



UNIVERSITÉ DE GENÈVE



UNIVERSITE DE GENEVE
FACULTE DES SCIENCES
SECTION DE PHARMACIE

HOPITAUX UNIVERSITAIRES DE GENEVE
DEPARTEMENT APSIC
PHARMACIE DES HUG

Mars-Juin 2003

Mémoire pour le travail de diplôme d'analyse pharmaceutique

ETUDE DE STABILITE DES SOLUTIONS INJECTABLES D'AMIODARONE

Présenté le 08 juillet 2003
par **Noémie Marcoz**

Sous la supervision du Dr P. Bonnabry, PD

Membres du jury :

Prof. J.-L. Veuthey
Prof. R. Gurny
Dr A.-M. Sautter
Dr S. Rudaz
Mr H. Ing

TABLE DES MATIERES

➤	LISTE DES ABREVIATIONS	3
➤	ABSTRACT.....	3
I.	THEORIE	4
	<i>I.1 INTRODUCTION</i>	<i>4</i>
	<i>I.2 UNE SUBSTANCE : AMIODARONE</i>	<i>6</i>
	<i>I.3 UNE METHODE : HPLC.....</i>	<i>10</i>
	<i>I.4 BIBLIOGRAPHIE.....</i>	<i>13</i>
	II. PARTIE EXPERIMENTALE.....	16
	<i>II.1 MATERIEL ET METHODES</i>	<i>16</i>
	II.1.1 Produits.....	16
	II.1.2 Instruments	17
	II.1.3 Mise au point de la méthode et optimisation des conditions.....	17
	<i>II.2 VALIDATION ET ROBUSTESSE DE LA METHODE.....</i>	<i>18</i>
	II.2.1 Validation	18
	II.2.2 Robustesse	19
	<i>II.3 PARAMETRES DE L'ETUDE DE STABILITE.....</i>	<i>21</i>
	II.3.1 Introduction	21
	II.3.2 Préparation des lots d'échantillons et des dosages	22
	<i>II.4 RESULTATS ET DISCUSSION.....</i>	<i>29</i>
	II.4.1 Mise au point de la méthode.....	29
	II.4.2 Etude de spécificité	30
	II.4.3 Validation de la méthode d'analyse	37
	II.4.4 Etude de la robustesse de la méthode.....	45
	II.4.5 Etude de stabilité	48
III.	CONCLUSIONS GENERALES ET GUIDELINES	59
IV.	PERSPECTIVES	59
V.	ANNEXES	60
	<i>V.1 INTRODUCTION</i>	<i>60</i>
	<i>V.2 VALIDATION</i>	<i>61</i>
	<i>V.3 PARAMETRES DE L'ETUDE DE STABILITE.....</i>	<i>64</i>
	<i>V. 4 RESULTATS</i>	<i>67</i>
	<i>V. 5 ROBUSTESSE</i>	<i>71</i>
➤	REMERCIEMENTS	73

➤ Liste des abréviations

HPLC:	Chromatographie liquide à haute performance
PA:	Principe actif
FM:	Formulation médicamenteuse = Cordarone®
Rdf:	Formulation de dosage reconstituée
Std:	Standard
G5%:	Glucose 5%
SIM:	Soins intensifs de médecine
HUG:	Hôpitaux universitaires de Genève
Si-OH:	Silice avec silanol protonné
Si-O ⁻ :	Silice avec silanol déprotonné
i.v.:	intra-veineuse
i.v.d:	intra-veineuse directe

➤ Abstract

Bien que l'amiodarone soit un produit ancien aux propriétés bien connues, son utilisation en milieu de soins intensifs nécessite un mode de dilution non recommandé par le fabricant, dont nous avons cherché à valider l'adéquation en terme de stabilité.

La stabilité physico-chimique de seringues prêtes à l'emploi de 50 mg/ml d'amiodarone ainsi que celle de diverses solutions de concentrations comprises entre 0,6 mg/ml et 25 mg/ml d'amiodarone, a été évaluée par une méthode d'HPLC en phase inversée spécialement développée pour cette étude. Cette méthode robuste et spécifique a été validée.

Les solutions de 50 mg/ml sont stables pendant 30 jours, celles de concentrations inférieures le sont sur minimum 24 h si elles sont conservées au frais et à l'abri de la lumière. La lumière et la température doivent être contrôlés car ils provoquent une dégradation de la substance et une perte de teneur en principe actif dans ces seringues. La concentration la plus diluée, recommandée par le fabricant, est très instable si elle n'est pas protégée de la lumière.

Une étude d'incompatibilité physico-chimique a été effectuée de façon visuelle, sans dosage. Neuf mélanges ont été constitués entre différents principes actifs couramment utilisés dans le services des soins intensifs de médecine et la Cordarone® diluée à 0,6 mg/ml pour la première série (A) et à 25 mg/ml pour la deuxième (B). Il est possible d'affirmer que tous les mélanges sont stables 24 h pour la série (A) ce qui n'est pas le cas pour la (B) où de nombreux mélanges deviennent opaques. Donc ces principes actifs ne devraient pas être administrés simultanément à la Cordarone® 25 mg/ml. En résumé, notre étude a permis de valider la stabilité de la solution non diluée en seringues et la pratique de dilutions non recommandées par le fabricant mais appliquées en routine aux soins intensifs de médecine.

I. THEORIE

I.1 INTRODUCTION

La mort subite due à une cause cardiaque touche des milliers de personnes chaque année en Suisse comme ailleurs [1]. Les différents troubles cardiaques sont nombreux et variés, parmi ceux-ci les arythmies telles que la fibrillation ventriculaire sont la source d'une importante morbidité.

Le chlorhydrate d'amiodarone est un agent antiarythmique largement utilisé dans les unités de soins intensifs pour une variété d'arythmies cardiaques et c'est notamment un des médicaments de choix pour traiter la fibrillation et la tachycardie ventriculaire [2]. Toutefois elle reste réservée aux cas où le pronostic vital est engagé car ces pathologies sont traitées initialement par la cardioversion (choc cardiogène) puis les antiarythmiques de première ligne tels que la quinidine ou la procainamide [3, 2].

La classification la plus largement utilisée pour les agents antiarythmiques est celle de Vaughan-Williams qui est constituée de quatre classes : les bloqueurs des canaux sodiques, les bêta-bloquants sympatholytiques, les médicaments prolongeant le temps de repolarisation et les bloqueurs des canaux calciques. L'amiodarone est unique car bien qu'elle soit classée principalement comme étant un agent de classe III, elle possède des propriétés appartenant à chacune des quatre classes [2, 4].

L'amiodarone peut être administrée par voie orale ou par voie parentérale. Il faut tout de même rappeler que la voie injectable représente une « agression » pour la peau qui est notre barrière naturelle nous protégeant, entre autres, contre les infections du milieu extérieur [5]. Toutefois l'effet obtenu après injection intra-veineuse est immédiat c'est pourquoi cette voie est nécessaire lorsque la voie orale est impossible pour diverses raisons [6], ou lorsque la situation est une urgence souvent vitale comme l'arrêt cardiorespiratoire par exemple [7].

Vu l'importance de la place de l'amiodarone dans la thérapeutique cardiaque, il est utile de s'intéresser à son emploi dans un service de soins intensifs de médecine (SIM) en milieu hospitalier comme les Hôpitaux universitaires de Genève (HUG).

Ce présent travail apportera une contribution dans la résolution de certains problèmes rencontrés dans l'unité de soins. En effet l'emploi de Cordarone® par voie intraveineuse pose toujours un certain nombre de questions pratiques de manipulation, de stabilité et d'incompatibilités physico-chimiques.

En ce qui concerne le premier point, il faut savoir que la solution contenue dans les ampoules de Cordarone® est très visqueuse en raison de la présence de polysorbate 80 qui est utilisé pour solubiliser le principe actif.

Selon la pathologie, on distingue deux modes d'administration de la Cordarone® : soit en intra-veineuse directe (i.v.d) à une concentration de 50 mg/ml lors d'un traitement d'urgence, soit en perfusion à diverses concentrations dépendantes des besoins du patient lors d'un traitement continu.

Or dans une situation d'urgence la viscosité de la solution rend difficile le prélèvement rapide d'un dosage précis d'amiodarone. Pour cette raison, l'Unité des SIM des HUG a demandé à la pharmacie la préparation de seringues prêtes à l'emploi d'amiodarone à 300mg / 6ml, qu'il serait possible d'administrer directement sans manipulation préalable. Ces seringues prêtes à l'emploi auraient ainsi leur place sur le chariot d'urgence au même titre que les seringues prêtes à l'emploi d'adrénaline par exemple. Elles seraient administrées ou non en fonction de la situation. Par conséquent, dans certains cas elles peuvent ne pas être utilisées d'où l'intérêt de déterminer leur durée de stabilité pour savoir combien de temps une telle seringue peut être conservée et dans quelles conditions.

D'autre part, selon la notice d'emballage du fabricant Sanofi (Meyrin, Genève), sous *posologie et mode d'emploi*, dans le paragraphe *Instructions spéciales* concernant le mode d'application, il est indiqué que « **pour des raisons galéniques, il ne faut pas utiliser des concentrations inférieures à 2 ampoules (=300mg) dans 500ml d'une solution de glucose 5%** ». Ce qui signifie qu'il ne faut pas avoir une dilution inférieure à 0,6 mg/ml.

Mais ceci ne précise pas quelle concentration maximale il est possible d'obtenir sans risque de précipitation.

Il faut savoir que les patients présentant une pathologie cardiaque sont souvent en restriction hydrique, par conséquent la dilution recommandée par le fabricant apporte une quantité de liquide trop importante. Dans les cas d'arythmies graves les doses d'amiodarone prescrites peuvent être de 1200 mg/24h, ce qui correspond à un apport de 2 litres de liquide quotidiennement sans compter le volume apporté par les autres médicaments administrés simultanément.

Aux Urgences et aux SIM des HUG, une pratique courante consiste à administrer la Cordarone® en pousse-seringue à des concentrations de 450mg, 600mg et jusqu'à 1200 mg / 48 ml de glucose 5%. Or la littérature ne donne aucun renseignement sur la stabilité du médicament dans ces conditions et le fabricant, lui, ne préconise que la dilution mentionnée dans le Compendium.

Finalement, les patients hospitalisés dans ces unités reçoivent un certain nombre de perfusions par voie i.v en continu ainsi que des perfusions par intermittence. Il est important, pour diverses raisons développées plus bas, de connaître les compatibilités physico-chimiques entre ces différents médicaments administrés simultanément. Ainsi par exemple un schéma de traitement fréquemment utilisé peut comporter : héparine, nitroglycérine, insuline, KCl, midazolam, fentanyl, norépinéphrine et dobutamine simultanément.

L'utilité et la place du travail de diplôme paraît donc évidente et il s'agira ainsi de définir la stabilité de la Cordarone® aux concentrations utilisées aux Soins intensifs et d'évaluer les incompatibilités physico-chimiques éventuelles entre les différents principes actifs et l'amiodarone.

I.2 UNE SUBSTANCE : AMIODARONE

D'un point de vue chimique, le chlorhydrate d'amiodarone (de formule $C_{25}H_{29}I_2NO_3.HCl$) est un dérivé benzofurane di-iodé contenant une chaîne alkyle avec une amine tertiaire diéthylée [8]. (Cf. figure1)

C'est une poudre cristalline blanche insoluble en milieu aqueux mais soluble dans l'éthanol [3, 9, 10].

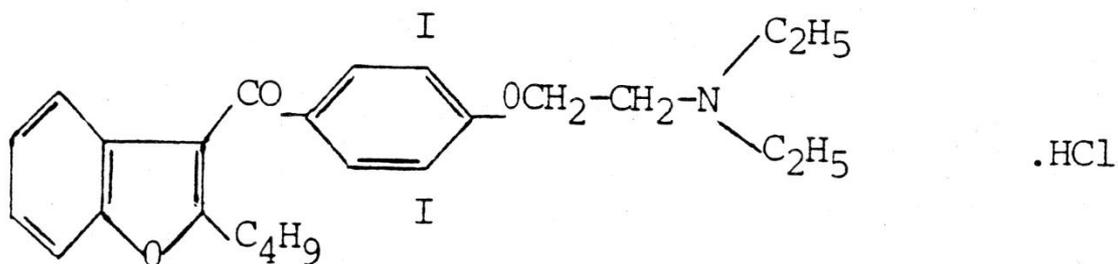


Figure 1 : Formule développée de l'amiodarone

Le chlorhydrate d'amiodarone est un sel, donc en solution aqueuse il se dissocie et donne l'amiodarone protonnée: une amine tertiaire de forme R_3-NH^+ , son contre ion dans l'eau est l'anion Cl^- .

L'amiodarone possède un pKa de 9,4 [11] qui régit l'équilibre entre la forme protonnée de la base et la forme neutre. Ce qui signifie que si $pH < 7,4$ ($pKa-2$) on a l'amiodarone principalement sous forme R_3-NH^+ donc acide, si $pH > 11,4$ l'amiodarone sera principalement sous forme R_3-N donc neutre.

Ce qui fait sa particularité analytique est sa nature très lipophile. En effet elle possède un $\log D = 5,49 \Rightarrow D = 10^{5,49}$ [11]. Ce qui signifie qu'il y a environ 10^6 molécules dans la phase organique pour 1 molécule dans la phase aqueuse lors d'une extraction liquide liquide. Donc l'affinité de l'amiodarone pour la phase hydrophobe est très supérieure à celle pour la phase aqueuse.

Dans le système chromatographique, le soluté amiodarone a une affinité différente pour les chaînes alkyles C18 de la phase stationnaire et pour la phase mobile ce qui définit son temps de rétention. Ces affinités sont influencées par la composition de la phase mobile, autrement dit par la proportion de modificateur organique. Par conséquent, dans notre cas, plus on augmentera le pourcentage d'acétonitrile dans la phase mobile plus l'amiodarone sera éluée rapidement.

De plus, par sa structure chimique on voit qu'elle est formée d'une grosse partie hydrophobe (3 cycles) sur laquelle est greffée une petite chaîne alkyle se terminant par deux groupements éthyle amine (NEt_2). Mais le fait qu'elle soit sous forme neutre ou protonnée n'influence pas du tout la séparation car la partie hydrophobe l'emporte.

Donc sur une colonne C18 où la phase est hydrophobe l'amiodarone sera fortement retenue, il faut donc ajouter un solvant organique pour la décrocher.

La stabilité de l'amiodarone est décrite dans différents ouvrages [3, 12] qui indiquent que les injectables doivent être conservées à température ambiante (15 à 25°C) à l'abri de la lumière et de la chaleur excessive. Selon L. A trissel [13], l'amiodarone HCl à 0,6 mg/ml dans G5% est stable 5 jours à température ambiante. Il faut tout de même ajouter que si cette solution est stockée dans un contenant à base de PVC, une perte de substance apparaît par adsorption sur le matériel. La perte est de 25% en 24 h à température ambiante.

L'activité pharmacologique prédominante de la substance étudiée est celle d'agent antiarythmique de la classe III de Vaughan-Williams c'est à dire ralentissement de la conduction et augmentation des périodes réfractaires en prolongeant la durée du potentiel d'action de la fibre cardiaque. Mais l'amiodarone a aussi un effet bradycardisant et adrénofréinateur et réduit la consommation d'oxygène du myocarde par allègement de son travail [8, 14]. Elle agit aussi au niveau des canaux en ralentissant les courants sodiques et calciques, a un effet vasodilatateur et augmente le débit coronarien.

Elle représente donc un antiarythmique très complet.

Ses possibilités d'emploi sont par conséquent assez nombreuses [15].

La dose habituellement prescrite peut être de 5mg/kg dans 250 ml de glucose 5% (G5%) renouvelables 2 à 3 fois par heure lors d'un traitement de charge ; de 10 à 20 mg/kg dans 250 ml de G5% pour un traitement préventif.

Il est aussi possible de faire une i.v.d de 5mg/kg sur 3 min minimum [4, 8], mais cette voie est contre-indiquée en cas d'hypotension, d'insuffisance respiratoire sévère et d'insuffisance cardiaque où un risque d'aggravation existe [15].

De part sa nature très lipophile, la substance a un profil pharmacocinétique caractéristique. Celui-ci présente une grande variabilité interpatient, une large distribution tissulaire, un métabolisme principalement hépatique, une faible clearance et une longue demi-vie (52 j.)

L'amiodarone est métabolisée par le cytochrome 3A4 en N-deséthylamiodarone, son principal métabolite, lui-même actif en tant qu'antiarythmique. L'élimination se fait principalement par la bile et très peu par le rein. L'amiodarone est fortement liée aux protéines plasmatiques (>96%) [8, 16].

Les effets secondaires de la substance sont aussi liés à sa nature lipophile car l'amiodarone et son métabolite s'accumulent dans le foie, le tissu adipeux, les poumons et d'autres organes. L'accumulation pulmonaire est potentiellement fatale. D'autres effets indésirables tels que hypotension, bradycardie, perturbation de la thyroïde, micro dépôts cornéens, et photosensibilité sont plutôt rencontrés lors de l'utilisation de la forme orale. Lors d'injections il peut y avoir baisse de tension, veinite, bouffées de chaleur, et sueurs [14].

La principale méthode utilisée pour analyser et doser l'amiodarone est la chromatographie liquide à haute performance en phase inverse ou normale [17, 18, 19, 20, 21, 22, 23]. Mais cette méthode est aussi comparée à la technique de spectrométrie UV-vis [24].

D'autre part, lorsqu'il s'agit d'aborder une question concernant un problème de compatibilité entre plusieurs médicaments, le premier réflexe est de se référer à la littérature qui regroupe des tables d'incompatibilités entre principes actifs [13, 25]. Selon de nombreux auteurs, lorsque l'amiodarone est mélangée à de nombreux principes actifs deux à deux, elle s'avère être compatible avec un certain nombre d'entre eux sur une période de 24h [25, 26, 27, 28] mais ne l'est pas par exemple avec l'héparine [12].

Mais toute littérature donne des mélanges de médicament toujours deux à deux et à des concentrations précises. Or dans un service de soins intensifs où l'état des patients est critique avec plusieurs organes vitaux pouvant être touchés, les concentrations des médicaments utilisés sont souvent très supérieures à celles recommandées par le fabricant ou utilisées en routine dans d'autres services. Donc les conditions diffèrent de celles de la littérature. Il est alors justifié de faire ces tests in vitro au laboratoire pour se placer dans les conditions expérimentales réelles des SIM, les livres étant trop éloignés de la réalité du service.

Les incompatibilités, étant par définition le résultat d'un changement physico-chimique, peuvent se manifester par la formation d'un précipité, un changement de coloration, une opalescence, un dégagement gazeux, un changement de pH (invisible) et une diminution de teneur en principe actif (invisible) [29].

Ces phénomènes dont les origines peuvent être très variées comme les problèmes de solubilisation, de complexation, d'oxydo-réduction, d'hydrolyse ou de réactions acide-base ont été bien décrites [30, 31, 32] car elles présentent un risque élevé si un mélange est injecté alors qu'il est incompatible. Un autre type d'incompatibilité est une cause physique se manifestant par l'adsorption du médicament sur son contenant ou la désorption de celui dans la solution médicamenteuse.

