

# Master en Pharmacie

## Travail Personnel de Recherche

### Développement et validation d'une méthode UHPLC-UV pour l'analyse des catécholamines en milieu hospitalier

présenté à la

Faculté des sciences de  
L'Université de Genève

par

**Diellëza Zeçiri**

**Unité de recherche**

Pharmacie Centrale du CHUV,  
Unité de contrôle-qualité

**Directeur de l'unité**

Prof. Farshid Sadeghipour

**Autres responsables**

Dr Julian Pezzatti

Genève  
Année académique 2024-2025

## Remerciements

J'ai eu l'opportunité de réaliser mon travail personnel de recherche dans le laboratoire de contrôle-qualité à la Pharmacie centrale du Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV). Durant ces 25 semaines, j'ai été entourée par de nombreuses personnes, offrant une dimension à la fois collective et personnelle à cette expérience. Je souhaiterais témoigner ma reconnaissance à toutes celles et ceux qui, de près ou de loin, ont participé à ce travail et au succès de mon stage.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude au Professeur Farshid Sadeghipour, pharmacien-chef du service de la Pharmacie du CHUV, pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser mon travail de Master à la pharmacie centrale du CHUV, au sein de son équipe. Je le remercie pour son accueil et la confiance qu'il m'a accordée durant ce projet.

Je remercie chaleureusement le Docteur Julian Pezzatti, pharmacien responsable de l'unité de contrôle-qualité de la Pharmacie Centrale du CHUV, pour sa disponibilité, sa patience, sa bienveillance, sa sympathie ainsi que pour ses conseils et ses suggestions qui ont rendu possible la concrétisation de ce travail. J'ai pris beaucoup de plaisir à travailler à ses côtés. Cette expérience a été très enrichissante et je lui en suis extrêmement reconnaissante.

Mes remerciements vont également au Docteur William Bello pour ses précieux conseils qui m'ont permis de mener à bien ce projet de Master, ainsi que pour son soutien, son humour et la passion avec laquelle il a su partager son expertise.

Un grand merci au Docteur Marko Krstić pour ses suggestions et conseils en matière d'écriture de rapport scientifique.

J'adresse mes remerciements à tous mes collègues du laboratoire de contrôle-qualité, pour le soutien qu'ils m'ont apporté tout au long de mon travail personnel de recherche : Christine Dorel, David Ney Gonzalez, Marine Champod, Shella Clément, Corinne Hemmerlin, Juliette Reda, Maxime Chastaing et Ariel Manase.

Je remercie tous les collaborateurs et collaboratrices de la Pharmacie centrale du CHUV pour leur accueil chaleureux, leur bienveillance et leur générosité lors de nos échanges.

Enfin, je ne saurais oublier ma famille et mes amis pour leur soutien, leur encouragement et leur confiance, qui ont été une source de motivation tout au long de ce projet et durant ces cinq années d'étude.

## Résumé

### Introduction et objectifs

Les catécholamines, puissants vasoconstricteurs et inotropes, sont des médicaments injectables administrés à l'hôpital dans des situations où le pronostic vital des patients est engagé, comme lors : de choc anaphylactique, réanimation cardiopulmonaire, hypotension aigue ou crise d'asthme. L'identification et le dosage de ces molécules dans les spécialités médicamenteuses utilisées permettraient, d'une part, de mettre en lumière l'origine des erreurs médicamenteuses commises par les unités de soins et, d'autre part, de pouvoir analyser les productions internes en cas de rupture de stock des fournisseurs.

L'objectif de ce travail de recherche était de développer et valider une méthode UHPLC-UV pour l'analyse de l'adrénaline (E), la noradrénaline (NE), la dopamine (DA), la dobutamine (DOB) et l'isoprénaline (IPN), en vue d'un usage en routine en pharmacie hospitalière.

### Matériels et méthodes

Diverses phases stationnaires RPLC et HILIC (7 au total), différents systèmes de solvants, différents pH (acide ou basique) et concentrations (10, 30 et 50 mM) de tampons ont été investigués en utilisant une méthode de gradient générique. Un système de score, basé sur les critères du temps de rétention, de l'intensité relative, de l'asymétrie et de la largeur à mi-hauteur, a été développé afin de pouvoir comparer les différentes méthodes et sélectionner la méthode la plus performante. Suite à cela, la méthode analytique a été optimisée afin de réduire le temps d'analyse et d'améliorer l'aspect des pics chromatographiques. Différentes conditions de dégradation forcée, telles que l'hydrolyse acide (HCl 0.5 M) et basique (NaOH 0.5 M), l'oxydation (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3.5 %) et de température (25 et 60°C), ont été testées sur l'adrénaline, la noradrénaline, la dopamine et l'isoprénaline. L'étude de dégradation forcée a été menée sur 5 jours. Enfin, la méthode UHPLC-UV a été validée pour ces quatre mêmes molécules, en suivant les normes ICH Q2(R2). La procédure de validation et une courbe fonction-réponse (3 niveaux, 3 répétitions de mesure) ont été réalisées sur 5 jours consécutifs (5 séries) pour chacune des 4 molécules.

### Résultats et discussion

Plus de 20 méthodes ont été testées et plus de 300 scores ont été générés. Les conditions les plus favorables à l'établissement de la méthode analytique ont pu être identifiées : pH acide, tampon ammonium formate 30 mM, débit 0.5 mL/min. La colonne chromatographique zwitterionique BEH Z-HILIC a été identifiée comme la plus performante. La méthode gradient a été optimisée : 5.20 min d'analyse, séparation à la ligne de base pour les 5 molécules. La dégradation forcée a montré une stabilité de l'E, la NE, la DA et l'IPN aux températures testées. Une dégradation similaire (environ 60%) en conditions d'oxydation et d'hydrolyse acide ont été observée. La dégradation des molécules en conditions basiques était totale sur 5 jours. Cela a permis de montrer que les produits de dégradations n'interféraient pas avec l'analyse des catécholamines d'intérêt. Pour la validation, la limite d'acceptation a été fixée à 6% pour l'E, la NE et l'ISP et à 5% pour la DA. Les résultats obtenus entraient dans les limites fixées et les incertitudes de mesure étaient toutes inférieures à 5% pour les 4 molécules.

### Conclusions et perspectives

La méthode développée et validée est spécifique, robuste et permet un débit d'analyse élevé. Elle pourra être utilisée en routine pour identifier et quantifier les catécholamines au Service de Pharmacie du CHUV lors de productions en série ou lors d'investigations qualité sécurité patients.

Un mode de détection MS et/ou MS/MS pourrait être utilisé afin de caractériser les différents produits de dégradations. Le système de score pourrait être amélioré en prenant en compte un critère supplémentaire : la sélectivité. La qualité de la séparation des pics serait alors pris en compte dans l'évaluation des méthodes. Enfin, des investigations plus approfondies permettrait de vérifier si la méthode analytique peut être transférée dans d'autres hôpitaux ou laboratoires. Le champ d'application de la méthode pourrait être élargi à d'autres sympathomimétiques et le couplage à une deuxième colonne chromatographique de mode différent (RPLC) permettrait peut-être l'analyse de la dobutamine en plus de celle de l'adrénaline, la noradrénaline, la dopamine et l'isoprénaline. Il s'agirait alors d'un système de chromatographie liquide bidimensionnelle (LC-2D).

## Liste des abréviations

<b>ACN</b>	Acétonitrile
<b>AF</b>	Ammonium formate
<b>CHUV</b>	Centre hospitalier universitaire vaudois
<b>CS<sub>M</sub></b>	Solution mère de calibration
<b>CStd</b>	Standards de calibration
<b>DA</b>	Dopamine
<b>DAD</b>	Spectrophotomètre à barrettes de diodes
<b>DOB</b>	Dobutamine
<b>E</b>	Adrénaline (ou Epinéphrine)
<b>HILIC</b>	Chromatographie liquide à réaction hydrophile
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Eau
<b>HPLC</b>	Chromatographie en phase liquide
<b>ICH</b>	Conseil international d'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain
<b>IPN</b>	Isoprénaline
<b>LOD</b>	Limite de détection
<b>LOQ</b>	Limite de quantification
<b>NE</b>	Noradrénaline (ou Norépinéphrine)
<b>NPLC</b>	Chromatographie liquide en phase normale
<b>PhEur</b>	Pharmacopée européenne
<b>RPLC</b>	Chromatographie liquide en phase inverse
<b>Rs</b>	Résolution
<b>S<sub>M</sub></b>	Solution mère
<b>t<sub>R</sub></b>	Temps de rétention
<b>UHPLC</b>	Chromatographie liquide à ultra haute performance
<b>UV</b>	Rayonnement ultra-violet
<b>VS<sub>M</sub></b>	Solution mère de validation
<b>VStd</b>	Standards de validation

## Table des matières

1. Introduction	1
1.1. Les catécholamines	1
1.1.1. Rôle physiologique et pharmacologique des catécholamines	1
1.2. Contexte du travail de recherche	2
1.3. Méthodes d'analyse des catécholamines investiguées	3
1.3.1. Caractéristiques physico-chimiques des catécholamines	3
1.3.2. Principe de la chromatographie liquide (UHPLC)	4
1.3.3. Colonnes de chromatographie liquide à ultra haute performance (UHPLC)	5
1.3.4. La spectrophotométrie UV-Vis	6
1.3.5. Essai de dégradation forcée des catécholamines	6
1.3.6. Validation d'une méthode analytique	7
1.4. But du travail de recherche	7
2. Matériel et méthode	8
2.1. Produits chimiques et instruments	8
2.2. Paramétrage de l'instrument et conditions d'analyse (UHPLC-UV)	9
2.3. Logiciels informatiques	10
2.4. Etapes du développement et de la validation de la méthodes UHPLC-UV	10
2.4.1. Investigation des différentes colonnes chromatographiques	10
2.4.2. Développement du score pour évaluer la performance des colonnes UHPLC	11
2.4.3. Optimisation de la méthode analytique UHPLC-UV	12
2.4.4. Estimation des limites de détection et quantification des catécholamines	12
2.4.5. Essai de dégradation forcée	12
2.4.6. Validation de la méthode analytique UHPLC-UV	13
2.5. Préparation et conservation des solutions pendant le développement et la validation de la méthode UHPLC-UV	13
3. Résultats et discussion	14
3.1. Développement de la méthode analytique UHPLC-UV	14
3.1.1. Investigation des différentes colonnes chromatographiques RPLC	14
3.1.2. Investigation des différentes colonnes chromatographiques HILIC	15
3.1.3. Développement du score pour évaluer la performance des colonnes UHPLC	16
3.1.4. Optimisation de la méthode analytique et méthode finale	18
3.2. Essai de dégradation forcée des catécholamines	21
3.3. Validation de la méthode analytique	23
3.3.1. Estimation des limites de détection et quantification des catécholamines	23
3.3.2. Fonctions réponses des différentes molécules validées et linéarité	24
3.3.3. Résultats de validation de l'E, la NE, la DA et l'IPN	24
3.3.4. Validation de l'adrénaline (E)	25
3.3.5. Validation de la noradrénaline (NE)	27
3.3.6. Validation de la dopamine (DA)	28
3.3.7. Validation de l'isoprénaline (IPN)	29
4. Conclusion et perspectives	30

## Table des figures

Figure 1 : Répartition des différents sous-types de récepteurs adrénergiques et effet physiologique..	1
Figure 2 : Représentation moléculaire des cinq catécholamines étudiées (E, NE, DA, IPN et DOB)...	3
Figure 3 : Représentation schématique de l'instrument de chromatographie liquide (LC) .....	5
Figure 4 : Schématisation de l'équilibre complexe dans une colonne HILIC zwitterionique en conditions d'analyse d'une catécholamine .....	6
Figure 5 : Evolution de la proportion de phase mobile C et d'eau [%] en fonction du temps [min] dans la méthode développée et validée pour l'analyse des catécholamines .....	10
Figure 6 : Préparations des témoins et des échantillons d'analyse pour la dégradation forcée .....	13
Figure 7: Schéma de la méthode de validation .....	13
Figure 8 : Chromatogrammes des 5 catécholamines (50 µg/mL) avec une colonne hydrophobe (BEH C8).....	14
Figure 9 : Chromatogramme des 5 catécholamines (50 µg/mL) avec une colonne HILIC (BEH Amide) .....	15
Figure 10 : Performances comparées des colonnes chromatographiques par analyses des scores ...	17
Figure 11 : Chromatogramme de l'analyse du mélange des 5 catécholamines avec la méthode gradient finale .....	18
Figure 12 : Influence de l'effet de sel sur les résultats de la méthode.....	20
Figure 13 : Superposition des 20 analyses du mélange des 5 catécholamines avec la méthode gradient finale .....	20
Figure 14 : Evolution de la quantité d'adrénaline au fil du temps en conditions acide, basique, oxydative et à température ambiante et élevée.....	21
Figure 15 : Superposition des résultats chromatographiques obtenus pour la dégradation forcée de l'E en condition acide (J0 à J4) et contrôle acide (J0).....	22
Figure 16 : Superposition des résultats chromatographiques obtenus pour la dégradation forcée de la NE en condition acide (J0 à J4) et témoin à 25°C (J0) .....	22
Figure 17 : Superposition des résultats chromatographiques obtenus pour la dégradation forcée de l'IPN en condition basique (J0), témoin à 25°C (J0) et contrôle basique (J0) .....	23
Figure 18 : Profil d'exactitude relatif de la méthode pour la quantification de l'adrénaline .....	25
Figure 19 : Profil d'incertitude relatif de la méthode pour la quantification de l'adrénaline .....	26
Figure 20 : Profil d'exactitude relatif de la méthode pour la quantification de la noradrénaline .....	27
Figure 21 : Profil d'incertitude relatif de la méthode pour la quantification de la noradrénaline.....	27
Figure 22 : Profil d'exactitude relatif de la méthode pour la quantification de la dopamine .....	28
Figure 23 : Profil d'incertitude relatif de la méthode pour la quantification de la dopamine.....	28
Figure 24 : Profil d'exactitude de la méthode pour la quantification de l'isoprénaline .....	29
Figure 25 : Profil d'incertitude relatif de la méthode pour la quantification de l'isoprénaline .....	29

## Table des tableaux

Tableau 1 : Affinité de l'E, la NE, la DA, l'IPN et la DOB pour les sous-types de récepteurs adrénergiques et leurs effets cliniques prédominants .....	1
Tableau 2 : Caractéristiques physicochimiques des catécholamines étudiées (E, NE, DA, IPN, DOB) ..	4
Tableau 3 : Critères de validation en fonction du type de procédure analytique .....	7
Tableau 4 : Caractéristiques des différentes colonnes chromatographiques testées .....	9
Tableau 5 : Méthode gradient développée et validée pour l'analyse des catécholamines .....	10
Tableau 6 : Phases mobiles utilisées lors de l'optimisation de la méthode d'analyse des catécholamines .....	12
Tableau 7 : Sélection des meilleurs scores obtenus et conditions associées pour l'analyse des cinq catécholamines .....	18
Tableau 8 : Temps de rétention (tR) des catécholamines avec la méthode analytique finale .....	21
Tableau 9 : Moyennes des fonctions réponses expérimentale de l'E, la NE, la DA et l'IPN .....	24
Tableau 10 : Profils d'exactitude relatifs de l'adrénaline, la noradrénaline, la dopamine et l'isoprénaline .....	25

## 1. Introduction

### 1.1. Les catécholamines

#### 1.1.1. Rôle physiologique et pharmacologique des catécholamines

Les catécholamines, telles que la dopamine (DA), l'adrénaline (ou épinéphrine (E)) et la noradrénaline (ou norépinéphrine (NE)), constituent une famille de composés organiques produits de manière endogène par le corps humain afin de maintenir et réguler plusieurs fonctions physiologiques, en permettant notamment une augmentation de la fréquence cardiaque, une bronchodilatation, une relaxation des muscles lisses des intestins et de l'estomac, une augmentation de la pression artérielle, une mydriase et une vasodilatation au niveau des muscles squelettiques. Sécrétées dans des situations de stress, elles conditionnent le corps à l'action. Ainsi, la réponse physiologique des catécholamines est souvent décrite comme une réponse « *fight-or-flight* » (1,2). Les effets des catécholamines sont liés à leur action sur les récepteurs adrénergiques, localisés au niveau des neurones du système nerveux périphérique et central, ainsi que sur différents tissus et organes du corps, tels que : le cœur (récepteurs  $\beta_1$ ), les poumons (récepteurs  $\beta_2$ ), le système digestif (récepteurs  $\alpha_1$ ,  $\beta_2$ ), les vaisseaux périphériques (récepteurs  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ), les yeux ( $\alpha_1$ ) et les muscles squelettiques ( $\beta_2$ ) (1–4). La Figure 1 illustre la répartition des différents sous-types de récepteurs dans les différents organes et tissus chez l'humain.

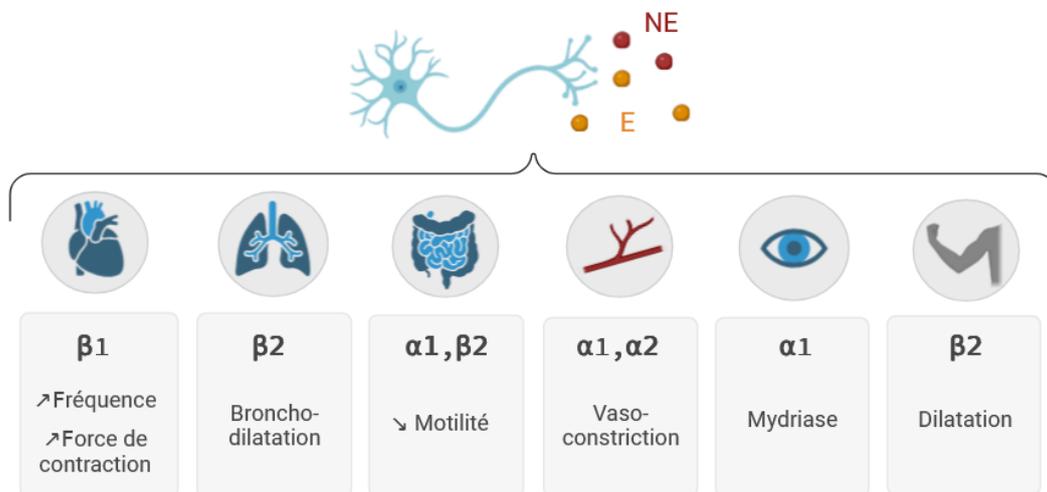


Figure 1 : Répartition des différents sous-types de récepteurs adrénergiques et effet physiologique

Réalisé sur BioRender

Outre leur rôle physiologique naturel, les catécholamines forment également une famille de médicaments utilisés pour le traitement d'un large éventail de pathologies. Elles constituent la classe thérapeutique des agonistes adrénergiques (ou des sympathomimétiques), leurs effets étant liés à leur affinité plus ou moins élevée pour les différents sous-types de récepteurs illustrés en Figure 1 et décrits dans le Tableau 1 (5,6).

Tableau 1 : Affinité de l'E, la NE, la DA, l'IPN et la DOB pour les sous-types de récepteurs adrénergiques et leurs effets cliniques prédominants

Médicament	Activité sur les récepteurs			Effets cliniques prédominants
	$\alpha_1$	$\beta_1$	$\beta_2$	
Adrénaline	+++	++++	+++	Vasoconstriction, débit cardiaque ↓ / ↑ *
Noradrénaline	+++++	+++	+	Vasoconstriction, débit cardiaque ↔ / ↑
Dopamine	++	+++	+	Vasoconstriction, débit cardiaque ↑ *
Dobutamine	+	++++	+++	Vasodilatation, débit cardiaque ↑
Isoprénaline	+	+++	+++	Vasodilatation, débit cardiaque ↑

\*L'activité et l'effet clinique sont dose-dépendants. Pour l'adrénaline, le débit cardiaque augmente à forte dose. Pour la dopamine, les données correspondent à une dose de 5-10 mcg/kg/min.

Tableau inspiré de (5), informations tirées de (5,6).

Les catécholamines sont des molécules à court délai d'action (quelques secondes), qui nécessitent une administration par voie intraveineuse, intramusculaire ou sous-cutanée. Ces caractéristiques, couplées à leur effet physiologique en font d'excellents choix thérapeutiques lorsque le pronostic vital des patients est en jeu. L'adrénaline, par exemple, est utilisée en cas de choc anaphylactique, d'hypersensibilité immédiate ou de choc septique. De plus, elle possède de nombreuses indications off-label comme pour les cas de bloc atrioventriculaire, choc cardiogénique, hypotension sévère et état de choc post-infarctus (7). L'administration de la noradrénaline est réservée au traitement du choc cardiogénique et du choc post-arrêt cardiaque (8). Elle constitue le choix de première ligne dans le traitement du choc septique, car elle semble offrir une meilleure prévention des troubles du rythme cardiaque par rapport aux autres vasodilatateurs (8–11).

En ce qui concerne la dopamine, son usage s'inscrit dans le contexte d'un choc hypotensif (comme traitement adjuvant), lors d'un bloc atrioventriculaire (indication off-label) ou en tant que support inotropique et/ou hémodynamique (12). La balance bénéfice-risque de ce traitement ne permet pas son usage en premier choix dans le traitement du choc septique (9,10,13). En effet, la dopamine a une faible marge thérapeutique, et, comme le débit rénal est affecté, les concentrations plasmatiques de dopamine sont imprévisibles (9,13). Mais elle reste intéressante chez les patients souffrant d'une bradycardie absolue ou relative et à faible risque de tachyrythmie (5). De la même manière, la dobutamine (DOB) n'est pas recommandée en premier choix dans le traitement des chocs, en raison de son action inotrope (et non vasopresseur). Ceci est lié à son effet agoniste des récepteurs  $\beta_1$  qui entraînent un effet inotrope et chronotrope. Elle diminue également la pression dans le ventricule gauche. L'insuffisance cardiaque sévère réfractaire ainsi que le choc cardiogénique font ainsi partie de ces indications principales (5,14).

Quant à l'isoprénaline (ou isoproterenol (IPN)), agoniste des récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ , elle est également un agent inotrope et chronotrope (5). Elle est administrée pour le traitement du choc cardiogénique dû à une bradycardie sévère de 3<sup>e</sup> degré (5,15).

Si elles sont employées à ces fins en milieu hospitalier, le choix de la catécholamine à utiliser est un sujet de controverse. Il dépend des habitudes de chaque praticien et de la réponse physiologique du patient (9,10,16,17,18). Dès lors, plusieurs catécholamines figurent dans la liste des médicaments du Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV) : l'adrénaline, la noradrénaline, la dopamine, la dobutamine et l'isoprénaline (19). L'analyse de ces molécules fait l'objet de ce travail de recherche.

## 1.2. Contexte du travail de recherche

La préparation et l'administration des catécholamines sont des actes médicaux critiques souvent réalisés dans des conditions de travail réunissant des patients au pronostic vital engagé, des interventions médicales compliquées et un environnement de travail marqué par le stress des équipes soignantes. Cette situation accroît le risque d'erreurs médicamenteuses, qui peuvent mener à des complications ou à des échecs thérapeutiques (20–24).

L'erreur médicamenteuse, traduite comme « *un événement évitable qui peut causer ou mener à l'utilisation inappropriée de la médication ou au préjudice du patient pendant que le médicament est sous le contrôle du professionnel de la santé, du patient ou du consommateur* » (23), représente l'événement indésirable le plus courant dans les hôpitaux en terme de nombre et de mortalité, entraînant ainsi des conséquences économiques en plus du préjudice causé aux patients (25,26).

En Suisse, d'après la fondation *Sécurité des patients*, un patient sur dix subit des dommages suite à des erreurs de médication ou des effets indésirables et, chaque année, 20 000 séjours à l'hôpital suite à des problèmes de médication sont dénombrés (27). Selon un rapport FMH datant de 2012, les coûts directs engendrés par les erreurs médicamenteuses sont estimés entre 70 et 100 millions de francs suisse (28).

Au sein du CHUV, des investigations qualité sont menées dans le but de déceler et corriger les potentielles lacunes dans les protocoles de préparation lorsque ce type d'événements indésirables ont lieu. Des investigations qualité concernant l'administration de catécholamines ont révélé que les soignants référents contactent régulièrement la Pharmacie Centrale pour analyser des poches ou des seringues administrées.

La littérature scientifique recense de nombreuses méthodes analytiques pour le dosage des catécholamines. Il s'agit, en général, de méthodes UHPLC couplées à des méthodes de détection comme la spectrométrie de masse (MS), la fluorescence, voire une détection électrochimique. Ces

méthodes sont utilisées pour l'analyse des catécholamines endogènes dans des échantillons biologiques (plasma ou urine).

L'article de *Meilin Juan et al.* (2023), par exemple, décrit une méthode UHPLC-MS/MS permettant l'analyse de l'adrénaline, la noradrénaline, la dopamine ainsi que la méthanéprine, la norméthanéprine et la 2-méthoxytyramine dans le plasma pour le diagnostic de phéochromocytomes et/ou de paragangliomes (29). Plus récemment, une revue sur le mécanisme de rétention de l'adrénaline et la noradrénaline sur une colonne échangeuse d'ions est également parue dans le *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (30).

