

Université de Poitiers
Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNÉE 2017

Thèse n°

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Arrêté du 17 juillet 1987)
et

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE PHARMACIE HOSPITALIÈRE
(Décret 88-996 du 19 octobre 1988)

présentée et soutenue publiquement
le 11 octobre 2017 à POITIERS
par Monsieur BINSON Guillaume

**Validation d'une méthode de dosage de préparations buvables
pédiatriques à l'aide de la spectrométrie UV/Raman directe**

Composition du jury :

Président : Madame RABOUAN Sylvie, Professeur à l'Université de Poitiers

Membres :

Madame CRAUSTE-MANCIET Sylvie, PU-PH au CHU de Bordeaux
Monsieur DUPUIS Antoine, PU-PH au CHU de Poitiers
Madame DE BOISGROLLIER Anne-Caroline, PH au CHU de Poitiers
Monsieur VENISSE Nicolas, PH au CHU de Poitiers

Directeur de thèse :

Monsieur DUPUIS Antoine, PU-PH au CHU de Poitiers

Université de Poitiers
Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNÉE 2017

Thèse n°

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Arrêté du 17 juillet 1987)
et

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE PHARMACIE HOSPITALIÈRE
(Décret 88-996 du 19 octobre 1988)

présentée et soutenue publiquement
le 11 octobre 2017 à POITIERS
par Monsieur BINSON Guillaume

**Validation d'une méthode de dosage de préparations buvables
pédiatriques à l'aide de la spectrométrie UV/Raman directe**

Composition du jury :

Président : Madame RABOUAN Sylvie, Professeur à l'Université de Poitiers

Membres :

Madame CRAUSTE-MANCIET Sylvie, PU-PH au CHU de Bordeaux
Monsieur DUPUIS Antoine, PU-PH au CHU de Poitiers
Madame DE BOISGROLIER Anne-Caroline, PH au CHU de Poitiers
Monsieur VENISSE Nicolas, PH au CHU de Poitiers

Directeur de thèse :

Monsieur DUPUIS Antoine, PU-PH au CHU de Poitiers



PHARMACIE

Professeurs

- CARATO Pascal, Chimie Thérapeutique
- COUET William, Pharmacie Clinique
- FAUCONNEAU Bernard, Toxicologie
- GUILLARD Jérôme, Pharmaco chimie
- IMBERT Christine, Parasitologie
- 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 (HDR)
- BON Delphine, Biophysique
- BRILLAULT Julien, Pharmacologie
- BUYCK Julien, Microbiologie
- CHARVET Caroline, Physiologie
- DEBORDE Marie, Sciences Physico-Chimiques
- DEJEAN Catherine, Pharmacologie
- DELAGE Jacques, Biomathématiques, Biophysique
- DUPUIS Antoine, Pharmacie Clinique (HDR)
- FAVOT Laure, Biologie Cellulaire et Moléculaire
- GIRARDOT Marion, pharmacognosie, botanique, biodiversité végétale
- GREGOIRE Nicolas, Pharmacologie (HDR)
- GRIGNON Claire, PH
- HUSSAIN Didja, Pharmacie Galénique (HDR)
- INGRAND Sabrina, Toxicologie
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile Pharmaco chimie

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

PAST - Maître de Conférences Associé

- DELOFFRE Clément, Pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwin, Pharmacien

Professeur 2nd degré

- DEBAIL Didier

Enseignante Contractuelle en Anglais

- ELLIOT Margaret

Maître de Langue - Anglais

- DHAR Pujasree

Poste d'ATER

- FERRU-CLEMENT Romain

Poste de Moniteur

- VERITE Julie

Poste de Doctorant

- BERNARD Clément
- PELLETIER Barbara



Le Doyen,

Année universitaire 2016 - 2017

LISTE DES ENSEIGNANTS DE MEDECINE

Professeurs des Universités-Praticiens Hospitaliers

- AGIUS Gérard, bactériologie-virologie (surnombre jusqu'en 08/2018)
- ALLAL Joseph, thérapeutique
- BATAILLE Benoît, neurochirurgie
- BRIDOUX Frank, néphrologie
- BURUCOA Christophe, bactériologie – virologie
- CARRETIER Michel, chirurgie générale
- CHEZE-LE REST Catherine, biophysique et médecine nucléaire
- CHRISTIAENS Luc, cardiologie
- CORBI Pierre, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
- DAHYOT-FIZELIER Claire, anesthésiologie – réanimation
- DEBAENE Bertrand, anesthésiologie réanimation
- DEBIAIS Françoise, rhumatologie
- DROUOT Xavier, physiologie
- DUFOUR Xavier, Oto-Rhino-Laryngologie
- FAURE Jean-Pierre, anatomie
- FRITEL Xavier, gynécologie-obstétrique
- GAYET Louis-Etienne, chirurgie orthopédique et traumatologique
- GICQUEL Ludovic, pédopsychiatrie
- GILBERT Brigitte, génétique
- GOMBERT Jean-Marc, immunologie
- GOUJON Jean-Michel, anatomie et cytologie pathologiques
- GUILHOT-GAUDEFFROY François, hématologie et transfusion (surnombre jusqu'en 08/2019)
- GUILLEVIN Rémy, radiologie et imagerie médicale
- HADJADJ Samy, endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
- HAUET Thierry, biochimie et biologie moléculaire
- HERPIN Daniel, cardiologie
- HOUETO Jean-Luc, neurologie
- INGRAND Pierre, biostatistiques, informatique médicale
- JAAFARI Nematollah, psychiatrie d'adultes
- JABER Mohamed, cytologie et histologie
- JAYLE Christophe, chirurgie thoracique t cardio-vasculaire
- KARAYAN-TAPON Lucie, oncologie
- KEMOUN Gilles, médecine physique et de réadaptation (en détachement)
- KITZIS Alain, biologie cellulaire (surnombre jusqu'en 08/2018)
- KRAIMPS Jean-Louis, chirurgie générale
- LECRON Jean-Claude, biochimie et biologie moléculaire
- LELEU Xavier, hématologie
- LEVARD Guillaume, chirurgie infantile
- LEVEQUE Nicolas, bactériologie-virologie
- LEVEZIEL Nicolas, ophtalmologie
- LEVILLAIN Pierre, anatomie et cytologie pathologiques (surnombre jusqu'en 08/2018)
- MACCHI Laurent, hématologie
- MARECHAUD Richard, médecine interne
- MAUCO Gérard, biochimie et biologie moléculaire (surnombre jusqu'en 08/2017)
- MEURICE Jean-Claude, pneumologie
- MIGEOT Virginie, santé publique
- MILLOT Frédéric, pédiatrie, oncologie pédiatrique
- MIMOZ Olivier, anesthésiologie – réanimation
- NEAU Jean-Philippe, neurologie
- ORIOT Denis, pédiatrie
- PACCALIN Marc, gériatrie
- PERAULT Marie-Christine, pharmacologie clinique
- PERDRISOT Rémy, biophysique et médecine nucléaire
- PIERRE Fabrice, gynécologie et obstétrique
- PRIES Pierre, chirurgie orthopédique et traumatologique
- RICCO Jean-Baptiste, chirurgie vasculaire
- RICHER Jean-Pierre, anatomie
- RIGOARD Philippe, neurochirurgie
- ROBERT René, réanimation
- ROBLOT France, maladies infectieuses, maladies tropicales
- ROBLOT Pascal, médecine interne
- RODIER Marie-Hélène, parasitologie et mycologie
- SENON Jean-Louis, psychiatrie d'adultes (surnombre jusqu'en 08/2017)
- SILVAIN Christine, hépato-gastro- entérologie
- SOLAU-GERVAIS Elisabeth, rhumatologie
- TASU Jean-Pierre, radiologie et imagerie médicale
- THIERRY Antoine, néphrologie
- THILLE Arnaud, réanimation
- TOUGERON David, gastro-entérologie
- TOURANI Jean-Marc, oncologie
- WAGER Michel, neurochirurgie

Maitres de Conférences des Universités-Praticiens Hospitaliers

- ALBOUY-LLATY Marion, santé publique
- BEBY-DEFAUX Agnès, bactériologie – virologie
- BEN-BRIK Eric, médecine du travail
- BILAN Frédéric, génétique
- BOURMEYSTER Nicolas, biologie cellulaire
- CASTEL Olivier, bactériologie - virologie – hygiène
- CREMNITER Julie, bactériologie – virologie
- DIAZ Véronique, physiologie
- FAVREAU Frédéric, biochimie et biologie moléculaire
- FEIGERLOVA Eva, endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
- FRASCA Denis, anesthésiologie – réanimation
- FROUIN Eric, anatomie et cytologie pathologiques
- HURET Jean-Loup, génétique
- LAFAY Claire, pharmacologie clinique
- PERRAUD Estelle, parasitologie et mycologie
- RAMMAERT-PALTRIE Blandine, maladies infectieuses
- SAPANET Michel, médecine légale
- SCHNEIDER Fabrice, chirurgie vasculaire
- THUILLIER Raphaël, biochimie et biologie moléculaire

Professeur des universités de médecine générale

- BINDER Philippe
- GOMES DA CUNHA José

Maître de conférences des universités de médecine générale

- BOUSSAGEON Rémy

Professeur associé des disciplines médicales

- ROULLET Bernard, radiothérapie

Professeurs associés de médecine générale

- BIRAULT François
- VALETTE Thierry

Maitres de Conférences associés de médecine générale

- AUDIER Pascal
- ARCHAMBAULT Pierrick
- BRABANT Yann
- FRECHE Bernard
- GIRARDEAU Stéphane
- GRANDCOLIN Stéphanie
- PARTHENAY Pascal
- VICTOR-CHAPLET Valérie

Enseignants d'Anglais

- DEBAIL Didier, professeur certifié
- DHAR Pujasree, maître de langue étrangère
- ELLIOTT Margaret, contractuelle enseignante

Professeurs émérites

- EUGENE Michel, physiologie (08/2019)
- GIL Roger, neurologie (08/2017)
- MARCELLI Daniel, pédopsychiatrie (08/2017)
- MENU Paul, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire (08/2017)
- POURRAT Olivier, médecine interne (08/2018)
- TOUCHARD Guy, néphrologie (08/2018)

Professeurs et Maitres de Conférences honoraires

- ALCALAY Michel, rhumatologie
- ARIES Jacques, anesthésiologie-réanimation
- BABIN Michèle, anatomie et cytologie pathologiques
- BABIN Philippe, anatomie et cytologie pathologiques
- BARBIER Jacques, chirurgie générale (ex-émérite)
- BARRIERE Michel, biochimie et biologie moléculaire
- BECQ-GIRAUDON Bertrand, maladies infectieuses, maladies tropicales (ex-émérite)
- BEGON François, biophysique, médecine nucléaire
- BOINOT Catherine, hématologie – transfusion
- BONTOUX Daniel, rhumatologie (ex-émérite)
- BURIN Pierre, histologie
- CASTETS Monique, bactériologie -virologie – hygiène
- CAVELLIER Jean-François, biophysique et médecine nucléaire
- CHANSIGAUD Jean-Pierre, biologie du développement et de la reproduction
- CLARAC Jean-Pierre, chirurgie orthopédique
- DABAN Alain, cancérologie radiothérapie (ex-émérite)
- DAGREGORIO Guy, chirurgie plastique et reconstructrice
- DESMAREST Marie-Cécile, hématologie
- DEMANGE Jean, cardiologie et maladies vasculaires
- DORE Bertrand, urologie (ex-émérite)
- FAUCHERE Jean-Louis, bactériologie-virologie (ex-émérite)
- FONTANEL Jean-Pierre, Oto-Rhino Laryngologie (ex-émérite)
- GRIGNON Bernadette, bactériologie
- GUILLARD Olivier, biochimie et biologie moléculaire
- GUILLET Gérard, dermatologie
- JACQUEMIN Jean-Louis, parasitologie et mycologie médicale
- KAMINA Pierre, anatomie (ex-émérite)
- KLOSSEK Jean-Michel, Oto-Rhino-Laryngologie
- LAPIERRE Françoise, neurochirurgie (ex-émérite)
- LARSEN Christian-Jacques, biochimie et biologie moléculaire
- MAGNIN Guillaume, gynécologie-obstétrique (ex-émérite)
- MAIN de BOISSIERE Alain, pédiatrie
- MARRILLAUD Albert, physiologie
- MORICHAU-BEAUCHANT Michel, hépato-gastro-entérologie
- MORIN Michel, radiologie, imagerie médicale
- PAQUEREAU Joël, physiologie
- POINTREAU Philippe, biochimie
- REISS Daniel, biochimie
- RIDEAU Yves, anatomie
- SULTAN Yvette, hématologie et transfusion
- TALLINEAU Claude, biochimie et biologie moléculaire
- TANZER Joseph, hématologie et transfusion (ex-émérite)
- VANDERMARCCQ Guy, radiologie et imagerie médicale

Remerciements

Monsieur Antoine Dupuis, Professeur des universités et Praticien hospitalier au Centre Hospitalo-Universitaire de Poitiers.

Merci de m'avoir fait l'honneur de diriger cette thèse. Vos conseils, vos connaissances et vos réflexions m'auront emmené jusqu'à l'aboutissement de ce travail. Merci également pour m'avoir guidé ces dernières années et pour m'avoir donné l'opportunité d'explorer de nouveaux horizons. Veuillez trouver ici toute ma reconnaissance ainsi que toute ma gratitude.

Madame Sylvie Rabouan, Professeur à l'Université de Poitiers.

Pour avoir accepté de présider ce jury et de juger mes travaux, veuillez trouver toute ma reconnaissance. Je vous remercie de prendre de votre temps pour partager votre expérience.

Madame Sylvie Crauste-Manciet, Professeur des universités et Praticien hospitalier au Centre Hospitalo-Universitaire de Bordeaux.

Merci d'avoir accepté de juger mes travaux, j'espère qu'ils seront à la hauteur de vos attentes. Merci également pour les enseignements que vous m'avez apporté durant votre Master 2. Votre exigence m'a permis d'aller au fond de moi-même.

Madame Anne-Caroline Garnier De Boisgrollier De Ruolz, Praticien hospitalier au Centre Hospitalo-Universitaire de Poitiers.

Pour me faire l'honneur de participer à mon jury et pour m'avoir encadré lors de mon passage à l'unité de reconstitution des chimiothérapies. Veuillez trouver ici toute ma reconnaissance.

Monsieur Nicolas Venisse, Praticien hospitalier au Centre Hospitalo-Universitaire de Poitiers.

Pour avoir accepté de faire partie de ce jury, je vous adresse toute ma gratitude.

L'équipe de préparateurs de l'unité de pharmacotechnie, en particulier Sandrine, Sabrina, Virginie, Corinne, Ludovic, Alfred, Cédric, Laurence et Loïc.

Pour votre bonne humeur et votre patience. J'ai appris beaucoup à votre contact et j'espère que cela continuera.

A mes co-internes, de Poitiers et d'ailleurs, Vivien, Alexandre, Pierre, Astrid, Barbara, Cécile, Julie, Adeline, Eugénie, Charles-Henri, Fanny, Hélène, Jean-Baptiste, François, Fabien...

Sans vous, cet internat aurait été bien fade. Merci de m'avoir accompagné et supporté pendant toutes ces années...

A la Turtle team, Justine, Sylvain, Aurélie, Gaspard, Caroline, Simon, Thomas, Clara...

Pour tous les bons moments passés avec vous à l'internat et par la suite. Grâce à vous, ma venue dans une nouvelle ville fut beaucoup plus simple que prévu. Vous êtes pour beaucoup dans le bon déroulement de mon internat et j'espère que l'on continuera à former cette belle équipe malgré nos nouveaux horizons.

Les Pharmaciens du CHU de Poitiers, du CHU de Brest et du CH d'Angoulême.

Pour l'ensemble de vos enseignements durant ces quatre années d'internat et pour m'avoir montré la pluridisciplinarité de ce métier. Merci également à Pauline pour m'avoir laissé le temps nécessaire à la réalisation de ces travaux.

A mes parents.

Pour m'avoir soutenu sans failles pendant toutes ces années et pour toutes les attentions que vous avez pu m'accorder. Pour ce que vous m'avez apporté. Merci à ma mère pour m'avoir appris la rigueur et l'envie de réussir. Cette thèse doit beaucoup aux valeurs que tu nous as transmises. Merci à mon père pour l'esprit cartésien et pour m'avoir forgé un esprit critique, cette thèse ressemble un peu à quelque chose que nous avons en commun : la technologie. Je suis fier d'être votre fils.

A mon grand-père.

Pour tout ce que tu as pu m'apporter. J'aurais tant souhaité que tu puisses assister à ce moment. J'espère que depuis là-haut, tu pourras être fier de ce que je suis devenu.

A ma grand-mère.

Pour les conserves cuisinées avec amour et qui m'ont tant aidé pendant mes révisions.

A toute ma famille, Mathilde, Victoire, Léo, Jules, Isabelle, Pierre, Jérôme, Lucile et tous les autres.

Pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble. Pour avoir égayé les moments difficiles.

A Dominique, pour ton hébergement et ta gentillesse lors de nos passages à Bordeaux.

A Anaïs et Julie, pour leur précieuse aide durant les manipulations.

Aux GROS. Thibault, Antoine, Grégoire, Guillaume.

Pour toutes ces années, nos semaines à Andernos, nos WE à Ax, nos soirées. A nous tous !

Et bien sûr, à toi Sara.

Merci d'être à mes côtés, de m'écouter, de me soutenir, de me pousser dans les moments de faiblesse. Tout ça n'aurait pas pu être fait sans toi et l'attention que tu me portes. Pour toutes ces années passées avec toi et pour le bonheur que tu m'apportes chaque jour. A notre avenir.

Table des matières

LISTE DES FIGURES.....	10
LISTE DES TABLEAUX.....	11
LISTE DES ANNEXES	12
INTRODUCTION.....	13
PREMIERE PARTIE : GENERALITES.....	16
I. LES PREPARATIONS EN PEDIATRIE.....	16
1. LA PROBLEMATIQUE DE L'ADMINISTRATION ORALE EN PEDIATRIE	17
2. L'INTERET DES FORMES BUVABLES EN PEDIATRIE.....	20
II. BONNES PRATIQUES DE PREPARATION ET CADRE REGLEMENTAIRE	22
1. LES DIFFERENTS TYPES DE PREPARATIONS	23
1.1. <i>Les préparations magistrales</i>	23
1.2. <i>Les préparations hospitalières</i>	24
2. LES RESPONSABILITES DU PHARMACIEN	24
3. LES CONTROLES APPLICABLES AUX PREPARATIONS PHARMACEUTIQUES	25
DEUXIEME PARTIE : LA TECHNOLOGIE UV/RAMAN	28
I. LA SPECTROPHOTOMETRIE UV-VISIBLE	29
II. LA SPECTROPHOTOMETRIE RAMAN	33
III. LE QC-PREP+ : L'ASSOCIATION DES SPECTROMETRIES UV ET RAMAN	35
1. COMPOSITION DU QC-PREP+.....	35
2. PRINCIPES DE FONCTIONNEMENT.....	40
2.1. <i>Ajout d'une nouvelle molécule ou d'un nouveau vecteur</i>	40
2.2. <i>Protocoles d'analyse</i>	40
2.3. <i>Régions spectrales</i>	41
2.4. <i>Etalonnages</i>	42
2.5. <i>Les bibliothèques spectrales</i>	43
2.6. <i>Paramétrage d'une analyse</i>	44
2.7. <i>Déroulement d'une analyse</i>	44
2.8. <i>Normalisation du système</i>	46
2.9. <i>Contrôles et tests de l'appareil</i>	47
3. UTILISATIONS EN MILIEU HOSPITALIER	48
TROISIEME PARTIE : MISE AU POINT ET VALIDATION DE LA METHODE DE DOSAGE DE LA SPIRONOLACTONE EN SUSPENSION BUVABLE	49
I. MATERIELS ET METHODES.....	49
1. EQUIPEMENT.....	52
2. ANALYSE PRELIMINAIRE	52
2.1. ANALYSE DE LA COMPOSITION DES VECTEURS DE SUSPENSION BUVABLE	52
2.2. ANALYSE DU SPECTRE UV ET RAMAN DE LA SPIRONOLACTONE	54
3. CALIBRATION.....	54

4.	ETUDE DE LA LINEARITE	55
5.	EVALUATION DE L'EFFET MATRICE	57
6.	DETERMINATION DE LA PRECISION	57
7.	DETERMINATION DE LA JUSTESSE	59
8.	EVALUATION DE LA SELECTIVITE	59
II.	RESULTATS.....	60
1.	ANALYSE PRELIMINAIRE	60
1.1.	<i>Détermination du facteur de dilution.....</i>	<i>60</i>
1.2.	<i>Analyse des spectres UV et Raman de la spironolactone</i>	<i>60</i>
1.3.	<i>Analyse des spectres UV des vecteurs de suspension buvable.....</i>	<i>61</i>
2.	VALIDATION DE LA METHODE DE DOSAGE	63
2.1.	<i>Calibration.....</i>	<i>63</i>
2.1.a.	Spironolactone seule.....	63
2.1.b.	Inorpha®	63
2.1.c.	Mélange OraPlus®/OraSweet®.....	64
2.1.d.	Syrspend® Dry	65
2.1.e.	Syrspend® SF PH4	66
2.2.	<i>Détermination de la précision</i>	<i>67</i>
2.2.a.	Répétabilité	67
2.2.b.	Précision intermédiaire	68
2.3.	<i>Détermination de la justesse.....</i>	<i>69</i>
3.	<i>Sélectivité de la méthode</i>	<i>70</i>
III.	DISCUSSION	70
IV.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	80
	BIBLIOGRAPHIE.....	82
	ANNEXES	85
	RESUME	98
	ABSTRACT.....	98

Liste des abréviations

ADME : Absorption distribution
métabolisme excrétion

AMM : Autorisation de mise sur le marché

ATU : Autorisation temporaire d'utilisation

BPP : Bonnes pratiques de préparation

CCM : Chromatographie sur couche mince

CHMP : Comité des médicaments à usage
humain

CQB : Contrôle qualité bas

CQH : Contrôle qualité haut

CQI : Contrôle qualité intermédiaire

CSP : Code de la santé publique

CV : Coefficient de variation

EC : Ecart-type

EMA : European medicine agency

FDA : Federal drugs administration

GERPAC : Groupe d'étude et de
recherche en atmosphère contrôlée

HPLC : High performance liquid
chromatography / Chromatographie liquide
haute performance

IC : Intervalle de confiance

ICH : International conference for
harmonization

IR : Infrarouge

ISO : Organisation internationale de
normalisation

IUPAC : International union of pure and
applied chemistry

LLOQ : Lower limit of quantification

OMS : Organisation mondiale de la santé

OP®/OS® : OraPlus®/OraSweet®

ORL : Oto-rhino-laryngé

pH : potentiel hydrogène

PIC/S : Pharmaceutical inspection co-
operation scheme

PIP : Plan d'investigation pédiatrique

PUI : Pharmacie à usage intérieur

R% : Taux de recouvrement

RCP : Résumé des caractéristiques du
produit

SFSTP : Société française des sciences et
techniques pharmaceutiques

UV : Ultraviolet

UV-Vis : Ultraviolet-Visible

Liste des figures

Figure 1 : Schéma des composantes d'une onde électromagnétique	28
Figure 2 : Principe de la spectrophotométrie UV.....	29
Figure 3 : Transitions électroniques disponibles	30
Figure 4 : Exemple de spectre ultraviolet (cas de la Bétaméthasone)	32
Figure 5 : Représentation des diffusions Rayleigh et Raman	33
Figure 6 : Injecteur automatique du système QC-Prep+.....	36
Figure 7 : Source laser Raman du QC-Prep+.....	37
Figure 8 : Ecran de définition d'un protocole d'analyse.....	41
Figure 9 : Représentation graphique des notions de justesse et de fidélité	51
Figure 10 : Ecran d'étalonnage du QC-Prep+.....	55
Figure 11 : Spectre UV de la Spironolactone à 1mg/mL (dilution méthanol).....	61
Figure 12 : Spectre Raman de la Spironolactone à 1mg/mL (dilution méthanol)	61
Figure 13 : Spectres UV superposés de la Spironolactone et des vecteurs de suspension buvable.....	62
Figure 14 : Etalonnage de la Spironolactone dans le méthanol	63
Figure 15 : Etalonnage de la Spironolactone dans l'Inorpha®.....	64
Figure 16 : Etalonnage de la Spironolactone dans le mélange OraPlus®/OraSweet®	64
Figure 17 : Etalonnage de la Spironolactone dans le Syrspend Dry.....	65
Figure 18 : Etalonnage de la Spironolactone dans le Syrspend.....	66
Figure 19 : Droites d'étalonnage de la spironolactone seule ou en suspension buvable.....	75

Liste des tableaux

Tableau 1 : Modifications des paramètres pharmacocinétiques chez le nouveau-né et l'enfant, comparativement à l'adulte ¹⁷	20
Tableau 2 : Paramètres à valider en fonction du type de méthode analytique à développer ³²	49
Tableau 3 : Composition des différents vecteurs de suspension buvable	53
Tableau 4 : Points de gamme utilisés pour l'étalonnage.....	56
Tableau 5 : Concentrations des contrôles-qualité	58
Tableau 6 : Résumé des critères de validation de la linéarité.....	66
Tableau 7 : Evaluation de la répétabilité avec l'Inorpha®.....	67
Tableau 8 : Evaluation de la répétabilité avec le mélange OraPlus®/OraSweet®	67
Tableau 9 : Evaluation de la répétabilité avec le Syrspend® Dry.....	67
Tableau 10 : Evaluation de la répétabilité avec le Syrspend® SF PH4.....	68
Tableau 11 : Evaluation de la précision intermédiaire avec l'Inorpha®.....	68
Tableau 12 : Evaluation de la précision intermédiaire avec le mélange OraPlus®/OraSweet®.....	68
Tableau 13 : Evaluation de la précision intermédiaire avec le Syrspend® Dry.....	68
Tableau 14 : Evaluation de la précision intermédiaire avec le Syrspend® SF PH4... ..	69
Tableau 15 : Evaluation de justesse avec l'Inorpha®.....	69
Tableau 16 : Evaluation de justesse avec le mélange OraPlus®/OraSweet®	69
Tableau 17 : Evaluation de justesse avec le Syrspend® Dry	69
Tableau 18 : Evaluation de justesse avec le Syrspend® SF PH4.....	70
Tableau 19 : Seuils d'acceptabilité des critères d'analyse d'une validation de méthode analytiques, selon la FDA ³³	74

Liste des annexes

Annexe 1: Spectre UV de l'Inorpha (dilution par du méthanol au 1/10e et au 1/100e).....	86
Annexe 2 : Spectre Raman de l'Inorpha (dilution par du méthanol au 1/10e et au 1/100e).....	87
Annexe 3 : Spectre UV du Syrspend (dilution par du méthanol au 1/10e et au 1/100e).....	88
Annexe 4: Spectre Raman du Syrspend (dilution par du méthanol au 1/10e et au 1/100e).....	89
Annexe 5 : Spectre UV du Syrspend Dry (dilution par du méthanol au 1/10e et au 1/100e).....	90
Annexe 6 : Spectre Raman du Syrspend Dry (dilution par du méthanol au 1/10e et au 1/100e).....	91
Annexe 7 : Spectre UV du mélange OP/OS (dilution par du méthanol au 1/10e et au 1/100e).....	92
Annexe 8 : Spectre Raman du mélange OP/OS (dilution par du méthanol au 1/10e et au 1/100e).....	93
Annexe 9 : Décalage du pic d'absorption en fonction du couple spironolactone/vecteur.....	94
Annexe 10 : Mode opératoire de dosage de la spironolactone par le QC-Prep+.....	95

Introduction

Dans certaines situations d'impasse thérapeutique, la réalisation de préparations par les pharmacies hospitalière s'impose afin d'adapter un médicament à des populations spécifiques. C'est souvent le cas en pédiatrie car la plupart des médicaments sont développés à destination des adultes et ne sont pas adaptés en termes de dose ou d'administration.