La photodégradation est une réaction chimique catalysée par la lumière et provoque une décomposition du principe actif suite à un réarrangement moléculaire [29].

Certains médicaments sont à conserver à l'abri de la lumière comme la Cordarone® [4] et d'autres comme l'Adalat® nécessitent même d'être protégés durant la perfusion à l'aide de tubulures noires.

Le pharmacien effectue aussi une réflexion théorique par rapport aux propriétés physico-chimiques du principe actif qui permet parfois de prévoir telle ou telle réaction lors d'administration simultanée. Ainsi l'amiodarone, possédant un pH de environ 3-3,5 est un médicament acide qu'il faut donc éviter de mélanger avec une base. Par ailleurs, sa solubilité est moindre et le fabricant est obligé d'y ajouter du polysorbate 80 comme co-solvant afin de

faire une forme injectable. De ce fait les réactions de cette préparation lors de dilutions sont donc peu prévisibles surtout si on y ajoute un autre principe actif lors d'un mélange. La vigilance contre une éventuelle précipitation due à cette solubilité réduite, est donc de rigueur.

On considère qu'un mélange de médicaments est stable s'il n'y a pas de dégradation visuelle, pas de formation de produits de dégradation toxiques, ni une perte supérieure à 10% du principe actif sur la durée escomptée. Si le moindre changement visuel apparaît on considère que le mélange est incompatible pour des raisons de sécurité.

Il faut toujours favoriser la prudence en cas d'absence de données ou de réponses ambiguës.

Les conséquences de tous ces phénomènes peuvent être une obstruction des cathéters, une perte d'efficacité du traitement, la formation de dérivés toxiques, un risque d'embolie potentiellement mortelle, voire le dépôt de cristaux dans certains organes .

Tout ceci pouvant être dommageable pour le patient.

I.3 UNE METHODE : HPLC

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC), constitue l'une des méthodes séparatives largement employées dans le domaine de l'analyse pharmaceutique. La chromatographie liquide a connu un développement considérable depuis la mise au point du procédé initial par Tswett en 1906, notamment depuis l'apparition des pompes à haute pression.

Cette méthode permet la séparation et la quantification de composés en solution élués à travers une colonne chromatographique à l'aide d'une phase mobile liquide, elle-même percolée grâce à une pression élevée.

Les phénomènes de séparation mis en jeu sont très divers (partage, adsorption..) et il existe une réelle interaction triple entre l'analyte, la phase stationnaire et la phase mobile basée sur des affinités physico-chimiques entre les trois [33].

De plus la commercialisation d'un grand choix de colonnes et la multitude des phases mobiles possibles rendent cette technique très sélective.

Contrairement à la chromatographie en phase gazeuse, il n'existe pas de détecteur universel en HPLC. Souvent ce sont des spectrophotomètres UV-vis qui sont couplés aux colonnes chromatographiques, notamment des appareils à barrettes de diodes qui permettent d'obtenir le spectre complet du composé analysé [34].

La chromatographie en phase inverse est basée sur l'inversion de polarité des phases.

Ainsi la phase stationnaire est généralement constituée de silice greffée. Précisément, la silice (Si), à l'origine un matériau très polaire grâce à ses groupements silanols, subit une réaction de silanisation à l'aide de groupements apolaires hydrophobes de différentes longueurs possibles. Toutefois la silice ne peut pas être greffée à 100%, il reste donc toujours certains silanols polaires libres (environ 20%), dont la polarité dépend directement du pH de la phase mobile et qui engendrent des interactions secondaires non désirées avec le composé, selon la nature de celui-ci.

La phase mobile est un mélange hydro-organique de nature plus polaire que la phase stationnaire. Selon ce principe, en chromatographie en phase inverse, les composés polaires seront élués en premier.

L'analyse d'une base est assez délicate car si l'on souhaite obtenir principalement des interactions hydrophobes avec la silice greffée, la base étudiée devrait se trouver sous forme moléculaire ce qui nécessiterait de travailler à $\text{pH} = \text{pK}_a + 2$. Or cela dépasse souvent largement le domaine de stabilité des colonnes courantes, compris entre $\text{pH} = 2$ et $\text{pH} = 8$.

Pour pallier ce problème il faut travailler en milieu acide où la base se retrouve alors sous forme cationique.

Une deuxième possibilité est d'utiliser une colonne spécialement adaptée à l'analyse des bases comme la *C18 Nucleodur gravity*.

La colonne *Nucleodur gravity C18 (125x4) 5 μ m* est une colonne dite spéciale base car elle permet l'analyse des composés basiques même à des pH très élevés. La colonne utilisée est en effet garantie par le fabricant jusqu'à pH 11.

Elle est aussi appelée colonne désactivée car elle est greffée, mais à l'intérieur des chaînes C18 sont intercalés des motifs polaires bloquant l'accès aux silanols résiduels empêchant ainsi des interactions ioniques supplémentaires. Ce sont donc principalement les interactions hydrophobes qui ont lieu et permettent ainsi la rétention spécifique du composé à séparer.

Définitions

La recherche des meilleures conditions de dosage se fait en faisant varier différents paramètres (pH du tampon, proportion de solvant organique) et en observant les réponses induites en fonction de ces changements. Pour cela il s'agit d'étudier les chromatogrammes obtenus et de calculer un certain nombre de facteurs importants en analyse HPLC [33, 34].

Ainsi, après l'injection d'un produit, celui-ci sera élué de la colonne après un certain temps correspondant au temps de rétention (t_r) qui est propre à chaque composé pour une colonne donnée et dans des conditions spécifiques fixées.

Ce temps permet de calculer différents autres paramètres tels que :

- le *facteur de rétention* (k') qui renseigne sur la rétention d'un composé mais en permettant de s'affranchir des paramètres géométriques de la colonne, sa valeur est idéalement comprise entre 1 et 10. Des faibles valeurs de k' indiquent que le composé est peu retenu et inversement ;
- le *nombre de plateaux théoriques* (N) correspondant à l'efficacité de la colonne c'est-à-dire son pouvoir de séparation, ainsi plus N est élevé plus la colonne est efficace. Il se calcule avec des formules différentes si le pic est de forme gaussienne ou non, toutefois si on veut s'affranchir de la géométrie de la colonne il faut utiliser la hauteur équivalente de plateaux théoriques (HEPT) qui divise la longueur de la colonne par le nombre de plateaux;
- le *facteur d'asymétrie* (f) renseignant sur l'allure et la symétrie du signal obtenu, ainsi si le pic est parfaitement symétrique $f=1$ mais on tolère une certaine marge car les pics sont généralement toujours de forme asymétrique à cause des interactions supplémentaires entre le composé et la phase stationnaire sur laquelle il reste quelques groupes silanols libres malgré un greffage avec des chaînes C18 ou encore des problèmes de solubilité ou de distribution non linéaire entre les deux phases (cf. théorie);
- la *sélectivité* (α) représente la séparation entre deux composés sur une colonne donnée. Elle est le rapport entre leur facteurs de rétention respectifs, pour obtenir une bonne séparation la sélectivité doit être supérieure à 1. Ce paramètre entre dans la définition de la résolution;
- la *résolution* (R_s) dépendant de trois facteurs (α , k' et N) indiquant à quel degré deux produits sont séparés et distincts sur le chromatogramme, une résolution supérieure à 1,5 indique une séparation complète entre les deux analytes.

Voir les formules en annexe p60

I.4 BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. J. Kudenchuk and coll. Amiodarone for resuscitation after out-of-hospital cardiac arrest due to ventricular fibrillation, *The new England Journal of Medicine*, 341: 871-79 (1999).
- [2] M. Hughes, A. Binning. Intravenous amiodarone in intensive care: time for reappraisal ?, *Intensive Care Med*, 26: 1730-39 (2000).
- [3] AHFS Drug Information. G. K. McEvoy, Bethesda, 2003.
- [4] Sanofi. Cordarone l'antiarythmique complet, Information scientifique du fabricant.
- [5] L.C. Hadaway, Anatomy and physiology related to intravenous therapy. In J. Hankins & coll., *Infusion therapy in clinical practice*, 2nd edition, Philadelphia, 2001, pp. 65-89 .
- [6] J. Calop and coll. Administration des médicaments : voie intraveineuse. Dans P.A Sado, *Pharmacie clinique générale*, Paris, 1990, pp. 81-95.
- [7] D. Fishman. L'arrêt cardiorespiratoire, *Médecine &Hygiène* 2362: 1911-19 (2001).
- [8] M.SS. Chow. Intravenous amiodarone: pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use, *The Annals of Phamacotherapy*, 30: 637-43 (1996).
- [9] *Pharmacopée Européenne*. Conseil de l'Europe, 4e édition, Strasbourg, 2002.
- [10] *The Merck Index*. M. J. O'Neil, 13th edition, Whitehouse station, 2001, p. 84.
- [11] Site internet : Sci finder Scholar
- [12] *Australian Injectable Drugs Handbook*. First Edition, South Melbourne, 1997, p.27.
- [13] L. A. Trissel. *Handbook on Injectable Drugs*. C. Reilly, 11th edition, Bethesda, 2001, p.97.
- [14] Société Suisse des Pharmaciens de l'Administration et des Hôpitaux. Questionnaire sur les spécialités pharmaceutiques: Cordarone, Labaz Sanofi Pharma AG, Bâle, 1982.
- [15] M. Lagler, C.Elène et I, Arnet. *Compendium Suisse des Médicaments*, J. Morant et H. Ruppanner, Documed SA., 24^e édition, Bâle, 2003, pp. 582-583.

- [16] N. Goldschlager and coll. Practical guidelines for clinicians who treat patients with amiodarone, *Arch Intern Med.* 160: 1741-1748 (2000)
- [17] S. J. Weir, V.A. Szucs Myers, K.D. Bengtson and C.T. Ueda. Sorption of amiodarone to polyvinyl chloride infusion bags and administration sets, *American Journal of Hospital Pharmacy*, 42: 2679-2683 (1985).
- [18] Y.V. Pramar. Chemical stability of amiodarone hydrochloride in intravenous fluids, *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, vol.1 No.5: 347-8 (1997).
- [19] S. Campbell, P.E. Nolan, Jr., M. Bliss, R. Wood and M. Mayersohn. Stability of amiodarone hydrochloride in admixtures with other injectable drugs, *American Journal of Hospital Pharmacy*, 43: 917-20 (1986).
- [20] N. Hanioka and coll. High-performance liquid chromatographic assay for amiodarone N-deethylation activity in human liver microsomes using solid-phase extraction, *Journal of chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 74 (1): 105-13 (2002).
- [21] M.C. Nahata. Stability of amiodarone in an oral suspension stored under refrigeration and at room temperature, *The Annals of Pharmacotherapy*, 31: 851-2 (1997).
- [22] T. A. Plomp and coll. Simultaneous determination of amiodarone and its major metabolite deethylamiodarone in plasma, urine and tissues by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography*, 273: 379-392 (1983).
- [23] L.J. Lesko and coll. High-pressure liquid chromatography of amiodarone in biological fluids, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol.70, No.12, (1981).
- [24] A. M. Di Pietra, V. Cavrini, R. Gatti and M. A. Raggi. Determination of amiodarone hydrochloride in pharmaceutical formulations by derivative UV spectrometry and High-performance liquid chromatography, *Pharmaceutical Research*, vol.5, No. 11, (1998).
- [25] King Guide to Parenteral Admixtures, CD Rom 2003. Et [http:// www. kingguide.com](http://www.kingguide.com).
- [26] G. R. Hasegawa and J. F. Eder. Visual compatibility of amiodarone hydrochloride injection with other injectable drugs, *American Journal of Hospital Pharmacy*, 41: 1379-1380 (1984).

- [27] L.V. Allen, Jr and M.L. Stilles. Compatibility of various admixtures with secondary additives at Y-Injections sites of intravenous administration sets. Part 2 , American Journal of Hospital Pharmacy, 38: 380-1 (1981)
- [28] M. Gikic, E.R. DiPaolo, A. Pannatier and J. Cotting. Evaluation of physicochemical incompatibilities during parenteral drug administration in a paediatric intensive care unit, Pharm World Sci, 22(3): 88-91 (2000).
- [29] A.-M. Sautter. Cours pharmacie HUG: Incompatibilités physico-chimiques, Genève, 2002.
- [30] I. Grenet, G. Hazebroucq, Incompatibilités physico-chimiques des médicaments injectables : considérations pratiques, Thérapie, 50 : 191-5 (1995).
- [31] M. Hoffman, G. Hazebroucq. Incompatibilités physico-chimiques des médicaments injectables. Dans J.P Giroud & coll., Pharmacologie clinique bases de la thérapeutique, 2e édition, Paris, 1988, pp. 171-177.
- [32] P.Bonnabry. Cours pharmacie HUG : Introduction à la pharmacie Hospitalière, Genève, 2003.
- [33] J.-L. Veuthey, S. Rudaz. Cours d'analyse pharmaceutique: module méthodes séparatives, 1^{ère} édition, Genève, 2002.
- [34] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler. Chimie analytique, De Boeck & Larcier s.a., 7^e édition, Paris, Bruxelles, 1997, pp. 701-707.
- [35] J. Caporal-Gautier et coll. Guide de validation analytique, Rapport d'une commission SFSTP, S. T. P. Pharma pratiques 2 (4) : 205-226, (1992).
- [36] S. Rudaz. Cours : validation d'une procédure analytique, Genève, 2003.
- [37] N. Paillous and M. Verrier. Photolysis of amiodarone, an antiarythmic drug, Photochemistry and Photobiology (47): 337-343, (1988).
- [38] D. E Moore. Standardization of photodegradation studies and kinetic treatment of photochemical reactions. In H. H. Tonnesen, Photostability of drugs and drugs formulation, London, 1996, pp. 74-76

II. PARTIE EXPERIMENTALE

II.1 MATERIEL ET METHODES

II.1.1 Produits

Le principe actif utilisé: chlorhydrate d'amiodarone (>98%), lot n° 061K1807 provient de Sigma-Aldrich GmbH, 59552 D-Steinheim.

La forme médicamenteuse testée est la Cordarone® dosée à 50mg/ml d'amiodarone, elle est distribuée par Sanofi-Synthelabo SA, 1217 Meyrin (Ge). Un lot unique (n°826) est utilisé pour l'étude.

Le polysorbate 80 EP 4 employé pour faire la formulation reconstituée est le lot n° 0000114965 de Schweizerhall Chemie AG, 4013 Bâle alors que l'alcool benzylique de lot n° 988797 provient de la maison Siegfried.

Les solvants d'analyse utilisés sont l'acétonitrile pour HPLC, lot n° 055391236 de Merck KGaA, 64271 Darmstadt ainsi que le lot S 13620-402 de qualité supérieure (>99,93%) de Sigma Aldrich, 89555 D-Steinheim ; le méthanol utilisé dans la mise au point est le lot K 31516209 250 provenant de Merck KGaA 64271 Darmstadt.

Le Glucose utilisé pour les dilutions dans les échantillonnages est du Glucose 5% à 278 mmol/l , lot n° 03012010 et vient de Bioren SA, Couvet NE.

Le tampon phosphate 26,5 mM a été préparé en dissolvant 3,61 g de dihydrogène phosphate de potassium, lot n° 4873.1000 (Na₂HPO₄) provenant de Merck KGaA, 64271 Darmstadt ; dans 1 l d'eau Millipore et le pH a été ajusté à la valeur désirée avec de l'acide phosphorique concentré à 85% de lot 9007T016 de Siegfried Handel, 4800 Zofingen. Il est ensuite filtré sous vide sur des filtres de 0,45µm , lot H2CN11546 de Millipore Corporation Bedford MA 01730.

La phase mobile est préparée en mélangeant 50.0% d'acétonitrile et 50% de tampon phosphate à pH 2,5 puis dégazée sous vide et dans un bain à Ultrasons .

II.1.2 Instruments

- Le système de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est le modèle Hitachi D-7000, constitué par une pompe L-7100, un injecteur automatique L-7200, un détecteur diode array L 7455, le tout provenant de la maison Merck.
- La colonne séparative utilisée est une colonne C18 Nucleodur gravity 125×4 (5µm) spéciale base.
- Le bac à ultrasons est un Bransonic MT-CE de VWR international.
- Le pH est réglé grâce au pH-mètre Metrohm 691.
- La lampe UV pour l'étude de dégradation accélérée est une lampe à ultraviolet classique de Camag éclairant à 254 ou 366nm.
- Le projecteur à filtre polarisant provient de IST-AG, 5430 Wettingen.
- La hotte à flux laminaire horizontal provient de la maison SKAN.
- Les spectres UV sont réalisés grâce au spectrophotomètre UV-vis Perkin Elmer Lambda 20.
- Les balances analytiques utilisées sont des modèles de Mettler Toledo AT-261 et PR-5002 Delta Range.

II.1.3 Mise au point de la méthode et optimisation des conditions

Des recherches d'optimisation sont effectuées afin de trouver la meilleure composition de la phase mobile et de trouver la longueur d'onde de détection la plus satisfaisante pour le dosage de l'amiodarone.

Le travail s'élargit avec l'étude de l'influence du Tween sur le dosage et une étude de spécificité.

D'après nos résultats, les conditions chromatographiques optimales sont les suivantes :

La phase mobile composée d'acétonitrile – tampon phosphate 26,5mM à pH=2,5 en proportion (50,0 :50) a un débit de 1,5 ml/min et est dégazée aux ultrasons sous vide à l'aide d'une pompe à eau. La longueur d'onde de détection optimale de l'amiodarone a été déterminée à 206nm, le volume injecté est de 20µl, la pression de l'appareil est environ 135 bars et tous les essais sont effectués à température ambiante.

II.2 VALIDATION ET ROBUSTESSE DE LA METHODE

II.2.1 Validation

Le but de valider la méthode est de démontrer que celle-ci est adaptée à l'usage pour lequel elle est prévue. Son objectif est de prouver que les résultats qu'elle permet d'obtenir sont fiables.

Dans une phase de validation il est vérifié la linéarité (capacité d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration), l'exactitude (accord entre la valeur théorique exacte et la valeur obtenue) et la fidélité. Cette dernière est évaluée par la répétabilité et la fidélité intermédiaire.

Cette partie de l'étude permet donc de valider la méthode d'analyse mise au point précédemment. Elle s'effectue sur trois jours et permet de vérifier la linéarité, l'exactitude et la précision de la méthode. Ces critères sont évalués chaque jour grâce aux solutions fraîches suivantes :

- 1) 5 standards de calibration de 50, 75, 100, 125 et 150% de solution reconstituée (Std)
- 2) 5 solutions de 50, 75, 100, 125 et 150% de formulation médicamenteuse du commerce (Rdf)
- 3) 6 solutions nominales de 100% de formulation médicamenteuse du commerce (fidélité)

Les standards de calibration sont constitués par une solution de formulation reconstituée et non par une solution aqueuse de principe actif car à la suite d'une première validation effectuée de la sorte, il est apparu que le PA aqueux ne convient pas pour doser l'ampoule, dû à un effet de matrice.