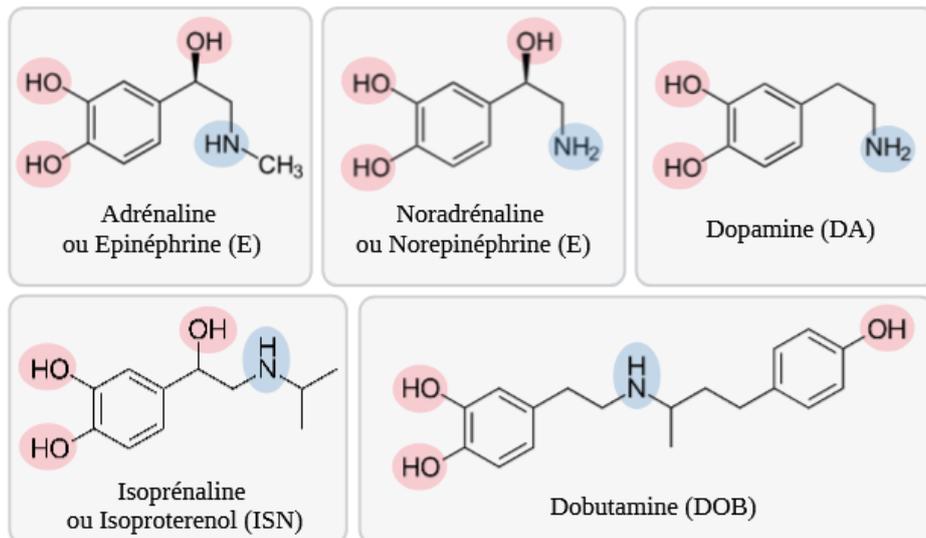
Cependant, aucune des méthodes analytiques trouvées ne permet de spécifiquement identifier et quantifier les cinq molécules d'intérêt utilisées à l'hôpital, dans des préparations pharmaceutiques. C'est dans ce contexte qu'intervient le présent travail de recherche, qui vise à développer une méthode d'analyse adaptée, simple, spécifique, robuste et rapide. Au vu du contexte hospitalier dans lequel s'inscrit ce projet, l'utilisation des instruments disponibles et connus des opérateurs est primordiale, afin que l'implémentation de la procédure pose le moins de difficultés possibles lors du passage en routine. La méthode utilisée pour mener ce projet est la chromatographie liquide à ultra haute performance (UHPLC) couplée à la détection par un détecteur à barrette de diodes (DAD), capable de caractériser un mélange complexe (*cf.* 1.3).

### 1.3. Méthodes d'analyse des catécholamines investiguées

Le choix de la méthode analytique repose sur divers critères, dont : le type de substance à analyser, la sensibilité de l'instrument, le coût, la rapidité d'obtention des résultats ainsi que la précision et l'exactitude de la méthode (31,32). Les caractéristiques physico-chimiques des catécholamines d'intérêt seront abordées, suivies du principe de l'UHPLC et de la méthode de détection DAD, ainsi que du principe de la dégradation forcée et de la validation de la méthode analytique.

#### 1.3.1. Caractéristiques physico-chimiques des catécholamines

Les catécholamines possèdent des structures chimiques communes : un groupement catéchol et un groupement amine, comme illustré dans la Figure 2 (3).



**Figure 2 : Représentation moléculaire des cinq catécholamines étudiées (E, NE, DA, IPN et DOB)**

Réalisé sur Chemdraw (33) et BioRender, inspiré de la base de données Chemicalize (Chemaxon) (34)

L'adrénaline, la noradrénaline, la dopamine et l'isoprénaline diffèrent notamment par la longueur de la chaîne alkyle greffée sur le noyau catéchol ainsi que par les groupements chimiques qui composent ladite chaîne. Ainsi, comparé à la noradrénaline, l'adrénaline possède un groupement méthyle additionnel (et donc une amine de type secondaire). La noradrénaline est une molécule légèrement plus polaire que l'adrénaline, (*cf.* les valeurs du logP contenues dans le Tableau 2). La dopamine, quant à elle, diffère de la noradrénaline par l'absence d'un groupement hydroxyle, ce qui diminue sa polarité. L'isoprénaline possède une amine tertiaire. La terminaison isopropyle augmente la lipophilie, et donc le logP.

Ces quatre catécholamines sont considérées comme polaires, puisqu'elles possèdent des valeurs de logP proches de 0 (cf. Tableau 2), contrairement la dobutamine (logP = 2.653). Un comportement différent lors de leur séparation en UHPLC peut être attendu (cf. 1.3.2). La présence d'une chaîne alkyle ainsi que le groupement phénol sont à l'origine de cette différence de lipophilicité.

Les fonctions hydroxyles et amines peuvent respectivement être déprotonées et protonées, en fonction du pH de la solution préparée. Les valeurs des pKa des fonctions basiques et acides étant assez proches (différence d'environ 1 unité), il est attendu que les pH basiques posent des difficultés. En effet, plusieurs états de charges pour chacune des molécules risquent d'être présents à un pH proche de  $9 \pm 1$ . Ceci est à prendre en compte pour le développement de la méthode. La lipophilicité pouvant varier en fonction du pH de la solution, les valeurs estimées du coefficient de distribution (logD) à des pH acide et basique sont présentées dans le Tableau 2 (34). Seul le pKa de la fonction acide la plus forte figure dans le Tableau 2.

**Tableau 2 : Caractéristiques physicochimiques des catécholamines étudiées (E, NE, DA, IPN, DOB)**

Molécules	M [g/mol]	pKa (base)	pKa (acide)	logP	logD (pH = 1.7)	logD (pH = 8.0)
Adrénaline	183.207	8.91	9.69	-0.43	-2.95	-1.08
Noradrénaline	169.180	8.81	9.47	-0.65	-3.17	-1.22
Dopamine	153.181	9.31	9.99	0.10	-2.25	-0.88
Dobutamine	301.377	9.35	10.16	2.65	0.54	1.62
Isoprénaline	211.261	9.81	8.96	0.24	-2.17	-0.45

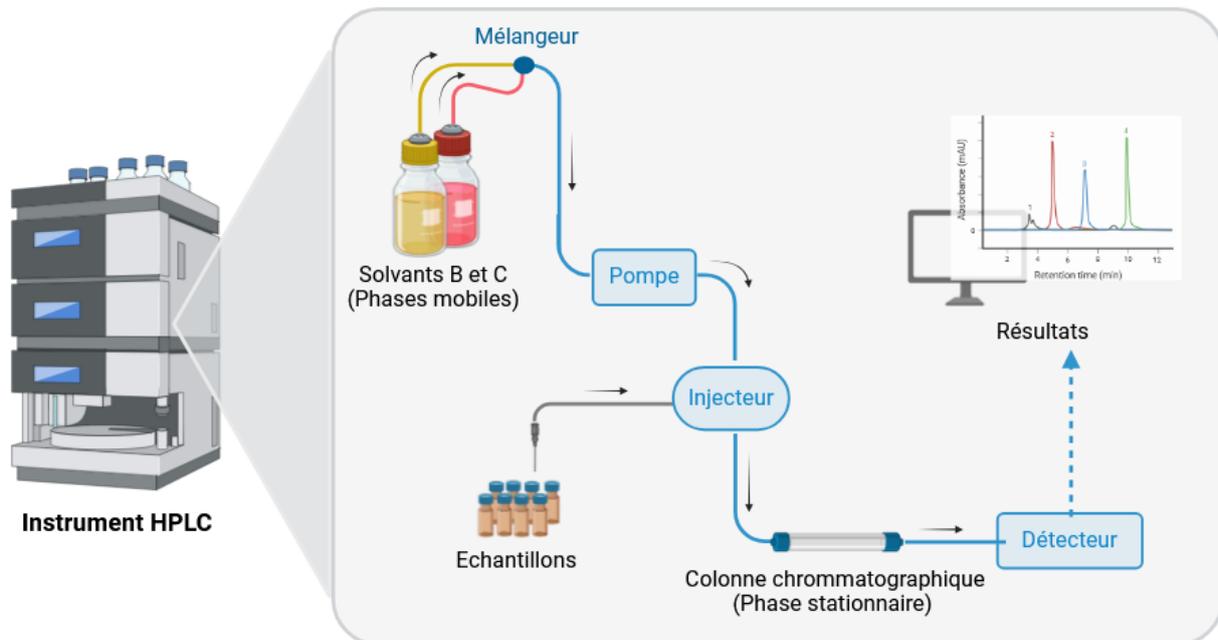
Les catécholamines sont des molécules sensibles à la lumière. Ainsi, des précautions devront être prises durant le développement et la validation de la méthode (cf. 2.5).

### 1.3.2. Principe de la chromatographie liquide (UHPLC)

La chromatographie liquide à ultra haute performance (UHPLC) est une technique analytique permettant la séparation physique des composés en fonction de leur partage/distribution entre deux phases non miscibles et de polarité opposées : la phase stationnaire et la phase mobile (35,36). La notion d'« ultra haute performance » est reliée au pouvoir de séparation qu'offre la colonne ainsi qu'à la rapidité de l'analyse (37).

L'instrument est composé de plusieurs modules illustrés en Figure 3. La pompe permet la circulation constante, fluide et reproductible des phases mobiles dans l'ensemble du système. La phase mobile est généralement composée de deux solvants hydro-organiques miscibles et de polarité opposée : la phase B (polaire) et la phase C (apolaire). Les solvants sont choisis en fonction de leur polarité, de leur miscibilité, de la nature des analytes et de leur compatibilité avec la colonne chromatographique utilisée. La régulation du débit de la phase mobile et de sa composition est essentielle pour une séparation optimale des molécules (35,36).

Un volume prédéfini d'échantillon est ensuite prélevé par l'autosampler puis injecté dans le flux de phase mobile. Les analytes sont ensuite entraînés par la phase mobile jusque dans la colonne (ou phase stationnaire). La colonne permet de retenir les composés par le biais d'interactions chimiques. Elle est placée dans un four permettant de fixer et d'assurer une température stable au cours des analyses. Les interactions de l'analyte avec les phases stationnaire et mobile déterminent le temps que le composé va passer dans la colonne chromatographique. Plus les interactions entre l'analyte et la phase stationnaire seront fortes, plus il sera retenu dans la colonne. Le temps de rétention ( $t_R$ ) du composé sera donc élevé. Au contraire, plus l'adsorption d'un composé sur la colonne est faible, plus il sera élué rapidement par le système de phases mobiles et plus le  $t_R$  sera faible. L'affinité de la molécule pour la phase mobile et la phase stationnaire est déterminée par son coefficient de partage (logP) si elle est neutre ou par le coefficient de distribution (logD) si la molécule est ionisée ou non à un pH donné. Ainsi, le pH de la phase mobile aqueuse peut être ajusté par l'ajout de sels ou d'additifs, afin de maintenir les molécules dans un état de charge déterminé. Enfin, les analytes séparés sont entraînés devant un détecteur. Ce dernier est choisi en fonction du type d'analyte (chromophore, possibilité d'ionisation, ...) et des caractéristiques d'intérêt (masse de l'analyte, absorbance, etc.) (35,36). de ce projet, un détecteur DAD a été utilisé (cf. Paragraphe 1.3.4).



**Figure 3 : Représentation schématique de l'instrument de chromatographie liquide (LC)**

Réalisé sur BioRender, inspiré de (36)

### 1.3.3. Colonnes de chromatographie liquide à ultra haute performance (UHPLC)

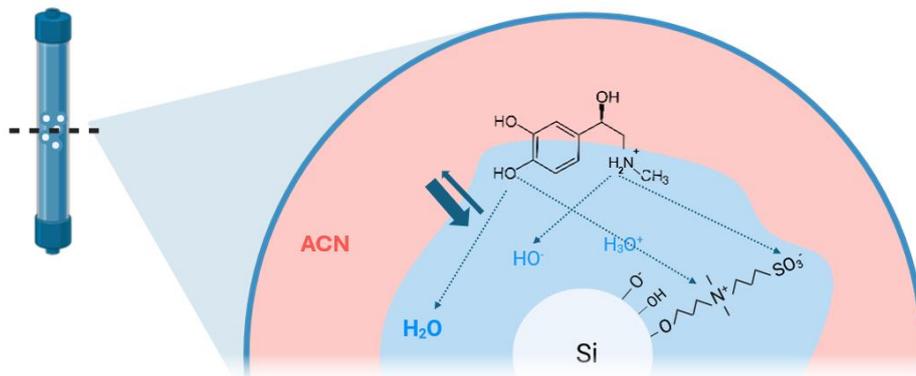
Les colonnes chromatographiques se caractérisent par leurs dimensions (longueur, diamètre interne et externe, taille des pores) ainsi que par les groupements chimiques composant la phase stationnaire. Ces critères influencent la qualité des interactions entre les analytes et la phase stationnaire et, ainsi, la qualité de leur séparation (32,35,38). En UHPLC, les colonnes sont remplies de particules de silice qui se différencient de par leur taille réduite ( $\leq 2 \mu\text{m}$ ), permettant d'accroître la surface de contact entre l'analyte et la phase stationnaire. Les billes de silice peuvent être poreuses ou superficiellement poreuses. Les interactions étant augmentées, la séparation des molécules en est améliorée et la vitesse des analyses est augmentée. La pression dans une colonne UHPLC peut monter jusqu'à 1500 bars (37–39). L'UHPLC permet de réduire le temps d'analyse tout en maintenant une bonne efficacité de séparation (38).

Le choix de la colonne chromatographique dépend de la nature des composés à séparer. Il existe plusieurs modes de chromatographie liquide, dont la phase inverse (RPLC), la phase normale (NPLC) et la chromatographie liquide d'interaction hydrophile (HILIC).

La RPLC est caractérisée par l'utilisation d'une phase stationnaire apolaire, formée par des particules de silice sur lesquelles sont greffées des chaînes alkyles (C8 ou C18), par exemple. Une phase mobile hydro-organique est utilisée. Ce mode permet l'analyse de composés apolaires ou moyennement polaires, qui seront retenus par interactions hydrophobes dans la colonne. Il s'agit du mode chromatographique le plus utilisé, de par sa haute efficacité, sa robustesse ainsi que sa compatibilité avec la MS. Ce mode ne permet pas en revanche l'analyse de composés polaires (40,41). Dans ce cas, d'autres modes peuvent être utilisés. La NPLC, par exemple, se distingue par l'utilisation de solvant organique non miscible à l'eau (phase mobile) ainsi que d'une colonne chromatographique polaire (phase stationnaire). Les composés hydrophobes contenant un petit groupement polaire sont de parfaits candidats pour ce type d'analyse. L'utilisation de la NPLC est très restreinte, car les solvants organiques utilisés sont très toxiques, inflammables et polluants. Les résultats présentent une mauvaise répétabilité et ce mode ne peut pas être couplé à la MS (42).

Le mode HILIC, introduit pour la première fois par le Dr Andrew Alpert en 1990, permet l'analyse des composés polaires. Ce mode est souvent décrit comme étant un variant de la NPLC, notamment car les colonnes chromatographiques utilisées sont polaires. L'HILIC diffère de par l'utilisation d'une phase mobile contenant un pourcentage élevé de solvant organique polaire, aprotique et miscible à l'eau (généralement l'ACN). Une fine couche d'eau se forme alors à la surface de la colonne. Le partage des molécules s'opère alors entre la phase stationnaire polaire et la couche d'eau adsorbée sur la colonne, générant un mode de rétention impliquant diverses interactions, dont des interactions dipôle-dipôle, des liaisons hydrogène et des interactions ioniques. L'aproticité du solvant organique utilisé est primordiale

afin de ne pas entraver les liaisons hydrogènes formées entre les analytes et la phase stationnaire. Les phases stationnaires peuvent être composées de silice pure, de groupements amides, de diols ou encore de zwitterions (ex : groupements sulfobétaïnes) (43–45). La complexité de cet équilibre est schématisé dans la Figure 4.



**Figure 4 : Schématisation de l'équilibre complexe dans une colonne HILIC zwitterionique en conditions d'analyse d'une catécholamine**  
Réalisé sur BioRender, inspiré de (45)

Dans le cadre de ce travail, sept colonnes de dimensions comparables ont été présélectionnées et testées (cf. 2.1).

#### 1.3.4. La spectrophotométrie UV-Vis

La spectrophotométrie UV-Vis est une technique analytique de détection largement employée de par ses nombreux avantages : simple d'utilisation, méthode rapide, qualitative et quantitative. Dans le domaine pharmaceutique, elle est utilisée pour effectuer des tests d'identification de substance ainsi que pour leur dosage (32,46,47).

Cette technique analytique est basée sur la capacité d'une substance ou d'un milieu à absorber la lumière qui la traverse. En d'autres termes, les électrons qui composent la couche externe des orbitales moléculaires peuvent utiliser l'énergie lumineuse (photons) pour transitionner sur une orbitale plus haute en énergie. Pour que cette transition puisse avoir lieu, il est essentiel que la longueur d'onde de la lumière ait l'énergie requise pour déplacer l'électron d'un niveau d'énergie au niveau supérieur. Les transitions entre les niveaux d'énergie des orbitales sont distinctes. Il existe alors une longueur d'onde précise à laquelle chaque molécule peut absorber. Lorsqu'une molécule est capable d'absorber à des longueurs d'ondes ( $\lambda$ ) appartenant à la région UV-Vis (200 à 800 nm) du spectre électromagnétique, elle est qualifiée de chromophore. Généralement, cela concerne les systèmes de liaisons  $\pi$  conjuguées. Au plus la molécule est conjuguée, au plus elle est considérée comme énergétiquement instable, car sa LUMO (la plus basse orbitale moléculaire inoccupée) et son HOMO (la plus haute orbitale moléculaire occupée) sont proches. De ce fait, une énergie plus faible est nécessaire pour passer à un état excité. C'est pourquoi les molécules les plus conjuguées absorbent aux longueurs d'onde les plus grandes (32).

Les catécholamines se prêtent parfaitement à ce type d'analyse puisqu'elles sont composées d'un système de liaisons  $\pi$  conjuguées (cycle aromatique composant le catéchol). L'instrument UHPLC utilisé possède un module spectrophotomètre à barrettes de diodes (DAD) qui permet d'obtenir des résultats plus rapidement, étant donné que toutes les composantes spectrales de la lumière sont simultanément envoyées sur l'échantillon et analysées (47).

#### 1.3.5. Essai de dégradation forcée des catécholamines

La dégradation forcée est une méthode visant à soumettre un échantillon à des conditions environnementales extrêmes afin de provoquer une dégradation accélérée du produit. Cette dégradation peut être réalisée à des fins d'identification de produits et/ou de mécanismes de dégradation, mais également pour le développement de formulations et/ou de conditionnements. Elle peut aussi servir à évaluer la spécificité d'une méthode analytique utilisée pour quantifier une substance active et/ou production interne de médicament (cf. 1.4) (36,48). La dégradation forcée inclut généralement différentes conditions, dont : une hydrolyse par variation de pH (acide et basique), une dégradation thermique (40-80 °C), une oxydation et une photolyse (exposition aux rayonnements UV et

fluorescents). Il n'existe pas de limite de dégradation formelle établie, mais les recommandations générales sont comprises entre 5 et 20%. Cela permet une dégradation de la molécule mère, tout en évitant une décomposition excessive. La concentration des molécules d'intérêt doit également être suffisamment élevée pour que les produits de dégradation puisse être détectés (36,48).

### 1.3.6. Validation d'une méthode analytique

La validation est une étape cruciale dans le développement d'une procédure analytique visant à « [...] fournir les preuves suffisantes que la procédure analytique répond à ses objectifs » (49). Un certain nombre de critères, décrits par les guidelines ICH Q2(R2) doivent être étudiés afin de valider une méthode analytique. Le Tableau 3 contient les caractéristiques qui doivent être évaluées en fonction du type de méthode mis au point.

Tableau 3 : Critères de validation en fonction du type de procédure analytique

Caractéristiques	Dosage	Impuretés		Identification	Dosage bioanalyse
		Quantitatif	Essais limites		
Exactitude	✓	✓			✓
Fidélité, répétabilité	✓	✓			✓
Fidélité, fidélité intermédiaire	✓	✓			✓
Spécificité, sélectivité	✓	✓	✓	✓	✓
Limite de détection		✓	✓		✓
Limite de quantification		✓			✓/X
Linéarité	✓	✓			✓
Intervalle de mesure	✓	✓			✓
Robustesse	✓/X	✓/X	✓/X	✓/X	✓/X

Adapté de (49). Légende : ✓ = caractéristiques obligatoires, ✓/X = caractéristiques parfois obligatoires

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre la moyenne des résultats d'une série d'essais et une valeur théorique considérée comme vraie. Elle permet de décrire l'erreur systématique d'une méthode de dosage. La fidélité, quant à elle, correspond à la dispersion d'une série de mesures provenant d'un même échantillon homogène, dans des conditions fixes. Les erreurs aléatoires sont évaluées. La répétabilité, liée à la notion de fidélité, concerne les résultats d'essais indépendants obtenus dans le même laboratoire, avec la même méthode d'analyse, à partir d'échantillons d'essais identiques préparés par le même opérateur et analysés avec le même appareillage. La fidélité intermédiaire diffère de la répétabilité de par le fait que l'opérateur, l'appareillage peuvent varier et que le délai entre les essais peut être plus important (jours différents) (36,49,50).

La spécificité et la sélectivité d'une méthode sont très importantes, car elles permettent de démontrer que la méthode est capable de distinguer un analyte de manière univoque, même s'il est en présence d'autres composés. La méthode doit être robuste, c'est-à-dire être capable de ne pas être influencée par des modifications délibérées, associées à la procédure. Enfin, l'établissement d'une droite d'étalonnage (ou fonction réponse) est essentiel à la quantification d'une substance d'intérêt, permettant d'établir une corrélation entre un signal obtenu et une concentration de la substance à analyser. La mesure de la linéarité permet d'évaluer ce critère (36,49,50).

## 1.4. But du travail de recherche

Ce travail de recherche de Master est centré sur le développement et la validation d'une méthode UHPLC-UV pour l'analyse qualitative et quantitative de cinq catécholamines utilisées en milieu hospitalier : l'adrénaline, la noradrénaline, la dopamine, l'isoprénaline et la dobutamine. Pour ce faire, divers modes d'analyses ont été testés, au travers de sept colonnes chromatographiques de chimie différentes : trois colonnes RPLC (C8, C18 et phényl-hexyl) ainsi que quatre colonnes de type HILIC (amide, silice et zwitterionique). Un score a été développé dans le but de choisir les meilleures conditions chromatographiques, à la suite de quoi la méthode choisie a été perfectionnée, une dégradation forcée des catécholamines a été effectuée et la méthode a été validée.

Ce projet de recherche permet de répondre aux problèmes qualité de l'administration des catécholamines dans les unités de soin. Si, à l'avenir, les résultats indiquent un problème de dosage, alors une révision des protocoles de préparation ou une formation approfondie du personnel soignant pourrait être envisagée. En revanche, si les résultats indiquent une erreur de la catécholamine administrée, ceci pourrait mener à une réévaluation de l'organisation au sein du service de soins ou une réévaluation des médicaments proposés. La mise en place d'une préparation centralisée à la pharmacie, visant à standardiser les dosages ou à fournir des conditionnements mieux adaptés, pourrait être une solution envisageable. Ceci permettrait de réduire les erreurs d'administration de médicaments et d'augmenter la sécurité des patients.

D'un point de vue plus large, le développement d'une méthode d'analyse pour les catécholamines, médicaments essentiels en milieu hospitalier, permettrait de pallier les ruptures de stock en rendant la pharmacie moins dépendante des fournisseurs. La mise en place d'une production interne de solutions de catécholamines serait alors accélérée et facilitée de par l'existence d'une méthode de dosage déjà validée.

Au-delà du contexte d'erreurs médicamenteuses, des solutions injectables d'adrénaline sont produites en série dans la Pharmacie Centrale du CHUV selon un contrat de sous-traitance avec la pharmacie des HUG, dû au manque de fiabilité des fournisseurs externes. Il devient dès lors primordial de pouvoir assurer la qualité et la sécurité des lots produits au CHUV.

## 2. Matériel et méthode

### 2.1. Produits chimiques et instruments

**Produits chimiques** – L'acétonitrile  $\geq 99.9\%$  (ACN) et l'eau ( $H_2O$ ) utilisés durant le développement et la validation de la méthode étaient de qualité HPLC et provenaient de chez Merck KGaA (Darmstadt, Allemagne). La solution de formate d'ammonium (AF) 10 M ( $NH_4HCO_2$ ) provenait de Sigma Aldrich (St-Louis, Etats-Unis). Quant à l'acide formique 99% de qualité ULC/MS, un flacon de chez Bisolve Chimie (Dieuze, France) a été employé.

Pendant la phase de développement, une solution d'ammoniaque 25% de la gamme Supelco® de chez Merck KGaA (Darmstadt, Allemagne) a également été utilisée pour l'ajustement du pH des solutions de tampon basique (pH = 9.0).

Pour les catécholamines, toutes les solutions, à l'exception de la dobutamine, ont été préparées à partir des sels hydrochloride provenant de chez Sigma-Aldrich (St-Louis, Etats-Unis) : DL-Norepinephrine hydrochloride cristalline  $\geq 97\%$  (  $\pm$ )-Epinephrine hydrochloride  $\geq 98\%$ , dopamine hydrochloride  $\geq 98\%$ , isoprénaline hydrochloride  $\geq 98.5\%$ . Pour la dobutamine, le choix s'est porté sur les flacons de solution pour perfusion Dobutrex® 250 mg/ 50 mL (Teva Pharma AG, Bâle, Suisse), contenant également un sel hydrochloride.

Lors de la validation, une solution de NaCl 0.9% de chez Bichsel AG (Interlaken, Suisse) et une solution de glucose 5% de chez BBraun Medical AG (Sempach, Suisse) a été utilisé pour la préparation des lots de validation.

**Instruments UHPLC-UV** – Un instrument de chromatographie liquide à ultra haute performance (UHPLC) Dionex UltiMate™ 3000 de ThermoFisher Scientific™ (Germering, Allemagne) avec un détecteur DAD-3000RS, une pompe Rs Pump, un four de colonne Dionex UltiMate™ 3000 et un injecteur Rs Autosampler ont été utilisés pour le développement et la validation de la méthode analytique.

**Balance** – Une balance analytique Mettler Toledo Suisse (modèle XP204), a été utilisée pour peser les catécholamines et préparer les échantillons d'analyse durant le développement. Pour la validation, une balance analytique Mettler Toledo Suisse de plus haute précision a été utilisée : modèle XPR225 DeltaRange®.

**Instrument de mesure de pH** – Un pH-mètre Metrohm Suisse SA (914 pH/Conductometer, Herisau, Suisse) a été utilisé durant le développement et la validation de la méthode analytique.

**Colonnes chromatographiques** – La colonne LC choisie pour cette méthode d'analyse a été la BEH Z-HILIC 1.7  $\mu m$  VanGuard™ Fit, 2.1 x 50 mm de la gamme Atlantis™ Première de chez Waters™ (Milford, Missouri, Massachusetts, Etats-Unis).

Durant le développement, six autres colonnes ont été testées en utilisant des conditions gradient génériques. Toutes les colonnes chromatographiques possédaient des dimensions comparables et ont été sélectionnées en amont du travail de recherche.

