



Contrôle d'uniformité de teneur des préparations injectables de Cytarabine

*Quality control of injectable preparations containing cytarabine :
détermination of cytarabine concentrations*

COLLIN Cédric¹,
CAMUS Maryse⁴,
ALBOUSSIÈRE Medhi²,
BRION Françoise³

1. Pharmacien,
2. Technicien de laboratoire,
3. Pharmacien hospitalo-universitaire, chef de service, service Pharmacie à usage intérieur, secteur de préparation des anticancéreux injectables, hôpital Robert-Debré, Paris.
4. Pharmacien, service Pharmacie à usage intérieur, centre hospitalier d'Auxerre.

Auteur correspondant :
CAMUS Maryse,
Centre hospitalier d'Auxerre,
service Pharmacie,
2 boulevard de Verdun, BP69,
89011 Auxerre Cedex.

mcamus@ch-auxerre.fr

Article reçu le 12/08/05
Accepté le 9/12/05

Article reçu et accepté pour publication
par les Annales pharmaceutiques françaises,
transféré au Pharmacien Hospitalier
avec l'accord des auteurs
et des deux rédactions.

Résumé

La Cytarabine est un anticancéreux administré dans le traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques chez l'enfant. La préparation des formes injectables est centralisée dans la pharmacie à usage intérieur. L'objectif est d'évaluer la conformité des préparations fabriquées, après développement du contrôle d'uniformité de teneur, afin de garantir la qualité des préparations effectuées. La spectrophotométrie UV est utilisée pour doser la Cytarabine. Les préparations sont déclarées conformes si l'erreur relative sur la teneur n'excède pas $\pm 15\%$. Le contrôle de 47 préparations de Cytarabine (26 poches, 21 seringues), indique un taux de conformité supérieur à 90 % (1 poche et 3 seringues ne sont pas conformes). La méthode utilisée est simple, rapide à mettre en œuvre et relativement économique par rapport à d'autres techniques d'analyse. Ce contrôle d'uniformité de teneur permet de confirmer la concentration en principe actif et de valider la fabrication. La non-conformité entraîne une destruction de la préparation et une nouvelle fabrication répondant aux exigences de qualité hospitalière. Cette étude est suivie de l'application du contrôle d'uniformité de teneur en routine et de son développement sur d'autres principes actifs.

Mots-clés : Cytarabine, Contrôle, Cytotoxiques, Spectrophotométrie.

Summary

Cytarabine is an effective chemotherapeutic agent used in the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. The handling of injectable cytotoxic drugs is centralised by the pharmaceutical department. The aim of this study is to develop a post-production quality program to check Cytarabine concentrations in preparations, thereby securing chemo-infusions given to hospitalised children. Cytarabine concentrations are assessed by UV-spectrophotometry. The production process is validated when error percent of Cytarabine concentration does not exceed 15 %. Control was performed on 47 preparations containing Cytarabine (26 infusion bags and 21 syringes) among which 90 % conformity was obtained (one infusion bag and three syringes were rejected). The proposed analytical method is easy-to-apply, rapid and economical compared to other available techniques. The suggested quality control is the basis for an efficient and effective monitoring process of production. Non-conformity implies the destruction of the

preparation followed by a new production. This study will be followed by its daily application and the development of this control process on others drugs.

Key-words: Cytarabine, Control, Cytotoxic, Spectrophotometry.

INTRODUCTION

En France, les cancers de l'enfant et de l'adolescent représentent 1 à 3 % des cancers diagnostiqués chaque année [1, 2]. Les leucémies et les lymphomes sont traités exclusivement par chimiothérapie anticancéreuse [3]. Le traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques chez l'enfant de plus de 1 an est basé, à l'hôpital Robert-Debré, sur le protocole EORTC 58951 utilisé par le service d'hématologie clinique. Ce protocole est composé d'une phase d'induction de 35 jours suivie d'une phase de consolidation de 65 jours. Chacune des deux phases comporte différentes cures basées sur l'association de plusieurs anticancéreux (Vincristine, Méthotrexate, L-Asparaginase, Daunorubicine, Cyclophosphamide, Melphalan). Le schéma thérapeutique du protocole comprend notamment des administrations répétées, par voie intraveineuse, de Cytarabine (Ara-C) à la dose de 75 mg/m² pendant la phase de consolidation [4]. La fabrication de préparations magistrales de poches ou de seringues d'Ara-C est centralisée dans le service de Pharmacie à usage intérieur (PUI) de l'établissement. En 2004, les préparations renfermant de l'Ara-C représentaient environ 30 % de l'activité du secteur des anticancéreux injectables préparés en Pharmacie (EKIPP) de l'hôpital Robert-Debré. La PUI est chargée de répondre aux besoins médicaux en assurant la validation des prescriptions, la réalisation des préparations magistrales stériles d'anticancéreux injectables, leur contrôle et leur dispensation [5, 6]. Comme bon nombre d'agents anticancéreux, l'Ara-C est un médicament à marge thérapeutique étroite, cytotoxique, nécessitant à la fois la protection du personnel et de l'environnement au cours de sa manipulation [7]. La sécurité de l'administration doit être renforcée en garantissant la stérilité de la préparation et l'exactitude de la dose préparée. Ce point est particulièrement important en pédiatrie où les erreurs médicamenteuses qui impliquent des anticancéreux ont des conséquences dramatiques [8, 9].