La réalisation des préparations doit répondre à un niveau d'exigence suffisant pour assurer qualité et sécurité de prise en charge. Pour atteindre ce niveau, la réalisation de contrôles sur le produit fini est nécessaire et différentes méthodes analytiques sont utilisables pour y parvenir.

Il existe une solution automatisée, combinant spectrométries UV et Raman, permettant l'identification et le contrôle de principes actifs : le QC-Prep+. Historiquement, cet appareil a été mis en avant pour le contrôle de préparations simples (un principe actif dans un excipient/diluant), notamment les chimiothérapies. Ainsi, il est essentiellement utilisé dans cette optique, que ce soit pour de l'identification ou du contrôle de teneur^{1,2}. La principale limitation de cette technique étant son côté destructif entraînant l'impossibilité de tester les préparations de petits volumes ou les diffuseurs portables. Une partie de cette limitation semble avoir été levée dans des études récentes^{3,4}.

Il existe d'autres utilisations du QC-Prep+ pour le contrôle de préparations hospitalières ou magistrales. Ainsi, dans une étude de 2014, différents types de gélules et de collyres ont été dosés de façon efficace avec cet appareillage⁵. Toutefois, il s'agit toujours de préparations à excipients simples, comme des gélules de dexaméthasone avec du lactose comme excipient. C'est le cas dans notre laboratoire de contrôle, où la libération analytique des lots de collyres antibiotiques et antifongiques est réalisée grâce au QC-Prep+.

A notre connaissance, il n'existe pas actuellement d'utilisation du QC-Prep+ – et plus largement d'une méthode automatisée combinant spectrométries Raman et UV de façon directe – pour le contrôle de préparations à excipients complexes. Un état des lieux mené en 2016 par *Berge-Bouchara et al* montre que cette utilisation combinée reste cantonnée au contrôle des chimiothérapies⁶.

En revanche, il est suffisamment décrit dans la littérature l'utilisation de la spectrométrie UV ou Raman, de façon séparée, pour le contrôle de préparations hospitalières.

Ainsi, dans un article de 2016, les auteurs ont testé la possibilité d'utiliser la spectrométrie Raman pour identifier le principe actif présent dans leurs préparations pharmaceutiques⁷. Différentes préparations, soit neuf principes actifs différents ont été testées. Les auteurs ont trouvé que l'utilisation de cette technique permettait d'obtenir une sensibilité de 98% et une sélectivité de 100%, associées à une valeur prédictive positive de 100% et une valeur prédictive négative de 99%.

Néanmoins, la composition excipiendaire des préparations n'étant pas précisé, cette étude ne permet pas de conclure sur la capacité de cette technique à identifier correctement un principe actif dans une formulation complexe. Les auteurs ont également réalisé une étude préliminaire pour utiliser la spectrométrie Raman en tant que technique de quantification. Les résultats, sur une seule molécule, semblaient encourageants avec des coefficients de corrélation corrects.

Si cette technique spectroscopique reste peu usitée dans le milieu pharmaceutique hospitalier, son utilisation est bien plus largement développée dans d'autres domaines pour lesquelles les applications se rapprochent de celles d'un laboratoire de contrôle d'une PUI. Ainsi, par exemple, la spectrométrie Raman peut être utilisée pour la quantification d'un principe actif dans un médicament industriel ou encore la lutte contre le dopage et les drogues⁸.

Concernant la spectrométrie UV, son utilisation est historiquement beaucoup plus répandue et elle reste une des techniques de contrôle qualité majoritaire dans les PUI. En effet, c'est une technique simple à utiliser, relativement peu coûteuse et dont l'essor a été plus précoce que pour la spectrométrie Raman.

En Pharmacie hospitalière, elle est couramment utilisée pour l'identification et le dosage de principes actifs d'intérêt, seule si l'excipient est simple ou en association à de la chromatographie s'il y a présence d'autres composés absorbants.

L'objectif de nos travaux sera de démontrer que l'utilisation de la spectrométrie directe UV/Raman est utilisable pour l'identification et le dosage de principes actifs inclus dans

un excipient complexe, en utilisant les recommandations ICH. Nous chercherons donc à démontrer que cette technique permet d'obtenir des résultats exacts.

Pour cela, nous prendrons comme témoin la spironolactone qui sera formulée avec quatre vecteurs de suspensions buvables : l'Inorpha®, le mélange OraPlus®/OraSweet® 50:50 (v:v), le Syrspend® SF PH4 et le Syrspend® Dry.

Première partie : Généralités

I. Les préparations en pédiatrie

Dans un certain nombre de situations, les spécialités pharmaceutiques industrielles possédant une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) ou une ATU (Autorisation Temporaire d'Utilisation) ne sont pas adaptées à la prise en charge de certaines populations. C'est, par exemple, souvent le cas dans le domaine de la pédiatrie avec des médicaments initialement développés pour l'adulte et dont les dosages ou les formes galéniques ne sont pas compatibles avec une utilisation chez l'enfant⁹.

En effet, la réalisation de médicaments pédiatriques par l'industrie pharmaceutique se heurte à des difficultés techniques (formulation galénique, réalisation des essais cliniques...) ainsi qu'à une faible rentabilité financière (petites cohortes de patients). Par ailleurs, la prescription des spécialités pharmaceutiques en pédiatrie est le plus souvent réalisée hors-AMM, la plupart des études étant réalisées chez des patients adultes¹⁰.

Afin de développer la commercialisation de médicaments pédiatriques, des instances nationales et internationales ont émis des recommandations et des obligations allant en ce sens. Ainsi, l'ICH (International Conference for Harmonization) a publié sa ligne directrice E11 en 2000 dont l'objectif principal est de faciliter le développement de médicaments pédiatriques au niveau international¹¹.

En 2006, l'Union Européenne s'est également engagée dans la promotion de ces médicaments en publiant le règlement n°1901/2006¹². Ce règlement est spécifique aux médicaments à usage pédiatrique et impose aux laboratoires pharmaceutiques le dépôt d'un PIP (Plan d'Investigation Pédiatrique) pour tout nouveau médicament. L'objectif d'un PIP est d'obtenir des données permettant de garantir que l'usage d'un médicament chez l'enfant est sans danger¹³. En contrepartie, les firmes pharmaceutiques bénéficient de mesures de protection accrues leur permettant de prolonger le monopole du médicament.

Malgré ces avancées, la disponibilité des médicaments en pédiatrie reste problématique dans de nombreuses pathologies. Ainsi, dans la prise en charge de la dysplasie broncho-pulmonaire chez le nouveau-né prématuré, la spironolactone a

démontré son efficacité dans l'amélioration des symptômes respiratoires avec une diminution des dommages pulmonaires et une augmentation du taux de survie¹⁴. La posologie recommandée dans cette indication est de 1 à 4 mg/kg/j. En considérant que le poids moyen de naissance d'un prématuré est d'environ 840g¹⁴, cela représente des doses de 0,84 à 3,36 mg de spironolactone par jour.

En pratique, les présentations commerciales de spironolactone sont des comprimés dosés à 25 et 75 mg, il est donc logiquement impossible de réaliser l'administration de petites doses avec ces formes. Ainsi, dans cette pathologie, il n'existe pas de solution industrielle satisfaisante permettant une prise en charge optimale.

Dans ces situations d'impasse thérapeutique, le pharmacien, qu'il soit hospitalier ou officinal, a la possibilité de réaliser une préparation pharmaceutique visant à adapter un médicament ou un principe actif afin de le rendre compatible avec une administration chez l'enfant. Cette adaptation peut être de nature galénique, avec une modification de la forme, ou une adaptation de la concentration ou de la dose afin de faciliter l'administration.

On entend par préparation la mise à disposition au patient d'un produit fini contenant un principe actif. Cette réalisation ne peut se faire que sur prescription médicale et est strictement encadrée d'un point de vue réglementaire, engageant la responsabilité du pharmacien à toutes les étapes de la fabrication¹⁵.

1. La problématique de l'administration orale en pédiatrie

La pédiatrie est la spécialité médicale qui traite des pathologies de l'enfant et de l'adolescent. Selon l'ICH, la population pédiatrique présente des groupes d'âge très variés¹¹. On y retrouve :

- Les nouveau-nés prématurés (moins de 33 semaines d'aménorrhée) ;
- Les nouveau-nés à terme (0-27 jours) ;
- Les nourrissons (1-23 mois) ;
- Les enfants (2-11 ans) ;
- Les adolescents (12-18 ans).

Ces groupes d'âge présentent des différences physiques et biologiques importantes qui entraînent des changements majeurs, notamment pour la pharmacocinétique des médicaments ou pour le choix de leur mode d'administration.

Par exemple, les nourrissons et les jeunes enfants ont un rapport surface corporelle/poids plus important que chez l'adulte et un *stratum corneum* plus fin. Dans ce cas, des médicaments administrés par voie topique peuvent être plus largement absorbés et provoquer des effets indésirables systémiques¹⁶.

D'autres facteurs physiologiques sont également modifiés et vont varier au cours du développement de l'enfant, tels que la proportion d'eau corporelle, la proportion de graisse ou encore la liaison des médicaments aux protéines plasmatiques¹⁷. Ainsi, la proportion d'eau totale décroît progressivement de 80% chez le nouveau-né à 60% chez l'enfant d'un an. A l'inverse, la proportion de graisse va augmenter progressivement, passant de 1 à 2% chez le nouveau-né prématuré à 10 à 15% chez le nouveau-né à terme, ou encore jusqu'à 20 à 25% chez l'enfant d'un an. Ces variations vont influencer sur la distribution des médicaments dans l'organisme, ce qui pourra entraîner une variabilité d'action en fonction de l'âge.

Ces différences pharmacocinétiques n'interviennent pas que sur les phases d'absorption et de distribution, mais tout au long du cycle ADME (Absorption – Distribution – Métabolisme – Excrétion) du devenir du médicament dans l'organisme. Elles sont présentées dans le Tableau 1.

Concernant l'administration du médicament, les formes galéniques existantes sont nombreuses et les voies d'abord diverses : orale, parentérale, nasale, rectale, topique, transdermiques... Toutefois, on considèrera une forme pharmaceutique comme adaptée à l'enfant si :

- Elle est adaptée en termes d'administration et d'acceptabilité ;
- Elle possède un dosage adapté à un bon ajustement aux posologies pédiatriques.

En effet, les possibilités d'administration des différentes formes pharmaceutiques ne sont pas équivalentes au cours du développement d'un enfant. Ainsi, la capacité à utiliser une forme galénique dépend principalement de l'âge, du développement physique et de la faculté à coordonner les mouvements. Développement physiologique

et capacité de compréhension vont également entrer en compte dans le choix de la forme à utiliser¹⁶. D'autres facteurs pourront également intervenir, comme la durée de la pathologie (aiguë ou chronique), la facilité d'administration par les parents et les soignants ou encore la scolarisation.

Les deux grandes voies majoritaires pour l'administration des médicaments pédiatriques sont la voie intraveineuse et la voie orale. La forme orale étant à privilégier car elle présente un risque infectieux plus faible, son abord est non-traumatique et l'acceptabilité est meilleure.

Toutefois, en fonction du groupe d'âge concerné, certaines formes orales ne sont pas utilisables. Ainsi, on peut les distinguer en deux catégories : les formes orales liquides et les formes orales solides, qui elles-mêmes peuvent être séparées en différentes sous-catégories (comprimés, gélules, suspensions buvables...). L'administration des médicaments par voie orale ne sera pas toujours possible en fonction de la forme galénique utilisée¹⁶. Par ailleurs, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) classe les enfants en deux catégories en fonction de leur capacité à accepter et utiliser une forme orale : les enfants préscolarisés (2-5 ans) et les enfants scolarisés (6-11 ans). Ainsi, les formes orales solides ne pourront être utilisées qu'à partir de six ans alors que les formes orales liquides pourront être administrés plus tôt.

Cette distinction est essentiellement due à la capacité de déglutition qui ne devient mature qu'à partir de l'âge de six ans, une fois le développement anatomique de la sphère ORL et la maturation du système nerveux central achevés.

Au final, durant le développement d'une préparation pharmaceutique pédiatrique, le choix de la formulation galénique doit prendre en compte ces différents paramètres afin de répondre aux objectifs de facilité d'administration, d'acceptabilité et de dosage adapté.

Tableau 1 : Modifications des paramètres pharmacocinétiques chez le nouveau-né et l'enfant, comparativement à l'adulte¹⁷

Physiologic Factors	Difference Compared to Adults	PK Implications	Example Drug
Oral absorption			
Gastric pH	↑	↓ Bioavailability (weak acids)	Phenytoin, phenobarbital, ganciclovir
		↑ Bioavailability (weak bases)	Penicillin G, ampicillin, nafcillin
Gastric emptying time	↑	Delayed absorption	Phenobarbital, digoxin and sulfonamides
Intestinal CYP3A4	↓	↑ Bioavailability	Midazolam
Intestinal GST	↑	↓ Bioavailability	Busulfan
Intestinal drug transporters	↓	↓ Bioavailability	Gabapentin
Percutaneous absorption			
Hydration of epidermis	↑	↑ Bioavailability	Steroids
Intramuscular absorption			
Skeletal muscle blood flow	Variable	Unknown	n.a.
Distribution			
Body water : fat ratio	↑	↑ Volume of distribution (hydrophilic drugs)	Gentamicin, linezolid, phenobarbital, propofol
		↓ Volume of distribution (lipophilic drugs)	Diazepam, lorazepam
Protein binding	↓	↑ Free fraction of drugs	Sulfonamides
Hepatic metabolism			
Phase I enzyme activity	↓	↓ Hepatic clearance	Theophylline, caffeine, midazolam
Phase II UGT enzyme activity	↓	↓ Hepatic clearance	Morphine
Renal excretion			
Glomerular filtration rate	↓	↓ Renal clearance	Aminoglycosides
Renal tubular absorption and secretion	↓	↓ Renal clearance	Digoxin

↑, changes increased in values; ↓, changes decreased in values; GST, glutathione S-transferase; n.a., not available; PK, pharmacokinetic; UGT, UDP glucuronosyltransferase.

2. L'intérêt des formes buvables en pédiatrie

Les formes liquides orales existantes sont de différents types : les solutions buvables, les suspensions buvables et les sirops.

Les sirops sont des solutions sucrées contenant une proportion d'au moins 45% m/m de saccharose. A partir d'une proportion de 65% m/m, le saccharose apporte également une protection antimicrobienne. D'autres sucres (glucose, fructose) ou

encore des édulcorants (sorbitol) peuvent être utilisés¹⁸. Ces préparations sont simples à fabriquer mais la forte proportion en sucre est problématique pour les traitements chroniques en raison du risque cariogène. Ils sont même contre-indiqués chez le patient diabétique ou en cas de régime cétogène.

Les solutions buvables sont définies par la Pharmacopée Européenne comme des préparations liquides, claires, limpides contenant un ou plusieurs principes actifs dissous dans l'eau¹⁸. Selon le CHMP (Comité des Médicaments à Usage Humain), les solutions doivent être le plus concentrées possibles pour pouvoir administrer le plus faible volume envisageable. La solubilité du principe actif est donc le critère limitant mais elle peut être améliorée par ajout de co-solvants, d'agents surfactants ou par modification du pH (potentiel Hydrogène).

Les suspensions buvables sont des préparations liquides contenant un principe actif dispersé dans un solvant aqueux¹⁸. Elles permettent d'incorporer une quantité plus importante de principes actifs que les sirops et les solutions, ce qui autorise des préparations plus concentrées et donc des volumes à administrer plus faibles. La dispersion du principe actif permet également de masquer un goût désagréable ou une amertume de celui-ci.

L'utilisation de ces formes orales liquides peut présenter un certain nombre d'avantages pour la population pédiatrique. Ainsi, elles permettent d'adapter plus facilement les doses administrées. Chez les enfants, notamment les nourrissons, le poids évolue rapidement ce qui nécessite une adaptation régulière de la posologie. L'utilisation d'une suspension buvable permet ainsi de modifier plus facilement la dose en faisant varier uniquement le volume à administrer. Les formes orales liquides permettent également de réaliser la titration de certains médicaments, ce qui nécessite des variations fréquentes de la posologie, jusqu'à obtenir la posologie efficace.

Avant l'âge de 6 ans, l'usage des formes orales solides n'est pas recommandée, voire impossible, notamment en raison du risque de fausse route. Pour pallier à cela, certaines unités de soins pouvaient avoir recours à des pratiques non évaluées telles que le broyage de comprimés, la dissolution dans des véhicules inadaptés, l'utilisation de dosage trop important par rapport à la posologie prescrite ou encore l'usage de médicaments injectables par voie orale sans tenir compte du pH, de l'osmolarité ou de la biodisponibilité¹⁹. Ces pratiques sont génératrices d'incertitudes sur la dose

réellement administrée et ne garantissent pas la stabilité du principe actif ou sa bonne absorption. L'utilisation de formes liquides permet de s'affranchir de ces inconvénients en mettant à disposition un médicament prêt à l'emploi avec un dosage adapté. Dans la même optique, elles peuvent également permettre de pallier une impossibilité à utiliser les formes solides sans utiliser d'autres voies d'administration telles que la voie intraveineuse. Elles permettent également de masquer des goûts désagréables attribuables à certains principes actifs, par l'ajout d'agents aromatisants.

Globalement, ces formes liquides permettent de sécuriser l'administration de médicaments en pédiatrie, notamment chez les jeunes enfants.

II. Bonnes pratiques de préparation et cadre réglementaire

Selon l'article L. 5125-5 du code de la santé publique, la préparation de médicaments doit être réalisée en conformité avec les BPP (Bonnes Pratiques de Préparation). Elles s'appliquent à l'ensemble des préparations, qu'elles soient réalisées au sein d'une pharmacie à usage intérieur ou dans une officine. Elles s'appliquent également aux préparations nécessaires par les recherches biomédicales, y compris les médicaments expérimentaux.

Les BPP sont opposables et décrivent l'ensemble des moyens nécessaires à mettre en œuvre pour assurer la réalisation d'une préparation avec un niveau d'exigence permettant d'assurer un niveau de sécurité suffisant. Elles définissent des lignes générales communes aux PUI (Pharmacies à Usage Intérieur) et aux officines concernant les notions de préparations, de contrôles, de gestion de la qualité, de gestion de non-conformités ou de sous-traitance. Elles comprennent également des lignes spécifiques concernant la préparation de médicaments stériles, dangereux, radiopharmaceutiques ou rendus nécessaires par la recherche biomédicale.

Elles définissent également leur champ d'application ainsi que les responsabilités du pharmacien lors de la mise en œuvre d'une préparation.

D'autres référentiels encadrent la réalisation des préparations tels que les Pharmacopées Européenne et Française ou encore les normes ISO ou les PIC/S.

Tous ces référentiels permettent de s'assurer de la bonne réalisation de l'ensemble des étapes de préparations.

1. Les différents types de préparations

Les médicaments soumis à AMM ou à ATU, ont tous des recommandations concernant leur reconstitution dans leur RCP (Résumé des Caractéristiques du Produit). Si la reconstitution des médicaments selon le RCP est une activité infirmière (arrêté du 16 avril 2011), toute opération de dilution ou de mélange non prévue constitue une préparation au sens des BPP.

Trois types de préparations pharmaceutiques existent : les préparations magistrales, officinales et hospitalières.

1.1. Les préparations magistrales

Selon les BPP, on entend par préparation magistrale « *Tout médicament préparé extemporanément au vu de la prescription destinée à un malade déterminé soit dans la pharmacie dispensatrice, soit, dans des conditions définies par décret, dans une pharmacie à laquelle celle-ci confie l'exécution de la préparation par un contrat écrit et qui est soumise pour l'exercice de cette activité de sous-traitance à une autorisation préalable délivrée par le représentant de l'Etat dans le département après avis du directeur régional des affaires sanitaires et sociales (1° de l'article L.5121-1 du CSP).* »¹⁵.

Cette définition est applicable à l'ensemble des préparations fabriquées ponctuellement, à la demande d'un médecin et pour un patient unique. Elles ne peuvent pas être préparées et stockées à l'avance en vue d'une dispensation antérieure.

La fabrication des préparations magistrales fait partie des activités obligatoires à une PUI (article R. 5126-8 du CSP).

1.2. Les préparations hospitalières

On entend par 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 du CSP, en raison de l'absence de spécialité pharmaceutique disponible ou adaptée dans 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 du CSP* »¹⁵.

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 française de sécurité sanitaire des produits de santé, dans des conditions définies par arrêté du ministre chargé de la santé (2° de l'article L.5121-1 du CSP et arrêté du 29 décembre 2003, fixant le contenu du dossier de déclaration des préparations hospitalières).

Leur fabrication se fait par lots dont le nombre maximum d'unités galéniques ne peut excéder trois cents.

2. Les responsabilités du pharmacien

Selon les BPP, le pharmacien engage sa responsabilité lors de l'activité de préparation, durant toutes les étapes de réalisation de celle-ci ainsi que lors de la dispensation.

De plus, il ne peut se soustraire à l'acte de préparation, sauf dans trois situations :

- En cas d'impossibilité découlant des textes en vigueur ;
- Si la préparation est dangereuse ou non conforme à l'état actuels des connaissances scientifiques, médicales et techniques ;
- Par défaut de moyens techniques adaptés.

Ainsi, en plus des connaissances nécessaires à l'appréciation de la faisabilité scientifique et médicale d'une préparation, le pharmacien doit pouvoir garantir que les moyens techniques utilisés sont en adéquation avec le niveau d'exigence requis pour la fabrication et le contrôle d'une préparation.

3. Les contrôles applicables aux préparations pharmaceutiques

Les contrôles des préparations font l'objet d'un chapitre spécifique des BPP. Leur objectif est de s'assurer que l'ensemble des matières premières, des articles de conditionnement et des préparations présentent un niveau de qualité suffisant pour une administration à l'homme.

Ainsi, pour une préparation terminée, le pharmacien a pour charge de vérifier que l'ensemble des données recueillies durant la fabrication sont conformes aux spécifications attendues. Parmi ces données, on peut citer les conditions de préparations, le contrôle des matières premières ou encore la conformité aux spécifications de la préparation terminée.

L'activité de contrôle doit être indépendante de l'activité de préparation et nécessite des exigences fondamentales décrites dans les BPP :

- Des installations adaptées ;
- Le personnel doit être qualifié et régulièrement formé aux activités de contrôle ;
- Des procédures écrites doivent être disponibles ;
- Les échantillons sont prélevés selon des méthodes approuvées ;
- Des relevés sont établis manuellement et/ou par des appareils d'enregistrement ;
- L'évaluation de la préparation terminée comporte un examen et une revue critique des documents de préparation, ainsi qu'une estimation concernant les déviations par rapport aux procédures écrites établies ;
- Tout lot de préparations ne peut être libéré pour la dispensation que par un pharmacien et après que celui-ci se soit assuré qu'il répond aux spécifications requises ;
- Des échantillons de référence des matières premières et des préparations terminées sont conservés.

Différents types de contrôles sont applicables aux préparations pharmaceutiques. Ils varient en fonction de la forme galénique, du type de préparation (magistrale/hospitalière) et de la nature du principe actif utilisé. On considèrera des

contrôles dits analytiques, où une détection et une quantification d'un principe actif est réalisée, et des contrôles dits non-analytiques, qui repose sur la maîtrise de paramètres critiques dont la dérive est susceptible d'entraîner une non-conformité de la préparation. Idéalement, un contrôle doit être rapide, qualitatif, quantitatif et doit être effectué *a priori* afin de pouvoir réaliser la libération avant la dispensation.

Parmi les méthodes non analytiques, on peut citer le contrôle gravimétrique qui consiste à comparer la masse théorique calculée à la masse du produit fini par contrôle pondéral à l'aide d'une balance de précision. Ce contrôle est généralement appliqué pour le contrôle de solutions, tels que les chimiothérapies²⁰. Il existe également le contrôle d'uniformité de masse. Comme pour la gravimétrie, il est effectué à travers un contrôle pondéral de plusieurs unités galéniques d'un lot. Ce contrôle est applicable aux préparations conditionnées sous forme unidoses telles que les gélules, les comprimés, les poudres.... L'écart entre la masse théorique et la masse pesée est calculé et ne doit pas dépasser une certaine valeur. Par exemple, la Pharmacopée Européenne indique une tolérance de 10% pour les gélules de moins de 300 mg et de 7,5% pour celles de 300 mg ou plus²¹.

Concernant les méthodes analytiques, elles sont nombreuses mais ont généralement le même objectif final : identifier un principe actif dans une préparation et le quantifier. Différentes méthodes peuvent être mises en œuvre pour le réaliser, elles utilisent généralement une technique de détection associée ou non à une technique séparative. En absence de cette dernière, on parlera de méthode directe.

Les techniques de détection peuvent être de la spectroscopie ultraviolet (UV)^{22,23}, infrarouge (IR)²⁴, Raman ou encore de la spectrométrie de masse. Le choix de la méthode se fera en fonction des propriétés physico-chimiques de la molécule à analyser.

La séparation est la plupart du temps assurée par une technique chromatographique telle que l'HPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance). Cette étape permet de séparer les différents constituants d'un mélange, comme un principe actif et ses excipients ou ses produits de dégradation. Le procédé de séparation peut parfois également être utilisée pour le contrôle en lui-même avec la chromatographie en couche mince (CCM), notamment pour le contrôle des produits radiopharmaceutiques.

Il existe également d'autres types de contrôle, comme ceux d'uniformité de teneur²⁵, de stérilité... Par exemple, une préparation pharmaceutique stérile devra faire l'objet d'un contrôle de stérilité afin de garantir qu'elle est exempte de germes²⁶. Pour une suspension buvable, un contrôle de teneur et d'homogénéité sont nécessaires.

Dans tous les cas, malgré la diversité des contrôles réalisables, la finalité est de démontrer que la préparation finie répond à des exigences de qualité suffisantes pour pouvoir la libérer en vue d'une administration à l'homme.

Deuxième partie : La technologie UV/Raman

De nombreuses méthodes analytiques existent pour identifier et quantifier un principe actif dans une préparation. Parmi elles, on peut citer la spectrométrie UV-Visible (UV-Vis) et la spectrométrie Raman qui sont des technologies pouvant être utilisées seules ou de façon combinée.