Le Tableau 4 présente les caractéristiques de toutes les colonnes utilisées durant ce projet (51–57).

**Tableau 4 : Caractéristiques des différentes colonnes chromatographiques testées**

COLONNE CHROMATOGRAPHIQUES							
Caractéristiques	BEH C8	HSS T3	Nucleodur	BEH Amide	BEH Z-HILIC	Nucleodur	Core-shell
Mode	RPLC	RPLC	RPLC	HILIC	HILIC	HILIC	HILIC
Chimie	C8	C18*	Phényl-hexyl	Amide	Sulfobétaïne	Sulfobétaïne	Silice
Dimensions	2.1x50 mm	2.1x50 mm	2.0x50 mm	2.1x50 mm	2.1x50 mm	2.0x50 mm	2.1x51 mm
Particules	1.7 µm	1.8 µm	1.8 µm	1.7 µm	1.7 µm	1.8 µm	1.7 µm
Volume mort	0.20 mL	0.20 mL	0.15 mL	0.20 mL	0.17 mL	0.15 mL	0.20
Endcapping	oui	oui	oui	oui	non	non	non
Pré-colonne	oui	oui	oui*	oui	oui	oui	oui*
Fabricant	Waters	Waters	Macherey-Nagel	Waters	Waters	Macherey-Nagel	Kinetex
Gamme	Acquity Premier	Acquity Premier	Nucleodur	Acquity Premier	Atlantis Premier	Nucleodur	Core-shell

\*La colonne HSS T3, contrairement à une colonne C18 trifonctionnelle, possède un recouvrement plus faible des groupements Si-OH, lui permettant ainsi de retenir des composés polaires (58).

\*\*Pré-colonnes manuellement fixées : CPS Guard column holder (Macherey-Nagel, Hoerd, France)

## 2.2. Paramétrage de l'instrument et conditions d'analyse (UHPLC-UV)

**Paramètres UHPLC-UV** – Durant le développement et lors de la validation de la méthode finale, les échantillons ont toujours été maintenus à une température de 10°C dans l'autosampler. La température de la colonne et le volume d'injection ont respectivement été fixés à 30°C et 5 µL. Le débit de la phase mobile a été réglé à 0.5 mL/min. La longueur d'onde choisie pour l'analyse de l'E, la NE, la DA, l'IPN et la DOB a été fixée à 280 nm, correspondant aux exigences de la Pharmacopée européenne (Ph.Eur.) et aux recommandations trouvées dans la littérature scientifique (30,59–62).

**Conditions d'analyse choisie pour la validation de méthode** – Les phases mobiles utilisées lors des analyses de chromatographie liquides sont :

- Phase mobile A : ACN/H<sub>2</sub>O (50 :50)
- Phase mobile B : H<sub>2</sub>O + NH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub> 30 mM (pH = 3.0)
- Phase mobile C : ACN/H<sub>2</sub>O + NH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub> 30 mM (pH = 3.0) (85 :15)
- Phase mobile D : ACN/H<sub>2</sub>O (90 :10)

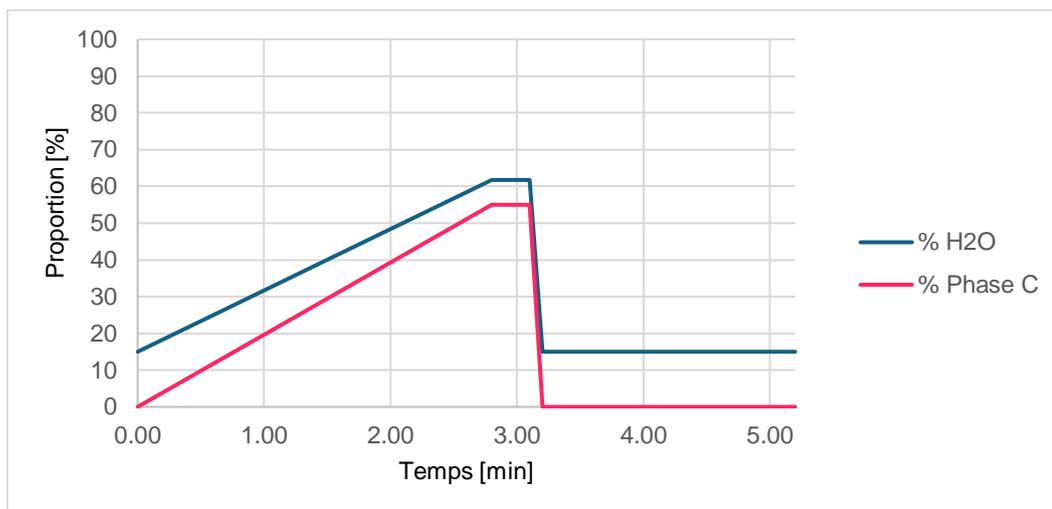
Les phases B et C ont été utilisées pour la séparation des composés. Quant aux phases A et D, elles ont été utilisées pour le nettoyage de la colonne et son conditionnement avant stockage.

Durant la phase de développement, de nombreuses phases mobiles ont été testées, avec différentes concentrations d'ammonium formate (10 mM, 30 mM et 50 mM) et différents pH (3.0 et 9.0). Le Tableau S1 de l'Annexe 1 référence toutes les phases mobiles testées.

**Méthode UHPLC-UV** - Le Tableau 5 retrace la méthode gradient développée et validée. L'évolution du pourcentage de phase mobile C et le profil d'eau au cours du temps sont représentés dans la Figure 5.

**Tableau 5 : Méthode gradient développée et validée pour l'analyse des catécholamines**

Temps (min)	%B	%C	% H <sub>2</sub> O
0.00	0	100	15
2.80	55	45	62
3.10	55	45	62
3.20	0	100	15
5.20	0	100	15



**Figure 5 : Evolution de la proportion de phase mobile C et d'eau [%] en fonction du temps [min] dans la méthode développée et validée pour l'analyse des catécholamines**

### 2.3. Logiciels informatiques

**Logiciel UHPLC-UV** – Le logiciel utilisé durant le développement et la validation de la méthode est Chromeleon™ 7.2 SR4 de ThermoFisher Scientific™. Le logiciel a servi pour la gestion de l'instrument HPLC-UV, l'obtention et le traitement des chromatogrammes.

**Excel** – Le logiciel Excel de chez Microsoft® 365 (Redmond, Washington, Etats-Unis) a été utilisé pour l'analyse des données des chromatogrammes, pour le développement du score ainsi que pour le traitement des données durant la validation.

### 2.4. Etapes du développement et de la validation de la méthodes UHPLC-UV

#### 2.4.1. Investigation des différentes colonnes chromatographiques

Un screening de toutes les colonnes présélectionnées (cf. Tableau 4) a été effectué en appliquant des gradients génériques ainsi qu'en utilisant des phases mobiles adaptées. Plusieurs exemples trouvés dans la littérature ont servi de base pour établir les méthodes dites « génériques ». Les phases mobiles ont ensuite été déclinées en plusieurs pH différents et différentes concentrations d'ammonium formate. Pour les méthodes UHPLC, plusieurs articles mentionnent l'utilisation d'un tampon « ammonium formate – acide formique » à pH acide (environ 3.0), l'utilisation des solvants eau et acétonitrile, des débits de 0.4 à 1.0 mL/min, ainsi qu'une température de colonne oscillant entre 25 et 40°C (29,30,63–67).

En ce qui concerne les analyses en mode RPLC, les références trouvées mentionnent l'utilisation d'acide formique (à 0.2 %), un débit de 5 mL/min et un gradient s'étalant de 6 à 10 min (68,69). L'Annexe 2 regroupe les méthodes génériques testées sur toutes les colonnes ainsi que les méthodes optimisées séparant les molécules.

### 2.4.2. Développement du score pour évaluer la performance des colonnes UHPLC

Les résultats obtenus par UHPLC-UV avec les méthodes d'analyses précédemment citées (cf. 2.4.1, Annexe 2) ont ensuite été traités de façon à évaluer la performance de chaque colonne. Pour ce faire, la fonction de désirabilité de Derringer, permettant de traiter un processus à réponses multiples, est un outil souvent utilisé en chimie analytique. Le principe est le suivant : différents critères d'intérêt sont établis et, à chacun d'entre eux, est attribué un score allant de 0 (situation indésirable) à 1 (situation favorable). Ces critères sont élevés à une valeur correspondant à l'importance qu'ils ont dans la détermination du score final. Puis, tous les critères sont multipliés entre eux (70). Depuis, les travaux de Derringer ont été repris et d'autres méthodes de scoring ont été développées.

Pour ce travail, la méthode de scoring présentée a été développée sur la base de deux articles scientifiques (71,72). Les critères choisis ont été : le temps de rétention ( $t_R$ ), la hauteur des pics, l'asymétrie des pics, ainsi que la largeur du pic à mi-hauteur. Ces informations ont été tirées des résultats chromatographiques obtenus durant la phase de test des sept colonnes et ont été traitées sur Excel.

Le temps de rétention ( $t_R$ ) a été traité de manière à s'affranchir du volume mort de la colonne (Équation 1), Puis, une échelle logarithmique a été appliquée, afin que la différence entre un composé suffisamment retenu et un composé très peu retenu soit notable (Équation 2), suivi d'une normalisation pour que le score soit compris entre 0 et 1 (Équation 3). Ainsi, plus un composé sera retenu, plus il obtiendra un score proche de 1, alors qu'un composé non retenu obtiendra un score proche ou égal à 0 (72).

$$k_{app} = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad \text{Équation 1}$$

$$L_{k_{app}} = \log(1 + k_{app}) \quad \text{Équation 2}$$

$$S_{k_{app}} = \frac{L_{k_{app}} - \min(L_{k_{app}})}{\max(L_{k_{app}}) - \min(L_{k_{app}})} \quad \text{Équation 3}$$

La hauteur relative des pics (ou l'intensité relative des pics,  $S_I$ ) a été obtenue en faisant le rapport entre l'intensité du pic d'une substance obtenue à l'aide d'une méthode et l'intensité maximale obtenue pour ce même composé, en utilisant la méthode analytique la plus sensible (Équation 4). Le score sera donc d'autant plus élevé que le signal sera intense.

$$S_I = \frac{I}{I_{max}} \quad \text{Équation 4}$$

Concernant l'asymétrie des pics, la valeur calculée par Chroméléon correspond aux exigences de la Ph.Eur. 2.2.46 : l'asymétrie est exprimée comme le rapport entre la largeur du pic au 1/20 de sa hauteur ( $W_{0.05}$ ) et la distance ( $d$ ) entre la perpendiculaire descendant du maximum du pic et le front du pic au 1/20 de sa hauteur (Équation 5) (73).

$$A_s = \frac{W_{0.05}}{2d} \quad \text{Équation 5}$$

L'expression de ce critère ne correspondant à aucune de celles utilisées dans les deux articles de référence, il a fallu utiliser une autre approche. Afin que le critère soit exprimé dans une échelle comprise entre 0 et 1, une normalisation a été effectuée sous le même principe que pour l'Équation 4. L'échelle a dû être inversée de sorte à ce qu'un score élevé corresponde à une faible asymétrie (Équation 6) (74,75).

$$Y = 1 - \frac{As_i - \min(As)}{\max(As) - \min(As)} \quad \text{Équation 6}$$

La largeur à mi-hauteur du pic permet d'obtenir une information sur la forme du pic en général (71). Comme précédemment, au vu des informations données par Chroméléon, le traitement des données a dû être adapté. Une normalisation avec inversion d'échelle a également été appliquée (Équation 7) (74,75).

$$S_s = 1 - \frac{w_{0.05_i} - \min(w_{0.05})}{\max(w_{0.05}) - \min(w_{0.05})} \quad \text{Équation 7}$$

Le score total a été calculé selon l'Équation 8.

$$S_{tot} = (S_{k_{app}}^3 * S_I * Y * S_s)^{1/6} \quad \text{Équation 8}$$

### 2.4.3. Optimisation de la méthode analytique UHPLC-UV

L'optimisation de la méthode s'est déroulée en plusieurs étapes : l'amélioration de la séparation des catécholamines, l'amélioration de la séparation de la dopamine et de l'adrénaline, l'optimisation de l'aspect des pics et la réduction du temps d'analyse. Différents modes d'analyse, différentes compositions de phase mobile, gradients et débits ont été testés durant cette phase afin d'optimiser la séparation des composés. Les deux combinaisons de phases mobiles utilisées pendant ce processus sont présentées dans le Tableau 6. Les résultats de certaines d'entre elles seront présentés et discutés ultérieurement.

**Tableau 6 : Phases mobiles utilisées lors de l'optimisation de la méthode d'analyse des catécholamines**

Colonne choisie	Phase mobile B	Phase mobile C
<b>BEH Z-HILIC</b> (Atlantis™Premiere,Waters™)	H <sub>2</sub> O + AF 30 mM + FA, pH = 3.0	ACN pur
	H <sub>2</sub> O + AF 30 mM + FA, pH = 3.0	ACN/ H <sub>2</sub> O (85 :15) + AF 30 mM

Le choix final s'est porté sur la méthode offrant les meilleurs résultats pour le temps d'analyse le plus courts. Les informations fournies par les chromatogrammes, telles que la sélectivité, la résolution et l'asymétrie, ont été utilisées afin de faire le choix.

### 2.4.4. Estimation des limites de détection et quantification des catécholamines

La limite de détection (LOD), soit la quantité la plus faible d'échantillon pouvant être détectée sans être quantifiée, ainsi que la limite de quantification (LOQ), représentant la quantité la plus faible pouvant être quantifiée avec une exactitude définie (36), ont été estimées en injectant plusieurs mélanges de catécholamines de concentrations différentes : 250 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL et 2.5 µg/mL.

### 2.4.5. Essai de dégradation forcée

Les recommandations ICH Q1A(R2) et Q1B permettent de fixer un cadre réglementaire, mais ne donnent pas de détails pratiques (76,77), c'est pourquoi le protocole utilisé est basé sur une étude de la dégradation forcée de l'adrénaline, datant de 2018 (78).

Tout d'abord, des solutions mères (C = 2 mg/mL) d'E, de NE, de DA et d'IPN ont été préparées à partir des poudres standards précédemment utilisées et d'une solution de NaCl 0.9% (pour E, NE et IPN) ou de glucose 5% (pour DA). Ces solutions ont servi à préparer les solutions témoins (C = 1 mg/mL), où les différentes conditions précédemment citées ont été testées : HCl 0.5 M (hydrolyse acide), NaOH 0.5 M (hydrolyse basique), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3.5 % (oxydation), effet de la température (25 et 60°C). Des solutions contrôle ont également été préparées pour toutes ces conditions, en utilisant du NaCl 0.9% ainsi que du glucose 5%. Seules les conditions de photolyse n'ont pas été incluses, le matériel recommandé n'étant pas disponible (77). Toutes les solutions témoins et contrôle (hormis celles testant la stabilité à 25°C) ont été placées dans une étuve à 60°C. Toutes étaient à l'abri de la lumière.

Les solutions témoins et contrôle ont été neutralisées et analysées (en 3 répétitions) aux jours 0, 1, 2 et 4 par la méthode UHPLC-UV développée. Le schéma de la Figure 6 illustre la préparation des solutions témoins au jour 0, ainsi que la préparation des échantillons d'analyse (neutralisation et mise en condition) réalisée sur quatre jours. Le protocole détaillé est présenté en Annexe 9.

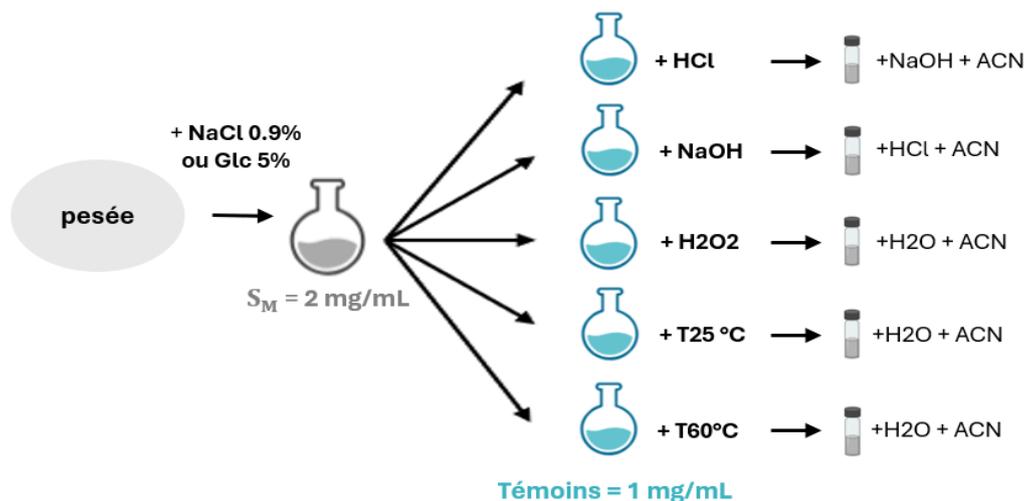


Figure 6 : Préparations des témoins et des échantillons d'analyse pour la dégradation forcée

#### 2.4.6. Validation de la méthode analytique UHPLC-UV

Le processus de validation s'est déroulé sur cinq jours consécutifs (5 séries indépendantes) pour chaque molécule. Deux pesées identiques ont été faites afin de préparer deux solutions mères ( $S_M$ ), une pour la calibration ( $CS_M$ ) et l'autre pour la validation ( $VS_M$ ). Puis, trois solutions standards (Std) de concentrations différentes ont été préparées à partir des solutions mères : trois standards de calibration (CStd) et de validation (VStd).

Pour chaque solution standard, trois aliquots ont été prélevés dans des vials pour analyse UHPLC-UV. L'analyse de chaque vial a été répétée 3 fois. La Figure 7 illustre le processus de validation.

Les protocoles de validation détaillés pour l'adrénaline, la noradrénaline, la dopamine et l'isoprénaline sont disponibles en Annexe 3 à 7.

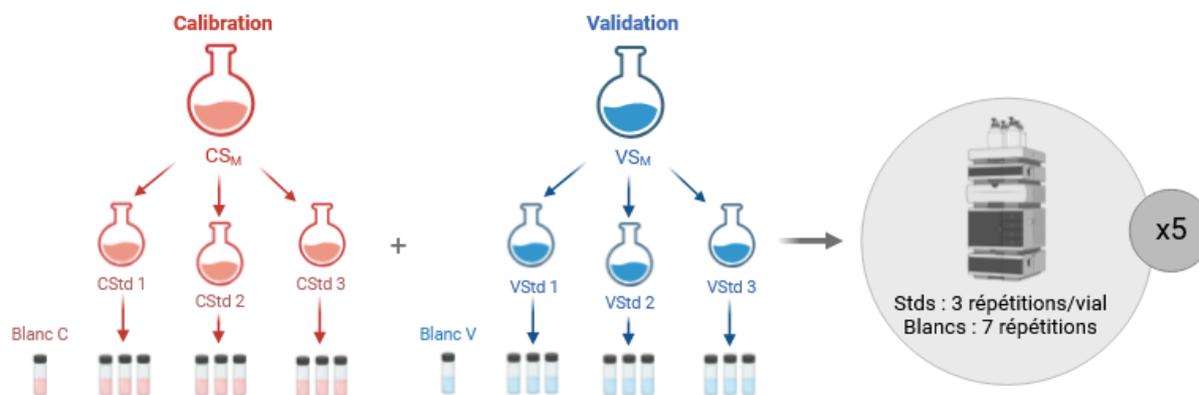


Figure 7: Schéma de la méthode de validation

Réalisé sur BioRender

### 2.5. Préparation et conservation des solutions pendant le développement et la validation de la méthode UHPLC-UV

La préparation des phases mobiles ainsi que la préparation des échantillons d'analyses durant la validation sont détaillées dans les protocoles de validation disponibles en Annexe 3-6. Les calculs de préparation des standards d'analyse utilisés pendant le développement et la validation sont présentés en Annexe 7-8.

Durant le développement, les solutions standards ont été aliquotées (9 aliquots/solution/mode d'analyse) et conservées dans un congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$  (68), à l'abri de la lumière (79–81), afin d'éviter la dégradation des échantillons.

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Développement de la méthode analytique UHPLC-UV

##### 3.1.1. Investigation des différentes colonnes chromatographiques RPLC

La première étape a été le screening des sept colonnes chromatographiques présélectionnées, à l'aide de modes gradients génériques et de différentes compositions de phases mobiles basées sur la littérature. Les colonnes RPLC ont été testées en premier. Les résultats obtenus suite à l'analyse des standards des 5 catécholamines par la colonne BEH C8 dans les conditions génériques décrites en Annexe 3.A.1, sont présentés dans la Figure 8. Les résultats du screening des différentes colonnes RPLC sont présents en Annexe 10.

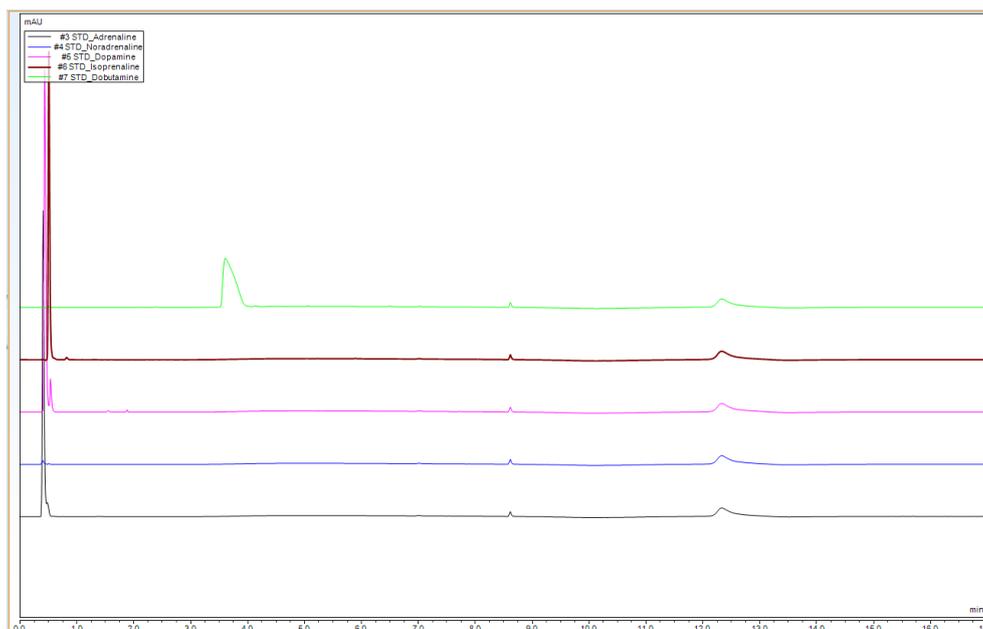


Figure 8 : Chromatogrammes des 5 catécholamines (50 µg/mL) avec une colonne hydrophobe (BEH C8)

Une co-élution de quatre molécules est observée : l'adrénaline, la noradrénaline, la dopamine et l'isoprénaline. Elles éluent au pic de l'injection. Seule la dobutamine est retenue dans ces conditions analytiques.

Ces observations s'expliquent par le choix du mode d'analyse et les propriétés physico-chimiques des molécules. En effet, comme expliqué au Paragraphe 1.3.1, l'adrénaline, la noradrénaline, la dopamine et l'isoprénaline sont des molécules polaires. Elles ne font pas d'interactions avec les chaînes C8 présentes à la surface interne de la colonne d'où leur élution rapide. La dobutamine, lipophile, forme des interactions hydrophobes avec la phase stationnaire, ce qui augmente sa rétention.

Les colonnes HSS T3 et NUCLEODUR® Phényl-hexyl ont donné des résultats similaires (*cf.* Annexe 10). Bien qu'il s'agisse de colonnes RPLC, leur chimie est différente, ce qui a conduit à leur sélection parmi les colonnes à tester. La colonne HSS T3, en comparaison à d'autres colonnes C18 classiques, possède des groupements C18 avec un recouvrement plus faible des silanols (58), ce qui lui offre la possibilité d'interagir avec des composés polaires en plus des composés apolaires. Les résultats ne sont cependant pas concluants. Les catécholamines étant entourées de groupements polaires, l'accès spatial au squelette carbonique est difficile, ce qui rend les interactions hydrophobes avec ce type de phase stationnaire compliquées (*cf.* Figure S1 de l'Annexe 10).

Quant à la dernière colonne RPLC, elle contient des groupements phényl-hexyl capables de faire des interactions  $\pi$ - $\pi$  avec les molécules possédant un groupement cyclique. Si les catécholamines possèdent effectivement un benzène, celui-ci possède deux groupements hydroxyle, empêchant probablement le rapprochement nécessaire à la formation de ce type d'interaction. Ces interactions étant relativement faibles, elles ne sont peut-être pas suffisantes à la rétention des catécholamines (82,83).

Au vu des résultats de la Figure 8, une autre méthode gradient avec une proportion d'eau diminuée au début de la méthode a été testée dans le but de retarder l'élution des analytes hydrophiles (cf. Figure S2 de l'Annexe 10). Cette tentative n'a pas donné les résultats attendus : les catécholamines hydrophiles n'ont pas été retenues par la colonne et l'élution de la dobutamine a été accélérée puisque la proportion d'ACN a été augmentée. Il en résultait alors une co-élution des cinq catécholamines.

Deux défis majeurs du développement de la méthode sont alors soulevés suite à ces premiers résultats : d'une part, la complexité de la séparation des catécholamines hydrophiles (E, NE, DA et IPN), ayant toutes un comportement très similaire, et d'autre part, la faisabilité de trouver une méthode pour l'analyse des 5 catécholamines au vu du comportement radicalement différent de la dobutamine.

Les analytes n'étant ni retenus ni séparés, la méthode présentée en Figure 8 manque de spécificité et n'est pas adaptée à l'analyse de ce type de composé. Comme des résultats similaires ont été obtenus avec toutes les colonnes RPLC (cf. Tableau 4, Annexe 10) et que les essais d'optimisation n'ont pas fonctionné, les colonnes chromatographiques RPLC n'ont pas été considérées comme adéquates pour ce type d'analyse. Ces résultats étaient attendus vu les propriétés physico-chimiques des analytes.