Le pharmacien étant responsable de la préparation des anticancéreux injectables, il doit développer un système permettant de garantir leur qualité, en assurant la traçabilité depuis la prescription jusqu'à l'administration au patient. Actuellement, le processus d'assurance qualité mis en place dans le secteur de préparation des anticancéreux comprend la validation de la prescription (respect du protocole, posologie, nature et volume des solvants de reconstitution et de dilution, stabilité), de la fiche de fabri-

cation, et le contrôle de la préparation finale (conditionnement, étiquetage, modalités de conservation). Bien que les recommandations issues du texte des Bonnes Pratiques de pharmacie hospitalière (BPPrH) ne l'imposent pas pour les préparations magistrales, le contrôle d'uniformité de teneur permettrait de compléter ce processus en améliorant la qualité des préparations injectables [10]. C'est pourquoi après la mise au point de la méthode de dosage de l'Ara-C, l'application du contrôle d'uniformité de teneur est envisagée sur les poches et les seringues fabriquées par l'unité du service de pharmacie dans le but de valider la conformité des préparations.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matières premières

L'Ara-C utilisée pour la préparation des points de gamme et des contrôles est apportée par une spécialité pharmaceutique présentée sous forme de lyophilisat pour usage parentéral dosé à 2 000 mg (Pharmacia SAS®, Saint-Quentin en Yvelines, France) [11, 12]. Une solution mère à 100 mg/mL est réalisée à partir de la pesée de 1 000 mg de lyophilisat d'Ara-C et diluée dans 10 mL d'eau distillée. Cette spécialité présente l'avantage d'être pure et est disponible au marché de l'hôpital.

Appareillage

La méthodologie repose sur l'utilisation d'un spectrophotomètre UV-Visible (Hewlett-Packard, France) et l'emploi de cuves en quartz. L'appareil, muni de photodiodes, permet de travailler dans une gamme de longueurs d'ondes allant de 180 à 400 nm.

Conditions opératoires

Le manipulateur, revêtu d'un habillement adapté (casaque, charlotte, masque, gants), prépare les solutions utilisées pour la méthode de dosage de l'Ara-C dans un isolateur rigide en dépression ou « boîte à gants » (JCE Biotechnology, Vichy Hauterive, France), réservé à la manipulation de formes orales de médicaments cytotoxiques, afin de se protéger et d'éviter les contaminations de l'environnement. Les déchets renfermant de l'Ara-C sont éliminés dans des poubelles spécifiques réservées aux anticancéreux, destinées à être incinérées selon les recommandations de l'OMS.



Préparation des points de gamme

Cinq points de gammes sont préparés ; leurs concentrations sont respectivement égales à 2,5 ; 5 ; 10 ; 15 ; 20 mg/L. Trois niveaux de contrôle de qualité interne (CQ) (4 ; 8 et 18 mg/L) sont réalisés à partir de solutions préparées de la même façon par un autre manipulateur.

Validation analytique

La méthode a été validée en étudiant la fidélité intermédiaire d'une part (deux gammes par jour sont préparées indépendamment et analysées le même jour, cette opération est répétée six jours consécutifs). La fidélité intermédiaire est acceptable lorsque le coefficient de variation (CV) est inférieur à 7,5 % pour les points de plus faibles valeurs et 5 % pour les points de concentration plus élevée. D'autre part, la validation est complétée par l'étude de la fidélité inter-série (deux gammes sont préparées par un manipulateur différent et analysées six jours différents). La reproductibilité est acceptable selon les mêmes conditions que celles définies précédemment [13, 14]. La validation a montré l'exactitude de la méthode (trois niveaux de CQ analysés le même jour, chacun six fois, et pendant six jours consécutifs). La limite de détection (L_D) est déterminée comme la plus faible quantité détectable par la méthode de dosage mise en œuvre [14, 15]. La limite de quantification est définie comme le minimum de produit permettant d'avoir une mesure exacte. L'existence d'une relation linéaire, entre les absorbances mesurées et les concentrations obtenues, est vérifiée en utilisant le test de Cochran.