Il a été démontré qu'il est nécessaire de doser les ampoules de Cordarone® à l'aide d'un standard constitué par une formulation reconstituée de Cordarone® de composition identique à celle des ampoules.

La préparation de toutes les solutions de validation est détaillée en annexe p 61 à 63.

II.2.2 Robustesse

L'étude de la robustesse d'une méthode permet de définir les variations admissibles des paramètres opératoires critiques qui sont sans effet sur la validité des résultats fournis.

L'étude se fait grâce à la technique des plans factoriels qui permet de faire varier plusieurs paramètres en même temps et d'observer aussi les interactions entre eux.

Dans la présente étude un plan 2^3 est utilisé permettant de tester trois paramètres A, B, C et leurs interactions deux à deux.

II.2.2.1 Paramètres variables

Les trois paramètres variables choisis sont :

- le pH du tampon phosphate (A)
- le pourcentage d'acétonitrile (B)
- la concentration molaire du tampon phosphate (C)

Tableau 1 : Valeurs codées des paramètres

	A <i>pH</i>	B <i>%ACN</i>	C <i>Conc. Tampon [mM]</i>
Valeur haute (+)	2,3	45	29
Point central (0)	2,5	50	26,5
Valeur basse (-)	2,7	55	24

La variation appliquée est de $\pm 10\%$ pour chaque paramètre.

II.2.2.2 Plan d'expériences complet à trois variables

Ce plan étudie la variation de trois paramètres ce qui représente huit essais (2^3).

Tableau 2: Paramètres étudiés

Systèmes		Paramètres		
		PH	% ACN	Conc. Tampon
1	A+ / B+ / C+	2,7	55	29
Point central	A0 / B0 / C0	2,5	50	26,5
2	A+ / B+ / C-	2,7	55	24
3	A+ / B - / C -	2,7	45	24
Point central	A0 / B0 / C0	2,5	50	26,5
4	A - / B + / C+	2,3	55	29
Point central	A0 / B0 / C0	2,5	50	26,5
Point central	A0 / B0 / C0	2,5	50	26,5
5	A - / B - / C+	2,3	45	29
6	A - / B - / C-	2,3	45	24
Point central	A0 / B0 / C0	2,5	50	26,5
7	A - / B + / C -	2,3	55	24
Point central	A0 / B0 / C0	2,5	50	26,5
8	A+ / B - / C+	2,7	45	29

II.3 PARAMETRES DE L'ETUDE DE STABILITE

II.3.1 Introduction

Il est demandé d'étudier la **stabilité physico-chimique** des différents échantillons préparés selon le plan ci-dessous.

La même étude de stabilité sera appliquée pour les 3 parties.

- La première étude est une évaluation visuelle des solutions afin d'observer d'éventuels changements (précipitation, dégagement gazeux, changement de coloration,) à laquelle s'ajoute des mesures de pH pour voir son évolution.

On étudiera l'influence de la lumière (naturelle) pendant le stockage pour voir si, comme il est précisé dans la littérature [37, 38] le principe actif se dégrade au cours du temps dans ce conditionnement différent du conditionnement initial en ampoule à 150 mg/ml et aussi l'influence de la température de conservation (4° et T° ambiante).

- Pour évaluer les phénomènes chimiques non visibles, un dosage analytique de l'amiodarone est prévu afin de comparer les concentrations obtenues à des intervalles de temps précis avec une concentration initiale à t_0 correspondant à 100% du principe actif et servant de témoin. L'observation devra être effectuée sur une longue durée (6 mois max.) car il serait souhaitable de pouvoir stocker ces seringues le plus longtemps possible sans avoir de dégradation.

On tolère une perte de 10% de principe actif au cours de la durée d'expérience fixée, pour autant que les éventuels composés de dégradation ne soient pas toxiques.

Pratiquement, deux distinctions sont faites lors de l'étude des échantillons.

- Tout d'abord les phénomènes physiques sont observés : Ainsi pour chaque lot, dès le début a lieu une observation visuelle des solutions sur fond blanc et sur fond noir à la lumière polarisée et aussi à la lumière indirecte. Les moindres changements: dégagement gazeux, changement de coloration, apparition d'un trouble ou d'un précipité...sont notés.

Le témoin de référence est une ampoule de Cordarone®, conservée dans les conditions optimales selon le fabricant, c'est à dire: à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'ampoule est fraîchement ouverte à chaque intervalle de temps.

- Puis les phénomènes chimiques sont évalués: en prenant premièrement une mesure du pH de la solution. La comparaison est toujours effectuée à l'aide de la même ampoule de référence.

Et dans un deuxième temps en dosant quantitativement par HPLC l'amiodarone présente dans les seringues avec observation de l'apparition d'éventuels produits de dégradation sans identification de ceux-ci.

II.3.2 Préparation des lots d'échantillons et des dosages

Comme il a été dit plus haut, l'étude de stabilité comprend une évaluation physique (visuelle) et chimique (dosage HPLC et pH) ; cela est effectué sur une période plus ou moins longue selon les exigences de chaque partie.

II.3.2.1 Partie 1

Pour obtenir des résultats cliniques de long terme, la durée de l'étude prévue pour cette première partie étant de 6 mois (180j), il s'agit de prévoir un nombre suffisant d'échantillons, même si le temps imparti pour le travail de diplôme nous permet de suivre l'étude de stabilité uniquement sur une période de 30 jours.

Les solutions prêtes à l'emploi fabriquées dans cette première partie, sont conditionnées dans des seringues opaques de 60 ml ou des transparentes de 10 ml. Elles sont de même concentration (50mg/ml) et de même volume (6ml). Elles sont constituées de 2 ampoules de Cordarone® non diluées et conditionnées dans la seringue adéquate selon le lot, dans des conditions aseptiques sous flux laminaire horizontal.

Il est vrai que la concentration initiale de chaque seringue n'est pas exactement identique car il s'agit de faire une seringue par lot et par intervalle de temps de prélèvement, ce qui est contraire à une étude de stabilité et de dosage habituelle où les prélèvements successifs sont effectués à partir d'une seule et même solution mère. Mais dans cette partie il n'a pas été possible de faire autrement car le volume approximatif nécessaire pour un jour d'étude est d'environ 3ml, or selon les spécifications et les exigences du travail (300 mg/ 6ml), la solution contenue dans les seringues devait être de 6ml et pas plus, donc une seringue eu été suffisante pour réaliser seulement deux dosages (2*3ml) mais il a été préféré fabriquer une seringue unique par jour d'étude, par sécurité et aussi afin d'uniformiser la réalisation des conditions de prélèvement et de dosage.

Pratiquement :

➤ *Préparation des échantillons:*

Chaque seringue est confectionnée en prélevant la totalité de 2 ampoules de Cordarone® à 150mg / 3ml pour donner une concentration finale d'amiodarone de 50mg/ml par seringue prête à l'emploi.

Nous allons étudier l'influence des paramètres température et lumière sur les seringues.

Pour cela 3 lots de 10 seringues chacun seront produits et conservés durant toute l'étude dans des conditions différentes.

Lot A : lumière naturelle, température ambiante (fenêtre)

Lot B : à l'abri de la lumière, à 4°C (frigo)

Lot C : à l'abri de la lumière, à température ambiante (placard)

➤ *Etude des échantillons:*

Chaque lot sera soumis à une étude de stabilité physico-chimique comme indiqué plus haut.

Les observations et mesures seront effectuées aux intervalles de temps suivants:

t = 0, 1j, 2j, 4j, 7j, 14j, 21j, 30j, 60j, 90, 180j.

Les seringues du lot A sont transparentes et celles des lots B et C sont opaques.

Durant la période effective du travail de diplôme, seuls les temps $t \leq 30$ j seront analysés.

Avant d'effectuer le dosage proprement dit des échantillons des lots A, B et C il s'agit de préparer les standards Rdf (reconstituted dosage form) permettant de tracer la droite de calibration et de recalculer les concentrations obtenues.

Pour cela, chaque jour de dosage, une nouvelle solution Rdf est constituée en mélangeant l'amiodarone et ses excipients selon la même formule qu'une ampoule de Cordarone® mais diluée 100 fois (Cf. formule en annexe) pour être dans le domaine analytique. Cette solution mère de Rdf est à nouveau diluée directement dans des vials de façon à obtenir les concentrations de calibration désirées. Le domaine de calibration choisi est le même que celui de la validation mais pour la phase de dosage, la droite de standards est constituée uniquement des trois points 50, 100 et 150% correspondant à 50, 100 et 150 µg/ml.

D'autre part, une solution mère de référence est constituée par une ampoule de Cordarone® fraîchement ouverte et diluée à la même concentration que la solution Rdf soit 0,5 mg/ml; puis une nouvelle fois diluée à 100 µg/ml. Cette référence nous permet de vérifier le dosage exact d'une ampoule censée être à 100% et nous permet ainsi de ramener toutes les concentrations obtenues pour chaque solution à cette valeur de référence.

Par exemple si une ampoule (référence) est dosée à 108% c'est cette valeur qui servira de 100% pour les calculs. Il faut préciser que le fabricant possède une marge de 85 à 115% selon les normes de la pharmacopée concernant les solutions injectables [9] et n'est donc pas tenu de mettre 100.00% d'amiodarone dans les ampoules. Donc si l'on retrouve 108% cela ne veut pas forcément dire que notre standard surdose les résultats mais c'est que le fabricant a effectivement lui-même surdosé ces ampoules de 8% de produit. De toute façon c'est cette valeur qui servira à calculer le 100% de départ.

Les échantillons des seringues des lots A, B et C sont dilués de la même façon, une première fois en solution mère à 0,5 mg/ml puis en solution fille d'analyse à 100 µg/ml. (Cf. annexe p64)

II.3.2.2 Partie 2

La deuxième partie ne contenant pas de restriction au niveau du volume et de la nature du conditionnement, on procède à une étude classique de stabilité et de dosage de six dilutions différentes sur 48h dans trois conditions de stockage différentes. Ainsi un volume nécessaire à l'étude sur deux jours est conditionné dans des seringues de 60 ml à partir desquelles sont effectués les prélèvements de 3ml à chaque jour de dosage et d'observation.

La concentration initiale est unique à l'intérieur d'un même lot.

Le problème abordé ici est celui de la **dilution** de la solution injectable de Cordarone®.

En effet selon le fabricant la solution injectable doit être diluée de la façon suivante: deux ampoules de 3ml à 150mg/ml dans 500ml minimums de glucose 5% ce qui correspond à une concentration maximale de **0,6 mg/ml**. Or dans la pratique courante des SIM pour des cas d'arythmies graves, on peut utiliser des concentrations de 450mg, 600mg et 1200mg/48ml. Ce qui correspond respectivement à **9,375; 12,5 et 25 mg/ml** d'amiodarone. Or on ne possède aucune donnée concernant la stabilité des solutions à ces concentrations.

Le même travail d'étude de stabilité physico-chimique que dans le point 1) sera donc à effectuer mais sur une période de 2 jours par sécurité car dans la pratique hospitalière les solutions des pousse-seringues sont de toute façon remplacées toutes les 24h.

Que se passe-t-il pour des concentrations allant de 0,6 mg/ml à 25 mg/ml ? Six concentrations sont donc choisies dans la fourchette de 0,6 à 25 mg/ml afin d'avoir un intervalle à peu près homogène entre les concentrations.

Pratiquement :

➤ *Préparation des échantillons:*

Pour chaque concentration trois lots sont constitués pour voir l'influence des mêmes paramètres que précédemment. Soit:

Lot D : lumière naturelle, température ambiante (fenêtre)

Lot E : à l'abri de la lumière, à 4°C (frigo)

Lot F : à l'abri de la lumière, à température ambiante (placard)

Ces solutions diluées sont destinées à être injectées directement au patient, donc lors de la perfusion seule la lumière peut jouer un rôle, à savoir : faut-il protéger le produit, durant sa conservation certes, mais aussi durant la perfusion à l'aide de tubulures opaques ? (lots D et F). Alors que la température ne peut pas jouer de rôle durant la perfusion car celle-ci se fait automatiquement à température ambiante. Toutefois il arrive que dans un service de soins, une infirmière prépare le traitement mais ne l'administre pas immédiatement. Donc l'intérêt du lot E serait de définir s'il est nécessaire de conserver la solution diluée au frais entre le moment de la dilution et le moment de l'administration.

Chaque lot comprendra 6 solutions (=6 seringues) de concentration croissante obtenues par dilution d'ampoules de Cordarone® soit:

$$C_a = 0,6 \text{ mg/ml}$$

$$C_b = 5 \text{ mg/ml}$$

$$C_c = 9,375 \text{ mg/ml}$$

$$C_d = 12,5 \text{ mg/ml}$$

$$C_e = 18,75 \text{ mg/ml}$$

$$C_f = 25 \text{ mg/ml}$$

➤ *Etude des échantillons:*

Les observations et mesures seront effectuées aux intervalles de temps suivants:

t = 0, 8h, 24h, 48h.

Les seringues du lot D sont transparentes et celles des lots E et F sont opaques. L'échantillon du t_0 est constitué d'une seule solution fraîchement préparée à partir d'une ampoule ouverte et diluée à la concentration d'analyse de 0,1 mg/ml et directement injectée et dosée. C'est donc la même solution pour D, E et F mais elle est injectée six fois.

Comme dans la première partie avant chaque dosage, un Rdf est constitué selon la même procédure. Pour ces dosages un deuxième Rdf est ajouté à chaque fois ainsi qu'une solution référence de Cordarone® diluée à 0,1 mg/ml (100%) comme dans la première partie.

Chaque solution de concentration spéciale des seringues est diluée à 0,1 mg/ml avant d'être dosée (cf. annexe p64-65).

II.3.2.3 Partie 3

Le troisième volet du travail traite des **incompatibilités** physico-chimiques de la Cordarone® avec plusieurs **autres médicaments**: en effet les patients des SIM sont souvent polymédiqués et on ne dispose pas toujours d'une voie veineuse différente pour chaque médicament injectable. On a donc souvent recours à les administrer simultanément, en Y, dans la même veine.

➤ *Préparation des échantillons:*

Après étude de la bibliographie, il apparaît inutile de tester le mélange avec l'héparine car celle-ci est incompatible. Nous aurons donc 7 médicaments à tester.

L'étude d'incompatibilité physico-chimique est effectuée selon le protocole utilisé en routine au laboratoire de Contrôle Qualité de la pharmacie des HUG. Ce document interne résultant d'une synthèse bibliographique des différentes méthodes utilisées dans divers laboratoires a été rédigé par C. Sierro [Tests d'incompatibilités physico-chimiques, 1994].

Dans chaque série, chaque médicament est testé à sa (ses) concentration(s) clinique(s) habituelle(s). La concentration clinique thérapeutique est nommée M, son double est donc 2M. Différentes proportions de chacune d'elle sont testées car très souvent la concentration du médicament à administrer change rapidement, dû à une modification de posologie décidée par le médecin en fonction de l'évolution de l'état général du patient.

L'étude d'incompatibilité physico-chimique est basée sur une visualisation de la stabilité de différentes solutions obtenues par mélange du médicament (X) à tester (ici X=Cordarone®) avec les principes actifs (Y) auxquels on souhaite l'associer. Les différentes solutions sont obtenues par mélange des deux constituants à diverses concentrations.

Il a été décidé d'effectuer deux séries d'étude (A et B), chacune comprenant une concentration extrême de Cordarone® soit :

Série A : $C_A = 0,6 \text{ mg/ml}$: concentration recommandée par le fabricant

Série B : $C_B = 25 \text{ mg/ml}$: concentration maximale utilisée aux SIM

Les dilutions effectuées sont les suivantes :

- 2MS = solution pure de la concentration 2M du médicament Y
- 2M (1 :1) = solution contenant 50% de Y à sa concentration 2M et 50% de X
- M (1 :1) = solution contenant 50% de Y à sa concentration M et 50% de X
- M (4 :1) = solution contenant 80% de Y à sa concentration M et 20% de X
- M (1 :4) = solution contenant 20% de Y à sa concentration M et 80% de X

(Voir les détails en annexe p65)

Ainsi pour chaque mélange de Cordarone® avec un principe actif, il est nécessaire de juger la stabilité de cinq solutions. Comme il a été dit plus haut, sept principes actifs sont testés mais la norépinéphrine étant couramment employée à trois concentrations, en réalité 9 mélanges sont effectués selon le plan décrit en annexe.

Les médicaments entrant dans l'étude sont les suivants :

Tableau 3: identification des principes actifs testés et de leurs concentrations

Principe actif	Nom de spécialité	Concentrations M testées
nitroglycérine	Perlinganit®	1 mg/ml
insuline	Actrapid®	1 u/ml
KCl	Chlorure de potassium 14,9% (Braun)®	1 mmol/ml
norépinéphrine	Artérenol®	100, 200, 500 µg/ml
dobutamine	Dobutrex®	10 mg/ml
midazolam	Dormicum®	10 mg/ml
fentanyl	Fentanyl HUG	10 µg/ml

La préparation des différentes solutions des principes actifs Y ainsi que les références de chaque produit sont reportées en annexe p66.

➤ *Etude des échantillons:*

La stabilité des mélanges est évaluée de façon visuelle à l'œil nu sous lumière polarisée et lumière indirecte aux temps t=0, 5min, 30min, 1h et 24h.

Le pH des solutions 2M est également mesuré à t₀ et t_{24h}.

Vu le temps imparti, il n'est pas possible de procéder à un dosage analytique.

II.4 RESULTATS ET DISCUSSION

II.4.1 Mise au point de la méthode

Un travail de recherche de conditions optimales est commencé en se basant sur la méthodologie classique de mise au point d'une méthode en phase inversée [33]. Cette phase d'optimisation est effectuée en mode manuel sur une autre chaîne HPLC (Modèle Hitachi D-6000 comprenant une pompe L-6200, un détecteur diode array L-4500 et un injecteur manuel).

II.4.1.1 Recherche de composition de la phase mobile

➤ *Influence du pourcentage d'acétonitrile et du pH du tampon*

Neuf systèmes de composition différente sont étudiés afin d'observer l'influence de la quantité d'acétonitrile (variée entre 40 et 70%) et le pH du tampon phosphate (varié entre 2,55 et 7).

Après observation des paramètres chromatographiques R_t , k' , N et Asymétrie des pics d'amiodarone, les conditions optimales pour la composition de la phase mobile sont :

50,0% d'acétonitrile

50% de tampon phosphate 26,5 mM à pH 2,5

II.4.1.2 Recherche des conditions analytiques optimales

➤ *Influence de la longueur d'onde de détection*

Différentes longueurs d'ondes de détection ont été testées : 206, 241, 244 et 270 nm et il ressort que 206nm est la meilleure condition de détection car à cette longueur d'onde le tween n'est pratiquement plus détecté.

➤ *Influence du débit de la phase mobile*

Ce paramètre est évalué avec les variations suivantes : 1 ; 1,2 et 1,5 ml/min.