### 3.1.2. Investigation des différentes colonnes chromatographiques HILIC

La Figure 9 présente les premiers résultats obtenus lors de l'application du gradient générique sur la première colonne HILIC testée, la BEH Amide.

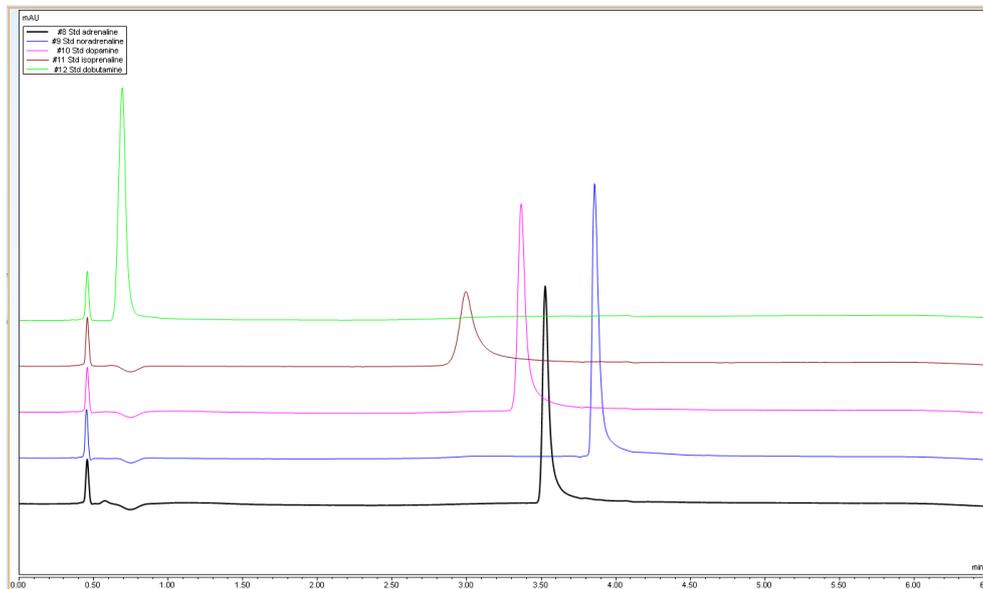


Figure 9 : Chromatogramme des 5 catécholamines (50 µg/mL) avec une colonne HILIC (BEH Amide)

Les chromatogrammes obtenus suite au screening des colonnes HILIC avec les méthodes génériques offraient dans l'ensemble une meilleure séparation des composés que les colonnes RPLC (cf. Annexe 11). Dans la Figure 9, les pics sont distincts et toutes les molécules sont retenues par la colonne, contrairement aux résultats précédents. À nouveau, une divergence de rétention apparaît entre les catécholamines hydrophiles ( $t_R > 3.00$  min) et la dobutamine ( $t_R \cong 0.70$  min), car le mode HILIC est adapté à l'analyse de composés hydrophiles (cf. Paragraphe 1.3.3).

L'ordre d'élution expérimentale des analytes suivait l'ordre d'élution théorique basé sur l'hydrophilie des composés : DOB – IPN – DA – E – NE (cf. Tableau 2). Ainsi, comme la dobutamine est la molécule la plus lipophile, elle est rapidement entraînée par l'ACN, présent en grande proportion dans la phase mobile au début de la méthode. Puis, la proportion de phase éluante (ici, l'eau) augmentant progressivement au cours du temps, les molécules sont entraînées selon leur hydrophilie. Plus la molécule est hydrophile, plus elle sera capable de faire des interactions avec la phase stationnaire et plus elle sera retenue.

Parmi les conditions génériques testées, le pH=3.0 offrait de meilleurs résultats que les tests à pH=9.0 (cf. Annexe 11). Les nombreuses fonctions ionisables (acides et basiques) présentes sur les catécholamines sont à l'origine de ce phénomène. Les pKa desdites fonctions se trouvent tous entre

8.00 et 11.00 (cf. Tableau 2). À pH basique (correspondant à la zone  $pK_a \pm 1$ ), les catécholamines se trouvent sous différents états de charge. Ceci explique la présence de traînées de pics, les pics additionnels et les irrégularités de signal observables dans les Figures S4, S9 et S16 en annexe.

Les colonnes BEH Z-HILIC, BEH Amide et NUCLEODUR HILIC offraient une séparation des catécholamines et une rétention des molécules. La BEH Z-HILIC et la NUCLEODUR HILIC sont des colonnes zwitterioniques qui contiennent des groupements sulfobetaines capables de faire des interactions ioniques avec la fonction amine des catécholamines. La BEH Z-HILIC semblait donner des meilleures formes de pic et une meilleure séparation que la colonne de Macherey-Nagel, même si elles sont chimiquement identiques. Les différences observées peuvent provenir de plusieurs facteurs, comme : les différences dimensionnelles des colonnes (cf. Tableau 4) ou le taux de recouvrement des silanols.

Les groupements amide de la colonne de chez Waters<sup>TM</sup> forment sûrement des liaisons hydrogène avec les catécholamines puisqu'ils sont neutres à pH = 3.00.

Quant à la colonne Core-shell HILIC (Kinetex<sup>TM</sup>, Waldems, Allemagne), les résultats ressemblaient d'avantage aux résultats obtenus en RPLC : co-élution des catécholamines dès leur injection. Ce type de colonne est composé de billes de silice (diamètre de 1.8-5  $\mu\text{m}$ ) à noyau dur et à revêtement partiellement poreux (84). Dans le cas présent, la colonne choisie possède des groupements silanols et silanolates libres, capables théoriquement d'interagir avec les catécholamines chargées positivement. Or, aucune rétention n'est observée. Les groupements silanols ayant un  $pK_a$  d'environ 3.5 (85), seul une partie (environ 50%) d'entre eux sont déprotonés à un pH de 3.00. Certainement que la densité de silanolates chargés n'est pas suffisante pour la rétention ionique des analytes et qu'une rétention par ponts H n'a pas lieu.

Les gradients génériques utilisés afin de tester les différentes colonnes ont été optimisés en variant principalement : la pente du gradient, la concentration d'ammonium formate (30 mM et 50 mM) et la composition des phases mobiles. Le but était d'améliorer la séparation et l'aspect des pics chromatographiques. Les chromatogrammes des essais retenus sont disponibles en Annexe 11 (Figures S6 et S10).

Ainsi, le mode HILIC semblait être plus adapté que le mode RPLC pour l'analyse des catécholamines, ou du moins, quatre d'entre elles.

Toutes les méthodes gradients génériques ainsi que les méthodes optimisées présentant des pics fins et séparés ont été sélectionnées pour le score (cf. Paragraphe 3.1.3).

### **3.1.3. Développement du score pour évaluer la performance des colonnes UHPLC**

La méthode développée pour établir le score a été introduite et détaillée précédemment (cf. Paragraphe 2.4.2). Le but est de pouvoir attribuer un score allant de 0 (situation indésirable) à 1 (situation la plus favorable) à toutes les conditions et colonnes testées, de sorte à pouvoir évaluer leurs performances. Les critères sélectionnés étaient : le temps de rétention, l'intensité des pics, l'asymétrie et la largeur à mi-hauteur.

Dans l'équation finale du score (cf. Équation 8), le  $t_R$  a été élevé au cube de sorte à pouvoir différencier les colonnes qui ne retenaient pas les différents analytes de celles qui offraient une rétention, puisqu'il s'agissait d'un des problèmes majeurs rencontrés lors du screening des différentes colonnes. La forme des pics chromatographiques a également été mise en évidence : l'asymétrie et la largeur à mi-hauteur ont été multipliées entre elles. Ainsi, la forme du pic a été considérée au carré dans la formule finale. Ces deux paramètres offrent une caractérisation fine de la forme de pic en permettant de différencier un pic fin mais asymétrique (traînée de pic ou un épaulement avant) d'un pic large, comme obtenus par exemple dans la Figure S5 en Annexe 11.

La dernière caractéristique utilisée est l'intensité des pics. Ce dernier paramètre a été utilisé dans les deux études scientifiques de référence et permet d'évaluer la sensibilité de la méthode pour un analyte donné. Un exemple de pic aplati pour la dobutamine est présenté dans la Figure S8.

Les données brutes des chromatogrammes et des scores générés sont respectivement présentées en Annexe 12 et Annexe 13. Le graphique de la Figure 10 compare les performances des différentes conditions et colonnes testées pour toutes les catécholamines.

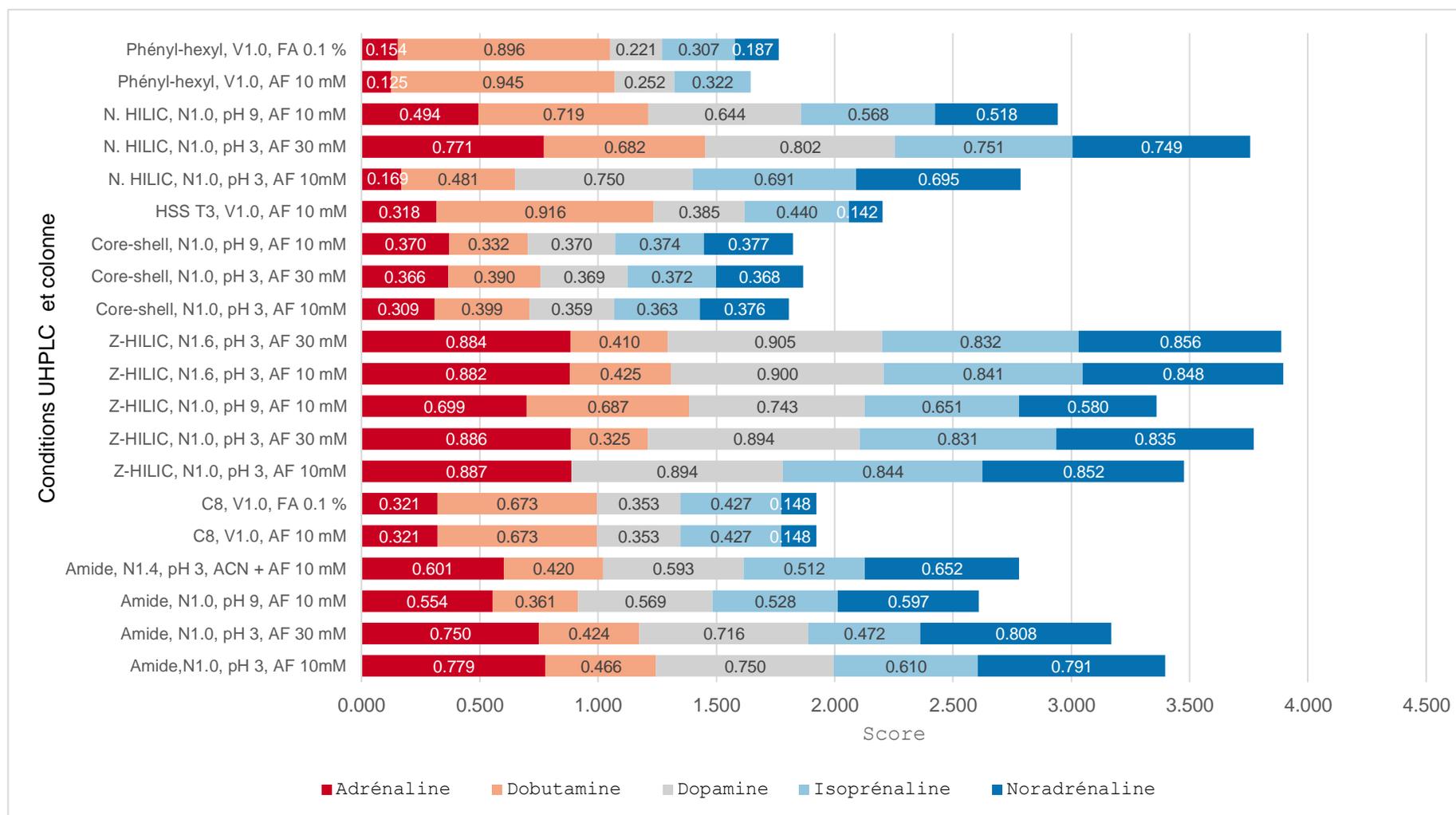


Figure 10 : Performances comparées des colonnes chromatographiques par analyses des scores

La colonne BEH Z-HILIC offre la meilleure performance pour l'analyse des catécholamines, et ce en condition acide avec notamment deux méthodes (N1.0 et N1.6) et deux concentrations d'ammonium formate différentes (10 et 30 mM).

Les scores obtenus pour cette colonne s'élèvent à plus de 0.850 pour 4/5 molécules (E, NE, DA et IPN). Sa performance pour la dobutamine est, en revanche, plus faible (0.679). La colonne la plus adaptée pour la DOB est la NUCLEODUR Phényl-hexyl, avec un score de 0.955.

Le tableau suivant résume les meilleurs scores obtenus pour chaque molécule ainsi que les conditions associées (colonnes, méthodes et phases mobiles).

**Tableau 7 : Sélection des meilleurs scores obtenus et conditions associées pour l'analyse des cinq catécholamines**

Molécules	Meilleur score	Colonne	Méthode	Phases mobiles
Adrénaline	0.887	BEH Z-HILIC	N1.0	(B) AF 30 mM + FA pH3, (C) ACN
Noradrénaline	0.856	BEH Z-HILIC	N1.6	(B) AF 30 mM + FA pH3, (C) ACN
Dopamine	0.905	BEH Z-HILIC	N1.6	(B) AF 30 mM + FA pH3, (C) ACN
Isoprénaline	0.844	BEH Z-HILIC	N1.0	(B) H <sub>2</sub> O + AF 10 mM + FA pH3, (C) ACN
Dobutamine	0.945	Phényl-hexyl	V2.0	(B) H <sub>2</sub> O + AF 10mM + FA, (C) ACN/H <sub>2</sub> O (90:10) + AF 10mM + FA

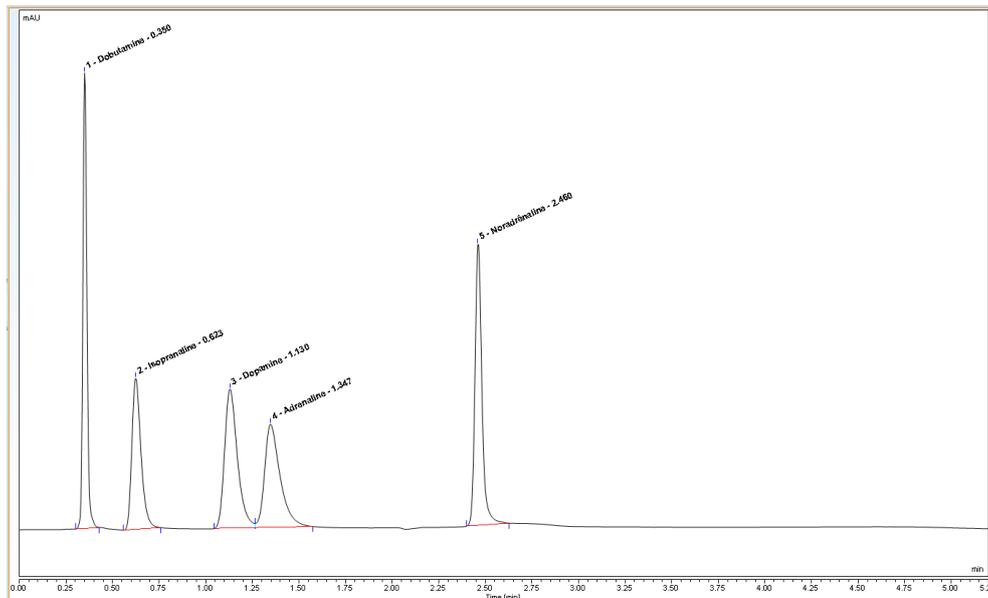
Pour les catécholamines hydrophiles, la meilleure colonne a unanimement été la BEH Z-HILIC. La concentration d'ammonium formate la plus adaptée s'élève à 30 mM pour leur analyse.

Ces résultats confirment que l'analyse des cinq catécholamines avec une colonne unique est difficile à mettre en place, pour les raisons évoquées précédemment. (cf. Paragraphes 3.1.1 et 3.1.2) À ce stade du travail, la colonne BEH Z-HILIC a été sélectionnée car elle offrait les meilleures performances pour 4/5 des molécules d'intérêt. Les standards de DOB ont été conservés et utilisés pour le reste du développement de la méthode analytique afin d'assurer la séparation des 5 molécules.

### 3.1.4. Optimisation de la méthode analytique et méthode finale

La méthode BEH Z-HILIC N1.6 sélectionnée selon la discussion au Paragraphe 3.1.3 a ensuite été optimisée dans le but de réduire le temps d'analyse et d'améliorer les performances de séparation de la DA et E

Les résultats obtenus à l'aide de la méthode finale sont présentés dans la Figure 11. La durée totale de l'analyse s'élève à 5.200 min. La dernière molécule (NE) élue à 2.46 min. L'ordre d'élution est le même que celui relevé au Paragraphe 3.1.2, à savoir : DOB – IPN – DA – E – NE. Les cinq catécholamines sont séparées, avec un retour à la ligne de base entre la DA et E.



**Figure 11 : Chromatogramme de l'analyse du mélange des 5 catécholamines avec la méthode gradient finale**

Les principaux axes d'amélioration de la méthode étaient la séparation à la ligne de base de la DA et de l'E, la réduction du temps d'analyse permettant de diminuer la consommation de solvant et de diminuer l'asymétrie des pics. Plusieurs stratégies ont donc été exploitées, tout en tenant compte des conditions idéales relevées par le score (cf. Tableau 7), à savoir : la colonne BEH Z-HILIC (Waters) un pH de 3.00, une concentration d'AF de 30 mM, les méthodes gradient N1.0 et N1.6 (cf. Annexe 2.B). Les résultats de nombreux essais différents sont présentés en Annexe 14.

Comme toutes les molécules, sauf la DOB, sont structurellement similaires et que leurs conditions d'éluion sont connues, une première amélioration consistait à augmenter la proportion d'eau dès le début de la méthode pour éluer les catécholamines plus rapidement. Il s'est avéré que les proportions d'ACN et d'H<sub>2</sub>O + AF s'élevant à 85 :15 offraient une bonne sélectivité et un temps d'analyse diminué. Cette information a dès lors été combinée à la méthode gradient retenue suite au score (cf. Tableau 7) pour d'autres essais : la pente du gradient N1.6 a été conservée tout en débutant à des proportions ACN/H<sub>2</sub>O (85 :15), formant la méthode N2.5. La séparation des pics a été satisfaisante (sélectivité  $\alpha > 1$  pour tous les pics) avec un retour à la ligne de base entre la DA et l'E. Les résultats sont présents dans la Figure S18 en Annexe 14. De nombreux autres gradients (plus rapides et plus lents) ont été testés durant cette phase d'optimisation, mais aucun essai n'a donné de meilleurs résultats que la méthode N2.5 (cf. Figure 11, Paragraphe 2.2).

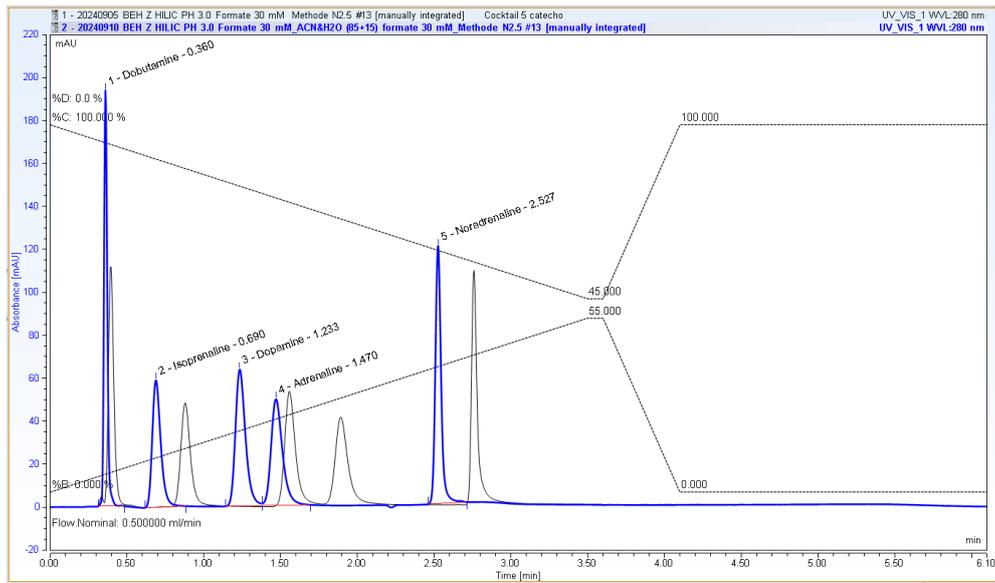
D'autres essais ont été effectués afin d'améliorer la séparation de la DOB et de l'E. Un plateau a, par exemple, été inséré au moment de l'éluion de la DA. Ces essais n'ont pas abouti à une meilleure séparation et le temps d'analyse a été augmenté (cf. Figure S19).

Pour réduire le temps d'analyse, la pente du gradient a été augmentée après la sortie de l'E, de manière à éluer la NE plus rapidement. Aucune amélioration notable n'a été perçue. La NE a tendance à sortir juste avant ou pendant le plateau final (soit, après le gradient), ce qui n'est pas souhaitable. (cf. Figure S19 et S20), l'asymétrie du pic de NE a été augmentée.

Le débit a également été augmenté à 0.6 mL/min afin de voir si l'asymétrie des pics et le temps d'analyse pouvaient être diminués. (cf. Figure S22 Annexe 14) Les résultats obtenus n'ont pas été améliorés. Le débit de 0.5 mL/min a donc été conservé.

Le dernier élément modifié afin d'améliorer l'asymétrie des pics a été l'effet de sel. Les phases mobiles classiques testées consistaient à utiliser un tampon d'ammonium formate (B) et de l'ACN pur (C). Dans ce genre de conditions, à mesure que la phase éluante (ici, le tampon) augmente, la concentration de sel augmente, permettant ainsi de rompre les interactions entre les molécules et la phase stationnaire plus rapidement. Or, comme l'asymétrie des pics était importante en utilisant ces phases mobiles, il a été testé de réduire cet effet de sel en changeant la phase mobile C en : ACN/ H<sub>2</sub>O+ AF 30 mM (85 :15). Cette nouvelle phase mobile comprend du formate d'ammonium à la même concentration que la phase mobile B (H<sub>2</sub>O + AF 30 mM), permettant ainsi de maintenir un taux de sel constant dans la colonne chromatographique. Comme les sels ne sont pas solubles dans les solvants organiques, 15% d'eau ont été ajoutés dans la phase mobile C. Puis, les proportions de phase mobile B et C ont été adaptées de sorte à préserver les paramètres de la méthode N2.5. Autrement dit, l'évolution de la proportion d'eau au cours du temps a été respectée.

La modification des phases mobiles a permis de diminuer l'asymétrie des pics, mais également de réduire le temps d'analyse. Ceci est visible dans la Figure 12, où les résultats obtenus avec la phase mobile C ACN/H<sub>2</sub>O + AF 30 mM (en bleu) et celles obtenus avec la phase mobile C ACN (en noir) sont superposés.

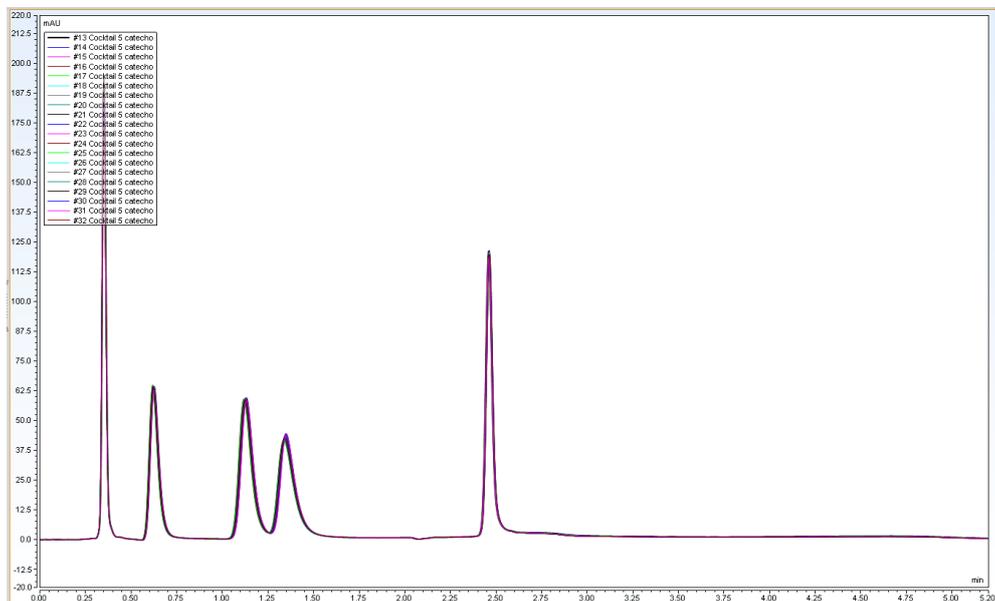


**Figure 12 : Influence de l'effet de sel sur les résultats de la méthode**

En gris, résultats de l'analyse avec (B) H<sub>2</sub>O + AF 30 mM + FA, pH = 3.0 et (C) ACN. En bleu, avec (B) H<sub>2</sub>O + AF 30 mM + FA, pH = 3.0 et (C) ACN/ H<sub>2</sub>O (85 :15) + AF 30 mM.

Comme la NE sortait bien avant le retour au plateau, cette méthode a pu être simplement raccourcie en insérant le plateau à 2.800 min (cf. Tableau 5), donnant ainsi la méthode finale.

Le mix des 5 catécholamines a ensuite été injecté 20 fois de suite afin de voir si la méthode donnait des résultats robustes. Les résultats des 20 injections superposés sont présentés dans la Figure 13.



**Figure 13 : Superposition des 20 analyses du mélange des 5 catécholamines avec la méthode gradient finale**

Cette méthode offre une résolution ( $R_s > 1.5$ ) et une sélectivité ( $\alpha > 1$ ) optimales pour toutes les catécholamines.