La spectroscopie est une technique analytique qui résulte de l'interaction entre la matière et une radiation. Cette dernière peut être de diverses formes : électromagnétique, acoustique... La méthode spectroscopique la plus couramment utilisée est celle faisant appel aux rayonnements électromagnétiques, tel que la lumière.

Une radiation électromagnétique est composée d'un champ magnétique et d'un champ électrique perpendiculaire entre eux (voir Figure 1).

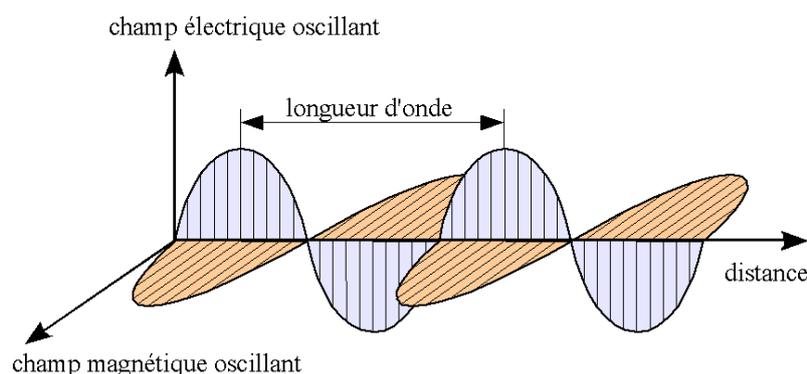


Figure 1 : Schéma des composantes d'une onde électromagnétique

L'interaction entre la matière et le rayonnement électromagnétique entraînera une modification de ce dernier. Ces variations seront reçues par un détecteur et leur analyse permettra de réaliser une identification et une quantification.

Dans certains cas, la spectroscopie sera associée à une technique séparative permettant de dissocier plusieurs analytes dans un même échantillon, permettant ainsi de doser plusieurs molécules ou de séparer une molécule d'excipients pouvant interférer avec la mesure spectroscopique.

Dans ce chapitre, nous décrivons deux techniques spectroscopiques pouvant être utilisées pour réaliser l'identification et la quantification de principes actifs : la

spectroscopie UV et la spectroscopie Raman. Nous détaillerons également un analyseur utilisant ces deux techniques de façon combinée : le QC-Prep+.

I. La spectrophotométrie UV-Visible

La spectrophotométrie ultraviolet-visible est une technique de spectroscopie qui met en jeu des photons dont les longueurs d'onde sont comprises dans le domaine du visible et de l'ultraviolet (400-750nm et 100-400nm respectivement). Elle permet une analyse qualitative et quantitative d'une substance en solution.

Certaines molécules possèdent la particularité d'absorber les photons à ces longueurs d'onde et la spectrophotométrie UV se base sur l'étude de ces propriétés. La spectrophotométrie UV repose sur l'étude de cette absorption en exploitant la loi d'absorption de la lumière, également appelée loi de Beer-Lambert.

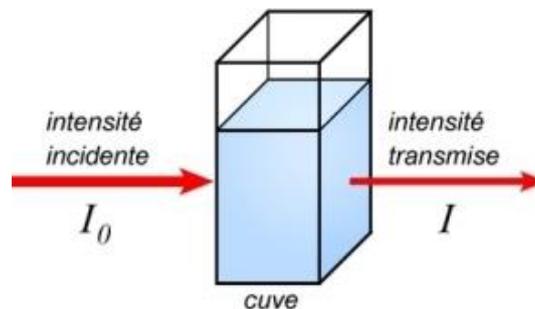


Figure 2 : Principe de la spectrophotométrie UV

Lorsqu'un rayonnement I_0 est projeté sur une substance, une partie sera absorbée et une autre partie sera transmise, c'est le rayonnement I (voir Figure 2). La loi de Beer-Lambert exprime la relation entre ces deux grandeurs, suivant la relation suivante :

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot l$$

Où A correspond à l'absorbance, ε_λ au coefficient d'extinction molaire, c à la concentration des espèces absorbantes et l à la distance traversée par le faisceau lumineux. Le coefficient d'extinction molaire est spécifique de la substance étudiée, pour une longueur d'onde donnée.

Le rapport entre I_0 et I peut également être exprimé par la transmittance T , avec l'équation suivante :

$$T = \frac{I}{I_0}$$

La loi de Beer-Lambert n'est applicable que pour des radiations monochromatiques et pour des solutions suffisamment diluées pour ne pas modifier les propriétés des molécules.

Cette loi est également additive. Ainsi, si plusieurs espèces sont présentes dans une solution, l'équation de la loi sera la suivante :

$$A = \sum(\varepsilon_{i,\lambda} \cdot C_i) \cdot l$$

Toutes les molécules ne présentent pas des propriétés d'absorption dans le domaine spectral UV. Pour cela, elles doivent posséder des liaisons chimiques permettant d'obtenir des transitions électroniques mesurables dans le domaine UV.

Une transition énergétique correspond à un changement dans la répartition des électrons de liaison d'une molécule. Il y a un passage depuis des orbitales liantes et non-liantes remplies vers des orbitales anti-liantes non remplies. Pour qu'une transition soit permise, il faut que l'énergie apportée par le faisceau lumineux soit suffisant pour assurer le passage des électrons d'un niveau énergétique de repos à un niveau énergétique excité.

Différents types de transitions électroniques existent et la longueur d'onde d'absorption d'une substance dépendra des orbitales utilisées. La Figure 3 représente les types de transitions pouvant exister.

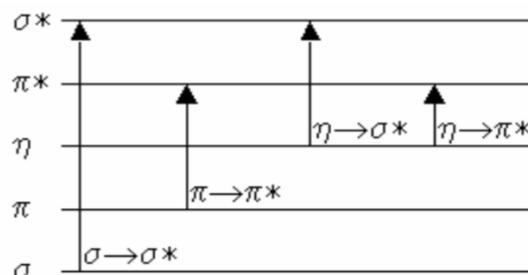


Figure 3 : Transitions électroniques disponibles

En revanche, toutes ces transitions ne sont pas exploitables. Ainsi, en spectrophotométrie UV-Vis, seules les transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ et $n \rightarrow \pi^*$ sont utiles.

Les transitions $\sigma \rightarrow \sigma^*$ et $n \rightarrow \sigma^*$ absorberont pour des longueurs d'onde inférieures à 140 nm, ce qui n'est donc pas analysable en spectrophotométrie UV-Vis. Ces deux transitions sont retrouvées pour les molécules saturées (par exemple : les alcanes). La transition $\pi \rightarrow \pi^*$ sera possible pour les molécules insaturées et aromatiques tandis que la transition $n \rightarrow \pi^*$ existera pour les fonctions permettant un transfert des électrons d'un doublet libre vers une orbitale π^* (fonctions organiques aldéhydes, cétones, amides, imines...). Ainsi en fonction des transitions électroniques possibles sur une molécule, on obtiendra des groupements chimiques responsables de l'absorption dans le domaine spectral UV-Vis. Deux grands types de groupements existent :

- Si ces groupements sont directement responsables de l'absorption (groupements insaturés), on parlera de chromophores. Ils feront apparaître des bandes sur le spectre UV ;
- Si ces groupements ne sont pas directement responsables de l'absorption, on parlera d'auxochromes. Dans ce cas, ils ne feront pas apparaître de bandes sur le spectres UV mais modifieront celles des groupements chromophores.

Le spectre UV-Vis d'une molécule est issu de sa composition en groupements chromophores et auxochromes. Il correspond à la variation de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde du faisceau lumineux. L'établissement du spectre UV d'une molécule de concentration connue permettra de définir ses caractéristiques d'absorption moléculaire (maximum d'absorption, coefficient d'extinction moléculaire...).

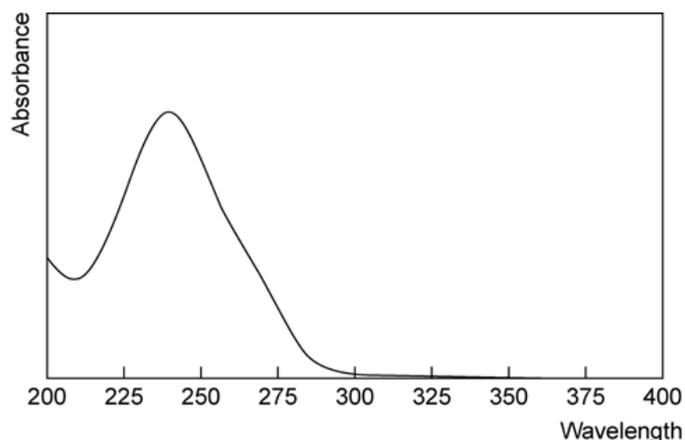


Figure 4 : Exemple de spectre ultraviolet (cas de la Bétaméthasone)

En plus des groupements chromophores et auxochromes, d'autres facteurs peuvent avoir une influence sur le spectre d'une molécule. On parlera d'effet hyperchrome ou hypochrome si ces facteurs font augmenter ou diminuer l'intensité d'absorption. On parlera également d'effet bathochrome ou hypsochrome si ces facteurs entraînent un déplacement du maximum d'absorption vers de plus grandes ou de plus petites longueurs d'onde.

Parmi ces facteurs, on peut citer :

- Le nombre de groupements chromophores sur la molécule. En effet, une augmentation de ce nombre par conjugaison des doubles liaisons ou par fusion des noyaux aromatiques provoquera un effet hyperchrome et bathochrome.
- Le pH. Les propriétés acido-basiques d'une molécule interviendront dans ces caractéristiques d'absorption. En effet, la perte d'un proton entraîne un effet hyperchrome et bathochrome. Ainsi, pour un acide, sa forme moléculaire aura un maximum d'absorption à une longueur d'onde plus faible que celle de sa forme ionisée.

Cette propriété est exploitée lors de l'usage d'indicateurs colorés comme la phénolphtaléine ou encore dans monographies de certaines molécules comme la morphine ou le paracétamol.

- La nature du solvant. Certains solvants présentent également des propriétés d'absorption. Le choix du solvant est donc important pour obtenir un spectre exploitable pour une molécule.

La spectrophotométrie UV-Vis permet ainsi une évaluation quantitative (par la loi de Beer-Lambert) et qualitative (détermination des caractéristiques d'absorption moléculaire) d'une molécule.

II. La spectrophotométrie Raman

Comme pour la spectrométrie UV, la spectrométrie Raman exploite les phénomènes résultant de l'interaction entre la lumière et la matière. En revanche, elle ne se base pas sur l'absorption mais sur l'étude des modes vibrationnels d'une molécule. C'est une méthode non destructive qui permet de caractériser la composition moléculaire et la structure d'un matériau²⁷.

L'effet Raman exploite le phénomène de diffusion inélastique de la lumière qui apparaît lors de l'excitation d'un matériau par une source lumineuse monochromatique.

Lors d'une analyse Raman, un matériau est porté à un niveau énergétique virtuel grâce à une puissante source lumineuse monochromatique (laser). L'énergie accumulée est ensuite réémise par une radiation qui peut suivre deux modes de diffusion (voir Figure 5) :

- Une diffusion élastique, appelée diffusion Rayleigh
- Une diffusion inélastique, appelée diffusion Raman

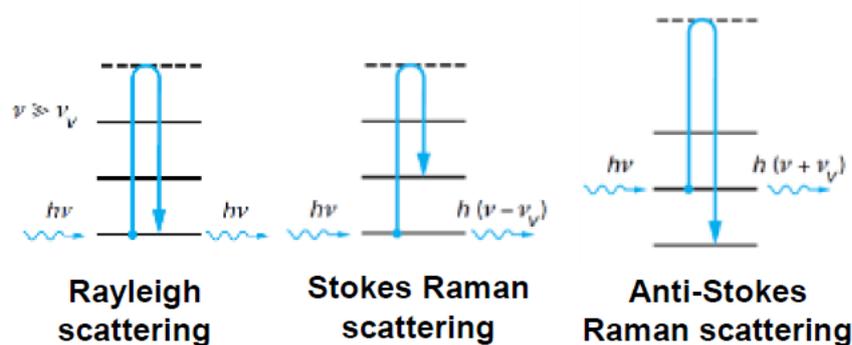


Figure 5 : Représentation des diffusions Rayleigh et Raman

La diffusion Rayleigh est majoritaire. Les photons absorbés sont réémis avec la même énergie. Elle correspond à une diffusion de la lumière sans changement d'énergie et donc sans changement de longueur d'onde.

La diffusion Raman est très minoritaire, elle touche environ $1/10^6$ des photons incidents. Dans ce cas, la matière peut absorber ou céder de l'énergie aux photons incidents, ce qui produit des radiations Stokes ou anti-Stokes pour lesquelles la longueur d'onde du photon émis sera différente de celle du photon incident.

En effet, l'énergie d'une radiation électromagnétique est déterminée par la formule suivante :

$$\Delta E = h \cdot \gamma = h \cdot \frac{c}{\lambda}$$

Où h est la constante de Planck, γ la fréquence (en Hz), c la vitesse de la lumière et λ la longueur d'onde (en nm). La longueur d'onde peut également être exprimée en nombre d'onde ν' (en cm^{-1}) où :

$$\nu' = \frac{1}{\lambda}$$

Dans le cas d'une diffusion Stokes, pour laquelle l'énergie d'un photon réémis est plus faible, on observera une augmentation de la longueur d'onde associée au photon. Le phénomène inverse se produira pour une diffusion anti-Stokes (longueur d'onde plus faible).

La diffusion inélastique de la lumière est caractéristique et spécifique des propriétés vibrationnelles d'une molécule. Ainsi, la variation d'énergie observée offrira des renseignements sur les niveaux énergétiques de rotation et de vibration de la molécule observée.

Ce type de spectroscopie offre certains avantages. C'est une méthode non-destructive, requérant une faible quantité d'échantillon. Elle est facile à mettre en œuvre et peut être utilisée sur une grande variété de matériaux.

Dans le milieu pharmaceutique et notamment industriel, la spectrométrie Raman peut être utilisée dans différentes applications^{28,29} :

- Identification de matières premières ;
- Dosage de principes actifs dans différentes formulations ;
- Screening de formes polymorphiques d'une molécule ;
- Développement de processus chimiques.

En revanche, dans le milieu hospitalier, cette technique est moins utilisée. Un état des lieux menée en 2013 a montré que seulement 18% des PUI interrogées étaient équipées d'un spectromètre Raman, essentiellement cantonnée au contrôle analytique des chimiothérapies injectables ^{6,30}.

Pourtant, cette technique pourrait être utilisable en pratique pour le contrôle de préparations hospitalières. Ainsi, une étude de 2016 a montré que la spectroscopie Raman pouvait être utilisable pour caractériser la présence d'un principe actif dans une préparation⁷.

III. Le QC-Prep+ : l'association des spectrométries UV et Raman

Le QC-Prep+ est un analyseur destiné au contrôle qualitatif et quantitatif des préparations pharmaceutiques injectables.

Il est commercialisé par la société Icones Services (Sucé-sur-Erdre, France).

1. Composition du QC-Prep+

Le QC-Prep+ est composé d'un spectrophotomètre UV-Visible, d'un spectromètre Raman et d'un injecteur d'échantillons. Ces 3 modules travaillent de façon combinée et permettent une analyse automatisée de préparations pharmaceutiques.

1.1. Injecteur automatique

Cet injecteur est constitué d'un portoir d'échantillons de 110 positions associé à une seringue de 2,5 mL permettant le prélèvement.

Les échantillons sont placés dans des vials avec des bouchons, la seringue permet un prélèvement directement à travers le septum permettant ainsi la protection du manipulateur, notamment lors du contrôle des chimiothérapies. L'injecteur comprend également quatre positions supplémentaires permettant de placer des flacons de diluants. Ces diluants sont nécessaires pour la réalisation des gammes de calibrations (voir la section Calibration, page 54), ils peuvent également être utilisés pour la dilution d'échantillons. La quatrième position permet de placer la solution de nettoyage.



Figure 6 : Injecteur automatique du système QC-Prep+

Enfin l'injecteur est relié à un réservoir de solution de zéro ainsi qu'à un bidon de déchets avec détection de niveau et cartouche à charbon actif.

Cet injecteur permet un prélèvement automatisé d'un volume précis d'un échantillon, pouvant être inférieur à 1 mL. Entre chaque échantillon, un rinçage du circuit hydraulique est réalisé permettant d'éviter les contaminations croisées. Enfin, un détecteur de présence permet de contrôler la présence de vials aux positions indiquées afin de ne pas endommager l'aiguille de prélèvement.

L'injecteur est fourni avec un logiciel de test qui permet de contrôler l'ensemble de ses fonctionnalités.

1.2. Spectrophotomètre UV-Visible

Le spectrophotomètre UV-Visible utilisé par le QC-Prep+ est un détecteur à barrettes CCD 2048 pixels offrant une place de mesure de 180 à 405 nm avec une résolution spectrale de 0,25 nm. La lecture se fait à travers une cellule à transmission.

Il est relié à une source ultraviolet de haute énergie émettant sur une gamme spectrale allant de 180 à 1100 nm. Cette source est dotée d'une lampe au deutérium ainsi que d'une lampe à halogène.

Spectrophotomètre et source sont connectés entre eux par l'intermédiaire de fibres optiques.

On ne retrouve ni pièces en mouvement, ni miroir mobile, ce qui permet d'avoir un système robuste.

Comme pour l'injecteur automatique, un logiciel de test permet de contrôler le bon fonctionnement du spectrophotomètre.

1.3. Spectromètre Raman

Le spectromètre Raman est composé d'un laser CleanLaze™ de 785 nm avec une précision de 0,01 nm. La puissance du laser est supérieure à 300 Mw, ajustable et contrôlable par logiciel.

La détection est assurée par un détecteur CCD 2048 pixels refroidit thermo-électriquement, dont la gamme spectrale du détecteur s'étend de 800 à 1050 nm avec une résolution de 0,25 nm. Cela correspond à une couverture Raman shift de 175 à 3200 cm^{-1} .

Le détecteur est équipé d'une cellule à circulation avec connexion par fibre optique.

Comme pour l'injecteur et le spectromètre UV-Visible, un logiciel de test permet d'en contrôler le bon fonctionnement.



Figure 7 : Source laser Raman du QC-Prep+

1.4. Logiciels

Le système automatisé QC-Prep+ est livré avec une suite de logiciel permettant d'exploiter l'ensemble des fonctionnalités offertes par cet appareil. Trois logiciels permettent d'utiliser le QC-Prep+ en routine : QC Analyses, QL Analyst et QS

validation. Les fonctions de ces trois logiciels sont différentes et interviennent à différents moments du processus d'analyse.

1.4.a. QC Analyses :

QC analyses est le logiciel d'acquisition des données. Il est utilisé pour réaliser les analyses de routines, notamment par sa possibilité de définir les protocoles d'analyse qui seront utilisés.

Ce type de protocole doit contenir les informations suivantes :

- Les bibliothèques génériques d'identification de la molécule et/ou de la famille de molécules ;
- Les bibliothèques spécifiques d'identification de la molécule et/ou de la famille de molécules ;
- Les étalonnages à utiliser pour réaliser l'étude quantitative ;
- Le paramétrage de l'injecteur (volume de solution à prélever...).

Ces protocoles sont indispensables au bon déroulement de l'analyse car ils permettent au QC-Prep+ de connaître les bonnes bibliothèques spectrales (pour l'identification) ainsi que les bons étalonnages (pour la quantification). Un soin particulier doit donc être apporté par le manipulateur réalisant la configuration du protocole. En effet, une erreur à ce niveau risquerait d'entraîner des dysfonctionnements pour la reconnaissance et la quantification d'une molécule.

Au laboratoire de contrôle de notre PUI, les protocoles sont classés par forme galénique à tester. Quatre sont utilisés : un pour les gélules, un pour les collyres, un pour les solutions et un pour les chimiothérapies.

En fonction des formes, différentes bibliothèques spectrales sont implémentées dans le protocole. Par exemple, pour les collyres, seules les bibliothèques des molécules contrôlées au QC-Prep+ sont paramétrées (amikacine, ceftazidime, vancomycine, amphotéricine B, PHMB). De la même façon, seuls les étalonnages à ces molécules sont ajoutés au protocole.

Le logiciel QC Analyses permet également de gérer les listes de travail, d'analyser (ou de réanalyser) des séries d'échantillons, d'avoir un état du système et de lancer des procédures de nettoyage automatiques.

Enfin, il permet également de vérifier la réponse spectrale du système, tant en UV qu'en Raman, par analyse d'une solution de référence.

1.4.b. *QL Analyst :*

QL Analyst est le logiciel d'étalonnage et de librairie spectrale. Il est utilisé pour la création et la gestion des étalonnages. En effet, si la liste de travail permettant de paramétrer le QC-Prep+ pour la réalisation d'un étalonnage est géré par le logiciel QC Analyses, il existe une interface avec le logiciel QL Analyst qui permettra à ce dernier de récupérer les données obtenues et d'en extraire les données nécessaires à la création de l'étalonnage. La réalisation de l'étalonnage peut se faire de façon manuelle ou bien de façon automatisée par le logiciel.

Il permet également de réaliser une validation de l'étalonnage par calcul du coefficient de corrélation, des résidus, de l'équation de la droite d'étalonnage et du ratio performance/déviaton.

Dans les recommandations du constructeur, le coefficient de corrélation doit être supérieur à 0,997 et le ratio performance/déviaton doit être supérieur à 5. Les valeurs limites pour les résidus sont fixées par l'utilisateur.

Parmi les autres fonctions offertes par le logiciel, on retrouve la possibilité de gérer les bibliothèques spectrales, qui seront ensuite utilisés dans les protocoles paramétrés par le logiciel QC Analyses. Deux types de bibliothèques existent :

- Pour les molécules ;
- Pour les vecteurs.

Ainsi, après avoir réalisé l'étalonnage d'une nouvelle molécule, les spectres obtenus sont associés aux molécules et vecteurs utilisés. En les ajoutant à une bibliothèque spectrale, cela permettra au QC-Prep+ de pouvoir réaliser l'étude qualitative d'une molécule (reconnaissance) par comparaison du spectre obtenu par un échantillon avec ceux présent dans la bibliothèque.

Enfin, le logiciel QL Analyst permet également de visualiser de façon fine l'ensemble des spectres, que ce soient ceux obtenus lors d'une analyse de routine ou bien ceux obtenus durant la réalisation des étalonnages. Il peut ainsi être utilisé pour caractériser une molécule d'intérêt dans les domaines spectraux UV et Raman.

1.4.c. QS Validation

QS Validation est un logiciel de suivi de production permettant de réaliser la libération analytique de préparations pharmaceutiques.

Il permet de lire en temps réel les résultats des analyses effectuées et d'en déduire s'ils sont conformes aux résultats attendus.

Différentes données sont récupérées et comparées entre elles : la molécule attendue et celle détectée, le pourcentage de reconnaissance, les concentrations théoriques et retrouvées ainsi que le pourcentage de d'erreur et la conformité du vecteur.

2. Principes de fonctionnement

2.1. Ajout d'une nouvelle molécule ou d'un nouveau vecteur

Les différents logiciels du QC-Prep+ sont reliés à une base de données Microsoft Access® qui comprend les noms des molécules et des vecteurs.

Lors de la mise au point d'une méthode de dosage d'un nouveau principe actif, l'utilisateur doit impérativement la créer dans cette base de données afin qu'elle puisse apparaître dans les logiciels d'analyse et d'étalonnage.

2.2. Protocoles d'analyse

Un protocole d'analyse contient l'ensemble des informations nécessaires pour réaliser correctement une analyse. Il permet de lire une famille de molécules ou encore d'organiser les différentes analyses possibles. Il est paramétré à l'aide du logiciel QC Analyses.

Un protocole d'analyse contient les informations suivantes :

- Le nom du protocole ;
- Le volume d'échantillon à prélever ;
- La vitesse de prélèvement ;
- Les temps d'acquisition pour les spectromètres UV-Visible et Raman ;
- La bibliothèque spectrale à utiliser pour l'identification du principe actif ;
- La bibliothèque spectrale pour l'identification du vecteur ;
- Les étalonnages à utiliser pour la quantification du principe actif.

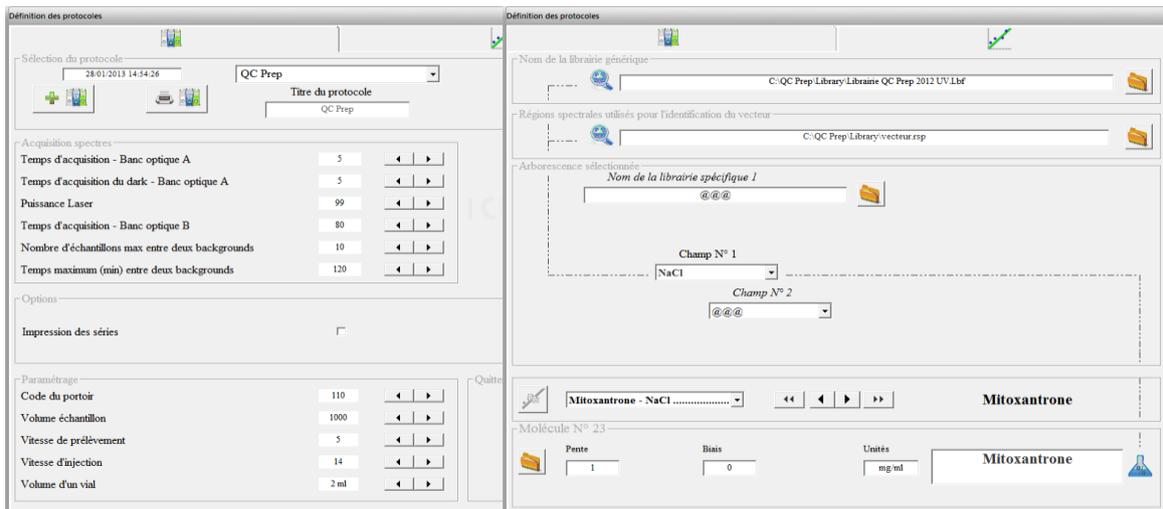


Figure 8 : Ecran de définition d'un protocole d'analyse

2.3. Régions spectrales

La sélection des régions spectrales permet l'identification des principes actifs ainsi que leur quantification.

Cette sélection consiste à isoler les bandes du spectre pour lesquelles :

- Les écarts d'absorbance entre les points d'une gamme sont les plus importants, on recherche une variance maximale ;
- Les concentrations théoriques sont corrélées de façon optimale avec les niveaux d'absorbance des différents points de la gamme, on recherche une corrélation maximale.

Les courbes de variance et de corrélation obtenues permettent de définir précisément la bande spectrale la mieux corrélée aux concentrations

La définition de ces deux paramètres permet d'obtenir le ratio performance/déviaton.

2.4. Etalonnages

La création des étalonnages est indispensable à la quantification des principes actifs avec le QC-Prep+.

Leur création et leur validation fait intervenir deux logiciels.

