

**Université de POITIERS**  
**Faculté de Médecine et de Pharmacie**

**ANNEE 2014**

**Thèse n°**

**THESE**  
**POUR LE DIPLOME D'ETAT**  
**DE DOCTEUR EN PHARMACIE**  
(arrêté du 17 juillet 1987)

présentée et soutenue publiquement  
le 14 novembre 2014 à POITIERS  
par Madame ROUSSEAU épouse ROBIN Hélène  
née le 29 juin 1989

Mise au point d'une suspension buvable  
d'hydrochlorothiazide

Composition du jury :

Président : Monsieur DUPUIS Antoine, MCU-PH au CHU de Poitiers

Membres : Madame GRIGNON Claire, AHU au CHU de Poitiers

Madame BEUZIT Karine, PH au CHU de Poitiers

Monsieur BIAIS-SAUVÊTRE Bernard, Pharmacien

Directeur de thèse : Mme GRIGNON Claire, AHU au CHU de Poitiers



**PHARMACIE**

**Professeurs**

- CARATO Pascal, Chimie Thérapeutique
- COUET William, Pharmacie Clinique
- FAUCONNEAU Bernard, Toxicologie
- GUILLARD Jérôme, Pharmaco chimie
- IMBERT Christine, Parasitologie
- LEVESQUE Joël, Pharmacognosie
- MARCHAND Sandrine, Pharmacocinétique
- OLIVIER Jean Christophe, Galénique
- PAGE Guylène, Biologie Cellulaire
- RABOUAN Sylvie, Chimie Physique, Chimie Analytique
- SARROUILHE Denis, Physiologie
- SEGUIN François, Biophysique, Biomathématiques

**Maîtres de Conférences**

- BARRA Anne, Immunologie-Hématologie
- BARRIER Laurence, Biochimie
- BODET Charles, Bactériologie
- BON Delphine, Biophysique
- BRILLAULT Julien, Pharmacologie
- CHARVET Caroline, Physiologie
- DEBORDE Marie, Sciences Physico-Chimiques
- DEJEAN Catherine, Pharmacologie
- DELAGE Jacques, Biomathématiques, Biophysique
- DUPUIS Antoine, Pharmacie Clinique
- FAVOT Laure, Biologie Cellulaire et Moléculaire
- GIRARDOT Marion, pharmacognosie, botanique, biodiversité végétale
- GREGOIRE Nicolas, Pharmacologie
- HUSSAIN Didja, Pharmacie Galénique
- INGRAND Sabrina, Toxicologie
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile Pharmaco chimie

- PAIN Stéphanie, Toxicologie
- RAGOT Stéphanie, Santé Publique
- RIOUX BILAN Agnès, Biochimie
- TEWES Frédéric, Chimie et Pharmaco chimie
- THEVENOT Sarah, Hygiène et Santé publique
- THOREAU Vincent, Biologie Cellulaire
- WAHL Anne, Chimie Analytique

**PAST - Maître de Conférences Associé**

- DELOFFRE Clément, Pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwin, Pharmacien

**Professeur 2<sup>nd</sup> degré**

- DEBAIL Didier

**Maître de Langue - Anglais**

- PERKINS Marguerite,

## **Remerciements**

**A mon président de thèse, Monsieur Antoine DUPUIS, *MCU-PH au CHU de Poitiers,***

Pour l'honneur que vous me faites de présider cette thèse, veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

**A ma directrice de thèse, Claire GRIGNON, *AHU au CHU de Poitiers,***

Pour m'avoir proposé ce sujet, pour avoir accepté de diriger ce travail et pour le temps que vous m'avez accordé malgré votre planning chargé et les délais impartis, veuillez trouver ici mes sincères remerciements. Merci de m'avoir soutenue et accompagnée tout au long de ce travail, j'en garderai un excellent souvenir.

**Aux membres du jury :**

**Madame Karine BEUZIT, *PH au CHU de Poitiers,***

Pour l'honneur que vous me faites de siéger parmi les membres du jury, veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

**Monsieur Bernard BIAIS-SAUVÊTRE, *Pharmacien d'officine à Couhé,***

Pour l'honneur que vous me faites de siéger parmi les membres du jury, veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance. Un grand merci pour tous vos précieux conseils et pour tout ce que vous m'avez appris durant les différents stages que j'ai pu effectuer au sein de votre officine.

**Mes remerciements s'adressent également :**

**Aux préparateurs du service de Pharmacotechnie de la Pharmacie du CHU de Poitiers,**

Un merci particulier à Sandrine pour m'avoir aidée à la réalisation de certaines étapes de cette étude.

**Aux internes en Pharmacie du service de Pharmacotechnie de la Pharmacie du CHU de Poitiers,**

Merci particulièrement à Karen et Steve pour votre aide durant ces quelques mois, et pour toutes les fois où je vous ai sollicités. Bonne continuation à vous !

## **Je dédie cette thèse :**

### **A toute ma famille,**

Merci de m'avoir soutenue durant toutes ces années.

### **A mes parents,**

Merci d'avoir été là pour moi tout au long de mes études, dans les moments difficiles, comme dans les plus heureux. Vous m'avez toujours aidée et soutenue et je vous en suis très reconnaissante. Maintenant, vous allez pouvoir souffler, je vais enfin pouvoir voler de mes propres ailes !

### **A mes sœurs,**

Pour ces petits moments de folie qui font du bien quand la fatigue et le stress nous envahissent parfois.

### **A mes amies de fac,**

Laetitia, Fanny, Saritha, Lise-Amélie et Lucie, pour ces belles années passées à vos côtés, que ce soit dans les amphis, en salle de TP, ou en soirée. Merci pour ces parties de rire et pour votre aide en période d'examens. Maintenant, terminée la vie étudiante, j'espère néanmoins que nous ne nous perdrons pas de vue et que d'autres soirées ensemble resteront à venir.

### **A ma belle-famille,**

Merci à vous de m'avoir soutenue pendant ces 6 années.

### **A David,**

Merci à toi d'être toujours là pour moi. Même si ces 6 années ont été difficiles par moment, tu as toujours su trouver les mots pour me reconforter et m'encourager. Merci d'avoir supporté mes sautes d'humeur et d'être toujours resté à mes côtés. Tu vas enfin pouvoir souffler, parce que cette fois, ça y est, c'est terminé !

# Sommaire

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>7</b>
<b>I. GENERALITES .....</b>	<b>10</b>
A. LES PREPARATIONS .....	10
1. Définitions .....	10
2. Les Bonnes Pratiques de Préparation.....	11
3. L'étiquetage .....	12
B. LA DYSPLASIE BRONCHO-PULMONAIRE .....	16
1. Définition.....	16
2. Epidémiologie.....	16
3. Clinique .....	17
4. Prise en charge thérapeutique.....	17
5. Evolution .....	18
C. L'HYDROCHLOROTHIAZIDE .....	18
1. Propriétés physico-chimiques .....	18
2. Propriétés pharmacocinétiques.....	19
3. Mécanisme d'action.....	19
4. Effets indésirables .....	20
5. Place de l'hydrochlorothiazide dans la prise en charge de la dysplasie broncho-pulmonaire.....	20
6. Posologie.....	21
<b>II. MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>21</b>
A. MISE AU POINT ET VALIDATION DE LA METHODE DE DOSAGE PAR HPLC-UV.....	21
1. Mise au point des conditions chromatographiques et UV.....	21
2. Protocole de dosage .....	25
3. Validation .....	27
a) Spécificité.....	28
b) Linéarité .....	29
c) Fidélité.....	31
d) Justesse/Exactitude.....	32
e) Limite de détection et limite de quantification.....	33
B. ETUDE DE LA FAISABILITE DE LA PREPARATION.....	33
1. Excipients disponibles et formulation .....	33

2.	<i>Etude de l'homogénéité par HPLC-UV</i> .....	35
C.	ETUDE DE STABILITE .....	36
1.	<i>La stabilité chimique</i> .....	36
2.	<i>La stabilité physique</i> .....	36
<b>III.</b>	<b>RESULTATS</b> .....	<b>38</b>
A.	VALIDATION DE LA METHODE DE DOSAGE PAR HPLC-UV .....	38
1.	<i>Spécificité</i> .....	38
2.	<i>Linéarité</i> .....	42
3.	<i>Fidélité/Précision</i> .....	43
4.	<i>Justesse/Exactitude</i> .....	44
B.	ETUDE DE LA FAISABILITE DE LA PREPARATION.....	45
1.	<i>Excipients disponibles et formulation</i> .....	45
2.	<i>Etude de l'homogénéité par HPLC-UV</i> .....	46
C.	ETUDE DE STABILITE .....	46
1.	<i>Stabilité chimique</i> .....	46
2.	<i>Stabilité physique</i> .....	48
<b>IV.</b>	<b>DISCUSSION</b> .....	<b>53</b>
	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>57</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>58</b>
	<b>ANNEXES</b> .....	<b>62</b>
	<b>RESUME</b> .....	<b>71</b>

## Introduction

Parmi toutes les spécialités utilisées en France, un faible pourcentage possède l'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) en pédiatrie. Une étude menée entre 1993 et 1996 a permis de montrer que sur l'ensemble des médicaments admis à l'AP-HP (Assistance Publique des Hôpitaux de Paris) seulement 26% avaient l'indication en pédiatrie. Concernant les 74% restant, ils étaient réservés à l'adulte ou contre-indiqués chez l'enfant, ou bien ils ne comportaient aucune donnée pédiatrique. (1)

Plusieurs raisons à cela, tout d'abord l'aspect technique : le développement des médicaments à usage pédiatrique est complexe de par leur formulation galénique particulière, la multiplicité des doses à préparer ou encore la difficulté de pouvoir réaliser des essais cliniques chez l'enfant ; mais aussi l'aspect financier : les médicaments à usage pédiatrique sont peu rentables pour l'industrie pharmaceutique.

Le manque de spécialités destinées à l'usage pédiatrique donne lieu à plusieurs conséquences : l'utilisation de médicaments hors AMM en pédiatrie, ce qui n'est pas sans risque et peut être à l'origine d'effets secondaires, et une augmentation dans les pharmacies à usage intérieur (PUI) du nombre de préparations magistrales à visée pédiatrique. Celles-ci sont pour la majorité des formes orales. Selon une étude menée par la Société Française de Pharmacie Clinique dans 53 hôpitaux français, les formes orales représentaient 87% des préparations magistrales à visée pédiatrique, réparties pour 97% en gélules et pour 3% en formes buvables. (2)

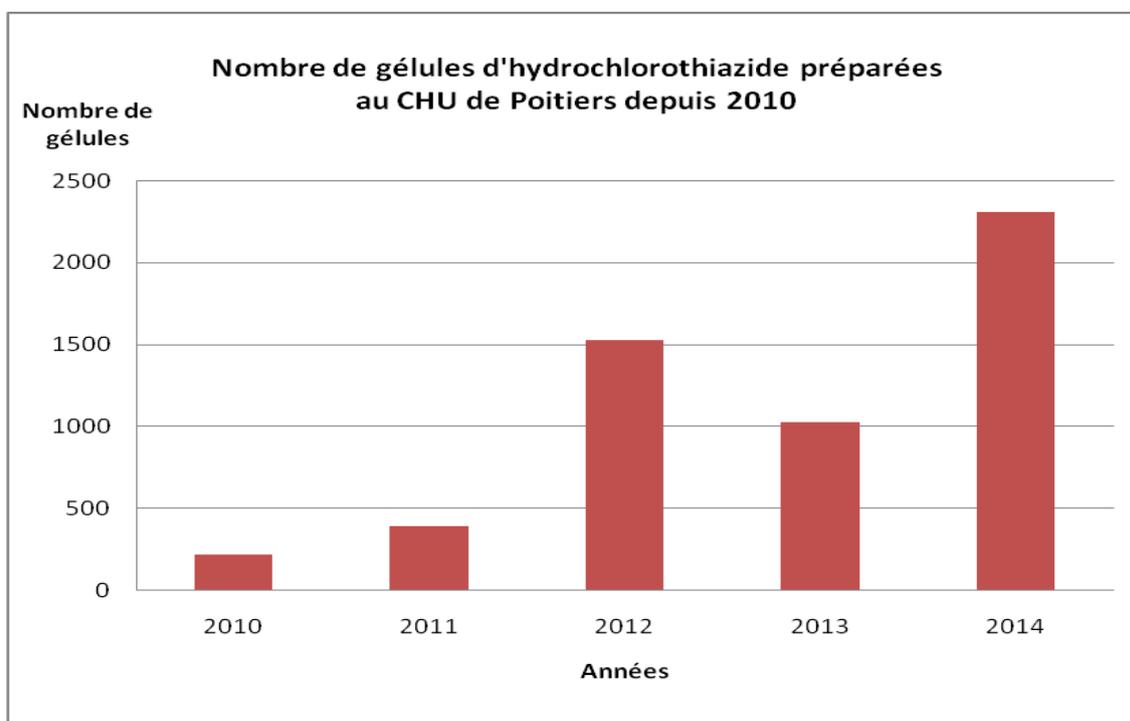
La majorité des préparations magistrales destinées à être utilisées en pédiatrie sont donc sous forme de gélule, ce qui prête réflexion quant à leur administration dans les services de pédiatrie. En effet, l'administration de gélules est inadaptée pour les enfants de moins de 6 ans. Ceci contraint les infirmières, pour les plus jeunes enfants à devoir ouvrir les gélules et à « dissoudre » leur contenu dans de l'eau. Lorsque le dosage est inadapté les infirmières sont parfois obligées de faire des dilutions supplémentaires en prélevant une petite quantité de ce principe actif « dissout » dans l'eau alors que la dissolution initiale n'est pas forcément homogène (tous les principes actifs ne sont pas solubles dans l'eau). Autant de manipulations supplémentaires que de risque d'erreur de dosage par mauvaise solubilisation du principe actif. De plus, les principes actifs « nus » peuvent générer des problèmes de goût (3). La forme gélule pose également soucis aux pharmacies à usage intérieur. En effet, lorsque les gélules sont destinées à des nourrissons, dont le poids évolue rapidement, les posologies doivent être

régulièrement adaptées.

Par conséquent, il faut adapter la dose de principe actif dans les gélules pour chaque enfant, ce qui rend fastidieux leur préparation surtout lorsque plusieurs enfants sont en même temps sous le même traitement.

L'hydrochlorothiazide fait partie de ces principes actifs dont la seule spécialité existante en France, l'Esidrex® (comprimés dosés à 25mg d'hydrochlorothiazide), n'est pas adaptée à l'usage pédiatrique. De plus, aucune Autorisation Temporaire d'Utilisation (ATU) n'existe concernant l'utilisation en pédiatrie de ce principe actif. Afin de répondre aux besoins du service de pédiatrie du CHU de Poitiers, qui utilise l'hydrochlorothiazide notamment dans le cadre de la prise en charge de la Dysplasie Broncho Pulmonaire (DBP) chez les prématurés, le préparatoire de la pharmacie du CHU de Poitiers prépare depuis plusieurs années des gélules d'hydrochlorothiazide. Les préparations de gélules d'hydrochlorothiazide ont été jugées comme indispensables par l'AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé) en 2010 lors de leur rapport d'analyse des préparations hospitalières. (4)

La fabrication de ces gélules est en nette augmentation à la pharmacie depuis 2010 (Figure 1). C'est en 2014 qu'il y a eu le plus grand nombre de gélules d'hydrochlorothiazide préparées.



*Figure 1- Nombre de gélules d'hydrochlorothiazide préparées à la Pharmacie du CHU de Poitiers depuis 2010*

La pharmacie du CHU de Poitiers est confrontée aux mêmes difficultés que celles citées précédemment. En effet, depuis 2010, ce ne sont pas moins de 27 dosages différents qui ont été réalisés (Figure 2). De plus, pour pouvoir pallier aux adaptations posologiques de la pédiatrie, la pharmacie est amenée à refaire des gélules à un dosage différent pour un même enfant.

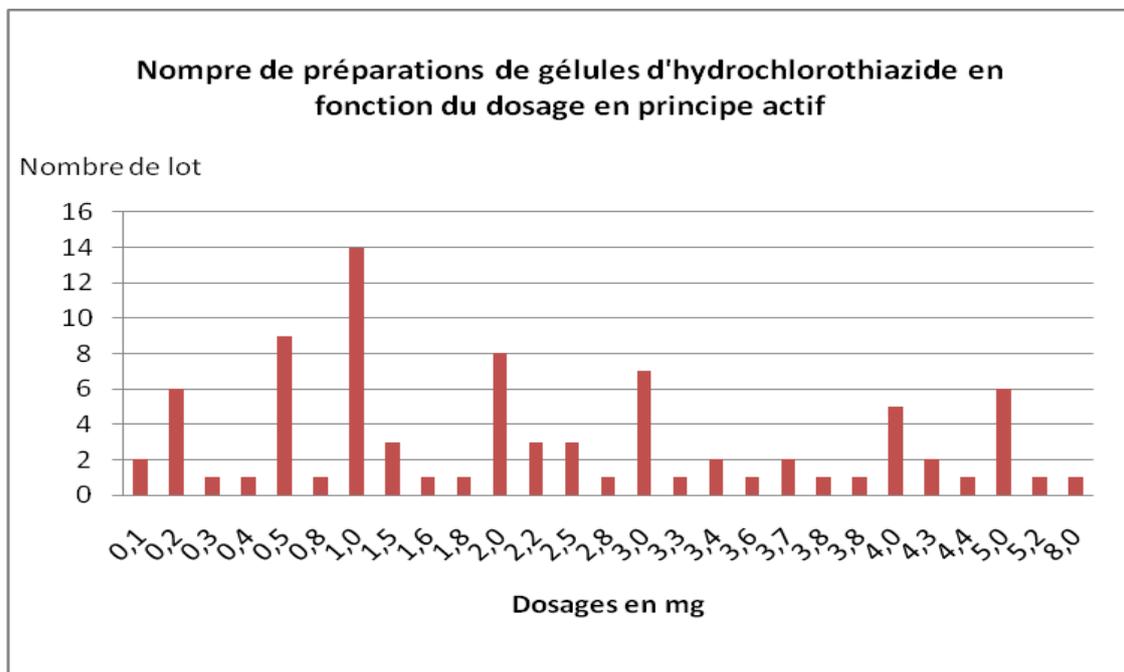


Figure 2- Nombre de préparations de gélules d'hydrochlorothiazide en fonction du dosage en principe actif

L'augmentation du nombre de préparations de gélules d'hydrochlorothiazide, les nombreux dosages préparés, les problèmes d'administration montrent tout l'intérêt de développer une suspension buvable d'hydrochlorothiazide. Cette suspension buvable permettra d'améliorer la sécurité et la qualité de la préparation, mais aussi celles de l'administration. Pour la préparation de suspensions buvables, différents excipients sont disponibles sur le marché, parmi eux, Syrspend<sup>®</sup>, Ora-Sweet<sup>®</sup> et Ora-Plus<sup>®</sup>, ainsi qu'InOrpha<sup>®</sup>.

L'objectif de ce travail est de mettre au point une suspension buvable d'hydrochlorothiazide qui pourra être préparée à l'avance (préparation hospitalière) et disponible à tout moment pour les services de pédiatrie. Afin de répondre à cet objectif et de déterminer une date de péremption, différentes étapes sont nécessaires : mise au point de la méthode de dosage de l'hydrochlorothiazide, étude de faisabilité et étude de stabilité de la préparation.

## I. Généralités

### A. Les préparations

#### 1. Définitions

D'après l'article L5121-1 du code de la santé publique modifié par la loi n° 2013-1203 du 23 décembre 2013 – art.47:

«On entend par :

1° Préparation magistrale, tout médicament préparé selon une prescription médicale destinée à un malade déterminé en raison de l'absence de spécialité pharmaceutique disponible disposant d'une autorisation de mise sur le marché, de l'une des autorisations mentionnées aux articles L. 5121-9-1 et L. 5121-12, d'une autorisation d'importation parallèle ou d'une autorisation d'importation délivrée à un établissement pharmaceutique dans le cadre d'une rupture de stock d'un médicament, soit extemporanément en pharmacie, soit dans les conditions prévues à l'article L. 5125-1 ou à l'article L. 5126-2;

2° Préparation hospitalière, tout médicament, à l'exception des produits de thérapies génique ou cellulaire, préparé selon les indications de la pharmacopée et en conformité avec les bonnes pratiques mentionnées à l'article L. 5121-5, en raison de l'absence de spécialité pharmaceutique disponible ou adaptée disposant d'une autorisation de mise sur le marché, de l'une des autorisations mentionnées aux articles L. 5121-9-1 et L. 5121-12, d'une autorisation d'importation parallèle ou d'une autorisation d'importation délivrée à un établissement pharmaceutique dans le cadre d'une rupture de stock d'un médicament, par une pharmacie à usage intérieur d'un établissement de santé, ou par l'établissement pharmaceutique de cet établissement de santé autorisé en application de l'article L. 5124-9 ou dans les conditions prévues à l'article L. 5126-2. Les préparations hospitalières sont dispensées sur prescription médicale à un ou plusieurs patients par une pharmacie à usage intérieur dudit établissement. Elles font l'objet d'une déclaration auprès de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé, dans des conditions définies par arrêté du ministre chargé de la santé ;

3° Préparation officinale, tout médicament préparé en pharmacie, inscrit à la pharmacopée ou au formulaire national et destiné à être dispensé directement aux patients approvisionnés par cette pharmacie ;» (5)

Les préparations, que ce soient des préparations magistrales, hospitalières ou officinales, sont toutes régies par un seul et même guide, celui des Bonnes Pratiques de Préparation.