Les différents critères cités sont représentés dans un tableau disponible en Annexe 15. La méthode finale (N2.5.2) a été définie comme optimale pour passer à l'étape de validation.

Le Tableau 8 présente les temps de rétention des catécholamines obtenues avec la méthode choisie pour la validation.

Tableau 8 : Temps de rétention ( $t_R$ ) des catécholamines avec la méthode analytique finale

Molécules	$t_R$ moyen des molécules et déviation de 5% [min]
Isoprénaline	0.791 ± 0.040 min
Dopamine	1.547 ± 0.077 min
Adrénaline	1.884 ± 0.094 min
Noradrénaline	2.714 ± 0.136 min

### 3.2. Essai de dégradation forcée des catécholamines

La dégradation forcée a été effectuée afin de démontrer la spécificité de la méthode analytique développée en vérifiant sa capacité à séparer les produits de dégradation et les catécholamines mères. La Figure 14 représente l'évolution de la quantité d'adrénaline dans les différentes solutions témoins au fil du temps. Les données brutes du graphique sont présentées en Annexe 17.

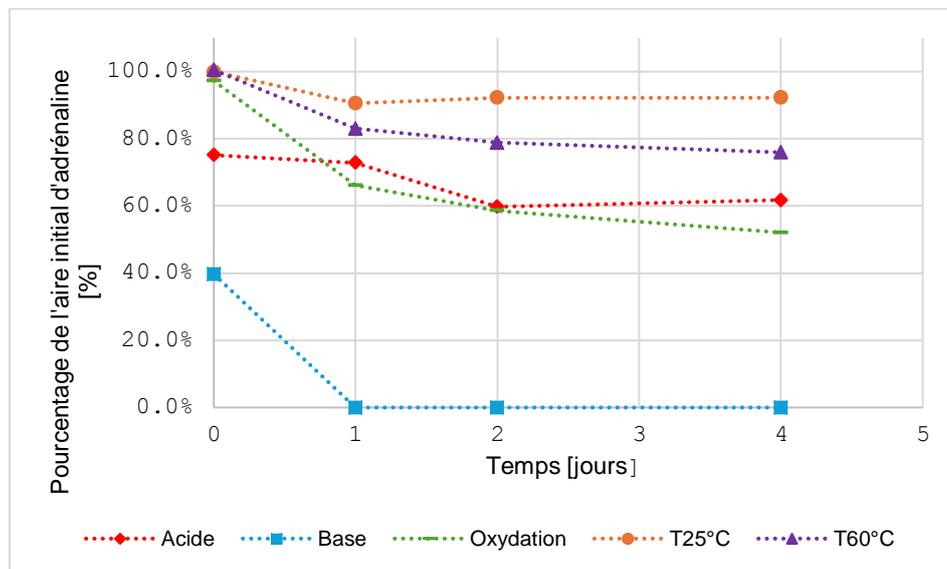


Figure 14 : Evolution de la quantité d'adrénaline au fil du temps en conditions acide, basique, oxydative et à température ambiante et élevée

L'adrénaline subit une dégradation croissante dans l'ordre : 25°C > 60°C > acidité ≥ oxydation > basicité. La molécule est fortement dégradée (60%) dès le J0 et plus aucune trace d'adrénaline n'est visible au J1. En condition acide, l'adrénaline est plus stable : La dégradation est d'environ 20% au J0 puis la courbe rejoint celle de l'oxydation, atteignant une dégradation d'environ 40% au J4. Pour ce qui est de la température, l'adrénaline subit une dégradation plus forte à 60°C qu'à 25°C. Les deux courbes évoluent de manière comparable.

Les autres molécules ayant un profil de dégradation similaire, seul le graphique de l'adrénaline est présenté dans cette section. Les autres graphiques ainsi que les résultats bruts sont en Annexe 18- 20.

Sur le chromatogramme de la Figure 15, les résultats obtenus pour le témoin acide du J0 au J4 ainsi que le résultat de l'analyse du contrôle acide sont superposés.

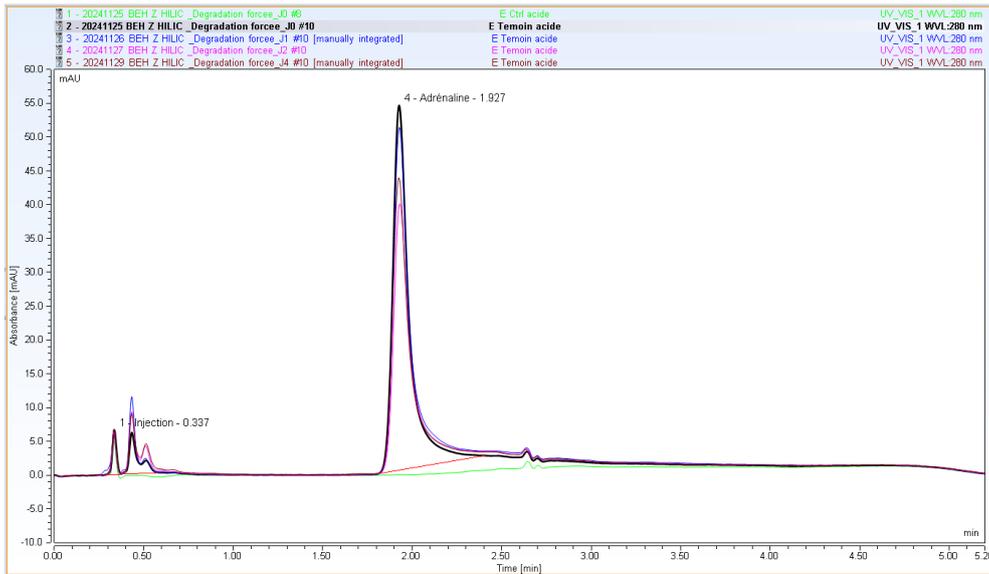


Figure 15 : Superposition des résultats chromatographiques obtenus pour la dégradation forcée de l'E en condition acide (J0 à J4) et contrôle acide (J0)

En comparaison avec l'échantillon contrôle, des pics additionnels sont observés sur les chromatogrammes dès le J0. De plus, l'intensité de ces pics augmente graduellement au cours du temps, alors que celui de l'adrénaline diminue. Dans le cas présent, et pour quasi la totalité des résultats observés, la méthode analytique développée est capable de séparer la substance mère des produits de dégradation.

En revanche, une déformation de pic a été observé pour la noradrénaline en condition acide ainsi que pour l'isoprénaline en condition basique. Ces résultats sont respectivement présentés dans Figure 16 et Figure 17, par superposition aux résultats obtenues à température ambiante au J0

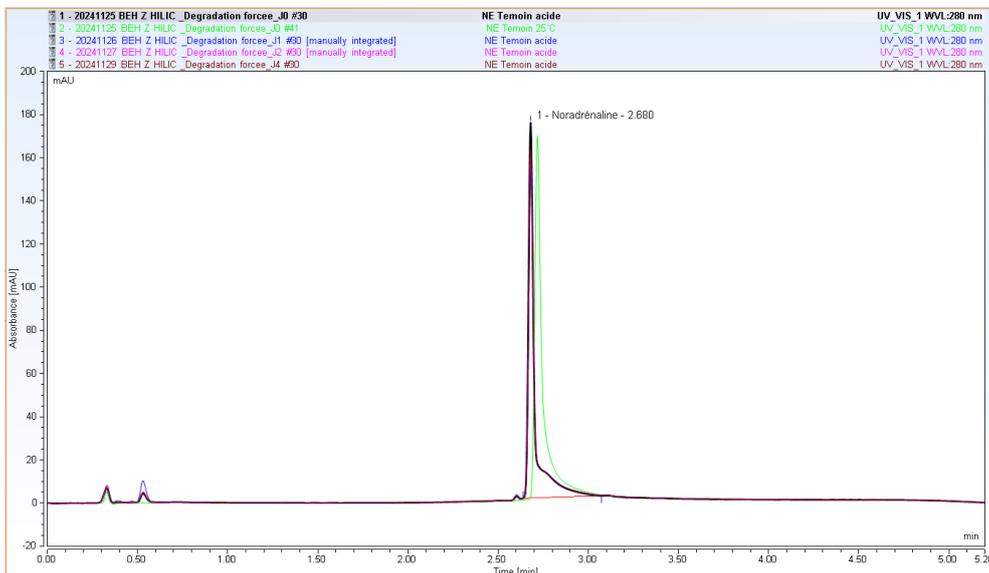
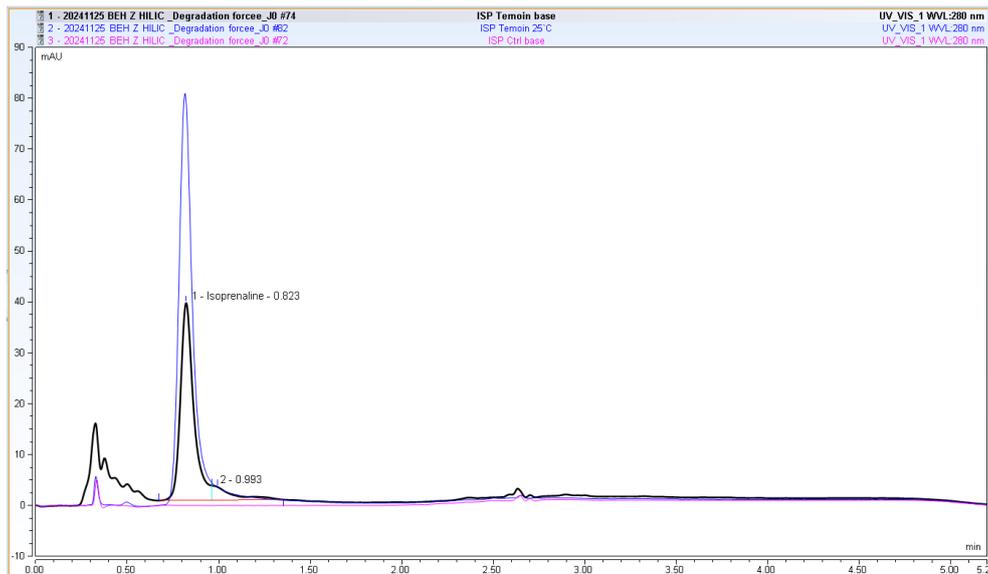


Figure 16 : Superposition des résultats chromatographiques obtenus pour la dégradation forcée de la NE en condition acide (J0 à J4) et témoin à 25°C (J0)

Comparé au pic d'E obtenu le J0 à 25°C (en vert), les pics d'E en condition acide présentent tous une déformation au niveau de la traînée de pic, laissant penser qu'un produit de dégradation apparu dès le J0 puisse avoir un  $t_R$  similaire à celui de l'E : l'intensité de cette bosse n'évolue pas au fil du temps.



**Figure 17 : Superposition des résultats chromatographiques obtenus pour la dégradation forcée de l'IPN en condition basique (J0), témoin à 25°C (J0) et contrôle basique (J0)**

Des résultats similaires ont été observés pour l'IPN en conditions basiques. Comme la quantité restante d'IPN au J1 est de 3.1% (cf. Annexe 20), il est impossible de pouvoir comparer l'évolution de la situation au cours du temps.

Les déformations de pics apparaissent sur la traînée du pic usuel et sont de moindre intensité. Elles ne sont observées que pour deux molécules (NE, IPN) et dans des conditions précises (pH acide, basique). À ce stade et avec la technique de détection utilisée (DAD), il est impossible d'identifier la cause de tels résultats. L'existence d'un produit de dégradation d'origine hydrolytique (pH acide pour NE, basique pour IPN) éluant en même temps que les molécules mères reste une probabilité. Aucune investigation supplémentaire n'a été menée lors de ce travail de recherche. Mais il pourrait être intéressant de refaire cette expérience en utilisant un moyen de détection par spectrométrie de masse (MS) afin d'affirmer (ou non) la présence de produits de dégradation, mais également d'en investiguer l'identité.

De plus, tous les produits de dégradations ne sont pas visibles en UV, ce qui veut dire que certains d'entre eux ne sont peut-être pas détectés par la méthode. Une approche complémentaire, telle que la MS, est dès lors nécessaire si une étude approfondie des produits de dégradation est nécessaire.

La méthode analytique est dite sélective et spécifique lorsqu'elle permet de garantir que le signal mesuré provient uniquement de la substance d'intérêt. À ce stade, il était possible d'affirmer que la méthode est sélective et spécifique car elle permet de séparer les cinq catécholamines dans un mélange. De plus, elle est suffisamment robuste pour donner des résultats constants lors de chaque injection.

### 3.3. Validation de la méthode analytique

La validation de la méthode est basée sur les recommandations ICH Q2(R2) (49). La méthode de validation présentée en 1.3.6 a été appliquée aux catécholamines suivantes : l'adrénaline, la noradrénaline, la dopamine et l'isoprénaline. Les protocoles de validation détaillés, ils sont présentés en Annexe 3-6.

#### 3.3.1. Estimation des limites de détection et quantification des catécholamines

Les résultats chromatographiques obtenus suite à l'analyse de mélange des 5 catécholamines aux concentrations de 250.00 µg/mL (la plus haute), ainsi qu'à 2.50 µg/mL (la plus basse), sont présentés en Annexe 16. Toutes les catécholamines étaient détectables, même avec le bruit important à la concentration la plus basse testée. La LOD des catécholamines est dès lors estimée comme inférieure à 2.50 µg/mL. Pour la LOQ, elle a été estimée à environ 10.00 µg/mL car toutes les substances étaient détectables et le bruit ne semblait pas perturber les signaux. Ainsi, pour la validation, les concentrations choisies n'étaient jamais inférieures à 10.00 µg/mL.

### 3.3.2. Fonctions réponses des différentes molécules validées et linéarité

Lors de chaque série de validation et pour chaque molécule, les droites d'étalonnage à trois niveaux ont été établies de façon externe à l'échantillon, avec trois répétitions de mesure et à l'aide d'étalons reconstitués dans une matrice de substitution (H<sub>2</sub>O), sans standard interne. Le modèle choisi était la régression linéaire.

Les fonctions réponses moyennes des molécules validées sont présentées dans le Tableau 9. Les données brutes et les graphiques des droites de calibration sont en Annexe 21-24.

**Tableau 9 : Moyennes des fonctions réponses expérimentale de l'E, la NE, la DA et l'IPN**

Molécule	Pente	Ordonnée à l'origine	R <sup>2</sup>
Adrénaline	0.080264	- 0.20	0.99912
Noradrénaline	0.093764	- 0.13	0.99847
Dopamine	0.114088	- 1.91	0.99533
Isoprénaline	0.073253	- 0.69	0.99588

Les coefficients de corrélation (R<sup>2</sup>) des fonctions réponse des différentes molécules sont tous supérieurs à 0.99500. Plus ce coefficient est proche de 1, plus la droite théorique tracée est alignée sur les points expérimentaux.

Le choix des concentrations utilisées s'est basé sur les concentrations les plus basses des spécialités médicamenteuses disponibles au CHUV, afin de pouvoir doser tout échantillon transmis à la Pharmacie centrale par les unités de soins, mais également sur les valeurs de LOD et LOQ estimées. (cf. Paragraphe 3.3.1) Les spécialités en question étaient : adrénaline Bichsel 0.1 mg/mL (ampoules de 1.0 mL), NORadrénaline Sintetica 1 mg/mL (solution pour perfusion), dopamine Fresenius 5.0 mg/mL (solution pour perfusion) et l'isoprénaline HCl 0.1 mg/mL (solution injectable) (19).

Les spécialités disponibles au CHUV ne contiennent pas toutes le sel chlorhydrate des différentes catécholamines. Afin que la méthode puisse être utilisée pour l'analyse des différentes spécialités disponibles, le sel ainsi que la pureté des standards utilisés ont été pris en compte pour la préparation des différentes solutions pendant la validation. Les concentrations sont donc données en catécholamine base (cf. Annexe 3-6)

Pour les standards de validation, les catécholamines ont été reconstituées dans une matrice similaire à celle de la spécialité afin de voir si un effet matrice était observé, mais également pour tester la spécificité de la méthode lors de la présence d'autres excipients. Les spécialités disponibles au CHUV ont une matrice simple, composée exclusivement du NaCl 0.9% ou du glucose 5%, à l'exception de la dopamine Fresenius qui contient de l'acétylcystéine ainsi que de l'EDTA disodique. Ces molécules n'absorbent pas d'elles-mêmes en UV à 280 nm, donc ne sont pas détectables avec la méthode analytique utilisée (86,87). Elles n'ont de ce fait pas été utilisées.

### 3.3.3. Résultats de validation de l'E, la NE, la DA et l'IPN

Le Tableau 10 résume les résultats des différents critères de validation (justesse, répétabilité, fidélité, limites supérieure et inférieure) des catécholamines validées (adrénaline, noradrénaline, dopamine et isoprénaline) aux concentrations choisies. Toutes les données brutes des aires mesurées, biais, concentrations recalculées et les taux de recouvrement sont présentés en Annexe 21-24.

Tableau 10 : Profils d'exactitude relatifs de l'adrénaline, la noradrénaline, la dopamine et l'isoprénaline

Molécules	C [µg/mL]	Justesse	Répétabilité (CVr)	Fidélité intermédiaire	Intervalle de confiance	Limite inférieure	Limite supérieure
E	10.0	102.4 %	0.8 %	1.7 %	3 %	99 %	106 %
	15.0	100.6 %	1.0 %	1.5 %	3 %	98 %	104 %
	20.0	100.9 %	0.8 %	1.6 %	3 %	98 %	104 %
NE	15.0	100.6 %	1.4 %	1.6 %	3 %	97 %	104 %
	20.0	101.9 %	1.2 %	1.5 %	3 %	99 %	105 %
	25.0	102.5 %	0.9 %	1.3 %	3 %	100 %	105 %
DA	200.0	99.5 %	0.7 %	1.1 %	2 %	97 %	102 %
	350.0	98.9 %	0.7 %	0.9 %	2 %	97 %	101 %
	500.0	99.7 %	0.7 %	0.8 %	2 %	98 %	101 %
IPN	15.0	101.0 %	1.9 %	2.0 %	4 %	97 %	105 %
	20.0	100.7 %	1.6 %	1.8 %	4 %	97 %	104 %
	25.0	100.8 %	1.2 %	1.5 %	3 %	98 %	104 %

La concentration des standards de validation a été recalculée à partir de la droite de calibration réalisée le jour même. Puis, dans le tableau ci-dessus, la justesse est exprimée en taux de recouvrement des standards de validation par rapport aux standards de calibration. Ainsi, un taux de recouvrement proche de 100% montre que les moyennes expérimentales sont très proches des valeurs de référence.

Le biais absolu et le biais relatif peuvent également exprimer la justesse. Ce dernier a été calculé mais n'est présenté qu'en Annexe 3-6.

La fidélité est la mesure des erreurs aléatoires, reflétant la dispersion d'une série de mesures provenant d'un même échantillon homogène. Elle se mesure à deux niveaux : la répétabilité et la fidélité intermédiaire, toutes deux exprimées soit par l'écart-type, soit, comme dans le Tableau 10, par le coefficient de variation. Ainsi, plus ces mesures sont faibles, plus la fidélité de la méthode analytique est haute. Ici, ces critères ne dépassent pas les 2.0%, ce qui signifie que la méthode analytique proposée a une bonne fidélité pour les quatre molécules validées, dans la plage de concentrations choisies.

Au vu des faibles concentrations des solutions ainsi que du mode UHPLC utilisé (HILIC), les limites d'acceptation de la méthode ont été fixées à 6% pour l'E, la NE et l'IPN. Pour la DA, comme les concentrations étaient plus élevées, des limites plus strictes, à 5%, ont été établies.

### 3.3.4. Validation de l'adrénaline (E)

La première molécule validée a été l'adrénaline (E). Le profil d'exactitude relatif est présenté dans la Figure 18. Les données brutes sont présentées dans le Tableau 10 et en Annexe 21.

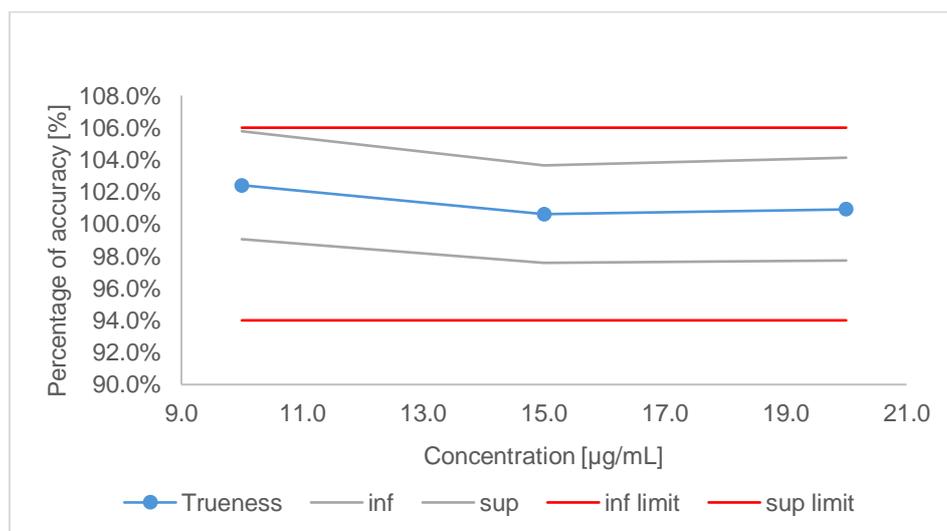


Figure 18 : Profil d'exactitude relatif de la méthode pour la quantification de l'adrénaline

L'exactitude d'une méthode analytique est liée à la notion de justesse et de fidélité sur la gamme de concentrations établies. Elle exprime le degré de concordance entre la moyenne des résultats d'une

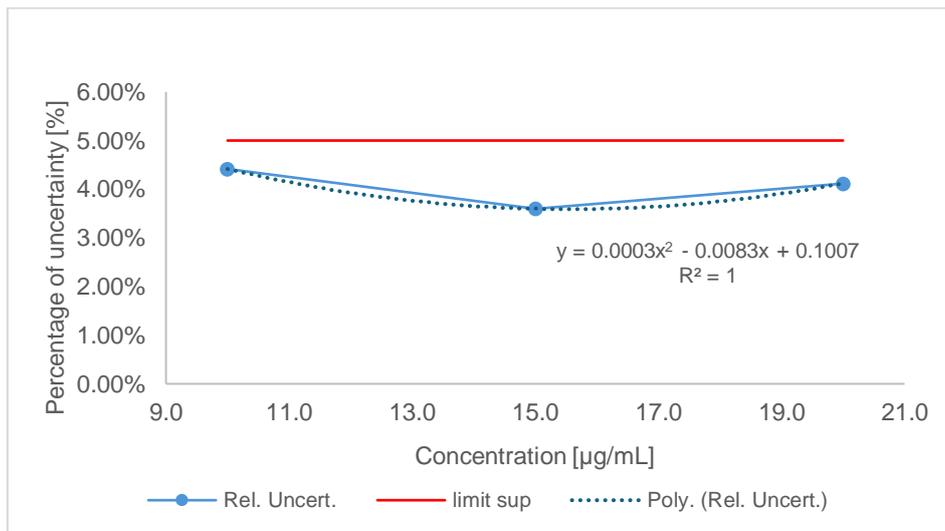
série d'essais et une valeur de référence (ou valeur vraie) et prend en compte l'erreur totale (systémique et aléatoire). Elle représente le degré de confiance des résultats obtenus par la méthode.

L'exactitude de la mesure à la plus faible concentration est plus proche des limites imposées que les deux autres concentrations. Le taux de recouvrement présenté dans le Tableau 10 est également plus grand que le taux de recouvrement à 15 et 20 µg/mL, ce qui signifie que la mesure de la concentration la plus faible de l'adrénaline a tendance à être surestimée (biais relatif de + 2.44 %). La méthode est alors moins juste à 10 µg/mL.

La justesse de la mesure de la concentration la plus faible d'adrénaline reste toutefois acceptable puisque le biais est inférieur à la limite de 6%. Quant à l'intervalle de confiance, qui définit l'intervalle des valeurs ayant 95% de chance de contenir la mesure d'un échantillon d'adrénaline à 10.0 µg/mL, elle est également contenue dans les limites fixées (6%). Autrement dit, les imprécisions de mesures liées aux erreurs systématiques et à la probabilité d'erreur lors d'une répétition de mesure se trouvent également dans les limites d'acceptation.

Comme la situation décrite s'applique également aux trois concentrations testées et que ces données ont été obtenues sur cinq essais indépendants, il est possible d'affirmer que la méthode analytique présentée est suffisamment précise, juste et répétable pour quantifier un échantillon d'adrénaline se trouvant dans la gamme de concentration allant de 10 à 20 µg/mL. La méthode analytique est donc validée pour la quantification de l'adrénaline.

Le profil d'incertitude relatif de l'adrénaline est présenté en Figure 19. Il représente l'évolution de l'incertitude d'une méthode en fonction de la concentration de l'analyte. Par exemple, pour la concentration la plus basse, l'incertitude relative s'élève à 4.42 %. (cf. Annexe 21) Cela signifie que, lorsqu'un échantillon d'adrénaline est quantifié à 10.0 µg/mL, en réalité la concentration vraie de cet échantillon sera comprise entre 9.66 et 10.44 µg/mL et il sera impossible de déterminer sa concentration avec une plus grande précision. La limite d'incertitude est fixée à 5% pour toutes les molécules validées.



