	527.82	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	509.81	0.00	0.00	

Tableau 5 : Résultats pour les seringues BD Sterifill®

BHT						
Seringue BD Sterifill®	Echantillon	Aire _{BHT}	Aire _{ISTD}	Rapport aire BHT	C _{BHT} [µg/mL]	Moyenne C _{BHT} [µg/mL]
Lot : 6060032	Echantillon 1	0.00	518.11	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	529.33	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	408.48	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	415.96	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	419.58	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	394.03	0.00	0.00	
Antioxydant 425						
Seringue BD Sterifill®	Echantillon	Aire _{A425}	Aire _{ISTD}	Rapport aire A425	C _{A425} [µg/mL]	Moyenne C _{Antioxydant 425} [µg/mL]
Lot : 6060032	Echantillon 1	0.00	518.11	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	529.33	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	408.48	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	415.96	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	419.58	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	394.03	0.00	0.00	

Tableau 6 : Résultats pour les flacons COC, Promens/Elpack®

BHT						
Flacon COC, Promens/Elpack®	Echantillon	Aire _{BHT}	Aire _{ISTD}	Rapport aire BHT	C _{BHT} [µg/mL]	Moyenne C _{BHT} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	594.99	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	586.76	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	456.73	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	466.82	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	462.66	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	457.33	0.00	0.00	
Antioxydant 425						
Flacon COC, Promens/Elpack®	Echantillon	Aire _{A425}	Aire _{ISTD}	Rapport aire A425	C _{A425} [µg/mL]	Moyenne C _{A425} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	594.99	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	586.76	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	456.73	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	466.82	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	462.66	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	457.33	0.00	0.00	

Les résultats obtenus dans les différents conditionnements primaires remplis avec un mélange isopropanol/eau 50:50 et stockés pendant trois jours à 55 [°C] figurent dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 7 : Résultats pour les seringues BD Perfusion®

BHT						
Seringue BD Perfusion®	Echantillon	Aire_{BHT}	Aire_{STD}	Rapport aire BHT	C_{BHT} [µg/mL]	Moyenne C_{BHT} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	0.00	795.39	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	776.49	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	738.45	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	781.83	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	695.02	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	708.06	0.00	0.00	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	0.00	810.30	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	828.40	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	799.40	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	841.22	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	825.95	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	780.50	0.00	0.00	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	0.00	812.30	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	785.20	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	842.50	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	835.40	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	759.50	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	814.59	0.00	0.00	
Antioxydant 425						
Seringue BD Perfusion®	Echantillon	Aire_{A425}	Aire_{STD}	Rapport aire A425	C_{A425} [µg/mL]	Moyenne C_{Antioxydant 425} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	1107.57	795.39	1.39	43.23	43.08
	Echantillon 1	1073.50	776.49	1.38	42.93	
	Echantillon 2	1050.01	738.45	1.42	44.11	44.24
	Echantillon 2	1118.35	781.83	1.43	44.36	
	Echantillon 3	1013.20	695.02	1.46	45.18	44.28
	Echantillon 3	989.60	708.06	1.40	43.38	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	1177.20	810.30	1.45	45.03	44.24
	Echantillon 1	1159.70	828.40	1.40	43.45	
	Echantillon 2	1137.90	799.40	1.42	44.15	43.56
	Echantillon 2	1164.34	841.22	1.38	42.98	
	Echantillon 3	1142.80	825.95	1.38	42.96	43.92
	Echantillon 3	1129.90	780.50	1.45	44.88	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	1090.80	812.30	1.34	41.74	42.55
	Echantillon 1	1096.90	785.20	1.40	43.36	
	Echantillon 2	1209.00	842.50	1.44	44.50	44.08
	Echantillon 2	1175.50	835.40	1.41	43.66	
	Echantillon 3	1080.91	759.50	1.42	44.15	43.18
	Echantillon 3	1106.87	814.59	1.36	42.22	

Tableau 8 : Résultats pour les seringues BD Sterifill®

BHT						
Seringue BD Sterifill®	Echantillon	Aire _{BHT}	Aire _{ISTD}	Rapport aire BHT	C _{BHT} [µg/mL]	Moyenne C _{BHT} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	774.03	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	795.73	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	755.30	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	791.96	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	728.53	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	716.53	0.00	0.00	
Antioxydant 425						
Seringue BD Sterifill®	Echantillon	Aire _{A425}	Aire _{ISTD}	Rapport aire A425	C _{A425} [µg/mL]	Moyenne C _{Antioxydant 425} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	774.03	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	795.73	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	755.30	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	791.96	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	728.53	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	716.53	0.00	0.00	

Tableau 9 : Résultats pour les flacons COC, Promens/Elpack®

BHT						
Flacon COC, Promens/ Elpack®	Echantillon	Aire _{BHT}	Aire _{ISTD}	Rapport aire BHT	C _{BHT} [µg/mL]	Moyenne C _{BHT} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	719.30	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	752.45	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	817.09	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	810.87	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	846.73	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	704.34	0.00	0.00	
Antioxydant 425						
Flacon COC, Promens/ Elpack®	Echantillon	Aire _{A425}	Aire _{ISTD}	Rapport aire A425	C _{A425} [µg/mL]	Moyenne C _{A425} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	719.30	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	752.45	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	817.09	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	810.87	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	846.73	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	704.34	0.00	0.00	

Le tableau ci-dessous résume les résultats statistiques obtenus suite à la comparaison des résultats obtenus pour les seringues BD Perfusion® remplies avec le mélange isopropanol/eau 50:50 :

Tableau 10 : Analyse statistique entre les seringues BD Perfusion®

Comparaison lot :			Comparaison lot :			Comparaison lot :		
Concentration [µg/mL]	Lot : 16022 09P	Lot : 16032 04P	Concentration [µg/mL]	Lot : 160320 4P	Lot : 16012 55P	Concentration [µg/mL]	Lot : 160220 9P	Lot : 160125 5P
Echantillon 1	43.08	44.24	Echantillon 1	44.24	42.55	Echantillon 1	43.08	42.55
Echantillon 2	44.24	43.56	Echantillon 2	43.56	44.08	Echantillon 2	44.24	44.08
Echantillon 3	44.28	43.92	Echantillon 3	43.92	43.18	Echantillon 3	44.28	43.18
Moyenne	43.86	43.91	Moyenne	43.91	43.27	Moyenne	43.86	43.27
Variance	0.47	0.11	Variance	0.11	0.59	Variance	0.47	0.59
Test de Fisher			Test de Fisher			Test de Fisher		
F _{calculé}	4.07		F _{calculé}	5.18		F _{calculé}	1.27	
F _{théorique}	19.00		F _{théorique}	19.00		F _{théorique}	19.00	
Test de Student			Test de Student			Test de Student		
t _{théorique}	2.78		t _{théorique}	2.78		t _{théorique}	2.78	
t _{observé}	0.10		t _{observé}	1.31		t _{observé}	1.00	

Un test de Fischer a été réalisé. Etant donné que le $F_{\text{théorique}}$ est supérieur au $F_{\text{calculé}}$, les variances sont égales. Un test de Student à variances égales a été réalisé pour comparer les résultats obtenus pour les différents lots de seringues BD Perfusion®. Etant donné que le $t_{\text{théorique}}$ est supérieur au $t_{\text{observé}}$, la différence n'est pas significative entre les résultats obtenus pour les seringues BD Perfusion®.

Les résultats obtenus dans les différents conditionnements primaires remplis avec du NaCl 0.9% et stockés pendant trois jours à 55 [°C] figurent dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 11 : Résultats pour les seringues BD Perfusion® (t₀)

BHT						
Seringue BD Perfusion®	Echantillon	Aire_{BHT}	Aire_{ISTD}	Rapport aire BHT	C_{BHT} [µg/mL]	Moyenne C_{BHT} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	0.00	687.61	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	687.81	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	650.59	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	662.08	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	641.15	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	655.29	0.00	0.00	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	0.00	634.20	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	680.26	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	627.35	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	633.70	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	645.76	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	654.08	0.00	0.00	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	0.00	629.82	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	668.09	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	724.17	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	725.19	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	698.91	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	701.32	0.00	0.00	
Antioxydant 425						
Seringue BD Perfusion®	Echantillon	Aire_{A425}	Aire_{ISTD}	Rapport aire A425	C_{A425} [µg/mL]	Moyenne C_{Antioxydant 425} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	0.00	687.61	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	687.81	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	650.59	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	662.08	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	641.15	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	655.29	0.00	0.00	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	0.00	634.20	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	680.26	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	627.35	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	633.70	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	645.76	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	654.08	0.00	0.00	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	0.00	629.82	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	668.09	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	724.17	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	725.19	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	698.91	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	701.32	0.00	0.00	

Tableau 12 : Résultats pour les seringues BD Perfusion® (t₃ jours)