Avec un débit supérieur (1,5 ml/min) on observe un gain d'efficacité au niveau du temps de rétention de l'amiodarone qui devient beaucoup plus court qui se traduit par une légère perte de plateaux théoriques qui n'est pas significative. Par contre il y a aussi un gain au niveau de l'asymétrie du pic qui devient plus fin. (Cf tableau 35 en annexe p69)

Conclusion :

Les conditions analytiques optimales sont les suivantes :

La phase mobile se compose de :

- 50% d'acétonitrile

- 50 % de tampon phosphate 26,5 mM dont le pH est ajusté à 2,50

Son débit est de 1,5 ml/min

La longueur d'onde de détection jugée optimale est 206nm.

II.4.2 Etude de spécificité

Cette étude comporte deux points: spécificité vis-à-vis des produits de dégradation, spécificité vis-à-vis des excipients de la formulation médicamenteuse.

II.4.2.1 Etude de dégradation accélérée

Méthode :

L'étude consiste à s'assurer que les conditions analytiques choisies permettent bien de séparer le principe actif amiodarone de ses éventuels produits de dégradation. Pour cela une étude de dégradation accélérée est effectuée sur le principe actif amiodarone, en lui appliquant des conditions de stress. En fonction du facteur stressant appliqué on distingue cinq lots, chaque lot comprend 1 ml de solution d'amiodarone à 5 mg/ml produite à partir de l'ampoule de Cordarone diluée, à laquelle on ajoute:

Lot A: 1 ml d'acide chlorhydrique à 2M

Lot B: 1 ml d'hydroxyde de sodium à 2M

Lot C: 1 ml d'eau oxygénée à 0,3%

Lot D: UV 366 nm pendant 4h

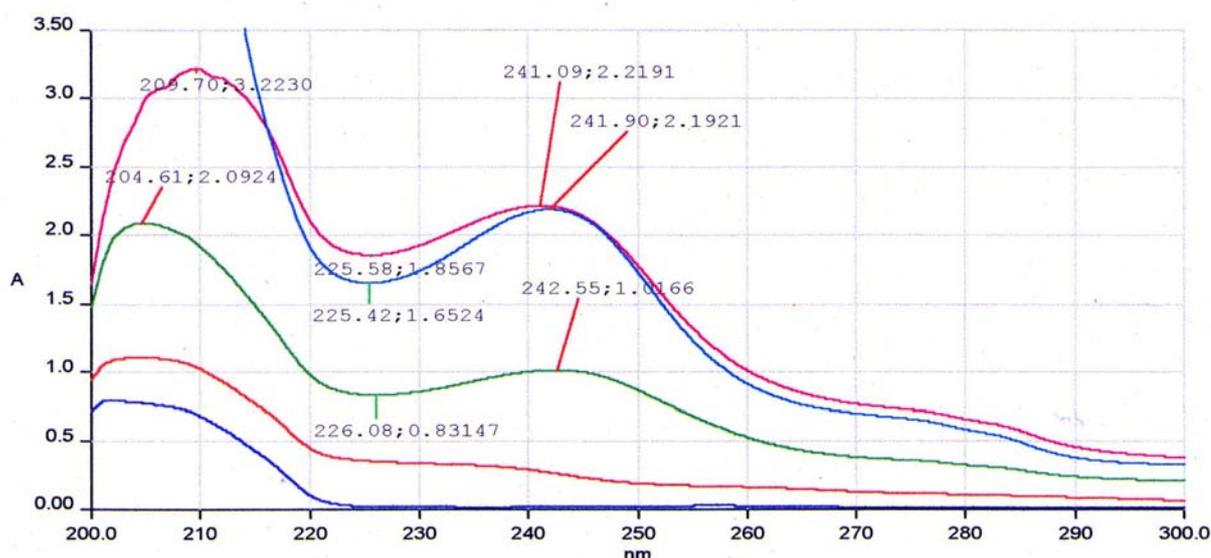
Les lots A à D sont placés 2h au bain-marie à 90°C afin de provoquer le maximum de dégradation possible. Les résultats obtenus sont décrits dans les tableaux suivants. Le premier tableau reflète les résultats obtenus lors de l'évaluation visuelle des solutions stressées et de leur spectre UV réalisé sur le spectrophotomètre en comparaison à celui d'une solution méthanolique d'amiodarone de même concentration.

Résultats :

Tableau 4: résultats visuels de l'étude de dégradation accélérée

Lot	Changements visuels observés	Changement du spectre UV
A	Rien	oui
B	Coloration + précipité orange	oui
C	Trouble blanc	peu
D	Coloration jaune	non

Visuellement toutes les solutions subissent un changement sauf la solution acide, Par contre toutes ne donnent pas forcément une modification du spectre UV alors même qu'elles semblent visuellement dégradées (Cf. figure 2)



bleu : Cordarone (µg/ml) + HCl
rouge : Cordarone (µg/ml) + NaOH
vert : Cordarone (µg/ml) + H2O2
turquoise : Cordarone (µg/ml) référence
rose : Cordarone (µg/ml) + UV

Figure 2 : Spectres UV des produits de dégradation avec comparaison à la référence

C'est pourquoi afin de vérifier l'apparition de produits de dégradation une injection de chacune est réalisée en HPLC et les chromatogrammes sont comparés de façon qualitative uniquement à celui de l'amiodarone pure.

Tableau 5: résultats des observations des chromatogrammes des produits de dégradation

Lot	Observations qualitatives du chromatogramme
A	Disparition complète du pic de l'amiodarone
B	Disparition complète du pic de l'amiodarone + Apparition de produits de dégradation
C	Diminution du pic de l'amiodarone + apparition de produits de dégradation
E	Diminution du pic de l'amiodarone + apparition de produits de dégradation

De nombreux produits de dégradation apparaissent sur les chromatogrammes alors que le spectre UV ne permet pas de les apercevoir ni de les identifier. Toutefois il n'est pas demandé dans notre travail de procéder à l'identification des ces produits secondaires.

La méthode HPLC apparaît donc comme beaucoup plus précise et spécifique que la spectrométrie UV-vis.

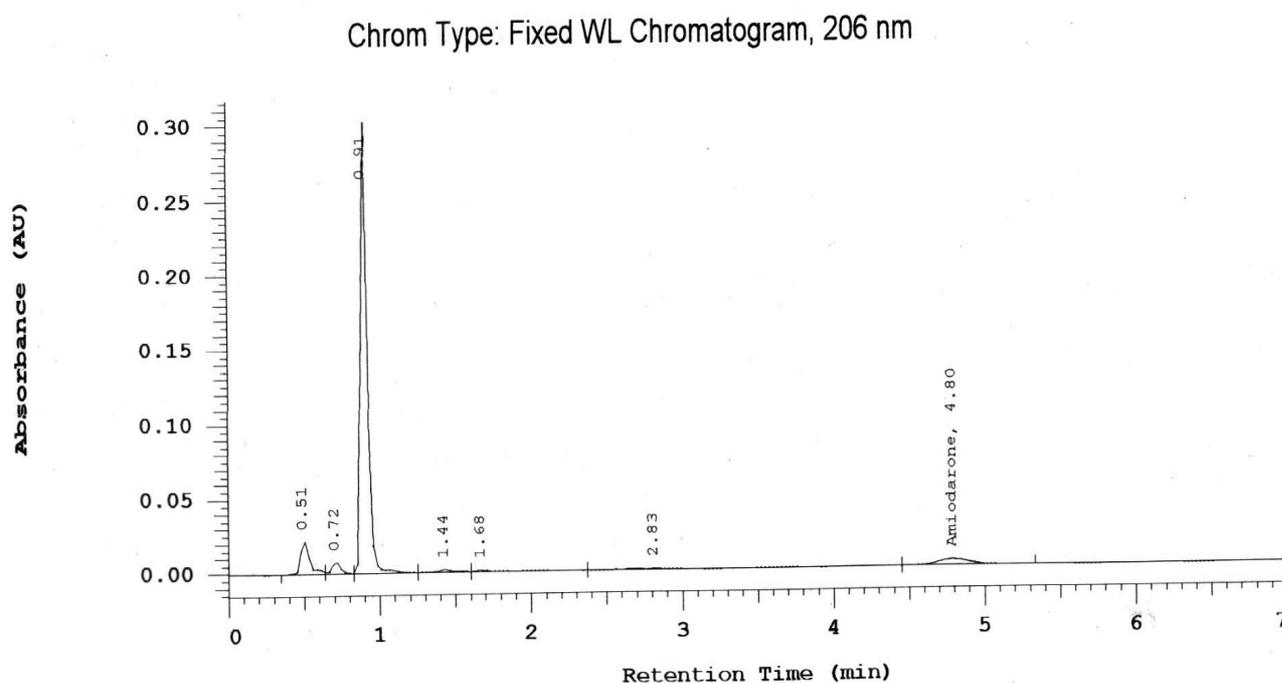


Figure 3 : chromatogramme HPLC de Cordarone® + HCl

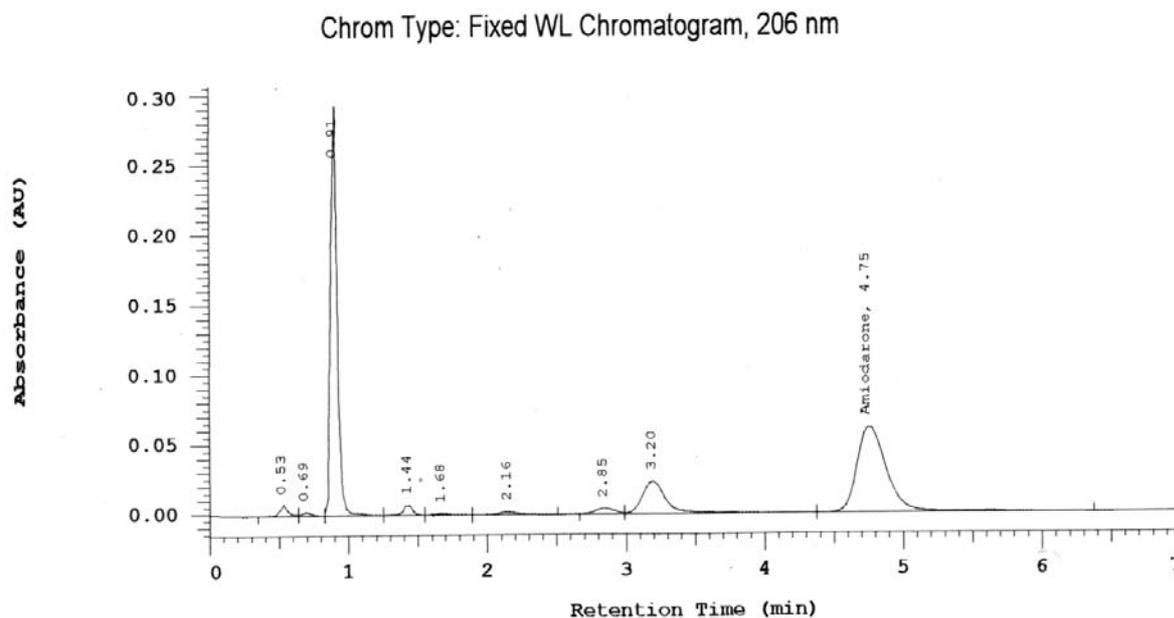


Figure 4 : chromatogramme HPLC de Cordarone® + H₂O₂

D'autre part, après avoir laissé une ampoule de Cordarone® un mois au bord de la fenêtre, le spectre UV et le chromatogramme suivants ont été réalisés afin de prouver qu'il y a effectivement une photodégradation.

(Cf. figures 20 et 21 en annexe p. 70)

II.4.2.2 Etude de spécificité sur la forme médicamenteuse

Méthode :

Afin de voir l'influence des autres constituants de la Cordarone® sur le pic de l'amiodarone, les différents constituants de l'ampoule sont injectés séparément. On prépare pour cela des solutions de concentrations identiques à celles de la formulation commerciale diluée afin de vérifier la provenance des pics chromatographiques observés lorsque l'on injecte de la Cordarone®.

Les différents composants suivants sont injectés :

1. Tween (1 µg/ml)
2. alcool benzylique (0,2 mg/ml)
3. Cordarone® (0,1 mg/ml)
4. phase mobile
5. amiodarone (0,1 mg/ml)
6. mélange Tween + amiodarone (10 :90)
7. mélange Tween + Cordarone® (10 :90)

Pour l'étude de spécificité de la Cordarone®, les différents excipients sont dilués de façon à entrer dans le domaine d'analyse, ainsi on injecte:

- une solution de Tween à 0,1 mg/ml
- une solution d'alcool benzylique à 0,2 mg/ml
- une solution de Cordarone® à 0,1 mg/ml

Résultats :

Aucune interférence avec la phase mobile ni avec l'alcool benzylique, qui sort très tôt, n'est observée. Par contre le Tween semble poser un problème: en effet il sort à peu près au même endroit que le principe actif amiodarone. Ce qui amène la problématique du « tween et effet mémoire ».

II.4.2.3 « Tween et effet mémoire » : recherche de l'influence du polysorbate 80

A plusieurs reprises et notamment lors de la phase d'étude d'optimisation et de spécificité avec les 9 systèmes, il a été remarqué lors de l'injection du polysorbate 80 son pic sortait exactement au même temps de rétention que le principe actif amiodarone.

La quantité dosée n'étant pas toujours négligeable, (0,41% dans le système 3; 6,2 % dans le système 7; 0,6% dans le système 8; 3,6% dans le système 9) il convient de s'interroger sur l'influence réelle de cet excipient sur le dosage de l'amiodarone.

Avant toute chose, il faut vérifier si c'est réellement le Tween lui même qui absorbe et qui est détecté car cela pourrait aussi être un effet mémoire. C'est à dire que de par ses propriétés de tensioactif le Tween pourrait décrocher des quantités infimes et non régulières

d'amiodarone qui seraient restées sur la colonne ou dans le système d'injection et cela serait en réalité notre principe actif qui serait détecté. Cet effet est gênant dans le sens où il peut provoquer des effets d'accumulation au fur et à mesure des dosages et fausser complètement les quantités de principe actif détectées.

Afin d'élucider le problème plusieurs approches ont été menées :

- Tout d'abord grâce au détecteur DAD couplé à notre système chromatographique il a été possible de regarder quelle était l'influence de la longueur d'onde de détection pour le Tween, l'amiodarone (PA) et la Cordarone® (FM).

Ces 2 dernières présentent des maxima d'absorption très proches (243 et 206 nm pour PA et 244 et 205 nm pour FM) et le spectre fourni sur l'écran DAD est identique ; il s'agit donc bien dans les deux cas du principe actif que l'on détecte et que l'on dose. Alors que le Tween présenterait un maximum vers 238 nm mais le spectre fourni ne ressemble pas à celui de l'amiodarone. (Cf. figures en annexe pp. 70a-70f)

A ce stade il serait possible de dire que le tween a une absorption qui lui est propre et qui interfère avec le PA. Il faudrait dans ce cas travailler à une longueur d'onde qui permettrait de moins le détecter voire plus du tout (comme par exemple à 205-206 nm).

Toutefois pour confirmation le spectre de l'excipient est effectué sur un appareil UV classique car selon sa structure chimique ce composé n'est pas sensé absorber en UV. Le spectre obtenu nous confirme cette hypothèse: le tween présente un spectre pratiquement plat, pas du tout caractéristique et qui ne ressemble pas non plus au spectre obtenu sur le DAD (cf. figure 26 annexes p. 70e)

Mais il est vrai que l'absorption à 244 nm n'est pas nulle. Donc bien qu'il puisse avoir une absorption à la longueur d'onde à laquelle le travail a été mené jusqu'à présent, celle-ci est tout à fait négligeable et sur les chromatogrammes étudiés ce n'est certainement pas ce composé qui est détecté.

- D'autre part des injections répétées et alternées de tween (20µg/ml) et de phase mobile sont effectuées afin d'observer un éventuel effet mémoire (cf.figure 27 annexe p70f).

Le chromatogramme obtenu démontre que même après deux injections successives la ligne de base n'est pas parfaitement plate et qu'à chaque fois que le tween est injecté il sort le même pic au même endroit que celui observé avec l'injection du blanc. Il est vrai que l'échelle est zoomée et les quantités sont certainement négligeables mais cela laisse suggérer qu'il y a peut-être un problème de rinçage du système entre les injections et que la colonne mal rincée pourrait ainsi sous l'influence du tween relâcher de faibles quantités d'amiodarone.

Afin de vérifier ce point, la solution de rinçage de l'appareil qui était constituées d'eau à 100% est remplacée par de la phase mobile.

Les résultats nous confirment qu'après 5 injections successives de blanc, le pic d'amiodarone résiduelle qui était observé, disparaît peu à peu. Le même phénomène est observé lors d'injections successives de Tween. A une sensibilité habituelle de détection (0,048) les pics ne sont plus détectables et ne sont même plus intégrés sur le chromatogramme).

Conclusion:

Il ne serait pas nécessaire de changer de longueur d'onde de détection car le pic observé lors de l'injection du Tween n'est pas dû au à l'excipient lui-même mais à ses propriétés tensioactives qui permettent de retirer des restes d'amiodarone accrochée sur la colonne dû à un mauvais rinçage de celle-ci.

Toutefois il semblerait plus prudent dorénavant de régler la longueur d'onde de détection à 206 nm à laquelle l'amiodarone est détectée à son maximum mais le tween n'a plus d'influence. Ainsi plus aucune interaction n'est observée.

Finalement la méthode est spécifique et permet la séparation des excipients de la Cordarone® et de ses produits de dégradation.

II.4.3 Validation de la méthode d'analyse

Comme indiqué dans la littérature [35, 36] les critères linéarité, exactitude et fidélité ont été étudiés sur 3 jours grâce aux solutions de Std, Rdf de 50, 75, 100, 125 et 150 µg/ml et aux solutions fidélité de 100 µg/ml. Chaque solution est injectée deux fois.