QC Analyses permet de créer la liste de travail des échantillons de calibration et d'en acquérir les spectres. Le logiciel propose une fonction permettant d'automatiser la calibration. Il suffit à l'utilisateur de préparer une solution-mère contenant une concentration connue en principe actif et une solution de diluant. Différents paramètres sont également à renseigner, à savoir :

- Le nom de la molécule étalonnée ;
- La concentration de la solution-mère de départ ;
- Le diluant utilisé ;
- Le choix des concentrations. Elles sont automatiquement calculées par le logiciel et leur valeur ne peut pas être modifiée. En revanche, il est possible de choisir les concentrations à tester.

Ces données permettront au QC-Prep+ de réaliser automatiquement les dilutions permettant d'aboutir aux différents niveaux de concentrations des points de gamme et de les analyser afin d'obtenir un spectre par concentration.

Il est également possible de ne pas utiliser la fonction automatisée du QC-Prep+ et de fabriquer manuellement chaque point de gamme qui sera ensuite analysé par l'appareil.

Une fois ces spectres obtenus, le logiciel QL Analyst permettra ensuite de mettre au point et de valider l'étalonnage.

Au préalable, il est nécessaire de définir la région spectrale de la molécule (voir la partie III.2.3 *Régions spectrales*).

Dans un second temps, l'établissement de la région spectrale de quantification permettra au logiciel de calculer les paramètres permettant à l'utilisateur de valider ou non l'étalonnage :

- Coefficient de corrélation ;
- Equation de la droite d'étalonnage (pente et ordonnée à l'origine) ;
- Ratio performance/déviations ;
- Ecart-types résiduel et de prédiction ;
- Calculs des résidus.

L'utilisateur peut supprimer des points d'étalonnage afin d'améliorer ces critères.

Une fois l'étalonnage validé et sauvegardé, il sera nécessaire d'ajouter les spectres d'étalonnage à une bibliothèque spectrale afin que le QC-Prep+ puisse reconnaître cette molécule (voir la partie III.2.5 *Les bibliothèques spectrales*)

2.5. *Les bibliothèques spectrales*

Une bibliothèque ou librairie spectrale permettent d'identifier un échantillon par comparaison de son spectre avec ceux d'un ou plusieurs spectres enregistrés dans cette bibliothèque.

Le résultat de la comparaison est exprimé sous forme d'un taux de corrélation exprimé en pourcentage. L'identification sera considérée comme certaine lorsque le degré de corrélation est supérieur à 93%. Dans ce cas, le nom de la molécule sera affiché en vert en fin d'analyse. Si le degré est inférieur à 90%, le nom de la molécule sera affiché en rouge. Entre ces deux valeurs, le nom sera affiché en orange.

De cette façon, lors d'une comparaison, un résultat sera toujours donné et seul le degré de corrélation renseignera sur la qualité de l'identification.

Les bibliothèques spectrales sont créées et enrichies par l'utilisateur, grâce au logiciel QL Analyst.

L'acquisition des spectres se fait grâce au logiciel QC Analyse, elle peut se faire durant l'étape d'étalonnage ou en analysant différents échantillons d'une molécule. Pour obtenir une identification correcte, il est recommandé par le fabricant d'obtenir des

spectres en prenant en compte le plus de facteurs de variabilité (concentrations, vecteurs...).

Les différents spectres obtenus seront ensuite ajoutés à un fichier permettant d'associer à chaque spectre le nom de la molécule et le vecteur.

2.6. Paramétrage d'une analyse

La création d'une liste de travail permettant de prélever une série d'échantillons se fait par l'intermédiaire du logiciel QC Analyse.

Dans l'écran « Liste de travail », l'utilisateur doit renseigner un certain nombre de paramètres :

- Le nombre d'échantillons à analyser ;
- La position du premier échantillon sur le carrousel ;
- Le dossier de sauvegarde pour l'enregistrement des spectres obtenus ;
- Le protocole de dosage à utiliser ;
- Le nom des différents échantillons.

Une fois tous ces paramètres saisis, l'utilisateur doit sauvegarder la liste de travail avant de pouvoir lancer l'analyse.

2.7. Déroulement d'une analyse

Dans un premier temps, le module injecteur introduit dans la cellule de mesure une solution de zéro (solution de triton diluée à 0,5%) qui permet d'obtenir un spectre de référence UV-Visible ainsi qu'un zéro électronique pour la spectrométrie Raman.

Ensuite, le module injecteur vient prélever les échantillons en fonctions des paramètres renseignés par l'utilisateur dans la liste de travail et dans le protocole de dosage sélectionné.

Lors du passage d'un échantillon, un spectre UV-Visible et un spectre Raman sont acquis par les détecteurs de l'appareil. Ces spectres, ainsi que les données de référence de l'UV-Visible et le zéro électronique, permettent d'obtenir un spectre d'absorbance UV-Visible et un spectre d'émission Raman de l'échantillon.

La comparaison du spectre de l'échantillon avec ceux présents dans la bibliothèque spectre sélectionnées permettra d'identifier le principe actif et le vecteur, tandis que l'étalonnage associé à la molécule permettra de la quantifier.

Lors de la création d'une liste de travail pour l'analyse d'une série d'échantillons, l'utilisateur sélectionnera un protocole de dosage. Ce protocole contient notamment la base spectrale à utiliser pour l'identification du principe actif, celle à utiliser pour l'identification du vecteur ainsi que les étalonnages associés afin de permettre la quantification.

D'autres données sont également paramétrables comme le volume à prélever ou la vitesse de prélèvement de la seringue.

Ainsi, une fois un spectre acquis et traité par logiciel d'analyse, ce dernier va ensuite effectuer une comparaison avec les spectres présents dans la base spectrale sélectionnée dans le protocole.

Dans la majorité des cas, la spectrométrie UV est suffisante pour l'identification du principe actif. Dans ce cas, seules les données spectrales UV seront utilisées.

Si la spectrométrie UV n'est pas suffisamment sensible pour différencier 2 principes actifs proches (cas des anthracyclines par exemple), alors les données spectrales Raman seront utilisées pour l'identification.

Dans tous les cas, seules les données UV seront utilisées pour la quantification une fois l'identification réalisée.

Les résultats sont affichés au fur et à mesure de l'avancement de la session de travail sur le logiciel QC Analyses.

Les données obtenues sont :

- Le nom de la molécule identifiée avec le code couleur correspondant au degré de corrélation du spectre par rapport à la bibliothèque spectrale ;
- La concentration de la molécule ;
- Le vecteur identifié ;
- Les spectres UV-Visible et Raman du principe actif.

Une fonction de réanalyse permet à l'utilisateur de tester des spectres préalablement enregistrés, par exemple en cas d'ajout de nouveaux spectres dans la bibliothèque spectrale ou en cas de changement au niveau de l'étalonnage.

Les résultats peuvent être imprimés ou bien exportés vers un fichier texte ou vers un logiciel externe.

2.8. Normalisation du système

La normalisation est une procédure permettant d'enregistrer la réponse des cellules UV-Visible et Raman. Elle se fait à l'installation du système ainsi qu'à intervalles réguliers.

Un facteur modifiant cette réponse peut être une usure de la cellule, provoquant ainsi une modification du trajet optique.

L'utilisation de la fonction de normalisation permet d'éviter un recalage des étalonnages en cas de changements de composants de l'appareil. Elle garantit également la stabilité de la réponse des cellules dans le temps.

Cette procédure est basée sur la comparaison du spectre d'une solution de référence avec un spectre de référence enregistré préalablement et s'effectue à l'aide du logiciel QC Analyse, avec la fonction de « normalisation ».

Grâce à cette comparaison, le logiciel fournira un facteur de normalisation. S'il est compris entre 0,95 et 1,05, la différence n'est pas considérée comme significative et il n'est pas nécessaire de sauvegarder le facteur.

En dehors de ces valeurs, le fabricant recommande de mener des vérifications complémentaires afin de contrôler que la modification du facteur n'est pas due à un problème indépendant de l'usure des cellules.

2.9. Contrôles et tests de l'appareil

2.9.a. Test des bancs optiques

Ce test, également appelé « Test banc » permet de contrôler la réponse des deux bancs optiques sur l'ensemble des zones spectrales. Il est effectué grâce au logiciel QC Analyse.

Le module injecteur introduit dans les cellules une solution de zéro puis effectue une série d'acquisitions. Le spectre de transmittance moyen sera calculé et le bruit sera mesuré dans différentes régions du spectre.

Si le test ne se situe pas dans les limites spécifiées, l'appareil le recommencera automatiquement jusqu'à que les valeurs soient correctes.

On considèrera le test comme bon si le bruit de fond est inférieur à 0,03.

D'autres paramètres sont également évalués comme le niveau d'énergie du laser et la lampe UV-Visible et le temps d'intégration du spectromètre UV.

Ce test doit être effectué à chaque démarrage de l'appareil.

2.9.b. Phénomène de traçage

Le phénomène de traçage correspond à une contamination d'un échantillon par un échantillon précédent.

Une des causes principales de ce phénomène est le manque d'efficacité du cycle de rinçage (solution de rinçage inadapté ou contaminée, cellules de mesures usées ou endommagées...).

Afin de garantir la fiabilité des résultats, il est important de vérifier mensuellement l'absence de ce phénomène. Pour cela, le fabricant de l'appareil propose une procédure de vérification consistant à analyser avec le QC-Prep+ deux échantillons d'une solution concentrée, puis deux échantillons d'eau, à nouveau deux échantillons de la même solution concentrée puis encore deux échantillons d'eau.

Cette procédure permet de vérifier que les résultats obtenus avec la solution concentrée ne sont pas altérés par la solution de rinçage ou par l'échantillon précédent.

Pour être conforme, l'efficacité du système de rinçage doit être supérieur ou égale à 99%.

2.9.c. Test de répétabilité

Le test de répétabilité permet de vérifier que le système est capable de donner des résultats homogènes pour un même échantillon. Ce test exprime la stabilité du banc optique et des composants du circuit fluide.

Ce test doit être réalisé de façon mensuelle, ainsi qu'après toute intervention sur le circuit fluide ou le banc optique.

Pour le réaliser, le fabricant recommande d'analyser huit échantillons identiques et d'en calculer la valeur moyenne, l'écart-type et le pourcentage d'erreur. Le test de répétabilité doit être effectué pour chaque étalonnage d'un protocole d'analyse.

3. Utilisations en milieu hospitalier

Le fabricant du QC-Prep+ positionne cet appareil pour le contrôle des préparations pharmaceutiques injectables. Actuellement, la principale utilisation décrite concerne le contrôle des chimiothérapies³¹. Notre équipe l'utilise également pour le contrôle de collyres antibiotiques et antifongiques ainsi que le contrôle de gélules⁵.

Troisième partie : Mise au point et validation de la méthode de dosage de la spironolactone en suspension buvable

I. Matériels et méthodes

Différentes approches de validation d'une méthode de dosage existent. Parmi elles, on peut citer les recommandations de l'ICH³², celles de la FDA (Food and Drug Administration)³³, celles de l'EMA (European Medicines Agency)³⁴, du GERPAC (Groupement d'Etude et de Recherche en Atmosphère Contrôlée)³⁵ ou encore celles de la SFSTP (Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques)³⁶.

Dans tous les cas, un certain nombre de paramètres sont à évaluer afin de valider la méthode de dosage. Ces paramètres peuvent différer en fonction de l'objectif final de la méthode, ceux cités par l'ICH sont listés dans le tableau ci-dessous (Tableau 2).

Tableau 2 : Paramètres à valider en fonction du type de méthode analytique à développer³²

Type of analytical procedure characteristics	IDENTIFICATION	TESTING FOR IMPURITIES		ASSAY - dissolution (measurement only) - content/potency
		quantitat.	limit	
Accuracy	-	+	-	+
Precision				
Repeatability	-	+	-	+
Interm.Precision	-	+(1)	-	+(1)
Specificity (2)	+	+	+	+
Detection Limit	-	-(3)	+	-
Quantitation Limit	-	+	-	-
Linearity	-	+	-	+
Range	-	+	-	+

Dans cette étude, nous cherchons à identifier et doser un principe actif dans un excipient, ce qui correspond à la troisième colonne du Tableau 2 (« Assay »). Les

paramètres à évaluer seront donc la justesse, la précision (répétabilité, précision intermédiaire), la spécificité et la linéarité.

Nous avons choisi d'utiliser les recommandations ICH Q2(R1)³² pour valider notre méthode de dosage. Les différents paramètres à valider et les analyses permettant d'y arriver sont décrits dans les paragraphes suivants.

La validation d'une méthode de dosage analytique doit permettre d'estimer sa capacité à atteindre le but pour laquelle elle a été développée, c'est-à-dire sa faculté à rendre des résultats exacts, c'est-à-dire juste et précis.

La linéarité d'une procédure analytique est sa capacité à fournir des résultats directement proportionnels à la concentration de l'analyte dans l'échantillon. Selon l'ICH, la validation analytique de la linéarité doit se faire sur un minimum de cinq points de gamme à des concentrations différentes.

Les données à déterminer sont l'équation de la droite d'étalonnage, c'est-à-dire la pente et l'ordonnée à l'origine, son coefficient de corrélation ainsi que les résidus³². Leur calcul se fait grâce à la méthode des moindres carrés.

La justesse exprime l'étroitesse d'accord entre la valeur considérée comme vraie et la valeur déterminée par la mesure. Elle exprime l'erreur systématique. Elle est déterminée par l'analyse de neuf déterminations pour trois niveaux de concentrations couvrant l'intervalle de mesure.

La précision d'une méthode analytique exprime l'étroitesse d'accord entre une série de mesures obtenues à partir d'un même échantillon homogène. Elle exprime l'erreur aléatoire de la méthode. Elle peut être définie selon trois niveaux : la répétabilité, la fidélité intermédiaire et la reproductibilité.

- La répétabilité, qui exprime la précision pour des conditions opératoires identiques sur une courte période de temps ;
- La fidélité intermédiaire, qui permet d'exprimer les variations intra-laboratoire : jours différents, techniciens différents... ;
- La reproductibilité, qui exprime les variations inter-laboratoire.

L'étude de la reproductibilité est optionnelle pour la validation d'une méthode.

La précision est déterminée par l'analyse du coefficient de variation de séries de contrôles.

Justesse et précision permettent d'exprimer l'exactitude d'une méthode. Ainsi, lorsqu'une méthode est juste et précise, on la considérera comme exacte.

Une représentation graphique de ces définitions est présentée dans la Figure 9.

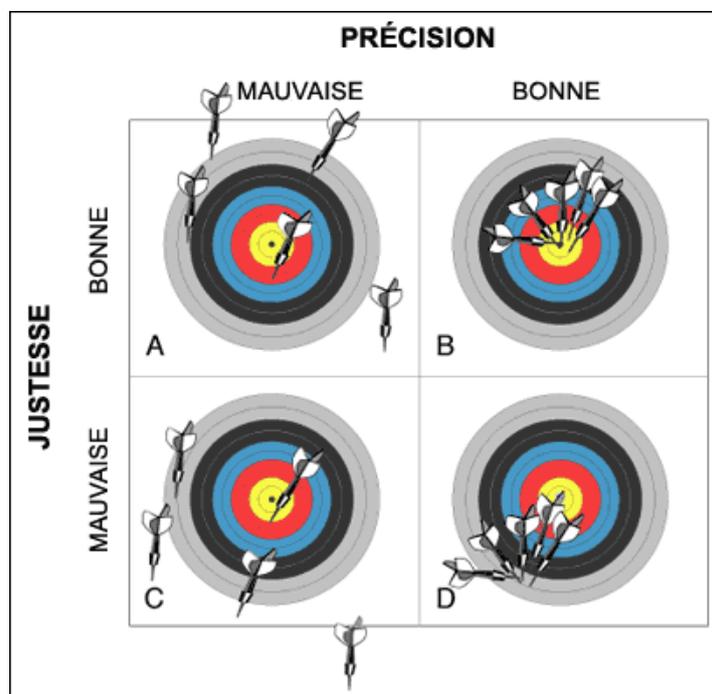


Figure 9 : Représentation graphique des notions de justesse et de fidélité

Enfin la spécificité est la capacité d'une méthode analytique à identifier sans équivoque l'analyte d'intérêt en présence d'autres composants pouvant être présents. Ces autres composants peuvent être des impuretés, des produits de dégradation ou encore des excipients accompagnant le principe actif d'intérêt.

Le schéma de validation a suivi les étapes décrites par l'ICH : étude de la linéarité et de l'intervalle de dosage, détermination de l'exactitude et de la précision de la méthode.

La mise au point et la validation seront effectuées en utilisation la spironolactone formulée avec quatre vecteurs de suspensions buvables : l'Inorpha®, le mélange OraPlus®/OraSweet® 50:50 (v:v), le Syrspend® SF PH4 et le Syrspend® Dry.

1. Equipement

L'analyse UV-Raman a été réalisée à l'aide d'un automate QC-Prep+ commercialisé par la société Icones Services.

Cet appareil est divisé en trois modules :

- Une source UV-Visible, connectée à une cellule à circulation par fibre optique. L'acquisition du signal se fait grâce à un détecteur à barrette CCD 2048 pixels.

La plage de mesure couvre une longueur d'onde comprise entre 180 et 405 nm avec une résolution spectrale de 0,25nm.

- Un spectromètre Raman comprenant un laser TM 785nm associé à un détecteur CCD 2048 pixels
- Un injecteur automatique permettant un prélèvement standardisé en volume des échantillons

L'acquisition et l'analyse des spectres UV/Raman est effectuée par l'intermédiaire du logiciel QC Analyses, fourni avec l'appareil. Ce logiciel permet de mettre au point les protocoles d'analyses (étalonnages à utiliser, volume d'échantillon à prélever, bibliothèques de spectres à utiliser pour identification de la molécule...). Il offre également la possibilité de gérer les listes de travail, d'analyser des séries d'échantillons ou encore de vérifier la réponse spectrale du système par analyse d'une solution de référence.

L'étalonnage et l'enrichissement de la bibliothèque spectrale sont réalisés grâce au logiciel QL Analyst. Il permet la visualisation des spectres, la gestion des étalonnages (création, modification...) ou encore la gestion des bibliothèques spectrales (principe actifs et vecteurs).

Enfin, il existe un logiciel de validation QS Validation qui permet de valider en temps réel les résultats fournis par le logiciel QC Analyses. Ce dernier n'est pas utilisé au sein de notre unité.

2. Analyse préliminaire

2.1. Analyse de la composition des vecteurs de suspension buvable

Dans notre étude, la spironolactone est mise en suspension dans un vecteur complexe dont les composants sont susceptibles de posséder une absorbance dans le domaine

UV et donc d'interférer avec le spectre de notre analyte d'intérêt. La composition en excipients de chacun des vecteurs est présentée dans le Tableau 3.

De plus, ces vecteurs de suspension ont tous la particularité d'être visqueux et opaques sauf l'Inorpha® qui présente une coloration jaune légèrement translucide. Or, afin de réaliser une analyse UV dans de bonnes conditions, il est nécessaire que le faisceau de lumière incident puisse traverser l'échantillon à analyser.

Utilisés purs, l'opacité de ces vecteurs risque de ne pas permettre un passage suffisant de la lumière et la spectroscopie UV ne pourra pas être réalisée. La viscosité de ces produits pourrait également endommager le circuit fluide du QC-Prep+.

Tableau 3 : Composition des différents vecteurs de suspension buvable

Vecteurs de suspension	Composition excipiendaire
Inorpha®	Eau purifiée, glycérol, hydroxyéthylcellulose, acide citrique, citrate de sodium, masquant d'amertume, arôme caramel, u, sorbate de potassium
OraPlus®	Cellulose microcristalline, carboxyméthylcellulose sodique, gomme xanthane, carraghenane, phosphate sodique, acide citrique, siméthicone, sorbate de potassium, méthylparabène
OraSweet®	Eau purifiée, sucralose, glycérol, sorbitol, aromatisants, phosphate sodique, acide citrique, sorbate de potassium, méthylparabène
Syrspend® SF PH4	Eau purifiée, amidon alimentaire modifié, citrate de sodium, acide citrique, sucralose, benzoate de sodium, acide malique, siméthicone
Syrspend® Dry	Amidon alimentaire modifiée, citrate de sodium, acide citrique, sucralose

La première étape de la mise au point de la méthode sera donc d'estimer s'il est nécessaire de diluer ces vecteurs afin de les rendre suffisamment transparents à la lumière pour pouvoir utiliser la technique spectroscopique dans de bonnes conditions.

Pour déterminer si une dilution est nécessaire, chaque vecteur sera analysé par le QC-Prep+ dans trois conditions : pur, dilué au 1/10^e dans du méthanol et dilué au 1/100^e dans du méthanol.

Le facteur de dilution sera considéré comme acceptable une fois que le spectre obtenu dans ces conditions sera répétable sur plusieurs analyses successives.

2.2. Analyse du spectre UV et Raman de la spironolactone

Un échantillon de spironolactone, à une concentration de 1 mg/mL dans du méthanol, sera également analysé à l'aide du QC-Prep+ pour en obtenir les spectre UV et Raman.

3. Calibration

La calibration du QC-Prep+ a été réalisée par réalisation d'une gamme de calibration issue d'une solution-mère diluée géométriquement avec un diluant. La calibration de chaque combinaison molécule/vecteur de suspension a été réalisée séparément et chaque solution-mère était directement issue d'une suspension buvable de spironolactone à 10mg/mL réalisée avec le vecteur de suspension correspondant au couple testé.

Le protocole de fabrication de la solution-mère a été identique pour les quatre vecteurs de suspension testés :

- Fabrication d'une suspension buvable de spironolactone à 10 mg/mL en suivant les recommandations établies par l'unité de Pharmacotechnie et par le fournisseur ;
- Dilution de la suspension au 1/10^{ème} dans du méthanol : prélèvement de 1mL de la suspension puis ajout de méthanol jusqu'à 10 mL à l'aide d'une fiole jaugée ;
- Agitation au vortex pendant 60 secondes ;
- Centrifugation de la solution obtenue afin d'éliminer les particules pouvant salir ou endommager la cellule et le circuit fluidique du QC-Prep+.

Le solvant utilisé pour la dilution de la solution-mère était un extrait méthanolique de chaque vecteur. Son protocole de fabrication a été le suivant :

- Prélèvement de 2 mL de vecteur ;
- Ajout de méthanol jusqu'à 20 mL à l'aide d'une fiole jaugée ;
- Agitation au vortex pendant 60 secondes ;
- Centrifugation de la solution obtenue pour éliminer les particules.

De cette façon, chaque extrait obtenu comporte un taux d'excipient égale à 1/10^{ème} de la concentration normalement présente dans le vecteur de suspension buvable.

La réalisation des gammes de calibration a ensuite suivi le protocole donné par le QC-Prep+.

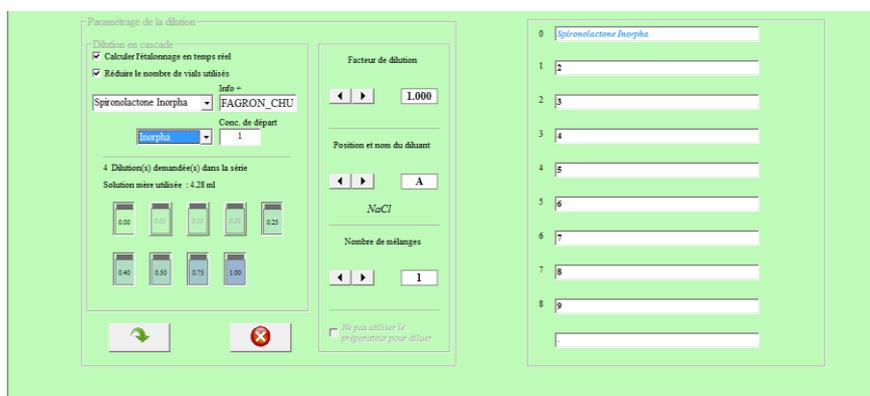


Figure 10 : Ecran d'étalonnage du QC-Prep+

L'acquisition des spectres d'étalonnage se fait de façon automatisée, l'utilisateur ayant uniquement à renseigner la molécule d'intérêt, le diluant, la concentration de départ de la solution-mère, les dilutions demandées, le facteur de dilution... (Figure 10). En revanche, il n'est pas possible de choisir librement les valeurs de concentrations. Aussi, il sera nécessaire d'être attentif à la concentration de départ choisie. Cela peut être un frein puisque les recommandations ICH demandent un intervalle de dosage compris entre 80 et 120% de la concentration-cible. Dans notre cas, l'intervalle sera plus grand (50-200%) en raison de cette limitation.

4. Etude de la linéarité

L'étude de la linéarité a été effectuée par la réalisation de trois gammes pendant trois jours. Une première gamme a été fabriquée et testée à J1, une deuxième à J2 puis une troisième à J3. Chaque gamme a été fabriquée indépendamment des autres.

Les valeurs des points de gammes utilisés pour cette étude sont présentées dans le Tableau 4. La concentration-cible pour le dosage était de 5 mg/mL.

Tableau 4 : Points de gamme utilisés pour l'étalonnage

Points	G1	G2	G3	G4	G5
Concentration en spironolactone (mg/mL)	2,5	4	5	7,5	10

L'ensemble des gammes obtenues ont été analysées par détermination du coefficient de corrélation, de la pente, de l'ordonnée à l'origine et le calcul des résidus par la droite des moindres carrés, à l'aide du logiciel QL Analyst.

L'ensemble des points des trois gammes ont ensuite été regroupés afin de ne former qu'une seule gamme dont les critères de validation étaient les mêmes que ceux cités ci-dessus. Cette gamme finale (ou calibration « 3 gammes ») servira pour la détermination de la justesse et de la précision.

La pente a et l'ordonnée à l'origine b sont déterminées par les formules suivantes :

$$a = \frac{\sum[(x_i - \bar{x}) \times (y_i - \bar{y})]}{\sum(x_i - \bar{x})^2}; b = \bar{y} - a \cdot \bar{x}$$

Où \bar{x} est la moyenne des points de concentration, x_i la valeur de concentration pour un niveau donné, \bar{y} la moyenne des absorbances mesurées et y_i la valeur de l'absorbance mesurée pour un niveau de concentration donné.

La pente et l'ordonnée à l'origine permettent de définir l'équation de la droite d'étalonnage selon la relation suivante :

$$y_i = a \cdot x_i + b$$

Le coefficient de corrélation a été calculé à l'aide de la formule suivante :

$$R^2 = \frac{\sum(y_i^* - \bar{y})^2}{\sum(y_i - \bar{y})^2}$$

L'équation de la droite a permis de calculer les résidus en fonction de l'absorbance obtenue pour chaque point de gamme, selon la relation suivante :

$$x_i^* = \frac{y_i - b}{a}$$

Le pourcentage de déviation des résidus par rapport à la concentration du point de gamme correspondant a été calculé grâce à l'équation suivante :

$$D\% = \frac{x_i^* - x_i}{x_i} \times 100$$

Les calculs ont été réalisés à l'aide du logiciel Excel® (Microsoft).