Application du dosage de l'Ara-C au contrôle d'uniformité de teneur

La préparation des médicaments anticancéreux est effectuée dans le service de pharmacie. Elle répond aux exigences des Bonnes Pratiques de Fabrication grâce à l'utilisation d'un isolateur rigide en surpression par rapport à l'extérieur, de norme ISO 5 (Sieve, Lyon, France). Le préparateur en pharmacie prélève un échantillon sur la préparation au moment de sa fabrication dans l'isolateur, à l'aide d'une seringue de 1 mL qu'il étiquette afin d'identifier correctement l'échantillon. Le volume de prélèvement est calculé à partir du volume de la préparation finale afin que la diminution de dose ne dépasse pas 1,0 % de la dose présentée. Le volume maximal pouvant être prélevé est fixé à 1,0 mL pour toutes les poches (100 à 500 mL) et 0,1 mL pour toutes les seringues (10 à 50 mL). L'échantillon est ensuite dilué au 1/1 000^e dans de l'eau distillée afin d'être analysé dans la gamme des concentrations retenues lors de la validation de la méthode de dosage. L'absence d'influence du solvant de dilution utilisé pour la préparation (glucose 5 % ou chlorure de sodium 0,9 %) a été vérifiée préalablement aux dosages ; la dilution opérée dans l'eau distillée limite éga-

lement les éventuelles interférences. L'échantillon est analysé sur une gamme réalisée extemporanément. Les trois niveaux de contrôle sont testés sur cette gamme et ne doivent pas s'écarter de plus de 5 % des valeurs théoriques. La conformité de la préparation est définie à partir du calcul du pourcentage d'erreur relative de concentration (C) en Ara-C, comme suit : pourcentage d'erreur relative $E \% = (C_{\text{mesurée}} - C_{\text{théorique}} / C_{\text{théorique}}) \times 100$. Les valeurs théoriques des concentrations ($C_{\text{théorique}}$) sont calculées lors de la rédaction de la fiche de fabrication. Les préparations sont conformes si ce pourcentage d'erreur relative par rapport à la valeur théorique n'excède pas ± 15 %. Cette valeur de 15 % a été retenue dans cette étude ; elle est basée sur la valeur de référence, issue de la Pharmacopée Européenne, pour « l'uniformité de teneur des préparations unidoses » qui précise que « la préparation satisfait à l'essai si la teneur individuelle de chaque unité est comprise entre 85 % et 115 % de la teneur moyenne » [16]. Dans le cas où le pourcentage d'erreur relative excéderait ± 15 %, la préparation est refusée. Les paramètres étudiés (volume, concentration, erreur relative E) sont présentés sous la forme d'une moyenne \pm écart-type.

RÉSULTATS

Validation analytique

Le spectre d'absorption de l'Ara-C, établi entre 180 à 400 nm, indique la présence de deux longueurs d'ondes maximales d'absorption respectivement égales à 198 et 270 nm ; les tests ont été effectués aux deux longueurs d'onde et la longueur d'onde de travail est fixée à 198 nm (*figure 1*). La méthode mise au point est répétable, reproductible, exacte et linéaire dans la gamme des concentrations étudiées allant de 2,5 à 20 mg/L (la droite moyenne, réalisée à partir de 12 gammes expérimentales, a pour équation : Absorbance = $0,0843 \times [\text{Concentration}] + 0,0144$) ($p < 0,01$). La valeur de la limite de détection est égale à 1,4 mg/L. La limite de quantification est calculée à 2,4 mg/L.

Application du dosage de l'Ara-C au contrôle de l'uniformité de teneur des préparations réalisées par la pharmacie

La méthode de dosage validée a été appliquée sur 47 préparations (26 poches et 21 seringues) fabriquées par l'unité entre juin 2004 et août 2004.