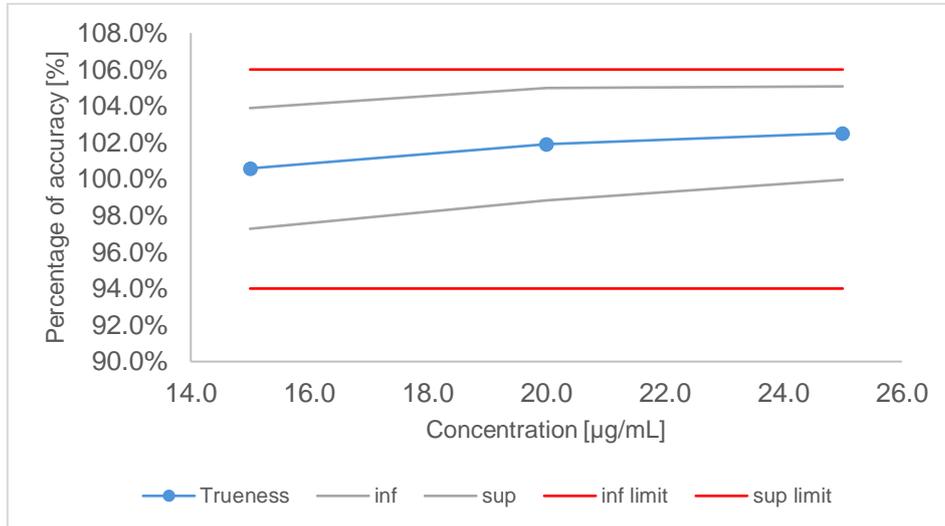
**Figure 19 : Profil d'incertitude relatif de la méthode pour la quantification de l'adrénaline**

La fonction polynomiale associée aux résultats expérimentaux peut être utilisée pour estimer l'incertitude de mesure pour une concentration comprise entre les trois points choisis ( gamme de 10 à 20 µg/mL).

Le processus de validation pour cette molécule a été compliqué. Les premières séries ne donnaient pas les résultats escomptés : les intervalles de confiance dépassaient la limite de 6% sur le profil d'exactitude (environ 8%) et les incertitudes de mesure atteignaient les 19.0 %. Les concentrations utilisées étant très faibles, ces résultats étaient probablement liés à des imprécisions pratiques : à faibles concentrations, la moindre imprécision peut avoir un grand impact sur les résultats. L'intégration des pics par Chroméléon peut être moins précise et influencée par le bruit de fond.

### 3.3.5. Validation de la noradrénaline (NE)

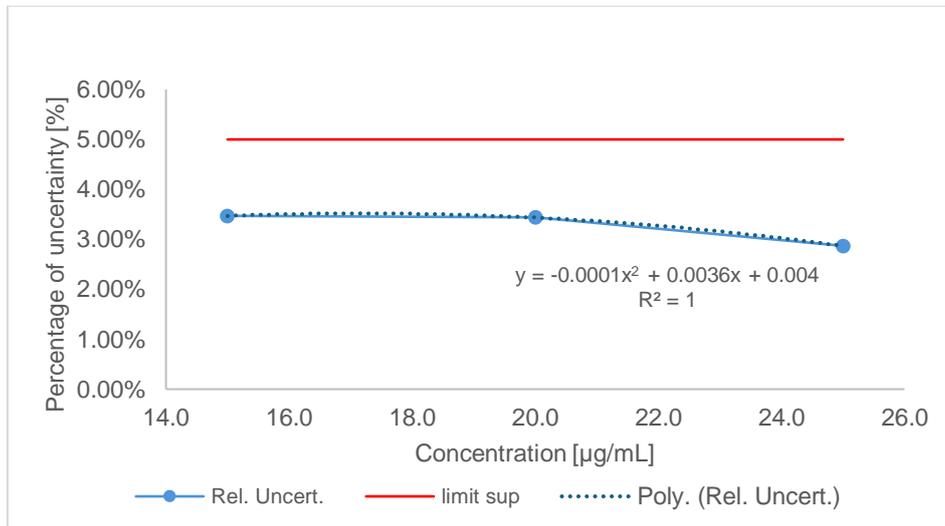
La deuxième molécule validée a été la noradrénaline. Suite aux difficultés observées lors de la première validation, la gamme des concentrations choisie a été adaptée : la concentration la plus faible de noradrénaline testée ( $C = 15 \mu\text{g/mL}$ ) est supérieure à celle de l'adrénaline (cf Tableau 10). De la même manière que pour l'adrénaline, tous les points entre dans la limite d'acceptation de 6 % dans le profil d'exactitude de la noradrénaline, présenté en Figure 20.



**Figure 20 : Profil d'exactitude relatif de la méthode pour la quantification de la noradrénaline**

Ces résultats permettent d'affirmer que l'exactitude de la méthode d'analyse proposée est suffisante pour la quantification de la noradrénaline dans la gamme de 15.0 à 25.0  $\mu\text{g/mL}$ . Une augmentation du taux de recouvrement (et donc, une diminution de la justesse des mesures) en fonction de la concentration est observée. Les erreurs de pratiques au laboratoire pourraient expliquer ce phénomène.

Le profil d'incertitude de la noradrénaline est présenté dans la Figure 21. L'incertitude de mesure est inférieure à la limite de 5%. Le profil de l'incertitude de mesure est plutôt constant.



**Figure 21 : Profil d'incertitude relatif de la méthode pour la quantification de la noradrénaline**

La validation de la noradrénaline a été nettement plus simple : 5 séries ont suffi. Cela peut être expliqué par les habitudes de pratique mais également par le changement de gamme de concentrations effectué. En effet, comme la concentration la plus faible était de 15  $\mu\text{g/mL}$  (au lieu de 10  $\mu\text{g/mL}$  pour l'adrénaline), l'intensité des pics des chromatogrammes est plus élevée, ce qui permet d'avoir une meilleure intégration du pic par Chroméléon, plus robuste face au bruit de fond. En résulte alors des données

plus fiables. Pour ces raisons, la même gamme de concentration a été gardée lors de la validation de l'isoprénaline (cf. Tableau 10, Annexe 24).

### 3.3.6. Validation de la dopamine (DA)

Le protocole de validation de la dopamine est disponible en Annexe 5. Le profil d'exactitude relatif de la méthode ainsi que le profil d'incertitude sont respectivement présentés en Figure 22 et Figure 23.

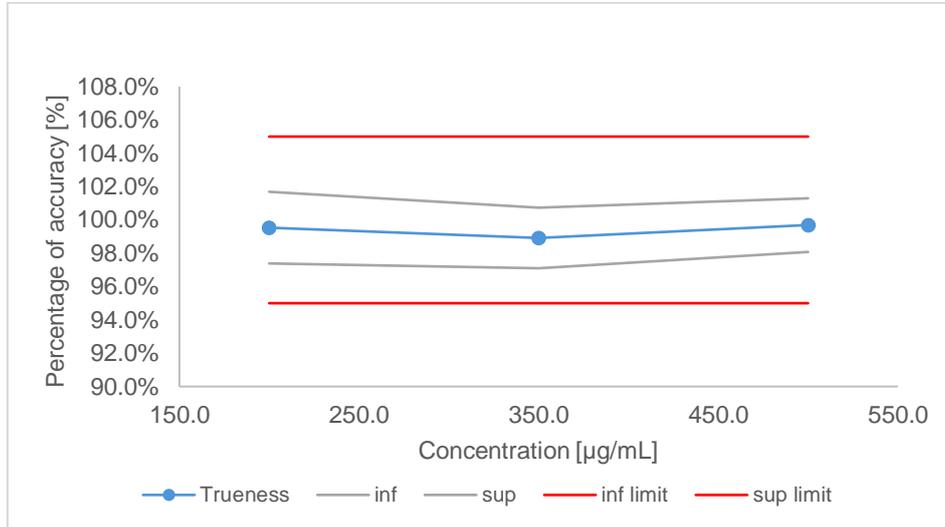


Figure 22 : Profil d'exactitude relatif de la méthode pour la quantification de la dopamine

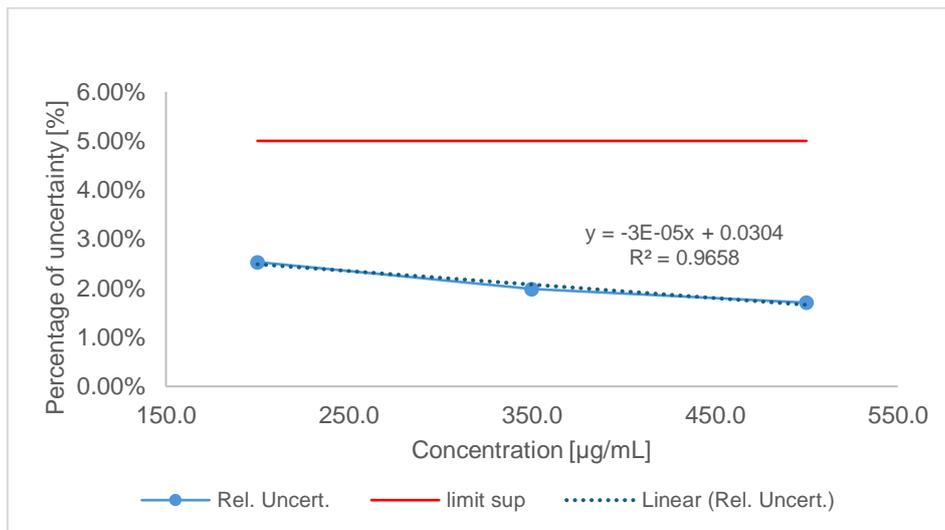


Figure 23 : Profil d'incertitude relatif de la méthode pour la quantification de la dopamine

Contrairement aux trois autres catécholamines, les solutions standards de validations de la DA ont été reconstituées dans du glucose 5% pour correspondre à la matrice des spécialités médicamenteuses disponibles au CHUV. Aucun effet matrice n'a été observé. Aucune difficulté quant aux préparations n'a été relevée.

La gamme de concentration choisie pour la dopamine est supérieure à celles utilisées pour l'E, la NE et l'IPN, dues aux concentrations d'administration plus élevées. Le profil d'incertitude est plus faible que celui des autres catécholamines et diminue en fonction de la concentration, ce qui est attendu, comme discuté précédemment. L'équation de régression linéaire a un  $R^2$  proche de 1, ce qui permettra d'obtenir une incertitude de mesure plus juste lors de la quantification d'un échantillon dans cette gamme de concentration. Le profil d'exactitude obtenu est relativement constant, avec des intervalles de confiance réduits par rapport aux autres molécules (cf. Tableau 10), ce qui était attendu au vu des concentrations testées. Comme ces dernières étaient plus élevées, des limites d'acceptation plus strictes ont été

appliquée :  $\pm 5\%$ , correspondant aux standards les plus stricts appliqués dans l'industrie pharmaceutique.

La méthode analytique développée permet alors de quantifier un échantillon de dopamine se trouvant dans la gamme testée avec une exactitude similaire.

### 3.3.7. Validation de l'isoprénaline (IPN)

Enfin, la dernière molécule validée a été l'isoprénaline. Le protocole de validation ainsi que les résultats bruts sont présentés respectivement en Annexe 6 et Annexe 24. Concernant le profil d'exactitude de la méthode ainsi que le profil d'incertitude, ils sont respectivement présentés en Figure 24 et Figure 25.

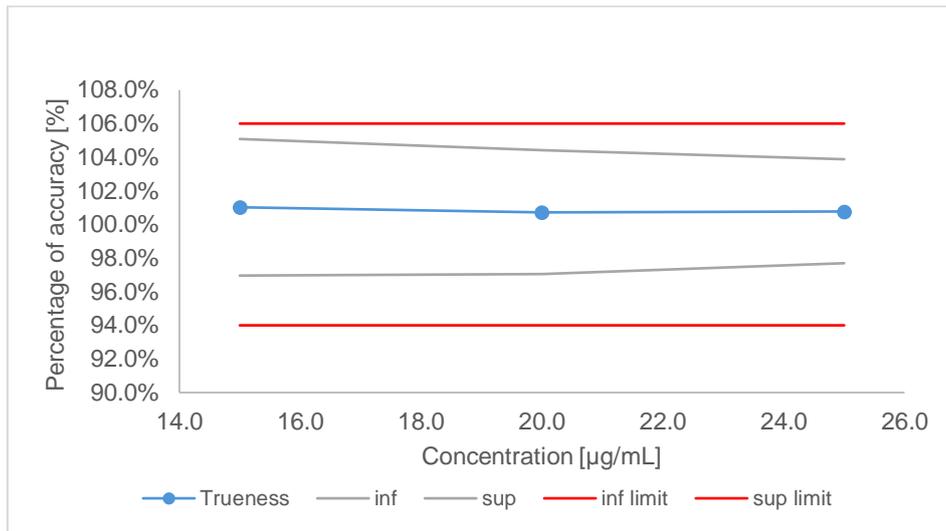


Figure 24 : Profil d'exactitude de la méthode pour la quantification de l'isoprénaline

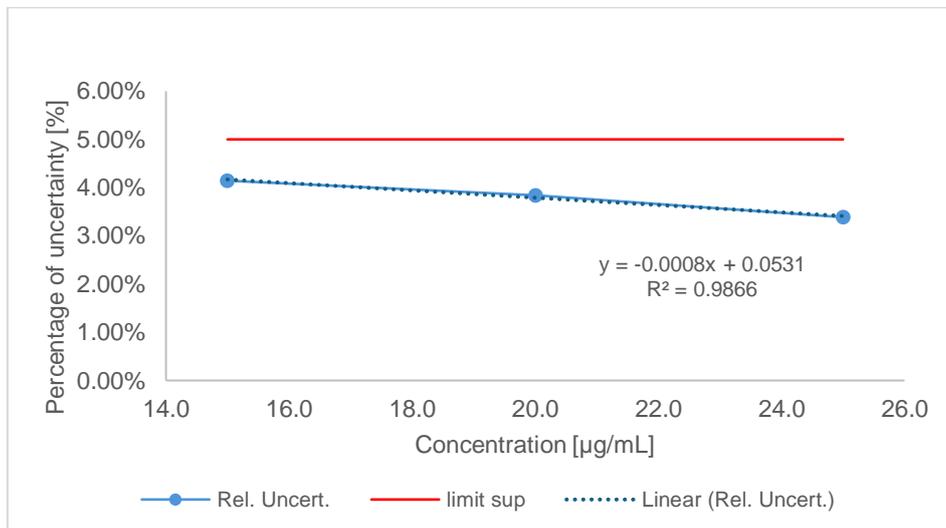


Figure 25 : Profil d'incertitude relatif de la méthode pour la quantification de l'isoprénaline

Toutes les valeurs entrent dans les limitations imposées (6% pour l'exactitude, 5% pour l'incertitude).

Avec ces derniers résultats obtenus, la méthode UHPLC-UV développée lors de ce travail personnel de recherche a été validée pour l'entièreté des molécules d'intérêt, dans les gammes de concentrations décrites dans le Tableau 10. Cette méthode est considérée comme suffisamment spécifique, sélective, robuste et exacte pour permettre son utilisation en routine.

## 4. Conclusion et perspectives

Le présent travail personnel de recherche a été initié suite à une investigation qualité concernant l'administration des catécholamines utilisées par les unités de soin au Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV) et à l'absence d'une méthode analytique unique pour leur analyse. Les catécholamines concernées étaient : l'adrénaline (E), la noradrénaline (NE), la dopamine (DA), la dobutamine (DOB) et l'isoprénaline (IPN).

Une méthode gradient UHPLC-UV spécifique, robuste, exacte et rapide a été développée et validée afin de doser et de quantifier toutes les catécholamines citées, hormis la DOB dont les propriétés physico-chimiques diffèrent de celles des autres. Sa spécificité, son exactitude et sa rapidité permettent un usage en routine au Service de Pharmacie du CHUV, non seulement dans le contexte des investigations qualité et sécurité patient, mais également lors de productions en série.

La méthode développée utilise un mode gradient et une colonne de chromatographie liquide à interactions hydrophiles (HILIC) contenant des groupements sulfobétaïne : colonne BEH Z-HILIC. Sa performance a été unanimement évaluée comme étant la meilleure pour toutes les molécules selon le score développé. Cette évaluation reposait sur un large éventail d'analyses réalisées par des méthodes gradient génériques, utilisées dans différentes conditions d'analyse (pH acide/basique, débit, type de tampon et concentrations de tampon), sur sept phases stationnaires de chromatographie liquide (RPLC et HILIC). Les critères de choix dudit score ont été : le temps de rétention, l'intensité, l'asymétrie et la largeur à mi-hauteur des pics chromatographiques.

La méthode sélectionnée par le score a ensuite été optimisée afin de réduire le temps d'analyse et de réduire l'asymétrie des pics. La suppression de l'effet de sel par changement de la composition de la phase mobile et l'ajustement des proportions des phases mobiles et du gradient ont grandement contribué à l'atteinte de ces objectifs.

Une étude de dégradation forcée, réalisée sur l'E, la NE, la DA et l'IPN, a permis de mettre en évidence la sélectivité de la méthode pour ces molécules face aux produits de dégradation. Toutes les catécholamines ont présenté un profil de dégradation similaire : Elles sont stables à 25 et 60°C, des profils de dégradation similaires en conditions acides et oxydatives, et une dégradation totale en conditions basiques. Les pics des produits de dégradations détectables en UV étaient séparés de ceux des molécules mères. Une réserve est toutefois émise au niveau de la noradrénaline à pH acide et de l'isoprénaline à pH basique car une irrégularité de pics a été détectée et pourrait être liée à une co-élution d'un produit de dégradation. Des investigations approfondies en utilisant une autre méthode de détection, comme la spectrométrie de masse (MS), pourraient permettre de déterminer la présence (ou non) d'un deuxième produit et de le caractériser.

L'analyse de l'adrénaline, de la noradrénaline, de la dopamine et de l'isoprénaline a ensuite été validée en suivant les recommandations ICH Q2(R2). La procédure mise en place a été réalisée sur 5 jours consécutifs pour toutes les molécules et avec la réalisation d'une courbe dose-réponse à trois niveaux, trois répétitions de mesure. Des limites d'acceptabilités strictes ont été respectées : 6% pour E, NE, de IPN et 5% pour la DA. Les incertitudes de mesure étaient toutes inférieures à 5%.

Le score développé pourrait faire l'objet d'une autre étude visant son amélioration. Le présent modèle ne permet pas de juger de la sélectivité de la méthode, or il s'agit d'une qualité recherchée. Cette information, couplée à la rétention des composés, permettrait d'obtenir un score plus élevé pour les méthodes présentant des temps de rétention faibles mais une sélectivité optimale. Ainsi, le score pourrait notamment être utilisé afin de qualifier les méthodes testées lors d'une phase d'optimisation.

Concernant la méthode développée, il pourrait être intéressant de la tester sur d'autres appareils HPLC dans d'autres laboratoires et par d'autres opérateurs. Le but serait alors de déterminer la reproductibilité et la robustesse inter-laboratoire de la méthode en vue d'un transfert à d'autres hôpitaux ou laboratoires. La méthode pourrait être testée et validée pour l'analyse d'autres médicaments sympathomimétiques, comme la phényléphrine par exemple. Il serait également possible de concevoir un système de chromatographie liquide bidimensionnelle (LC-2D), où la colonne BEH Z-HILIC serait couplée en série à une colonne RPLC, ce qui pourrait permettre l'analyse de la dobutamine en plus des quatre autres catécholamines.

## Bibliographie

1. Maestroni GJM. Adrenergic modulation of hematopoiesis. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* (15). 2020;82-92.
2. Katzung BG, Vanderah TW, directeurs. *Katzung's basic & clinical pharmacology*. 16<sup>e</sup> éd. New York Chicago San Francisco Athens London Madrid Mexico City Milan New Delhi Singapore Sydney Toronto: McGraw-Hill; 2023. (A Lange medical book).
3. Lemke TL, Williams DA, Roche VF, Zito SW, Foye WO, directeurs. *Foye's principles of medicinal chemistry*. 7 (International edition). Philadelphie: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
4. Brunton LL, Knollmann BC, directeurs. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. Fourteenth edition. New York Chicago San Francisco: McGraw Hill; 2023.
5. Manaker S, Gong MN, Finlay G. Use of vasopressors and inotropes. In: UpToDate [Internet]. Waltham, MA: UpToDate; 2024 [cité 12 août 2024]. Disponible sur: [https://www.uptodate.com/contents/use-of-vasopressors-and-inotropes?search=dobutamine&source=search\\_result#H21](https://www.uptodate.com/contents/use-of-vasopressors-and-inotropes?search=dobutamine&source=search_result#H21)
6. Bloom JE, Chan W, Kaye DM, Stub D. State of Shock: Contemporary Vasopressor and Inotrope Use in Cardiogenic Shock. *Journal of the American Heart Association*. 2023;12(15):e029787.
7. UpToDate Lexidrug. Epinephrine (adrenaline) (systemic): Drug information. In: UpToDate [Internet]. Waltham, MA: UpToDate; 2024 [cité 9 août 2024]. Disponible sur: [https://www.uptodate.com/contents/epinephrine-adrenaline-systemic-drug-information?search=adr%C3%A9naline&source=search\\_result&selectedTitle=1%7E150&usage\\_type=panel&showDrugLabel=true&display\\_rank=1s](https://www.uptodate.com/contents/epinephrine-adrenaline-systemic-drug-information?search=adr%C3%A9naline&source=search_result&selectedTitle=1%7E150&usage_type=panel&showDrugLabel=true&display_rank=1s)
8. UpToDate Lexidrug. Norepinephrine (noradrenaline): Drug information. In: UpToDate [Internet]. Waltham, MA: UpToDate; [cité 12 août 2024]. Disponible sur: [https://www.uptodate.com/contents/norepinephrine-noradrenaline-drug-information?search=noradr%C3%A9naline&source=search\\_result&selectedTitle=1%7E150&usage\\_type=panel&kp\\_tab=drug\\_general&display\\_rank=1](https://www.uptodate.com/contents/norepinephrine-noradrenaline-drug-information?search=noradr%C3%A9naline&source=search_result&selectedTitle=1%7E150&usage_type=panel&kp_tab=drug_general&display_rank=1)
9. Russell JA, Gordon AC, Williams MD, Boyd JH, Walley KR, Kisson N. Vasopressor therapy in the intensive care unit. *Semin Respir Crit Care Med*. 2021;42(01):059-77.
10. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, Antonelli M, Coopersmith CM, French C, et al. Surviving sepsis campaign : International guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Critical Care Medicine*. 2021;49(11):e1063.
11. Jia L, Wang P, Li C, Xie J. The efficacy and safety of vasopressors for septic shock patients : A systematic review and network meta-analysis. *Shock*. 2023;60(6):746-52.
12. UpToDate Lexidrug. Dopamine: Drug information. In: UpToDate [Internet]. Waltham, MA: UpToDate; [cité 12 août 2024]. Disponible sur: [https://www.uptodate.com/contents/dopamine-drug-information?search=dopamine&source=search\\_result&selectedTitle=1%7E150&usage\\_type=panel&kp\\_tab=drug\\_general&display\\_rank=1#F162660](https://www.uptodate.com/contents/dopamine-drug-information?search=dopamine&source=search_result&selectedTitle=1%7E150&usage_type=panel&kp_tab=drug_general&display_rank=1#F162660)
13. Schmidt GA, Sexton D, Finlay G. Evaluation and management of suspected sepsis and septic shock in adults. In: UpToDate [Internet]. Waltham, MA: UpToDate; 2024 [cité 12 août 2024]. Disponible sur: [https://www.uptodate.com/contents/use-of-vasopressors-and-inotropes?search=dobutamine&source=search\\_result#H21](https://www.uptodate.com/contents/use-of-vasopressors-and-inotropes?search=dobutamine&source=search_result#H21)
14. UpToDate Lexidrug. Dobutamine: Drug information. In: UpToDate [Internet]. Waltham, MA: UpToDate; 2024 [cité 12 août 2024]. Disponible sur: <https://www.uptodate.com/contents/dobutamine-drug->

- information?search=dobutamine&source=search\_result&selectedTitle=1%7E150&usage\_type=panel&kp\_tab=drug\_general&display\_rank=1#F161962
15. UpToDate Lexidrug. Isoproterenol: Drug information. In: UpToDate [Internet]. Waltham, MA: UpToDate; 2024 [cité 12 août 2024]. Disponible sur: [https://www.uptodate.com/contents/isoproterenol-drug-information?search=isoproterenol&source=search\\_result&selectedTitle=1%7E63&usage\\_type=panel&kp\\_tab=drug\\_general&display\\_rank=1](https://www.uptodate.com/contents/isoproterenol-drug-information?search=isoproterenol&source=search_result&selectedTitle=1%7E63&usage_type=panel&kp_tab=drug_general&display_rank=1)
  16. Levy B, Buzon J, Kimmoun A. Inotropes and vasopressors use in cardiogenic shock: when, which and how much? *Current opinion in critical care*. 2019;25(4):384.
  17. Gamper G, Havel C, Arrich J, Losert H, Pace NL, Müllner M, et al. Vasopressors for hypotensive shock. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2016;(2).
  18. Leone M, Vallet B, Teboul JL, Mateo J, Bastien O, Martin C. Survey of the use of catecholamines by French physicians. *Intensive Care Med*. 2004;30(5):984-8.
  19. RefMed [Internet]. 2024. RefMed. Disponible sur: [refmed-consult-interne.chuv.ch](http://refmed-consult-interne.chuv.ch)
  20. Rapphold BD, Metzenthin P, Oertle M, Küng K. Medication errors caused by nurses and physicians in a swiss acute care community hospital: Frequency and correlation to nurses' reported workload. *International Journal of Health Professions*. 2018;5(1):15-24.
  21. Schroers G, Ross JG, Moriarty H. Nurses' Perceived Causes of Medication Administration Errors: A Qualitative Systematic Review. *The Joint Commission Journal on Quality and Patient Safety*. 2021;47(1):38-53.
  22. Giannetta N, Trapani J, Dionisi S, De Leo A, Petrone F, D'Agostino F, et al. Medication administration error prevention among nurses working in intensive care units: A secondary analysis. *Nursing in Critical Care*. 2024;29(2):335-46.
  23. National coordinating council for medication error reporting and prevention (NCCMERP). What is a medication error? [Internet]. 2024 [cité 14 août 2024]. Disponible sur: <https://www.nccmerp.org/about-medication-errors>
  24. Giannetta N, Dionisi S, Cassar M, Trapani J, Renzi E, Simone ED, et al. Measuring knowledge, attitudes and behavior of nurses in medication management: cross-cultural comparisons in Italy and Malta.
  25. Vincent C, Staines A. Améliorer la qualité et la sécurité des soins en Suisse - Rapport national sur la qualité et la sécurité des soins en Suisse. Oxford, Clarmont: Office fédéral de la santé publique (OFSP); 2019 juin p. 86.
  26. European collaborative action on medication errors and traceability (ECAMET). The urgent need to reduce medication errors in hospitals to prevent patient and second victim harm [Internet]. Dublin (IE): European Alliance for Access to safe medicines EAASM; 2022 mars [cité 16 août 2024] p. 28. Disponible sur: <https://ecamet.eu/wp-content/uploads/2022/03/ECAMET-White-Paper-Call-to-Action-March-2022-v2.pdf>
  27. Fondation Sécurité des patients Suisse. Sécurité des patients Suisse - La sécurité de la médication aux interfaces [Internet]. Programme Progrès! 2017 [cité 19 août 2024]. Disponible sur: <https://patientensicherheit.ch/fr/programmes-nationaux/programmes-nationaux-de-mise-en-application/la-securite-de-la-medication-aux-interfaces/>
  28. Meyer-Nikolic VA, Hersperger M, Herren D. Erreurs de prescription. Editores Medicorum Helveticorum (EMH); 2012 p. 1595-9. (Bulletin des médecins suisses). Report No.: 93:44.