5. Evaluation de l'effet matrice

L'étude de l'effet matrice a été mise en œuvre par la réalisation de trois gammes de spironolactone diluée dans du méthanol. L'équation de la droite obtenue a été comparée à celles déterminées lors de l'utilisation des vecteurs de suspension buvable. Les pentes et les ordonnées à l'origine ont été comparées à l'aide d'un test de Student ($\alpha = 0,05$) pour estimer la présence d'un effet matrice.

Les calculs ont été réalisés à l'aide du logiciel Excel® (Microsoft).

6. Détermination de la précision

Les analyses nécessaires à l'évaluation de la précision sont, au minimum, neuf mesures réparties sur trois niveaux de concentrations couvrant l'intervalle de dosage de la procédure. Soit trois mesures sur des échantillons indépendants, par niveaux de concentrations.

Répétabilité et fidélité intermédiaire ont été évaluées par la détermination du coefficient de variation (CV) de chaque point de contrôle, sur une journée (répétabilité) et sur trois jours (fidélité intermédiaire). Les intervalles de confiance à 95% des coefficients ont également été déterminés.

Le coefficient de variation a été calculé selon la formule suivante :

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100$$

Où \bar{x} correspond à la moyenne des mesures pour un point de contrôle et σ représente l'écart-type (EC) de cette moyenne.

Les intervalles de confiance (IC) ont été calculés selon la formule suivante :

$$IC = CV \pm t_{\alpha/2} \cdot \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Où CV représente le coefficient de variation obtenu pour un point de contrôle, n le nombre de mesures effectués et σ l'écart-type.

Les valeurs des trois niveaux de concentration sont présentées dans le Tableau 5 :

Tableau 5 : Concentrations des contrôles-qualité

Contrôle qualité	CQB	CQI	CQH
Concentration en spironolactone (mg/mL)	2,5	5	10

Chaque point de contrôle a été fabriqué selon le protocole présenté ci-dessous.

○ Fabrication des points de contrôles :

Pour réaliser les mesures permettant l'analyse de la précision, nous avons fabriqués trois échantillons à 1 mg/mL (contrôle qualité haut CQH), trois échantillons à 0,5 mg/mL (contrôle qualité intermédiaire CQI) et trois échantillons à 0,25 mg/mL (contrôle qualité bas CQB), de façon indépendante et sur trois journées différents. Au total, 27 échantillons ont été fabriqués pour chaque vecteur de suspension testé : 9 CQH, 9 CQI et 9 CQB.

Le protocole de fabrication a été le suivant :

- Réalisation d'une solution-mère de Spironolactone à 5 mg/mL dans du méthanol (SM_{CQ}) ;
- Fabrication d'un extrait méthanolique (EM) au 1/10^{ème} du vecteur de suspension ;
- Mélange de la solution-mère, de l'extrait méthanolique et de méthanol pour obtenir les concentrations appropriées en Spironolactone :
 - CQH: 2 mL SM_{CQ} + 1 mL EM + 7 mL methanol
 - CQI: 1 mL SM_{CQ} + 1 mL EM + 8 mL methanol
 - CQB: 0,5 mL SM_{CQ} + 1 mL EM + 8,5 mL methanol

Ce protocole permet une fabrication aisée de l'ensemble des échantillons et respecte les recommandations ICH par ajout d'une quantité connue de Spironolactone dans un mélange d'excipients.

Le dosage au QC-Prep+ s'est fait dans les mêmes conditions que pour la réalisation de l'étalonnage. Chaque échantillon a été dosé trois fois.

Les calculs ont été réalisés à l'aide du logiciel Excel® (Microsoft).

7. Détermination de la justesse

Selon les recommandations ICH, différentes méthodes sont utilisables pour déterminer la justesse. Nous avons choisi d'appliquer la première méthode proposée, c'est-à-dire d'appliquer la méthode analytique à tester sur le mélange d'excipients auquel ont été rajoutés des quantités connues du principe actif à analyser.

L'analyse de la justesse a été réalisée en déterminant le pourcentage de recouvrement (R%) entre la valeur obtenue par le dosage et la valeur considérée comme vraie (valeur théorique), suivant la formule suivante :

$$R\% = \frac{\bar{x}}{x_{th}} \times 100$$

Où \bar{x} correspond à la moyenne des valeurs mesurées pour un point de contrôle et x_{th} à la valeur théorique.

Ce pourcentage de recouvrement doit être accompagné d'un intervalle de confiance à 95%, dont le calcul est le suivant :

$$IC = \bar{x} \pm t_{\alpha/2} \cdot \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Où \bar{x} représente la moyenne des taux de recouvrement obtenus pour un point de contrôle, n le nombre de mesures effectués et σ l'écart-type.

Les mesures à obtenir pour l'étude de la justesse sont, au minimum, neuf déterminations sur au moins trois niveaux de concentrations couvrant l'intervalle de dosage. Pour cela, nous avons utilisés les valeurs obtenues lors de l'analyse des contrôles qualité de l'étude de la précision.

Les calculs ont été réalisés à l'aide du logiciel Excel® (Microsoft).

8. Evaluation de la sélectivité

Des suspensions buvables de dexaméthasone, d'hydrochlorothiazide et de phénytoïne ont été fabriquées avec chaque vecteur de suspension buvable.

La concentration de ces suspensions étaient de 5 mg/mL de principe actif.

Pour chaque préparation, un échantillon dilué au 1/10^{ème} dans du méthanol a été analysé à l'aide du QC-Prep+.

Les résultats d'identification (molécule reconnue et pourcentage de reconnaissance) ont été analysés pour évaluer la sélectivité de la méthode.

II. Résultats

1. Analyse préliminaire

1.1. Détermination du facteur de dilution

Les échantillons de vecteurs de suspensions analysés purs présentent des spectres non exploitables car saturés et non répétables. De plus, la viscosité étant trop importante, l'aiguille de l'échantillonneur a présenté des difficultés pour prélever l'ensemble de l'échantillon à analyser.

En revanche, pour les échantillons dilués au 1/10^e et au 1/100^e, les spectres obtenus sont exploitables et ne saturent pas le détecteur. La viscosité des suspensions a été supprimée par la dilution et l'aiguille ne présente plus de difficultés pour prélever l'ensemble de l'échantillon. Enfin, la superposition des spectres montre que l'extraction des composés absorbants présents dans les vecteurs de suspension est répétable et ne variera pas au cours de la validation de méthode et des dosages.

1.2. Analyse des spectres UV et Raman de la spironolactone

Les Figure 11 et Figure 12 montrent les spectres UV et Raman d'une solution de spironolactone à 1 mg/mL dans du méthanol, obtenus par le QC-Prep+.

En UV, la spironolactone présente un maximum d'absorption à environ 238 nm, ce qui correspond aux données existantes dans la littérature³⁷.

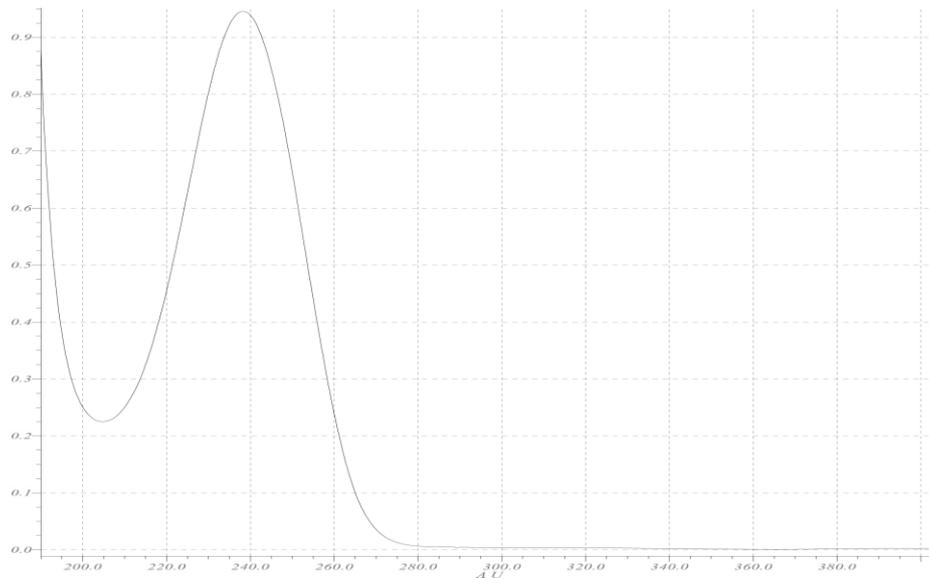


Figure 11 : Spectre UV de la Spironolactone à 1mg/mL (dilution méthanol)

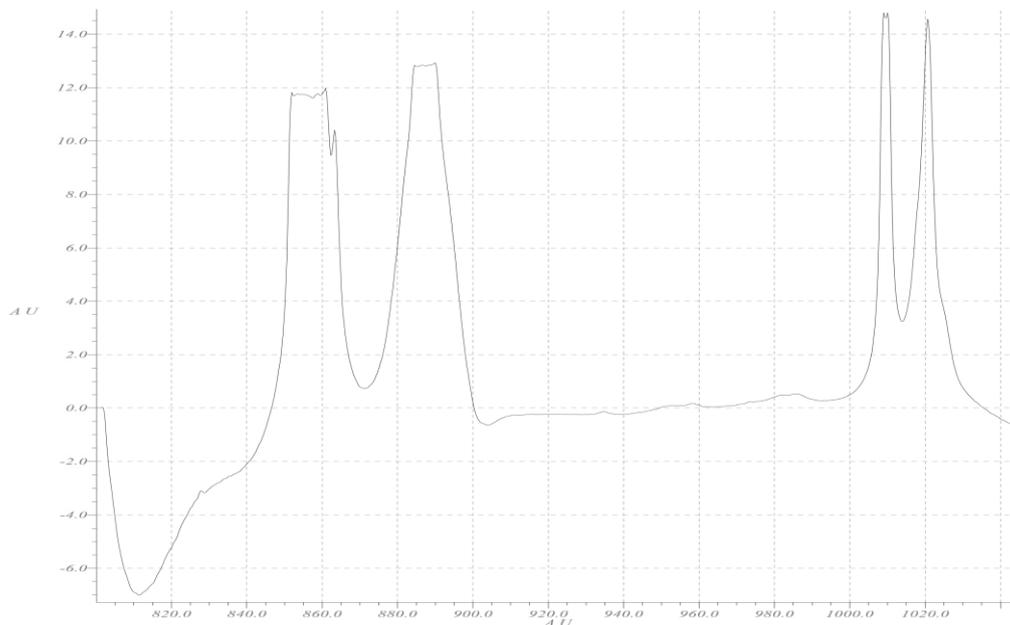


Figure 12 : Spectre Raman de la Spironolactone à 1mg/mL (dilution méthanol)

1.3. Analyse des spectres UV des vecteurs de suspension buvable

Les spectres des vecteurs de suspension buvable obtenus après analyse UV/Raman par le QC-Prep+ sont présentés dans les Annexe 1 Annexe 8.

Seul le Syrspend® Dry ne présente pas d'absorbance en UV. Tous les autres vecteurs présentent un pic d'absorbance dans le domaine UV. Ainsi, l'Inorpha® possède un pic entre 250 et 255 nm, le Syrspend® SF PH4 entre 225 et 230 nm et pour le mélange OP/OS® entre 250 et 260 nm.

Dilués au 1/100^{ème} dans le méthanol, on peut voir qu'une absorbance résiduelle persiste mais qu'elle est particulièrement faible avec une valeur inférieure à 0,1 pour l'Inorpha et inférieur à 0,05 pour le Syrspend® SF PH4 et le mélange OP/OS®.

Pour une dilution au 1/10^{ème}, l'absorbance de ces vecteurs est beaucoup plus importante, notamment pour l'Inorpha® qui possède une absorbance de 1. Pour le Syrspend® SF PH4 et le mélange OP/OS®, les valeurs d'absorbance sont respectivement de 0,08 et de 0,4.

Les différents vecteurs de suspension présentent des profils d'absorption en UV très différents. Si le Syrspend® SF PH4 a un profil relativement peu absorbant voire pas absorbant du tout pour le Syrspend® dry, l'Inorpha® et le mélange OP/OS® ont des profils beaucoup plus visibles en spectroscopie UV.

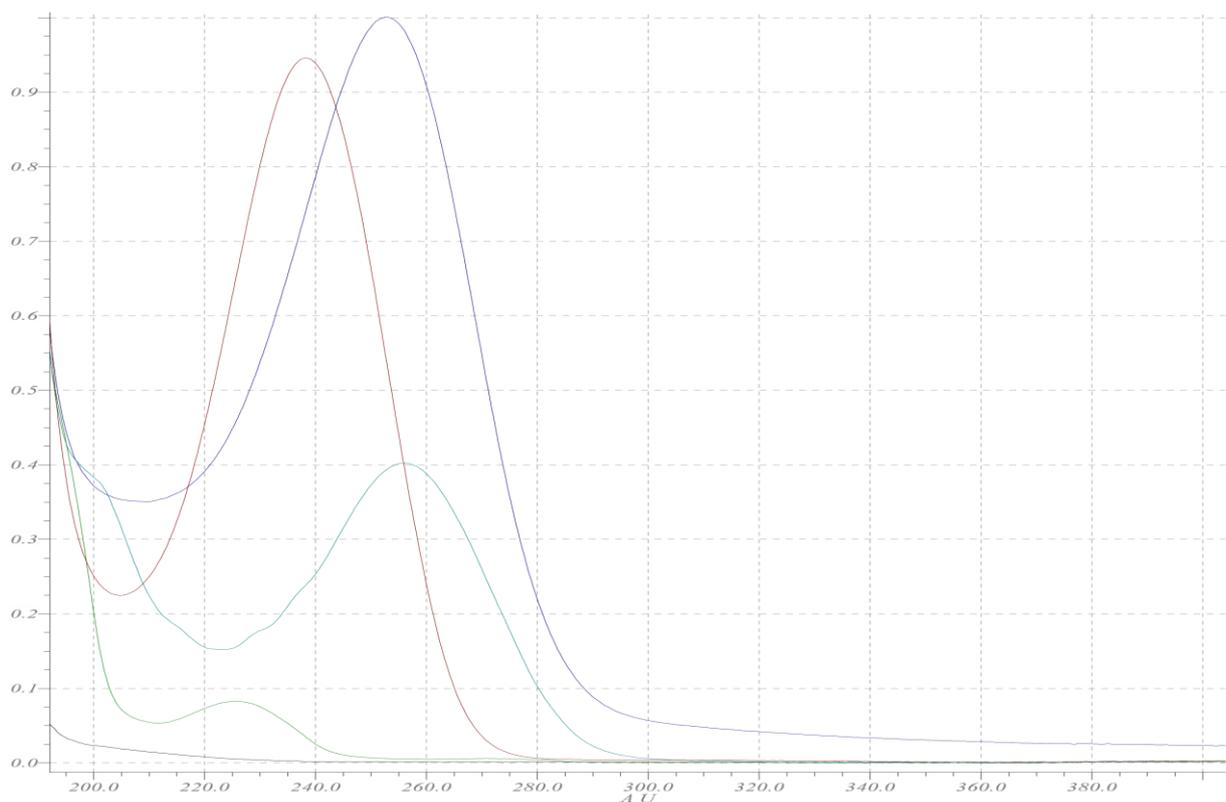


Figure 13 : Spectres UV superposés de la Spironolactone et des vecteurs de suspension buvable

La Figure 13 montre la superposition du spectre de la Spironolactone à 1 mg/mL dans du méthanol (en rouge) avec celui des 4 vecteurs de suspension testés (Inorpha® en bleu, mélange OP/OS® en turquoise, Syrspend® SF PH4 en vert et Syrspend® dry en noir). Dans tous les cas, les pics d'absorption ne se superposent pas mais sont parfois proches, notamment avec l'Inorpha®.

2. Validation de la méthode de dosage

2.1. Calibration

2.1.a. Spironolactone seule

La courbe d'étalonnage obtenue pour la Spironolactone seule est représentée dans la Figure 14.

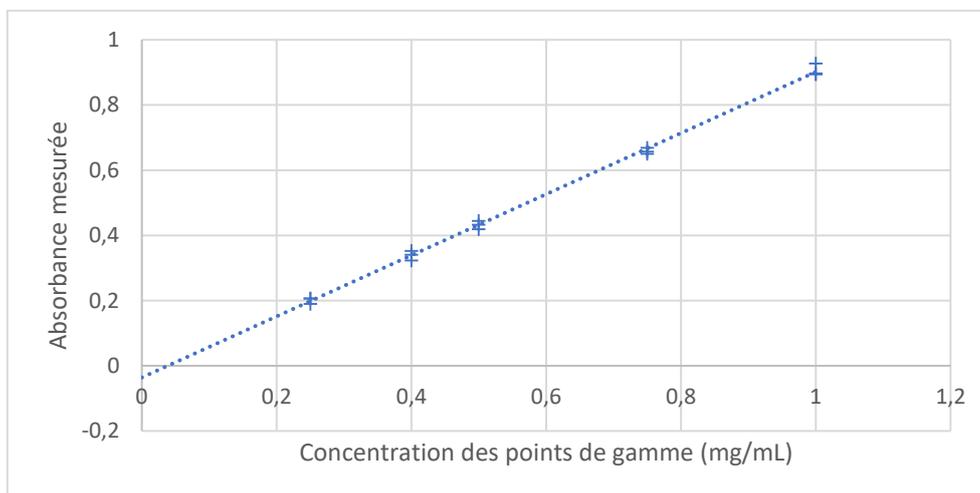


Figure 14 : Etalonnage de la Spironolactone dans le méthanol

Le coefficient de corrélation R^2 de la droite d'étalonnage est de $0,9978 \pm 1,59 \cdot 10^{-4}$.

La valeur a de la pente est de $0,937 \pm 1,5 \cdot 10^{-4}$ et la valeur b de l'ordonnée à l'origine est de $-0,036 \pm 6,16 \cdot 10^{-6}$.

L'équation de la droite d'étalonnage est donc :

$$y = 0,937 \times x - 0,036$$

Pour l'ensemble des points de calibration, les résidus calculés étaient inférieurs à 4,17%, avec une moyenne de 0,12%.

2.1.b. Inorpha®

La courbe d'étalonnage obtenue pour l'Inorpha® est représentée dans la Figure 15.

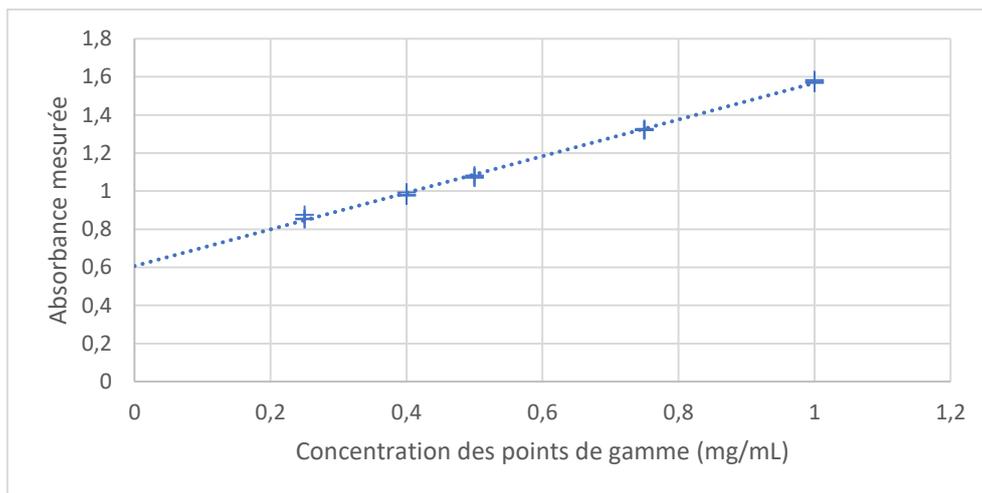


Figure 15 : Etalonnage de la Spironolactone dans l'Inorpha®

Le coefficient de corrélation R^2 de la droite est de $0,9977 \pm 1,71 \cdot 10^{-4}$.

La valeur a de la pente est de $0,961 \pm 1,61 \cdot 10^{-4}$ et la valeur b de l'ordonnée à l'origine est de $0,607 \pm 6,57 \cdot 10^{-5}$.

L'équation de la courbe d'étalonnage est donc :

$$y = 0,961 \times x + 0,607$$

Pour l'ensemble des points de calibration, les biais observés étaient inférieurs à 12,58%, avec une moyenne de 0,44%.

2.1.c. Mélange OraPlus®/OraSweet®

La courbe d'étalonnage obtenue pour le mélange OraPlus®/OraSweet® est représentée dans la Figure 16.

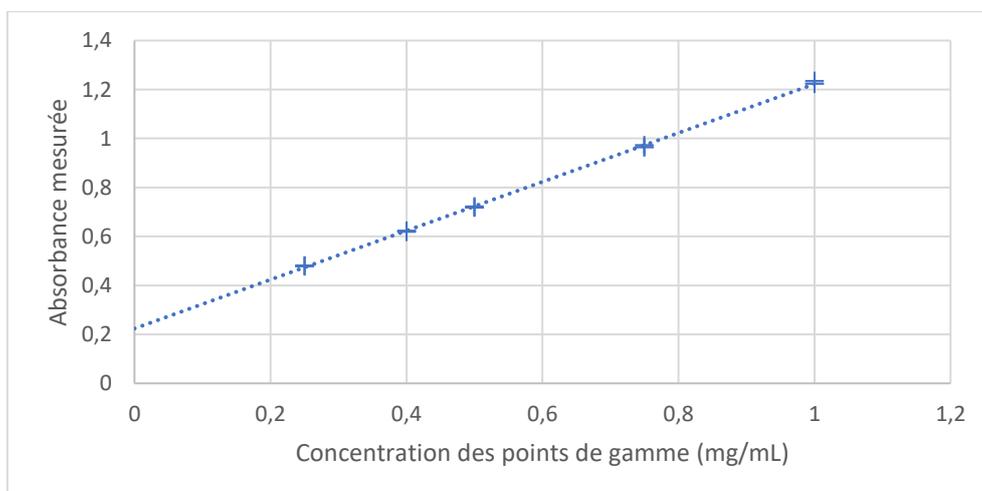


Figure 16 : Etalonnage de la Spironolactone dans le mélange OraPlus®/OraSweet®

Le coefficient de corrélation R^2 de la droite est de $0,9995 \pm 3,94.10^{-5}$.

La valeur a de la pente est de $0,9987 \pm 3,72.10^{-5}$ et la valeur b de l'ordonnée à l'origine est de $0,2239 \pm 1,52.10^{-5}$.

L'équation de la courbe d'étalonnage est donc :

$$y = 0,9987 \times x + 0,2239$$

Pour l'ensemble des points de calibration, les biais observés étaient inférieurs à 3,27% avec une moyenne de 0,19%.

2.1.d. Syrspend® Dry

La courbe d'étalonnage obtenue pour le Syrspend® Dry est représentée dans la Figure 17.

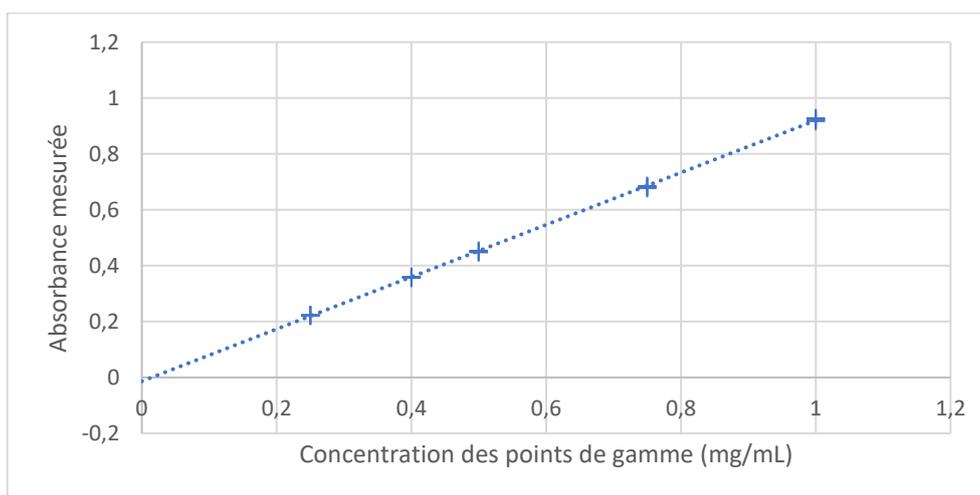


Figure 17 : Etalonnage de la Spironolactone dans le Syrspend Dry

Le coefficient de corrélation R^2 de la droite est de $0,9997 \pm 1,89.10^{-5}$.

La valeur a de la pente est de $0,9332 \pm 1,78.10^{-5}$ et la valeur b de l'ordonnée à l'origine est de $-0,0134 \pm 7,29.10^{-6}$.

L'équation de la courbe d'étalonnage est donc :

$$y = 0,9332 \times x - 0,0134$$

Pour l'ensemble des points de calibration, les biais observés étaient inférieurs à 1,95% avec une moyenne de 0,11%.

2.1.e. Syrspend® SF PH4

La courbe d'étalonnage obtenue pour le Syrspend® SF PH4 est représentée dans la Figure 18.

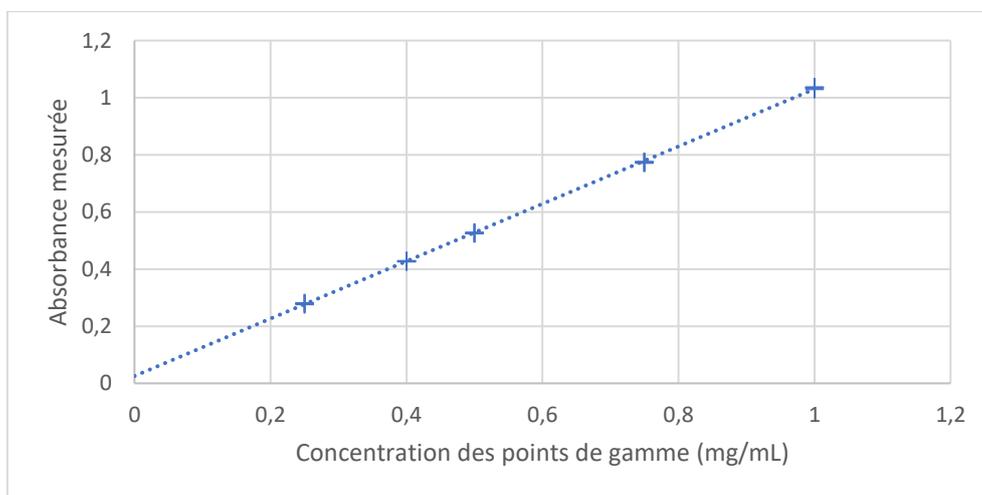


Figure 18 : Etalonnage de la Spironolactone dans le Syrspend

Le coefficient de corrélation R^2 de la droite est de $0,9998 \pm 1,59.10^{-5}$.

La valeur a de la pente est de $1,004 \pm 1,50.10^{-5}$ et la valeur b de l'ordonnée à l'origine est de $0,025 \pm 6,13.10^{-6}$.

L'équation de la courbe d'étalonnage est donc :

$$y = 1,004 \times x + 0,025$$

Pour l'ensemble des points de calibration, les biais observés étaient inférieurs à 1,93% avec une moyenne de 0,10%.