II.4.3.1 Linéarité

a) Droites de régression linéaire

Tableau 6: données solutions Std jour 1

Std J1	Concentration (mg/ml)	Surface moyenne
50%	0,04894	962765
75%	0,07341	1489709
100%	0,09788	1993470
125%	0,12235	2570471
150%	0,14682	3117563

Tableau 7: données solutions Rdf jour 1

Rdf J1	Concentration (mg/ml)	Surface moyenne
50%	0,05000	951694
75%	0,07500	1465837
100%	0,10000	1978663
125%	0,12500	2492516
150%	0,15000	3077989

Équation des droites pour le jour 1 :

$$\text{Std : } y = 2 \cdot 10^7 x - 129348 \quad r^2 = 0,9995$$

$$\text{Rdf : } y = 2 \cdot 10^7 x - 118368 \quad r^2 = 0,9993$$

Tableau 8: données solutions Std jour 2

Std J2	Concentration (mg/ml)	Surface moyenne
50%	0,04906	973272
75%	0,07359	1485632
100%	0,09812	2022614
125%	0,12265	2539705
150%	0,14718	3132058

Tableau 9: données solutions Rdf jour 2

Rdf J2	Concentration (mg/ml)	Surface moyenne
50%	0,05000	995788
75%	0,07500	1543464
100%	0,10000	2100776
125%	0,12500	2624901
150%	0,15000	3222329

Équation des droites pour le jour 2 :

Std : $y = 2 \cdot 10^7 x - 118002$ $r^2 = 0,9993$

Rdf : $y = 2 \cdot 10^7 x - 116356$ $r^2 = 0,9997$

Tableau 10: données solutions Std jour 3

Std J3	Concentration (mg/ml)	Surface moyenne
50%	0,05004	1099432
75%	0,07506	1465057
100%	0,10008	2274962
125%	0,12510	2600121
150%	0,15012	3521386

Tableau 11: données solutions Rdf jour 3

Rdf J3	Concentration (mg/ml)	Surface moyenne
50%	0,05000	1050135
75%	0,07500	1676657
100%	0,10000	2110737
125%	0,12500	2704925
150%	0,15000	3889566

Équation des droites pour le jour 3 :

Std : $y = 2 \cdot 10^7 x - 199398$ $r^2 = 0,9760$

Rdf : $y = 2 \cdot 10^7 x - 396448$ $r^2 = 0,9620$

b) Etude statistique de la linéarité sur les trois jours

Ces tests sont effectués après un ajustement de variances sur la concentration moyenne des jours 1,2,3.

Tableau 12: Linéarité sur jours 1,2,3- Etude statistique

Jour 1; 2; 3	Std	Rdf	Constantes statistiques
Ordonnées à l'origine (a) des droites d'ajustement	Std a = -154163.09	Rdf a = -210390.5	
Ecart-type de l'ordonnée à l'origine	Std S _a = 83739.62	Rdf S _a = 154551.25	
Comparaison des ordonnées à l'origine avec 0	1.84	1.36	t _(0.05 ; 13) = 2.16
Pentes (b) des droites d'ajustement	Std b = 22669993.81	Rdf b = 23361222.00	
Ecart-type de la pente	Std S _b = 799917.64	Rdf S _b = 1457123.12	
Comparaison des ordonnées à l'origine	0.320		t _(0.05 ; 13) = 2.16
Comparaison des pentes	0.416		t _(0.05 ; 13) = 2.16
S _{2 max}	3.54*10 ¹⁰	1.87*10 ¹¹	
ΣS ₂	5.71*10 ¹⁰	2.18*10 ¹¹	
Homogénéité des variances (Cochran)	C _(calculé) = 0.6201	C _(calculé) = 0.8592	C _(0.05 ; 5 ; 2) = 0.684
Variance de la régression S ₁ ²	9.34*10 ¹²	1.02*10 ¹³	
Variance résiduelle S _R ²	1.17*10 ¹⁰	3.98*10 ¹⁰	
Existence pente significative F ₁	F ₁ = 798.97	F ₁ = 257.04	F _(0.05 ; 1 ; 13) = 4.67
Variance erreur expérimentale S _E ²	1.14*10 ¹⁰	4.36*10 ¹⁰	
Variance erreur régression S _L ²	1.26*10 ¹⁰	2.71*10 ¹⁰	
Validité des ajustements F ₂	F ₂ = 1.1044	F ₂ = 0.6203	F _(0.05 ; 3 ; 10) = 3.708

b) Discussion des résultats

Les ordonnées à l'origine ne sont pas significativement différentes de 0, ni différentes entre elle au risque de 5%. Les pentes ne sont pas significativement différentes au risque de 5%. Les deux droites sont donc superposables.

Les tests de F_1 et F_2 sont acceptés, par contre les variances ne sont pas homogènes. Cela est dû à un seul point très différent : le 150% du jour 3. Mais pour des raisons de tableur, il ne peut être supprimé.

c) Conclusion concernant la linéarité

Le modèle linéaire est adapté (mais celui-ci dépend du bruit de fond qui est ici très important dû à ce fameux point).

A priori, le dosage pourrait se faire avec un étalon externe à 100%.

II.4.3.2 Exactitude

a) Résultats et calculs pour l'exactitude

Tableau 13: résultats obtenus à partir d'un seul étalon externe à 100% (un par jour)

Pourcentage théorique (groupe= std)	Essai (i/j) (i = jour ; j= groupe std)	Concentration (mg/ml)	Concentration retrouvée (mg/ml)	Recouvrement (%)	Variance S2j
groupe 1	1 / 1	0,0500	0,0467	93,46	4,817
	2 / 1	0,0500	0,0483	96,61	
	3 / 1	0,0500	0,0462	92,39	
groupe 2	1 / 2	0,0750	0,0720	95,96	3,811
	2 / 2	0,0750	0,0749	99,83	
	3 / 2	0,0750	0,0738	98,35	
groupe 3	1 / 3	0,1000	0,0972	97,15	20,522
	2 / 3	0,1000	0,1019	101,91	
	3 / 3	0,1000	0,0929	92,86	
groupe 4	1 / 4	0,1250	0,1224	97,91	11,268
	2 / 4	0,1250	0,1273	101,87	
	3 / 4	0,1250	0,1190	95,20	
groupe 5	1 / 5	0,1500	0,1511	100,75	47,766
	2 / 5	0,1500	0,1563	104,21	
	3 / 5	0,1500	0,1711	114,07	
Recouvrement moyen				98.84	
Coefficient de détermination (r^2)				0.9800	

Tableau 14: résultats obtenus à partir de la droite de régression (une par jour)

Pourcentage théorique (groupe= std)	Essai (i/j) (i = jour ; j= groupe std)	Concentration (mg/ml)	Concentration retrouvée (mg/ml)	Recouvrement (%)	Variance S²_j
groupe 1	1 / 1	0,0500	0,0491	98,15	10,373
	2 / 1	0,0500	0,0509	101,72	
	3 / 1	0,0500	0,0523	104,58	
groupe 2	1 / 2	0,0750	0,0724	96,55	16,594
	2 / 2	0,0750	0,0759	101,16	
	3 / 2	0,0750	0,0785	104,68	
groupe 3	1 / 3	0,1000	0,0957	95,69	9,041
	2 / 3	0,1000	0,1013	101,32	
	3 / 3	0,1000	0,0967	96,67	
groupe 4	1 / 4	0,1250	0,1190	95,22	6,297
	2 / 4	0,1250	0,1253	100,21	
	3 / 4	0,1250	0,1215	97,23	
groupe 5	1 / 5	0,1500	0,1456	97,07	77,316
	2 / 5	0,1500	0,1525	101,69	
	3 / 5	0,1500	0,1711	114,07	
Recouvrement moyen				100.4	
Coefficient de détermination (r ²)				0.9729	

b) Etude statistique de l'exactitude pour les 3 jours

Tableau 15: Exactitude sur jours 1,2,3 avec étalon externe à 100% - Etude statistique

Jour 1 ;2 ;3	Rdf	Constantes statistiques
S ² _{max}	47.766	
ΣS ²	88.183	
Homogénéité des variances (Cochran)	C _(calculé) = 0.542	C _(0.05 ;5 ;2) = 0.684
Variance de l'étalon externe (inter-groupe) S ² _C	61.154	
Variance inter-analyses (intra-groupe) S ² _E	17.637	
Validité des moyennes F ₃	F ₃ = 3.467	F _(0.05 ;4 ;10) = 3.48
Ecart-type total S _T	5.484	t _(0.05;14) = 2.145
Rendement moyen	98.84 % ± 3.04 %	

Tableau 16: Exactitude sur jours 1,2,3 avec droite de régression - Etude statistique

Jour 1 ;2 ;3	Rdf	Constantes statistiques
S _{2 max} ΣS ₂	77.316 119.621	
Homogénéité des variances (Cochran)	C _(calculé) = 0.646	C _(0.05 ;5 ;2) = 0.684
Variance de la régression (inter-groupe) S ² C	23.066	
Variance inter-analyses (intra-groupe) S ² E	23.924	
Validité des moyennes F ₃	F ₃ = 0.964	F _(0.05 ;4 ;10) = 3.48
Ecart-type total S _T	4.866	t _(0.05;14) = 2.145
Rendement moyen	100.4 % ± 2.69 %	

c) Discussion

La variance est homogène pour les 5 groupes, il n'y a pas de biais, donc statistiquement un étalon externe suffirait. Toutefois, au vu des résultats des concentrations de 50 et 150% qui diffèrent beaucoup, il aurait été souhaitable, pour la qualité, de refaire un jour 4 de validation. D'un point de vue de la validité des moyennes, le résultat du test F₃ est trop proche de la valeur limite concernant l'étalon externe à 100%, il est donc préféré de prendre la droite de régression comme étalon pour calculer les dosages.

Le résultat obtenu par la droite de régression donne un intervalle de : 97.705 % à 103.095 %, donc l'exactitude est validée pour cette méthode.

d) Conclusion concernant l'exactitude

L'exactitude sur trois jours montre un biais inférieur à 5% sur les trois jours donc la méthode est jugée exacte. L'étalon choisi est le modèle de la droite de régression.

II.4.3.3 Fidélité pour les Rdf

a) Résultats de la fidélité

La fidélité est constituée de la répétabilité (6 points au centre du domaine étudié, 1 jour) et de la fidélité intermédiaire (18 points au centre, soit 6 par jour).

Tableau 17: résultats obtenus pour l'étude de la fidélité

Jour de validation	Essai (i/j) (i = solution; j = jour)	Concentration (mg/ml)	Concentration retrouvée (mg/ml)	Recouvrement (%)
1	1/1	0,1000	0,0992	99,19
	2/1	0,1000	0,0980	97,98
	3/1	0,1000	0,0979	97,88
	4/1	0,1000	0,0969	96,89
	5/1	0,1000	0,0967	96,72
	6/1	0,1000	0,0989	98,92
2	1/2	0,1000	0,1012	101,19
	2/2	0,1000	0,1011	101,10
	3/2	0,1000	0,1020	102,00
	4/2	0,1000	0,1035	103,50
	5/2	0,1000	0,1011	101,09
	6/2	0,1000	0,0999	99,93
3	1/3	0,1000	0,0958	95,81
	2/3	0,1000	0,0969	96,86
	3/3	0,1000	0,0958	95,76
	4/3	0,1000	0,0984	98,39
	5/3	0,1000	0,0975	97,52
	6/3	0,1000	0,0973	97,30
moyennes			0,0988	98,78

b) Etude statistique de la fidélité pour les 3 jours

La répétabilité étudie les variations très faibles entre les mesures d'un même échantillon durant un intervalle de temps court, par exemple une journée. La variance de répétabilité est égale à la moyenne des variances de chaque jour.

La fidélité intermédiaire représente les variations obtenues lorsque les analyses sont faites sur des jours différents mais dans un même laboratoire, (la notion de jour reflétant un changement de phase mobile etc...).

Le tableau suivant résume les calculs des coefficients de variation de répétabilité et de fidélité intermédiaires.

Tableau 18: résultats des variances et coefficients de variation pour la fidélité

Variance du groupe Jour 1	1.0217
Variance du groupe Jour 2	1.4287
Variance du groupe Jour 3	1.0487
Moyenne (n=18)	98.78 %
Variance de répétabilité S_r^2	1.166
Variance inter-groupe S_g^2	5.472
Variance de fidélité intermédiaire SR^2	6.639
Coefficient de variation de répétabilité CVr	1.09
Coefficient de variation de fidélité intermédiaire CVR	2.61

d) Discussion

La variance de répétabilité est acceptable mais dû à l'ajout de la variance inter-groupe, la variance de fidélité intermédiaire devient grande : ce qui reflète un effet jour qui était déjà connu avec le problème de la grande dispersion des résultats du jour 3 .

e) Conclusion

Sur l'ensemble des trois jours, les coefficients de variation pour la répétabilité et la fidélité intermédiaire sont assez élevés donc la méthode n'est pas considérée comme fidèle, notamment à cause de cet effet jour.

II.4.3.4 Conclusion sur la validation

Le modèle linéaire convient pour cette validation. Une droite de calibration est choisie plutôt qu'un étalon externe à 100%. Mais la procédure n'est pas jugée fidèle.

II.4.3.5 Limites de confiance des résultats d'analyse

Les limites de confiance à 95% des résultats d'analyse sont définies comme suit :

$$IC = x \pm t * \sqrt{(SR^2 / N)}$$

Où $SR^2 = 6,639$

t de student pour 15 d.d.l = 2,16

N = 1 car 2 injections du même vial pour un échantillon.

Donc ici :

$$IC = x \pm 5.56 \%$$

II.4.4 Etude de la robustesse de la méthode

II.4.4.1 Préparation des solutions

La solution utilisée est une Rdf dont la concentration équivaut à la valeur centrale du domaine de concentrations étudiées soit 100% = 100 µg/ml, préparée à partir d'une solution mère à 0,5 mg/ml.

II.4.4.2 Résultats

Pour voir quelle est l'influence de la variation des facteurs A, B, C ; les paramètres k' , asymétrie et surface du pic d'amiodarone sont relevés.

Selon le plan d'expérience, huit essais sont effectués de façon aléatoire, entre lesquels sont intercalés six essais au point central servant de référence. Chaque essai est composé de deux injections.

a) essais au point central

Tableau 19: réponses des essais au point central

N° de l'essai	Réponses obtenues		
	k'	Asymétrie	Surface
1	5,48	1,38	1765749
2	5,24	1,56	1768170
3	5,62	1,34	1993249
4	4,81	1,51	2297589
5	4,48	1,48	1996845
6	5,10	1,47	1719347

b) essais du domaine étudié

Tableau 20: réponses des essais du domaine étudié

N° de l'essai	Réponses obtenues		
	k'	Asymétrie	Surface
1	2,86	1,20	1753915
2	2,81	1,42	1774498
3	10,95	1,62	1778486
4	2,76	1,36	1783978
5	10,95	1,55	2016112
6	10,90	1,57	2008423
7	2,90	1,34	1998027
8	12,33	1,62	1723733

c) Analyse des résultats

Chaque facteur agit de façon spécifique sur chaque paramètre (réponse) observé, une formule (annexe) permet de mesurer cet effet en calculant le coefficient de chaque facteur sur les réponses. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau 21: matrice des coefficients

Réponses	% MeCN	pH	Conc. tampon	%MeCN-pH	%MeCN-Conc. tampon	Conc. tampon - pH	%MeCN-Conc. tampon-pH
k' amiodarone	-4,23	0,18	0,17	-0,18	-0,19	0,19	-0,14
Asymétrie amiodarone	-0,130	0,005	-0,028	-0,025	-0,023	-0,027	-0,033
Surface amiodarone	-27042	-96989	-35212	33591	-23446	16378	31989

Ces coefficients sont représentés dans les figures 28 à 30 en annexe p.71-72.

Chaque réponse possède un intervalle de confiance calculé sur le domaine d'expérience (N=8) , selon la formule donnée en annexe. L'écart type utilisé dans la formule a été calculé à partir des valeurs du point central.

Le tableau suivant résume les intervalles obtenus pour chaque réponse.

Tableau 22 : écart-type et intervalles de confiance pour chaque paramètres de réponse

	k' amiodarone	Asymétrie amiodarone	Surface amiodarone
écart type (S)	0.47	0.09	218442
Intervalle de confiance	0.465	0.09	214393

- Coefficients des facteurs sur le k'

C'est la variation du pourcentage d'acétonitrile qui agit de façon vraiment significative sur le facteur de rétention (k') de l'amiodarone (cf. fig. 28).

Les interactions du premier ordre sont insignifiantes.

- Coefficients des facteurs sur l'asymétrie du pic

Une variation du pourcentage d'acétonitrile agit de façon significative sur l'asymétrie du pic d'amiodarone. Aucune interaction du premier ordre n'est observée.

- Coefficients des facteurs sur la surface du pic

Les facteurs n'ont aucune influence significative sur les surfaces du pic d'amiodarone.

Aucune interaction du premier ordre n'est observée.

d) Conclusion sur la robustesse

Parmi les facteurs variables étudiés, seul le pourcentage d'acétonitrile dans la phase mobile agit de façon significative sur k' et sur l'asymétrie du pic d'amiodarone. Toutefois les résultats qualitatifs ne sont que légèrement modifiés.

Dès lors, il est indispensable de fixer le pourcentage d'acétonitrile dans la phase mobile de manière très précise à 50,0%.

La stabilité de la méthode du point de vue quantitatif a été démontrée grâce à l'étude de robustesse. Toutefois il se peut qu'il y ait une légère modification de l'asymétrie des pics et du facteur de rétention k' si le pourcentage d'acétonitrile n'est pas fixé avec précision.

II.4.5 Etude de stabilité

II.4.5.1 Partie 1 : étude des lots A, B, C

➤ Stabilité physique

Cette stabilité est évaluée en fonction de l'aspect visuel des solutions observées.

- Aspect de la solution à t_0 : liquide sirupeux, limpide, jaune pâle identique à la référence.
Aucun cristaux, ni trouble, ni précipité.
- Evolution de l'aspect au cours du temps :
Aucun changement n'est apparu jusqu'à t_7 . Les solutions conservent un aspect visuel identique à la solution de départ à t_0 .

Les seringues prêtes à l'emploi de 50 mg/ml d'amiodarone sont donc visuellement stables sur une période de 30 jours.

➤ Variation du pH

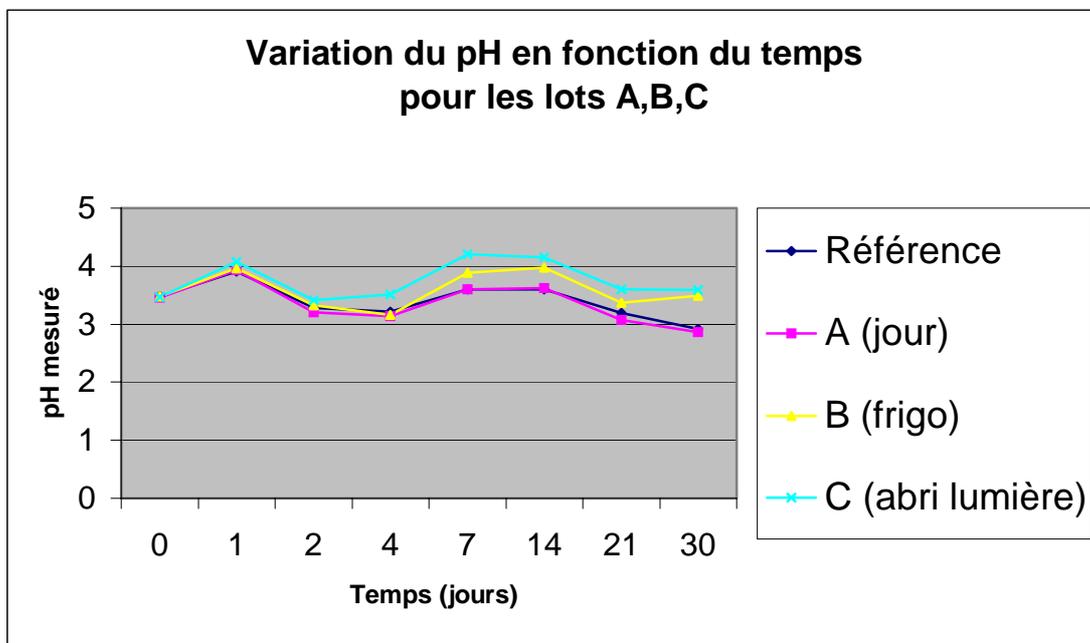


Figure 5: Variation du pH mesuré pour les lots A,B et C

Commentaires :

La variation de pH en fonction du temps à l'intérieur de chaque lot est environ de 1 unité de pH, alors que la différence observée entre les échantillons et la référence au cours du temps est inférieure à l'unité. (Cette différence tend à augmenter au cours du temps.)