BHT						
Seringue BD Perfusion®	Echantillon	Aire_{BHT}	Aire_{ISTD}	Rapport aire BHT	C_{BHT} [µg/mL]	Moyenne C_{BHT} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	0.00	646.62	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	646.62	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	640.73	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	640.73	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	572.32	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	572.32	0.00	0.00	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	0.00	687.35	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	687.35	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	620.11	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	620.11	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	644.25	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	644.25	0.00	0.00	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	0.00	662.86	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	662.86	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	671.32	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	671.32	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	768.46	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	768.46	0.00	0.00	
Antioxydant 425						
Seringue BD Perfusion®	Echantillon	Aire_{A425}	Aire_{ISTD}	Rapport aire A425	C_{A425} [µg/mL]	Moyenne C_{Antioxydant 425} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	0.00	646.62	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	646.62	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	640.73	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	640.73	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	572.32	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	572.32	0.00	0.00	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	0.00	687.35	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	687.35	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	620.11	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	620.11	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	644.25	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	644.25	0.00	0.00	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	0.00	662.86	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	662.86	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	671.32	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	671.32	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	768.46	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	768.46	0.00	0.00	

Tableau 13 : Résultats pour les seringues BD Perfusion[®], dilution 2x (t₃ jours)

BHT						
Seringue BD Perfusion [®]	Echantillon	Aire _{BHT}	Aire _{ISTD}	Rapport aire BHT	C _{BHT} [µg/mL]	Moyenne C _{BHT} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	0.00	731.10	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	744.72	0.00	0.00	
Antioxydant 425						
Seringue BD Perfusion [®]	Echantillon	Aire _{A425}	Aire _{ISTD}	Rapport aire A425	C _{A425} [µg/mL]	Moyenne C _{Antioxydant 425} [µg/mL]
Lot : 1601255P	Echantillon 1	0.00	731.10	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	744.72	0.00	0.00	

Annexe XXXVI : Résultats détaillés du SST, QC, de la courbe d'étalonnage et du blanc

Les solutions standard ont été préparées de la même manière qu'en annexe XXV.

Les résultats détaillés obtenus pour la droite d'étalonnage figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 : Résultats

Acide caprylique						
	Aire Acide caprylique	Aire Acide myristique D27	Rapport Aire	Concentration Acide caprylique [µg/mL]	Concentration Acide myristique D27 [µg/mL]	Rapport concentration
STD1	3948000.00	1184000.00	3.33	0.50	0.50	1.01
	4064000.00	1303000.00	3.12	0.50	0.50	1.01
STD2	1835000.00	1295000.00	1.42	0.20	0.50	0.41
	2209000.00	1175000.00	1.88	0.20	0.50	0.41
STD3	1047000.00	956132.00	1.10	0.10	0.50	0.20
	957383.00	910867.00	1.05	0.10	0.50	0.20
Pente			2.64			
Ordonnée à l'origine			0.55			
Coefficient de détermination			0.97			
Acide myristique						
	Aire Acide myristique	Aire Acide myristique	Rapport Aire	Concentration Acide myristique [µg/mL]	Concentration Acide myristique D27 [µg/mL]	Rapport concentration
STD1	1091000.0	1184000.00	0.92	0.50	0.50	1.00
	1165000.0	1303000.00	0.89	0.50	0.50	1.00
STD2	275319.0	1295000.00	0.21	0.20	0.50	0.40
	213915.0	1175000.00	0.18	0.20	0.50	0.40
STD3	16158.0	956132.00	0.02	0.10	0.50	0.20
	16085.0	910867.00	0.02	0.10	0.50	0.20
Pente			1.13			
Ordonnée à l'origine			-0.23			
Coefficient de détermination			1.00			

Les résultats détaillés du SST figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 2 : Résultats SST

Temps de rétention	Acide caprylique	Acide myristique	Acide myristique D27	Rapports d'aires	Acide caprylique	Acide myristique
SST1 [min]	3.53	9.41	9.11	SST1	0.37	0.47
SST2 [min]	3.57	9.50	9.18	SST2	0.37	0.46
SST3 [min]	3.66	9.46	9.16	SST3	0.38	0.46
Moyenne	3.59	9.46	9.15	Moyenne	0.37	0.46
Ecart-type	0.07	0.04	0.04	Ecart-type	0.01	0.01
CV	1.84%	0.45%	0.39%	CV	1.59%	1.16%
Résultats (Spécification : CV < 2%)	Conforme	Conforme	Conforme	Résultats (Spécification : CV < 3%)	Conforme	Conforme

Les résultats détaillés du QC figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 3 : Résultats

Acide caprylique					
QC	Aire_{Acide caprylique}	Aire_{ISTD}	Rapport aire Acide caprylique	C_{Acide caprylique} [µg/mL]	Résultats (Spécifications : 0.18 [µg/mL] ≤ x ≤ 0.22 [µg/mL])
QC1	1906000.00	1123000.00	1.70	0.22	CONFORME
QC2	1570500.00	959968.00	1.64	0.20	CONFORME
			Moyenne	0.21	CONFORME
			Ecart-type	0.01	
			CV [%]	3.89%	
Acide myristique					
QC	Aire_{Acide myristique}	Aire_{ISTD}	Rapport aire Acide myristique	C_{Acide myristique} [µg/mL]	Résultats (Spécifications : 0.18 [µg/mL] ≤ x ≤ 0.22 [µg/mL])
QC1	208482.00	1123000.00	0.19	0.18	CONFORME
QC2	179175.00	959968.00	0.19	0.18	CONFORME
			Moyenne	0.18	CONFORME
			Ecart-type	0.00	
			CV [%]	0.17%	

Annexe XXXVII : Résultats détaillés des extraits soumis aux ultrasons pendant 2 heures à 0 [°C]

Les résultats obtenus pour l'acide myristique et l'acide caprylique dans les différents conditionnements primaires remplis avec du tampon phosphate à pH 3 et soumis aux ultrasons figurent dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 1 : Résultats pour les seringues BD Perfusion®

Acide caprylique						
Seringue BD Perfusion®	Echantillon	Aire_{Acide caprylique}	Aire_{STD}	Rapport aire_{Acide caprylique}	C_{Acide caprylique} [µg/mL]	Moyenne C_{Acide caprylique} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	0.00	2736000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	2916000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	1526000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	1608000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	2009000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	1607000.00	0.00	0.00	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	0.00	1333000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	1337000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	2042000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	1607000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	2036000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	2620000.00	0.00	0.00	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	0.00	2445000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	2409000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	3239000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	3341000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	541237.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	624564.00	0.00	0.00	
Acide myristique						
Seringue BD Perfusion®	Echantillon	Aire_{Acide myristique}	Aire_{STD}	Rapport aire_{Acide myristique}	C_{Acide myristique} [µg/mL]	Moyenne C_{Acide myristique} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	0.00	2736000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	2916000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	1526000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	1608000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	2009000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	1607000.00	0.00	0.00	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	NA	NA	NA	NA	NA
	Echantillon 1	NA	NA	NA	NA	
	Echantillon 2	0.00	2042000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	1607000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	324244.00	2036000.00	0.16	0.17	0.17
	Echantillon 3	423282.00	2620000.00	0.16	0.17	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	0.00	2445000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	2409000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	3239000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	3341000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	59268.00	541237.00	0.11	0.15	0.15
	Echantillon 3	75310.00	624564.00	0.12	0.15	

Tableau 2 : Résultats pour les seringues BD Sterifill®

Acide caprylique						
Seringue BD Sterifill®	Echantillon	Aire _{Acide caprylique}	Aire _{ISTD}	Rapport aire _{Acide caprylique}	C _{Acide caprylique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide caprylique} [µg/mL]
Lot : 6060032	Echantillon 1	0.00	692681.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	475856.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	986225.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	708714.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	1898000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	1864000.00	0.00	0.00	
Acide myristique						
Seringue BD Sterifill®	Echantillon	Aire _{Acide myristique}	Aire _{ISTD}	Rapport aire _{Acide myristique}	C _{Acide myristique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide myristique} [µg/mL]
Lot : 6060032	Echantillon 1	0.00	692681.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	475856.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	986225.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	708714.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	225238.00	1898000.00	0.12	0.16	0.16
	Echantillon 3	216177.00	1864000.00	0.12	0.16	

Tableau 3 : Résultats pour les flacons COC, Promens/Elpack®

Acide caprylique						
Flacon COC, Promens/ Elpack	Echantillon	Aire _{Acide caprylique}	Aire _{ISTD}	Rapport aire _{Acide caprylique}	C _{Acide caprylique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide caprylique} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	3450000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	3278000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	2292000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	2398000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	1287000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	1283000.00	0.00	0.00	
Acide myristique						
Flacon COC, Promens/ Elpack	Echantillon	Aire _{Acide myristique}	Aire _{ISTD}	Rapport aire _{Acide myristique}	C _{Acide myristique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide myristique} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	438948.00	3450000.00	0.13	0.16	0.16
	Echantillon 1	420878.00	3278000.00	0.13	0.16	
	Echantillon 2	0.00	2292000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	2398000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	122033.00	1287000.00	0.09	0.15	0.15
	Echantillon 3	126289.00	1283000.00	0.10	0.15	

Les résultats obtenus dans les différents conditionnements primaires remplis avec du tampon phosphate à pH 8 et soumis aux ultrasons figurent dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 4 : Résultats pour les seringues BD Perfusion®