Préparations présentées en poches

Le volume moyen des poches prélevées est égal à 304 ± 110 mL (volumes extrêmes : 100 – 440 mL). Le

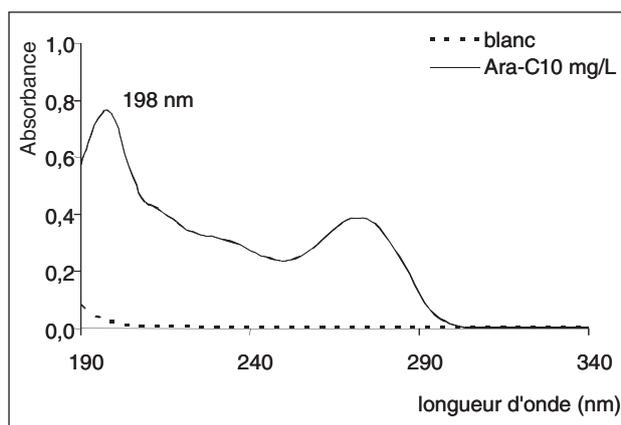


Figure 1. Spectre d'absorption de l'Ara-C à 10 mg/L (trait continu ; le trait discontinu représente le spectre d'absorption d'un échantillon blanc réalisé dans les mêmes conditions).

Figure 1. Ultraviolet spectrum of 10 mg/L Ara-C (full line; discontinuous line represents the spectrum of a blank sample analysed in the same conditions).

pourcentage de diminution de dose engendré par le prélèvement de l'échantillon pour le dosage ne dépasse pas la limite fixée, il est compris entre 0,05 et 1,00 % (0,25 ± 0,22 %). La concentration moyenne théorique en Ara-C est de 8,2 ± 2,9 mg/L (valeurs extrêmes 2,2 – 9,9 mg/L). La moyenne des concentrations mesurées est de 7,9 ± 2,7 mg/L (valeurs extrêmes 2,7 – 11,3 mg/L). Le contrôle de l'uniformité de teneur en Ara-C des 26 poches indique un pourcentage moyen d'erreur relative égal à -3,4 ± 9,0 % (valeurs extrêmes : -13,8 et +17,1 %). Une seule préparation possède un pourcentage d'erreur relative supérieur à +15 %.

Préparations présentées en seringues

Le volume moyen des seringues prélevées est de 12,5 ± 5,5 mL (volumes minimal et maximal : 10 et 24 mL). Le pourcentage de diminution de dose est de 0,9 ± 0,2 % (valeurs extrêmes 0,4 – 1,0 %). La concentration moyenne théorique en Ara-C est calculée à 5,6 ± 1,9 mg/L (valeurs extrêmes 2,4 – 8,8 mg/L). La moyenne des concentrations mesurées est égale à 5,0 ± 1,8 mg/L (valeurs extrêmes 2,1 – 8,4 mg/L). Le contrôle de l'uniformité de teneur en Ara-C des 21 seringues indique un pourcentage moyen d'erreur relative égal à -11,1 ± 6,1 % (valeurs extrêmes : -27,8 et -0,2 %). Trois préparations possèdent un pourcentage d'erreur relative excédant 15 %.

Préparations non conformes

Le pourcentage d'erreur relative excède ± 15 % pour quatre préparations : trois seringues (pourcentages respectifs : -16,6 %, -16,3 % et -27,8 %) et une poche (erreur relative égale à 17,1 %), ce qui représente 8,5 % de préparations déclarées non conformes. Au final, la

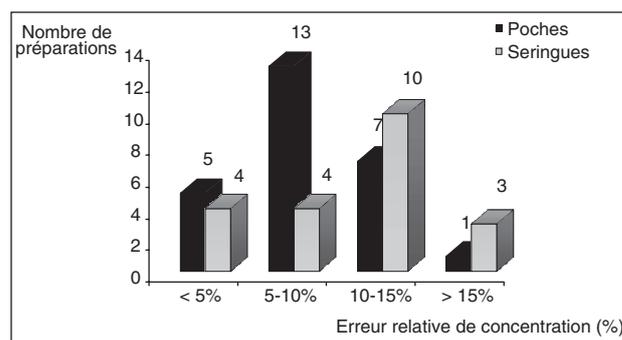


Figure 2. Répartition des préparations en fonction de l'erreur relative de concentration en Ara-C exprimée en pourcentage.

Figure 2. Distribution of preparations related to relative error of Ara-C concentrations expressed in percent.

conformité de la concentration en Ara-C des préparations est égale à 91,5 %.