Les légères différences observées entre les trois lots ne sont pas significatives, donc tous les lots sont stables du point de vue du pH pendant la période observée.

➤ Dosage par HPLC

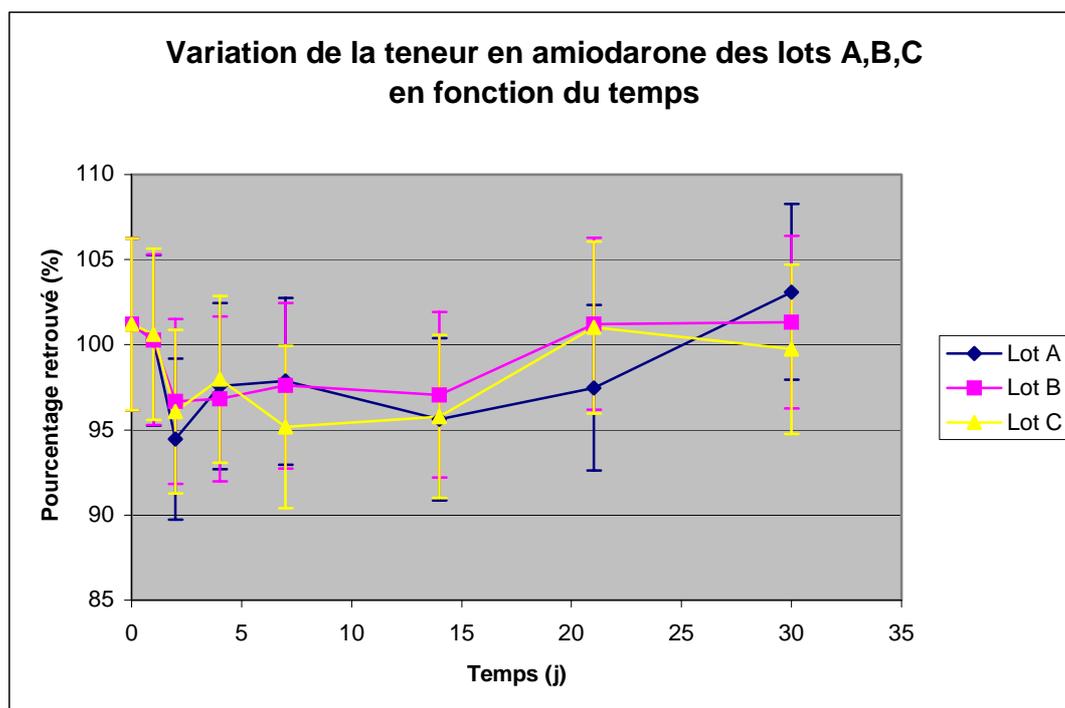


Figure 6 : résultats de dosage des lots A,B,C

Commentaires :

Les trois courbes possèdent le même profil général : légère décroissance jusqu'à 14 jours puis croissance jusqu'à 30 jours.

Toutefois en considérant la valeur du t_0 comme étant le 100%, la variation de 10% autorisée. Aucune influence de la lumière ni de la température n'est observée car les trois conditions de stockage donnent des teneurs en amiodarone semblables au cours du temps.

Conclusion :

La stabilité physique et chimique des seringues prêtes à l'emploi de 50 mg/ml d'amiodarone peut être affirmée pour un période de 30 jours.

De telles seringues pourraient donc potentiellement être produites par la pharmacie des HUG et proposées aux SIM pour la fonction désirée. Toutefois il serait souhaitable de refaire des analyses si l'on désire avoir une preuve de reproductibilité et d'y ajouter les résultats sur six mois comme il est prévu dans le plan de l'étude.

II.4.5.2 Partie 2 : étude des lots D,E,F

➤ Stabilité physique

- Aspect de la solution à t_0 :

L'aspect des solutions a à f des lots D,E,F est reporté dans le tableau suivant.

Tableau 23: aspect physique des solutions à t_0

Référence	D,E,F a 0.6mg/ml	D,E,F b 5mg/ml	D,E,F c 9.375mg/m	D,E,F d 12.5mg/ml	D,E,F e 18.75mg/ml	D,E,F f 25mg/ml
Liquide sirupeux, limpide, jaune pâle, sans cristaux, ni trouble, ni précipité	Liquide limpide, transparent par rapport à la référence, aspect liquide non sirupeux, sans cristaux, ni trouble, ni précipité	Idem que a	Idem mais Commence à se colorer jaune très pâle	Idem mais coloration un peu plus prononcée	Idem de plus en plus jaune	Idem mais coloration proche de celle de la référence et commence à devenir sirupeux

- Evolution de l'aspect au cours du temps :

Aucun changement n'est apparu jusqu'à t_3 . Les solutions conservent un aspect visuel identique aux solutions de départ à t_0 .

Chaque solution de concentration croissante est donc visuellement stable sur une période de 48 h. La concentration n'a aucune influence sur la stabilité visuelle.

➤ Variation du pH

Ces mesures de pH ne sont que indicatives, elles ne reflètent pas un activité ionique du H^+ car le milieu de travail n'est pas 100% aqueux : les échantillons sont des solutions de Cordarone® diluées dans du glucose 5%. Toutefois ces mesures sont effectuées pour permettre d'avoir une comparaison de pH par rapport à une référence et de pouvoir observer surtout sa variation au cours du temps.

La solution de référence est aussi une solution non aqueuse à 100% puisqu'il s'agit d'une ampoule de Cordarone® pure (50 mg/ml) non diluée. On ne cherche pas à mesurer la concentration ionique des protons mais comme dans toute étude de stabilité, à voir la variation de ce paramètre important qu'est le pH.

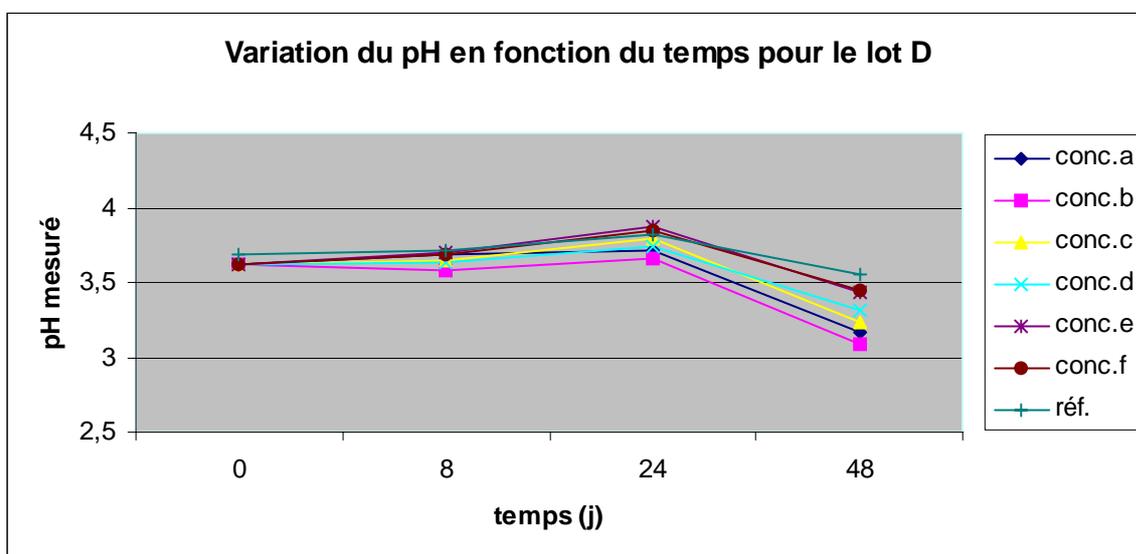


Figure 7: Variation du pH mesuré sur le lot D

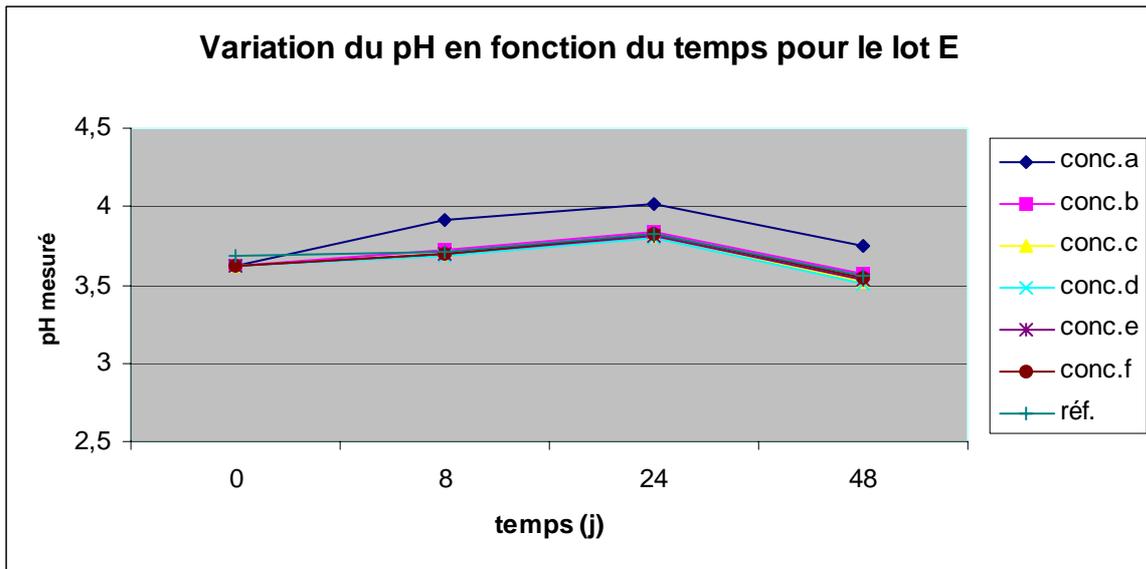


Figure 8: Variation du pH mesuré sur le lot E

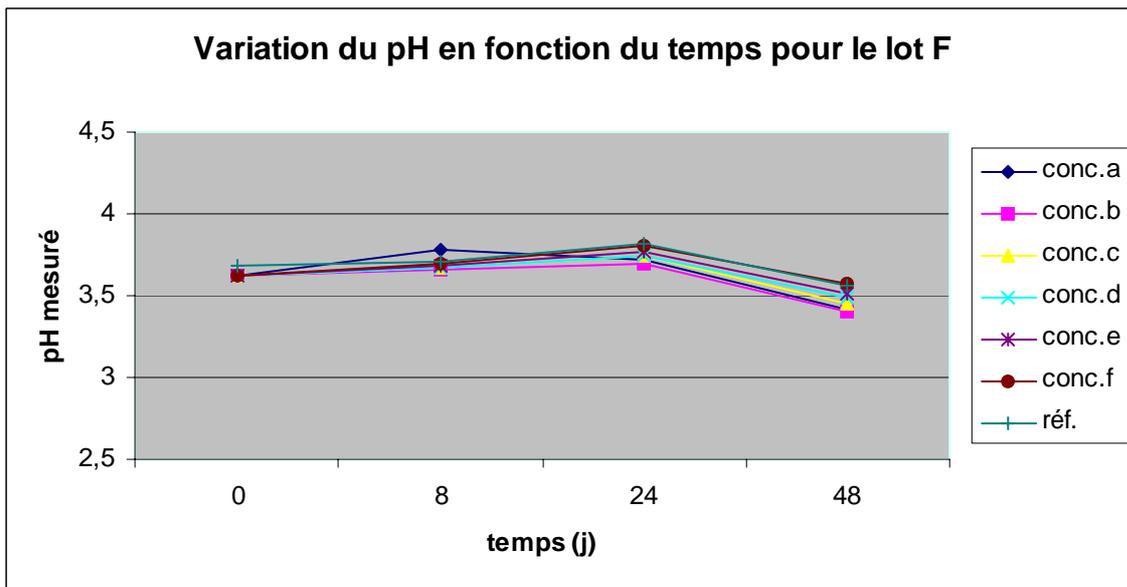


Figure 9: Variation du pH mesuré sur le lot F

Commentaires :

Une seule valeur a été prise pour le t_0 (pH=3,62).

Pour le lot D sur 24 h la variation de pH est insignifiante, il y a une baisse à 48h surtout pour les faibles concentrations. La lumière a donc une petite influence sur le pH à partir de 48 h.

La plus forte variation est de 0,57 unité de pH, elle est plus importante que dans les deux autres lots mais reste toujours assez acceptable.

Le pH est stable sur 48h et tout à fait homogène quelle que soit la concentration sauf pour la concentration la plus diluée, qui s'éloigne le plus de la référence alors qu'elle est recommandée par le fabricant. Par contre la référence n'a pas été conservée dans les mêmes conditions de frigo, c'est une ampoule conservée dans sa boîte dans un placard et qui est fraîchement ouverte chaque jour de mesure de pH.

C'est dans le lot F que la variation de pH est la moindre.

La concentration des solutions n'a aucune influence sur le pH.

La plus forte variation de pH est de 0,3 unité donc insignifiante. Concernant le paramètre du pH, F semble être la meilleure condition de stockage ce qui correspond aux recommandations du fabricant.

Conclusion :

La variation de pH est insignifiante sur 48h et la concentration des solutions n'a pratiquement pas d'influence sur celui-ci.

La conservation à température ambiante et à l'abri de la lumière semble être ici conseillée.

➤ Dosage par HPLC

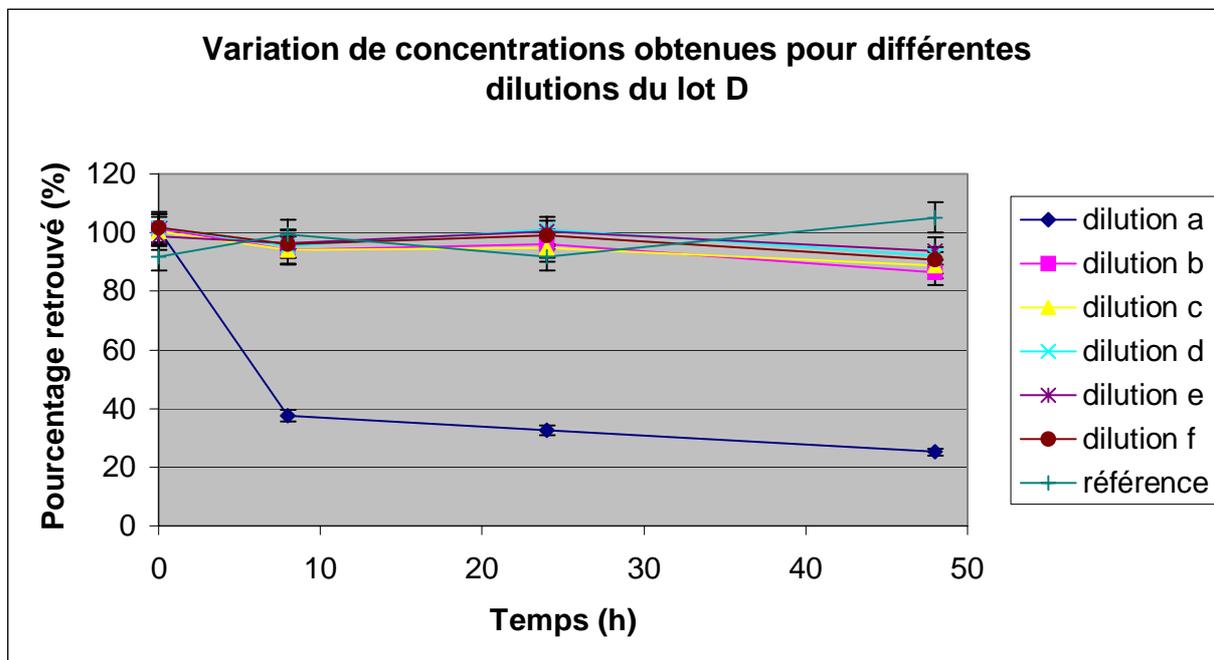


Figure 10: variation de la teneur en principe actif en fonction du temps pour le lot D

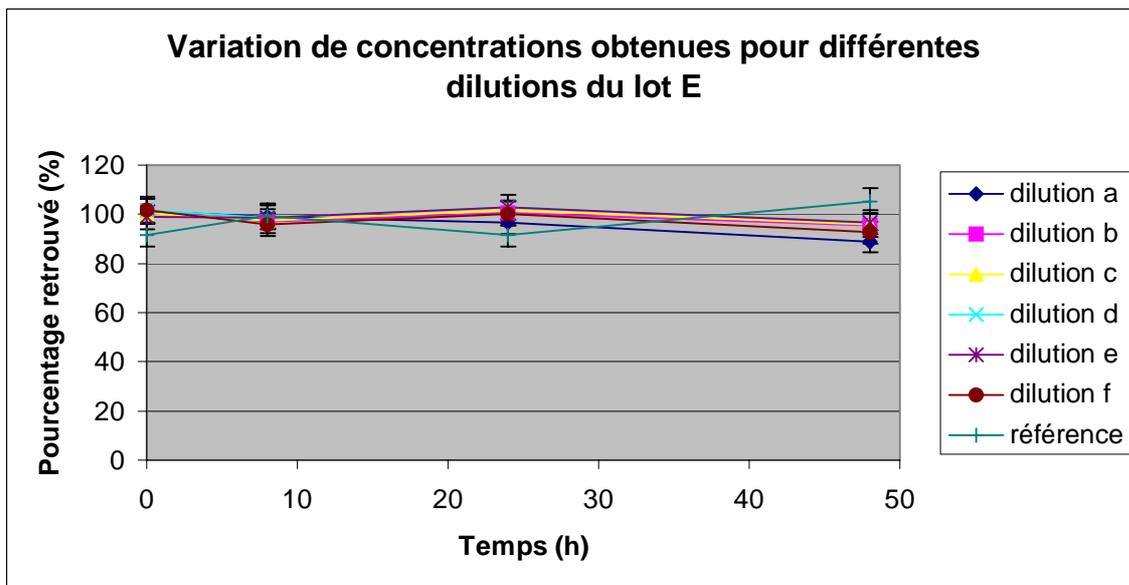


Figure 11: variation de la teneur en principe actif en fonction du temps pour le lot E

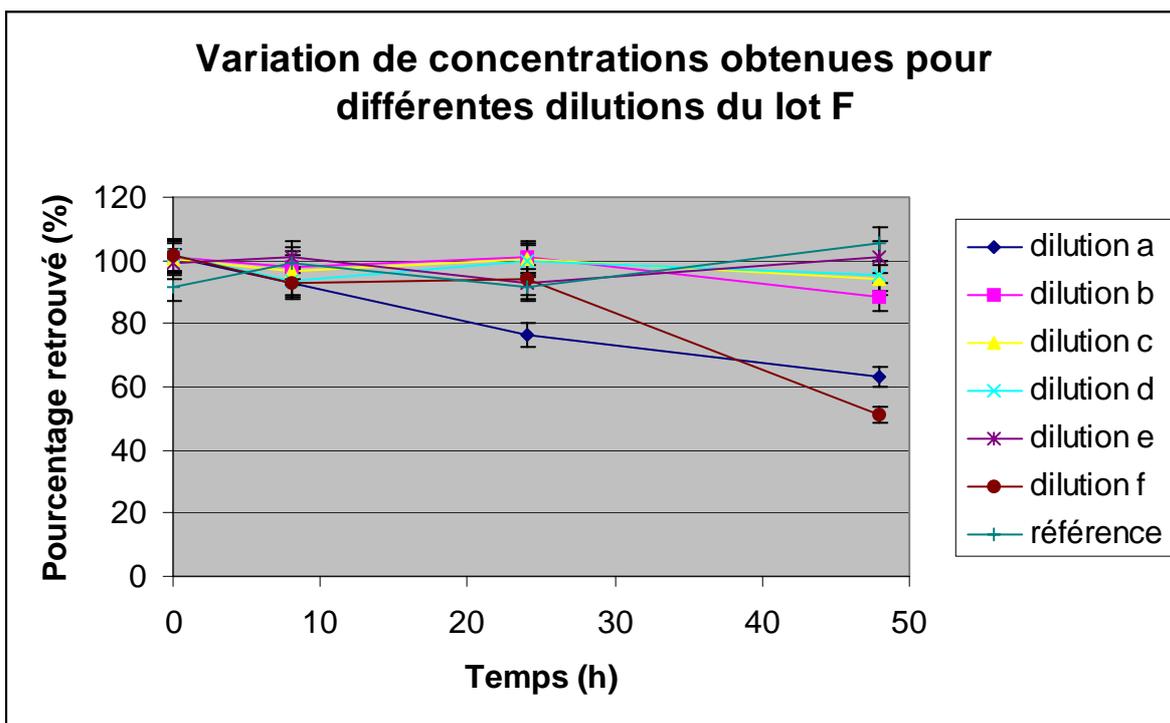


Figure 12: variation de la teneur en principe actif en fonction du temps pour le lot E

Commentaires :

- Dans le lot D, la concentration la plus faible subit une perte importante en amiodarone dès les huit premières heures (-60%) et cette perte se poursuit pour atteindre une baisse de 76% au bout de 48h. Les autres concentrations subissent aussi une perte en principe actif, elle reste acceptable après 24h mais sur 48h dépasse les 10% autorisés.