## 2. Les Bonnes Pratiques de Préparation

Rédigées par l'ANSM et publiées au Journal Officiel le 21 novembre 2007, elles sont opposables et applicables aussi bien aux pharmacies d'officine (art. L. 5125-1 du CSP) qu'aux Pharmacies à Usage Intérieur (PUI) des établissements de santé (art. L. 5126-5 du CSP).

Elles visent à garantir à la fois la traçabilité, la sécurité et la qualité des préparations.

Ce guide est divisé en quatre parties :

Dans la première, on retrouve un ensemble de généralités qui sont communes aux pharmacies d'officine et aux PUI, avec des informations portant notamment sur les locaux, le personnel qualifié à la réalisation des préparations, la préparation en elle-même (de la réception des matières premières jusqu'à l'étiquetage en passant par le contrôle de la préparation), la gestion de la qualité et la documentation ...

On retrouve dans la seconde partie les dispositions à prendre afin de réaliser dans de bonnes conditions les préparations de médicaments stériles et de médicaments contenant des substances dangereuses pour le personnel et l'environnement.

La troisième partie est réservée aux PUI. En effet, elle traite des médicaments radio pharmaceutiques et des préparations destinées à la recherche biomédicale.

La quatrième est une partie regroupant les documents annexes. L'annexe A porte sur le contenu des documents qui sont nécessaires pour qu'une préparation soit en accord avec les bonnes pratiques de préparation. L'annexe B quant à elle traite des cas particuliers du déconditionnement des spécialités pharmaceutiques. (6)

### 3. L'étiquetage

C'est le décret n°2012-1201 du 29 octobre 2012 qui fixe les règles d'étiquetage des préparations officinales, magistrales et hospitalières. Ce décret est applicable depuis le 1er avril 2013. (7)

L'étiquetage des préparations se fait à partir d'une étiquette sur fond blanc et doit porter différentes mentions dans le but d'identifier précisément la préparation et retracer d'où elle provient. L'ensemble de ces mentions doivent être lisibles, compréhensibles et indélébiles.

Concernant l'identification de la préparation, l'étiquette doit comporter plusieurs informations :

- le nom ou la dénomination de la préparation, le dosage, la forme pharmaceutique et son destinataire

- la composition qualitative et quantitative en substances actives par unité de prise ou selon la forme pharmaceutique, pour un volume ou une masse déterminée

- le contenu en masse, en volume ou en unité de prise

- concernant les formes liquides, les deux mentions précédentes doivent être remplacées par la quantité totale de chaque substance active dans le volume total de la solution et la concentration en unité de masse par volume

- les excipients à action ou effet notoire

- la voie d'administration

- le mode d'administration

S'agissant des mentions relatives au numéro de lot et à la traçabilité, l'étiquette doit comporter diverses informations telles que :

- le numéro de lot de la préparation

- le numéro d'enregistrement de la préparation qui figure sur le livre-registre ou dans le système informatisé

- la date limite d'utilisation

- les précautions de conservation

- le nom et l'adresse de la pharmacie d'officine ou de la PUI ayant réalisé et dispensé la préparation ou bien le nom et l'adresse de l'établissement pharmaceutique ayant réalisé la préparation

D'autres mentions peuvent être ajoutées telles que :

- « Respecter les doses prescrites » en caractères noirs sur fond rouge et « Uniquement sur ordonnance » en caractères noirs sur fond blanc lorsqu'il s'agit de substances vénéneuses
- « Ne pas avaler » lorsque la voie d'administration est différente de la voie orale, sublinguale, perlinguale ou injectable
- « ATTENTION – SOLUTION HYPERTONIQUE » en caractères gras et noirs sur fond bleu clair pour les solutions injectables hypertoniques, perpendiculairement aux autres mentions. (8)

Afin de faciliter l'étiquetage des préparations et l'application de ce décret, l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé) a réalisé quatre logigrammes permettant d'accéder facilement au modèle d'étiquette souhaité ainsi qu'aux mentions qui doivent y figurer (7) :

- Logigramme A (Figure 3) : Etiquetage d'une préparation administrée directement aux patients (hormis le cas des préparations sous forme d'ampoules ou autres petits conditionnements primaires),
- Logigramme B : Etiquetage d'une préparation administrée directement au patient se présentant sous forme d'ampoule ou autre petit conditionnement primaire,
- Logigramme C : Etiquetage d'une préparation non destinée à être administrée directement au patient et utilisée pour la réalisation d'autres préparations (hormis le cas des préparations sous forme d'ampoules ou autres petits conditionnements primaires),
- Logigramme D : Etiquetage d'une préparation non destinée à être administrée directement au patient et utilisée pour la réalisation d'autres préparations se présentant sous forme d'ampoule ou autre petit conditionnement primaire.

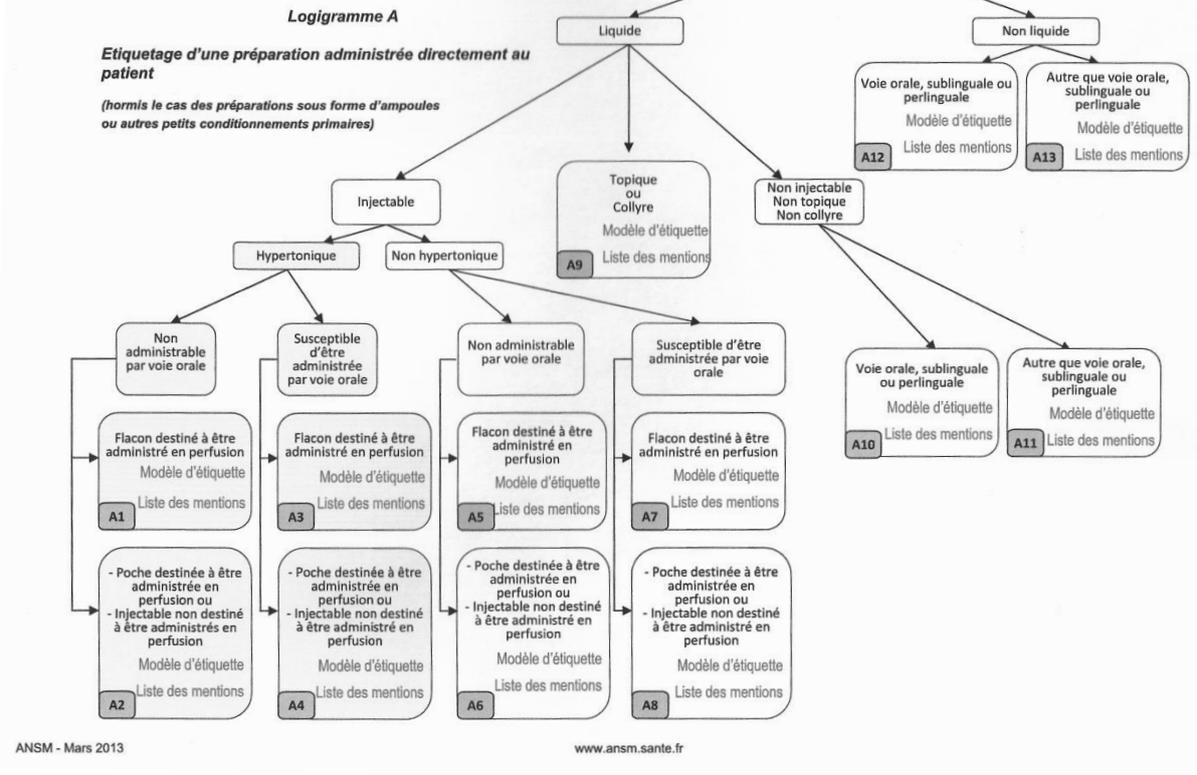


Figure 3 - Étiquetage d'une préparation, administrée directement au patient

Exemple de recherche de l'étiquetage pour une suspension buvable :

Il s'agit d'une préparation magistrale ou hospitalière, sous forme liquide, qui n'est ni un injectable, ni un topique, ni un collyre, et qui est destinée à être administrée par voie orale. Le logigramme réalisé par l'ANSM nous renvoie donc au modèle d'étiquette et à la liste des mentions A10.

## Exemple d'étiquetage A10

Préparation administrée directement au patient, liquide, hors préparation injectable, hors préparation topique et hors collyre, administrée par voie orale, sublinguale ou perlinguale (hors cas particulier des préparations se présentant sous forme d'ampoules ou autres petits conditionnements primaires)

<p><b>Dénomination de la préparation</b>  <b>2,4 g – 100 mL</b>  <b>24 mg/mL</b>  <b>Suspension buvable - Voie orale</b></p> <p>Préparation réservée à l'enfant de 15 à 24 Kg</p> <p>Substance active.....2,4 g                  Excipients.....qsp 100 mL</p> <p>Excipients à effet notoire : excipient 1, excipient 2, excipient 3.</p> <p>A conserver 14 jours après ouverture</p>	<p>Pharmacie de l'ANSM                  143-147 bd Arriola France                  93265 Saint Denis Cedex</p> <p>Lot 00F000                  EXP 000000</p> <p>Numéro d'enregistrement</p>
---	---

Figure 4 - Exemple d'étiquette d'une suspension buvable

### PRÉPARATION ADMINISTRÉE DIRECTEMENT AU PATIENT :

Préparation liquide hors préparation injectable, hors préparation topique et hors collyre, administrée par voie orale, sublinguale ou perlinguale (hors cas particulier des préparations se présentant sous forme d'ampoules ou autres petits conditionnements primaires)

### Etiquette A10

<p>Nom de la préparation</p> <p>Dosage = Concentration : en unités de masse par volume</p> <p>Quantité totale de chaque substance active dans volume total solution</p> <p>Forme pharmaceutique</p> <p>Le cas échéant : mention du destinataire</p> <p>Excipients à effet notoire</p> <p>Voie d'administration</p> <p>Mode d'administration, si nécessaire</p> <p>Numéro de lot</p> <p>Numéro d'enregistrement attribué lors de la dispensation de la préparation</p> <p>Date limite utilisation</p> <p>Précautions de conservation, si nécessaire</p> <p>Nom et adresse de la pharmacie ayant réalisé et dispensé la préparation</p>
<p>En cas de sous-traitance :</p> <p>Nom et adresse de la pharmacie ou de l'établissement pharmaceutique ayant réalisé la préparation et</p> <p>Nom et adresse de la pharmacie ayant dispensé la préparation (contre étiquette possible)</p>
<p>Pour les préparations contenant des substances vénéneuses</p> <p style="text-align: center;"><b>Respecter les doses prescrites</b>                  Uniquement sur ordonnance</p>

Figure 5 - Liste des mentions de l'étiquette A10

## B. La dysplasie broncho-pulmonaire

### 1. Définition

La dysplasie broncho-pulmonaire (DBP) est une des complications les plus fréquentes et la principale séquelle respiratoire de la grande prématurité. Elle est caractérisée par un arrêt et une altération du développement alvéolaire pulmonaire chez les nouveau-nés prématurés exposés à une ventilation prolongée et une oxygénothérapie intense. (9)

Le diagnostic et la sévérité de la DBP sont déterminés en fonction du degré d'oxygéo-dépendance à 36 semaines d'aménorrhée. (10)

### 2. Epidémiologie

Devant les progrès considérables de la réanimation néonatale, l'incidence de la DBP a considérablement diminué jusqu'à atteindre un plateau depuis quelques années. A titre d'exemple, en Île de France, le taux moyen de DBP s'élève à 13,8%, et en Europe, il varie entre 10,5 et 21,8% selon les pays. (10)

Les facteurs de risque de la DBP sont multiples

- le degré de prématurité (plus il est important, plus le risque de DBP augmente)
- le poids (plus il est faible, plus le risque est augmenté)
- le sexe masculin
- la durée et le degré d'exposition à l'oxygène
- l'inflammation ante et post-natale
- certains agents infectieux des voies aériennes tels que Urea plasma urealyticum ou Adénovirus
- les infections bactériennes post-natales précoces ou tardives
- la persistance du canal artériel
- des apports hydro-sodés excessifs au cours des premiers jours de vie
- chorioamniotite

Des facteurs moléculaires présentant des anomalies ont également pu être mis en évidence à partir de modèles animaux ou chez le prématuré humain tels que :

- certaines métalloprotéinases (qui permettent le développement alvéolaire et le remodelage de la matrice extracellulaire)
- le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) qui joue un rôle important dans l'alvéolisation et la maturation micro vasculaire

### 3. Clinique

La DBP est caractérisée par un ensemble de lésions histologiques au niveau pulmonaire à l'origine d'une insuffisance respiratoire prolongée et sévère (11) :

- hypoplasie alvéolaire (alvéoles peu nombreuses, larges et simplifiées)
- diminution du nombre de capillaires, avec des vaisseaux dystrophiques
- lésions épithéliales des voies aériennes
- hyperplasie variable des muscles lisses des voies aériennes
- fibro-prolifération interstitielle variable

### 4. Prise en charge thérapeutique

Les traitements préventifs ante et périnataux :

- la corticothérapie anténatale (de façon à accélérer la maturation pulmonaire)
- l'administration d'un surfactant pulmonaire exogène à la naissance
- la mise en place d'une stratégie ventilatoire en salle de naissance qui soit la plus performante mais aussi la moins agressive possible

Les traitements préventifs post-nataux :

- l'oxygénothérapie (qui doit être contrôlée de par la toxicité de l'oxygène)
- la mise en place d'une stratégie ventilatoire non invasive
- le NO (monoxyde d'azote) inhalé (afin de prévenir les troubles de l'alvéolisation)
- la caféine (qui permettrait de diminuer à la fois la durée de la ventilation et de l'oxygénation, ainsi que le taux de DBP à 36 SA)

En ce qui concerne la corticothérapie systémique, elle n'est plus recommandée, et est même fortement déconseillée puisqu'elle entraîne de nombreux effets indésirables ainsi que des effets néfastes sur le développement neurocognitif des nouveau-nés.

Les traitements curatifs, une fois le diagnostic de la DBP posé :

- l'oxygénothérapie
- les bronchodilatateurs et les corticoïdes inhalés en cas d'hyperréactivité bronchique et si les effets sont bénéfiques
- la kinésithérapie si nécessaire
- l'antibiothérapie en cas d'infections pulmonaires
- la corticothérapie systémique dans le sevrage de l'oxygénothérapie
- l'hydrochlorothiazide ou la spironolactone en cas de rétention hydrosodée, et d'oedèmes.

Afin de limiter les agressions du système respiratoire du nouveau-né, les vaccinations anti-grippales et anti-pneumococciques sont fortement recommandées ainsi que l'injection de palivizumab (Synagis<sup>®</sup>) pour prévenir les infections à VRS (Virus Respiratoire Syncytial). (10)

## 5. Evolution

Au-delà des deux premières années de vie, il peut persister certaines manifestations respiratoires telles qu'une toux fréquente ou encore une respiration sifflante.

Selon diverses études, il a été montré que les voies aériennes des anciens prématurés ayant souffert d'une DBP étaient obstruées de façon durable. Ceci pourrait être expliqué par la diminution du calibre des voies aériennes qui en plus d'entraîner cette obstruction est aussi à l'origine de l'hyperréactivité bronchique. Les bronchodilatateurs inhalés permettent de rendre réversible cette obstruction, mais que partiellement. (10)

### C. L'hydrochlorothiazide

#### 1. Propriétés physico-chimiques

Structure chimique de l'hydrochlorothiazide ou 6-Chloro-3,4-dihydro-2H-1, 2, 4-benzothiadiazine-7-sulfonamide 1,1-dioxyde :

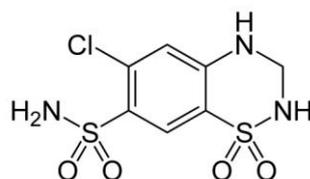


Figure 6- Structure chimique de l'hydrochlorothiazide

L'hydrochlorothiazide se présente sous la forme d'une poudre blanche cristalline, sans odeur particulière. Sa formule brute est  $C_7H_8ClN_3O_4S_2$ , sa masse molaire est de  $297,7 \text{ g.mol}^{-1}$ .

Elle est pratiquement insoluble dans l'eau, le chloroforme et l'éther, et est peu soluble dans l'alcool. Elle est cependant soluble dans l'éthanol, l'acétone, le diméthylformamide, le méthanol, le n-butylamine, ou encore la soude. (12,13)

L'hydrochlorothiazide n'étant pas soluble dans l'eau, il ne pourra pas être mis en solution. Il faudra donc réaliser une suspension buvable.

## 2. Propriétés pharmacocinétiques

L'hydrochlorothiazide est rapidement absorbé par le système digestif, mais pas totalement. Le pic plasmatique est obtenu en moyenne 4 heures après son administration par voie orale. Sa biodisponibilité varie selon les sujets de 65 à 70%.

Concernant sa distribution, sa liaison aux protéines plasmatiques est de 60%, et son volume de distribution de 0,8 L/kg. Sa demi-vie est variable d'un sujet à un autre puisqu'elle se situe entre 5 et 15h.

L'hydrochlorothiazide est majoritairement excrétée sous forme inchangée dans les urines. 95% d'une dose d'hydrochlorothiazide administrée par voie IV est retrouvée inchangée dans les urines contre 65% par voie orale.

L'hydrochlorothiazide traverse la barrière placentaire et est retrouvé dans le lait maternel. (12)

## 3. Mécanisme d'action

L'hydrochlorothiazide est un diurétique thiazidique. En inhibant le co-transport  $Na^+ - Cl^-$  au niveau du tubule contourné distal, il permet de diminuer la réabsorption du sodium et de faciliter celle du calcium (Figure 7). Ainsi, il augmente l'excrétion urinaire du sodium, et accroît la diurèse. (14)

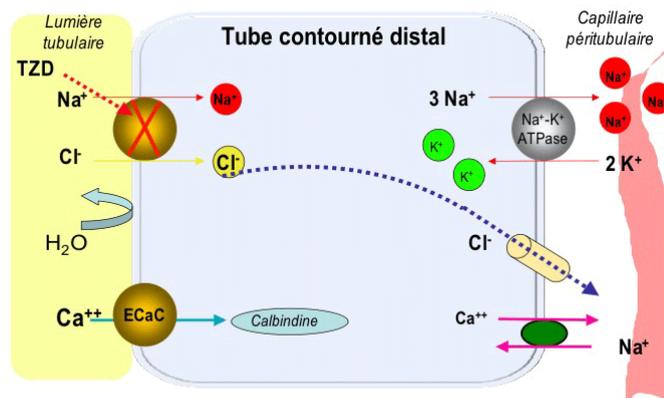


Figure 7 - Mécanisme d'action de l'hydrochlorothiazide

#### 4. Effets indésirables

L'hydrochlorothiazide, tout comme les autres diurétiques thiazidiques, peut entraîner de nombreux troubles métaboliques surtout lorsqu'il est utilisé à forte dose. Parmi ces troubles, il est possible d'observer une hyperglycémie, une hyperuricémie, une hypokaliémie ou encore une hyponatrémie avec hypovolémie qui peut être à l'origine d'une déshydratation, d'une hypotension orthostatique voire même d'un syndrome confusionnel.

Des troubles hématologiques peuvent aussi être observés tels qu'une thrombocytopénie.

Nausées, vomissements, constipation, diarrhée, céphalées, troubles de la vision, photosensibilité ... sont des effets indésirables que peut causer l'hydrochlorothiazide, mais qui restent cependant rarement constatés. (15)

#### 5. Place de l'hydrochlorothiazide dans la prise en charge de la dysplasie broncho-pulmonaire

L'hydrochlorothiazide, le plus souvent en association avec la spironolactone, est utilisé dans le traitement de la DBP afin d'améliorer le fonctionnement du système pulmonaire tout en limitant la formation d'œdèmes.

En effet, il a été observé au cours de différentes études, chez les nourrissons atteints de DBP, la présence d'œdèmes pulmonaires interstitiels et peribronchiolaire, des vaisseaux lymphatiques dilatés, et une augmentation du contenu hydrique du poumon. De plus, dans les pathologies cardio-pulmonaires associées à un œdème pulmonaire chronique, les diurétiques

ont un effet bénéfique.

Les nourrissons souffrant de DBP sont également incapables de diluer leurs urines de façon appropriée ce qui entraîne une rétention d'eau. (16)

## 6. Posologie

La posologie recommandée est de 3 mg/kg par 24h par voie orale en 2 prises. (14)

Les gélules d'hydrochlorothiazide préparées au sein de la pharmacie du CHU de Poitiers, et destinées aux services de pédiatrie, sont dosées en moyenne à 2.16 mg d'hydrochlorothiazide. Pour être en accord avec cette observation et pouvoir pallier à d'éventuels changements de posologie, la concentration de la suspension buvable d'hydrochlorothiazide a été fixée à 2 mg/mL.

## II. Matériel et Méthodes

### A. Mise au point et validation de la méthode de dosage par HPLC-UV

#### 1. Mise au point des conditions chromatographiques et UV

Le dosage a été mis au point selon une méthode par Chromatographie Liquide Haute Performance (ou High Performance Liquid Chromatography) couplée à une détection Ultra-Violette (HPLC-UV). Cette méthode permet une analyse séparative adaptée à une étude de stabilité car permettant de séparer le principe actif de ses produits de dégradation.