Acide caprylique						
Seringue BD Perfusion®	Echantillon	Aire_{Acide caprylique}	Aire_{STD}	Rapport aire_{Acide caprylique}	C_{Acide caprylique} [µg/mL]	Moyenne C_{Acide caprylique} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	0.00	3408000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	3428000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	893323.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	965890.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	1027000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	1220000.00	0.00	0.00	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	0.00	1544000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	1967000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	NA	NA	NA	NA	NA
	Echantillon 2	NA	NA	NA	NA	
	Echantillon 3	0.00	1639000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	1079000.00	0.00	0.00	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	0.00	2363000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	2146000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	1359000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	1469000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	NA	NA	NA	NA	NA
	Echantillon 3	NA	NA	NA	NA	
Acide myristique						
Seringue BD Perfusion®	Echantillon	Aire_{Acide myristique}	Aire_{STD}	Rapport aire_{Acide myristique}	C_{Acide myristique} [µg/mL]	Moyenne C_{Acide myristique} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	698014.00	3408000.00	0.20	0.20	0.20
	Echantillon 1	706263.00	3428000.00	0.21	0.20	
	Echantillon 2	0.00	893323.00	0.00	0.10	0.10
	Echantillon 2	0.00	965890.00	0.00	0.10	
	Echantillon 3	0.00	1027000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	1220000.00	0.00	0.00	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	85844.00	1544000.00	0.06	0.13	0.13
	Echantillon 1	120761.00	1967000.00	0.06	0.13	
	Echantillon 2	NA	NA	NA	NA	NA
	Echantillon 2	NA	NA	NA	NA	
	Echantillon 3	517574.00	1639000.00	0.32	0.26	0.31
	Echantillon 3	581243.00	1079000.00	0.54	0.37	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	119476.00	2363000.00	0.05	0.13	0.13
	Echantillon 1	124964.00	2146000.00	0.06	0.13	
	Echantillon 2	43036.00	1359000.00	0.03	0.12	0.12
	Echantillon 2	48380.00	1469000.00	0.03	0.12	
	Echantillon 3	NA	NA	NA	NA	NA
	Echantillon 3	NA	NA	NA	NA	

Tableau 5 : Résultats pour les seringues BD Sterifill®

Acide caprylique						
Seringue BD Sterifill®	Echantillon	Aire _{Acide caprylique}	Aire _{STD}	Rapport aire _{Acide caprylique}	C _{Acide caprylique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide caprylique} [µg/mL]
Lot : 6060032	Echantillon 1	46213.00	2710000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	16997.00	2710000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	NA	NA	NA	NA	NA
	Echantillon 2	NA	NA	NA	NA	
	Echantillon 3	0.00	659219.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	508336.00	0.00	0.00	
Acide myristique						
Seringue BD Sterifill®	Echantillon	Aire _{Acide myristique}	Aire _{STD}	Rapport aire _{Acide myristique}	C _{Acide myristique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide myristique} [µg/mL]
Lot : 6060032	Echantillon 1	147501.00	2710000.00	0.05	0.12	0.12
	Echantillon 1	147501.00	2710000.00	0.05	0.12	
	Echantillon 2	NA	NA	NA	NA	NA
	Echantillon 2	NA	NA	NA	NA	
	Echantillon 3	0.00	659219.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	508336.00	0.00	0.00	

Tableau 6 : Résultats pour les flacons COC, Promens/Elpack®

Acide caprylique						
Flacon COC, Promens/Elpack®	Echantillon	Aire _{Acide caprylique}	Aire _{STD}	Rapport aire _{Acide caprylique}	C _{Acide caprylique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide caprylique} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	2403000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	2340000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	NA	NA	NA	NA	NA
	Echantillon 2	NA	NA	NA	NA	
	Echantillon 3	0.00	405367.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	318100.00	0.00	0.00	
Acide myristique						
Flacon COC, Promens/Elpack®	Echantillon	Aire _{Acide myristique}	Aire _{STD}	Rapport aire _{Acide myristique}	C _{Acide myristique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide myristique} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	2403000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	2340000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	NA	NA	NA	NA	NA
	Echantillon 2	NA	NA	NA	NA	
	Echantillon 3	0.00	405367.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	318100.00	0.00	0.00	

Annexe XXXVIII : Résultats détaillés des extraits mis à l'étuve à 55 [°C] pendant 3 jours

Les résultats obtenus dans les différents conditionnements primaires remplis avec un mélange isopropanol/eau 50:50 et stockés pendant trois jours à 55 [°C] figurent dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 1 : Résultats pour les seringues BD Perfusion®

Acide caprylique						
Seringue BD Perfusion®	Echantillon	Aire_{Acide caprylique}	Aire_{STD}	Rapport aire_{Acide caprylique}	C_{Acide caprylique} [µg/mL]	Moyenne C_{Acide caprylique} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	0.00	3610000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	3741000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	1251000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	1420000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	4627000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	4815000.00	0.00	0.00	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	0.00	3178000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	3155000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	3196000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	3229000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	2714000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	2750000.00	0.00	0.00	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	0.00	5524000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	5527000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	1259000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	1054000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	NA	NA	NA	NA	NA
	Echantillon 3	NA	NA	NA	NA	
Acide myristique						
Seringue BD Perfusion®	Echantillon	Aire_{Acide myristique}	Aire_{STD}	Rapport aire_{Acide myristique}	C_{Acide myristique} [µg/mL]	Moyenne C_{Acide myristique} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	583704.00	3610000.00	0.16	0.18	0.18
	Echantillon 1	631370.00	3741000.00	0.17	0.18	
	Echantillon 2	32107.00	1251000.00	0.03	0.11	0.11
	Echantillon 2	39658.00	1420000.00	0.03	0.11	
	Echantillon 3	2198000.00	4627000.00	0.48	0.34	0.34
	Echantillon 3	2298000.00	4815000.00	0.48	0.34	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	7990000.00	3178000.00	2.51	1.35	1.35
	Echantillon 1	7916000.00	3155000.00	2.51	1.35	
	Echantillon 2	1070000.00	3196000.00	0.33	0.27	0.26
	Echantillon 2	1051000.00	3229000.00	0.33	0.26	
	Echantillon 3	4976000.00	2714000.00	1.83	1.01	0.99
	Echantillon 3	4789000.00	2750000.00	1.74	0.97	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	1247000.00	5524000.00	0.23	0.21	0.21
	Echantillon 1	1241000.00	5527000.00	0.22	0.21	
	Echantillon 2	44539.00	1259000.00	0.04	0.12	0.12
	Echantillon 2	25536.00	1054000.00	0.02	0.11	
	Echantillon 3	NA	NA	NA	NA	NA
	Echantillon 3	NA	NA	NA	NA	

Tableau 2 : Résultats pour les seringues BD Sterifill®

Acide caprylique						
Seringue BD Sterifill®	Echantillon	Aire _{Acide caprylique}	Aire _{ISTD}	Rapport aire _{Acide caprylique}	C _{Acide caprylique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide caprylique} [µg/mL]
Lot : 6060032	Echantillon 1	0.00	4236000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	4104000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	3026000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	2827000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	2025000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	2141000.00	0.00	0.00	
Acide myristique						
Seringue BD Sterifill®	Echantillon	Aire _{Acide myristique}	Aire _{ISTD}	Rapport aire _{Acide myristique}	C _{Acide myristique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide myristique} [µg/mL]
Lot : 6060032	Echantillon 1	1070000.00	4236000.00	0.25	0.21	0.21
	Echantillon 1	1056000.00	4104000.00	0.26	0.21	
	Echantillon 2	215013.00	3026000.00	0.07	0.13	0.13
	Echantillon 2	208840.00	2827000.00	0.07	0.13	
	Echantillon 3	31369.00	2025000.00	0.02	0.11	0.11
	Echantillon 3	34134.00	2141000.00	0.02	0.11	

Tableau 3 : Résultats pour les flacons COC, Promens/Elpack®

Acide caprylique						
Facon COC, Promens/Elpack®	Echantillon	Aire _{Acide caprylique}	Aire _{ISTD}	Rapport aire _{Acide caprylique}	C _{Acide caprylique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide caprylique} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	1205000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	1020000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	3129000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	3337000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	5536000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	5700000.00	0.00	0.00	
Acide myristique						
Facon COC, Promens/Elpack®	Echantillon	Aire _{Acide myristique}	Aire _{ISTD}	Rapport aire _{Acide myristique}	C _{Acide myristique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide myristique} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	1205000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	1020000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	3129000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	3337000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	5536000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	5700000.00	0.00	0.00	

Les résultats obtenus pour l'acide myristique et l'acide caprylique dans les différents conditionnements primaires remplis avec du tampon phosphate à pH 3 et stockés pendant 3 jours à 55 [°C] figurent dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 4 : Résultats pour les seringues BD Perfusion®