Une hypothèse pourrait être qu'il y a une adsorption du produit sur la seringue [17] mais compte tenu du fait que le phénomène est nettement atténué lorsque les seringues sont stockées à l'abri de la lumière, cette hypothèse peut être écartée.

Cette perte exceptionnelle est uniquement marquée dans le lot D qui subit l'influence de la lumière. On pourrait alors penser à une photodégradation. Il a été bien décrit que l'amiodarone est photosensible, sa principale réaction de décomposition étant une réaction de deshalogénéation avec formation d'un singulet d'oxygène en passant par l'état triplet de l'amiodarone elle-même [37].

Selon la littérature la cinétique principale d'une réaction de photolyse est un processus de premier ordre avec une vitesse de dégradation proportionnelle à la concentration de la substance. Pour les faibles concentrations, la vitesse de réaction est limitée par la concentration et non par l'intensité du rayonnement [38].

En résumé il est probable que les résultats obtenus reflètent une photodégradation, particulièrement marquée avec les solutions faiblement concentrées et plus tardive à se manifester avec de plus fortes concentrations.

- Le lot E apparaît comme le plus stable. La concentration n'a pas d'influence sur la perte en principe actif car au bout de 48h les concentrations a et f sont les seules à dépasser les 10% de perte autorisés alors que ces concentrations sont les deux extrêmes.
- En observant les résultats du lot F on remarque la dégradation naturelle du produit alors qu'il est dans les conditions optimales de stockage selon le fabricant.
- Pratiquement toutes les concentrations dépassent la limite autorisée après de 48 h, la solution la plus diluée la dépasse même déjà après 8 h.

La température influence la perte car si l'on compare avec E, on peut aisément conclure que le frais permet de ralentir largement la dégradation.

D'autre part l'obscurité permet aussi de ralentir légèrement la perte d'amiodarone.

Conclusion :

Ces dilutions sont censées être injectées directement au patient, malgré tout s'il doit y avoir un délai entre la préparation et l'administration il convient de les conserver au frais à l'abri de la lumière car la température et la lumière provoquent trop de dégradation et de perte du principe actif.

On remarque aussi que la concentration de 0,6 mg/ml recommandée par le fabricant et conservée à température ambiante et à l'abri de la lumière s'avère être la concentration la moins stable et nécessite une administration rapide. Dans ces conditions on peut imaginer que le fabricant recommande cette concentration d'un point de vue de la tolérance clinique plutôt que de la stabilité.

Nos résultats démontrent que les concentrations élevées, non recommandées par le fabricant mais utilisées en pratique aux SIM, sont stables pour une durée de 24h.

II.4.5.3 Partie 3 : étude des incompatibilités

➤ Variation du pH

Chaque solution mère M et 2M de chaque principe actif est préparée avant d'effectuer les mélanges avec la Cordarone®. La variation du pH des solutions de concentration 2M (M pour le Perlinganit®) est évaluée sur une période de 24h. Les résultats sont reportés dans le tableau suivant.

Tableau 24: variation du pH des solutions mères sur 24h

Médicament Y	pH t_0	pH t_{24h}
Perlinganit®	4.43	4.10
Actrapid® HM	5.60	6.23
KCl®	5.38	5.74
Artérenol® 5mg	4.17	4.62
Artérenol® 10mg	4.08	4.68
Artérenol® 25mg	3.87	4.57
Dobutrex®	2.75	3.67
Dormicum®	2.95	3.37
Fentanyl HUG	5.86	6.13

Toutes les solutions sauf le Perlinganit® subissent une élévation de pH sur 24h. Ce phénomène est certainement dû à une absorption du CO₂ de l'air qui, dissout, apporte des carbonates à la solution qui devient un peu plus basique ; car par mégarde les solutions n'ont pas été conservées de façon hermétique à l'air

➤ Stabilité des solutions

La stabilité des différents mélanges a été évaluée visuellement. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 25: résultats des tests de compatibilité

Principe actif Y ajouté	Concentration M de Y	Série A X = Cordarone® 0,6 mg/ml	Série B X = Cordarone® 25 mg/ml
		Résultats observés	
nitroglycérine	1 mg/ml	Visuellement compatible pendant 24h, aucune coloration, ni précipitation, ni production de gaz, ni opalescence	Visuellement compatible pendant 24h
insuline	1 u/ml	idem	Visuellement compatible pendant 5 min pour la solution 2M, puis apparition d'une opalescence : incompatible
KCl	1 mmol/ml	idem	Visuellement incompatible dès t ₀ , opalescence immédiate
noradrénaline	100 µg/ml	idem	Visuellement compatible pendant 24h
noradrénaline	200 µg/ml	idem	Visuellement incompatible dès t ₀ , opalescence immédiate
noradrénaline	500 µg/ml	idem	Visuellement incompatible dès t ₀ , opalescence immédiate
dobutamine	10 mg/ml	idem	Visuellement compatible pendant 5 min, puis apparition d'une opalescence à toutes les dilutions : incompatible
midazolam	10 mg/ml	idem	Visuellement incompatible dès t ₀ , opalescence immédiate
fentanyl	10 µg/ml	idem	Visuellement compatible pendant 5 min, puis apparition d'une opalescence : incompatible

Commentaires :

- Tous les mélanges de la série A sont compatibles, aucune modification des solutions n'apparaît quelque soit la dilution des mélanges.
- Par contre plusieurs changements sont observés dans la série B. L'opalescence observée peut être le début d'une précipitation ou d'un trouble. Cela rend le mélange des deux principes actifs totalement inadéquat à la perfusion et à l'utilisation clinique. La plupart du temps la solution 2M est touchée en premier car elle possède la concentration la plus forte en principe actif, d'autre part, souvent le rapport M (4 :1) permet de confirmer l'observation de M (1 :1) car la solution est quatre fois plus concentrée.

Conclusion :

Lorsque la Cordarone® est utilisée à la concentration officielle recommandée par le fabricant (0,6 mg/ml) aucun problème de compatibilité avec les sept autres médicaments testés n'apparaît sur une période de 24 h. Chacun peut donc être administré en Y à l'amiodarone sans risque.

Par contre lorsque la concentration de celle-ci s'élève à 25 mg/ml, on relève des incompatibilités sur 24h avec tous les médicaments à l'exception du Perlinganit® et de l'Artérenol® 5mg. Ces deux derniers pourraient donc être potentiellement administrés simultanément et dans la même voie à la Cordarone® 25 mg/ml alors que tous les autres par mesure de sécurité et de prudence ne doivent pas être associés à cette dernière

III. CONCLUSIONS GENERALES et GUIDELINES

La technique HPLC permet d'étudier la stabilité des solutions de différentes concentrations conservées dans des milieux divers. Contrairement à la technique de spectrométrie UV-vis, elle permet la visualisation des produits de dégradation qui apparaissent par exemple après une exposition à la lumière du jour. Donc d'un point de vue qualitatif, déjà, l'HPLC est plus performante que la spectrométrie UV-vis.

A l'aide de cette technique de choix, une méthode spécifique à l'étude de l'amiodarone a été développée puis validée, l'intervalle de confiance des résultats est de ± 5.56 %.

Le dosage des solutions de 50 mg/ml d'amiodarone a permis de conclure que ces seringues prêtes à l'emploi sont stables physiquement et chimiquement durant 30 jours. Elles peuvent être conditionnées dans des seringues transparentes et être exposées à la lumière du jour, c'est à dire qu'elles peuvent absolument avoir leur place sur un chariot d'urgence des SIM. Toutefois il serait souhaitable de les conserver au frais et à l'abri de la lumière pour ralentir la dégradation inévitable et la perte en amiodarone.

Le fait d'administrer de fortes concentrations comme il est d'usage aux SIM ne pose apparemment pas de problème d'instabilité physique, ni chimique si les dilutions sont administrées directement. Dans le cas contraire la même précaution de conservation que les seringues prêtes à l'emploi est applicable pour les seringues de concentrations inférieures diluées dans le G5%, dont la limite d'utilisation se situe entre 24 et 48 h dans ces conditions de conservation.

Par ailleurs si la Cordarone® est diluée dans du G5% à la concentration de 0,6 mg/ml elle est compatible avec tous les médicaments testés utilisés fréquemment aux SIM. Ceux-ci peuvent donc être administrés simultanément selon la pratique du service.

Par contre il est déconseillé de faire de même si la Cordarone® n'est diluée qu'à 25 mg/ml, notamment pour l'insuline, le KCl, la noradrénaline à 200 et 500 $\mu\text{g/ml}$, la dobutamine, le midazolam et le fentanyl. Ce mélanges apparaissent en effet incompatibles.

IV. PERSPECTIVES

Le travail pourrait se poursuivre en proposant le dosage analytique des neuf mélanges visuellement compatibles étudiés, pour observer et quantifier une éventuelle perte en amiodarone malgré l'aspect positif des solutions.

Selon le temps imparti il serait indispensable de faire plusieurs nouvelles solutions des lots D,E,F et de procéder au dosage avec des injections plus nombreuses.

A l'aide de la littérature et à différentes techniques analytiques couplées, il serait aussi possible de procéder à l'identification des produits de dégradation engendrés par la lumière.

V. ANNEXES

V.1 INTRODUCTION

Méthode HPLC :formules

Les équations mathématiques permettant de calculer les paramètres chromatographiques définis dans la théorie [33] sont données ci-dessous:

➤ Facteur de rétention:

$$k' = \frac{tr - t0}{t0}$$

avec tr = temps de rétention du composé

t0 = temps de rétention nul, correspondant à l'écoulement du solvant pour parcourir la colonne.

➤ Nombre de plateaux théoriques:

$$N = \frac{41,7 \cdot \left(\frac{tr}{A+B} \right)^2}{\frac{A}{B} + 1,25}$$

avec A et B = demi-largeurs du pic non gaussien à 10% de sa hauteur (A>B), en minutes.

➤ Résolution:

$$Rs = 2 \cdot \frac{tr2 - tr1}{\varpi2 + \varpi1}$$

avec ϖ = largeur du pic à la base

➤ Facteur d'asymétrie:

$$f = \frac{A}{B}$$

➤ Sélectivité:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$$

V.2 VALIDATION

Préparation des solutions :

➤ solutions standard reconstituées (Std 1 à 5)

La composition d'une ampoule de Cordarone® donnée par le fabricant est pour 1 ml :

50 mg de chlorhydrate d'amiodarone

20 mg d'alcool benzylique

100 mg de polysorbate 80

eau pour injectable en quantité suffisante pour 1 ml

Ceci constitue la solution originale de FM qu'il faut diluer 100 fois pour obtenir les solutions mères d'analyse; donc la composition d'une solution mère est de:

0,5 mg/ml d'amiodarone

0,2 mg/ml d'alcool benzylique

1 mg/ml de tween

eau pour injectable ad 1ml

50 ml de solution mère à 0,5 mg/ml d'amiodarone sont constitués selon le tableau suivant.

Tableau 26: constituants utilisés pour la fabrication de solution mère Std

Composition pour 50 ml de Std mère	
Amiodarone	25 mg
Alcool benzylique non dilué	10 μ l
Solution de tween à 1%	5 ml
Eau Millipore	Ad 50 ml

Tableau 27: masse d'amiodarone pesée pour la préparation des solutions mères de Std

Jour de validation	Jour 1	Jour 2	Jour 3
Masse d'amiodarone pesée (mg)	24.47	24.53	25.02

Cette solution mère est diluée de façon à obtenir les concentrations désirées des std 1 à 5 (50 à 150%).

La concentration du 100% d'analyse est fixé à 100 μ g/ml et le domaine de validation s'étend de 50 à 150 % soit 50-75-100-125 et 150 μ g/ml .

Les solutions mères de Std et Rdf étant toutes deux concentrées à 0,5 mg/ml d'amiodarone les mêmes dilutions seront effectuées afin d'obtenir les solutions filles à injecter.

Le solvant diluant est l'acétonitrile et le volume des solutions filles est de 1ml.

Le schéma de dilution suivant est appliqué.

Tableau 28: mode de préparation des solutions filles d'analyse

Pourcentage de la concentration en amiodarone (%)	Concentration en amiodarone (μg/ml)	Volume de solution mère de 0,5 mg/ml à prélever (μl)	Volume d'acétonitrile à ajouter (μl)
50	50	100	900
75	75	150	850
100	100	200	800
125	125	250	750
150	150	300	700

➤ Solutions reconstituées (Rdf 1 à 5)

Une solution mère Rdf à 0,5 mg/ml d'amiodarone est constituée en diluant 500 µl d'une ampoule de Cordarone à 50 mg/ml dans de l'eau millipore à l'aide d'un ballon jaugé de 50 ml.

Cette solution est diluée de la même façon que la solution mère Std, afin d'obtenir les mêmes concentrations (50 à 150 µg/ml). Cf. tableau n° 28 ci-dessus.

➤ Solutions fidélité

Les solutions de fidélité sont constituées à partir de la solution mère Rdf ci-dessus en effectuant six dilutions indépendantes identiques.

Le tableau suivant résume la préparation de ces solutions fidélité pour la validation.

Tableau 29: mode de préparation des solutions fidélité

Concentration de la solution fidélité (µg/ml)	Volume de solution mère de 0,5 mg/ml à prélever (µl)	Volume d'acétonitrile à ajouter (µl)
100	200	800

V.3 PARAMETRES DE L'ETUDE DE STABILITE

Préparations des échantillons de dosage

V.3.1 Partie 1

Préparation des solutions

Les solutions mères à 0,5 mg/ml sont préparées en diluant 500 µl de chaque seringue à 50 mg/ml dans 50 ml d'eau, puis les solutions filles d'analyse à 0,1 mg/ml sont préparées en diluant 200 µl de ces solutions mères dans 1ml acétonitrile.

V.3.2 Partie 2

1) Préparation des seringues des lots D, E, F

Par dilution d'ampoules de Cordarone® à 50mg/ml dans du G5% six solutions mères de 50ml chacune aux six concentrations nécessaires sont réalisées.

Pour les trois lots D, E, F cela représente au total 18 seringues.

Tableau 30: mode de préparation des solutions mères

Concentration de la solution mère désirée (mg/ml)	Volume de solution de Cordarone® à prélever (ml) et à diluer dans 50 ml de G5%
0.6	0.6
5	5
9.375	9.375
12.5	12.5
18.75	18.75
25	25

2) Préparation des solutions de dosage

Lors du dosage, les solutions mères contenues dans les seringues doivent être diluées afin d'être dans le domaine d'étude, à la concentration du 100% valant 0,1 mg/ml.

Ainsi les solutions filles à 0,1 mg/ml ou solutions d'analyse à injecter, sont préparées en diluant les seringues dans du G5% selon le schéma du tableau ci-dessous.