29. Jian M, Huang H, Li K, Chuan L, Li L, Jiang L. A 3-min UPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of plasma catecholamines and their metabolites: Method verification and diagnostic efficiency. *Clin Biochem.* 2021;87:67-73.
30. Mattioni JB, de la Reberdière C, Boudy V, Jaccoulet E. Understanding the retention mechanisms of a reversed-phase/anion exchange/cation-exchange column for the separation of epinephrine and norepinephrine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2023;227:115273.
31. Berthod A, Randon J. *Encyclopædia Universalis.* Encyclopædia Universalis; 1999 [cité 26 août 2024]. Chimie analytique. Disponible sur: <https://www.universalis-edu.com/encyclopedie/chimie-analytique> [Level: Avancé]
32. Skoog DA, West DM. *Chimie analytique.* 3<sup>e</sup> éd. De Boeck Supérieur; 2015.
33. ChemDraw [Internet]. 2024. Disponible sur: <https://revvitysignals.com/products/research/chemdraw>
34. Chemaxon. Chemicalize. [cité 28 août 2024]. Chemicalize - Instant Cheminformatics Solutions. Disponible sur: <https://chemicalize.com> [[Utilisé pour la représentation des molécules ainsi que pour la prédiction des propriétés suivantes : logP, logD (à pH = 1.7 et 6.5), pKa (acide et basique)]]
35. Burgot G, Burgot JL. *Chimie analytique: méthodes de séparation, méthodes spectrales et méthodes thermiques.* Paris: Lavoisier-Tec & doc; 2017. (Sciences de l'ingénieur).
36. Sautou V, Brossard D, Chedru-Legros V, Crauste-Manciet S, Fleury-Souverain S, Lagarce F, et al. Guide méthodologique des études de stabilité des préparations [Internet]. 1<sup>re</sup> éd. Clermont-Ferrand] [Pau: SFCP GERPA; 2013. Disponible sur: [https://www.gerpac.eu/IMG/pdf/guide\\_de\\_stabilite\\_vf\\_avril2013.pdf](https://www.gerpac.eu/IMG/pdf/guide_de_stabilite_vf_avril2013.pdf)
37. Dr Timothy Cross. Thermo fisher scientific. 2019 [cité 17 sept 2024]. HPLC or UHPLC? Disponible sur: <https://www.thermofisher.com/blog/analyteguru/hplc-or-uhplc/>
38. Guillaume D, Rudaz S, Veuthey JL. Nouveaux développements en chromatographie rapide dans le domaine pharmaceutique. *Spectra analyse.* 2009;(267):12-7.
39. Waters. Waters. [cité 17 sept 2024]. ACQUITY UPLC Columns. Disponible sur: [https://www.waters.com/waters/fr\\_FR/Colonnes-%C3%A0-particules-sub-2%C2%B5m/nav.htm?cid=513206&locale=fr\\_FR](https://www.waters.com/waters/fr_FR/Colonnes-%C3%A0-particules-sub-2%C2%B5m/nav.htm?cid=513206&locale=fr_FR)
40. Wang F, Yang F, Liu J, Bai Q. Studies on the retention mechanism of solutes in hydrophilic interaction chromatography using stoichiometric displacement theory II. HILIC/RPLC dual-retention mechanism of solutes in hydrophilic interaction chromatography over the entire range of water concentration in mobile phase. *Talanta.* 2023;265:124858.
41. Rafferty JL, Zhang L, Siepmann JI, Schure MR. Retention mechanism in reversed-phase liquid chromatography: A molecular perspective. *Anal Chem.* 2007;79(17):6551-8.
42. Josephs RD, Daireaux A, Choteau T, Westwood S, Wielgosz RI. Normal phase-liquid chromatography-tandem mass spectrometry with atmospheric pressure photoionization for the purity assessment of 17 $\beta$ -estradiol. *Anal Bioanal Chem.* 2015;407(11):3147-57.
43. Alpert AJ. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography A.* 1990;499:177-96.
44. Gama MR, da Costa Silva RG, Collins CH, Bottoli CBG. Hydrophilic interaction chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2012;37:48-60.
45. Periat AC. Utilisation de la chromatographie d'interaction hydrophile pour l'analyse de composés d'intérêt pharmaceutique [Internet]. 2015. Disponible sur: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:80919> [DOI: 10.13097/archive-ouverte/unige:80919]

46. Agilent technologies. Éléments fondamentaux de la spectrophotométrie UV-Vis - Guide [Internet]. 2021 [cité 29 août 2024]. Disponible sur: [https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/primer-uv-vis-basics-5980-1397fr-fr-agilent.pdf?srltid=AfmBOOrGGXDOY-j568\\_Jv9vv5Q0dVGviFJ5roAq9eZUKTBwO4HMmAZY2](https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/primer-uv-vis-basics-5980-1397fr-fr-agilent.pdf?srltid=AfmBOOrGGXDOY-j568_Jv9vv5Q0dVGviFJ5roAq9eZUKTBwO4HMmAZY2)
47. Mettler-Toledo International. Spectroscopie UV Vis. [cité 29 août 2024]. Spectroscopie UV Vis - Comprendre l'essentiel sur la spectroscopie UV Vis et ses applications. Disponible sur: [https://www.mt.com/ch/fr/home/applications/Application\\_Browse\\_Laboratory\\_Analytics/uv-vis-spectroscopy/uvvis-spectroscopy-explained.html](https://www.mt.com/ch/fr/home/applications/Application_Browse_Laboratory_Analytics/uv-vis-spectroscopy/uvvis-spectroscopy-explained.html)
48. Blessy M, Patel RD, Prajapati PN, Agrawal YK. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs—A review. *J Pharm Anal.* 2014;4(3):159-65.
49. International council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use (ICH). Validation of analytical procedures Q2(R2) - ICH harmonised guideline [Internet]. ICH; 2023 nov p. 36. Disponible sur: [https://database.ich.org/sites/default/files/ICH\\_Q2%28R2%29\\_Guideline\\_2023\\_1130.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q2%28R2%29_Guideline_2023_1130.pdf)
50. Feinberg M, Rudaz S. Quantification, validation and uncertainty in analytical sciences - An analyst's companion. (WILEY\_VCH).
51. Waters Corporation. Care and use manual : ACQUITY UPLC and ACQUITY Premier BEH Columns [Internet]. Waters corporation; 2021 [cité 18 juill 2024]. Disponible sur: <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715001371.pdf>
52. Waters Corporation. Care and use manual : ACQUITY UPLC and ACQUITY Premier HSS Columns [Internet]. Waters corporation; 2021 [cité 18 juill 2024]. Disponible sur: <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715001429.pdf>
53. MACHEREY-NAGEL [Internet]. [cité 19 juill 2024]. Colonne UHPLC EC (analytique), NUCLEODUR Phenyl-Hexyl, 1,8 µm, 50x2 mm. Disponible sur: <https://www.mn-net.com/ch/colonne-uhplc-ec-analytique-nucleodur-phenyl-hexyl-1-8-m-50x2-mm-760563.20>
54. Waters Corporation. Care and use manual : ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide columns [Internet]. Waters corporation; 2021 [cité 18 juill 2024]. Disponible sur: <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/720003042en.pdf>
55. Waters Corporation. Care and use manual : Atlantis Premier BEH Z-HILIC Columns [Internet]. Waters corporation; 2021 [cité 18 juill 2024]. Disponible sur: <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/720007240en.pdf>
56. MACHEREY-NAGEL [Internet]. [cité 17 sept 2024]. Colonne UHPLC EC (analytique), NUCLEODUR HILIC, 1,8 µm, 50x2 mm. Disponible sur: <https://www.mn-net.com/ch/colonne-uhplc-ec-analytique-nucleodur-hilic-1-8-m-50x2-mm-760523.20>
57. Phenomenex. Kinetex HPLC/UHPLC Columns Tips for Care and Use [Internet]. Phenomenex; 2012 [cité 18 juill 2024]. Disponible sur: <https://www.phenomenex.com/documents/2022/05/20/18/59/kinetex-care-and-use-notes>
58. Waters [Internet]. 2019 [cité 13 nov 2024]. What is the difference between a T3 trifunctional column and a C18 trifunctional column? - WKB73010. Disponible sur: [https://support.waters.com/KB\\_Chem/Columns/WKB73010\\_What\\_is\\_the\\_difference\\_between\\_a\\_T3\\_trifunctional\\_column\\_and\\_a\\_C18\\_trifunctional\\_column](https://support.waters.com/KB_Chem/Columns/WKB73010_What_is_the_difference_between_a_T3_trifunctional_column_and_a_C18_trifunctional_column)
59. Ph.Eur. 11.0, 1332 (04/2020).
60. Ph.Eur. 11.0, 1200 (01/2017).
61. Ph.Eur. 11.0, 0664 (01/2017).

62. Falamaş A, Petran A, Hada AM, Bende A. Dopamine photochemical behaviour under UV irradiation. *Int J Mol Sci.* 2022;23(10):5483.
63. Danaceau JP, Qianqian L, Balloch S, Calton LJ. Reversed-phase UPLC-MS/MS Analysis of Plasma Catecholamines and Metanephrines for Clinical Research. Waters Corporation [Internet]. 2020; Disponible sur: <https://www.waters.com/content/dam/waters/en/app-notes/2020/720006778/720006778-en.pdf>
64. Kanamori T, Isokawa M, Funatsu T, Tsunoda M. Development of analytical method for catechol compounds in mouse urine using hydrophilic interaction liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B.* 2015;985:142-8.
65. Kumar A, Hart JP, McCalley DV. Determination of catecholamines in urine using hydrophilic interaction chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A.* 2011;1218(25):3854-61.
66. Waters Corporation. Atlantis Columns: Applications notebook [Internet]. 2004. Disponible sur: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720000472en.pdf>
67. Macherey-Nagel. Macherey-Nagel chromatography: NUCLEODUR and NUCLEOSHELL [Internet]. Allemagne; Disponible sur: <https://www.mn-net.com/media/pdf/d3/aa/13/Brochure-Nucleodur-Nucleoshell.pdf>
68. Bergmann ML, Schmedes A. Highly sensitive LC-MS/MS analysis of catecholamines in plasma. *Clinical Biochemistry.* 2020;82:51-7.
69. Macherey-Nagel. Studies for the quantitative determination of catecholamines in blood and urine using different chromatographic methods [Internet]. 1980 [cité 11 oct 2024]. Disponible sur: <https://chromaappdb.mn-net.com/en/hplc/101880/studies-for-the-quantitative-determination-of-catecholamines-in-blood-and-urine-using-different-chromatographic-methods?ref=%2Fhplc%3Fq%3Dcatecholamine>
70. Derringer G, Suich R. Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology.* 1980;12(4):214-9.
71. Desfontaine V, Tarafder A, Hill J, Fairchild J, Grand-Guillaume Perrenoud A, Veuthey JL, et al. A systematic investigation of sample diluents in modern supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A.* 2017;1511:122-31.
72. Pezzatti J, González-Ruiz V, Codesido S, Gagnebin Y, Joshi A, Guillarme D, et al. A scoring approach for multi-platform acquisition in metabolomics. *Journal of Chromatography A.* 2019;1592:47-54.
73. Ph.Eur. 11.0, 20246 (01/2024).
74. Mhlanga ST, Lall M. Influence of normalization techniques on multi-criteria decision-making methods. *J Phys: Conf Ser.* 2022;2224(1):012076.
75. Vafaei N, Ribeiro RA, Camarinha-Matos LM. Normalization techniques for Multi-criteria decision making: Analytical hierarchy process case study. In: Camarinha-Matos LM, Falcão AJ, Vafaei N, Najdi S, directeurs. *Technological Innovation for Cyber-Physical Systems.* Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 261-9.
76. International council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use (ICH). Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2) - ICH harmonised guideline [Internet]. ICH; 2003 févr p. 24. Disponible sur: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q1A%28R2%29%20Guideline.pdf>
77. International council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use (ICH). Stability testing : Photostability testinf of new druf substances and products Q1B - ICH

- harmonised guideline [Internet]. ICH; 1996 nov p. 12. Disponible sur: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q1B%20Guideline.pdf>
78. Siddiqui MR, Wabaidur SM, Alothman ZA, Rafiquee MZA, Khan MA, Sumbul S, et al. High throughput ultra performance liquid chromatography - Mass spectrometric method for determination of adrenaline and characterization of its stress degradation products : A mechanistic approach. *Journal of the Chilean Chemical Society*. 2018;63(1):3803-10.
  79. Centre hospitalier de Saumur (COMEDIMS). Descriptif technique - Conservation des médicaments injectables [Internet]. 2019. Disponible sur: <https://www.omedit-paysdelaloire.fr/wp-content/uploads/2020/08/Conservation-injectables.pdf> [Réf. : MD-POL-DT-028]
  80. Pharmacie clinique des Hôpitaux universitaires de Genève (HUG). Influence de la lumière sur la stabilité des médicaments [Internet]. Hôpitaux universitaires de Genève (HUG); 2023. Disponible sur: [https://www.hug.ch/pharmacie/recommandations/document/photosens\\_general](https://www.hug.ch/pharmacie/recommandations/document/photosens_general)
  81. Challet C, Jaren L, Schaad N. Médicaments injectables et lumières [Internet]. Pharmacie interhospitalière de la côte; 2023. Disponible sur: <https://pharmpic.ch/files/user/Documents/Recomm-utilisation/Conservation/Conservation-injectables/Medicaments-injectables-et-lumiere.pdf> [[Version 2.0]]
  82. Headen TF, Howard CA, Skipper NT, Wilkinson MA, Bowron DT, Soper AK. Structure of  $\pi$ - $\pi$  Interactions in Aromatic Liquids. *J Am Chem Soc*. 2010;132(16):5735-42.
  83. Carter-Fenk K, Liu M, Pujal L, Loipersberger M, Tsanai M, Vernon RM, et al. The energetic origins of Pi-Pi contacts in proteins. *J Am Chem Soc*. 2023;145(45):24836-51.
  84. Fekete S, Ganzler K, Fekete J. Efficiency of the new sub-2  $\mu$ m core-shell (Kinetex™) column in practice, applied for small and large molecule separation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011;54(3):482-90.
  85. Méndez A, Bosch E, Rosés M, Neue UD. Comparison of the acidity of residual silanol groups in several liquid chromatography columns. *Journal of Chromatography A*. 2003;986(1):33-44.
  86. Valent I, Bednárová L, Schreiber I, Bujdák J, Valachová K, Šoltés L. Reaction of N-Acetylcysteine with Cu<sup>2+</sup>: Appearance of Intermediates with High Free Radical Scavenging Activity: Implications for Anti-/Pro-Oxidant Properties of Thiols. *Int J Mol Sci*. 2022;23(11):6199.
  87. Narola B, Singh AS, Mitra M, Santhakumar PR, Chandrashekhar TG. A validated reverse phase HPLC method for the determination of disodium EDTA in meropenem drug substance with UV-detection using precolumn derivatization technique. *Analytical Chemistry Insights*. 2011;6:7.

## Annexes

Annexe 1 : Phases mobiles utilisés lors du développement de méthode .....	38
Annexe 2 : Conditions UHPLC-UV utilisées pour le screening des sept colonnes chromatographiques .....	39
Annexe 3 : Protocole de validation de l'adrénaline.....	43
Annexe 4 : Protocole de validation de la noradrénaline.....	49
Annexe 5 : Protocole de validation de la dopamine.....	55
Annexe 6 : Protocole de validation de l'isoprénaline .....	61
Annexe 7 : Calculs de la préparation des échantillons d'analyse durant le développement de la méthode .....	67
Annexe 8 : Calculs de la préparation des échantillons d'analyse durant la validation de la méthode ..	68
Annexe 9 : Protocole de la dégradation forcée des catécholamines.....	69
Annexe 10 :Chromatogrammes de l'analyse UHPLC-UV des standards des cinq catécholamines par colonne RPLC.....	76
Annexe 11 :Chromatogrammes de l'analyse UHPLC-UV des standards des cinq catécholamines par colonne HILIC .....	78
Annexe 12 :Données brutes Chroméléon obtenues durant le test des sept colonnes UHPLC .....	85
Annexe 13 :Développement du score pour analyser la performance des sept colonnes UHPLC .....	88
Annexe 14 :Chromatogrammes obtenus durant la phase d'optimisation de la méthode analytique.....	92
Annexe 15 :Données brutes Chroméléon obtenues durant la phase d'optimisation de la méthode analytique.....	95
Annexe 16 : Résultats chromatographiques obtenus pour la concentration la plus haute (250.00 µg/mL) et la plus basse (2.50 µg/mL) lors l'estimation de la LOD .....	98
Annexe 17 : Résultats bruts de la dégradation forcée de l'adrénaline .....	99
Annexe 18 : Résultats bruts de la dégradation forcée de la noradrénaline .....	100
Annexe 19 : Résultats bruts de la dégradation forcée de la dopamine .....	102
Annexe 20 : Résultats bruts de la dégradation forcée de l'isoprénaline.....	104
Annexe 21 : Résultats bruts de validation de l'adrénaline .....	106
Annexe 22 : Résultats bruts de validation de la noradrénaline .....	109
Annexe 23 : Résultats bruts de validation de la dopamine .....	112
Annexe 24 : Résultats bruts de validation de l'isoprénaline.....	115

## Annexe 1: Phases mobiles utilisés lors du développement de méthode

Tableau S1 : Composition de phases mobiles et tampons utilisés lors du développement de la méthode

Mode d'analyse	Phase mobile B	Phase mobile C
<b>HILIC</b>	H <sub>2</sub> O + AF 10 mM + FA, pH = 3.0	ACN pur
	H <sub>2</sub> O + AF 30 mM + FA, pH = 3.0	ACN pur
	H <sub>2</sub> O + AF 10 mM + NH <sub>3</sub> , pH = 9.0	ACN pur
	H <sub>2</sub> O + AF 50 mM + FA, pH = 3.0	ACN pur
	H <sub>2</sub> O + AF 10 mM + FA, pH = 3.0	ACN/ H <sub>2</sub> O (90 :10) + AF 10 mM
<b>RPLC</b>	H <sub>2</sub> O + FA 0.1%	ACN + FA 0.1%
	H <sub>2</sub> O + AF 10 mM + FA, pH = 3.0	ACN/ H <sub>2</sub> O (90 :10) + AF 10 mM

Légende : AF = ammonium formate, FA = acide formique (formica cid en anglais), NH<sub>3</sub> = ammoniac, ACN = acétonitrile

## Annexe 2 : Conditions UHPLC-UV utilisées pour le screening des sept colonnes chromatographiques

## A. Méthode HPLC en phase inverse

## 1. Gradient V1.0

Temps [min]	%B	%C	% H2O
0.0	90	10	91
1.0	90	10	91
8.0	0	100	10
10.0	0	100	10
10.1	90	10	91
12.0	90	10	91
17.0	90	10	91

	% H2O
<b>PMB</b>	1
<b>PMC</b>	0.1

Phases mobiles      **PMB** : H2O + FA 0.1%  
                                  **PMC** : ACN:H2O (90:10) + FA 0.1 %

Débit : 0.4 mL/min

Colonne Temp : 25°C

Colonne : BEH C8      Phényl-hexyl

## 2. Gradient V1.0

Temps [min]	%B	%C	% H2O
0.0	90	10	91
1.0	90	10	91
8.0	0	100	10
10.0	0	100	10
10.1	90	10	91
12.0	90	10	91
17.0	90	10	91

	% H2O
<b>PMB</b>	1
<b>PMC</b>	0.1

Phases mobiles      **PMB** : H2O + AF 10 mM (+FA)  
                                  **PMC** : ACN:H2O (90:10) + AF 10 mM (+FA)

Débit : 0.4 mL/min

Colonne Temp : 25°C

Colonne : BEH C8      HSS T3      Phényl-hexyl

**B. Méthodes HPLC en phase normale****1. Gradient N1.0**

Time (min)	%B	%C	% H2O
0.0	5	95	5
0.5	5	95	5
4.0	50	50	50
4.5	50	50	50
4.6	5	95	5
6.5	5	95	5

	% H2O
<b>MPB</b>	1
<b>MPC</b>	0

**Mobile Phases**            **MPB** : H2O + ammonium formate (10mM)  
**MPC** : ACN

**Débit** : 0.5 mL/min

**Colonne temp. [°C]** : 30°C

**Colonne** : Amide            BEH Z-HILIC    Core-Shell    Nucleodur

**pH** : 3.0

**2. Gradient N1.0**

Time (min)	%B	%C	% H2O
0.0	5	95	5
0.5	5	95	5
4.0	50	50	50
4.5	50	50	50
4.6	5	95	5
6.5	5	95	5

	% H2O
<b>MPB</b>	1
<b>MPC</b>	0

**Mobile Phases**            **MPB** : H2O + ammonium formate (30mM)  
**MPC** : ACN

**Débit** : 0.5 mL/min

**Colonne temp. [°C]** : 30°C

**Colonne** : Amide            BEH Z-HILIC    Core-Shell    Nucleodur

**pH** : 3.0

**3. Gradient N1.0**

Time (min)	%B	%C	% H2O
0.0	5	95	5
0.5	5	95	5
4.0	50	50	50
4.5	50	50	50
4.6	5	95	5
6.5	5	95	5

	% H2O
<b>MPB</b>	1
<b>MPC</b>	0

**Mobile Phases**      **MPB** : H2O + ammonium formate (10mM)  
**MPC** : ACN

**Débit** : 0.5 mL/min

**Colonne temp. [°C]** : 30°C

**Colonne** : Amide      BEH Z-HILIC      Core-Shell      Nucleodur

**pH** : 9.0

**4. Gradient N1.4**

Time (min)	%B	%C	% H2O
0.0	0	100	10
0.5	0	100	10
4.0	25	75	33
4.5	25	75	33
4.6	0	100	10
6.6	0	100	10

	% H2O
<b>MPB</b>	1
<b>MPC</b>	0.1

**Mobile Phases**      **MPB** : H2O + ammonium formate (10 mM)  
**MPC** : ACN/H2O (90:10) + ammonium formate (10 mM)

**Débit** : 0.5 mL/min

**Colonne temp. [°C]** : 30°C

**Colonne** : Amide

**pH** : 3.0

**5. Gradient N1.6**

Time (min)	%B	%C	% H2O
0.0	5	95	5
0.5	5	95	5
4.0	60	40	60
4.5	60	40	60
4.6	5	95	5
6.5	5	95	5

	% H2O
MPB	1
MPC	0

**Mobile Phases**      **MPB : H2O + ammonium formate (10mM)**  
**MPC : ACN**

**Débit : 0.5 mL/min**

**Colonne temp. [°C] : 30°C**

**Colonne : BEH Z-HILIC**

**pH : 3.0**

**Annexe 3 : Protocole de validation de l'adrénaline****PHA8 –PREVALIDATION de l'adrénaline chlorhydrate par UHPLC-UV****Arborescence :**MQ : [PHA\\_MQ\\_8000](#)Processus : [PHA\\_PROC\\_8008](#)Procédure : [PHA\\_PRO\\_8027](#)**1. OBJET**

L'objectif de cette méthode est d'identifier et doser l'adrénaline chlorhydrate dans du NaCl 0.9% de la formulation suivante :

- Adrénaline Sintetica 0.1 mg/mL, ampoules de 1 mL
- Adrénaline HUG 0.1 mg/mL, ampoules 10 mL
- Adrénaline chlorhydrate 0.1 mg/mL, seringue 10 mL

**2. COMPOSITION**

Principe actif : Adrénaline chlorhydrate

Excipients : NaCl 0.9%

**3. PRINCIPE**

L'échantillon est dilué et dosé par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée à un détecteur DAD avec la méthode d'étalonnage externe.

**4. DÉFINITIONS - ABRÉVIATIONS**

<b>DAD</b>	Diode Array Detector (détecteur à barrette de diodes)
<b>ACN</b>	Acétonitrile
<b>C</b>	Concentration
<b>CV</b>	Coefficient de variation
<b>CVr</b>	Coefficient de variation de répétabilité
<b>CV=RSD</b>	Coefficient de variation ou Relative standard deviation (terme anglais)
<b>FA</b>	Acide formique
<b>FRN</b>	Fournisseur
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Eau
<b>HPLC</b>	Chromatographie liquide à haute performance
<b>IC</b>	Intervalle de confiance
<b>LogP</b>	Coefficient de partage
<b>MW</b>	Poids moléculaire
<b>NaH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub></b>	Ammonium formate
<b>N°</b>	Numéro
<b>NS</b>	Numéro de série
<b>pKa</b>	Constante de dissociation
<b>QC</b>	Contrôle Qualité
<b>SCR</b>	Substance chimique de référence
<b>Std(s)</b>	Standards

**5. SYNONYMES**

Adrénaline ; Adrenalinum ; Epinéphrine

**Sel** : Adrenalini hydrochloridum

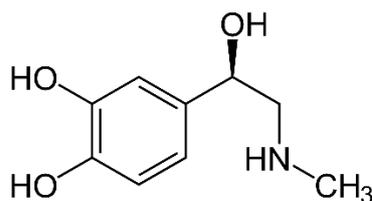
**6. NOM CHIMIQUE ET STRUCTURE****Adrénaline Base**

(1*R*)-1-(3,4-dihydroxyphényl)-2-(méthylamino)éthanol

4-[(1*R*)-1-hydroxy-2-(méthylamino)éthyl]benzène-1,2-diol

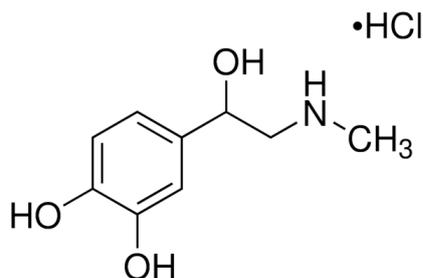
(*R*)-(-)-3,4-Dihydroxy- $\alpha$ -(méthylaminométhyl)benzyl alcohol

$C_{13}H_{19}NO_9 = 183.2 \text{ g/mol}$   
CAS – [51-43-4]



#### Adrénaline chlorhydrate

$C_9H_{13}NO_3 \cdot HCl = 219.7 \text{ g/mol}$   
CAS – [55-31-2]



### 7. PROPRIÉTÉS PHYSICOCHIMIQUES

#### Adrénaline base

*Aspect* : Poudre blanche ou sensiblement blanche, virant progressivement au brun lorsqu'elle est exposée à la lumière et à l'air.