La figure 2 représente la répartition des deux types de préparations, seringues et poches, en fonction de leurs écarts aux valeurs théoriques (le calcul du pourcentage d'erreur est inférieur à 5 % pour 19,1 % des préparations, compris entre 5 et 10 % pour 36,2 % des préparations et compris entre 10 et 15 % pour 36,2 % d'entre elles).

DISCUSSION

La méthode de dosage développée est simple à mettre en œuvre : elle ne nécessite pas de prétraitement des échantillons d'une part, et les dilutions et manipulations sont rapides à effectuer d'autre part. Actuellement, les principales méthodes utilisées dans les laboratoires de contrôles reposent sur la spectrophotométrie, la chromatographie liquide haute performance (CLHP) et la chromatographie couche mince haute performance (CCMHP). En comparant le temps de mise en œuvre de ces différentes techniques analytiques, il est évalué à 2 heures pour une méthode de CLHP et à 30 minutes pour celle de CCMHP [17]. Le temps attribué aux manipulations de contrôle depuis le prélèvement, son acheminement dans la zone de contrôle jusqu'au rendu du résultat est évalué à 15 minutes pour la méthode de spectrophotométrie UV mise au point pour l'Ara-C. La principale contrainte est liée aux conditions de manipulation en isolateur. La méthodologie nécessite un appareillage simple (spectrophotomètre UV-Visible) et l'emploi de réactifs peu coûteux. Le calcul du coût de sa mise en œuvre est évalué à 18 euros par préparation contrôlée (ce calcul approximatif inclut les temps nécessaires au technicien pour réaliser une gamme et analyser un échantillon, et au pharmacien pour valider l'analyse ainsi que l'amortissement de l'appareillage utilisé). Si bien que cette méthodologie semble intéressante d'un point de



vue économique (le coût des contrôles réalisés par CLHP étant supérieur). La simplicité et la rapidité de la méthode de dosage permettent d'envisager une application pratique en routine de ce contrôle d'uniformité de teneur des préparations finales renfermant de l'Ara-C dans les services pharmaceutiques disposant de moyens humains et techniques. Malgré une longueur d'onde proche de l'UV, la longueur d'onde retenue reste, dans nos conditions opératoires, adaptée au contrôle. En effet, la spécificité est suffisante puisque les dilutions opérées dans l'eau distillée permettent de travailler sur une substance pure et d'éliminer le potentiel effet de la matrice comme le montre la *figure 1* qui représente les spectres d'absorption comparatifs d'un blanc réalisé dans l'eau distillée et d'un point de concentration en Ara-C égale à 10 mg/L. Par ailleurs, ces différentes dilutions étant préparées extemporanément, la lecture au spectrophotomètre est optimisée sans interférences potentiellement liées à la dégradation de l'Ara-C. Enfin, le choix de cette longueur d'onde est en faveur d'un gain de la valeur de la limite de détection par rapport à un travail à 270 nm.

Le pourcentage de non-conformité observé sur les préparations contrôlées montre deux grandes difficultés liées à la reconstitution des médicaments anticancéreux.

Dans un premier temps, l'homogénéisation est une étape très importante mais qui paraît insuffisante pour certaines préparations testées. En effet, pour les seringues, l'homogénéisation est plus difficile à obtenir du fait de la rigidité du corps de celle-ci par rapport à celle d'une poche, augmentant le risque de prélever un échantillon où le principe actif n'est pas dilué de façon homogène. Cet aspect est évoqué avec les manipulateurs de façon à ce que cette étape ne soit pas négligée dans le processus de fabrication.

Dans un second temps, l'imprécision du volume de remplissage des poches de solvant peut être à l'origine d'une erreur de concentration. En effet, le volume moyen de remplissage, mesuré sur dix poches de glucose à 5 % de 250 mL et dix poches de glucose à 5 % de 500 mL, est res-

pectivement de 269,7 mL pour les premières poches et de 551,5 mL pour les secondes (CV respectifs de 0,32 % et 0,74 %, erreurs relatives de remplissage respectivement égales à 7,9 % et 10,2 %). Le pourcentage moyen d'erreur de concentration en Ara-C (égal à - 3,4 %, n = 26 poches) pourrait provenir d'un effet de dilution lié au remplissage inexact des poches de solvant.

Malgré ces résultats, le contrôle ne semble pas remettre en cause le procédé de préparation dans la mesure où le système d'assurance qualité valide chaque étape de la production. En effet, les principes actifs, la nature et le volume de solvant de reconstitution pour les poudres pour usage parentéral, la nature et le volume de solvant de dilution nécessaires à la préparation sont vérifiés systématiquement par un second manipulateur présent dans l'isolateur.