Tableau 31: mode de préparation des solutions d'analyse pour les lots D, E, F

Concentration de la solution mère (mg/ml)	Volume de solution mère à prélever (µl)	Volume final de la solution fille (ml)	Concentration exacte obtenue (mg/ml)
0.6	500	3	0.100
5	400	20	0.100
9.375	215	20	0.101
12.5	160	20	0.100
18.75	110	20	0.103
25	400	100	0.100

V.3.3 Partie 3

1) Mode de préparation des mélanges

Tableau 32: plan d'échantillonnage et préparation des dilutions

Mélange n° (Série A ou B)	Médicament X	Médicament Y	Mode de préparation des solutions M et 2M
1	Cordarone® C _A ou C _B selon la série	Perlinganit®	M= quantité nécessaire de la solution pure de Perlinganit à 1mg/ml. Pour ce médicament il n'y a pas de solution 2M.
2	idem	Actrapid®	M= 0,5 ml d'Actrapid + 49,5 ml de NaCl 0,9% 2M= 1 ml d'Actrapid + 49,5 ml de NaCl 0,9%
3	idem	KCl 14,9% (Braun)®	M= 30 ml de KCl + 30 ml de Glucose 5% 2M= 60 ml de KCl + 30 ml de Glucose 5%
4	idem	Artérenol® 5mg	M= 5 ml d'Artérenol ad 50 ml de Glucose 5% 2M= 10 ml d'Artérenol ad 50 ml de Glucose 5%
5	idem	Artérenol® 10mg	M= 10 ml d'Artérenol ad 50 ml de Glucose 5% 2M= 20 ml d'Artérenol ad 50 ml de Glucose 5%
6	idem	Artérenol® 25mg	M= 25 ml d'Artérenol ad 50 ml de Glucose 5% 2M= quantité nécessaire de l'ampoule pure
7	idem	Dobutrex®	M= 20 ml de Dobutrex + 5 ml de Glucose 5% 2M= 20 ml de Dobutrex + 2,5 ml de Glucose 5%
8	idem	Dormicum®	M= 10 ml de Dormicum ad 50 ml de Glucose 5% 2M= 20 ml de Dormicum ad 50 ml de Glucose 5%
9	idem	Fentanyl HUG	M= 10 ml de Fentanyl ad 50 ml de Glucose 5% 2M= 20 ml de Fentanyl ad 50 ml de Glucose 5%

2) Références des médicaments utilisés pour l'étude de la troisième partie

Tableau 33: références et caractéristiques des médicaments utilisés

Principe actif	Spécialité	Propriétés	Numéro de lot	Date d'expiration	Distributeur
nitroglycérine	Perlinganit®	Vasodilatateur coronarien pour le traitement intensif de l'infarctus et de l'insuffisance cardiaque gauche aigüe	4379804	01/2006	Pharmacia AG 8600 Dübendorf
insuline	Actrapid® HM	Insuline humaine d'action rapide et de courte durée. Antidiabétique	NW 50356	03/2005	Novo Nordisk Pharma AG, CH-8700 Küsnacht
KCl	KCl 14,9% (Braun)®	Apport potassique substitutif en cas d'alcalose métabolique	3032C34	12/2005	B.Braun Medical AG, CH-6020 Emmenbrücke
noradrénaline	Artéréinol®	Vasoconstricteur, sympathomimétique	40A059	08/2005	Aventis Pharma Deutschland GmbH, D-65926 Frankfurt
dobutamine	Dobutrex®	Cardiotonique :inotrope et chronotrope positif, β_1 sympathomimétique	Z27277	10/2003	Eli Lilly S.A Vernier (Ge)
midazolam	Dormicum®	Hypnotique à brève durée d'action, destiné à la prémédication, à la sédation, l'induction et au maintien de l'anesthésie.	B1125	10/2007	Roche Pharma AG, 4153 Reinach
fentanyl	Fentanyl HUG 0,05mg/ml®	Analgésique opiacé puissant, stupéfiant	200 1A14/3-1	06/2003	Pharmacie HUG Genève
Chlorure de sodium	NaCl 0,9%®	Utilisé ici comme diluant	1510303	03/2006	Labo.Bichsel AG, CH-3800 Interlaken
glucose	Glucose 5%®	Utilisé ici comme diluant	03012010	01/2006	Bioren S.A, Couvét (NE)

V. 4 RESULTATS

V. 4. 1 Mise au point de la méthode

Recherche de composition de la phase mobile.

Influence du pourcentage d'acétonitrile et du pH du tampon.

Certains chiffres du tableau diffèrent énormément d'une formulation à l'autre mais ils ont pourtant été reportés directement des chromatogrammes. Voir les exemples pages suivantes (figures 13 à 16 pp. 67a –67d)

Tableau 34: résultats de l'étude des 9 systèmes

SYSTEMES										
	1	2	4	5	6	7	8	3	9	
% ACN	60	40	70	70	60	50	50	50	50	
pH tampon	3	3	3	7	7	4.2	3.4	3	2.55	
PA	T ₀ (min)	0.80	0.80	0.95	0.80	0.83	0.81	0.84	0.90	0.85
	Rt (min)	2.91	Tr > 30 minutes abandon	1.76 trop rapide	36.35 abandon	Tr > 50 minutes abandon	12.11	7.71	6.89	8.96
	K'	2.63		0.85	39.39		13.95	8.17	6.65	9.54
	N	2544		1502	8130		11277	2774	2661	3992
	Asym.	1.54		?	1.26		2.55	2.42	2.08	2.11
	Rés.	1.58 minimum		-	-		-	6.88	2.86 minimum	-
FM	T ₀ (min)	0.80		0.95	0.80		0.81	0.84	0.90	0.85
	Rt (min)	2.88		2.83			11.12	8.96	6.82	8.77
	K'	2.6		1.98			12.73	9.67	6.58	9.32
	N	1500		1601			8336	2835	2121	2930
	Asym	2.33		1.74			2.78	2.98	2.54	2.38
	Rés.	2.48		2.49			-	-	5.41	-

➤ Influence du débit de la phase mobile

Tableau 35: optimisation du débit

Systèmes		a	b	c
% ACN		50	50	50
pH tampon		2,50	2,50	2,5
PA	T0 (min)	0,87	0,74	0,6
	Rt (min)	8,75	5,92	4,75
	K'	9,05	7	6,91
	N	3447	2567	2359
	Asym.	1,85	1,62	1,58
FR	T0 (min)	0,87	0,74	0,6
	Rt (min)	8,35	5,81	4,72
	K'	8,59	6,86	6,87
	N	2157	2123	2070
	Asym	2,81	2,1	1,63
Débit (ml/min)		1	1,2	1,5

Cf. Quelques exemples de chromatogrammes pages suivantes
(figures 17 à 19 pp. 69a–69c).

V.4.2 Etude de spécificité

- Etude de dégradation accélérée

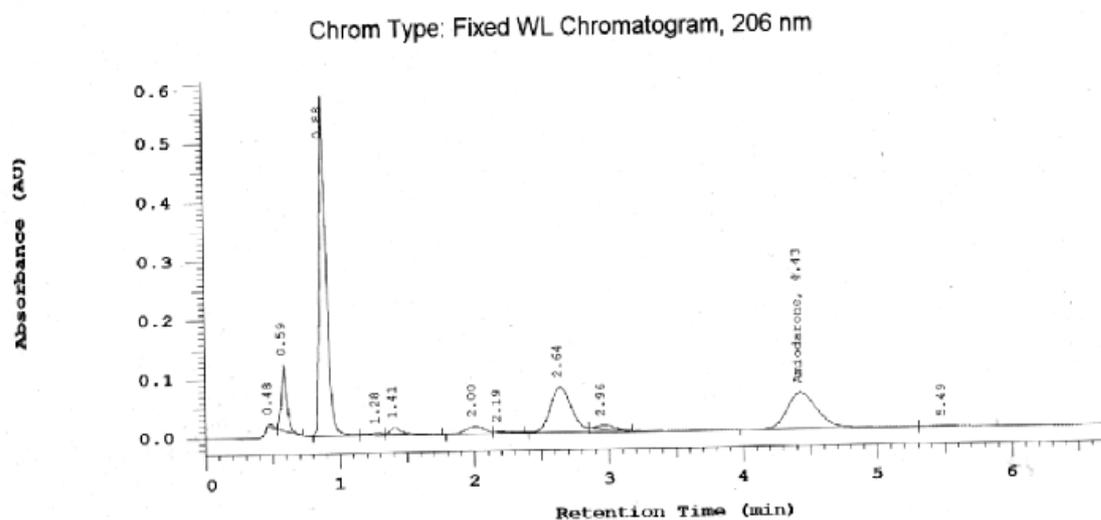
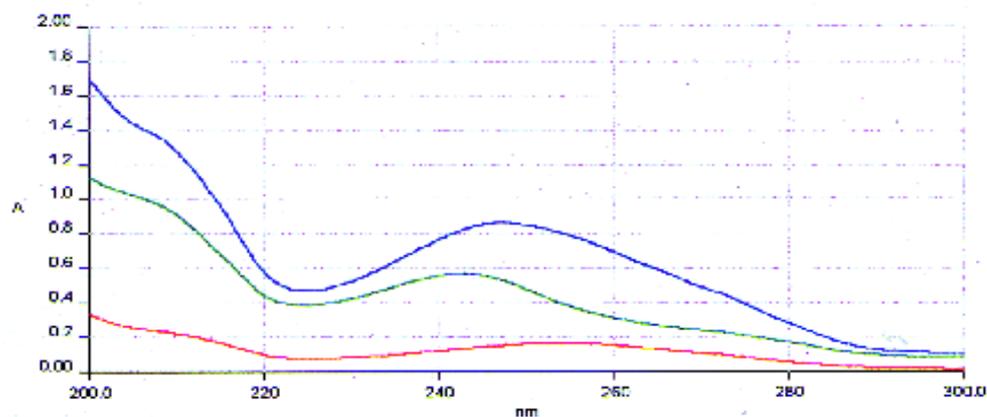


Figure 20: chromatogramme HPLC de Cordarone à la lumière du jour pendant 1 mois



Bleu : Cordarone 10 µg/ml préparée extemporanément
Vert : Cordarone 10 µg/ml laissée à la lumière du jour pendant 30 jours
rouge : Cordarone 10 µg/ml laissée à la lumière du jour pendant 46 jours

Figure 21: Spectres UV de Cordarone extemporanée + Cordarone lumière du jour pendant 30 jours et 46 jours.

- Tween et effet mémoire

Cf. figures 22 à 27 pp. 70a-70f

V. 5 ROBUSTESSE

Coefficients des différents facteurs

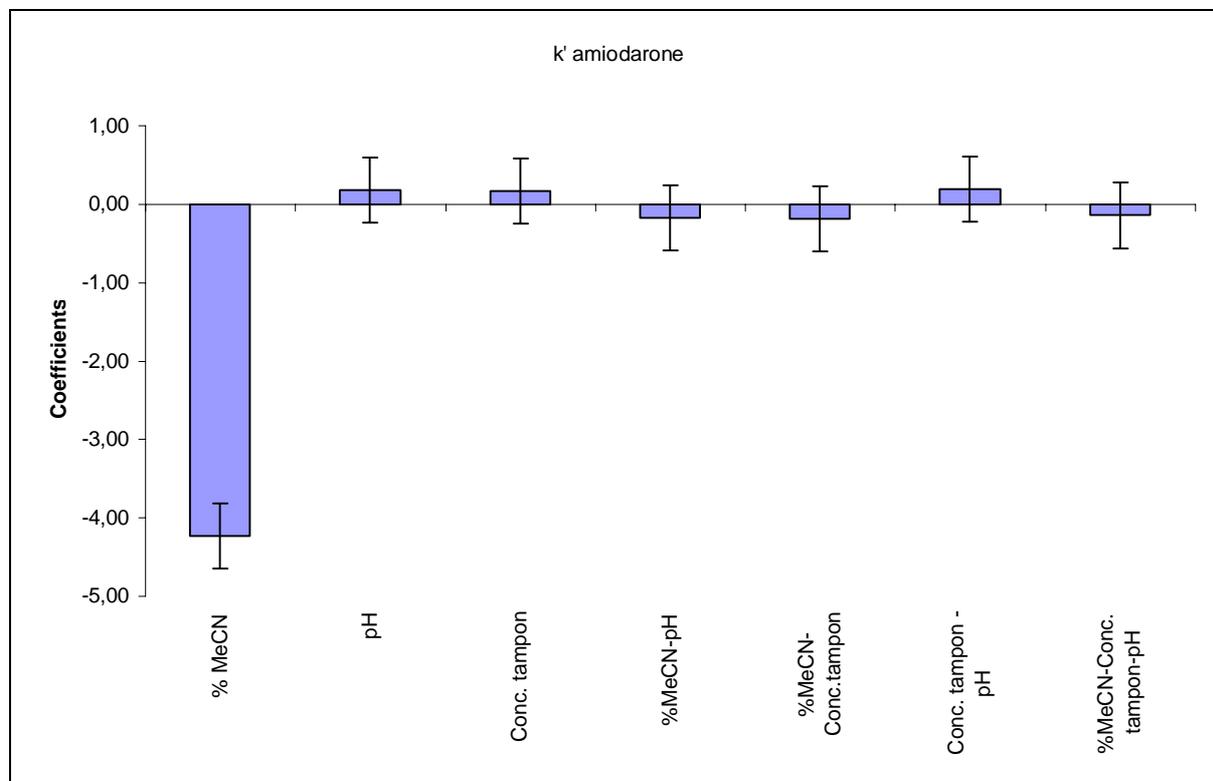


Figure 28: résultats des k'

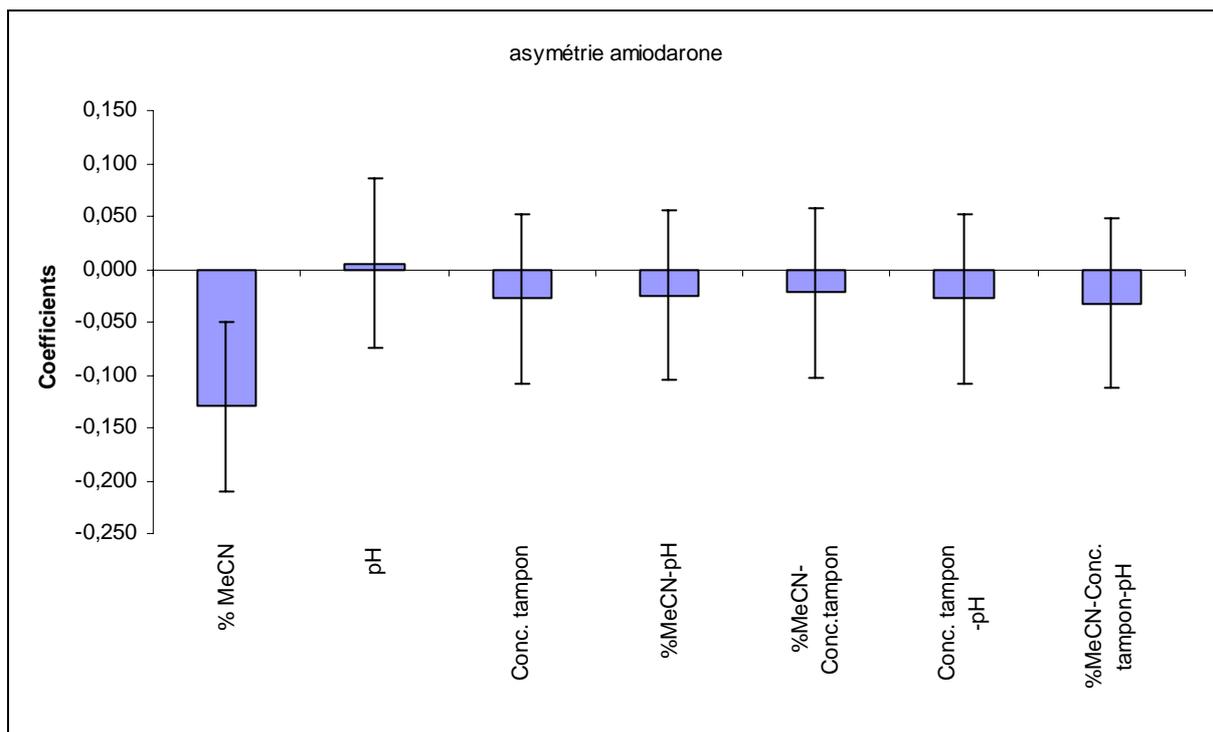


Figure 29: résultats des asymétries

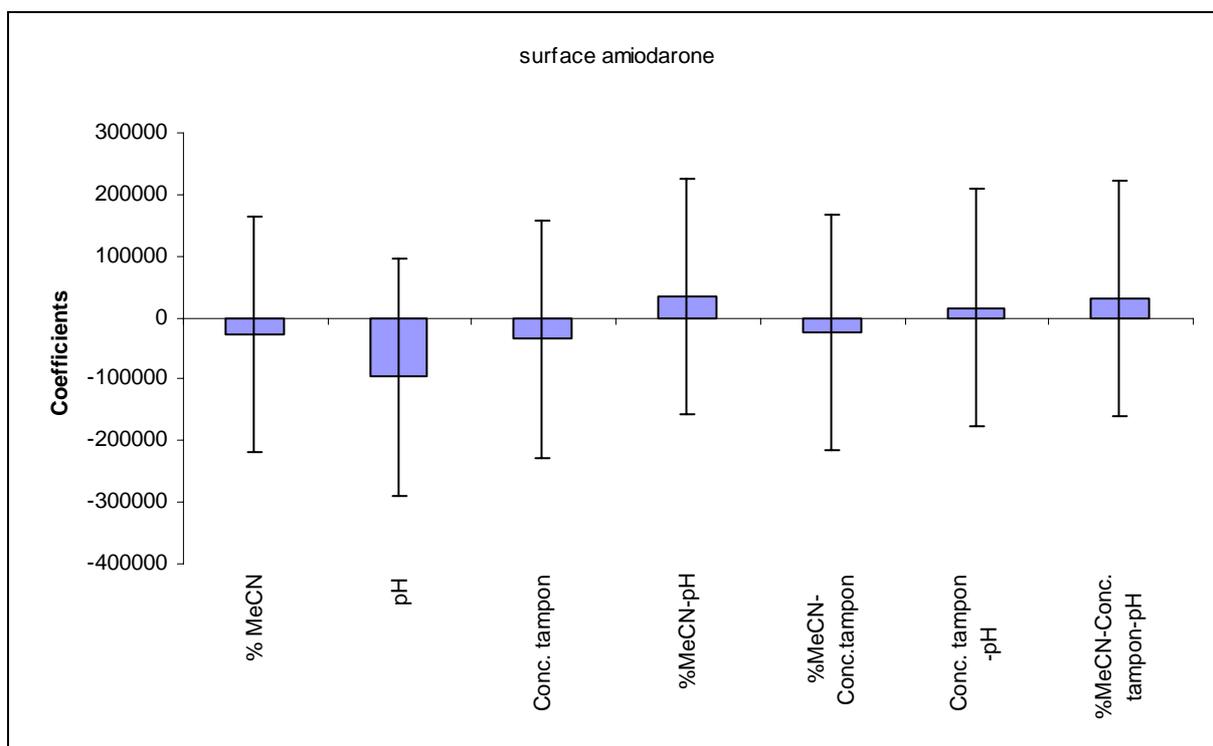


Figure 30: résultats des surfaces

➤ Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont permis d'avancer lors de cette étude et d'arriver à conclure ce travail de diplôme. Plus particulièrement :

Monsieur Bonnabry pour m'avoir acceptée dans son service et m'avoir ainsi permis d'effectuer ce travail de diplôme, Monsieur Ing pour m'avoir guidée à l'intérieur du laboratoire de la pharmacie, Madame Sautter pour m'avoir expliqué toute la partie clinique du travail et intégrée lors de ses visites du service des Soins Intensifs de Médecine, Madame Roulin pour m'avoir gentiment accueillie dans son service et expliqué le fonctionnement des SIM, Messieurs Veuthey et Rudaz pour leur collaboration et leur aide précieuse dans la poursuite de ce travail, Monsieur Saadi pour son soutien moral et son aide technique au sein du laboratoire de la pharmacie, Monsieur Sadeghipour pour son aide aux calculs, Monsieur Schelling pour m'avoir aidée concernant la validation de la méthode et pour son soutien moral, Madame Stella pour m'avoir soutenue et apporté son aide. Merci à toutes ces personnes pour le temps qu'elles m'ont accordé et les précieux conseils qu'elles m'ont dispensés.