#### Principe et Description de l'Appareillage HPLC-UV :

L'HPLC est une technique qui permet de séparer les différents composés d'un mélange, de façon à pouvoir les identifier et les quantifier. Cette séparation est rendue possible par la différence de distribution des solutés entre deux phases, une phase stationnaire (contenue dans une colonne) et une phase mobile. Ces deux phases étant non miscibles entre elles. (17)

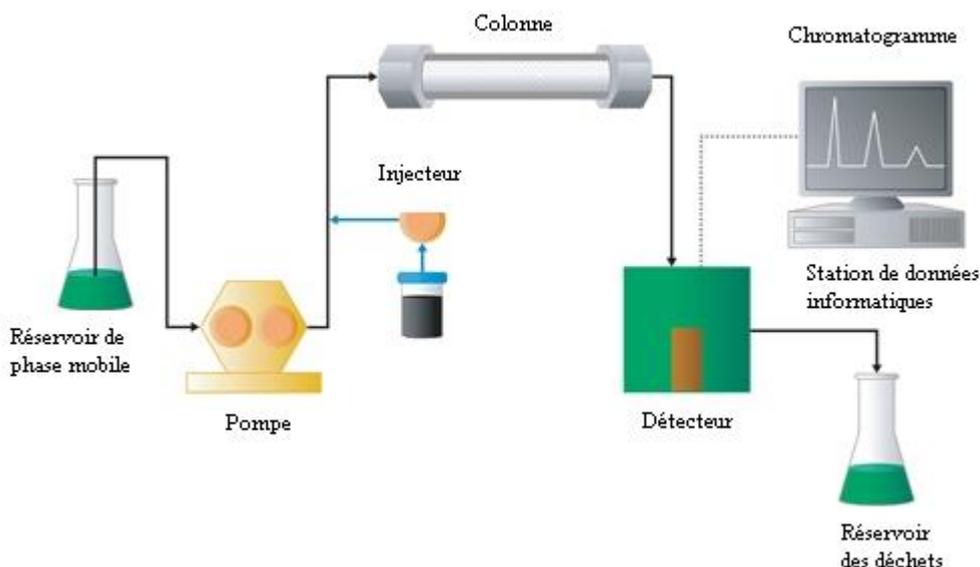


Figure 8- Appareillage de l'HPLC-UV

L'appareillage de l' HPLC-UV est composé :

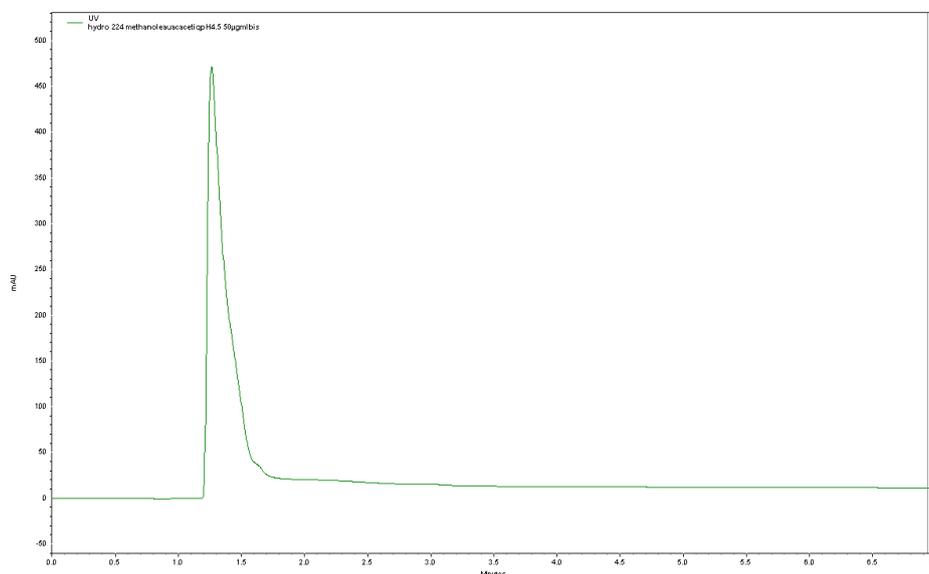
- d'une phase mobile, qui doit être compatible avec le système de détection, et dans laquelle les solutés doivent être solubles. Elle est polaire.
- d'une pompe (L-2130 LaChrom Elite® VWR), qui permet l'écoulement de la phase mobile dans la colonne,
- d'un injecteur (L-2200 LaChrom Elite® VWR), qui permet l'injection en tête de colonne d'un volume précis et reproductible de l'échantillon,
- d'une colonne (Purospher STAR RP-18 150mm x 4,6mm, 5µm, Merck Millipore®), courte et droite, en acier inoxydable généralement. La phase stationnaire apolaire contenue dans la colonne est constituée de silice greffée.
- d'un détecteur UV-visible (L-2400 LaChrom Elite® VWR), qui suit en continu l'apparition des solutés, et permet la mesure de l'absorbance de la phase mobile en fin de colonne. Le signal obtenu est enregistré en fonction du temps, et est proportionnel à la concentration du soluté dans l'effluent. (18)

L'HPLC-UV du laboratoire fonctionne selon la technique de chromatographie de partage à polarité de phase inversée. Dans ce type de chromatographie, moins le soluté sera soluble dans la phase mobile, plus il sera retenu par la colonne donc aura un temps de rétention plus élevé. (18)

La phase stationnaire ou colonne a été choisie par défaut comme étant celle déjà utilisée au niveau du laboratoire pour avoir une uniformité des méthodes de dosage.

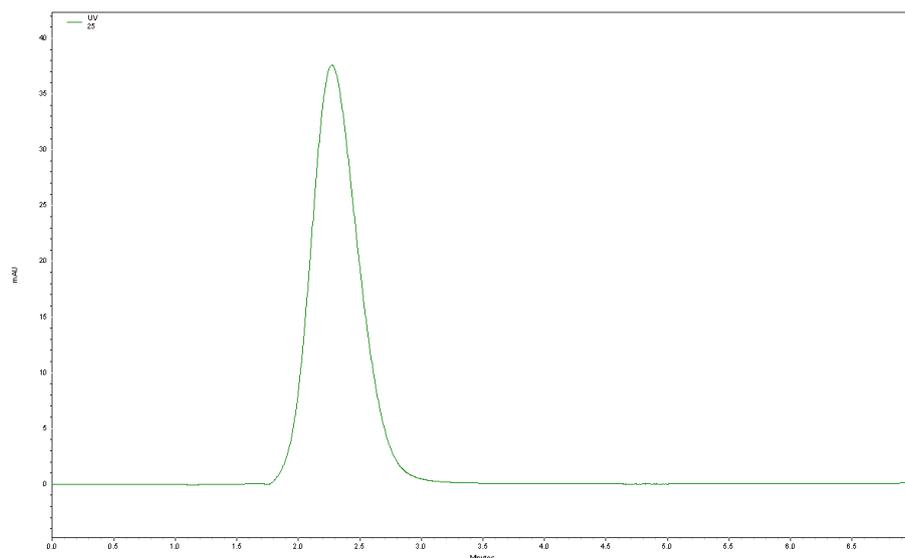
Plusieurs débits et phases mobiles ont été testés :

- 25% méthanol et 75% d'eau à un débit de 1 mL/min



*Figure 9- Phase mobile avec 25% de méthanol et 75% d'eau, injection de 10 µL d'un échantillon à 50 µg/mL d'hydrochlorothiazide à un débit de 1 mL/min*

- 5% méthanol et 95% d'eau de pH 4,5 (obtenu à partir d'acide acétique 1M) à un débit de 1 mL/min



*Figure 10- Phase mobile avec 5% de méthanol et 95% d'eau à un pH de 4,5 (avec acide acétique 1M), injection de 10 µL d'un échantillon à 25 g/mL d'hydrochlorothiazide à un débit de 1 mL/min,*

- 5 % méthanol et 95% d'eau de pH 4,5 (obtenu à partir d'acide acétique 1M) à un débit de 1,5 mL/min (16)

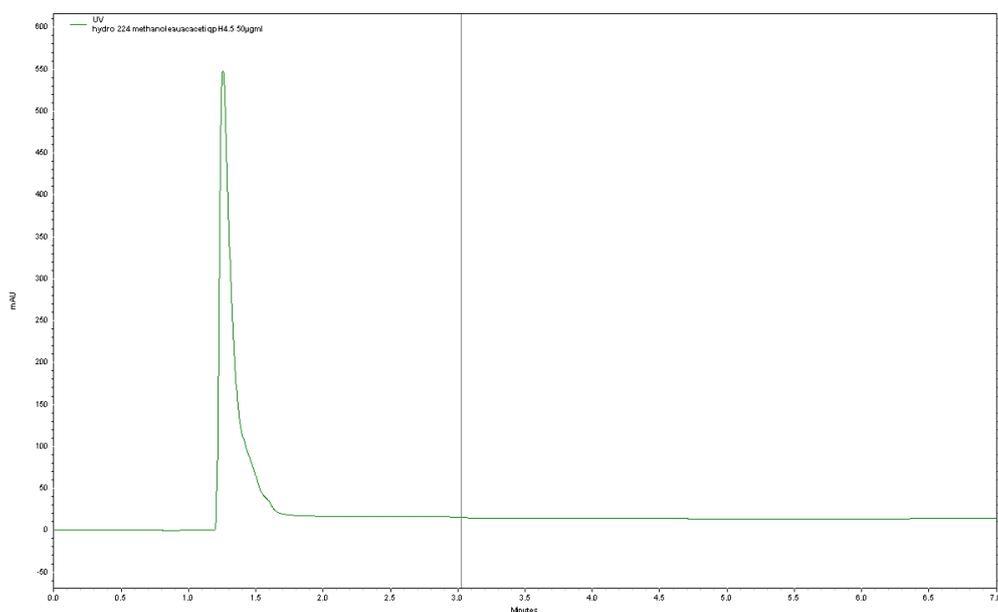


Figure 11- Phase mobile avec 5% de méthanol et 95% d'eau à un pH de 4,5 (avec acide acétique 1M), injection de 10  $\mu$ L d'un échantillon de 50  $\mu$ g/mL d'hydrochlorothiazide à un débit de 1,5 mL/min

- 20% de méthanol et 80% d'eau de pH 4,5 (obtenu à partir d'acide acétique 1M) à un débit de 1,5 mL/min.

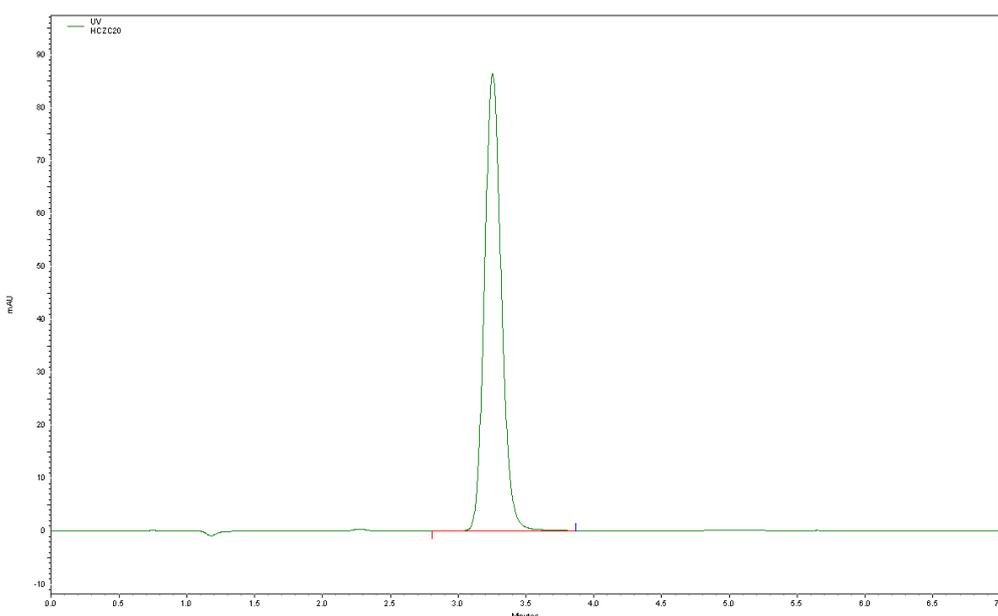


Figure 12- Phase mobile avec 20% de méthanol et 80% d'eau à un pH de 4,5 (avec acide acétique 1M), injection de 10  $\mu$ L d'un échantillon de 20  $\mu$ g/mL d'hydrochlorothiazide à un débit de 1,5 mL/min

C'est cette dernière phase mobile avec 20% de méthanol et 80% d'eau ajustée à un pH de 4,5 qui a été retenue, puisqu'elle permet d'obtenir les pics les plus corrects.

La longueur d'onde d'analyse a été choisie par la réalisation d'un spectre UV de l'hydrochlorothiazide (Figure 13). Cette longueur d'onde est de 224 nm.

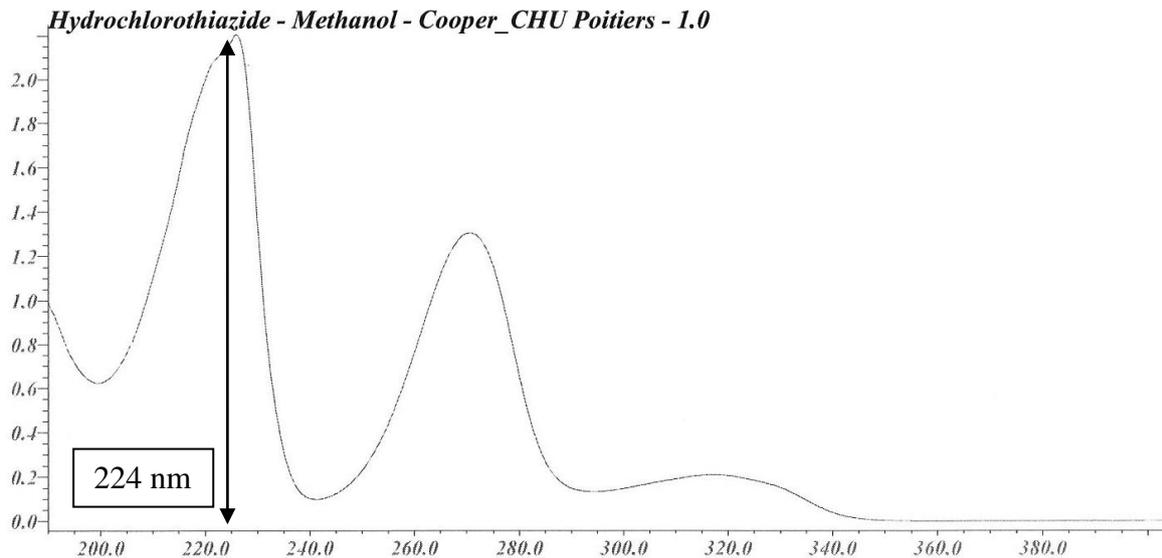


Figure 13 - Spectre UV de l'hydrochlorothiazide

## 2. Protocole de dosage

Le protocole de préparation de la gamme et des échantillons a été défini en fonction de la concentration de la suspension buvable (2 mg/mL) et les propriétés physicochimiques de l'hydrochlorothiazide (celui-ci étant insoluble dans l'eau mais soluble dans le méthanol).

L'échantillon de suspension buvable ne pourra pas être injecté directement dans le système chromatographique. Il sera dilué au 1/100<sup>ème</sup> afin d'obtenir une concentration cible de 20 µg/mL.

Dans un premier temps, il faut préparer la Solution Etalon :

- préparer une Solution Mère de Dosage (SM) à 1 mg/mL : peser 10 mg de poudre d'hydrochlorothiazide et dissoudre dans 10 mL de méthanol dans une fiole jaugée de 10 mL,

- puis préparer une Solution Fille de Dosage (SF) à 100 µg/mL : prélever 500 µL de SM et diluée dans 4,5 mL d'eau distillée dans une fiole jaugée de 5 mL.

Ensuite, la gamme étalon est préparée. Pour cela, des tubes Ependorf de 1,5 mL sont utilisés, dans lesquels nous avons dilué la SF préalablement préparée dans de l'eau distillée selon le tableau suivant :

µg/mL	28	24	20	14	12	0
SF = 100 µg/mL	280 µL	240 µL	200 µL	140 µL	120 µL	0 µL
Eau distillée	720 µL	760 µL	800 µL	860 µL	880 µL	1000 µL

Tous les Ependorfs doivent être vortexés 30 secondes à chaque dilution.

Ensuite, il faut transférer le contenu de chaque Ependorf dans des vials destinés à être placés dans l'injecteur automatique.

Les différents points de la gamme ont été choisis de telle sorte que l'intervalle de dosage soit compris entre 60 et 140 % de notre valeur cible (ici 20 µg/mL) comme il est recommandé dans « Le guide méthodologique des études de stabilité des préparations ». (17)

Afin de valider la gamme étalon, plusieurs contrôles internes respectivement à 12, 20 et 25 µg/mL, doivent être réalisés au laboratoire par une personne autre que la personne réalisant le dosage, et ce suivant le même protocole de préparation que celui de la solution étalon :

- préparer une Solution Mère de Contrôle (SMC) à 1 mg/mL : peser 10 mg de poudre d'hydrochlorothiazide et dissoudre dans 10 mL de méthanol dans une fiole jaugée de 10 mL,
- puis préparer une Solution Fille de Contrôle (SFC) à 100 µg/mL : prélever 500 µL de SM et diluer dans 4,5 mL d'eau distillée dans une fiole jaugée de 5 mL.

Ensuite, il faut préparer les différents points de contrôle selon le tableau suivant :

µg/mL	C25	C20	C12
SFC = 100 µg/mL	250 µL	200 µL	120 µL
Eau distillée	750 µL	800 µL	880 µL

Comme précédemment, tous les Ependorfs doivent être vortexés 30 secondes à chaque dilution, et leur contenu est transféré dans des vials.

Pour terminer, il faut préparer les échantillons afin de pouvoir déterminer leur concentration. Pour cela, il faut préparer 3 Ependorf (1 pour chaque échantillon) : dans chaque tube Ependorf de 1,5 mL, il faut diluer la solution buvable d'hydrochlorothiazide à 2 mg/mL au 10<sup>ème</sup> dans du méthanol (100 µL solution d'hydrochlorothiazide + 900 µL de méthanol), agiter au vortex 30 secondes et centrifuger 60 secondes au maximum de rpm, puis diluer à nouveau au 10<sup>ème</sup> (100 µL de surnageant + 900 µL d'eau distillée) et vortexer. Ainsi, la concentration théorique finale obtenue est de 20 µg/mL. Et pour finir, il faut transférer le contenu de chaque Ependorf dans un vial. Chaque vial sera ensuite placé dans l'HPLC afin d'y être dosé.

### 3. Validation

La validation d'une méthode de dosage est la procédure qui démontre qu'une méthode particulière utilisée pour le dosage d'un analyte (médicaments ou autres composés) dans une matrice donnée (eau, Ora-Sweet<sup>®</sup>/Ora-Plus<sup>®</sup>, Inorpha<sup>®</sup>, Syrspend<sup>®</sup>) est fiable et répétable pour l'usage qui en est fait.

Les paramètres fondamentaux de cette validation comprennent :

- la spécificité
- la linéarité
- la gamme d'étalonnage
- la fidélité (précision)
- la justesse (exactitude)
- la limite de détection et la limite de quantification

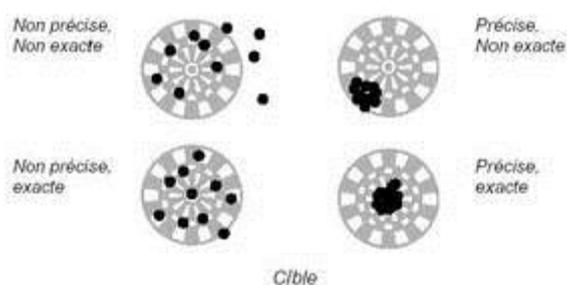


Figure 14 - Représentation de la fidélité (précision) et de la justesse (exactitude)

La méthode de dosage de l'hydrochlorothiazide en vue de l'étude de la stabilité de l'hydrochlorothiazide dans une suspension buvable a été validée selon les recommandations de l'International Conference on Harmonisation (ICH) et du Guide méthodologique des études de stabilité des préparations, issu de la collaboration entre la Société Française de Pharmacie Clinique (SFPC) et le Groupe d'Evaluation et de Recherche sur la Protection en Atmosphère Contrôlée (GERPAC). (17,27)

a) Spécificité

Définition :

La spécificité d'une méthode analytique est sa capacité à mesurer seulement ce qu'elle est destinée à mesurer. Une méthode est spécifique lorsqu'elle permet de mesurer l'analyte avec la garantie que le signal instrumental ne provient que de l'analyte. Elle permet de séparer les produits de dégradation et les excipients.

Détermination :

- Spécificité vis-à-vis des produits de dégradation : la dégradation forcée (hydrolyse des fonctions amines de l'hydrochlorothiazide)

Elle a pour but de mettre en évidence les produits de dégradation de la molécule à étudier par leur rétention relative. Les signaux des molécules issues de la dégradation ne doivent pas interférer avec celui correspondant à l'hydrochlorothiazide, c'est-à-dire que les produits de dégradation ne doivent pas être élués en même temps que la molécule à étudier.

Afin de dégrader la molécule, une solution de concentration quatre fois supérieure à la concentration du milieu de notre gamme a été réalisée, puis cette solution a été mise en contact avec des solutions d'acide et de base de concentrations différentes. Après chauffage, les solutions ont été neutralisées (Tableau 1), la concentration finale injectée étant celle de notre milieu de gamme (20 µg/mL).