L'ensemble des données traitées pour l'analyse de la linéarité sont regroupées dans le tableau suivant (Tableau 6) :

Tableau 6 : Résumé des critères de validation de la linéarité

Vecteur de suspension utilisé	Coefficient de corrélation R^2	Pente a	Ordonnée à l'origine b
Méthanol	0,9978	0,937	-0,036
Inorpha®	0,9977	0,9961	0,607
OraPlus®/OraSweet®	0,9987	0,9987	0,2239
Syrspend® Dry	0,9997	0,9332	-0,0134
Syrspend® SF PH4	0,9998	1,004	0,025

2.1.f. Evaluation de l'effet matrice

Les pentes obtenues avec l'Inorpha® et le Syrspend® Dry ne sont pas statistiquement différents de celle obtenue dans le méthanol ($p = 0,275$ & $0,675$ respectivement). En revanche, les pentes obtenues avec le mélange OP/OS® et le Syrspend® SF PH4 l'étaient ($p < 0,007$).

Les ordonnées à l'origine étaient significativement différentes pour tous les véhicules ($p < 0,001$) sauf pour le Syrspend® Dry ($p = 0,049$).

2.2. Détermination de la précision

2.2.a. Répétabilité

Les résultats obtenus lors de l'étude de la répétabilité sont présentés dans les tableaux suivants.

Tableau 7 : Evaluation de la répétabilité avec l'Inorpha®

	QCB	QCI	QCH
Concentration théorique (mg/mL)	0,25	0,5	1,0
Moyenne (mg/mL)	0,253	0,514	0,996
Ecart-type (mg/mL)	0,024	0,007	0,009
CV (%)	9,415	1,295	0,929
IC 95%	[3,38 ; 14,80]	[-0,36 ; 2,95]	[-1,37 ; 3,23]

Tableau 8 : Evaluation de la répétabilité avec le mélange OraPlus®/OraSweet®

	QCB	QCI	QCH
Concentration théorique (mg/mL)	0,25	0,5	1,0
Moyenne (mg/mL)	0,240	0,508	1,016
Ecart-type (mg/mL)	0,002	0,005	0,011
CV (%)	0,847	1,054	1,072
IC 95%	[0,34 ; 1,35]	[-0,28 ; 2,39]	[-1,64 ; 3,78]

Tableau 9 : Evaluation de la répétabilité avec le Syrspend® Dry

	QCB	QCI	QCH
Concentration théorique (mg/mL)	0,25	0,5	1
Moyenne (mg/mL)	0,250	0,517	1,032
Ecart-type (mg/mL)	0,003	0,001	0,009
CV (%)	1,333	0,290	0,932
IC 95%	[0,50 ; 2,16]	[-0,08 ; 0,66]	[-1,46 ; 3,32]

Tableau 10 : Evaluation de la répétabilité avec le Syrspend® SF PH4

	QCB	QCI	QCH
Concentration théorique (mg/mL)	0,25	0,5	1
Moyenne (mg/mL)	0,254	0,501	0,989
Ecart-type (mg/mL)	0,002	0,005	0,008
CV (%)	0,860	0,985	0,831
IC 95%	[0,32 ; 1,40]	[-0,24 ; 2,21]	[-1,21 ; 2,88]

Dans tous les cas, les coefficients de variations obtenus sont inférieurs à 9,4%.

2.2.b. Précision intermédiaire

Les résultats obtenus pour l'étude de la fidélité intermédiaire sont présentés dans les tableaux suivants :

Tableau 11 : Evaluation de la précision intermédiaire avec l'Inorpha®

	QCB	QCI	QCH
Concentration théorique (mg/mL)	0,25	0,5	1
Moyenne (mg/mL)	0,241	0,502	0,991
Ecart-type (mg/mL)	0,016	0,012	0,022
CV (%)	2,248	2,455	6,731
IC 95%	[1,00 ; 3,49]	[1,51 ; 3,40]	[5,02 ; 8,44]

Tableau 12 : Evaluation de la précision intermédiaire avec le mélange OraPlus®/OraSweet®

	QCB	QCI	QCH
Concentration théorique (mg/mL)	0,25	0,5	1
Moyenne (mg/mL)	0,248	0,507	1,011
Ecart-type (mg/mL)	0,007	0,004	0,019
CV (%)	1,904	0,823	3,031
IC 95%	[1,33 ; 2,48]	[0,50 ; 1,14]	[1,55 ; 4,51]

Tableau 13 : Evaluation de la précision intermédiaire avec le Syrspend® Dry

	QCB	QCI	QCH
Concentration théorique (mg/mL)	0,25	0,5	1
Moyenne (mg/mL)	0,252	0,519	1,024
Ecart-type (mg/mL)	0,003	0,012	0,021
CV (%)	2,096	2,342	1,195
IC 95%	[1,86 ; 2,33]	[1,41 ; 3,28]	[-0,45 ; 2,85]

Tableau 14 : Evaluation de la précision intermédiaire avec le Syrspend® SF PH4

	QCB	QCI	QCH
Concentration théorique (mg/mL)	0,25	0,5	1
Moyenne (mg/mL)	0,248	0,494	1,002
Ecart-type (mg/mL)	0,013	0,008	0,014
CV (%)	1,426	1,711	5,348
IC 95%	[0,41 ; 2,45]	[1,06 ; 2,36]	[4,25 ; 6,45]

Comme pour la répétabilité, l'ensemble des coefficients de variations sont inférieurs à 6,7%.

2.3. Détermination de la justesse

Les résultats obtenus pour l'étude de la justesse sont présentés dans les tableaux suivants.

Tableau 15 : Evaluation de justesse avec l'Inorpha®

	Concentration (mg/mL)	% R Moyen +/- EC	IC 95%
QCB	0,25	96,31 ± 6,48	[92,08 ; 100,55]
QCI	0,5	100,51 ± 2,47	[98,90 ; 102,12]
QCH	1	99,15 ± 2,23	[97,70 ; 100,61]

Tableau 16 : Evaluation de justesse avec le mélange OraPlus®/OraSweet®

	Concentration (mg/mL)	% R Moyen +/- EC	IC 95%
QCB	0,25	99,07 ± 3,00	[97,10 ; 101,03]
QCI	0,5	101,38 ± 0,83	[100,83 ; 101,92]
QCH	1	101,15 ± 1,92	[99,89 ; 102,41]

Tableau 17 : Evaluation de justesse avec le Syrspend® Dry

	Concentration (mg/mL)	% R Moyen +/- EC	IC 95%
QCB	0,25	100,98 ± 1,21	[100,19 ; 101,77]
QCI	0,5	103,91 ± 2,43	[102,32 ; 105,50]
QCH	1	102,40 ± 2,15	[101,00 ; 103,80]

Tableau 18 : Evaluation de justesse avec le Syrspend® SF PH4

	Concentration (mg/mL)	% R Moyen +/- EC	IC 95%
QCB	0,25	99,30 ± 5,31	[95,83 ; 102,77]
QCI	0,5	98,85 ± 1,69	[97,75 ; 99,96]
QCH	1	100,25 ± 1,43	[99,32 ; 101,19]

3. Sélectivité de la méthode

Pour les échantillons d'hydrochlorothiazide et de phénytoïne, le QC-Prep+ n'est pas capable d'identifier un principe actif, quel que soit le vecteur de suspension utilisé.

Pour les échantillons de Dexaméthasone, la molécule identifiée est la spironolactone avec des pourcentages de reconnaissance inférieurs à 90% de similitude.

III. Discussion

1. Analyse préliminaire

L'analyse par spectrométrie UV des vecteurs de suspension buvable sans principe actif montre la présence d'une absorption pour tous les vecteurs, sauf pour le Syrspend® Dry. Néanmoins, les profils d'absorption sont relativement différents puisque si le Syrspend® SF PH4 a un profil relativement peu absorbant, l'Inorpha® et le mélange OP/OS® ont des profils beaucoup plus visibles en spectroscopie UV.

Si on s'intéresse de plus près à la composition excipiendaire de ces vecteurs, on constate que deux composés présentent un profil d'absorbance correspondant à ce qui est décrit dans la littérature. En effet, l'Inorpha® et le mélange OP/OS® ont tout deux un pic d'absorbance à la même longueur d'onde (250-255 nm) et leur formule possède un élément commun : le sorbate de potassium. Or, d'après les données disponibles, cet élément présente un pic d'absorption en UV à 254 nm³⁸. Le Syrspend® SF PH4 contient du benzoate de sodium dont le pic d'absorbance se trouve à 225 nm³⁸. Or, le spectre UV du Syrspend® SF PH4 présente un pic d'absorbance dans la même région spectrale. Enfin, le Syrspend® Dry, qui ne contient aucuns composés absorbant dans l'UV, présente un spectre sans pic d'absorption.

Etant donné la superposition des pics d'absorption, nous pouvons donc conclure que l'absorbance UV de ces vecteurs de suspension est essentiellement due à la présence de ces excipients conservateurs.

En plus de la présence de ces composés et de l'absorption UV qui en résulte, il est également intéressant de regarder l'intensité des pics obtenus lors de l'analyse des échantillons de vecteurs de suspension dilués au 1/10^e. Ainsi, le Syrspend® SF PH4, bien qu'il contienne du benzoate de sodium, présente une absorbance relativement faible, de l'ordre de 0,1 en densité optique. En revanche, l'Inorpha® et le mélange OP/OS® ont une absorbance plus importante, de l'ordre de 1 et de 0,4 respectivement.

Cette différence d'absorption est susceptible d'entraîner la présence d'un effet matrice lors des étalonnages.

De plus, si l'on compare le spectre obtenu avec de la spironolactone dans du méthanol et ceux obtenus avec de la spironolactone dans les vecteurs de suspension, on constate un décalage de la longueur d'onde du maximum d'absorption en fonction du vecteur de suspension utilisé. Cela correspond à la superposition des maximums d'absorbance de la spironolactone et de l'excipient absorbant (Annexe 9).

En utilisation classique, le QC-Prep+ est utilisé pour identifier et doser des principes actifs dissous dans des excipients simples tels que le glucose, le chlorure de sodium ou encore l'eau pour préparations injectables. Dans ce cas, seule la molécule d'intérêt présente une absorption dans le domaine spectral UV. Dans notre étude, les excipients utilisés apportent une absorbance supplémentaire à celle du principe actif. Elle devra donc être prise en compte dans la mise au point de la méthode de dosage afin de garantir la spécificité et l'exactitude de la méthode. En effet, le QC-Prep+ permet :

- De réaliser une identification du principe actif de la préparation, ainsi que de l'excipient ;
- De déterminer la quantité de principe actif dans la préparation.

La bonne réalisation de ces deux objectifs est soumise à deux conditions :

- L'étalonnage doit être linéaire ;
- Les bibliothèques spectrales correspondant au principe actif et à l'excipient doivent être correctement renseignées.

Lors de l'étalonnage, le logiciel QL Analyst du QC-Prep+ choisira une longueur d'onde pour laquelle l'appareil mesurera l'absorbance afin de calculer les paramètres de la droite d'étalonnage (pente, ordonnée à l'origine, coefficient de corrélation). Ce choix se fait en fonction du rapport performance/déviations mais l'utilisateur garde la possibilité de choisir librement la longueur d'onde utilisée.

Aussi, il est possible de choisir cette valeur en fonction de l'absorbance du principe actif et de l'excipient pour se placer dans une zone spectrale où l'excipient n'absorbe pas. Néanmoins, il se peut que ces pics d'absorbance soient proches et qu'il ne soit pas possible d'appliquer cette méthode. C'est le cas dans notre étude puisque la spironolactone absorbe à 238 nm, le sorbate de potassium à 254 nm et le benzoate de sodium à 225 nm.

De plus, lors du dosage d'une suspension buvable de spironolactone, la teneur en excipients restera constante quelle que soit la concentration en principe actif de la préparation. Dans ce cas, la partie du spectre UV correspondant à l'excipient restera constante. Il est donc primordial de conserver une quantité d'excipients constante quel que soit le point de la gamme de calibration.

Or, en utilisant la fonction automatisée de calibration du QC-Prep+, l'appareil réalise automatiquement ces dilutions à partir d'une solution-mère et d'un diluant. Si la solution-mère contient le principe actif d'intérêt ainsi que les excipients, ce n'est pas le cas du diluant (méthanol uniquement). Il y aura donc une diminution du taux d'excipients au fur et à mesure des dilutions, ce qui influera sur l'identification et la quantification lors de l'utilisation de l'appareil.

Pour pallier cet effet, deux solutions existent :

- Changer le mode de fabrication des points d'étalonnage en réalisant une préparation indépendante de chaque point de gamme. Cela revient à ne pas utiliser le mode automatique pour la calibration du QC-Prep+ ;
- Modifier le diluant utilisé par le QC-Prep+ en y ajoutant la quantité d'excipient normalement contenue dans le vecteur de suspension.

La première solution nous a semblé difficile à mettre en œuvre car elle aurait nécessité la préparation d'au moins six suspensions buvables par gamme, pour chaque vecteur testé (cinq points de concentration + un blanc). En tout, ce sont au moins 72

suspensions buvables qui auraient dû être fabriquées, ce qui aurait nécessité une forte mobilisation en temps et en personnel, ainsi qu'un risque accru d'erreurs de manipulation.

Il nous a ainsi semblé plus aisé d'appliquer la deuxième solution, c'est-à-dire la modification du diluant utilisé par le QC-Prep+. C'est pourquoi nous avons réalisé un extrait méthanolique des vecteurs de suspension buvable en tant que diluant pour les gammes de calibrations.

Cette méthode permet de conserver une quantité d'excipients constante quel que soit le point de gamme.

L'analyse préliminaire montre ainsi que la présence d'excipients absorbants dans les vecteurs de suspension buvable est un élément à prendre en compte dans la mise au point de la validation de méthode et notamment pour la réalisation de la calibration. Elle montre également qu'il n'est pas possible d'analyser un échantillon de suspension buvable pur. Une dilution est nécessaire pour pouvoir réaliser l'analyse dans de bonnes conditions.

Cette étape est donc indispensable avant toute étude de linéarité, de justesse ou de précision.

2. Exactitude de la méthode

La guideline de l'ICH donne des recommandations pour valider une méthode en se basant sur l'étude de plusieurs critères : justesse, précision, linéarité... Néanmoins, il n'est pas proposé de méthodes d'analyses des résultats obtenus pour ces critères, dont seuls les définitions et les modes de calculs sont proposés. En suivant strictement ces recommandations, on s'aperçoit que la méthodologie de validation proposée par l'ICH repose uniquement sur le calcul de ces critères d'analyse et non pas sur la validation de ces critères. Il revient donc à la personne développant la méthode de fixer les seuils d'acceptabilité pour ces critères de performance³⁹.

D'autres organismes, tels que la FDA, l'IUPAC ou encore la SFSTP, sont plus précis et donnent des seuils d'acceptabilité concernant la validation de ces critères^{40,41}. Par exemple, pour l'EMA, on considèrera comme juste une méthode dont les déviations sur les points de contrôles sont inférieures à 15%³⁴. Néanmoins, les méthodologies

proposées par ces organismes présentent parfois de grandes différences^{39,42}. Aussi, nous avons choisi de suivre les recommandations données par la FDA sur l'analyse de ces critères car concernant la démarche de validation, la méthodologie de la FDA est la plus proche de celle de l'ICH. Les seuils d'acceptabilité sont présentés dans le Tableau 19 :

Tableau 19 : Seuils d'acceptabilité des critères d'analyse d'une validation de méthode analytiques, selon la FDA³³

Critère	Seuils d'acceptabilité
Linéarité	<ul style="list-style-type: none"> - Déviation inférieure à 15% sur les points de la gamme et 20% à la LLOQ - Minimum de 75% des points de gamme corrects pour valider une série
Justesse	- Déviation inférieure à 15% ou 20% à la LLOQ
Précision	- Déviation inférieure à 15% ou 20% à la LLOQ

Contrairement à une analyse HPLC-UV classique, le QC-Prep+ ne nécessite pas de réaliser un étalonnage avant chaque analyse. En effet, l'appareil est « standardisé » par analyse journalière d'une solution de référence dont l'évaluation permet de vérifier l'absence de dérive des appareils de mesure dans le temps. La normalisation du système ainsi que les différents tests de contrôle permettent également de s'assurer de cette absence de dérive. Aussi, il n'aurait pas été nécessaire de réaliser trois étalonnages consécutifs. Un seul aurait été suffisant puisque l'analyse de la solution de référence supprime le risque de dérives de l'appareil tandis que l'automatisation de la réalisation de la gamme supprime les erreurs aléatoires. Néanmoins, afin d'être au plus proche des recommandations et pour obtenir un plus grand nombre de points, nous avons tout de même choisi de réaliser trois gammes de calibration consécutives.

Si l'utilisation de la fonction automatisée de calibration du QC-Prep+ permet de diminuer le risque d'erreur dans la préparation des points de gamme, elle présente toutefois l'inconvénient de ne pas pouvoir choisir précisément les concentrations de chaque point de gamme. En effet, l'utilisateur peut uniquement définir celle de la solution-mère du principe actif. Les dilutions sont ensuite automatiquement réalisées suivant un schéma prédéfini par le logiciel. Il est uniquement possible de choisir quelles sont les concentrations à utiliser pour la calibration mais pas de les modifier.

En raison de cette limitation, il n'a pas été possible de respecter strictement les recommandations ICH sur l'intervalle de dosage, c'est-à-dire 80 à 120% de la concentration-cible (soit 4 à 6 mg/mL, pour une concentration-cible de 5 mg/mL). Pour notre étude, l'intervalle a donc été plus large : de 50 à 200% (soit 2,5 à 10 mg/mL). Néanmoins, cette limitation est uniquement théorique. En effet, la validation de la méthode sur un intervalle de concentrations plus large nous permettra de doser une gamme de concentrations plus grande et ainsi de proposer plus facilement de nouvelles concentrations de spironolactone en suspension buvable.

Concernant l'étude de la linéarité en elle-même, les coefficients de corrélation obtenues sont supérieurs à 0,997, quel que le soit le vecteur de suspension utilisé. De plus, l'évaluation des pourcentages de déviation des points de calibration montre qu'ils sont tous inférieurs à 12,58%. Ainsi, en se basant sur la méthodologie de la FDA, on peut estimer que la méthode est linéaire pour les quatre vecteurs de suspension, dans un intervalle de dosage compris entre 2,5 et 10 mg/mL.

La comparaison des valeurs obtenues pour la spironolactone seule et celles obtenues pour les vecteurs de suspension montre la présence d'un effet matrice pour trois des vecteurs. Deux présentent des différences au niveau de la pente et de l'ordonnée à l'origine, d'où un effet matrice complexe (Syrspend® SF PH4 et OraPlus®/OraSweet®) tandis qu'un présente un effet matrice simple avec uniquement une modification de l'ordonnée à l'origine (Inorpha®). Le Syrspend® ne présente aucun effet matrice. Ces différences sont représentées dans la Figure 19.

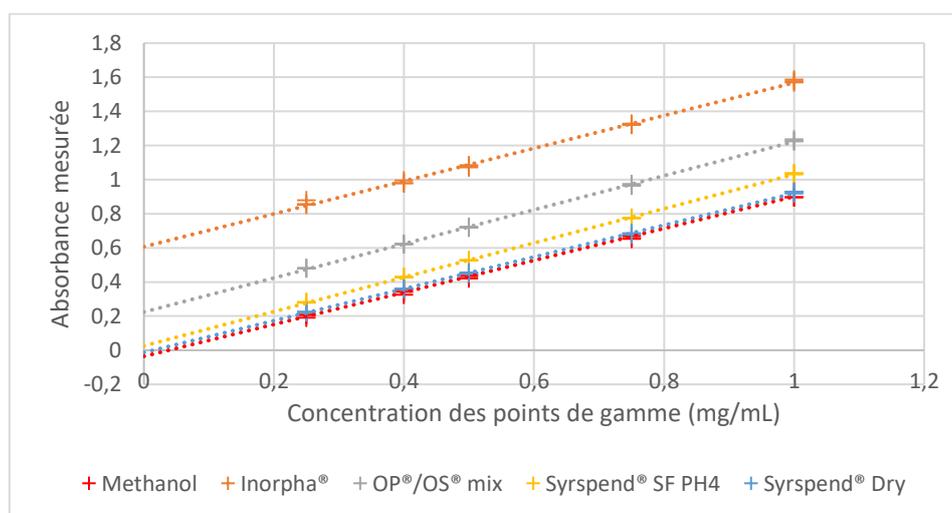


Figure 19 : Droites d'étalonnage de la spironolactone seule ou en suspension buvable

La matrice correspond à l'ensemble des constituants d'un échantillon mis à part le principe actif d'intérêt. Ici, ces constituants sont nombreux (voir Tableau 3) et l'analyse préliminaire a montré une absorbance dans le spectre UV. La présence d'un effet matrice confirme que la présence de ces excipients influe sur la méthode de dosage et que l'utilisation d'un extrait méthanolique contenant les excipients était nécessaire pour réaliser les gammes de calibration.

Toutefois, l'absence d'effet matrice pour le Syrspend® Dry indique que la calibration et l'étude de la linéarité pourrait se faire uniquement en utilisant une gamme dont la solution-mère de départ serait une solution de spironolactone simple.

Néanmoins, un des objectifs d'utilisation du QC-Prep+ est de pouvoir détecter également le vecteur de suspension utilisé. Or, les spectres obtenus par une solution simple de spironolactone et ceux obtenus avec des suspensions dans un vecteur sont différents. Le QC-Prep+ utilisant une méthode comparative à partir d'une bibliothèque spectrale pour reconnaître le principe actif et le vecteur, il est nécessaire de réaliser la calibration en utilisant un diluant contenant les excipients des vecteurs de suspension pour permettre leur reconnaissance.

L'effet matrice et le mode d'identification de l'appareil valident donc notre choix de réaliser un extrait méthanolique de chaque vecteur pour la réalisation de la calibration.

Concernant la précision, elle a été évaluée à 2 niveaux : répétabilité et précision intermédiaire. L'ICH ou la FDA donnent la plupart de leurs définitions, modes de calcul et seuils d'acceptation des critères de performance pour la notion de répétabilité. Pour la précision intermédiaire, il est simplement indiqué de faire varier une condition de manipulation intra-laboratoire (jour, manipulateur, réactif...). Devant l'impossibilité de changer d'instrument ou de réactifs, nous avons uniquement fait varier les paramètres jours et utilisateurs.

Conformément aux guidelines utilisées, la précision a été évaluée sur un intervalle de dosage établi lors de l'étude de linéarité (2,5 à 10 mg/mL pour les quatre vecteurs de suspension buvable). Concernant la répétabilité, l'ensemble des coefficients de variation calculés sont inférieurs au seuil de 15%. Mis à part le CQB de l'Inorpha (9,41%), ils sont même tous inférieurs à 1,5%. Quel que soit le vecteur de suspension buvable utilisé, on peut donc affirmer que la méthode de dosage est répétable.

En ce qui concerne la précision intermédiaire, elle a été étudiée de la même façon que la répétabilité (contrôles qualité, modes de calculs, seuils d'acceptabilité identiques) sur trois journées. L'ensemble des coefficients de variation obtenus sont inférieurs au seuil de 15%. Les contrôles qualité respectent donc le critère de performance fixé. Aussi, nous pouvons affirmer que la méthode a une bonne précision intermédiaire.

Etant donné que la répétabilité et la précision intermédiaire ont été démontrés, on peut ainsi considérer la méthode comme précise, quel que soit le vecteur de suspension buvable utilisé.

Pour la justesse, les taux de recouvrement ont été calculés en reprenant l'ensemble des valeurs obtenues pour les contrôles qualité utilisés lors de l'étude de la précision. L'ensemble des taux calculés ainsi que leurs intervalles de confiance respectaient le critère de performance fixé, c'est-à-dire 85% à 115% de la valeur cible. On peut ainsi affirmer que la méthode de dosage est juste, quel que soit le vecteur de suspension buvable utilisé.

Nous pouvons donc affirmer que la méthode est linéaire et exacte car précise et juste.

Il existe dans la littérature quelques références concernant l'étude de stabilité de suspensions buvables et qui décrivent la méthode de dosage associée^{43,44}. Toutes utilisent la spectroscopie UV associée à la chromatographie liquide comme technique analytique. Cette dernière fait intervenir un procédé de séparation permettant de distinguer principe actif et excipients en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques. La spectrométrie UV est donc utilisée comme une méthode indirecte, intervenant après la séparation des différents composés du mélange.

Par exemple, dans une étude de 2015⁴⁴, les auteurs ont étudié la stabilité de plusieurs principes actifs, dont la spironolactone, dans le Syrspend® SF PH4. La technique d'identification et de dosage a été la spectroscopie UV associée à l'HPLC. Si l'on s'intéresse à leur validation de méthode de dosage, on s'aperçoit que les critères de performances de leur étude sont proches de ce que nous avons obtenus dans le même vecteur de suspension.

Ainsi, le coefficient de corrélation était de 1, le coefficient de variation moyen de 0,86% et le taux de recouvrement moyen de 98,6%.

Dans notre unité, la méthode de référence pour le dosage de nos préparations hospitalières de spironolactone (véhicule utilisé : mélange OraPlus®/OraSweet® 1:1, v:v) est l'HPLC associée à une détection UV à 238 nm. Lors de la validation de méthode, les critères de performance correspondaient également avec les données retrouvées avec le QC-Prep+ (*données non publiées*). Ainsi, le coefficient de corrélation était de 0,991, le coefficient de variation moyen de 1,81% et le taux de recouvrement moyen de 98,2%.

Notre méthode de dosage basée sur la spectrométrie combinée UV/Raman directe présente donc des critères de performance équivalents à ceux rencontrés dans les méthodes utilisant une technique analytique classique telle l'HPLC-UV.

Concernant la sélectivité de l'analyse, seule la dexaméthasone est confondue avec la spironolactone. Néanmoins, le pourcentage de reconnaissance associé au résultat permet d'identifier immédiatement que la molécule reconnue n'est pas celle présente dans l'échantillon, permettant ainsi de rendre un résultat non-conforme. Cela démontre la nécessité de vérifier que le pourcentage de reconnaissance est suffisamment haut afin de s'assurer que la molécule identifiée est la bonne. Il faudra également poursuivre l'étude de la sélectivité en ajoutant à la base spectrale du logiciel les spectres des trois autres molécules testées et réanalyser les résultats obtenus pour vérifier la bonne reconnaissance par le logiciel.

3. Avantages et limites à l'utilisation du QC-Prep+

Beaucoup des avantages et des inconvénients de l'utilisation du QC-Prep+ ont été déjà évoqués dans les parties précédentes.

La principale limite à l'utilisation du QC-Prep+ pour l'identification et le dosage de principes actifs inclus dans des excipients complexes est l'absence de procédé de séparation. En effet, si l'un des excipients comporte une absorbance dans le domaine UV, cette dernière peut se superposer avec le spectre UV du principe actif d'intérêt et interférer avec sa mesure. Cette interférence a été démontrée par la présence d'un effet matrice avec trois des vecteurs de suspension buvable. Toutefois, nous avons également montré que cela n'était pas un inconvénient majeur et qu'il suffisait de modifier le diluant de calibration pour éviter cette interférence.