Acide caprylique						
Seringue BD Perfusion®	Echantillon	Aire _{Acide caprylique}	Aire _{ISTD}	Rapport aire _{Acide caprylique}	C _{Acide caprylique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide caprylique} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	0.00	8850000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	9112000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	6635000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	6531000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	4791000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	4856000.00	0.00	0.00	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	0.00	7564000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	7700000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	7437000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	7094000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	6250000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	6274000.00	0.00	0.00	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	0.00	7247000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	7051000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	7609000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	7888000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	NA	NA	NA	NA	NA
	Echantillon 3	NA	NA	NA	NA	
Acide myristique						
Seringue BD Perfusion®	Echantillon	Aire _{Acide myristique}	Aire _{ISTD}	Rapport aire _{Acide myristique}	C _{Acide myristique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide myristique} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	0.00	8850000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	9112000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	55935.00	6635000.00	0.01	DéTECTABLE	DéTECTABLE
	Echantillon 2	65185.00	6531000.00	0.01	DéTECTABLE	
	Echantillon 3	5642.00	4791000.00	0.00	DéTECTABLE	DéTECTABLE
	Echantillon 3	9653.00	4856000.00	0.00	DéTECTABLE	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	0.00	7564000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	7700000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	324244.00	7437000.00	0.04	0.12	0.12
	Echantillon 2	423282.00	7094000.00	0.06	0.13	
	Echantillon 3	0.00	6250000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	6274000.00	0.00	0.00	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	84293.00	7247000.00	0.01	DéTECTABLE	DéTECTABLE
	Echantillon 1	90426.00	7051000.00	0.01	DéTECTABLE	
	Echantillon 2	620116.00	7609000.00	0.08	0.14	0.13
	Echantillon 2	409867.00	7888000.00	0.05	0.12	
	Echantillon 3	NA	NA	NA	NA	NA
	Echantillon 3	NA	NA	NA	NA	

Tableau 5 : Résultats pour les seringues BD Sterifill®

Acide caprylique						
Seringue BD Sterifill®	Echantillon	Aire _{Acide caprylique}	Aire _{ISTD}	Rapport aire _{Acide caprylique}	C _{Acide caprylique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide caprylique} [µg/mL]
Lot : 6060032	Echantillon 1	0.00	2425000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	2309000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	1305000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	1113000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	830903.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	896702.00	0.00	0.00	
Acide myristique						
Seringue BD Sterifill®	Echantillon	Aire _{Acide myristique}	Aire _{ISTD}	Rapport aire _{Acide myristique}	C _{Acide myristique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide myristique} [µg/mL]
Lot : 6060032	Echantillon 1	0.00	2425000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	2309000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	118403.00	1305000.00	0.09	0.15	0.14
	Echantillon 2	81551.00	1113000.00	0.07	0.14	
	Echantillon 3	0.00	830903.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	896702.00	0.00	0.00	

Tableau 6 : Résultats pour les flacons COC, Promens/Elpack®

Acide caprylique						
Flacon COC, Promens/Elpack®	Echantillon	Aire _{Acide caprylique}	Aire _{ISTD}	Rapport aire _{Acide caprylique}	C _{Acide caprylique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide caprylique} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	1260000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	1340000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	2304000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	2141000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	2467000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	2490000.00	0.00	0.00	
Acide myristique						
Flacon COC, Promens/Elpack®	Echantillon	Aire _{Acide myristique}	Aire _{ISTD}	Rapport aire _{Acide myristique}	C _{Acide myristique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide myristique} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	1260000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	1340000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	242613.00	2304000.00	0.11	0.15	0.15
	Echantillon 2	203885.00	2141000.00	0.10	0.15	
	Echantillon 3	0.00	2467000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	2490000.00	0.00	0.00	

Les résultats obtenus dans les différents conditionnements primaires remplis avec du tampon phosphate à pH 8 et stockés pendant trois jours à 55 [°C] figurent dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 7 : Résultats pour les seringues BD Perfusion®

Acide caprylique						
Seringue BD Perfusion®	Echantillon	Aire_{Acide caprylique}	Aire_{ISTD}	Rapport aire_{Acide caprylique}	C_{Acide caprylique} [µg/mL]	Moyenne C_{Acide caprylique} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	0.00	3800000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	3821000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	3728000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	3766000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	4232000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	4335000.00	0.00	0.00	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	0.00	2712000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	2766000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	3685000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	3722000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	2755000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	2495000.00	0.00	0.00	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	0.00	5245000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	5286000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	1008000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	997123.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	4404000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	4502000.00	0.00	0.00	
Acide myristique						
Seringue BD Perfusion®	Echantillon	Aire_{Acide myristique}	Aire_{ISTD}	Rapport aire_{Acide myristique}	C_{Acide myristique} [µg/mL]	Moyenne C_{Acide myristique} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	2301000.00	3800000.00	0.61	0.40	0.40
	Echantillon 1	2268000.00	3821000.00	0.59	0.40	
	Echantillon 2	6828000.00	3728000.00	1.83	1.01	1.00
	Echantillon 2	6651000.00	3766000.00	1.77	0.98	
	Echantillon 3	891856.00	4232000.00	0.21	0.21	0.21
	Echantillon 3	949767.00	4335000.00	0.22	0.21	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	148397.00	2712000.00	0.05	0.13	0.13
	Echantillon 1	144197.00	2766000.00	0.05	0.13	
	Echantillon 2	2320000.00	3685000.00	0.63	0.41	0.41
	Echantillon 2	2303000.00	3722000.00	0.62	0.41	
	Echantillon 3	257122.00	2755000.00	0.09	0.15	0.15
	Echantillon 3	235075.00	2495000.00	0.09	0.15	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	237024.00	5245000.00	0.05	0.12	0.12
	Echantillon 1	224258.00	5286000.00	0.04	0.12	
	Echantillon 2	0.00	1008000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	997123.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	4404000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	4502000.00	0.00	0.00	

Tableau 8 : Résultats pour les seringues BD Sterifill®

Acide caprylique						
Seringue BD Sterifill®	Echantillon	Aire _{Acide caprylique}	Aire _{ISTD}	Rapport aire _{Acide caprylique}	C _{Acide caprylique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide caprylique} [µg/mL]
Lot : 6060032	Echantillon 1	0.00	2826000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	2767000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	3636000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	3384000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	NA	NA	NA	NA	NA
	Echantillon 3	NA	NA	NA	NA	
Acide myristique						
Seringue BD Sterifill®	Echantillon	Aire _{Acide myristique}	Aire _{ISTD}	Rapport aire _{Acide myristique}	C _{Acide myristique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide myristique} [µg/mL]
Lot : 6060032	Echantillon 1	0.00	2826000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	2767000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	3636000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	3384000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	NA	NA	NA	NA	NA
	Echantillon 3	NA	NA	NA	NA	

Tableau 9 : Résultats pour les flacons COC, Promens/Elpack®

Acide caprylique						
Flacon COC, Promens/Elpack®	Echantillon	Aire _{Acide caprylique}	Aire _{ISTD}	Rapport aire _{Acide caprylique}	C _{Acide caprylique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide caprylique} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	1163000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	1017000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	893380.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	722206.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	NA	NA	NA	NA	NA
	Echantillon 3	NA	NA	NA	NA	
Acide myristique						
Flacon COC, Promens/Elpack®	Echantillon	Aire _{Acide myristique}	Aire _{ISTD}	Rapport aire _{Acide myristique}	C _{Acide myristique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide myristique} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	1163000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	1017000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	32861.00	893380.00	0.04	0.12	0.11
	Echantillon 2	18375.00	722206.00	0.03	0.11	
	Echantillon 3	NA	NA	NA	NA	NA
	Echantillon 3	NA	NA	NA	NA	

Annexe XXXIX : Résultats détaillés du SST, QC, de la courbe d'étalonnage et du blanc

Les solutions standard ont été préparées de la même manière qu'en annexe IX.

Les résultats détaillés obtenus pour la droite d'étalonnage figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 : Résultats

BHT						
	Aire BHT	Aire Irganox	Rapport Aire	Concentration BHT [µg/mL]	Concentration Irganox 415 [µg/mL]	Rapport concentration
STD1	1455.67	613.72	2.37	5.03	1.00	5.06
	1536.82	647.12	2.37	5.03	1.00	5.06
STD2	700.80	735.07	0.95	2.01	1.00	2.02
	603.62	611.92	0.99	2.01	1.00	2.02
STD3	382.55	801.98	0.48	1.01	1.00	1.01
	382.55	801.98	0.48	1.01	1.00	1.01
Pente			0.47			
Ordonnée à l'origine			0.01			
Coefficient de détermination			1.00			
Antioxydant 425						
	Aire Antioxydant 425	Aire Irganox	Rapport Aire	Concentration Antioxydant 425 [µg/mL]	Concentration Irganox 415 [µg/mL]	Rapport concentration
STD1	2523.58	613.72	4.11	4.97	1.00	4.99
	2648.76	647.12	4.09	4.97	1.00	4.99
STD2	1153.26	735.07	1.57	1.99	1.00	2.00
	982.32	611.92	1.61	1.99	1.00	2.00
STD3	638.78	801.98	0.80	0.99	1.00	1.00
	638.78	801.98	0.80	0.99	1.00	1.00
Pente			0.83			
Ordonnée à l'origine			-0.05			
Coefficient de détermination			1.00			

Les résultats détaillés du SST figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 2 : Résultats SST