Solution n°	1	2	3	4		5	6	7	8	9
SF en mL	1	1	1	0		1	1	1	1	1
HCl 0,1M en mL	1				NaOH 0,1M en mL	1				
HCl 0,5M en mL		1			NaOH 0,5M en mL		1			
HCl 1M en mL			1	1	NaOH 1M en mL			1		
H2O en mL					H2O en mL				1	1
Chauffer à 80°C au bain-marie pendant 1h puis neutraliser avec :										
NaOH 0,1M en mL	1				HCl 0,1M en mL	1				
NaOH 0,5M en mL		1			HCl 0,5M en mL		1			
NaOH 1M en mL			1	1	HCl 1M en mL			1		
Phase mobile en mL	1	1	1	2	Phase mobile en mL	1	1	1	1	1
H2O en mL					H2O en mL				1	1

*Tableau 1- Résumé du protocole de dégradation*

- Spécificité vis-à-vis des excipients

L'examen de la spécificité vis-à-vis des excipients a été effectuée par l'analyse d'un blanc matrice (Ora-Sweet<sup>®</sup>/Ora-Plus<sup>®</sup>, Inorpha<sup>®</sup>, Syrspend<sup>®</sup>) en démontrant par les graphiques, l'absence de réponse au temps de rétention de l'hydrochlorothiazide par comparaison avec une solution pure (sans excipient) d'hydrochlorothiazide. Pour chaque excipient, 3 échantillons ont été testés à des jours différents.

b) Linéarité

Définition :

La linéarité d'une méthode de dosage est sa capacité (pour une gamme de concentration donnée), à produire des résultats proportionnels à la concentration à doser dans l'échantillon.

Le modèle mathématique est une droite d'équation :

$$Y = ax + b \text{ avec } y = \text{Aire du pic}$$

$x = \text{concentration}$

$a = \text{pente}$

$b = \text{ordonnée à l'origine}$

### Détermination :

- Six gammes d'étalonnage en 5 points (12, 14, 20, 24 et 28 µg/mL), la concentration cible (20 µg/mL correspondant à la suspension buvable d'hydrochlorothiazide 2 mg/mL diluée au 1/100<sup>ème</sup>) se trouvant au centre de la gamme.
- La pente a et l'ordonnée à l'origine de la droite de régression b, le coefficient de corrélation r ont été calculés avec le logiciel Excel<sup>TM</sup>.
- Pour chacune des 6 gammes d'étalonnage, les concentrations des points d'étalonnage ont été recalculées à partir de l'équation de régression. Les biais ont été calculés par rapport aux concentrations théoriques [1].

$$Biais (\%) = \frac{C_{Calculée} - C_{Théorique}}{C_{Théorique}} \times 100 \quad [1]$$

Un point d'étalonnage est accepté si son biais est inférieur ou égal à 5%.

- Les valeurs de concentration calculées à partir des différentes courbes d'étalonnage sont regroupées par niveau de concentration. A chaque niveau de concentration, la moyenne, l'écart-type [2], le coefficient de variation [3] et le biais [4] sont calculés.

Ecart-type :

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} (C_i - C_{moyen})^2}{n - 1}} \quad [2]$$

Coefficient de variation :

$$CV(\%) = \frac{s}{C_{moyen}} \times 100 \quad [3]$$

$$Biais (\%) = \frac{C_{Calculée} - C_{Théorique}}{C_{Théorique}} \times 100 \quad [4]$$

Les valeurs calculées pour les coefficients de variation et les biais doivent être inférieures ou égales à 5%.

### c) Fidélité

#### Définition :

La fidélité, également appelée précision exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant d'un même échantillon homogène dans des conditions fixées. Elle renseigne uniquement sur la distribution des erreurs aléatoires.

La fidélité peut être évaluée à 3 niveaux :

- La répétabilité concerne des résultats d'essais indépendants obtenus au sein d'un même laboratoire, avec une méthode d'analyse fixée, des échantillons d'essai identiques, préparés par un même opérateur et analysés avec un même appareillage dans un laps de temps très court.

- La reproductibilité intra-laboratoire (également appelée fidélité intermédiaire) concerne des résultats d'essais indépendants obtenus au sein d'un même laboratoire, avec une méthode d'analyse fixée et des échantillons d'essai identique, mais les opérateurs, les jours et l'appareillage sont différents.

- La reproductibilité concerne des résultats d'essais indépendants obtenus avec une méthode d'analyse fixée et des échantillons d'essai identique, mais les opérateurs, les appareillages et les laboratoires sont différents.

### Détermination :

La fidélité a été déterminée à 3 niveaux de concentration différents :

- CQ1 = 12 µg/mL correspondant au plus petit point de la gamme,
- CQ2 = 20 µg/mL correspondant à la concentration cible (échantillon de la suspension d'hydrochlorothiazide 2 mg/mL diluée au 1/100<sup>ème</sup>),
- CQ3 = 25 µg/mL situé dans le haut de la gamme.

- La répétabilité a consisté à doser 6 exemplaires de 3 niveaux de contrôle différents, par le même opérateur avec une même gamme d'étalonnage au cours d'une même journée.  
(27)

- La reproductibilité intra-laboratoire a consisté à doser 6 exemplaires de 3 niveaux de contrôle différents lors de 6 journées différentes, avec des gammes d'étalonnage différentes réalisées chaque jour et deux opérateurs différents.

- La reproductibilité n'a pas été déterminée.

Pour la répétabilité et la reproductibilité intra-laboratoire, et pour chaque niveau de concentration, la moyenne, l'écart-type et le coefficient de variation ont été calculés.

### d) Justesse/Exactitude

### Définition :

La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essais et une valeur théorique. Elle traduit l'erreur systématique d'une méthode de dosage.

### Détermination :

La justesse a été validée à partir des résultats obtenus lors des essais de répétabilité et de reproductibilité intra-laboratoire. Pour chaque niveau de concentration, la moyenne et le biais de la moyenne par rapport à la valeur théorique ont été calculés.

e) Limite de détection et limite de quantification

Définition :

La limite de détection correspond à la quantité minimale d'analyte dans un échantillon pouvant être détectée mais pas quantifiée de façon précise.

La limite de quantification correspond à la quantité minimale d'analyte dans un échantillon pouvant être quantifiée.

Détermination :

La limite de détection n'a pas été déterminée. La limite de quantification a été déterminée comme étant le plus petit point de gamme.

B. Etude de la faisabilité de la préparation

L'hydrochlorothiazide est insoluble dans l'eau. Afin d'assurer une dispersion uniforme et stable du principe actif, différents excipients permettant la mise en suspension peuvent être utilisés.

1. Excipients disponibles et formulation

Dans le cadre des préparations buvables réalisées en pharmacie, de plus en plus de possibilités en termes de formulations sont disponibles. Trois gammes de véhicules sont disponibles pour la formulation des préparations buvables. Une analyse des différentes formulations disponibles a été réalisée. Les composants (agent épaississant, masquant, aromatisant, conservateur...) ont été répertoriés et comparés aux excipients à effets notoires de l'ANSM (20) et les paramètres physico-chimiques disponibles (pH, osmolalité) des véhicules étudiés ont été comparés. Les études de stabilité réalisées sur les préparations buvables de principe actif ont été recensées.

Trois gammes de véhicules sont disponibles en France : la gamme Ora<sup>®</sup>, InOrpha<sup>®</sup> et Syrspend<sup>®</sup> (liquide et poudre). Leur composition est détaillée dans le Tableau 2, et le flaconnage est présenté dans la Photo 1. (28,29,30)



Photo 1- Flaconnage des excipients utilisés

Véhicule	InOrpha®	Ora-Plus	Ora-Sweet SF	Syrspend SF liquide
<b>Conditionnement</b>	Flacon de 1L blanc opaque ou flacon brun de 60mL	Flacon de 473mL blanc opaque	Flacon de 473mL blanc opaque	Flacons de 450mL blanc opaque
<b>Qualification</b>	Excipient liquide	Agent de suspension	Agent masquant, aromatisant	Véhicule de suspension orale
<b>Conservation</b>	3 mois après ouverture	2 mois après ouverture	2 mois après ouverture	1 an après ouverture
<b>Composition :</b>				
<b>Phase liquide</b>	Eau purifiée	Eau purifiée	Eau purifiée	Eau purifiée (liquide)
<b>Agents épaississants</b>	Hydroxyéthylcellulose	Cellulose microcristalline, sodium carboxyméthylcellulose, gomme xanthane, carraghenane		Amidon de maïs modifié
<b>Anticristallisation</b>	Glycérol		Glycérol	
<b>Edulcorant</b>	Sucralose		Sorbitol, sodium saccharine	Sucralose
<b>Agent masquant l'amertume</b>	OUI			
<b>Aromatisant</b>	Arôme caramel		Arôme cerise	
<b>Agent tampon</b>	Acide citrique, citrate de sodium	Sodium phosphate, acide citrique	Sodium phosphate, acide citrique	Sodium citrate, acide citrique anhydre, acide malique
<b>Agent anti mousse</b>		Simeticone		Simeticone
<b>Conservateur</b>	Sorbate de potassium	Sorbate de potassium, methyl et propylparabens	Potassium sorbate, methyl et propylparabens	sodium benzoate 0,06%

SF = Sugar Free

Tableau 2- Composition des différents agents de suspension

## 2. Etude de l'homogénéité par HPLC-UV

### Mode opératoire :

Préparation d'une suspension buvable d'hydrochlorothiazide à 2 mg/mL avec comme véhicule l'Inorpha<sup>®</sup> (Annexe 2) :

Peser 60 mg de poudre d'hydrochlorothiazide et la triturer dans un mortier. Mesurer dans une éprouvette graduée 30 mL d'Inorpha<sup>®</sup>. Puis dissoudre l'hydrochlorothiazide dans une faible quantité d'Inorpha<sup>®</sup> jusqu'à former une pâte. Triturer. Rajouter petit à petit le reste d'Inorpha<sup>®</sup> jusqu'à obtenir une suspension. Pour finir, transvaser dans un flacon de 30 mL et étiqueter le flacon.

Préparation d'une suspension buvable d'hydrochlorothiazide à 2 mg/mL avec comme véhicule le Syrspend<sup>®</sup> : le protocole utilisé est le même que celui d'Inorpha<sup>®</sup>.

Préparation d'une suspension buvable d'hydrochlorothiazide à 2mg/mL avec comme véhicule l'Ora-Plus<sup>®</sup> et l'Ora-Sweet<sup>®</sup> :

Peser 60mg de poudre d'hydrochlorothiazide et la triturer dans un mortier. Mesurer séparément dans une éprouvette graduée le volume d'Ora-Plus<sup>®</sup> et celui d'Ora-Sweet<sup>®</sup> soit 15mL de chaque. Puis dissoudre l'hydrochlorothiazide dans une faible quantité d'Ora-Plus<sup>®</sup> jusqu'à former une pâte. Triturer. Rajouter petit à petit le reste d'Ora-Plus<sup>®</sup> jusqu'à obtenir une suspension. Mélanger progressivement la suspension obtenue avec la totalité du volume d'Ora-Sweet<sup>®</sup>. Pour finir, transvaser dans un flacon de 30 mL et étiqueter le flacon.

### Validation de la méthode de préparation :

Pour chaque excipient, six préparations ont été réalisées par quatre opérateurs à des jours différents (parmi les opérateurs, d'eux d'entre eux ont réalisé 2 préparations pour chaque excipient et les deux autres en ont réalisé 1 préparation pour chaque excipient). Le biais, l'écart-type et le coefficient de variation ont été calculés.

## C. Etude de stabilité

La stabilité d'une préparation est l'aptitude « à conserver ses propriétés chimiques, physiques, microbiologiques et biopharmaceutiques dans des limites spécifiées pendant toute sa durée de validité » (27).

Pour l'étude de stabilité, une suspension buvable d'hydrochlorothiazide a été réalisée avec chaque excipient. Chaque suspension buvable a été répartie en 9 flacons : 3 flacons conservés à température ambiante à l'abri de la lumière (flacon brun), 3 flacons conservés à température ambiante sans protection vis-à-vis de la lumière (flacon incolore) et 3 flacons conservés entre +4 et +8°C à l'abri de la lumière (flacon brun). Les flacons conservés à température ambiante étaient stockés dans le laboratoire à 20°C et les flacons conservés entre +4 et +8°C étaient stockés dans le réfrigérateur du laboratoire. Les températures ambiantes et du réfrigérateur étaient surveillées par le logiciel Sirius™.

### 1. La stabilité chimique

La stabilité chimique est définie comme la période pendant laquelle la concentration en médicament se maintient à plus de 90% par rapport à la concentration initiale (19).

La stabilité chimique consiste à mesurer la concentration en hydrochlorothiazide retrouvée dans la suspension buvable au cours des différents temps de prélèvements, la valeur de référence étant celle obtenue à J0, c'est-à-dire immédiatement après la fabrication.

La stabilité chimique a été mesurée aux temps : J0, J1, J2, J7, J14, J28 et J56.

### 2. La stabilité physique

#### La mesure du pH :

Le pH (ou potentiel hydrogène) est un paramètre qui permet de définir, en fonction de la concentration en H<sup>+</sup> de la solution, si le milieu est acide ou basique.

Un pH qui reste stable signifie que ni le principe actif, ni l'excipient ne se sont dégradés, et qu'il n'y pas d'interaction entre le contenant et la suspension. La stabilité du pH contribue donc à confirmer la stabilité chimique de la préparation.

Les mesures de pH ont été réalisées sur un pH-mètre 5/6 Ecoscan, à J0, J1, J2, J7, J14, J28 et J56.

#### La mesure de l'osmolalité :

L'osmolalité est la quantité de molécules osmotiquement actives par unité de masse, c'est une façon globale de mesurer la contribution des différents solutés, présents dans une solution, à la pression osmotique de cette solution.

Une solution qui ne se dégrade pas, conserve une osmolalité constante. L'osmolalité permet de confirmer une stabilité chimique.

Les mesures d'osmolalité ont été réalisées avec un micro osmomètre automatique de type 15 Loser Messtechnik, aux temps J0, J14, J28 et J56.

#### L'aspect et la coloration :

Elle peut être évaluée de deux manières, soit à l'œil nu à partir d'une solution témoin, soit par spectrophotométrie d'absorption. C'est la première méthode qui a été réalisée.

Tout changement de coloration de la suspension buvable signifie un changement dans la composition de la suspension. La présence de sédimentation a également été surveillée à l'œil nu.

#### L'odeur :

L'odeur est aussi un gage de stabilité. En effet un changement d'odeur peut laisser supposer un changement de composition de la suspension.

#### Autres : dosage avant et après agitation

Des prélèvements des suspensions buvables d'hydrochlorothiazide ont été réalisés à des niveaux différents (haut, milieu et fond du flacon) sur 9 flacons des suspensions buvables, avant et après agitation.

Ces prélèvements ont ensuite été analysés par HPLC-UV. Le but de cette expérience est de montrer la nécessité d'agiter les flacons de suspension buvable d'hydrochlorothiazide avant chaque utilisation.

### III. Résultats

#### A. Validation de la méthode de dosage par HPLC-UV

##### 1. Spécificité

##### Spécificité vis-à-vis des produits de dégradation :

Les aires de l'hydrochlorothiazide après les différents procédés de dégradation sont présentées dans le Tableau 3. L'aire de l'hydrochlorothiazide diminue sous l'action de l'acide chlorhydrique et de la température.

Type de dégradation	AUC (Aire sous la courbe) de l'hydrochlorothiazide	Pourcentage de dégradation
1 : HCl 0,1M, 80°C, puis NaOH 0,1M	8671424	5,27
2 : HCl 0,5M, 80°C, puis NaOH 0,5M	6116016	33,18
3 : HCl 1M, 80°C, puis NaOH 1M	4291380	53,11
4 : Blanc à 80°C	Non déterminé	Non déterminé
5 : NaOH 0,1M, 80°C, puis HCl 0,1M	9246745	1,01
6 : NaOH 0,5M, 80°C, puis HCl 0,5M	9227137	0,80
7 : NaOH 1M, 80°C, puis HCl 1M	8869564	3,10
8 : 80°C	5537069	39,50
9 : Echantillon témoin à 50 µg/mL	9153583	0

*Tableau 3- Pourcentage de dégradation de l'hydrochlorothiazide en fonction du type de dégradation*

Le protocole d'hydrolyse par l'acide chlorhydrique a permis de mettre en évidence des produits de dégradation (Figure 15).

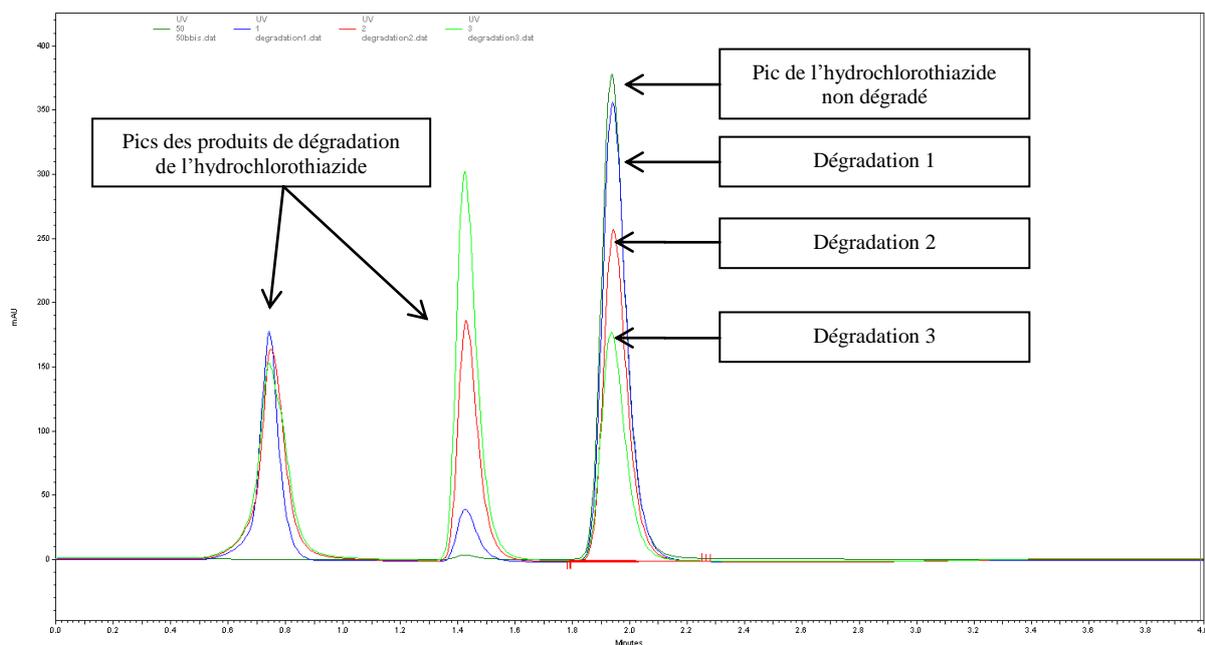


Figure 15 - Résultats de l'hydrolyse (dégradations 1,2 et 3)

La température seule à 80°C a également un effet sur la dégradation (Figure 16).