En revanche, nous n'avons pas étudié le cas de principes actifs pour lesquels la longueur d'onde du maximum d'absorption serait strictement identique à celle d'un des excipients, ce qui pourrait être un frein potentiel pour l'identification et la quantification.

Un autre inconvénient associé est qu'il pourrait ne pas être possible d'utiliser le QC-Prep+ pour réaliser des études de stabilité. En effet, si on se réfère aux recommandations existantes pour la réalisation de ces études, deux conditions sont nécessaires. Il faut que la méthode analytique puisse :

- Identifier et quantifier le principe actif concerné pour en suivre l'évolution dans le temps ;
- Suivre l'apparition d'éventuels produits de dégradation dans le temps et d'en faire une analyse semi-quantitative.

On parle alors dans ce cas de méthode « indicatrice de stabilité »³⁵.

Or, si la première condition est réalisée, nous n'avons pas étudié la possibilité de répondre à la deuxième. En outre, l'absence de procédé séparatif pourrait empêcher la détection d'éventuels produits de dégradation, notamment si ceux-ci présentent les mêmes caractéristiques spectrales que le principe actif d'intérêt.

Un autre inconvénient est l'obligation de diluer les suspensions buvables pour pouvoir les doser. En effet, cela introduit un risque d'erreur de manipulation et donc d'obtenir un dosage qui ne reflète pas la réalité.

Comparativement à la méthode standard pour le dosage des suspensions buvables (HPLC) utilisée dans notre laboratoire de contrôle, il y a tout de même une diminution des manipulations nécessaires à la réalisation de l'analyse. Aussi, si le risque d'erreur n'est pas totalement supprimé, il est fortement réduit.

Enfin, le principe de fonctionnement du QC-Prep+ entraîne l'absence d'étalonnage à chaque analyse. Si cela constitue un gain de temps et donc un avantage, cela peut aussi être une limite car la réalisation de la gamme de calibration servant à la réalisation de l'étalonnage utilisé pour l'ensemble des quantifications devra être menée de façon parfaitement rigoureuse. Toutefois, cette condition doit être respectée pour la validation de n'importe quelle méthode de dosage, quelle que soit l'appareillage utilisé. Aussi, ce n'est pas un inconvénient intrinsèque du QC-Prep+.

Parmi les avantages, le plus important est le gain de temps apporté par l'utilisation de cet appareil.

En effet, pour la méthode chromatographique actuellement utilisée, le temps d'analyse (« run ») par échantillon est de douze minutes. Sachant qu'il faut utiliser six points de gamme pour la calibration, trois contrôles qualité et trois échantillons. L'analyse d'un lot de spironolactone en suspension buvable prendra au minimum 2,5 heures. En ajoutant le temps de préparation des points de gamme, des contrôles qualité et des échantillons, la durée totale d'une analyse est de 3 à 3,5 heures. Comparativement, l'analyse d'un lot par le QC-Prep+ prendra environ 20 minutes.

Cette différence s'explique essentiellement par deux facteurs :

- L'absence de réalisation d'un étalonnage à chaque analyse ;
- L'absence de procédé séparatif.

Le gain de temps apporté par cet appareil est donc considérable.

Un autre avantage du QC-Prep+ est son fonctionnement totalement automatisé. Ainsi, pour des échantillons ne nécessitant pas de dilution (collyres), aucune manipulation n'est requise ce qui permet de supprimer les variabilités dues à l'opérateur et donc de rendre des résultats les plus proches possibles de la réalité.

Enfin, la normalisation de l'appareil et les différents tests de contrôle permettent de s'assurer de la qualité de l'analyse et de l'absence de dérives des bancs optiques dans le temps. Cela permet de s'affranchir de la nécessité de la réalisation de contrôles qualité à chaque analyse de préparations.

IV. Conclusion et perspectives

Notre étude a permis de démontrer que le QC-Prep+ était une méthode analytique exacte pour l'identification et la quantification d'un principe actif d'intérêt dans un excipient complexe.

Dans notre cas, les vecteurs de suspension buvable contiennent, pour la plupart, des conservateurs dont l'absorbance dans le domaine spectral UV existe mais cela ne forme pas une limitation à l'utilisation d'une spectrométrie directe pour la réalisation d'un contrôle qualité.

Comparativement aux méthodes classiques comme l'HPLC, notre procédé analytique offre les mêmes critères de performance : le principe actif d'intérêt est identifié et sa quantification est exacte.

Par ailleurs, l'utilisation de ce procédé permet de réaliser un gain de temps, tant sur la durée d'analyse que sur la préparation des différents échantillons.

La mise en place de cette nouvelle méthode au sein de notre laboratoire de contrôle nous a également permis de libérer du temps d'analyse sur notre chaîne HPLC. Cette dernière pourra ainsi être plus facilement déployée pour le développement de nouvelles préparations hospitalières ou encore pour contrôler des préparations qui ne l'étaient pas faute de créneaux d'analyse disponibles.

Un protocole d'utilisation du QC-Prep+ dans cette utilisation a été rédigé (Annexe 10) tandis que le personnel du laboratoire de contrôle a été formé pour le dosage des suspensions buvables de spironolactone avec cet appareil.

Dans nos travaux, une seule molécule a été étudiée alors que trois autres sont préparées sous forme de suspension buvable (hydrochlorothiazide, dexaméthasone, phénytoïne) de façon quotidienne par notre unité. Notre objectif est maintenant d'élargir la gamme de molécules dosables avec le QC-Prep+ en poursuivant l'étude de l'exactitude de cette méthode pour ces principes actifs. Nous souhaiterions également étendre cette méthode pour le dosage d'autres préparations à excipient complexe, comme les formes topiques.

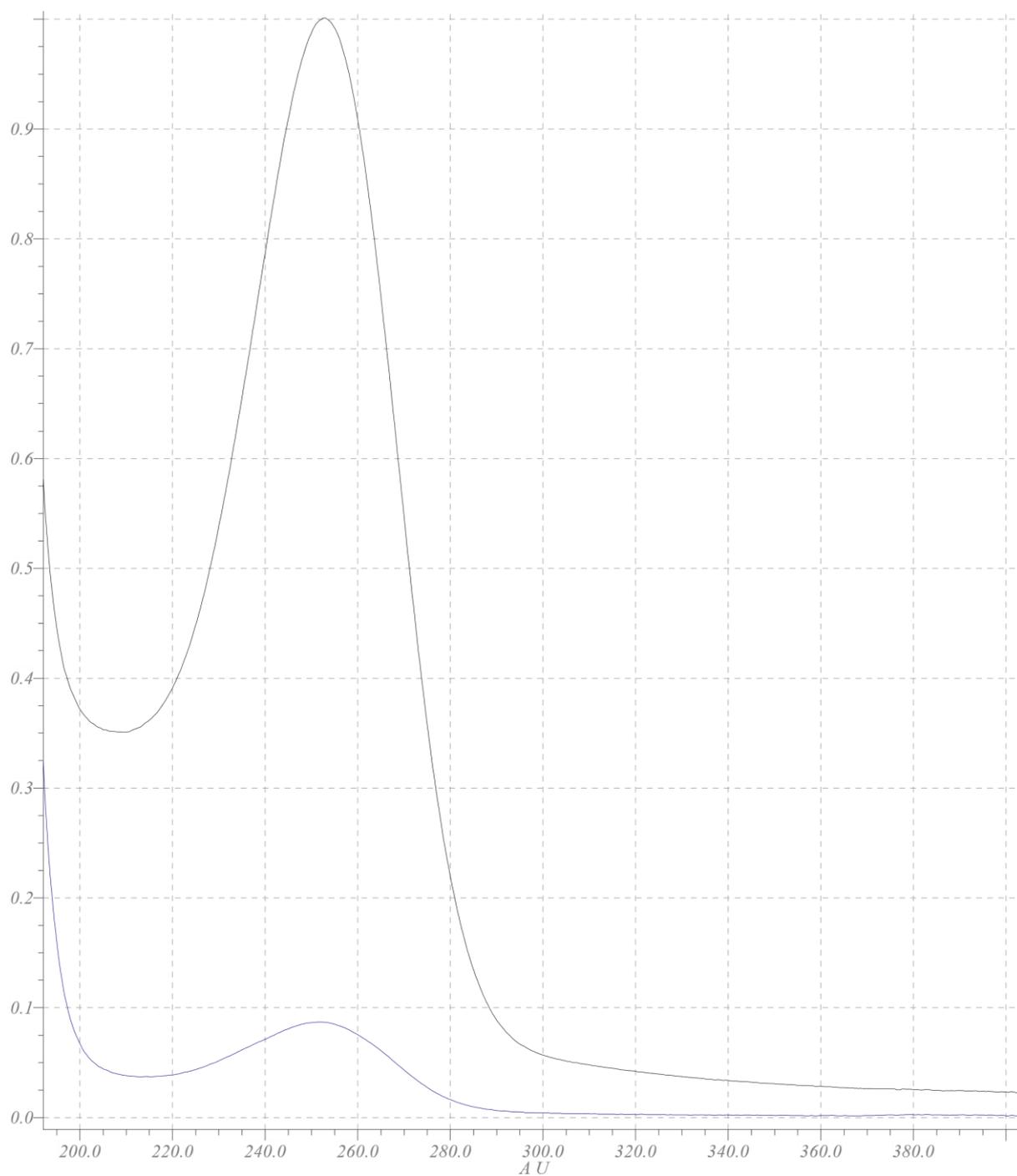
Bibliographie

1. Nardella F, Beck M, Collart-Dutilleul P, et al. A UV-Raman spectrometry method for quality control of anticancer preparations: Results after 18 months of implementation in hospital pharmacy. *Int J Pharm.* 2016;499(1-2):343-350.
2. Morel D, Leroy M, Sarrazin A, et al. Mise au point d'une méthode de contrôle pré-libératoire de l'aflibercept au sein d'une unité de préparation des chimiothérapies (UPC). *Le Pharm Hosp Clin.* 2014;49(4):336.
3. Chouquet T, Benoit G, Morand K. Implementation of Analytical Control of Low Volume Pediatric Cytotoxic Drugs Preparations using a UV/Raman Spectrophotometer. *Pharm Technol Hosp Pharm.* 2016;1(3):151-162.
4. Dectot B, Simon N, Vasseur M, Décaudin B OP. Development of a non-destructive dosage method by Raman spectroscopy, applied to 5-Fluorouracil solutions. <http://www.gerpac.eu/development-of-a-non-destructive-dosage-method-by-raman-spectroscopy-applied-to-5-fluorouracil-solutions>. Published 2016. Accessed August 13, 2017.
5. Grignon C, Zahaf F, Dermu M, Rouillon S, Dupuis A. Contrôle analytique des préparations hospitalières et magistrales par le QC Prep®. *Le Pharm Hosp Clin.* 2014;49(2):e128-e129.
6. Berge-Bouchara C, Hergli M, Olivier E. Contrôle des préparations hospitalières et magistrales : quelles pratiques dans les pharmacies à usage intérieur d'établissements de santé. *Pharm Hosp Clin.* 2017;52(1):26-32.
7. Meek C, Hoe J, Evans J, et al. Raman Spectroscopy : A Sensitive and Specific Technique for Determining the Accuracy of Compounded Pharmaceutical Formulations. *J Pediatr Pharmacol.* 2016:413-418.
8. Cailletaud J, De Bleye C, Dumont E, et al. Critical review of surface-enhanced Raman spectroscopy applications in the pharmaceutical field. *J Pharm Biomed Anal.* 2017.
9. Conroy S. Paediatric pharmacy - drug therapy. *Hosp Pharm.* 2003:49-57.
10. Conroy S, Choonara I, Impicciatore P, et al. Survey of unlicensed and off label drug use in paediatric wards in European countries. *Br Med J.* 2000;320(7227):79-82.
11. International Conference on Harmonisation (ICH). Clinical Investigation of Medicinal Products in the Pediatric Population (E11). 2000;(July):1-16.
12. Parlement Européen et Conseil de l'Union Européenne. Règlement CE n°1901/2006 relatif aux médicaments à usage pédiatrique. *J Off l'Union Eur.* 2006:1-19.
13. Médicament pédiatrique : plan d'investigation pédiatrique. 2016:1-4.

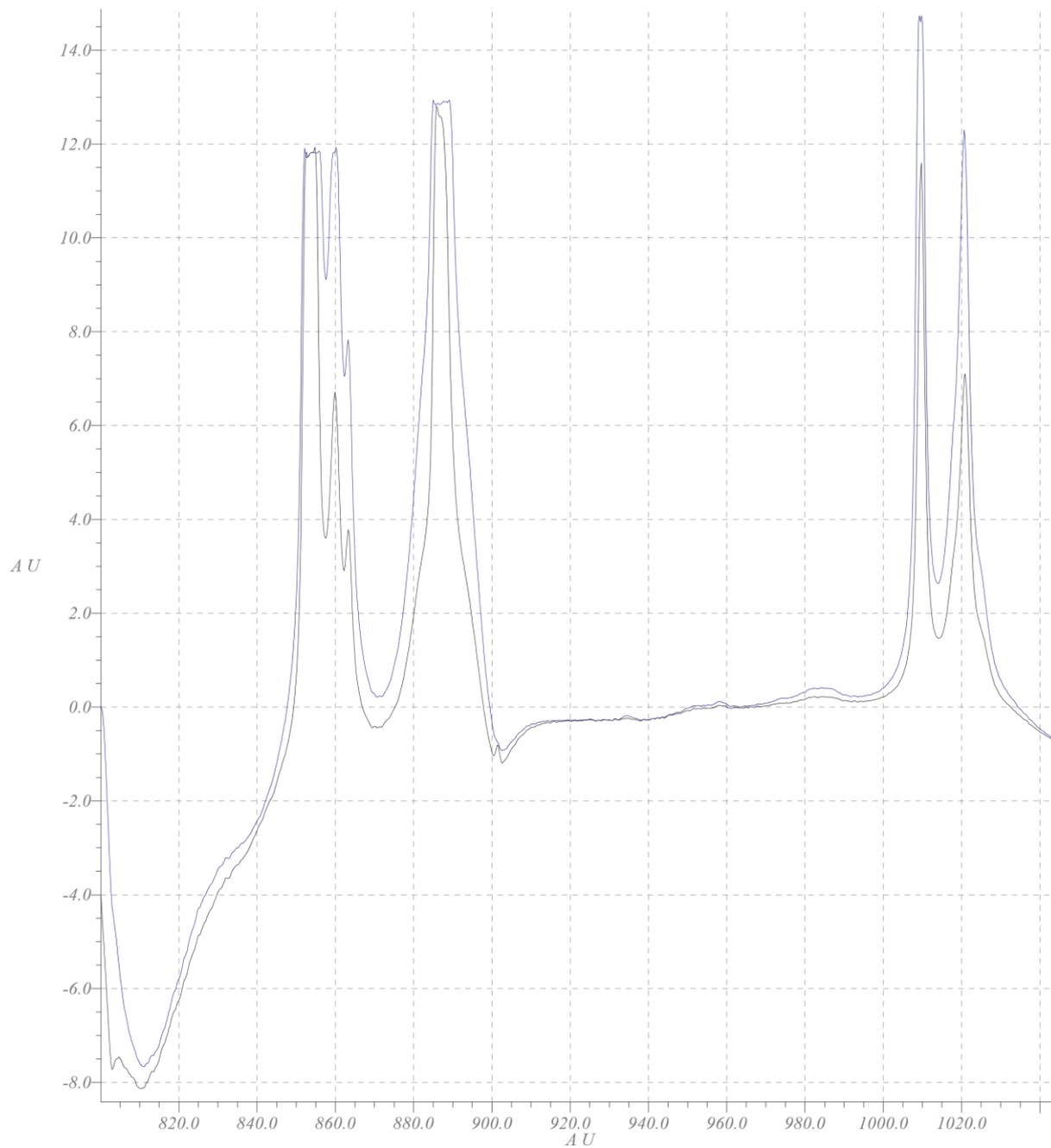
14. Albersheim SG, Solimano AJ, Sharma AK, et al. Randomized, double-blind, controlled trial of long-term diuretic therapy for bronchopulmonary dysplasia. *J Pediatr*. 1989.
15. AFSSAPS. *Bonnes Pratiques de Préparation.*; 2007.
16. EMA. *Reflection Paper : Formulations of Choice for the Paediatric Population.*; 2006.
17. Lu H, Rosenbaum S. Developmental pharmacokinetics in pediatric populations. *J Pediatr Pharmacol Ther*. 2014;19(4):262-276.
18. Pharmacopée Européenne 8.6. In: ; 2013.
19. Standing JF, Tuleu C. Paediatric formulations - Getting to the heart of the problem. *Int J Pharm*. 2005;300(1-2):56-66.
20. Patrick LEG, Olivier A, Xavier B, et al. Choix et mise en place d ' un contrôle pondéral libérateur au sein d ' une unité hospitalière centralisée de préparation des cytotoxiques. *Le Pharm Hosp*. 2008;43(172):19-27.
21. 2.9.5. Uniformity of mass of single-dose preparations. In: *European Pharmacopoeia 8.0.* ; 2013.
22. Dupuis A, Tournier N, Le Moal G, Venisse N. Preparation and Stability of Voriconazole Eye Drop Solution. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(2):798-799.
23. Spectrophotometric determination of amoxicillin and clavulanic acid in pharmaceutical preparation. *Talanta*. 1989;36(6):683-685.
24. Bazin C, Vieillard V, Astier A, Paul M. Contrôle rapide et fiable des préparations de chimiothérapies à base d'anticorps monoclonaux à l'aide de l'automate Multispec®. *Ann Pharm Françaises*. 2010;68(3):163-177.
25. 2.9.40. Uniformity of dosage units. In: *European Pharmacopoeia 8.0.* ; 2013.
26. 2.6.1. Sterility. In: *European Pharmacopoeia 8.0.* ; 2013.
27. Lewis IR, Edwards HGM. *Handbook of Raman Spectroscopy.*; 2001.
28. Vankeirsbilck T, Vercauteren A, Baeyens W, et al. Applications of Raman spectroscopy in pharmaceutical analysis.
29. De Beer T, Burggraeve A, Fonteyne M, Saerens L, Remon JP, Vervaeet C. Near infrared and Raman spectroscopy for the in-process monitoring of pharmaceutical production processes. *Int J Pharm*. 2011;417(1-2):32-47.
30. Kiehntopf M, Mönch B, Salzer R, Kupfer M, Hartmann M. Quality control of cytotoxic drug preparations by means of Raman Spectroscopy. *Pharmazie*. 2012;67(1):95-96.

31. Icones Services. *Documentation QC Prep +.*; 2013.
32. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). In: *ICH Harmonised Tripartite Guideline*. Vol 1994. ; 1994.
33. FDA. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. 2001;(May).
34. EMA. *Guideline on Bioanalytical Method Validation.*; 2011.
35. Sautou V, Brossard D, Crauste-Manciet S, et al. *Guide Méthodologique Des Études de Stabilité Des Préparations.*; 2013.
36. Hubert P, Nguyen-Huu J-J, Boulanger B, et al. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. *J Pharm Biomed Anal*. 2007;45(1):70-81.
37. Merck and Co. *The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 13th Edition.* (O'Neil MJ (ed. ., ed.); 2001.
38. Pylypiw HM, Grether MT. Rapid high-performance liquid chromatography method for the analysis of sodium benzoate and potassium sorbate in foods. *J Chromatogr A*. 2000;883(1-2):299-304.
39. SIAVELIS Armand. Analyse des différentes approches de validation de méthodes de dosage et proposition d'un guide de validation de méthode de dosage en pharmacie hospitalière. 2014.
40. SFSTP. *Validation Des Procédures Analytiques Quantitatives Harmonisation Des Démarches.*; 2003.
41. Fajgelj A, Ambrus A. *International Workshop on Principles and Practices of Method Validation.*; 1999.
42. Grignon C. Toxicocinétique en Santé Environnementale : Application à la mesure de l'exposition aux Perturbateurs Endocriniens. 2016.
43. Pramari V., Gupta D, Zerai T. Quantitation of spironolactone in the presence of canrenone using high-performance liquid chromatography. *Drug Dev Ind Pharm*. 1991;17(5):747-761.
44. Geiger CM, Sorenson B, Whaley P. Stability Assessment of 10 Active Pharmaceutical Ingredients Compounded in SyrSpend SF. *Int J Pharm Compd*. 2015;19(5):420-427.

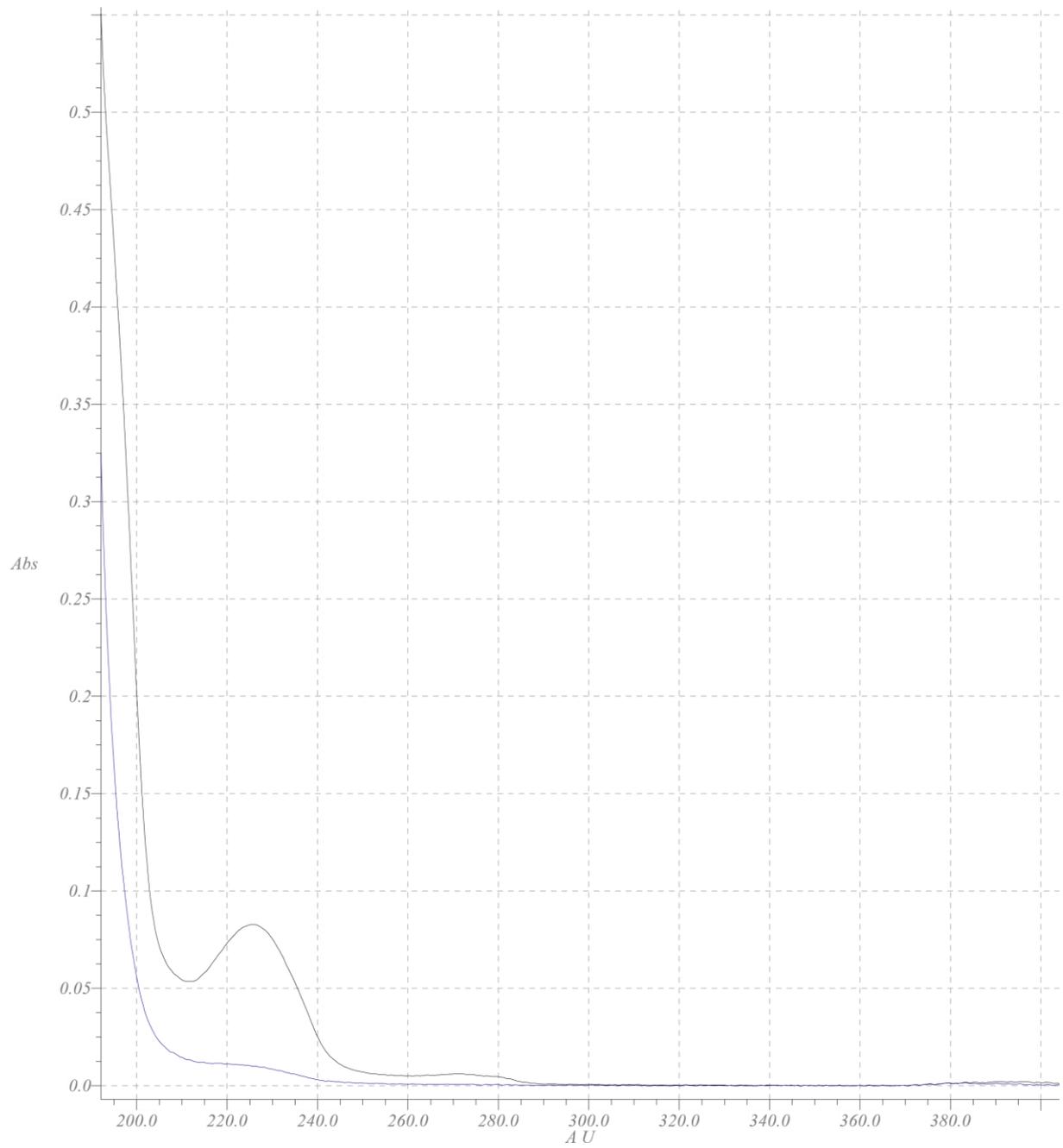
ANNEXES



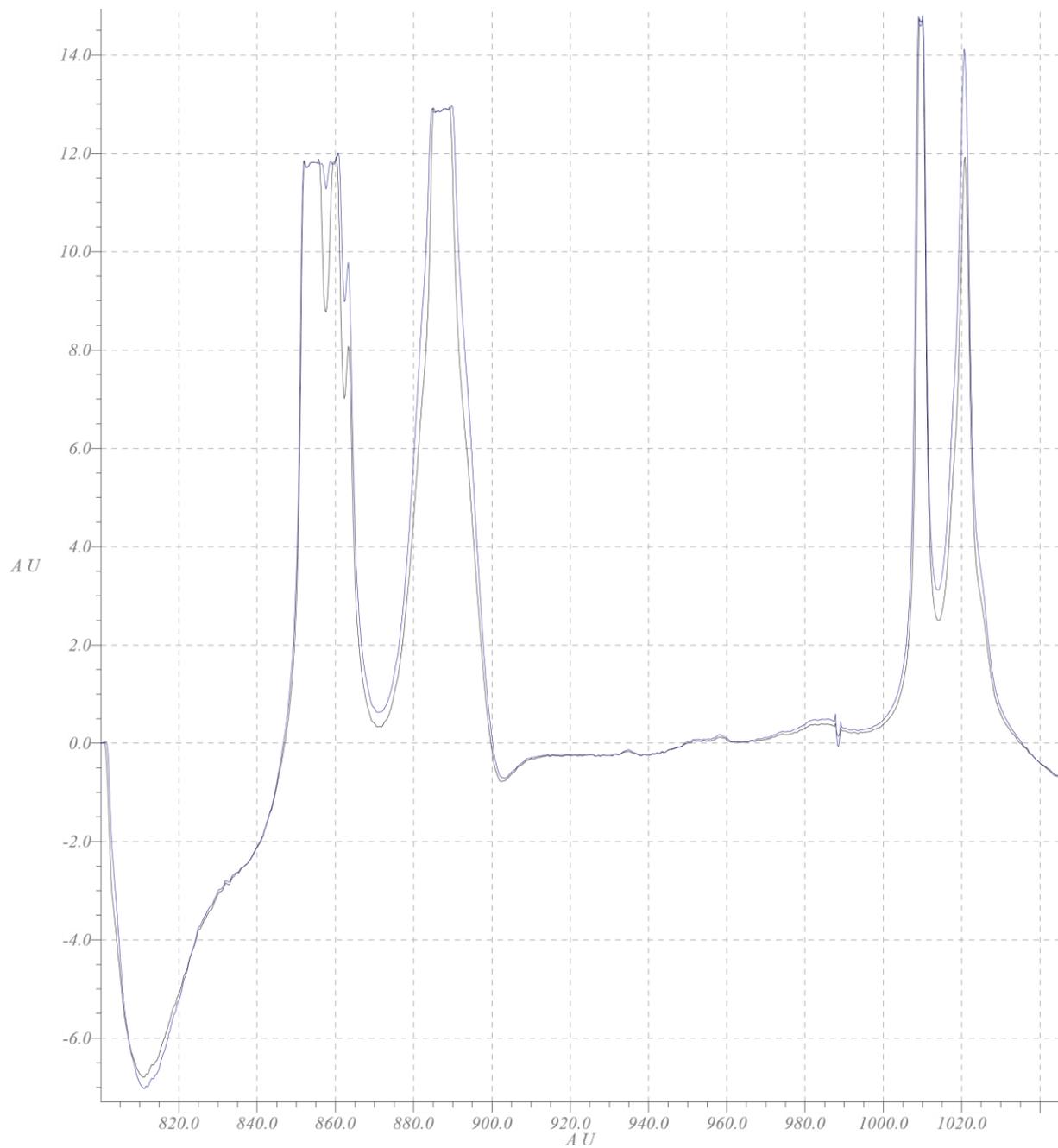
Annexe 1: Spectre UV de l'Inorpha (dilution par du méthanol au 1/10e et au 1/100e)