Temps de rétention	Irganox 415	BHT	Antioxydant 425	Rapport d'aire	BHT	Antioxydant 425
SST1 [min]	46.58	49.07	55.75	SST1	2.36	4.06
SST2 [min]	46.71	49.20	55.86	SST2	2.43	4.13
SST3 [min]	46.80	49.28	55.93	SST3	2.40	4.11
Moyenne	46.70	49.18	55.84	Moyenne	2.40	4.10
Ecart-type	0.11	0.11	0.09	Ecart-type	0.04	0.03
CV	0.23%	0.22%	0.16%	CV	1.52%	0.82%
Résultats (Spécification : CV < 2%)	Conforme	Conforme	Conforme	Résultats (Spécification : CV < 3%)	Conforme	Conforme

Les résultats détaillés du QC figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 3 : Résultats

BHT						
QC	Aire _{BHT}	Aire _{ISTD}	Rapport aire BHT	C _{BHT} [µg/mL]	Résultats (Spécifications : 1.80 [µg/mL] ≤ x ≤ 2.20 [µg/mL])	
QC1	693.01	680.10	1.02	2.14	CONFORME	
QC2	588.00	601.00	0.98	2.05	CONFORME	
				Moyenne	2.10	CONFORME
				Ecart-type	0.06	
				CV [%]	2.91%	
Antioxydant 425						
QC	Aire _{Antioxydant 425}	Aire _{ISTD}	Rapport aire Antioxydant 425	C _{Antioxydant 425} [µg/mL]	Résultats (Spécifications : 1.80 [µg/mL] ≤ x ≤ 2.20 [µg/mL])	
QC1	1057.80	680.10	1.56	1.92	CONFORME	
QC2	973.40	601.00	1.62	2.00	CONFORME	
				Moyenne	1.96	CONFORME
				Ecart-type	0.05	
				CV [%]	2.78%	

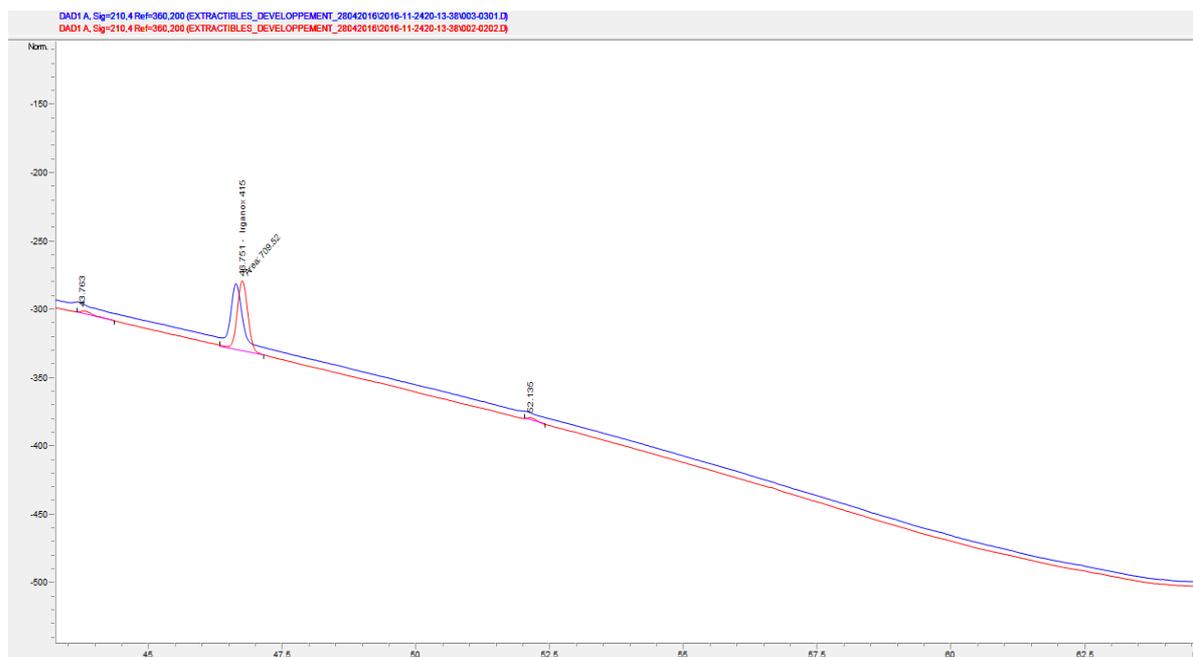


Figure 1 : Chromatogrammes superposés des blancs de la solution de NaCl 0.9% et de la solution d'insuline à 1 [UI/mL]

Annexe XL : Résultats détaillés des extraits de la solution de NaCl 0.9%

Les résultats obtenus pour le BHT et l'Antioxydant 425 dans les différents conditionnements primaires remplis avec du NaCl 0.9% au temps t_0 figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 : Résultats pour les seringues BD Perfusion[®], au temps t_0

BHT						
Seringue BD Perfusion [®]	Echantillon	Aire _{BHT}	Aire _{STD}	Rapport aire BHT	C _{BHT} [µg/mL]	Moyenne C _{BHT} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	0.00	583.94	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	571.85	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	601.93	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	620.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	608.26	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	573.76	0.00	0.00	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	0.00	664.02	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	642.98	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	554.26	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	580.27	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	668.57	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	668.27	0.00	0.00	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	0.00	486.53	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	534.74	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	550.14	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	552.12	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	537.16	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	542.46	0.00	0.00	
Antioxydant 425						
Seringue BD Perfusion [®]	Echantillon	Aire _{A425}	Aire _{STD}	Rapport aire A425	C _{A425} [µg/mL]	Moyenne C _{A425} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	0.00	583.94	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	571.85	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	601.93	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	620.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	608.26	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	573.76	0.00	0.00	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	0.00	664.02	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	642.98	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	554.26	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	580.27	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	668.57	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	668.27	0.00	0.00	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	0.00	486.53	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	534.74	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	550.14	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	552.12	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	537.16	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	542.46	0.00	0.00	

Tableau 2 : Résultats pour les seringues BD Sterifill[®], au temps t_0

BHT						
Seringue BD Sterifill [®]	Echantillon	Aire _{BHT}	Aire _{ISTD}	Rapport aire BHT	C _{BHT} [µg/mL]	Moyenne C _{BHT} [µg/mL]
Lot : 6060032	Echantillon 1	0.00	557.25	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	565.02	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	519.56	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	522.23	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	453.21	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	490.11	0.00	0.00	
Antioxydant 425						
Seringue BD Sterifill [®]	Echantillon	Aire _{A425}	Aire _{ISTD}	Rapport aire A425	C _{A425} [µg/mL]	Moyenne C _{Antioxydant 425} [µg/mL]
Lot : 6060032	Echantillon 1	0.00	557.25	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	565.02	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	519.56	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	522.23	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	453.21	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	490.11	0.00	0.00	

Tableau 3 : Résultats pour les flacons COC, Promens/Elpack[®], au temps t_0

BHT						
Flacon COC, Promens /Elpack [®]	Echantillon	Aire _{BHT}	Aire _{ISTD}	Rapport aire BHT	C _{BHT} [µg/mL]	Moyenne C _{BHT} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	665.15	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	649.66	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	605.19	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	589.81	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	669.66	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	647.51	0.00	0.00	
Antioxydant 425						
Flacon COC, Promens /Elpack [®]	Echantillon	Aire _{A425}	Aire _{ISTD}	Rapport aire A425	C _{A425} [µg/mL]	Moyenne C _{A425} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	665.15	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	649.66	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	605.19	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	589.81	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	669.66	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	647.51	0.00	0.00	

Les résultats obtenus pour le BHT et l'Antioxydant 425 dans les différents conditionnements primaires remplis avec du NaCl 0.9% au temps $t_{3 \text{ mois}}$ figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 4 : Résultats pour les seringues BD Perfusion[®], au temps $t_{3 \text{ mois}}$

BHT						
Seringue BD Perfusion [®]	Echantillon	Aire _{BHT}	Aire _{STD}	Rapport aire BHT	C _{BHT} [µg/mL]	Moyenne C _{BHT} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	0.00	562.56	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	548.47	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	641.64	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	675.48	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	558.13	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	549.45	0.00	0.00	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	0.00	611.91	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	618.68	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	637.37	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	630.65	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	564.23	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	562.71	0.00	0.00	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	0.00	524.42	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	547.72	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	634.79	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	658.18	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	620.11	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	614.23	0.00	0.00	
Antioxydant 425						
Seringue BD Perfusion [®]	Echantillon	Aire _{A425}	Aire _{STD}	Rapport aire A425	C _{A425} [µg/mL]	Moyenne C _{A425} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	0.00	562.56	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	548.47	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	641.64	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	675.48	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	558.13	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	549.45	0.00	0.00	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	0.00	611.91	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	618.68	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	637.37	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	630.65	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	564.23	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	562.71	0.00	0.00	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	0.00	524.42	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	547.72	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	634.79	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	658.18	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	620.11	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	614.23	0.00	0.00	

Tableau 5 : Résultats pour les seringues BD Sterifill[®], au temps t_3 mois

BHT						
Seringue BD Sterifill [®]	Echantillon	Aire _{BHT}	Aire _{ISTD}	Rapport aire BHT	C _{BHT} [µg/mL]	Moyenne C _{BHT} [µg/mL]
Lot : 6060032	Echantillon 1	0.00	572.13	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	580.48	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	610.26	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	620.23	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	686.48	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	680.76	0.00	0.00	
Antioxydant 425						
Seringue BD Sterifill [®]	Echantillon	Aire _{A425}	Aire _{ISTD}	Rapport aire A425	C _{A425} [µg/mL]	Moyenne C _{Antioxydant 425} [µg/mL]
Lot : 6060032	Echantillon 1	0.00	572.13	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	580.48	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	610.26	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	620.23	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	686.48	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	680.76	0.00	0.00	