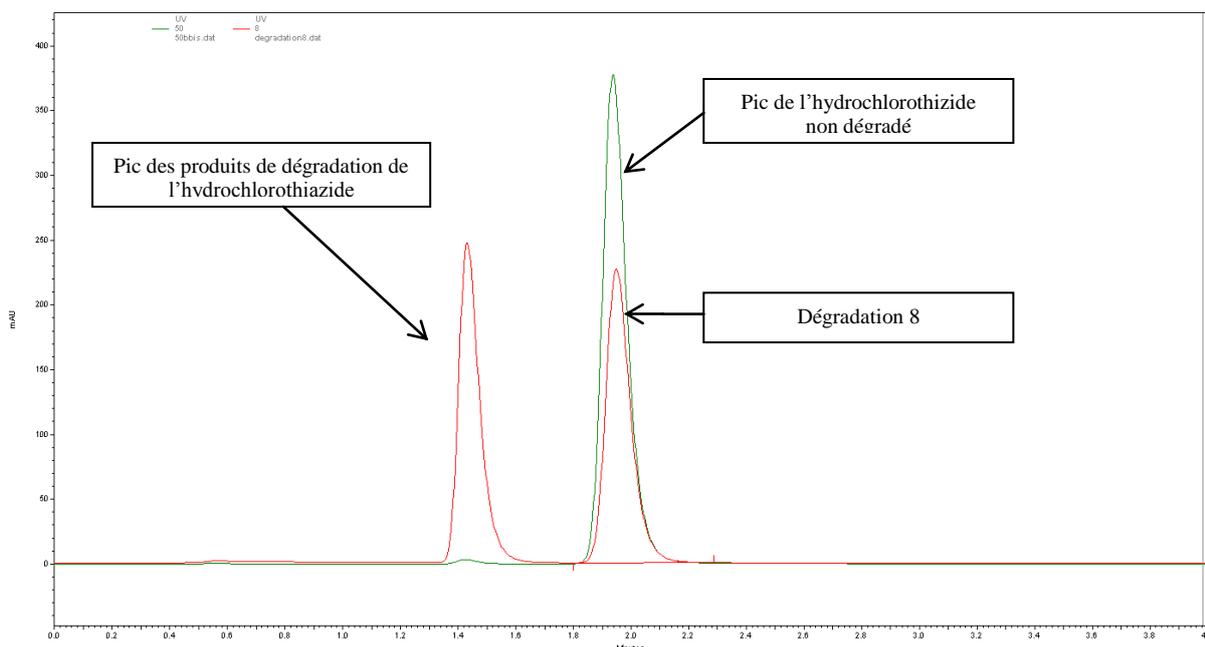


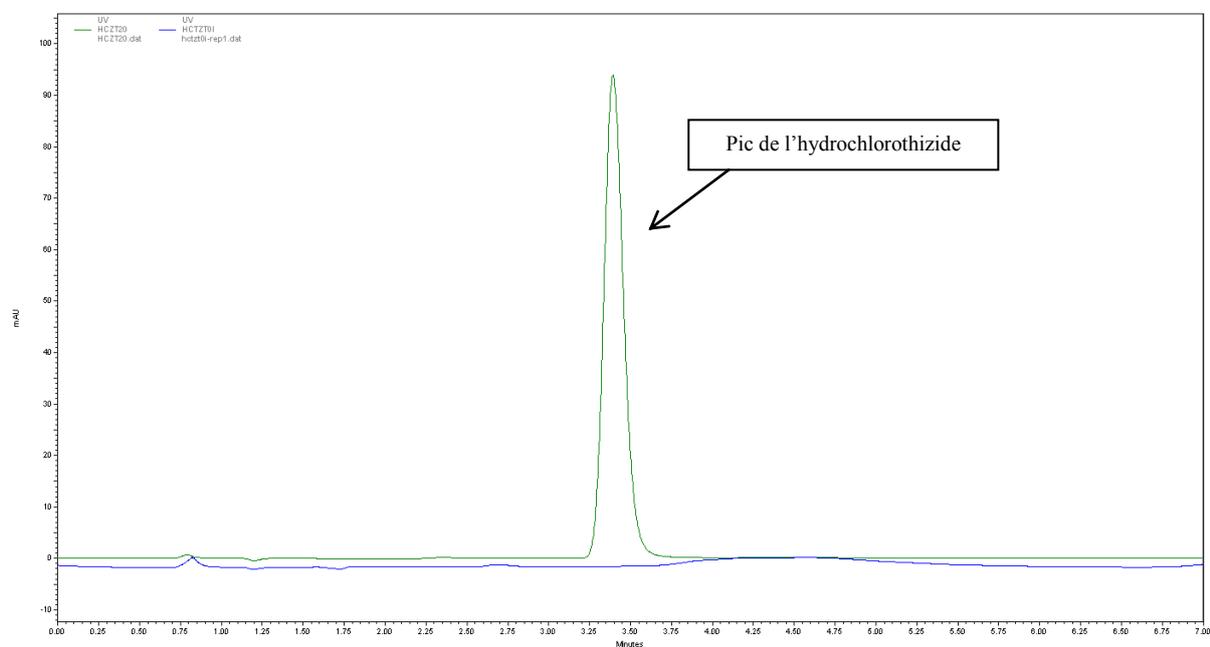
Figure 16 - Effet de la température (dégradation 8)

Ces analyses montrent l'absence de réponse au temps de rétention de l'hydrochlorothiazide des produits de dégradation de l'hydrochlorothiazide par comparaison avec une solution pure d'hydrochlorothiazide.

### Spécificité vis-à-vis des excipients :

L'examen de la spécificité par rapport aux excipients est réalisée par l'analyse d'un blanc matrice par comparaison avec une solution pure d'hydrochlorothiazide à 20 µg/mL. Les blancs matrices testés ont été réalisés en diluant l'excipient au 1/10<sup>ème</sup> dans du methanol puis en diluant cette solution au 1/10<sup>ème</sup> dans de l'eau.

La figure 17 montre la comparaison du blanc « Inorpha<sup>®</sup> » avec la solution d'hydrochlorothiazide, la figure 18 montre la comparaison du blanc « Ora-Plus<sup>®</sup>/Ora-Sweet<sup>®</sup> » avec la solution d'hydrochlorothiazide, et la figure 19 montre la comparaison du blanc « Syrspend<sup>®</sup> » avec la solution d'hydrochlorothiazide.



*Figure 17 - Comparaison du blanc Inorpha<sup>®</sup> avec une solution pure d'hydrochlorothiazide à 20 µg/mL*

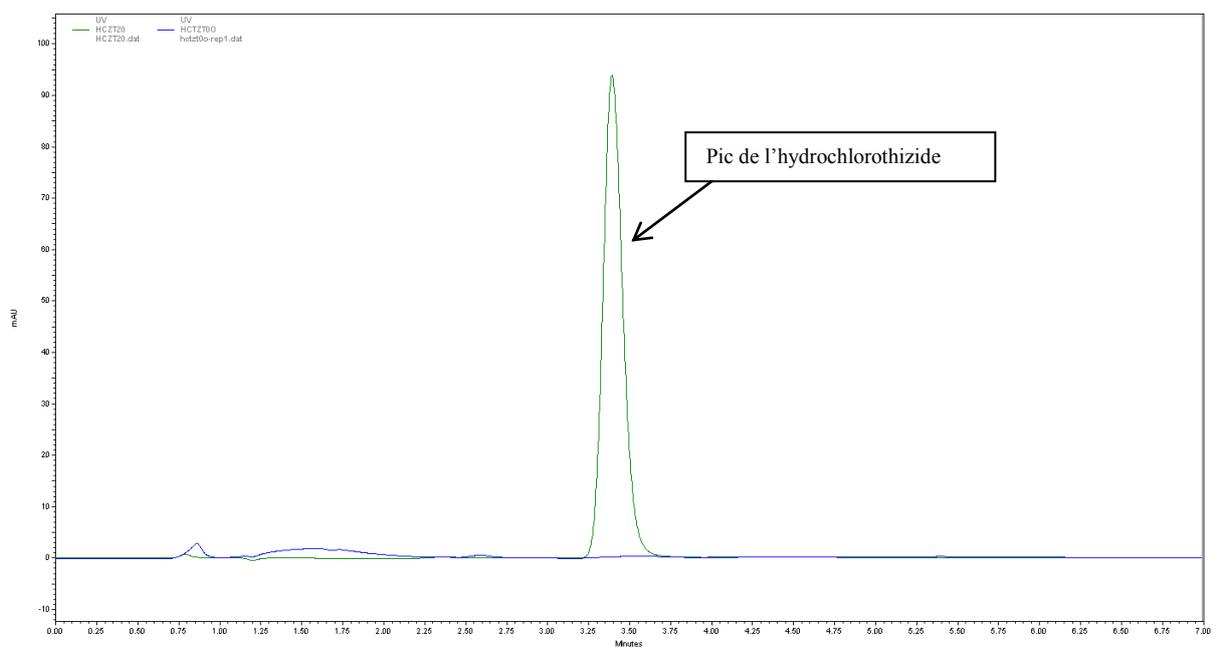


Figure 18 - Comparaison du blanc Ora<sup>®</sup> avec une solution pure d'hydrochlorothiazide à 20 µg/mL

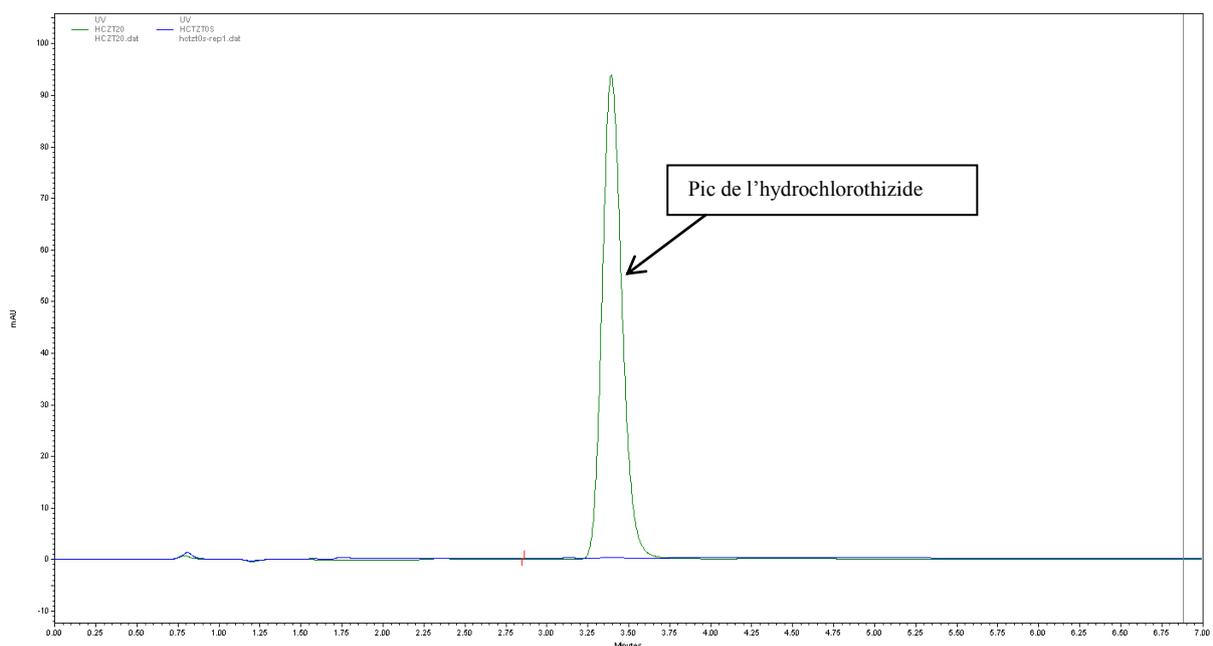


Figure 19 - Comparaison du blanc Syrspend<sup>®</sup> avec une solution pure d'hydrochlorothiazide à 20 µg/mL

Ces analyses montrent l'absence de réponse au temps de rétention de l'hydrochlorothiazide dans les différents blancs matrice par comparaison avec une solution pure d'hydrochlorothiazide.

## 2. Linéarité

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	Moyenne	Ecart-type	CV %	Biais de la moyenne
12 µg/mL Ccalculée (biais%)	12,29 (2,44)	12,10 (0,86)	11,94 (-0,52)	11,53 (-3,89)	11,91 (-0,76)	12,26 (2,16)	12,01	0,28	2,34	0,05
14 µg/mL Ccalculée (biais%)	14,59 (4,18)	14,03 (0,23)	14,08 (0,61)	13,65 (-2,50)	14,11 (0,80)	13,82 (-1,30)	14,05	0,32	2,26	0,34
20 µg/mL Ccalculée (biais%)	20,66 (3,32)	20,27 (1,37)	19,94 (-0,30)	20,30 (1,52)	19,70 (-1,51)	20,16 (0,79)	20,17	0,33	1,64	0,86
24 µg/mL Ccalculée (biais%)	24,19 (0,79)	23,86 (-0,60)	24,14 (0,58)	23,72 (-1,17)	23,92 (-0,35)	24,17 (0,70)	24,00	0,19	0,81	-0,01
28 µg/mL Ccalculée (biais%)	26,95 (-3,77)	27,87 (-0,47)	27,91 (-0,33)	28,40 (1,42)	28,27 (0,97)	27,72 (-0,99)	27,85	0,51	1,84	-0,53

L = linéarité, CV = coefficient de variation, Ccalculée = Concentration calculée en µg/mL

*Tableau 4- Tableau de linéarité*

- Le coefficient de chaque gamme d'étalonnage est supérieur à 0,997.
- Pour chaque point d'étalonnage de chaque gamme, le biais était inférieur à 5%.
- Pour chaque niveau de concentration le coefficient de variation et le biais de la concentration moyenne par rapport à la concentration théorique étaient inférieurs à 5%.

La méthode est donc linéaire de 12 à 28 µg/mL.

### 3. Fidélité/Précision

#### Répétabilité :

Pour chaque niveau de concentration, la moyenne, l'écart-type, et le coefficient de variation (CV) sont calculés. Les résultats de la répétabilité sont présentés dans le Tableau 5.

<b>Répétabilité (intra-day):</b>			
<b>Contrôles Niveaux Concentrations (µg/mL)</b>	<b>CQ1 Bas 12 (11,4-12,6)</b>	<b>CQ2 Moyen 20,0 (19-21)</b>	<b>CQ3 Haut 25,0 (23,75-26,25)</b>
C1	11,75	19,43	25,01
C2	11,74	19,51	24,97
C3	11,43	19,60	24,88
C4	11,63	19,13	24,57
C5	11,69	19,38	24,82
C6	12,10	19,58	25,32
<b>Moyenne</b>	<b>11,72</b>	<b>19,44</b>	<b>24,93</b>
<b>Ecart-type</b>	<b>0,22</b>	<b>0,17</b>	<b>0,25</b>
<b>CV %</b>	<b>1,87</b>	<b>0,89</b>	<b>0,99</b>
<b>Admisibilité</b>	<b>5%</b>	<b>5%</b>	<b>5%</b>

Tableau 5- Résultats de répétabilité

Pour chaque niveau de concentration, les coefficients de variation sont inférieurs à 5%. La méthode est considérée comme répétable.

#### Reproductibilité intra-laboratoire :

Pour chaque niveau de concentration, la moyenne, l'écart-type, et le coefficient de variation (CV) sont calculés. Les résultats de la reproductibilité intra-laboratoire sont présentés dans le Tableau 6.

<b>Reproductibilité (inter-day):</b>			
<b>Contrôles Niveaux Concentrations (µg/mL)</b>	<b>CQ1 Bas 12 (11,4-12,6)</b>	<b>CQ2 Moyen 20,0 (19-21)</b>	<b>CQ3 Haut 25,0 (23,75-26,25)</b>
C1	11,8	20,9	26,0
C2	11,8	19,2	24,1
C3	11,7	20,2	24,4
C4	12,3	20,4	25,4
C5	11,4	20,1	25,5
C6	12,2	20,6	25,5
<b>Moyenne</b>	<b>11,9</b>	<b>20,2</b>	<b>25,1</b>
<b>Ecart-type</b>	<b>0,3</b>	<b>0,6</b>	<b>0,7</b>
<b>CV %</b>	<b>2,78</b>	<b>2,87</b>	<b>2,87</b>
<b>Admisibilité</b>	<b>5%</b>	<b>5%</b>	<b>5%</b>

Tableau 6- Résultats de reproductibilité intra-laboratoire

Pour chaque niveau de concentration, les coefficients de variation sont inférieurs à 5%. La méthode est considérée comme reproductible.

#### 4. Justesse/Exactitude

La justesse a été validée à partir des résultats obtenus lors des essais de répétabilité et de reproductibilité intra-laboratoire. Pour chaque niveau de concentration, le biais, exprimant le pourcentage d'écart par rapport à la valeur cible, a été calculé. Les résultats de la justesse sont présentés dans le Tableau 7.

<b>Justesse de la méthode (répétabilité et reproductibilité)</b>			
<b>Contrôles Niveaux Concentrations (µg/mL)</b>	<b>CQ1 Bas 12 (11,4-12,6)</b>	<b>CQ2 Moyen 20,0 (19-21)</b>	<b>CQ3 Haut 25,0 (23,75-26,25)</b>
C1 intra day	11,75	19,43	25,01
C2 intra day	11,74	19,51	24,97
C3 intra day	11,43	19,60	24,88
C4 intra day	11,63	19,13	24,57
C5 intra day	11,69	19,38	24,82
C6 intra day	12,10	19,58	25,32
C1 intrerday	11,8	20,9	26,0
C2 intrerday	11,8	19,2	24,1
C3 intrerday	11,7	20,2	24,4
C4 intrerday	12,3	20,4	25,4
C5 intrerday	11,4	20,1	25,5
C6 intrerday	12,2	20,6	25,5
<b>Moyenne valeur théorique</b>	<b>11,8 12,00</b>	<b>19,8 20,0</b>	<b>25,0 25,0</b>
<b>Biais %</b>	<b>-1,7</b>	<b>-0,8</b>	<b>0,1</b>
<b>Admisibilité</b>	<b>5%</b>	<b>5%</b>	<b>5%</b>

*Tableau 7- Résultats de justesse*

Pour chaque niveau de concentration, le biais est inférieur à 5%. La méthode est considérée comme juste.

#### 5. Limite de détection et limite de quantification

La méthode de dosage de l'hydrochlorothiazide n'ayant pas pour objectif de pouvoir détecter de faible concentration d'hydrochlorothiazide mais d'étudier la stabilité en milieu de gamme, la limite de détection n'a pas été déterminée.

La limite de quantification a été déterminée comme étant le plus petit point de la gamme soit 12 µg/mL.

## B. Etude de la faisabilité de la préparation

### 1. Excipients disponibles et formulation

Trois gammes de véhicules sont disponibles en France : la gamme Ora<sup>®</sup>, Inorpha<sup>®</sup> et Syrspend<sup>®</sup> (liquide et poudre).

Certains de leurs composants appartiennent à la liste des excipients à effet notoire éditée en 2009 par l'ANSM (20) :

- Parabenoates et leurs esters (excipient 33) : les dérivés méthylés et propylés sont utilisés comme conservateurs dans la gamme Ora<sup>®</sup> ; ils sont identifiés comme potentiellement perturbateurs endocriniens, et provoquent des réactions allergiques.

- Acide benzoïque et benzoates (excipient 7) : le benzoate de sodium est utilisé comme conservateur dans le Syrspend<sup>®</sup> liquide et de part sa fixation protéique à l'albumine peut être à l'origine d'ictère nucléaire chez le nouveau-né.

- Glycérol (excipient 22) : il est utilisé comme anti cristallisant dans les gammes Ora<sup>®</sup> et Inorpha<sup>®</sup>. Cet excipient est responsable de maux de tête, troubles digestifs et diarrhées.

- Sorbitol (excipient 40) : employé comme édulcorant dans la gamme Ora<sup>®</sup>, il est métabolisé en fructose et galactose et représente donc une contre-indication en cas d'intolérance au fructose. Il possède de plus un léger effet laxatif (diarrhée osmotique).

Il existe des véhicules à pH acide ou basique, dont le choix s'orientera en fonction des caractéristiques du principe actif à véhiculer. Par exemple, l'oméprazole base, pour résister au passage de l'estomac nécessite un véhicule à pH plutôt alcalin. Au contraire, une forme gastro-résistante devra être en présence d'un véhicule à pH acide.

La gamme Ora<sup>®</sup> présente une osmolalité élevée par rapport aux autres gammes, pouvant entraîner des risques de diarrhées.

La majorité des études de stabilité physico-chimique disponibles ont été réalisées dans la gamme Ora<sup>®</sup>, moins nombreuses pour les autres produits disponibles, qui sont eux plus récents.

Les Trois excipients ont été testés lors de l'étude de faisabilité et de l'étude de stabilité.

## 2. Etude de l'homogénéité par HPLC-UV

Pour chaque excipient, six préparations ont été réalisées par quatre opérateurs différents selon le mode opératoire. Les résultats de la validation de la méthode de préparation sont présentés dans le Tableau 8.

	1	2	3	4	5	6	Moyenne	Ecart-type	CV %	Biais de la moyenne
Ora <sup>®</sup> Ccalculée (biais%)	2,21 (10,33)	2,00 (0,18)	2,09 (4,65)	2,02 (0,83)	1,98 (-1,03)	2,03 (1,60)	2,06	0,83	4,06	2,76
Inorpha <sup>®</sup> Ccalculée (biais%)	2,02 (1,18)	1,77 (-11,57)	1,89 (-5,33)	1,95 (-2,34)	1,92 (-3,89)	1,82 (-8,89)	1,90	0,92	4,83	-5,14
Syrspend <sup>®</sup> Ccalculée (biais%)	1,96 (-1,85)	1,99 (-0,10)	2,38 (19,19)	1,92 (-4,00)	2,01 (0,89)	2,11 (5,49)	2,07	1,68	8,15	3,27

Ccalculée = Concentration calculée en mg/mL

Tableau 8- Résultats de la validation de la méthode de préparation

### C. Etude de stabilité

#### 1. Stabilité chimique

Les figures 20, 21, 22 illustrent l'évolution de la moyenne des concentrations (n=3) pour les flacons conservés à température ambiante ou au réfrigérateur, à l'abri ou pas de la lumière pour les 3 excipients.