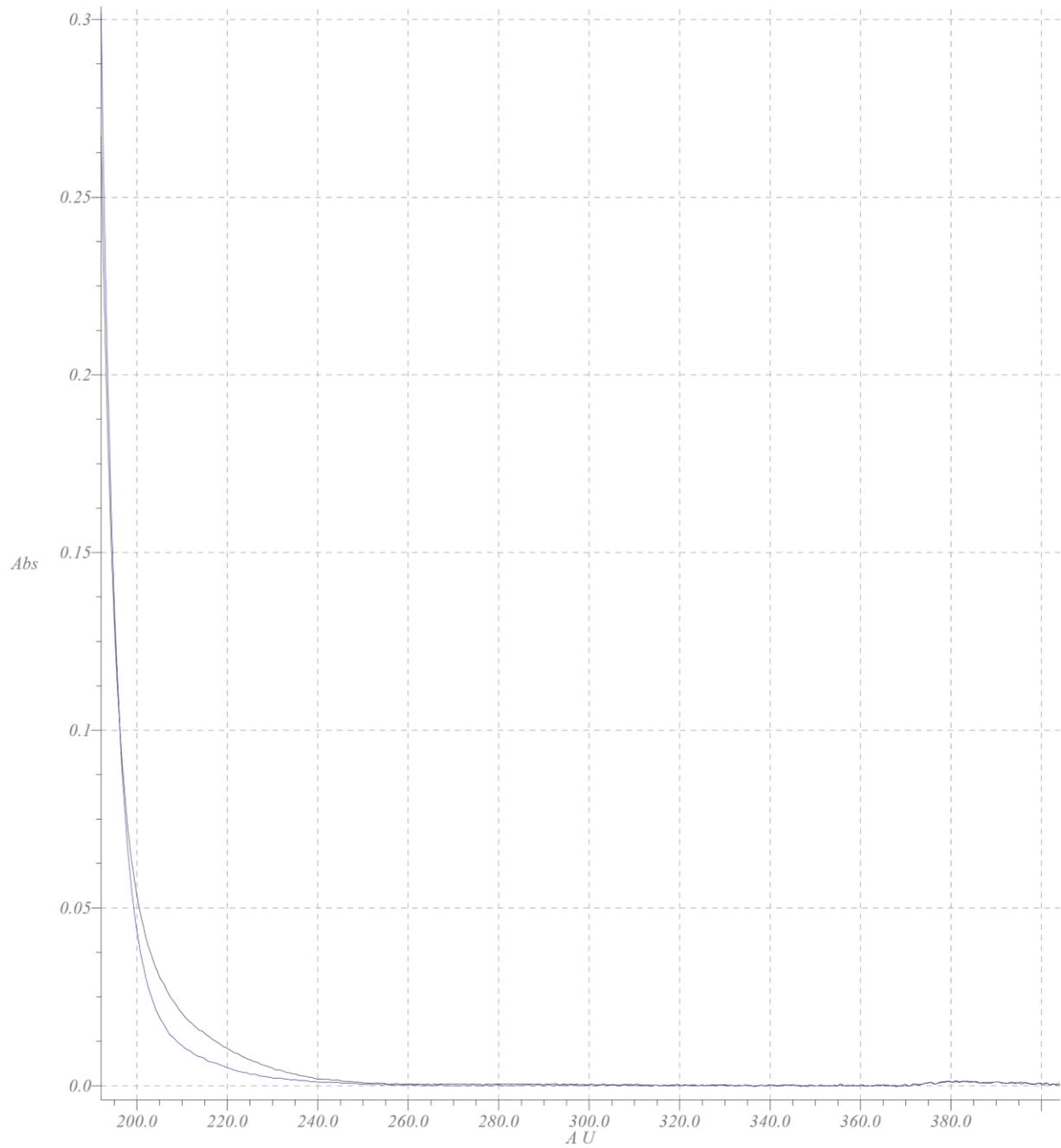
Annexe 2 : Spectre Raman de l'Inorpha (dilution par du méthanol au 1/10e et au 1/100e)



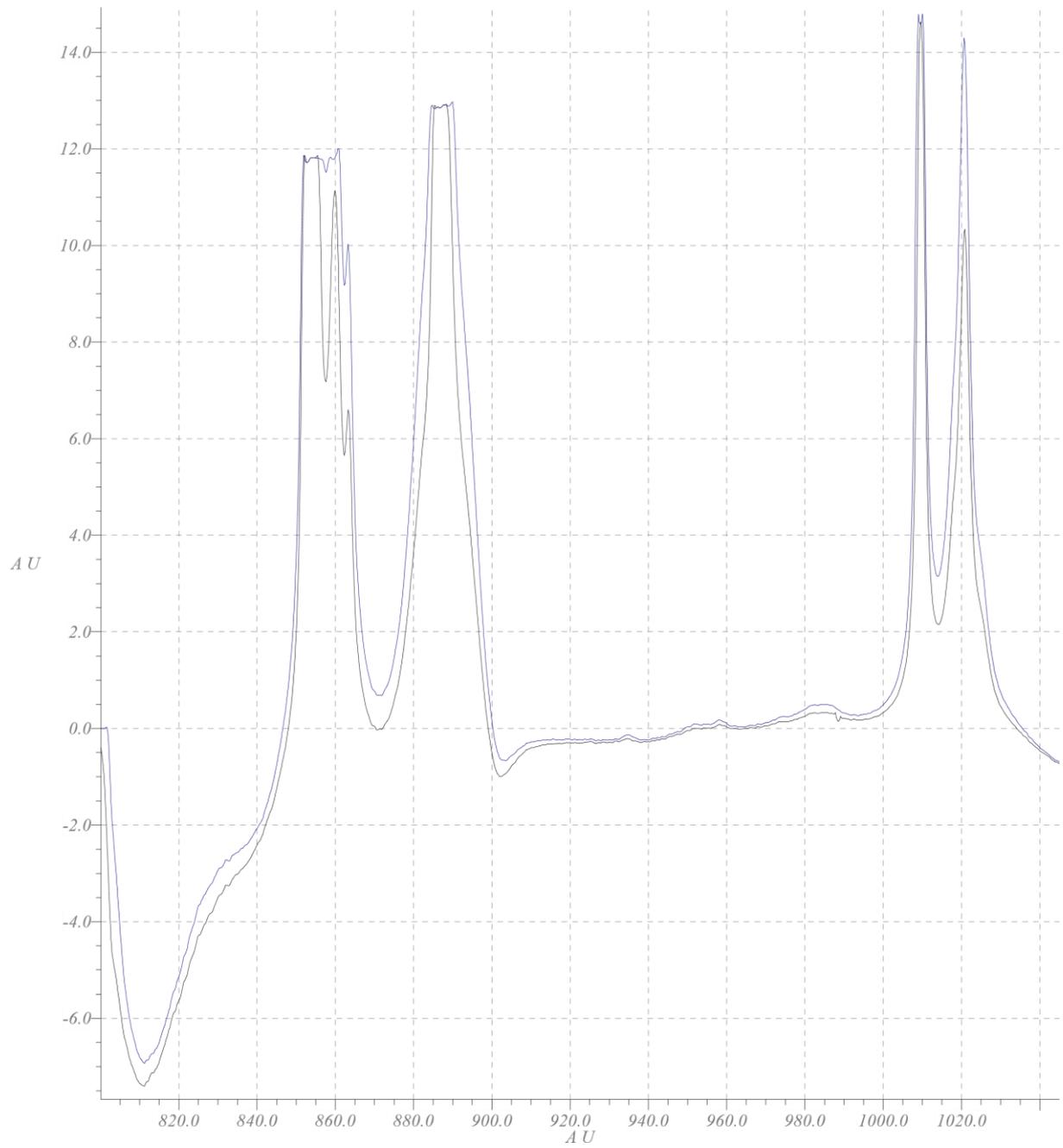
Annexe 3 : Spectre UV du Syrspend (dilution par du méthanol au 1/10e et au 1/100e)



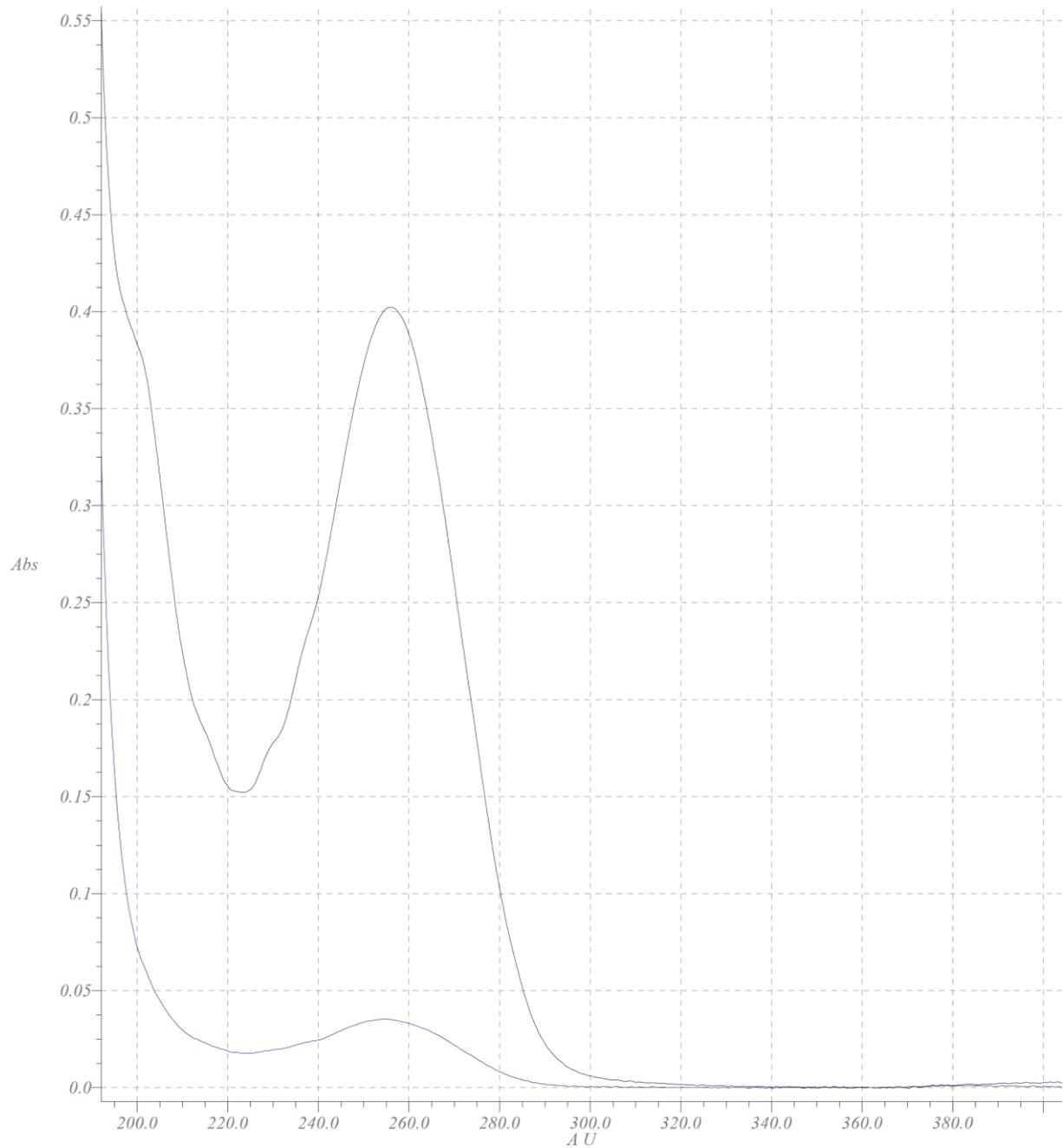
Annexe 4: Spectre Raman du Syrspend (dilution par du méthanol au 1/10e et au 1/100e)



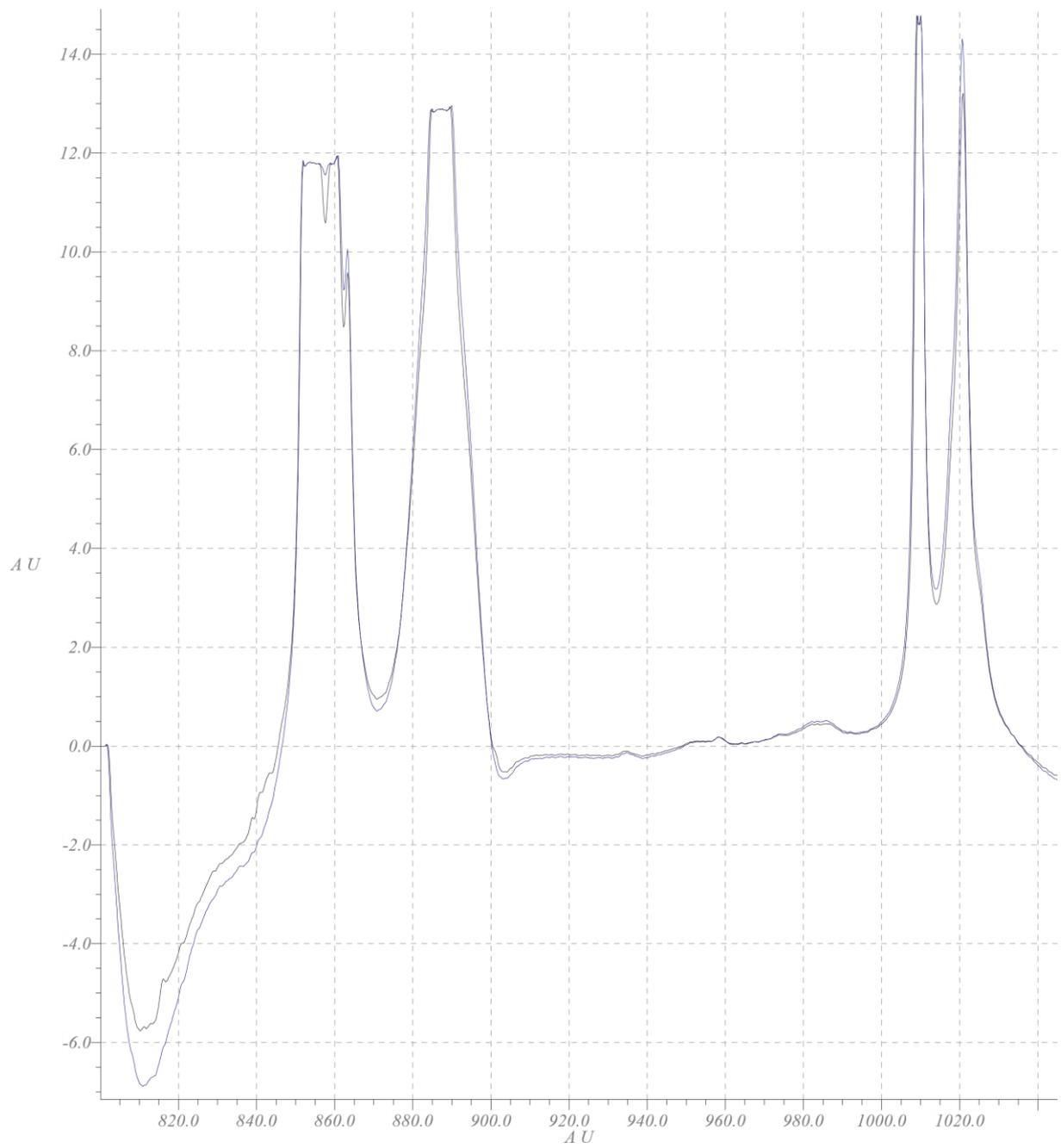
Annexe 5 : Spectre UV du Syrspend Dry (dilution par du méthanol au 1/10e et au 1/100e)



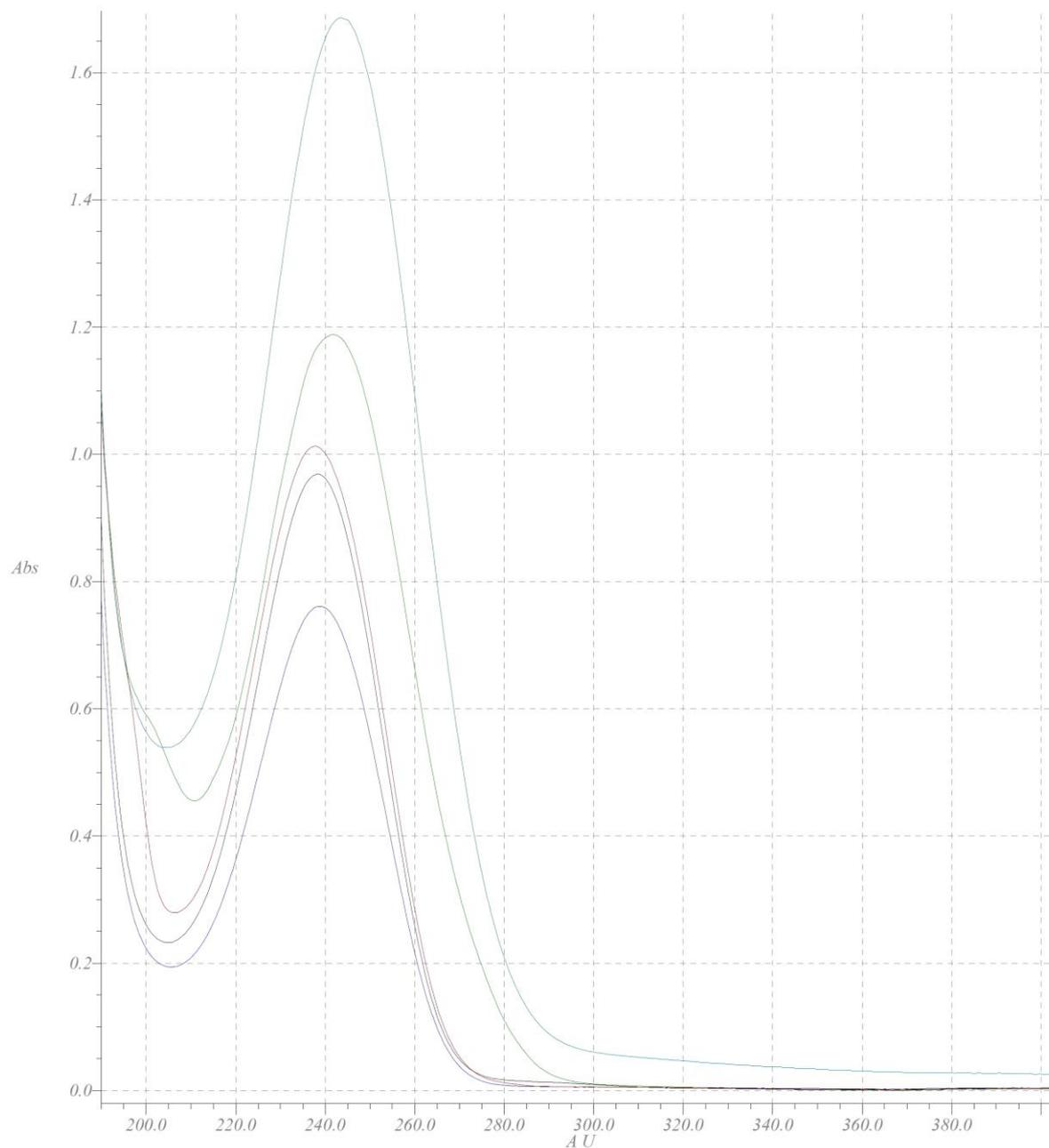
Annexe 6 : Spectre Raman du Syrspend Dry (dilution par du méthanol au 1/10e et au 1/100e)



Annexe 7 : Spectre UV du mélange OP/OS (dilution par du méthanol au 1/10e et au 1/100e)



Annexe 8 : Spectre Raman du mélange OP/OS (dilution par du méthanol au 1/10e et au 1/100e)



Spirolactone - MeOH - FAGRON_CHU Poitiers - 1.000
Spirolactone Syspend dry - MeOH - FAGRON_CHU Poitiers - 1.000
Spirolactone OP.OS - OP/OS - FAGRON_CHU Poitiers - 1.000
Spirolactone Inorpha - Inorpha - FAGRON_CHU Poitiers - 1.000
Spirolactone Syspend - Syspend - FAGRON_CHU Poitiers - 1.000

CHU Poitiers

Identification : QC Prep

**Annexe 9 : Décalage du pic d'absorption en fonction du couple
spirolactone/vecteur**

Annexe 10 : Mode opératoire de dosage de la spironolactone par le QC-Prep+

 PHARM- LABO-MO-09	Pôle Pharmacie et Santé Publique Service Pharmacie	Page : 1/2
		Date : Juillet 2017
Version n° 01	Dosage des suspensions buvables de Spironolactone spectrométrie combinée UV/Raman (QC-Prep+)	
Historique		
Numéro de version	Date	Nature des modifications
01	Juillet 2017	Création

OBJET :

Ce mode opératoire décrit les différentes étapes du dosage par spectrométrie combinée UV/Raman (QC-Prep+) de la spironolactone en suspension buvable à la concentration de 5 mg/mL.

PRINCIPE DU DOSAGE :

Les échantillons sont 3 flacons de suspensions buvables de spironolactone à 5 mg/mL, prélevé au début, au milieu et en fin de répartition de la préparation entre les différents flacons du lot.

Les échantillons sont conservés à +4°C dans le frigo « quarantaine » et identifiée par la mention « pour dosage ».

REACTIFS :

Solution de triton
Méthanol HPLC grade

ICONES SERVICES
CARLO ERBA

APPAREILLAGE :

QC-Prep+

PREPARATION DES ECHANTILLONS :

Préparer 3 fioles jaugées de 10 mL.

Dans chaque fiole :

- Diluer la suspension buvable de spironolactone à 5 mg/mL au 10^{ème} dans du méthanol (1 mL de suspension de spironolactone + 9 mL de méthanol) ;
- Agiter au vortex 60 secondes ;
- Transvaser 1,5 mL dans un tube Eppendorf ;
- Centrifuger 60 secondes au maximum de rpm ;
- Transférer 1,2 mL dans un vial.

 PHARM- LABO-MO-09	Pôle Pharmacie et Santé Publique Service Pharmacie	Page : 2/2
		Date : Juillet 2017
Version n° 01	Dosage des suspensions buvables de Spironolactone spectrométrie combinée UV/Raman (QC-Prep+)	

REALISATION DU DOSAGE :

- Allumer le QC-Prep+ et réaliser le test banc et le contrôle de la solution de référence en suivant la procédure associée (procédure n°01) ;
- Configurer le logiciel QC Analyses en suivant la procédure n°06 (« Processus d'analyse des échantillons de routine QC-Prep+ ») et choisir le protocole « Suspension buvable » et le dossier de sauvegarde « Suspensions buvables » ;
- Enregistrer puis lancer l'analyse.

ANALYSE DES RESULTATS :

- La préparation de spironolactone à 5 mg/mL a été diluée une fois au 10^{ème}, ce qui revient à doser une solution diluée à 0,5 mg/mL ;
- La gamme d'étalonnage paramétrée dans le QC-Prep+ va de 0,25 à 1 mg/mL. Cette gamme est donc appropriée pour le dosage de la spironolactone à 5 mg/mL diluée au 10^{ème} ;
- Le résultat rendu par l'appareil est exprimé en mg/mL. Pour obtenir la concentration réelle de la suspension de spironolactone, il faudra le multiplier par 10.
- La préparation est conforme si la concentration trouvée est comprise entre 4,5 et 5,5 mg/mL (+/- 10% de la concentration-cible)

Rédaction	Vérification	Approbation
BINSON Guillaume Interne Date et signature :	MONTEIL Jean-Baptiste Interne Date et signature :	DUPUIS Antoine Responsable du secteur « Pharmacotechnie » Date et signature :

SERMENT DE GALIEN

~~~~

Je jure, en présence des maîtres de la faculté et de mes condisciples :

**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 j'y manque.

## Résumé

Les préparations pharmaceutiques sont couramment utilisées adapter des traitements à des populations particulières, telle que la population pédiatrique. Le contrôle analytique de ces préparations est essentiel pour assurer la qualité et sécurité de la prise en charge. Nous avons développé une méthode basée sur l'utilisation combinée des spectrométries UV et Raman directes afin de réaliser le contrôle analytique de préparations à formulation complexe, en suivant les recommandations de l'ICH. La méthode a été testée avec la spironolactone et quatre véhicules de suspension buvable couramment utilisés (Inorpha®, Syrspend® SF PH4, Syrspend® Dry, mélange OraPlus®/OraSweet®). Les résultats obtenus étaient satisfaisants pour la linéarité et l'exactitude (justesse et précision). La spectrométrie combinée UV/Raman peut ainsi être utilisée pour le contrôle analytique de préparations à formulation complexe, tels que les suspensions buvables. Pour étendre l'utilisation de cette technique, d'autres molécules fréquemment préparées sous forme de suspension buvable seront validées (dexaméthasone, phénytoïne, hydrochlorothiazide).

**Mots clés :** *spectrophotométrie UV, spectroscopie Raman, préparations pharmaceutiques, spironolactone, agents de suspension.*

## Abstract

Pharmaceutical compounding is often used to adapt drugs to special populations like the pediatric one. Analytic control of these compounds remains essential to ensure quality and safety. To this aim, we developed a method based on the use of combined UV and Raman direct spectrometry to perform content control of preparations with complex formulation, following ICH recommendations. Spironolactone oral suspension was used to assess the method with four common suspending vehicles (Inorpha®, Syrspend® SF PH4, Syrspend® Dry, OraPlus®/OraSweet® mix). We obtained acceptable results regarding linearity and accuracy (precision and trueness), whatever the vehicle used. Combined UV/Raman direct spectrometry can be used as an effective tool to perform analytic control of preparations with complex formulation. Further experiments will be performed to extend the use of this method to other drugs frequently compounded as oral suspension (dexamethasone, phenytoine, hydrochlorothiazide).

**Key words:** *ultraviolet spectrophotometry, Raman spectroscopy, pharmaceutic preparations, spironolactone, suspending agents.*