Tableau 6 : Résultats pour les flacons COC, Promens/Elpack[®] au temps t_3 mois

BHT						
Flacon COC, Promens /Elpack [®]	Echantillon	Aire _{BHT}	Aire _{ISTD}	Rapport aire BHT	C _{BHT} [µg/mL]	Moyenne C _{BHT} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	582.81	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	593.61	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	645.65	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	639.65	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	476.21	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	479.17	0.00	0.00	
Antioxydant 425						
Flacon COC, Promens /Elpack [®]	Echantillon	Aire _{A425}	Aire _{ISTD}	Rapport aire A425	C _{A425} [µg/mL]	Moyenne C _{A425} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	582.81	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	593.61	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	645.65	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	639.65	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	476.21	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	479.17	0.00	0.00	

Annexe XLI : Résultats détaillés des extraits de la solution d'insuline à 1 [UI/mL]

Les résultats obtenus pour le BHT et l'Antioxydant 425 dans les différents conditionnements primaires remplis avec une solution d'insuline à 1 [UI/mL] au temps t_0 figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 : Résultats pour les seringues BD Perfusion[®], au temps t_0

BHT						
Seringue BD Perfusion [®]	Echantillon	Aire _{BHT}	Aire _{STD}	Rapport aire BHT	C _{BHT} [µg/mL]	Moyenne C _{BHT} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	0.00	697.61	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	688.37	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	680.17	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	681.85	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	644.93	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	646.19	0.00	0.00	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	0.00	661.85	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	662.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	679.80	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	671.87	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	743.52	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	755.00	0.00	0.00	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	0.00	706.94	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	698.29	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	621.76	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	637.67	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	617.29	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	616.56	0.00	0.00	
Antioxydant 425						
Seringue BD Perfusion [®]	Echantillon	Aire _{A425}	Aire _{STD}	Rapport aire A425	C _{A425} [µg/mL]	Moyenne C _{Antioxydant 425} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	0.00	697.61	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	688.37	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	680.17	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	681.85	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	644.93	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	646.19	0.00	0.00	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	0.00	661.85	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	662.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	679.80	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	671.87	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	743.52	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	755.00	0.00	0.00	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	0.00	706.94	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	698.29	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	621.76	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	637.67	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	617.29	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	616.56	0.00	0.00	

Tableau 2 : Résultats pour les seringues BD Sterifill® au temps t_0

BHT						
Seringue BD Sterifill®	Echantillon	Aire _{BHT}	Aire _{ISTD}	Rapport aire BHT	C _{BHT} [µg/mL]	Moyenne C _{BHT} [µg/mL]
Lot : 6060032	Echantillon 1	0.00	691.14	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	621.89	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	577.62	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	593.88	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	742.47	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	737.70	0.00	0.00	
Antioxydant 425						
Seringue BD Sterifill®	Echantillon	Aire _{A425}	Aire _{ISTD}	Rapport aire A425	C _{A425} [µg/mL]	Moyenne C _{A425} [µg/mL]
Lot : 6060032	Echantillon 1	0.00	691.14	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	621.89	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	577.62	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	593.88	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	742.47	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	737.70	0.00	0.00	

Tableau 3 : Résultats pour les flacons COC, Promens/Elpack® au temps t_0

BHT						
Flacon COC, Promens/Elpack®	Echantillon	Aire _{BHT}	Aire _{ISTD}	Rapport aire BHT	C _{BHT} [µg/mL]	Moyenne C _{BHT} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	637.32	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	628.52	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	695.26	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	642.25	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	583.53	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	659.87	0.00	0.00	
Antioxydant 425						
Flacon COC, Promens/Elpack®	Echantillon	Aire _{A425}	Aire _{ISTD}	Rapport aire A425	C _{A425} [µg/mL]	Moyenne C _{Antioxydant 425} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	637.32	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	628.52	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	695.26	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	642.25	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	583.53	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	659.87	0.00	0.00	

Les résultats obtenus pour le BHT et l'Antioxydant 425 dans les différents conditionnements primaires remplis avec une solution d'insuline à 1 [UI/mL] au temps $t_{3 \text{ mois}}$ figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 4 : Résultats pour les seringues BD Perfusion[®], $t_{3 \text{ mois}}$

BHT						
Seringue BD Perfusion [®]	Echantillon	Aire _{BHT}	Aire _{STD}	Rapport aire BHT	C _{BHT} [µg/mL]	Moyenne C _{BHT} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	0.00	706.88	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	694.23	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	647.27	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	643.20	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	640.15	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	634.17	0.00	0.00	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	0.00	707.34	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	704.76	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	633.11	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	631.18	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	624.11	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	618.65	0.00	0.00	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	0.00	708.80	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	703.65	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	622.23	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	604.92	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	735.68	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	716.59	0.00	0.00	
Antioxydant 425						
Seringue BD Perfusion [®]	Echantillon	Aire _{A425}	Aire _{STD}	Rapport aire A425	C _{A425} [µg/mL]	Moyenne C _{Antioxydant 425} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	0.00	706.88	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	694.23	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	647.27	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	643.20	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	640.15	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	634.17	0.00	0.00	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	0.00	707.34	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	704.76	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	633.11	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	631.18	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	624.11	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	618.65	0.00	0.00	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	0.00	708.80	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	703.65	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	622.23	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	604.92	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	735.68	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	716.59	0.00	0.00	

Tableau 5 : Résultats pour les seringues BD Sterifill[®], t₃ mois

BHT						
Seringue BD Sterifill [®]	Echantillon	Aire _{BHT}	Aire _{ISTD}	Rapport aire BHT	C _{BHT} [µg/mL]	Moyenne C _{BHT} [µg/mL]
Lot : 6060032	Echantillon 1	0.00	646.40	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	652.08	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	594.16	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	612.57	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	593.99	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	602.62	0.00	0.00	
Antioxydant 425						
Seringue BD Sterifill [®]	Echantillon	Aire _{A425}	Aire _{ISTD}	Rapport aire A425	C _{A425} [µg/mL]	Moyenne C _{Antioxydant 425} [µg/mL]
Lot : 6060032	Echantillon 1	0.00	646.40	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	652.08	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	594.16	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	612.57	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	593.99	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	602.62	0.00	0.00	

Tableau 6 : Résultats pour les flacons COC, Promens/Elpack[®], t₃ mois

BHT						
Flacon COC, Promens/Elpack [®]	Echantillon	Aire _{BHT}	Aire _{ISTD}	Rapport aire BHT	C _{BHT} [µg/mL]	Moyenne C _{BHT} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	641.87	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	685.26	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	691.25	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	695.41	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	658.72	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	656.50	0.00	0.00	
Antioxydant 425						
Flacon COC, Promens/Elpack [®]	Echantillon	Aire _{A425}	Aire _{ISTD}	Rapport aire A425	C _{A425} [µg/mL]	Moyenne C _{A425} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	641.87	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	685.26	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	691.25	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	695.41	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	658.72	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	656.50	0.00	0.00	

Annexe XLII : Résultats détaillés du SST, QC, de la courbe d'étalonnage et du blanc

Les résultats détaillés obtenus pour la droite d'étalonnage figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 : Résultats

Acide caprylique						
	Aire Acide caprylique	Aire Acide myristique D27	Rapport Aire	Concentration Acide caprylique [µg/mL]	Concentration Acide myristique D27 [µg/mL]	Rapport concentration
STD1	3948000.00	1184000.00	3.33	0.50	0.50	1.01
	4064000.00	1303000.00	3.12	0.50	0.50	1.01
STD2	1835000.00	1295000.00	1.42	0.20	0.50	0.41
	2209000.00	1175000.00	1.88	0.20	0.50	0.41
STD3	1047000.00	956132.00	1.10	0.10	0.50	0.20
	957383.00	910867.00	1.05	0.10	0.50	0.20
Pente			2.64			
Ordonnée à l'origine			0.55			
Coefficient de détermination			0.97			
Acide myristique						
	Aire Acide caprylique	Aire Acide myristique	Rapport Aire	Concentration Acide myristique [µg/mL]	Concentration Acide myristique D27 [µg/mL]	Rapport concentration
STD1	1091000.0	1184000.00	0.92	0.50	0.50	1.00
	1165000.0	1303000.00	0.89	0.50	0.50	1.00
STD2	275319.0	1295000.00	0.21	0.20	0.50	0.40
	213915.0	1175000.00	0.18	0.20	0.50	0.40
STD3	16158.0	956132.00	0.02	0.10	0.50	0.20
	16085.0	910867.00	0.02	0.10	0.50	0.20
Pente			1.13			
Ordonnée à l'origine			-0.23			
Coefficient de détermination			1.00			

Les résultats détaillés du SST figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 2 : Résultats SST