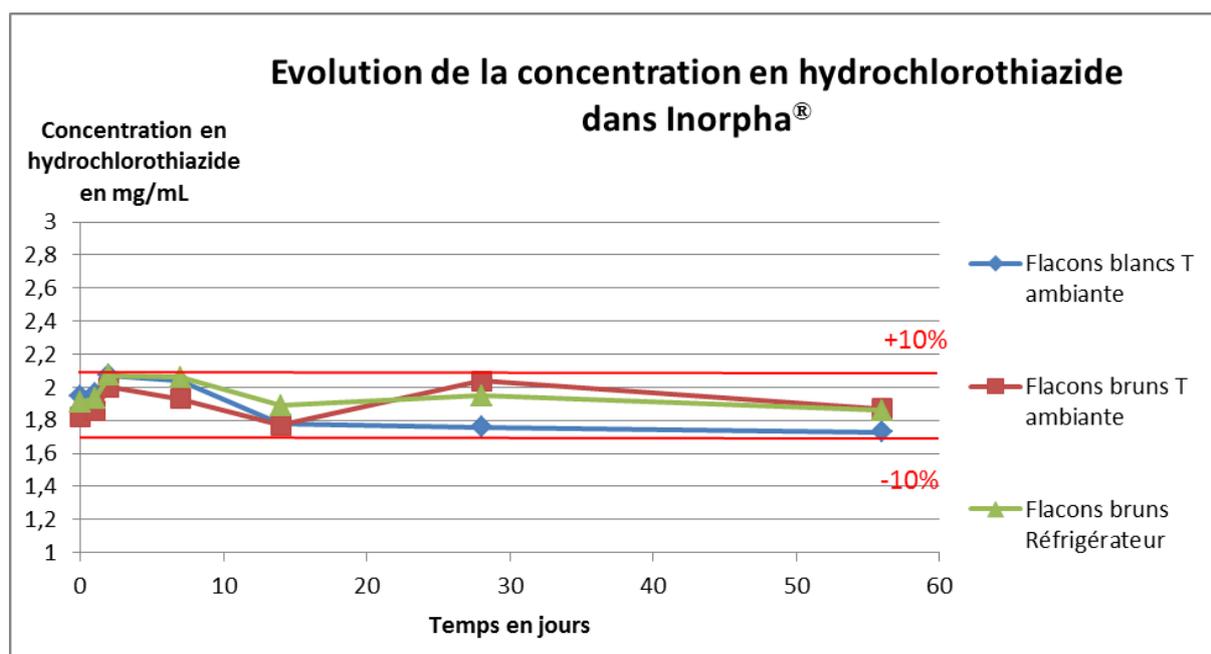


Figure 20- Evolution de la concentration en hydrochlorothiazide dans Inorpha<sup>®</sup>

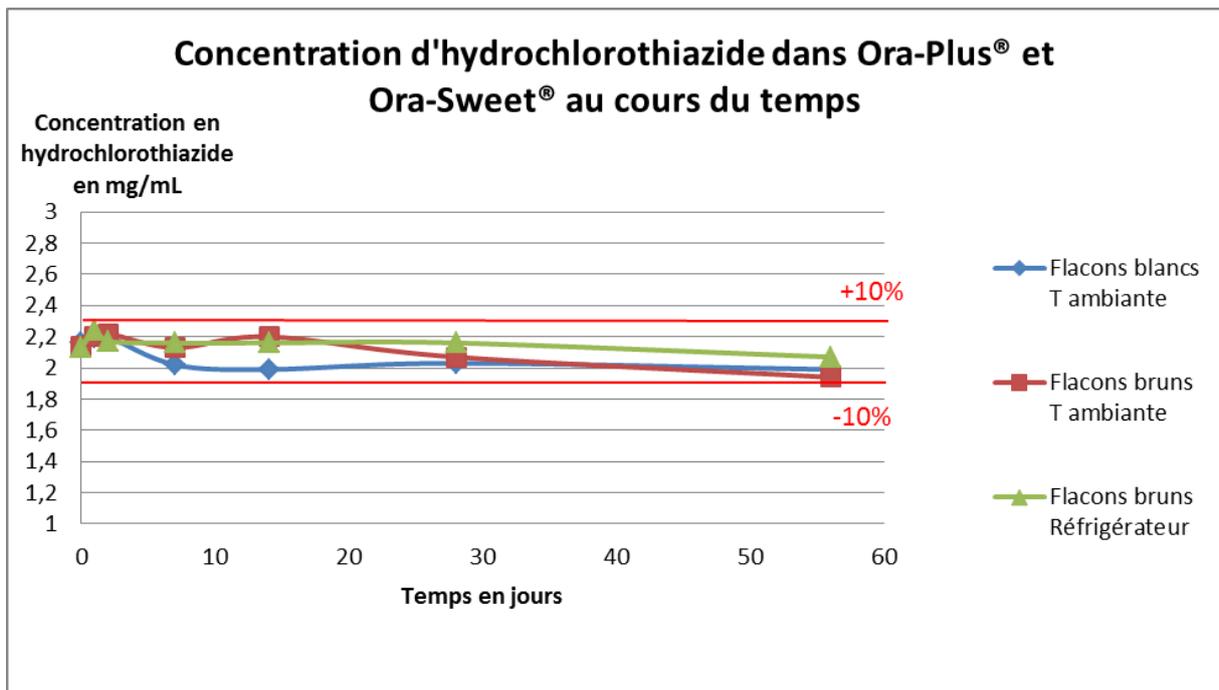


Figure 21- Evolution de la concentration moyenne en hydrochlorothiazide dans Ora-Plus® et Ora-Sweet®

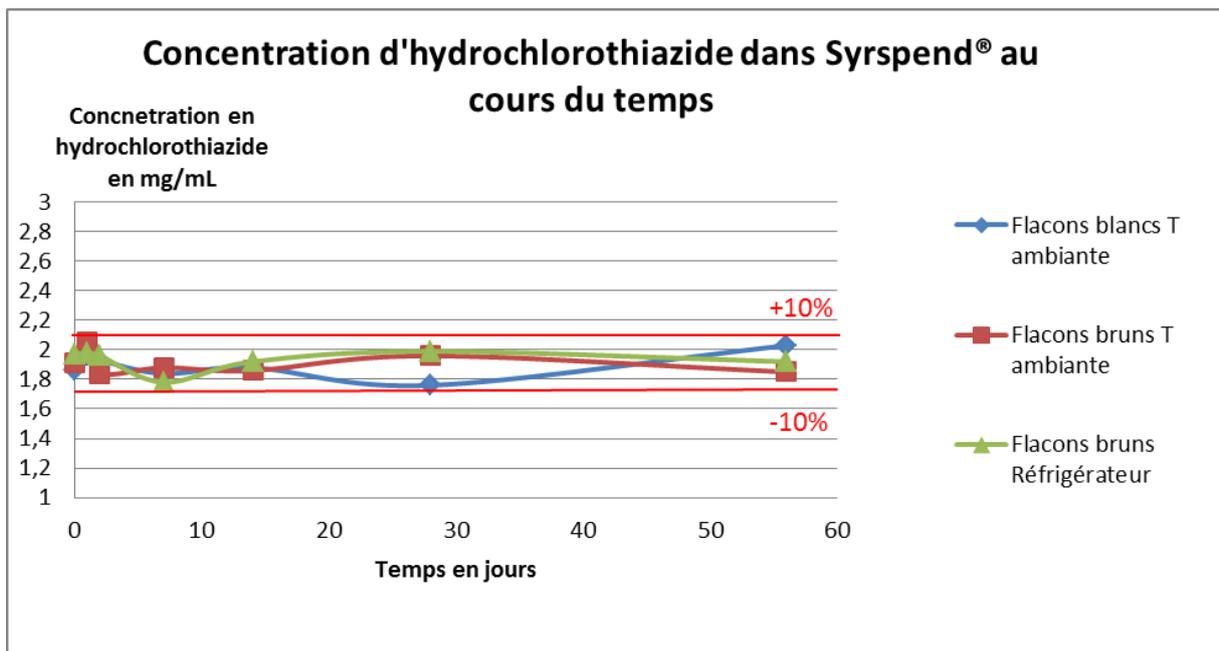


Figure 22- Evolution de la concentration en hydrochlorothiazide dans Syrspond®

La concentration en hydrochlorothiazide ne varie pas de plus de 10% par rapport à la concentration initiale pour chacun des trois excipients à température ambiante ou réfrigérée, à l'abri ou non de la lumière.

## 2. Stabilité physique

### Mesure du pH :

Les figures 23, 24, 25 illustrent l'évolution du pH (n=3) pour les flacons conservés à T ambiante ou au réfrigérateur, à l'abri ou pas de la lumière pour les 3 excipients.

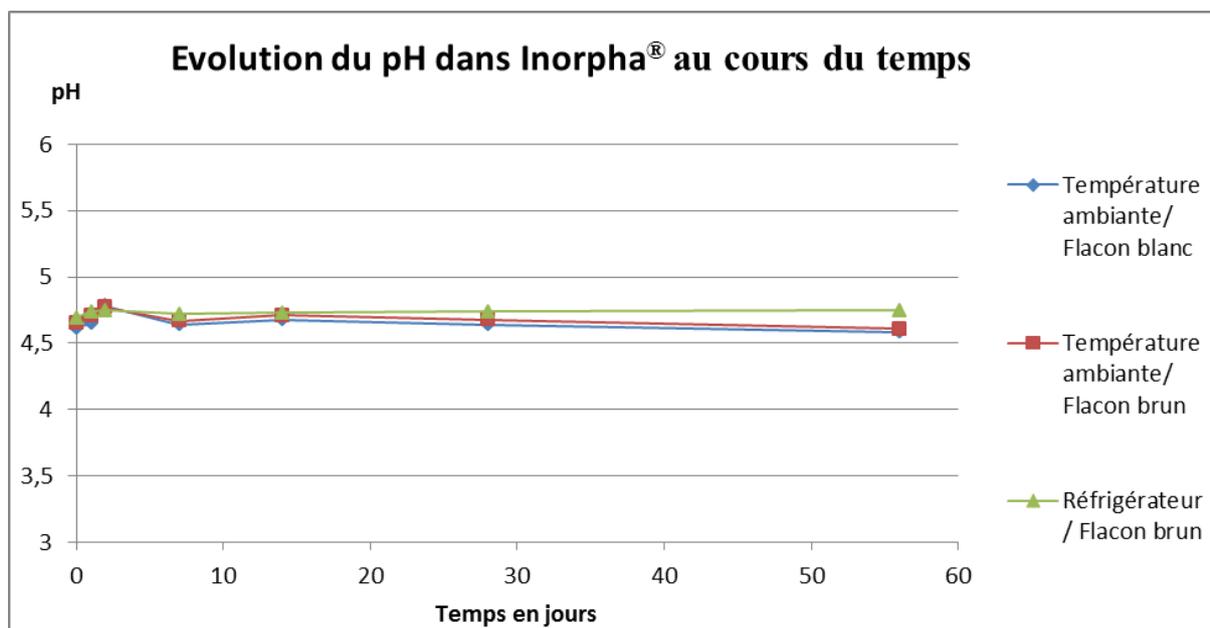


Figure 23 - Evolution du pH dans In'Orpha® au cours du temps

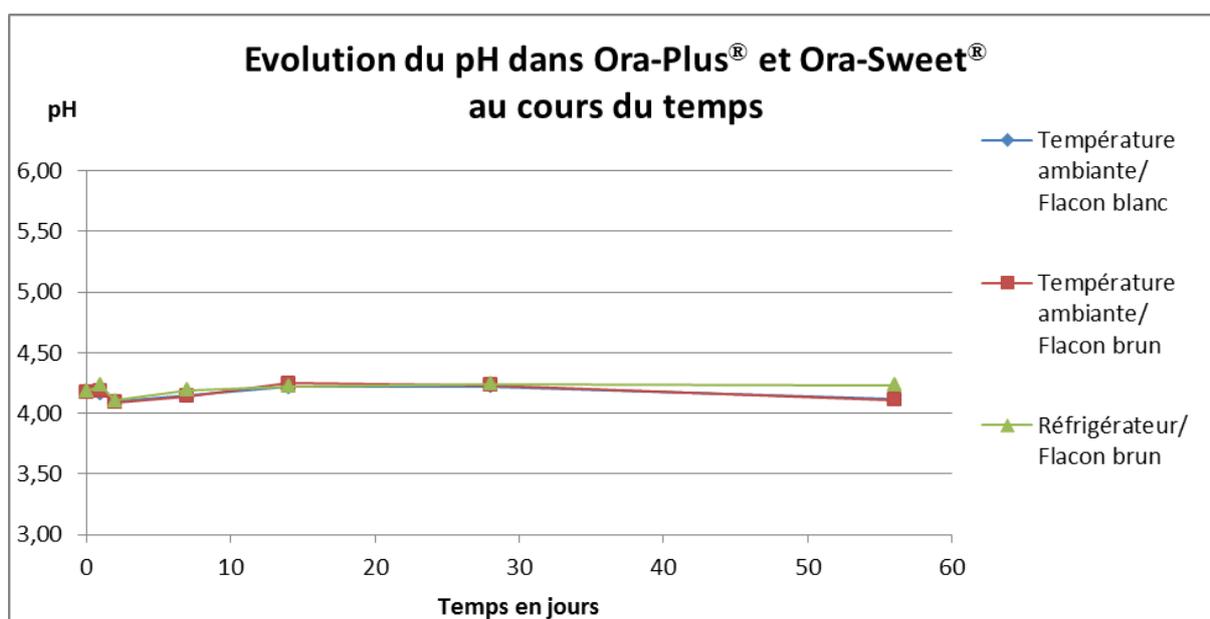


Figure 24- Evolution du PH dans OraPlus® et OraSweet® au cours du temps

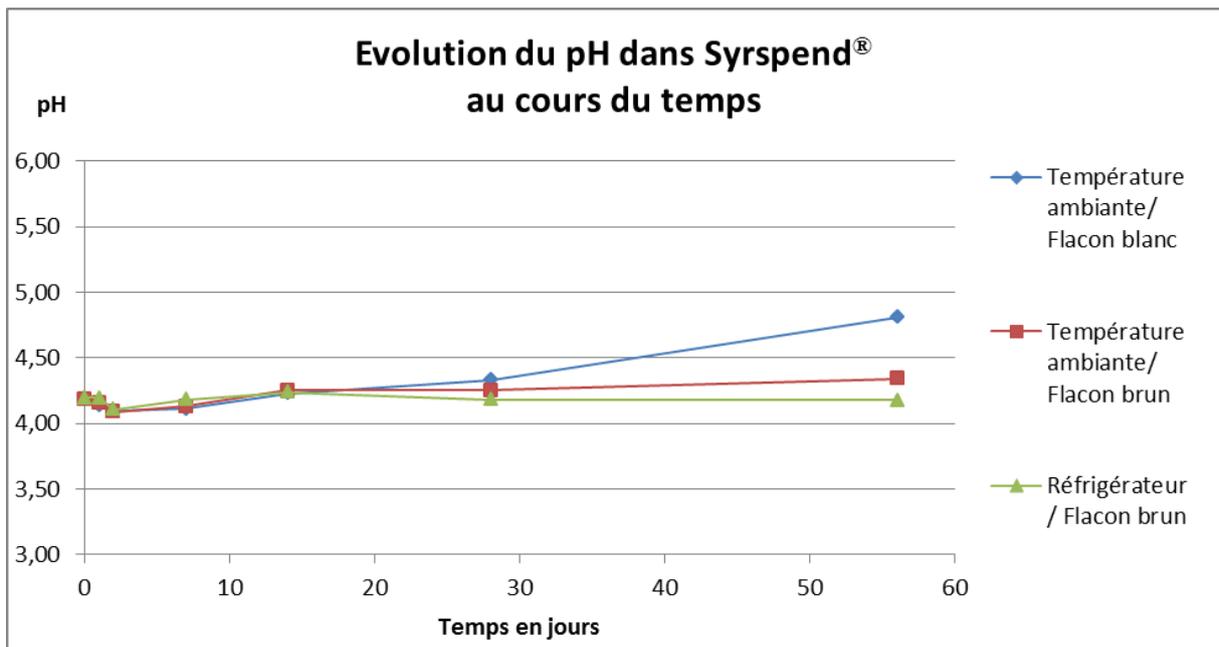


Figure 25- Evolution du pH dans Syrspend® au cours du temps

Le pH ne varie pas de plus de 1 unité pH par rapport au pH initial pour chacun des trois excipients à température ambiante ou réfrigérée, à l'abri ou non de la lumière.

Mesure de l'osmolalité :

Les figures 26, 27, 28 illustrent l'évolution de l'osmolalité (n=3) pour les flacons conservés à T ambiante ou au réfrigérateur, à l'abri ou pas de la lumière pour les 3 excipients.

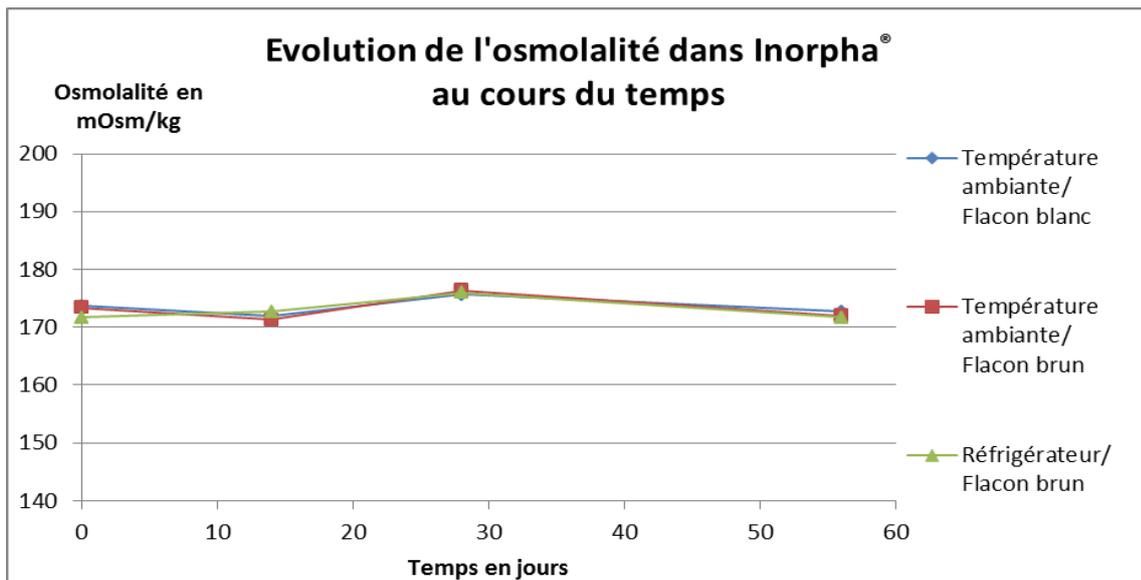


Figure 26- Evolution de l'osmolalité dans In'Orpha®

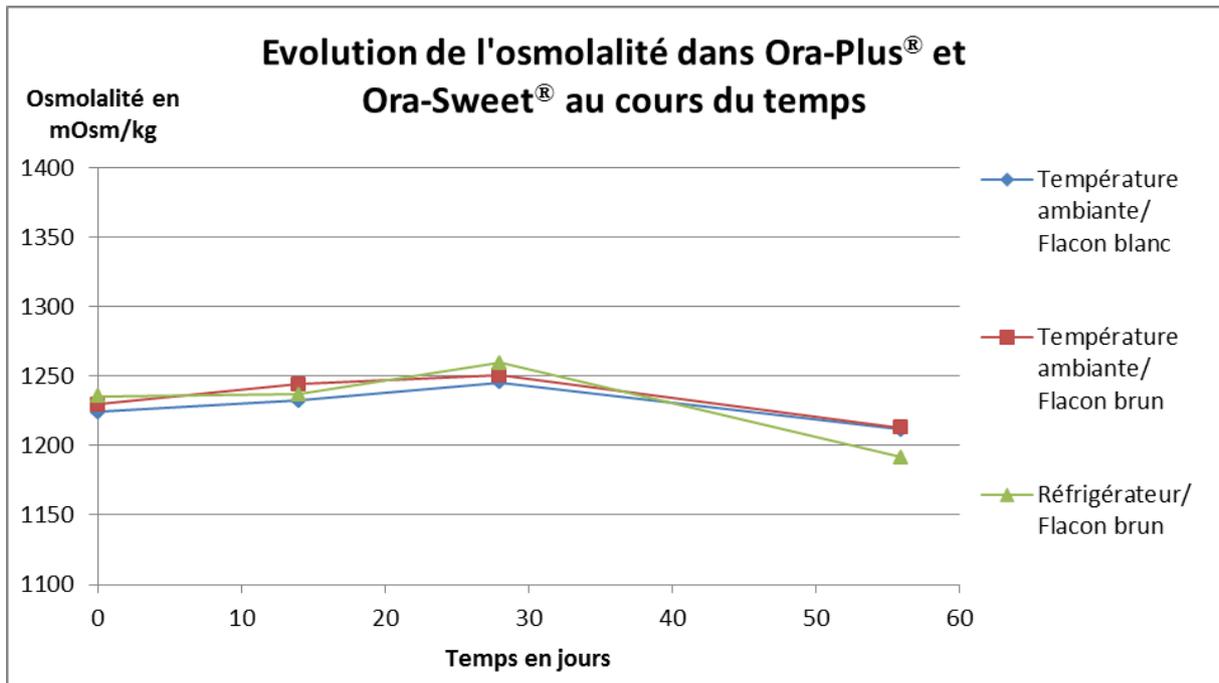


Figure 27- Evolution de l'osmolalité dans OraPlus® et OraSweet® en fonction du temps

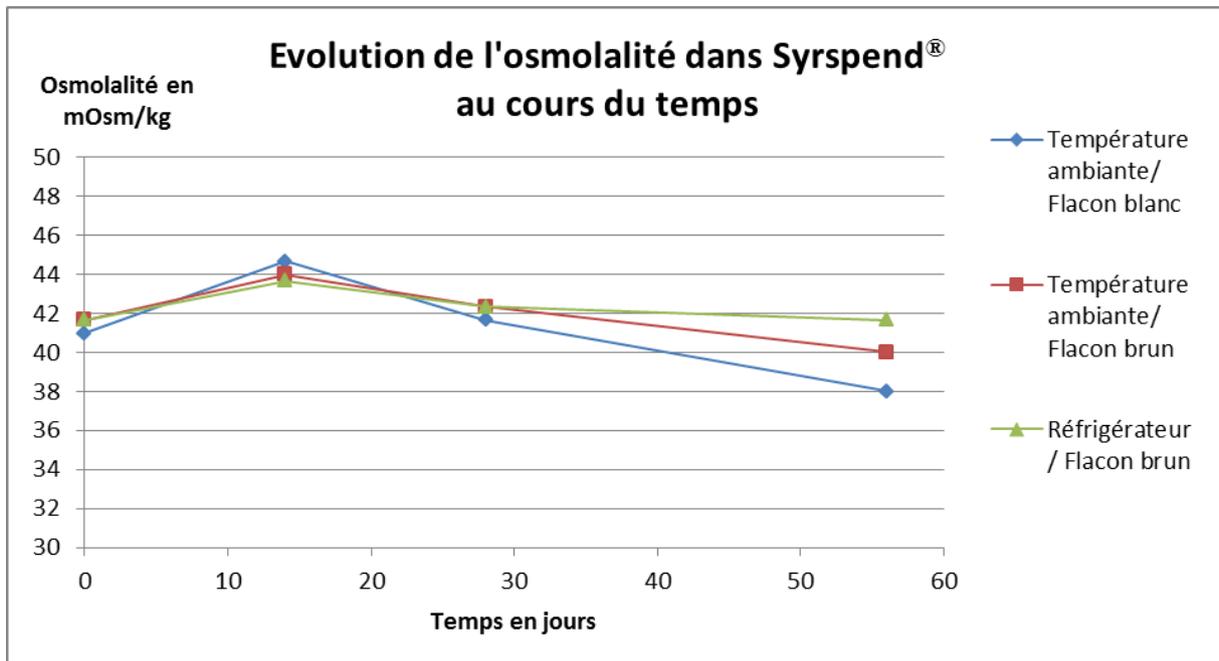


Figure 28- Evolution de l'osmolalité dans Syrspend®

L'osmolalité ne varie pas pour chacun des trois excipients à température ambiante ou réfrigérée, à l'abri ou non de la lumière.