CONCLUSION

La méthode employée permet de confirmer la concentration en Ara-C et de valider la fabrication mais sa mise en application implique un coût de fonctionnement, du personnel qualifié pour la réalisation des dosages et une réorganisation pour libérer les préparations rapidement.

La perspective future de cette étude est la mise en place de l'uniformité de teneur sur toutes les préparations renfermant de l'Ara-C fabriquées dans l'unité avec l'extension du contrôle de l'uniformité de teneur à d'autres médicaments anticancéreux préparés par le secteur (celui-ci est en cours d'application pour le Méthotrexate) [18]. Ce contrôle garantit la dispensation de la dose exacte à l'enfant, et permet de répondre aux exigences de qualité hospitalière (BPPrH). Le projet des BPPrH recommande le développement du système assurance qualité des préparations effectuées au sein d'une PUI dont les chimiothérapies et positionnent le pharmacien comme acteur essentiel du bon usage du médicament dans les établissements hospitaliers, notamment en pédiatrie.

RÉFÉRENCES

1. Sommelet D, Lacour B, Clavel J. Epidemiology of childhood cancer. *Bull Acad Natl Med* 2003; 187: 711-37.
2. Stiller CA. Epidemiology and genetics of childhood cancer. *Oncogene* 2004; 23: 6429-44.
3. Joannon P, Oviedo I, Campbell M, Tordecilla J. High-dose methotrexate therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia: lack of relation between serum methotrexate concentration and creatinine clearance. *Pediatr Blood Cancer* 2004; 43: 17-22.
4. Benoit Y, Boilletot A, Boutard P, Villemer P. Protocol EORTC 58921 Children's Leukemia Cooperative Study group. 1998.
5. Article L5126-1 du Code de la Santé publique relatif à la pharmacie à usage intérieur. *Journal Officiel, Annexe V*, p. 19-22, édition 22 juin 2000.
6. Camus M, Brion F. Intérêts de la préparation des médicaments anticancéreux dans les pharmacies à usage intérieur. *Gest Hosp* 2005 ; (444) : 219-22.
7. Trigg ME, Nadkarni V, Chidekel A, MacKay C, Meek R, Griffin G *et al.* Effects of inadvertent dose of cytarabine in a child with Fanconi's anemia : reducing medication errors. *Paediatr Drugs* 2002; 4: 205-8.
8. Trinkle R, Wu JK. Errors involving pediatric patients receiving chemotherapy: a literature review. *Med Pediatr Oncol* 1996; 26: 344-51.
9. Hachimi-Idrissi S, Schots R, DeWolf D, Van Belle SJ, Otten J. Reversible cardiopathy after accidental overdose of mitoxantrone. *Pediatr Hematol Oncol* 1993; 10: 35-40.
10. Projet des Bonnes Pratiques de pharmacie hospitalière, 1^{re} édition, juin 2001. http://www.sante.gouv.fr/htm/actu/bpph/rap_bpph.pdf

11. Moffat A, Osselton D, Widdop B, Gallichet L. 3rd Clark's Analysis of drugs and poisons. 2004.
12. Monographie Cytarabine. Pharmacopée européenne 5^e édition, tome 2, 1492-3, janvier 2005.
13. Moller H. Quality concept of parenterals in Europe. J Pharm Sci Technol 1995; 4; 196-201.
14. Chapuzet E, Mercier N, Bervoas-Martin S. Example of application of the new strategy proposed for the validation of chromatographic bioanalytical methods. STP Pharma Pratiques 2000; 10: 79-101.
15. Boulanger B, Chapuzet E, Cohen N. Validation des procédures analytiques quantitatives : harmonisation des démarches. STP Pharma Pratiques 2003 ; 13 : 101-38.
16. Uniformité de teneur des préparations unidoses. Pharmacopée européenne 5^e édition, tome 1, 248, janvier 2005.
17. Paci A, Mercier L, Bourget P. Identification and quantification of antineoplastic compounds in chemotherapeutic infusion bags by use of HPTLC: application to the vinca-alkaloids. J Pharm Biomed Anal 2003; 30: 1603-10.
18. Collin C, Camus M, Alboussière M, Brion F. Validation du dosage de Méthotrexate par spectrophotométrie UV pour le contrôle de teneur des préparations injectables réalisées par la pharmacie. Act Pharm Biol Clin 2005 ; 12 : 369-74.