Temps de rétention	Acide caprylique	Acide myristique	Acide myristique D27	Rapport d'aire	Acide caprylique	Acide myristique
SST1 [min]	3.532	9.413	9.111	SST1	0.37	0.47
SST2 [min]	3.565	9.498	9.18	SST2	0.37	0.46
SST3 [min]	3.659	9.464	9.162	SST3	0.38	0.46
Moyenne	3.59	9.46	9.15	Moyenne	0.37	0.46
Ecart-type	0.07	0.04	0.04	Ecart-type	0.01	0.01
CV	1.84%	0.45%	0.39%	CV	1.59%	1.16%
Résultats (Spécification : CV < 2%)	Conforme	Conforme	Conforme	Résultats (Spécification : CV < 3%)	Conforme	Conforme

Les résultats détaillés du QC figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 3 : Résultats

Acide caprylique					
QC	Aire_{Acide caprylique}	Aire_{ISTD}	Rapport aire_{Acide caprylique}	C_{Acide caprylique} [µg/mL]	Résultats (Spécifications : 0.18 [µg/mL] ≤ x ≤ 0.22 [µg/mL])
QC1	1906000.00	1123000.00	1.70	0.22	CONFORME
QC2	1570500.00	959968.00	1.64	0.20	CONFORME
			Moyenne	0.21	CONFORME
			Ecart-type	0.01	
			CV [%]	3.89%	
Acide myristique					
QC	Aire_{Acide myristique}	Aire_{ISTD}	Rapport aire_{Acide myristique}	C_{Acide myristique} [µg/mL]	Résultats (Spécifications : 0.18 [µg/mL] ≤ x ≤ 0.22 [µg/mL])
QC1	208482.00	1123000.00	0.19	0.18	CONFORME
QC2	179175.00	959968.00	0.19	0.18	CONFORME
			Moyenne	0.18	CONFORME
			Ecart-type	0.00	
			CV [%]	0.17%	

Annexe XLIII : Résultats détaillés des extraits de la solution de NaCl 0.9%

Les résultats obtenus pour l'acide myristique et l'acide caprylique dans les différents conditionnements primaires remplis avec du NaCl 0.9% au temps t_0 figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 : Résultats pour les seringues BD Perfusion[®], au temps t_0

Acide caprylique						
Seringue BD Perfusion[®]	Echantillon	Aire_{Acide caprylique}	Aire_{ISTD}	Rapport aire_{Acide caprylique}	C_{Acide caprylique} [µg/mL]	Moyenne C_{Acide caprylique} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	NA	NA	NA	NA	NA
	Echantillon 1	NA	NA	NA	NA	
	Echantillon 2	0.00	2872000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	2990000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	1102000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	917928.00	0.00	0.00	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	0.00	572472.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	346769.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	1459000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	1435000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	5329000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	5521000.00	0.00	0.00	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	0.00	1425000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	1341000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	1905000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	2028000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	2329000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	2410000.00	0.00	0.00	
Acide myristique						
Seringue BD Perfusion[®]	Echantillon	Aire_{Acide myristique}	Aire_{ISTD}	Rapport aire_{Acide myristique}	C_{Acide myristique} [µg/mL]	Moyenne C_{Acide myristique} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	NA	NA	NA	NA	NA
	Echantillon 1	NA	NA	NA	NA	
	Echantillon 2	0.00	2872000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	2990000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	1102000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	917928.00	0.00	0.00	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	0.00	572472.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	346769.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	1459000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	1435000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	5329000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	5521000.00	0.00	0.00	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	0.00	1425000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	1341000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	1905000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	2028000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	2329000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	2410000.00	0.00	0.00	

Tableau 2 : Résultats pour les seringues BD Sterifill[®], au temps t₀

Acide caprylique						
Seringue BD Sterifill [®]	Echantillon	Aire _{Acide caprylique}	Aire _{STD}	Rapport aire _{Acide caprylique}	C _{Acide caprylique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide caprylique} [µg/mL]
Lot : 6060032	Echantillon 1	0.00	780608.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	855936.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	2105000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	2007000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	267284.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	441899.00	0.00	0.00	
Acide myristique						
Seringue BD Sterifill [®]	Echantillon	Aire _{Acide myristique}	Aire _{STD}	Rapport aire _{Acide myristique}	C _{Acide myristique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide myristique} [µg/mL]
Lot : 6060032	Echantillon 1	0.00	780608.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	855936.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	2105000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	2007000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	267284.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	441899.00	0.00	0.00	

Tableau 3 : Résultats pour les flacons COC, Promens/Elpack[®] au temps t₀

Acide caprylique						
Flacon COC, Promens/Elpack [®]	Echantillon	Aire _{Acide caprylique}	Aire _{STD}	Rapport aire _{Acide caprylique}	C _{Acide caprylique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide caprylique} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	1608000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	1531000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	2166000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	2067000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	1467000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	1570000.00	0.00	0.00	
Acide myristique						
Flacon COC, Promens/Elpack [®]	Echantillon	Aire _{Acide myristique}	Aire _{STD}	Rapport aire _{Acide myristique}	C _{Acide myristique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide myristique} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	1608000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	1531000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	2166000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	2067000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	1467000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	1570000.00	0.00	0.00	

Les résultats obtenus pour l'acide myristique et l'acide caprylique dans les différents conditionnements primaires remplis avec du NaCl 0.9% au temps $t_{3 \text{ mois}}$ figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 4 : Résultats pour les seringues BD Perfusion[®], au temps $t_{3 \text{ mois}}$

Acide caprylique						
Seringue BD Perfusion [®]	Echantillon	Aire _{Acide caprylique}	Aire _{ISTD}	Rapport aire _{Acide caprylique}	C _{Acide caprylique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide caprylique} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	0.00	6025000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	6011000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	4881000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	4777000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	5770000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	5780000.00	0.00	0.00	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	0.00	6656000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	6578000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	6509000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	NA	NA	NA	NA	
	Echantillon 3	0.00	5329000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	5521000.00	0.00	0.00	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	0.00	6176000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	5641000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	1532000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	1345000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	4161000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	4368000.00	0.00	0.00	
Acide myristique						
Seringue BD Perfusion [®]	Echantillon	Aire _{Acide myristique}	Aire _{ISTD}	Rapport aire _{Acide myristique}	C _{Acide myristique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide myristique} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	0.00	6025000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	6011000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	4881000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	4777000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	5770000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	5780000.00	0.00	0.00	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	0.00	6656000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	6578000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	6509000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	NA	NA	NA	NA	
	Echantillon 3	0.00	5329000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	5521000.00	0.00	0.00	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	268404.00	6176000.00	0.04	0.00	0.00
	Echantillon 1	255164.00	5641000.00	0.05	0.00	
	Echantillon 2	0.00	1532000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	1345000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	4161000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	4368000.00	0.00	0.00	

Tableau 5 : Résultats pour les seringues BD Sterifill[®], au temps t₃ mois

Acide caprylique						
Seringue BD Sterifill [®]	Echantillon	Aire _{Acide caprylique}	Aire _{ISTD}	Rapport aire _{Acide caprylique}	C _{Acide caprylique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide caprylique} [µg/mL]
Lot : 6060032	Echantillon 1	0.00	1382000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	1470000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	4875000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	5068000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	2184000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	2122000.00	0.00	0.00	
Acide myristique						
Seringue BD Sterifill [®]	Echantillon	Aire _{Acide myristique}	Aire _{ISTD}	Rapport aire _{Acide myristique}	C _{Acide myristique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide myristique} [µg/mL]
Lot : 6060032	Echantillon 1	0.00	1382000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	1470000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	4875000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	5068000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	2184000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	2122000.00	0.00	0.00	

Tableau 6 : Résultats pour les flacons COC, Promens/Elpack[®] au temps t₃ mois

Acide caprylique						
Flacon COC, Promens /Elpack [®]	Echantillon	Aire _{Acide caprylique}	Aire _{ISTD}	Rapport aire _{Acide caprylique}	C _{Acide caprylique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide caprylique} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	2019000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	1665000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	257476.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	166478.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	1550000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	1755000.00	0.00	0.00	
Acide myristique						
Flacon COC, Promens/Elpack [®]	Echantillon	Aire _{Acide myristique}	Aire _{ISTD}	Rapport aire _{Acide myristique}	C _{Acide myristique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide myristique} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	2019000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	1665000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	257476.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	166478.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	1550000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	1755000.00	0.00	0.00	

Annexe XLIV : Résultats détaillés des extraits de la solution d'insuline à 1 [UI/mL]

Les résultats obtenus pour l'acide myristique et l'acide caprylique dans les différents conditionnements primaires remplis avec une solution d'insuline à 1 [UI/mL] au temps t_0 figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 : Résultats pour les seringues BD Perfusion[®], au temps t_0