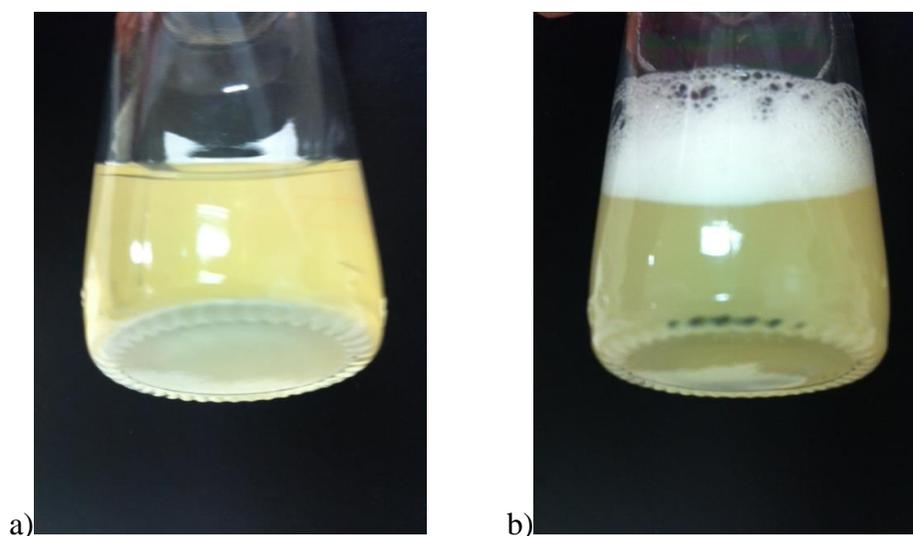
Aspect et coloration :

Aucun changement de coloration n'a été détecté après les 56 jours d'étude (Photo 2).



*Photo 2- Flacons de suspensions buvables d'hydrochlorothiazide, avec de gauche à droite Inorpha<sup>®</sup>, Ora<sup>®</sup> et Syrspend<sup>®</sup>*

Pour l'Inorpha<sup>®</sup>, une sédimentation a été observée entre chaque mesure (Photo 3), ce qui n'a pas été observé pour le Syrspend<sup>®</sup> ou l'Ora-Plus<sup>®</sup>/Ora-Sweet<sup>®</sup>.



*Photo 3- Suspension d'hydrochlorothiazide dans l'Inorpha avant agitation (a) et après agitation (b)*

Odeur :

Les différentes suspensions buvables ont conservé leur odeur initiale 56 jours après leur fabrication.

### Dosage avant et après agitation à 3 niveaux différents :

Pour chaque excipient, des dosages d'hydrochlorothiazide ont été réalisés avant et après agitation. Les prélèvements ont été réalisés à trois niveaux différents du flacon : en haut, au milieu et en bas du flacon. Les résultats sont présentés dans le Tableau 9.

	Concentration avant agitation (mg/mL)	Concentration après agitation (mg/mL)
Inorpha® Haut	0,50	1,63
Inorpha® Milieu	0,54	1,83
Inorpha® Bas	0,93	1,85
Ora-Plus®/Ora-Sweet® Haut	1,98	1,95
Ora-Plus®/Ora-Sweet® Milieu	1,98	1,98
Ora-Plus®/Ora-Sweet® Bas	2,60	2,04
Syrspend® Haut	1,88	2,07
Syrspend® Milieu	1,73	2,08
Syrspend® Bas	1,76	1,98

*Tableau 9- Différences de concentration en hydrochlorothiazide avant et après agitation*

Pour Inorpha®, on observe une différence de concentration entre avant et après agitation, avec des valeurs très faibles avant agitation à tous les niveaux du flacon. Avant agitation, l'hydrochlorothiazide est colmaté au fond du flacon ce qui rend difficile le prélèvement de la suspension buvable, seul l'excipient est aspiré.

Pour Ora-Sweet®/Ora-Plus®, on observe une différence de concentration entre avant et après agitation seulement pour le prélèvement dans le bas du flacon.

Pour Syrspend®, on n'observe pas de différences entre avant et après agitation.

## IV. Discussion

Comme tout projet de préparation d'une suspension buvable, le choix de la concentration en principe actif doit être discuté. La concentration en hydrochlorothiazide la plus souvent citée dans la littérature est celle de 5 mg/mL (1, 21).

Même si le choix de la concentration s'appuie sur des travaux déjà réalisés, elle doit aussi répondre au mieux aux besoins du centre hospitalier pour lequel la suspension buvable est préparée. Ainsi, c'est la concentration de 2 mg/mL qui a été retenue. Très peu citée dans la littérature (22), elle est cependant la plus adaptée aux besoins du CHU de Poitiers, car si l'on regarde les dosages en hydrochlorothiazide des gélules préparées depuis plusieurs années, la moyenne des dosages est de 2,16 mg d'hydrochlorothiazide.

La concentration de 2 mg/mL est donc la plus adaptée pour pouvoir répondre au mieux aux éventuels changements posologiques en cours de traitement sans administrer de gros volumes de suspension buvable pour les grosses posologies et en étant précis pour les plus faibles posologies.

Le choix du véhicule ne doit pas être négligé. Les formulations disponibles sur le marché ont chacune leur place dans la préparation des formes buvables, et seront choisies en fonction de nombreux critères : notions d'hypersensibilité ou contre-indication du patient à certains excipients, caractéristiques du principe actif, études de stabilité physico-chimiques disponibles... Des études supplémentaires en termes de comparaison de l'homogénéité des suspensions ou d'agglutination du principe actif au cours du temps, mais aussi en terme de maniabilité du produit sont apparues intéressantes pour affiner ces critères de choix.

La présence d'excipients à effet notoire est également un critère de choix. Dans la gamme Ora<sup>®</sup>, plusieurs sont retrouvés : des parabenzates (pouvant être à l'origine de troubles endocriniens et de réactions allergiques), du glycérol (pouvant provoquer des céphalées ou des troubles digestifs), ou encore du sorbitol (qui est contre-indiqué en cas d'intolérance au fructose et qui peut engendrer une diarrhée). La gamme Inorpha<sup>®</sup>, contient un seul excipient à effet notoire : le glycérol. Quant au Syrspend<sup>®</sup> liquide, on retrouve dans sa formulation du benzoate de sodium ; or, chez les prématurés et les nouveau-nés de moins de 8 semaines, en raison de l'immaturation des enzymes de métabolisation, il existe un risque d'accumulation d'acide benzoïque avec, pour conséquence, un risque d'augmentation de la bilirubinémie consécutive à son déplacement de l'albumine, pouvant aggraver l'ictère du nouveau-né vers un ictère nucléaire. Le Syrspend<sup>®</sup> deshydraté ne contient pas de conservateur comme l'acide benzoïque, mais il n'est pas encore disponible en France.

Le pH et l'osmolalité de l'excipient doivent également être pris en compte. Le pH acide des trois excipients est compatible avec une absorption orale. Concernant l'osmolalité, lorsqu'elle est élevée, elle peut entraîner des diarrhées. L'estomac supporte une osmolalité jusqu'à 1000 mOsmol/kg (31). Elle est faible dans le cas d'Inorpha<sup>®</sup> et de Syrspend<sup>®</sup> contrairement à l'Ora<sup>®</sup> où elle est plus élevée.

Le goût procuré à la suspension buvable par l'excipient est aussi un critère de choix important, d'autant plus lorsque la suspension buvable est destinée à être administrée à des enfants. Il permet d'assurer une bonne compliance au traitement en facilitant sa prise. Ainsi, les gammes Ora<sup>®</sup> et Syrspend<sup>®</sup> procurent à la suspension buvable un goût cerise (Syrspend<sup>®</sup> peut également avoir un goût neutre sur demande). En ce qui concerne Inorpha<sup>®</sup>, il lui procure un goût caramel.

Le choix de l'excipient s'appuie également sur la facilité de mise en suspension du principe actif dans l'excipient pendant la préparation et avant utilisation. L'étude de faisabilité n'a montré aucune difficulté à la mise en suspension de l'hydrochlorothiazide par différents opérateurs pour les différents excipients. Concernant la remise en suspension avant utilisation, les dosages comparant la concentration avant et après agitation ont montré que pour l'Ora<sup>®</sup> et le Syrspend<sup>®</sup> la remise en suspension du principe actif est simple et ne demande qu'une agitation de quelques secondes, alors que pour l'Inorpha<sup>®</sup>, l'agitation doit être vigoureuse pour remettre en suspension le produit qui a sédimenté.

Concernant la méthode chromatographique, elle a été mise au point à partir de données issues de la littérature. Différentes phases mobiles ont été utilisées dans divers articles scientifiques : acide trifluoroacétique à 0,2% et acetonitrile à un débit de 1,2 mL/min en mode gradient au cours du temps (23) ; phosphate aqueux à 0,1M comme solution tampon, acetonitrile et tetrahydrofurane à un débit de 1 mL/min (24) ; 5% de méthanol et 95% d'eau ajusté à un pH de 4,5 avec de l'acide acétique 1M à un débit de 1,5 mL/min (22). Nous nous appuyés sur la dernière phase mobile citée, plus facile à mettre en œuvre que les deux premières, adaptée à notre appareillage et plus spécifique du dosage de l'hydrochlorothiazide seul en suspension. A partir de cette phase mobile, différentes proportions d'eau et de méthanol dans la phase mobile, et différents débits ont été testés. Les conditions optimales du dosage de l'hydrochlorothiazide sont obtenues à partir d'une phase mobile contenant 20% de méthanol et 80% d'eau à un pH de 4,5 obtenu à partir d'acide acétique 1M et avec un débit de 1,5 mL/min.

Quant au choix de la longueur d'onde à 224 nm, il a été confirmé par la réalisation du spectre UV de l'hydrochlorothiazide. Dans la littérature, deux longueurs d'onde sont utilisés : 224 nm (22, 24) et 263 nm (23).

En ce qui concerne le protocole de dosage, la plupart des données trouvées dans la littérature ont montré que le méthanol était le solvant le plus utilisé pour dissoudre l'hydrochlorothiazide. (23).

La méthode de dosage qui a été mise au point est spécifique, linéaire, fidèle et juste. Elle a donc été validée et a pu être utilisée pour réaliser l'étude de stabilité. Cette méthode de dosage sera également utilisée pour le contrôle libératoire des suspensions buvables d'hydrochlorothiazide.

L'étude de stabilité permet de montrer la stabilité à la fois microbiologique, chimique et physique d'une préparation.

Dans cette étude, la stabilité microbiologique n'a pas été déterminée. Cependant, une étude menée au sein de l'hôpital Robert Debré a montré la stabilité microbiologique pendant 60 jours d'une suspension buvable de spironolactone à 5 mg/mL avec Ora Plus<sup>®</sup> et Ora Sweet<sup>®</sup> (1). Cette suspension buvable a été préparée et utilisée dans les mêmes conditions que le serait une suspension buvable d'hydrochlorothiazide. Par ailleurs, chacun des excipients contient des conservateurs.

Plusieurs études de stabilité physico-chimique de suspension buvable d'hydrochlorothiazide ont été retrouvées dans la littérature. Parmi les études publiées, une seule concernait une suspension buvable d'hydrochlorothiazide à 2 mg/mL. Le véhicule de l'hydrochlorothiazide au cours de cette étude était un mélange de glycérine, méthylcellulose, acide citrique et eau purifiée. La stabilité étudiée de la préparation dans ces conditions était de 24 jours à 5°C (22). Une autre étude menée en Hollande sur une suspension buvable d'hydrochlorothiazide de 0,5 mg/mL a permis de montrer sa stabilité pendant 6 mois à température ambiante dans un mélange complexe d'excipients (25). La seule étude de stabilité concernant un des véhicules utilisés lors de notre étude a été réalisé sur une suspension buvable d'hydrochlorothiazide de 5 mg/mL dans du Syrspend<sup>®</sup> (26). Cette préparation est stable 60 jours entre 15 et 25°C. Cependant, nous n'avons aucune donnée sur la façon dont a été effectuée cette étude de stabilité.

Dans ces conditions, il est difficile de transposer les résultats issus de la bibliographie à notre étude, d'où l'utilité d'avoir réalisé notre propre étude de stabilité.

Une durée de 2 mois a été choisie pour réaliser l'étude de stabilité car les excipients Ora<sup>®</sup> et Syrspend<sup>®</sup> se conservent deux mois après ouverture. Cette étude a montré la possibilité de conserver la suspension buvable d'hydrochlorthiazide à 2 mg/mL 56 jours à température ambiante comme à température réfrigérée, à l'abri ou non de la lumière dans les trois excipients testés.

## Conclusion

La dysplasie broncho-pulmonaire (DBP) est une des complications les plus fréquentes et la principale séquelle respiratoire de la grande prématurité. Son incidence varie en Europe entre 10,5 et 21,8%. Il est observé chez les nourrissons atteints de DBP la présence d'œdèmes pulmonaires qui peuvent être traités par l'utilisation de dérivés thiazidiques comme l'hydrochlorothiazide.

L'hydrochlorothiazide comme de nombreux principes actifs ne possèdent pas de spécialités en pédiatrie. Les pharmacies sont obligées de faire des préparations pour répondre à la demande des services de pédiatrie, avec comme possibilités de préparer des formes gélules ou des suspensions buvables. Les gélules réalisées à la pharmacie présentent l'avantage d'être une présentation unitaire de la dose exacte, cependant les gélules sont inadaptées à l'administration chez les enfants de moins de 6 ans incapables de les avaler. L'ouverture de la gélule est alors nécessaire générant des erreurs de dosage et des problèmes de goût. L'alternative de la suspension buvable paraît la mieux adaptée : elle répond mieux à l'administration aux jeunes enfants, aux adaptations de posologie et selon les excipients utilisés pour la mise en suspension, il est possible de masquer le goût.

L'objectif de ce travail de pharmacotechnie était de mettre au point une suspension buvable d'hydrochlorothiazide à 2 mg/mL et de déterminer la durée de stabilité pour trois excipients différents. La stabilité a été déterminée en dosant l'hydrochlorothiazide par HPLC-UV avec une méthode mise au point et validée préalablement au cours de ce même travail.

L'étude réalisée a montré la possibilité de conserver la suspension buvable d'hydrochlorothiazide à 2 mg/mL 56 jours à température ambiante comme à température réfrigérée, à l'abri ou non de la lumière dans les trois excipients testés.

La pharmacie d'officine est de moins en moins sollicitée pour la réalisation de préparations contrairement aux Pharmacies à Usage Intérieur. Cependant, lorsqu'une nouvelle préparation est prescrite à un patient, il n'en reste pas moins utile de connaître la stabilité du principe actif dans les excipients disponibles à l'officine pour pouvoir déterminer une date limite de conservation de la préparation. Une étude de stabilité n'étant pas réalisable en pharmacie d'officine, la recherche de données bibliographiques concernant les excipients et le principe actif est alors nécessaire pour pouvoir déterminer la date limite de conservation d'une préparation.

## Bibliographie

(1) FAJOLLE V., DUJOLS C., DARBORD J-C., et al. Evaluation de suspensions orales pédiatriques, hydrochlorothiazide et captopril : stabilité microbiologique et revue d'utilisation clinique. J Pharm Clin, 2005, 24, n°1, p. 23-29.

(2) FONTAN J.E., COMBEAU D., BRION F., et al. Les préparations pédiatriques dans les hôpitaux français. Archives pédiatriques, 2000, 7, p. 825-832.

(3) BAY M., SAINT-LAURENT C., DUPUIS A. Les préparations buvables en pédiatrie. Actualités pharmaceutiques hospitalières, 2011, 7, n°26, p. 20-24.

(4) Direction de l'évaluation des médicaments et des produits biologiques, Département de l'évaluation des Essais cliniques et des médicaments à statut particulier, Cellule préparations hospitalières. AFSSAPS. Résumé du rapport d'analyse des préparations hospitalières déclarées à l'AFSSAPS (période janvier 2008/ janvier 2010). 2010. Annexe 2, p.7.

(5) Code de la santé publique. Article L5121-1. [en ligne]. In : Legifrance. Disponible sur : <http://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?idArticle=LEGIARTI000026499732&cidTexte=LEGITEXT000006072665>. (Page consultée le 08 octobre 2013)

(6) Afssaps. Bonnes pratiques de préparation. [en ligne]. In : ANSM. Bonnes pratiques de préparation. Disponible sur : [http://ansm.sante.fr/Activites/Elaboration-de-bonnes-pratiques/Bonnes-pratiques-de-preparation/\(offset\)/5](http://ansm.sante.fr/Activites/Elaboration-de-bonnes-pratiques/Bonnes-pratiques-de-preparation/(offset)/5). (Page consultée le 08 avril 2013)

(7) ANSM. Etiquetage des préparations magistrales, officinales et hospitalières : précisions et recommandations relatives à l'application du décret n° 2012-1201-Point d'information. [ en ligne]. Disponible sur : <http://ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/Etiquetage-des-preparations-magistrales-officinales-et-hospitalieres-precisions-et-recommandations-relatives-a-l-application-du-decret-n-2012-1201-Point-d-information>. (Page consultée le 05 septembre 2014)

(8) AYRAULT Jean-Marc. Décret n°2012-1201 du 29 octobre 2012 relatif à l'étiquetage des préparations et d'autres produits pharmaceutiques. Journal officiel de la République Française, 2012, n°0254, texte n°13, p. 17063.

- (9) JARREAU P.-H, FAYON M., BAUD O. et al. Utilisation de la corticothérapie postnatale chez le nouveau-né prématuré dans la prévention et le traitement de la dysplasie bronchopulmonaire : état des lieux et conduite à tenir. *Archives de pédiatrie*, 2010, 17, p.1480-1487.
- (10) HADCHOUEL A., DELACOURT C. Dysplasie bronchopulmonaire du nouveau-né prématuré : d’hier à aujourd’hui. *Revue de Pneumologie clinique*, 2013, 69, p207-216.
- (11) FAUROUX Brigitte. *Dysplasie bronchopulmonaire*. 2005.
- (12) MOFFATT A.C, OSSELTON M.D, WIDDOP B. et al. *Clarke’s Analysis of drugs and Poisons in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material*, third edition. Pharmaceutical Press, London, 2004, p1109-1110.
- (13) Dorvault. Editions Vigot. p.820
- (14) SEMAMA D.S. Diurétique et prématuré. *Archives de pédiatrie*, 2006, 13, p. 381-382.
- (15) MOZAYANI A., RAYMON L. *Handbook of Drug Interactions*. 2<sup>nd</sup> edition. 2011. P. 343-344.
- (16) SEMAMA D.S. Diurétique et prématuré. *Archives de pédiatrie*, 2006, 13, p. 384.
- (17) BROSSARD D., CHEDRU-LEGROS V., CRAUSTE-MANCIET S. et al. *Guide méthodologique des études de stabilité des préparations*. 1<sup>ère</sup> édition, 2013, 74 p.
- (18) JACOB Véronique. *La chromatographie liquide haute performance*. 2010.
- (19) TRISSEL L.A. *Handbook on injectable drugs*, 13th edition, ed. American Society of Health-System Pharmacists. 2005, 1645 p.
- (20) AFSAPPS. *Liste des Excipients à Effet Notoire Mise à Jour de la liste et des libellés selon le Guideline européen 2003 AFSAPPS-2<sup>ème</sup> révision du 3 mars 2009*. [en ligne]. Disponible sur : [http://ansm.sante.fr/var/ansm\\_site/storage/original/application/29aa941a3e](http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/29aa941a3e)

(21) ALLEN LV, ERICKSON M.A 3rd. Stability of labetolol hydrochloride, metoprolol tartate, verapamil hydrochloride, and spironolactone with hydrochlorothiazide in extemporaneously compounded oral liquids. Am J Health Syst Pharm, 1996, 53, p. 2304-2309.

(22) SANTOVENÏ A., HERNÁNDEZ-PAIZ Z., FARIÑA J.B. Design of pediatric oral formulation with a low proportion of hydrochlorothiazide. International Journal of Pharmaceutics, 2012, 423, p.360-364.

(23) TAOMIN H., ZHONG H., BEI Y. et al. Simultaneous determination of captopril and hydrochlorothiazide in human plasma by reverse-phase HPLC from linear gradient elution. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006, 41, p. 644-648.

(24) THUSLEEM O.A, MUNEERA M.S, AKMAL J. et al. A simple and rapid high-performance liquid chromatographic method for the determination of bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide in a tablet dosage form. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008, 48, p. 1055-1057.

(25) LI Y.Y, POSTMA D.J, WAGENAAR H.W.G. Development of a hydrochlorothiazide 0,5mg/mL oral solution for children. EAHP Congress Paris, 2013.

(26) FAGRON. SyrSpend® SF Table de compatibilité. In FRAGRON. Table de Stabilité. [en ligne]. Disponible sur : [http://www.fagron.fr/cms\\_files/N-56582-frFile1.pdf](http://www.fagron.fr/cms_files/N-56582-frFile1.pdf). (Page consultée le 29 octobre 2014)

(27) International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. 2005. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)

(28) Paddock Laboratories Inc. [www.paddocklabs.com](http://www.paddocklabs.com)

(29) INRESA. Inorpha. [en ligne]. <http://www.inresa-pharma.fr/InOrpha.pdf>. (Page consultée le 29 octobre 2014)

(30) FAGRON. SyrSpend® SF. In FRAGRON. [en ligne]. Disponible sur : <http://www.fagron.fr/fr/56581>. (Page consultée le 29 octobre 2014)

(31) Hôpitaux universitaires de Genève, Pharmacie. Administration de produits injectables par voie orale ou parentérale. [en ligne]. [http://pharmacie.hug-ge.ch/infomedic/utilismedic/admin\\_injperos.pdf](http://pharmacie.hug-ge.ch/infomedic/utilismedic/admin_injperos.pdf). (Page consultée le 09 septembre 2014)

# Annexes

## Annexe 1 : Protocole de dosage de la suspension buvable d'hydrochlorothiazide

 PHARM-LABO-MO- Version n° 01	<b>Pôle Pharmacie et Santé Publique</b> <b>Service Pharmacie</b>	Page : 1/3
	<b>Dosage de la suspension buvable d'hydrochlorothiazide par HPLC</b>	

Historique		
Numéro de version	Date version 01	Nature des éventuelles modifications
01		

### **OBJET :**

Ce mode opératoire décrit les différentes étapes du dosage par HPLC de l'hydrochlorothiazide dans la solution buvable d'hydrochlorothiazide à 5 mg/mL préparée à la pharmacie.

### **PRINCIPE DU DOSAGE :**

L'échantillon est un des flacons de la solution buvable d'hydrochlorothiazide à 5 mg/mL, conservé à +4°C (identifiée par la mention « pour dosage »).

### **REACTIFS :**

Hydrochlorothiazide	COOPER
Méthanol HPLC grade	VWR CHEMICALS
Eau distillée	

### **CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES :**

Détecteur :	UV fixe $\lambda = 224$ nm
Colonne :	Purospher® 5 $\mu$ m RP-18 endcapped MERCK (150 x 4.6 cm) M
Phase mobile :	20% Méthanol 80% Eau distillée
Débit :	1,5 mL/min
Volume d'injection :	10 $\mu$ L
Run time :	10 min

### **SOLUTION ETALON :**

**Préparation extemporanée de la Solution Mère de Dosage à 100  $\mu$ g/mL :** peser 10 mg de poudre d'hydrochlorothiazide et dissoudre dans 10 mL de méthanol dans une fiole jaugée, puis diluer au 1/10<sup>ème</sup> avec de l'eau distillée.

Rédaction	Vérification	Approbation
ROUSSEAU Hélène Etudiante en 6 <sup>ème</sup> année de pharmacie Date et signature :	Interne Date et signature :	Chef de service Date et signature :

 PHARM-LABO-MO- Version n° 01	<b>Pôle Pharmacie et Santé Publique</b> <b>Service Pharmacie</b>	Page : 2/3 Date : Octobre 2013
	<b>Dosage de la suspension buvable d'hydrochlorothiazide par HPLC</b>	

### GAMME ETALON

Dans des tubes Ependorf 1,5 mL, diluer géométriquement la SM avec de l'eau distillée (750 µL + 750 µL).

µg/ml	T100	T50	T25	T12.5	T6,25	T0
SM = 100µg/ml	750 µL SM	750 µL SM	750 µL T50	750 µL T25	750 µL T12,5	
Eau distillée		750µL	750µL	750µL	750 µL	750 µL

VORTEXER tous les Ependorf 30 secondes à chaque étape de la dilution.  
Effectuer d'abord la dilution et transférer le contenu de chaque Ependorf dans les vials.

Injecter 10 µL.

### CONTROLE DE QUALITE :

Un contrôle interne à 50 µg/mL, est réalisé au laboratoire par une personne autre que la personne réalisant le dosage.

**Préparation extemporanée du contrôle qualité d'hydrochlorothiazide à 50 µg/mL :** peser 10 mg de poudre d'hydrochlorothiazide et dissoudre dans 10 mL de méthanol dans une fiole jaugée. Puis diluer au 1/20<sup>ème</sup>.

### PREPARATION DE L'ECHANTILLON :

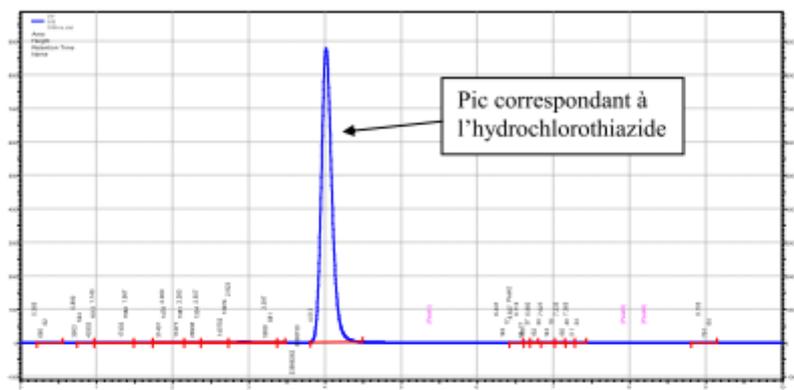
Préparer 3 Ependorf (1 pour chaque échantillon)

Dans chaque tube Ependorf de 1,5 mL :

- diluer la solution buvable d'hydrochlorothiazide à 5 mg/mL au 10<sup>ème</sup> dans du méthanol (100 µL solution d'hydrochlorothiazide + 900 µL d'eau distillée).
- Agiter au vortex 30 secondes.
- Centrifuger 60 secondes au maximum de rpm.
- Diluer à nouveau au 10<sup>ème</sup> (100 µL de surnageant + 900 µL d'eau distillée)
- Vortexer
- Transférer 1000 µL dans un vial
- Injecter 10 µL

 PHARM-LABO-MO- Version n° 01	<b>Pôle Pharmacie et Santé Publique</b> <b>Service Pharmacie</b>	Page : 3/3 Date : Octobre 2013
	<b>Dosage de la suspension buvable d'hydrochlorothiazide par HPLC</b>	

**EXEMPLE DE TRACE CHROMATOGRAPHIQUE :**



**RESULTAT / FICHE DE CONTRÔLE :**

- La préparation d'hydrochlorothiazide à 5mg/ml (à doser) a été diluée deux fois au dixième (soit une dilution au centième), ce qui revient à doser une solution diluée d'hydrochlorothiazide à 50µg/ml.
- La gamme d'étalonnage va de 100µg/ml à 0µg/ml et le point contrôle qualité est à 50µg/ml. Cette gamme d'étalonnage est donc appropriée pour le dosage de l'hydrochlorothiazide à 5mg/ml diluée au centième.
- Les concentrations de la gamme d'étalonnage sont exprimées en mg/ml, ce qui correspond à une augmentation d'un facteur 100 des valeurs des points de gamme, pour obtenir la concentration réelle de la solution d'hydrochlorothiazide (et non la concentration de la dilution au centième).

Concentration	AUC
10	-
5	-
2.5	-
1.25	-
0	0

- En obtenant un résultat exprimé en mg/ml, la comparaison avec la concentration théorique de 5mg/ml est donc simplifiée.  
Le résultat obtenu est calculé à partir des trois moyennes des échantillons.  
La préparation va être conforme si elle est comprise dans la fourchette 4.5mg/ml < résultat < 5.5mg/ml.

 PHARM-LABO-MO- Version n° 01	<b>Pôle Pharmacie et Santé Publique</b> <b>Service Pharmacie</b>	Page : 4/3 Date : Octobre 2013
	<b>Dosage de la suspension buvable d'hydrochlorothiazide par HPLC</b>	

Qté de principe actif :	5 mg/ml
Résultats obtenus :	--- mg/ml
Entre -10% et +10%	

- Sur la fiche de contrôle remplir les informations et les valeurs suivantes :
  - o 1 : le numéro de préparation et la date de réalisation du contrôle.
  - o 2 : la date de fabrication et la date de péremption de la préparation.
  - o 3 : remplir dans le tableau les AUC obtenu sur le logiciel EZChrom Elite. (dans File, Data, Open, et choisir les graphique 0, 12.5, 25, 50, 100)
  - o 4 : remplir dans le tableau les AUC obtenu sur le logiciel EZChrom Elite. (dans File, Data, Open, et choisir les graphiques cq-rep...)
  - o 5 : remplir dans le tableau les AUC obtenu sur le logiciel EZChrom Elite. (dans File, Data, Open, et choisir les graphiques ec1, ec2, ec3)
  - o 6 : vérifier si le contrôle réalisé est conforme ou non conforme.

**REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE :**

Annexe 2 : Exemple de Mode opératoire pour la préparation d'une suspension buvable d'hydrochlorothiazide à 2mg/mL avec In'Orpha®

	SERVICE PHARMACIE – UNITE DE PHARMACOTECHNIE	MO-PREP-XXX
	MODE OPERATOIRE	
<b>SOLUTION BUVABLE D'HYDROCHLOROTHIAZIDE 2mg/mL</b>		
<b>INDICATIONS THERAPEUTIQUES</b>		
✓ Broncho dysplasie		
<b>SERVICES DEMANDEURS</b>		
✓ Pédiatrie		
<b>FORMULE</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Hydrochlorothiazide                      60mg</li> <li>➤ In'Orpha    30mL</li> </ul>		
<b>PRODUITS &amp; MATERIELS NECESSAIRES</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Hydrochlorothiazide</li> <li>✓ In'Orpha</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ 1 mortier et 1 pilon</li> <li>✓ 1 éprouvette graduée de 30 mL</li> <li>✓ 1flacon blanc de 30mL</li> </ul>	
<b>METHODE</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Peser l'hydrochlorothiazide puis la triturer dans le mortier</li> <li>✓ Mesurer à l'éprouvette le volume d'In'Orpha</li> <li>✓ Dans un mortier, dissoudre l'hydrochlorothiazide dans une faible quantité d'In'Orpha pour former une pâte. Triturer</li> <li>✓ Rajouter petit à petit le reste d'In'Orpha jusqu'à obtenir une suspension</li> <li>✓ Transvaser dans le flacon</li> <li>✓ Etiqueter le flacon</li> </ul>		
Solution buvable d'hydrochlorothiazide 2mg/mL	09/07/2014	1/2

Annexe 3 : Exemple de Fiche de fabrication – Document d’enregistrement

	SERVICE PHARMACIE – UNITE DE PHARMACOTECHNIE	MO-PREP-XXX
	MODE OPERATOIRE	
<b>SOLUTION BUVABLE D’HYDROCHLOROTHIAZIDE 2mg/mL</b>		

FICHE DE FABRICATION
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Définir le numéro de la préparation</li> <li>✓ Remplir la fiche de préparation intitulée « Solution buvable d’hydrochlorothiazide à 2mg/mL » (Cf.EN-PREP- )</li> </ul>

ETIQUETAGE													
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Etiquette blanche portant les mentions : « Conserver au réfrigérateur (+4°C) » quand c’est le cas « Agiter avant emploi »</li> <li>✓ Contre-étiquette rouge portant la mention : « Respecter les doses prescrites »</li> </ul>	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center;">CHU DE POITIERS – SERVICE PHARMACIE</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center;">SOLUTION BUVABLE D’HYDROCHLOROTHIAZIDE 2mg/mL</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Prép N° :</td> <td style="text-align: center;">Fab. le :</td> <td style="text-align: center;">Pér. le :</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center; background-color: #f4a460;"><b>Respecter les doses prescrites</b></td> </tr> </table>	CHU DE POITIERS – SERVICE PHARMACIE			SOLUTION BUVABLE D’HYDROCHLOROTHIAZIDE 2mg/mL			Prép N° :	Fab. le :	Pér. le :	<b>Respecter les doses prescrites</b>		
CHU DE POITIERS – SERVICE PHARMACIE													
SOLUTION BUVABLE D’HYDROCHLOROTHIAZIDE 2mg/mL													
Prép N° :	Fab. le :	Pér. le :											
<b>Respecter les doses prescrites</b>													

CONSERVATION
✓ Conserver 3 flacons blancs à T° ambiante

HISTORIQUE DES MODIFICATIONS		
Numéro de version	Date d’application	Nature des modifications
Version 1	xxx	

VALIDATION		
Rédaction	Vérification	Approbation
Date : 09/07/2014	Date :	Date :
Nom (s) : Rousseau H	Nom (s) :	Nom (s) :
Signature (s) :	Signature (s) :	Signature (s) :

	SERVICE PHARMACIE – PREPARATOIRE	EN-PREP-024
	FICHE DE FABRICATION DOCUMENT D'ENREGISTREMENT	
1 SOLUTION BUVABLE D'HYDROCHLOROTHIAZIDE à 2mg/ml		

<b>DENOMINATION DE LA PREPARATION &amp; DOSAGE</b>  Suspension buvable d'Hydrochlorothiazide à 2 mg/ml	N° DE LOT DE FABRICATION : P _____
	DATE DE FABRICATION : ____/____/____

MATIERES PREMIERES UTILISEES				
DCI & Dosage	Quantité	Numéro d'identification	Date péremption	Numéro d'échantillon
Hydrochlorothiazide	60 mg			
Volume d'In'Orpha	30 mL			

FABRICATION	
Quantité préparée : _____ flacons de ... ml  Date de péremption : ____/____/____ <i>(date de préparation + 60 jours)</i>  Conditions de conservation : +2°C à +8°C  Remarques particulières :  Nom et signature du préparateur :	ETIQUETTE & CONTRE-ETIQUETTE(S)

ECHANTILLONNAGE DE LA PREPARATION	CONTROLE DE LA PREPARATION
N° D'ECHANTILLON : _____	<i>Technique : contrôle de la concentration par CLHP (acceptabilité : +/- 10%)</i>  Résultat : _____

VALIDATION PHARMACEUTIQUE	
Préparation acceptée : <b>Oui</b> <b>Non</b>  Si « Non », motif :	Nom et signature du pharmacien :

## Annexe 4 : Quels excipients pour la préparation de formes buvables ?



# QUELS EXCIPIENTS POUR LA PREPARATION DE FORMES BUVABLES ?



M. DERMU<sup>1</sup>, H. ROUSSEAU<sup>1</sup>, K. WATON<sup>1</sup>, K. BEUZIT<sup>1</sup>, C. GRIGNON<sup>1,2</sup>, A. DUPUIS<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup> CHU de Poitiers, Service Pharmacie, <sup>2</sup> Université de Poitiers, Faculté de Médecine et de Pharmacie

### Introduction

Peu de spécialité ayant l'AMM en pédiatrie → Solution ou Suspension buvable = forme galénique adaptée → 3 gammes de véhicules disponibles → ?



### Matériels et Méthode

Analyse des différentes formulations et comparaison :

- les excipients à effets notoires (ANSM 2009)
- les paramètres physico-chimiques disponibles : pH, osmolalité

### Résultats et Discussion

Excipients à effets notoires	Gamme Ora <sup>®</sup>	Gamme Inorpha <sup>®</sup>	Gamme Syrspend <sup>®</sup>	Effets notoires
Parabenzoyates et leurs esters (conservateur)	X			Potentiel perturbateur endocrinien, réaction allergique
Acide benzoïque et benzoates (conservateur)			X	Ictère nucléaire chez le nouveau-né
Glycérol (anticristalisant)	X	X		Maux de tête, troubles digestifs
Sorbitol (édulcorant)	X			Effet laxatif, CI en cas d'intolérance au fructose
<b>pH</b>	acide	acide	acide ou basique	Choix orienté en fonction des caractéristiques du PA
<b>Osmolalité</b>	élevée	faible	faible	Une osmolalité élevée peut entraîner des diarrhées

### Conclusion

Les formulations disponibles sur le marché ont chacune leur place dans la préparation des solutions et des suspensions buvables, et seront choisies en fonction de nombreux critères : notions d'hypersensibilité ou contre-indication du patient à certains excipients, caractéristiques du principe actif, études de stabilité physico-chimiques disponibles. Cependant aucun véhicule disponible n'est exempt d'excipients à effets notoires dont les conséquences sont à prendre en compte notamment pour la population pédiatrique.



9<sup>èmes</sup> Rencontres Convergences Santé Hôpital 24/25/26 Septembre 2014



Annexe 5 : Exemple d'étiquetage pour la suspension buvable d'hydrochlorothiazide à 2mg/mL

<b>Hydrochlorothiazide - Suspension Buvable</b> <b>2 mg/mL – 30 mL</b> Voie orale Hydrochlorothiazide : .....54 mg ORA Plus® et ORA Sweet®: .....qsp 30mL Excipient à effet notoire : Glycérol, Sorbitol, Saccharose, Sodium, Potassium, Méthylparaben  Conserver au réfrigérateur (+4°C) Agiter avant emploi <b>Respecter les doses prescrites</b> Uniquement sur ordonnance	<b>Enr.</b> <b>Exp.</b> / / <b>Lot N°</b>	<b>C.H.U. de Poitiers</b> 2, rue de la Millèrie 86000 Poitiers
---	---	---

## Résumé

### Introduction :

L'hydrochlorothiazide est un diurétique thiazidique utilisé dans la prise en charge thérapeutique de la dysplasie broncho-pulmonaire chez les nouveau-nés prématurés. Aucune spécialité à base d'hydrochlorothiazide n'étant disponible en France pour une utilisation pédiatrique, la Pharmacie du CHU de Poitiers prépare depuis plusieurs années des gélules d'hydrochlorothiazide à des dosages adaptés aux nourrissons. Cependant, la forme gélule pose des problèmes en termes d'administration, mais aussi en termes de réalisation par la multitude de dosages à préparer lors des adaptations posologiques. C'est pourquoi une forme buvable d'hydrochlorothiazide ainsi qu'une étude pour évaluer sa stabilité ont été mises en place.

### Objectifs :

Mettre au point et valider la méthode de dosage de l'hydrochlorothiazide par HPLC-UV pour étudier la faisabilité et la stabilité physico-chimique de la suspension buvable d'hydrochlorothiazide dans divers véhicules commercialisés en France (Ora-Plus<sup>®</sup> et Ora-Sweet<sup>®</sup>, Inorpha<sup>®</sup>, et Syrspend<sup>®</sup>).

### Matériels et méthode :

La suspension d'hydrochlorothiazide est préparée à la concentration de 2 mg/mL dans 3 excipients différents Ora-Plus<sup>®</sup> /Ora-Sweet<sup>®</sup>, Inorpha<sup>®</sup>, et Syrspend<sup>®</sup>. Pour chaque excipient, 9 flacons de cette suspension sont préparés : 3 en verre transparent et 3 en verre brun sont conservés à température ambiante, 3 en verre brun sont conservés à 4°C. La stabilité chimique des trois suspensions est évaluée à J1, J2, J7, J14, J28 et J56. Elle est considérée comme correcte si la dégradation du principe actif est inférieure à 10%. La stabilité chimique est déterminée en dosant l'hydrochlorothiazide par HPLC-UV. Le dosage est effectué avec une colonne Purospher<sup>®</sup> 5 µm RP-18 Merck (150 x 4,6 mm). La phase mobile est constituée d'un mélange eau/méthanol (80/20, v/v). Son débit est de 1,5 mL/min. La détection se fait à 224 nm. La gamme d'étalonnage est réalisée à partir d'hydrochlorothiazide dissout dans du méthanol puis dilué dans de l'eau pour obtenir des concentrations comprises entre 12 et 28 µg/mL. La stabilité physique a été déterminée par le pH, l'osmolalité et la présence de précipité à J1, J2, J7, J14, J28 et J56.

### Résultats :

La méthode de dosage est linéaire de 12 à 28 µg/mL, spécifique vis-à-vis des excipients et des produits de dégradation, fidèle et juste avec des biais, et des coefficients de variation inférieurs à 5%. Les dosages par HPLC-UV ont montré pour les trois excipients que quelles que soient les conditions de stockage (à +4°C ou à température ambiante), la dégradation du principe actif était inférieure à 10% jusqu'à 56 jours. Aucune modification de couleur ou d'odeur n'a été observée au cours de la période de stockage, cependant il est à noter un colmatage de l'hydrochlorothiazide au fond du flacon lorsqu'il est préparé dans l'Inorpha<sup>®</sup>. Aucune difficulté particulière de remise en suspension n'a été notée. Les variations de pH au cours de la période de stockage sont inférieures à 1 unité pH.

### Conclusion :

A l'abri ou non de la lumière, la suspension d'hydrochlorothiazide mise au point dans 3 excipients différents au CHU de Poitiers est stable au moins 56 jours à température ambiante ou à +4°C. Cette formulation est appropriée pour une administration par voie orale en pédiatrie.

Mots clefs : Hydrochlorothiazide, forme buvable, préparation, pédiatrie

# SERMENT DE GALIEN

En présence de mes maîtres et de mes condisciples, **je jure** :

**D'**honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

**D'**exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

**De** ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

**En** aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

**Que** les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

**Que** je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si je manque à mes engagements.