Acide caprylique						
Seringue BD Perfusion[®]	Echantillon	Aire_{Acide caprylique}	Aire_{ISTD}	Rapport aire_{Acide caprylique}	C_{Acide caprylique} [µg/mL]	Moyenne C_{Acide caprylique} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	0.00	53246.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	20166.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	1283000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	1124000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	312435.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	311678.00	0.00	0.00	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	0.00	1192000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	1219000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	1155000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	1113000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	1771000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	1672000.00	0.00	0.00	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	0.00	1760000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	1760000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	NA	NA	NA	NA	NA
	Echantillon 2	NA	NA	NA	NA	
	Echantillon 3	0.00	2176000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	1887000.00	0.00	0.00	
Acide myristique						
Seringue BD Perfusion[®]	Echantillon	Aire_{Acide myristique}	Aire_{ISTD}	Rapport aire_{Acide myristique}	C_{Acide myristique} [µg/mL]	Moyenne C_{Acide myristique} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	0.00	53246.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	20166.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	1283000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	1124000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	312435.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	311678.00	0.00	0.00	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	0.00	1192000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	1219000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	1155000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	1113000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	1771000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	1672000.00	0.00	0.00	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	0.00	1760000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	1760000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	NA	NA	NA	NA	NA
	Echantillon 2	NA	NA	NA	NA	
	Echantillon 3	0.00	2176000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	1887000.00	0.00	0.00	

Tableau 2 : Résultats pour les seringues BD Sterifill® au temps t₀

Acide caprylique						
Seringue BD Sterifill®	Echantillon	Aire _{Acide caprylique}	Aire _{ISTD}	Rapport aire _{Acide caprylique}	C _{Acide caprylique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide caprylique} [µg/mL]
Lot : 6060032	Echantillon 1	0.00	1723000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	1495000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	NA	NA	NA	NA	NA
	Echantillon 2	NA	NA	NA	NA	
	Echantillon 3	0.00	2722000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	2818000.00	0.00	0.00	
Acide myristique						
Seringue BD Sterifill®	Echantillon	Aire _{Acide myristique}	Aire _{ISTD}	Rapport aire _{Acide myristique}	C _{Acide myristique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide myristique} [µg/mL]
Lot : 6060032	Echantillon 1	0.00	1723000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	1495000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	NA	NA	NA	NA	NA
	Echantillon 2	NA	NA	NA	NA	
	Echantillon 3	0.00	2722000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	2818000.00	0.00	0.00	

Tableau 3 : Résultats pour les flacons COC, Promens/Elpack® au temps t₀

Acide caprylique						
Flacon COC, Promens/Elpack®	Echantillon	Aire _{Acide caprylique}	Aire _{ISTD}	Rapport aire _{Acide caprylique}	C _{Acide caprylique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide caprylique} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	1270000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	1246000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	853576.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	817411.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	2751000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	2352000.00	0.00	0.00	
Acide myristique						
Flacon COC, Promens/Elpack®	Echantillon	Aire _{Acide myristique}	Aire _{ISTD}	Rapport aire _{Acide myristique}	C _{Acide myristique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide myristique} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	1270000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	1246000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	853576.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	817411.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	2751000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	2352000.00	0.00	0.00	

Les résultats obtenus pour l'acide myristique et l'acide caprylique dans les différents conditionnements primaires remplis avec une solution d'insuline à 1 [UI/mL] au temps $t_{3 \text{ mois}}$ figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau 4 : Résultats pour les seringues BD Perfusion[®], $t_{3 \text{ mois}}$

Acide caprylique						
Seringue BD Perfusion [®]	Echantillon	Aire _{Acide caprylique}	Aire _{ISTD}	Rapport aire _{Acide caprylique}	C _{Acide caprylique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide caprylique} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	0.00	6725000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	6796000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	6955000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	6827000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	3539000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	3462000.00	0.00	0.00	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	0.00	6334000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	6511000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	8625000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	8375000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	9481000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	9558000.00	0.00	0.00	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	0.00	8189000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	8096000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	8048000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	8130000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	7260000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	7224000.00	0.00	0.00	
Acide myristique						
Seringue BD Perfusion [®]	Echantillon	Aire _{Acide myristique}	Aire _{ISTD}	Rapport aire _{Acide myristique}	C _{Acide myristique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide myristique} [µg/mL]
Lot : 1602209P	Echantillon 1	207699.00	6725000.00	0.03	0.12	0.12
	Echantillon 1	208920.00	6796000.00	0.03	0.12	
	Echantillon 2	146112.00	6955000.00	0.02	0.11	0.11
	Echantillon 2	157888.00	6827000.00	0.02	0.11	
	Echantillon 3	47684.00	3539000.00	0.01	0.11	0.11
	Echantillon 3	62758.00	3462000.00	0.02	0.11	
Lot : 1603204P	Echantillon 1	170097.00	6334000.00	0.03	0.11	0.11
	Echantillon 1	179454.00	6511000.00	0.03	0.11	
	Echantillon 2	129251.00	8625000.00	0.01	0.11	0.11
	Echantillon 2	133851.00	8375000.00	0.02	0.11	
	Echantillon 3	207820.00	9481000.00	0.02	0.11	0.11
	Echantillon 3	194745.00	9558000.00	0.02	0.11	
Lot : 1601255P	Echantillon 1	179768.00	8189000.00	0.02	0.11	0.11
	Echantillon 1	166791.00	8096000.00	0.02	0.11	
	Echantillon 2	275650.00	8048000.00	0.03	0.12	0.12
	Echantillon 2	286980.00	8130000.00	0.04	0.12	
	Echantillon 3	128364.00	7260000.00	0.02	0.11	0.11
	Echantillon 3	118506.00	7224000.00	0.02	0.11	

Tableau 5 : Résultats pour les seringues BD Sterifill[®], t₃ mois

Acide caprylique						
Seringue BD Sterifill [®]	Echantillon	Aire _{Acide caprylique}	Aire _{ISTD}	Rapport aire _{Acide caprylique}	C _{Acide caprylique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide caprylique} [µg/mL]
Lot : 6060032	Echantillon 1	0.00	2963000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	3003000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	2394000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	2260000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	3138000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	3202000.00	0.00	0.00	
Acide myristique						
Seringue BD Sterifill [®]	Echantillon	Aire _{Acide myristique}	Aire _{ISTD}	Rapport aire _{Acide myristique}	C _{Acide myristique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide myristique} [µg/mL]
Lot : 6060032	Echantillon 1	0.00	2963000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	3003000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	2394000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	2260000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	0.00	3138000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 3	0.00	3202000.00	0.00	0.00	

Tableau 6 : Résultats pour les flacons COC, Promens/Elpack[®], t₃ mois

Acide caprylique						
Flacon COC, Promens /Elpack [®]	Echantillon	Aire _{Acide caprylique}	Aire _{ISTD}	Rapport aire _{Acide caprylique}	C _{Acide caprylique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide caprylique} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	1163000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	1017000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	1163000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	1017000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	NA	NA	NA	NA	NA
	Echantillon 3	NA	NA	NA	NA	
Acide myristique						
Flacon COC, Promens /Elpack [®]	Echantillon	Aire _{Acide myristique}	Aire _{ISTD}	Rapport aire _{Acide myristique}	C _{Acide myristique} [µg/mL]	Moyenne C _{Acide myristique} [µg/mL]
Lot : 00254776	Echantillon 1	0.00	1163000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 1	0.00	1017000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 2	0.00	1163000.00	0.00	0.00	0.00
	Echantillon 2	0.00	1017000.00	0.00	0.00	
	Echantillon 3	NA	NA	NA	NA	NA
	Echantillon 3	NA	NA	NA	NA	

Le tableau ci-dessous résume les résultats statistiques obtenus suite à la comparaison des résultats obtenus pour les seringues BD Perfusion[®] de différents lots remplis avec la solution d'insuline à 1 [UI/mL] :

Tableau 7 : Analyse statistique entre les seringues BD Perfusion[®]

Comparaison lot :			Comparaison lot :			Comparaison lot :		
Moyenne concentration [µg/mL]	Lot : 160220 9P	Lot : 16032 04P	Moyenne concentration [µg/mL]	Lot : 16032 04P	Lot : 1601 255P	Moyenne concentration [µg/mL]	Lot : 160220 9P	Lot : 1601 255P
Echantillon 1	0.12	0.11	Echantillon 1	0.11	0.11	Echantillon 1	0.12	0.11
Echantillon 2	0.11	0.11	Echantillon 2	0.11	0.12	Echantillon 2	0.11	0.12
Echantillon 3	0.11	0.11	Echantillon 3	0.11	0.11	Echantillon 3	0.11	0.11
Moyenne	0.11	0.11	Moyenne	0.11	0.11	Moyenne	0.11	0.11
Variance	0.000	0.000	Variance	0.00	0.00	Variance	0.00	0.00
Test de Fisher			Test de Fisher			Test de Fisher		
F_{calculé}	1.65		F_{calculé}	2.49		F_{calculé}	1.51	
F_{théorique}	19.00		F_{théorique}	19.00		F_{théorique}	19.00	
Test de Student			Test de Student			Test de Student		
t_{théorique}	2.78		t_{théorique}	2.78		t_{théorique}	2.78	
t_{observé}	0.29		t_{observé}	0.49		t_{observé}	0.21	

Un test de Fischer a été réalisé : étant donné que le $F_{\text{théorique}}$ est supérieur au $F_{\text{calculé}}$, les variances sont égales.

Un test de Student à variances égales a été réalisé pour comparer les résultats obtenus pour les seringues BD Perfusion[®] de différents lots. Etant donné que le $t_{\text{théorique}}$ est supérieur au $t_{\text{observé}}$, la différence entre les résultats n'est pas significative pour les différents lots de seringues BD Perfusion[®].