*Solubilité* : Très peu soluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96 pourcent, pratiquement insoluble dans l'acétone. L'adrénaline se dissout dans les solutions diluées d'acides minéraux et d'hydroxydes alcalins.

*Précautions* : Sensible à la lumière

#### Adrénaline chlorhydrate

*Aspect* : Poudre blanche ou sensiblement blanche, virant progressivement au brun lorsqu'elle est exposée à la lumière et à l'air.

*Solubilité* : Facilement soluble dans d'eau, peu soluble dans l'éthanol à 96 pourcent.

*Précautions* : Sensible à la lumière

**Point de fusion** : environ 215 °C

**LogP<sup>1</sup>** : - 0.43

### 8. PKA<sup>1</sup> : BASE (AMINE) = 8.91 ; ACIDE (HYDROXYDES) = 9.69, 12.65, 14.38 MATÉRIEL

#### Standards :

- Epinephrine Hydrochloride, Sigma Aldrich, N° FRN : E44642-5G, CAS [329-63-5]

#### Appareillage :

- HPLC Ultimate 3000 Rs ThermoScientific, équipé :
  - d'une pompe Rs Pump

<sup>1</sup> Chemaxon. Chemicalize. [cité 20 septembre 2024]. Chemicalize - Instant Cheminformatics Solutions. Disponible sur: <https://chemicalize.com>

- d'un injecteur Rs Autosampler
- d'un compartiment à colonne Rs Column compartment
- d'un détecteur DAD Rs Diode array detector
- d'un détecteur Corona Rs Corona Veo
- d'un logiciel Chromelion
- Colonne : 1 colonne BEH Z-HILIC (Atlantis™ Premier UPLC, 95 Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 50 mm)
- Précolonne : VanGuard™ FIT (intégrée à la colonne)
- Balance semi-analytique
- Balance analytique
- Ballons jaugés 10 mL, 100 mL et 500 mL
- Flacons en verre
- Cylindres gradués
- Micropipettes 200 µL et 1000 µL

**Réactifs :**

- Acétonitrile qualité HPLC, Merck, N° FRN 1.00030, ou qualité équivalente.
- Eau qualité HPLC, Merck, N° FRN 1.15333, ou qualité équivalente.
- Ammonium formate BioUltra 10 M in H<sub>2</sub>O 100 mL, Sigma-Aldrich, N° FRN 78314-100ML-F, ou qualité équivalente.
- Acide formique 99% qualité ULC/MS, Biosolve, N° FRN 069141 (0006914143BS), ou qualité équivalente.
- NaCl 0.9%, Bichsel AG (Interlaken, Suisse), REF : FE1001340, ou qualité équivalente.

**9. CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES HPLC**

**Colonne HPLC :** BEH Z-HILIC (Waters, Atlantis™ Première UPLC®, 95 Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 50 mm), N° FRN 186009981, avec pré-colonne intégrée (VanGuard FIT).

**Température du sampler :** 10°C

**Température de colonne :** 30 °C

**Phase mobile :** La phase mobile est constituée d'une **phase mobile B** et d'une **phase mobile C**

**Phase mobile A :** ACN / H<sub>2</sub>O (50:50), utilisé pour le nettoyage de la colonne

**Phase mobile B :** H<sub>2</sub>O + ammonium formate 30 mM à pH = 3.0

**Phase mobile C :** ACN/ H<sub>2</sub>O (85:15) + ammonium formate 30 mM, à pH=3

**Phase mobile D :** ACN / H<sub>2</sub>O (90:10), utilisé pour le nettoyage et le conditionnement de la colonne

En **mode gradient** selon le tableau 1.

Tableau 1 : Gradient utilisé pour l'analyse

Temps (min)	%B	%C
0.00	0	100
2.80	55	45
3.10	55	45
3.20	0	100
5.20	0	100

**Durée totale de l'analyse :** 5.20 min

**Débit :** 0.5 mL/min

**Volume d'injection :** 5 µL

**Temps de rétention de l'adrénaline :** 1.884 ± 0.094 min

**Solution de lavage de l'aiguille (Phase mobile D) :** ACN / H<sub>2</sub>O (90 :10)

- Dans un cylindre gradué de 250 mL, verser 225 mL d'ACN et compléter à 250 mL avec du H<sub>2</sub>O.

**Rear Seal Wash :** MeOH / H<sub>2</sub>O (10 : 90)

- Dans un cylindre gradué de 250 mL, verser 225 mL d' H<sub>2</sub>O et compléter à 250 mL avec du MeOH.

**Lavage de la colonne :** ACN / H<sub>2</sub>O (50 : 50) (donc **100% phase A**) pendant 10 min. Puis, ACN / H<sub>2</sub>O (90 :10) (donc **100% phase D**) pendant 10 min.

**Stockage de la colonne :** ACN/H<sub>2</sub>O (90 :10), donc 100% phase mobile D

**Longueur d'onde :** 280 nm

## 10. PRÉPARATION DES SOLUTIONS, CONSERVATION, STABILITÉ

### **Phase Mobile B : H<sub>2</sub>O + 30 mM d'ammonium formate à pH = 3.0 (ajustement avec acide formique)**

Préparer environ 400 mL H<sub>2</sub>O dans un ballon jaugé de 500 mL et ajouter 1.5 mL d'ammonium formate (NaH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub>, 10M). Ajuster le pH à 3.0 avec de l'acide formique CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ajouter environ 2.0 mL) puis compléter au trait de jauge avec H<sub>2</sub>O. Verser la solution dans un duran de 500 mL.

La phase mobile B se conserve pendant 1 semaine à température ambiante.

### **Phase Mobile C : ACN/H<sub>2</sub>O (85 :15) + ammonium formate 10 mM à pH=3.0 (ajustement avec acide formique)**

Dans un cylindre gradué de 100 mL, prélever 75 mL de la phase mobile B. Dans un cylindre gradué de 500 mL, mesurer 425 mL d'ACN. Verser le contenu des deux cylindres dans un duran de 500 mL. La phase mobile C se conserve pendant 1 semaine à température ambiante.

### **Diluant pour solutions standards de calibration (CStd): ACN / H<sub>2</sub>O (85:15)**

Préparer 100 mL de diluant en mesurant 85 mL d'ACN et 15 mL d'H<sub>2</sub>O. Utiliser soit deux cylindres gradués de même précision (100 mL) ou prélever d'abord l'ACN, verser dans un flacon, bien sécher le cylindre et ensuite prélever l'eau et verser dans le flacon.

### **Diluant pour solutions standards de validation (VStd): ACN / NaCl 0.9% (85:15) +**

Préparer 100 mL de diluant en mesurant 100 mL d'ACN et 15 mL de solution NaCl 0.9%. Utiliser soit deux cylindres gradués de même précision (100 mL) ou prélever d'abord l'ACN, verser dans un flacon, bien sécher le cylindre et ensuite prélever l'eau et verser dans le flacon.

### **Préparation des standards :**

**Solution mère (SM) :** Dans un ballon jaugé de 100 mL, dissoudre précisément 61.2 mg d'adrénaline chlorhydrate (équivalent à 50 mg d'adrénaline base) dans un fond d'H<sub>2</sub>O HPLC. Compléter au trait de jauge avec l'H<sub>2</sub>O HPLC. (C<sub>SM</sub> adrénaline base = 500 µg/mL).

**Blanc standard** : 1 mL de diluant ACN / H<sub>2</sub>O (85 : 15)

**Solutions standards (Std)** : Pour chaque standard, prélever le volume de SM indiqué dans le *Tableau 2* et introduire dans un ballon jaugé de 10 mL. Compléter ensuite au trait de jauge avec le diluant ACN/H<sub>2</sub>O (85 :15).

**Tableau 2 : Préparation des solutions standards de calibration**

	Concentration des stds (µg/mL)	Volume de SM à prélever (µL)	Volume final total (mL)
<b>CStd1</b>	20.0	400	10
<b>CStd2</b>	15.0	300	10
<b>CStd3</b>	10.0	200	10

Prélever ensuite 3 fois 1 mL de solution standard et introduire dans des vials pour analyses HPLC (3 vials par concentration).

*Note* : La masse d'adrénaline chlorhydrate à peser a été calculée en **adrénaline base** et en tenant compte de la pureté du produit (ici ≥ 98%) .

## 11. PRÉPARATION LOT TEST ADRÉNALINE CHLORHYDRATE

**Solution mère (VSM)** : Dans un ballon jaugé de 100 mL, dissoudre précisément 61.2 mg d'adrénaline chlorhydrate (équivalent à 50 mg d'adrénaline base) dans un fond de solution NaCl 0.9%. Compléter au trait de jauge avec la solution NaCl 0.9%.

(C<sub>VSM</sub> adrénaline base = **500 µg/mL**).

**Blanc du lot test** : 1 mL de diluant ACN / NaCl 0.9% (85 : 15)

**Solutions standards (Std)** : Pour chaque standard, prélever le volume de SM indiqué dans le *Tableau 2* et introduire dans un ballon jaugé de 10 mL. Compléter ensuite au trait de jauge avec le diluant ACN/NaCl 0.9% (85 :15).

**Tableau 3 : Préparation des solutions standards de validation**

	Concentration des Vstds (µg/mL)	Volume de VSM à prélever (µL)	Volume final total (mL)
<b>VStd1</b>	20.0	400	10
<b>VStd2</b>	15.0	300	10
<b>VStd3</b>	10.0	200	10

Prélever ensuite 3 fois 1 mL de solution standard et introduire dans des vials pour analyses HPLC (3 vials par concentration).

*Note* : La masse d'adrénaline chlorhydrate à peser a été calculée en **adrénaline base** et en tenant compte de la pureté du produit (ici ≥ 98%) .

## 12. DÉROULEMENT

- Suivre l'instruction d'utilisation de l'HPLC.
- Equilibrer la colonne pendant au moins 50 minutes (phases mobiles et température de colonne appropriées).
- Les données de la courbe d'étalonnage dans la méthode pour les stds sont exprimées en **µg/mL**.
- La séquence analytique est présentée en annexe 1 dans le rapport Chroméléon.
- Conditionner le système avec des blancs avant de lancer la séquence de validation.
- Injecter la solution test (std2) 3 fois pour évaluer la conformité du système (indiqué CS dans le tableau 2).
  - Le temps de rétention l'adrénaline est de 1.884 ± 0.094 min
  - Calculer le coefficient de variation, il doit être < 1%.
- Injecter les standards 3 fois par ordre croissant de concentration pour la droite de calibration.
- Injecter l'échantillon à examiner 3 fois et, finalement injecter un QC 3 fois en fin de séquence.
- Compléter le logbook « Suivi de colonne ».

**13. CALCUL ET RENDU DES RÉSULTATS**

L'adrénaline est identifiée par son temps de rétention.  
Les résultats sont calculés à partir des aires (surfaces) des pics.  
La quantification de l'adrénaline se fait à l'aide du logiciel Chroméléon.  
La courbe de calibration est obtenue par 3 niveaux de standards.  
Les résultats de l'échantillon sont exprimés en mg/mL.  
Les résultats du QC sont exprimés en mg/mL.

**14. VALIDATION TECHNIQUE**

La courbe de calibration doit être acceptable si :  $R^2 > 0.99$ .  
Le coefficient de variation des facteurs de réponse doit être (CV = RSD) :  $< 2\%$   
Le coefficient de variation de la répétabilité ( $CV_r$ ) de l'échantillon et du QC doit être  $< 2\%$ .  
L'IC réelle de la solution de QC au risque de 5% doit se trouver entre 95 et 105% de la valeur nominale (pesée).

**15. RÉFÉRENCES**

1. Chemaxon. Chemicalize. [cité 20 septembre 2024]. Chemicalize - Instant Cheminformatics Solutions. Disponible sur: <https://chemicalize.com>

**Annexe 4 : Protocole de validation de la noradrénaline****PHA8 –PREVALIDATION de la noradrénaline chlorhydrate par UHPLC-UV****Arborescence :**MQ : [PHA MQ 8000](#)Processus : [PHA PROC 8008](#)Procédure : [PHA PRO 8027](#)**1. OBJET**

L'objectif de cette méthode est d'identifier et doser la noradrénaline chlorhydrate dans du NaCl 0.9% de la formulation suivante :

- **NORadrénaline Sintetica sol perf 1 mg/mL**

**2. COMPOSITION**

**Principe actif :** NORadrénaline chlorhydrate

**Excipients :** NaCl 0.9%

**3. PRINCIPE**

L'échantillon est dilué et dosé par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée à un détecteur DAD avec la méthode d'étalonnage externe.

**4. DÉFINITIONS - ABRÉVIATIONS**

<b>DAD</b>	Diode Array Detector (détecteur à barrette de diodes)
<b>ACN</b>	Acétonitrile
<b>C</b>	Concentration
<b>CV</b>	Coefficient de variation
<b>CVr</b>	Coefficient de variation de répétabilité
<b>CV=RSD</b>	Coefficient de variation ou Relative standard deviation (terme anglais)
<b>FA</b>	Acide formique
<b>FRN</b>	Fournisseur
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Eau
<b>HPLC</b>	Chromatographie liquide à haute performance
<b>IC</b>	Intervalle de confiance
<b>LogP</b>	Coefficient de partage
<b>MW</b>	Poids moléculaire
<b>NaH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub></b>	Ammonium formate
<b>N°</b>	Numéro
<b>NS</b>	Numéro de série
<b>pKa</b>	Constante de dissociation
<b>QC</b>	Contrôle Qualité
<b>SCR</b>	Substance chimique de référence
<b>Std(s)</b>	Standards

**5. SYNONYMES**

Nordrénaline ; Nordrenalinum ; Norpinéphrine ; L-Arterenol ; Levarterenol

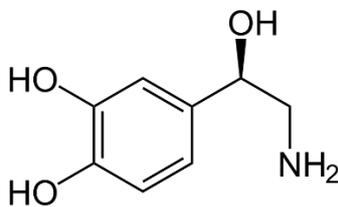
**Sel :** Nordrenalini hydrochloridum

**6. NOM CHIMIQUE ET STRUCTURE****Noradrénaline Base**

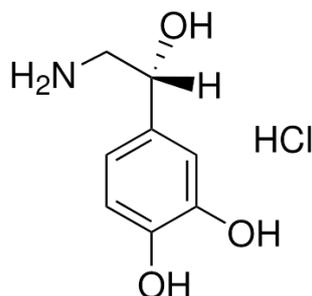
(R)-4-(2-Amino-1-hydroxyethyl)-1,2-benzenediol

 $C_8H_{11}NO_3 = 169,2 \text{ g/mol}$ 

CAS – [51-41-2]

**Noradrénaline chlorhydrate** $C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl = 205.6 \text{ g/mol}$ 

CAS – [329-56-6]

**7. PROPRIÉTÉS PHYSICOCHIMIQUES****Nordrénaline base***Aspect* : Poudre cristalline*Solubilité* : NA*Précautions* : Sensible à la lumière**Nordrénaline chlorhydrate***Aspect* : Poudre cristalline, blanche ou blanc-brun. Se colore quand il est exposé à l'air et à la lumière.*Solubilité* : Très soluble dans l'eau, peu soluble dans l'éthanol à 96 pour cent.*Précautions* : Sensible à la lumière**Point de fusion** : environ 220 °C**LogP<sup>2</sup>** : - 0.649**pKa<sup>1</sup>** : Base (Amine) = 8.81 ; Acide (Hydroxdes) = 9.47, 12.65, 14.39

<sup>2</sup> Chemaxon. Chemicalize. [cité 20 septembre 2024]. Chemicalize - Instant Cheminformatics Solutions. Disponible sur: <https://chemicalize.com>

**8. MATÉRIEL****Standards :**

- DL-Norepinéphrine hydrochloride crystalline, Sigma Aldrich, N° FRN : A7256-5G, CAS [55.27.6]

**Appareillage :**

- HPLC Ultimate 3000 Rs ThermoScientific, équipé :
  - d'une pompe Rs Pump
  - d'un injecteur Rs Autosampler
  - d'un compartiment à colonne Rs Column compartment
  - d'un détecteur DAD Rs Diode array detector
  - d'un détecteur Corona Rs Corona Veo
  - d'un logiciel Chromelion
- Colonne : 1 colonne BEH Z-HILIC (Atlantis™ Premier UPLC, 95 Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 50 mm)
- Précolonne : VanGuard™ FIT (intégrée à la colonne)
- Balance semi-analytique
- Balance analytique
- Ballons jaugés 10 mL, 100 mL et 500 mL
- Flacons en verre
- Cylindres gradués
- Micropipettes 1000 µL
- Macropipette 0.5-5 mL

**Réactifs :**

- Acétonitrile qualité HPLC, Merck, N° FRN 1.00030, ou qualité équivalente.
- Eau qualité HPLC, Merck, N° FRN 1.15333, ou qualité équivalente.
- Ammonium formate BioUltra 10 M in H<sub>2</sub>O 100 mL, Sigma-Aldrich, N° FRN 78314-100ML-F, ou qualité équivalente.
- Acide formique 99% qualité ULC/MS, Biosolve, N° FRN 069141 (0006914143BS), ou qualité équivalente.
- NaCl 0.9%, Bichsel AG (Interlaken, Suisse), REF : FE1001340, ou qualité équivalente.

**9. CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES HPLC**

**Colonne HPLC** : BEH Z-HILIC (Waters, Atlantis™ Première UPLC®, 95 Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 50 mm), N° FRN 186009981, avec pré-colonne intégrée (VanGuard FIT).

**Température du sampler** : 10°C

**Température de colonne** : 30 °C

**Phase mobile** : La phase mobile est constituée d'une **phase mobile B** et d'une **phase mobile C**

**Phase mobile A** : ACN / H<sub>2</sub>O (50 / 50)

**Phase mobile B** : H<sub>2</sub>O + ammonium formate 30 mM à pH = 3.0

**Phase mobile C** : ACN/H<sub>2</sub>O (85:15) + ammonium formate 30 mM, à pH=3.0

**Phase mobile D** : ACN / H<sub>2</sub>O (90 :10)

En **mode gradient** selon le tableau 1.

**Tableau 1 : Gradient utilisé pour l'analyse**

Temps (min)	%B	%C
0.00	0	100
2.80	55	45
3.10	55	45
3.20	0	100
5.20	0	100

**Durée totale de l'analyse** : 5.20 min

**Débit** : 0.5 mL/min

**Volume d'injection** : 5 µL

**Temps de rétention de la noradrénaline** : 2.714 ± 0.136 min

**Solution de lavage de l'aiguille (Phase mobile D)** : ACN / H<sub>2</sub>O (90 :10)

- Dans un duran de 500 mL, verser 50 mL d'H<sub>2</sub>O et 450 mL d'ACN.

**Rear Seal Wash** : MeOH / H<sub>2</sub>O (10 : 90)

- Dans un cylindre gradué de 500 mL, verser 50 mL de MeOH et compléter à 500 mL avec H<sub>2</sub>O

**Lavage de la colonne** : ACN / H<sub>2</sub>O (50 : 50) (donc **100% phase A**) pendant 10 min. Puis, ACN / H<sub>2</sub>O (90 :10) (donc **100% phase D**) pendant 10 min.

**Stockage de la colonne** : ACN/H<sub>2</sub>O (90 :10), donc 100% phase mobile D

**Longueur d'onde** : 280 nm

**10. PRÉPARATION DES SOLUTIONS, CONSERVATION, STABILITÉ****Phase Mobile B : H<sub>2</sub>O + 30 mM d'ammonium formate à pH = 3.0 (ajustement avec acide formique)**

Préparer environ 400 mL H<sub>2</sub>O dans un ballon jaugé de 500 mL et ajouter 1.5 mL d'ammonium formate (NaH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub>, 10 M). Ajuster le pH à 3.0 avec de l'acide formique CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ajouter environ 2.0 mL) puis compléter au trait de jauge avec H<sub>2</sub>O. Verser la solution dans un duran de 500 mL.

La phase mobile B se conserve pendant 1 semaine à température ambiante.

**Phase Mobile C : ACN/H<sub>2</sub>O (85:15) + ammonium formate 10 mM à pH=3.0 (ajustement avec acide formique)**

Dans un cylindre gradué de 100 mL, prélever 75 mL de la phase mobile B. Dans un cylindre gradué de 500 mL, mesurer 425 mL d'ACN. Verser le contenu des deux cylindres dans un duran de 500 mL.

La phase mobile C se conserve pendant 1 semaine à température ambiante.

**Diluant pour solutions standards de calibration (CStd): ACN / H<sub>2</sub>O (85 : 15)**

Préparer 100 mL de diluant en mesurant 85 mL d'ACN et 15 mL d'H<sub>2</sub>O. Utiliser soit deux cylindres gradués de même précision (100 mL) ou prélever d'abord l'ACN, verser dans un flacon, bien sécher le cylindre et ensuite prélever l'eau et verser dans le flacon.

**Diluant pour solutions standards de validation (VStd): ACN / NaCl 0.9% (85 : 15)**

Préparer 100 mL de diluant en mesurant 85 mL d'ACN et 15 mL de solution NaCl 0.9%. Utiliser soit deux cylindres gradués de même précision (100 mL) ou prélever d'abord l'ACN, verser dans un flacon, bien sécher le cylindre et ensuite prélever l'eau et verser dans le flacon.

**Préparation des standards :**

**Solution mère (SM) :** Dans un ballon jaugé de 100 mL, dissoudre précisément **62.66 mg** de noradrénaline chlorhydrate (équivalent à 50 mg de noradrénaline base) dans un fond d'H<sub>2</sub>O HPLC. Compléter au trait de jauge avec l' H<sub>2</sub>O HPLC.

(C<sub>SM</sub> noradrénaline base = 500 µg/mL).

**Blanc standard :** 1 mL de diluant ACN / H<sub>2</sub>O (85 : 15)

**Solutions standards (Std) :** Pour chaque standard, prélever le volume de SM indiqué dans le *Tableau 2* et introduire dans un ballon jaugé de 10 mL. Compléter ensuite au trait de jauge avec le diluant ACN/H<sub>2</sub>O (85 :15).

**Tableau 2 : Préparation des solutions standards de calibration**

	Concentration des stds (µg/mL)	Volume de SM à prélever (µL)	Volume final total (mL)
<b>CStd1</b>	25.0	500	10
<b>CStd2</b>	20.0	400	10
<b>CStd3</b>	15.0	300	10

Prélever ensuite 1 mL de solution standard et introduire dans des vials pour analyses HPLC.

*Note :* La masse de noradrénaline chlorhydrate à peser a été calculée en noradrénaline base et en tenant compte de la pureté du produit (≥ 97%) .

**11. PRÉPARATION LOT TEST NORADRÉNALINE CHLORHYDRATE**

**Solution mère (VSM) :** Dans un ballon jaugé de 100 mL, dissoudre précisément **62.66 mg** de noradrénaline chlorhydrate (équivalent à 50 mg de noradrénaline base) dans un fond de solution NaCl 0.9%. Compléter au trait de jauge avec la solution NaCl 0.9%.

(C<sub>VSM</sub> noradrénaline base = 500 µg/mL).

**Blanc du lot test :** 1 mL de diluant ACN / NaCl 0.9% (85 : 15)

**Solutions standards (Std) :** Pour chaque standard, prélever le volume de SM indiqué dans le *Tableau 2* et introduire dans un ballon jaugé de 10 mL. Compléter ensuite au trait de jauge avec le diluant ACN/NaCl 0.9% (85 :15).

**Tableau 3 : Validation standards de validation**

	Concentration des Vstds (µg/mL)	Volume de VSM à prélever (µL)	Volume final total (mL)
<b>VStd1</b>	25.0	500	10
<b>VStd2</b>	20.0	400	10
<b>VStd3</b>	15.0	300	10

Prélever ensuite 1 mL de solution standard et introduire dans des vials pour analyses HPLC.

*Note : La masse de noradrénaline chlorhydrate à peser a été calculée en noradrénaline base et en tenant compte de la pureté du produit (≥ 97%) .*

## 12. DÉROULEMENT

- Suivre l'instruction d'utilisation de l'HPLC.
- Equilibrer la colonne pendant au moins 50 minutes (phases mobiles et température de colonne appropriées).
- Les données de la courbe d'étalonnage dans la méthode pour les stds sont exprimées en **µg/mL**.
- La séquence analytique est présentée en annexe 1 dans le rapport Chroméléon.
- Conditionner le système avec des blancs avant de lancer la séquence de validation.
- Injecter la solution test (std2) 3 fois pour évaluer la conformité du système (indiqué CS dans le tableau 2).
  - Le temps de rétention la noradrénaline est de  $2.714 \pm 0.136$  min
  - Calculer le coefficient de variation, il doit être < 1%.
- Injecter les standards 3 fois par ordre croissant de concentration pour la droite de calibration.
- Injecter l'échantillon à examiner 3 fois et, finalement injecter un QC 3 fois en fin de séquence.
- Compléter le logbook « Suivi de colonne ».

## 13. CALCUL ET RENDU DES RÉSULTATS

La noradrénaline est identifiée par son temps de rétention.  
 Les résultats sont calculés à partir des aires (surfaces) des pics.  
 La quantification de la noradrénaline se fait à l'aide du logiciel Chroméléon.  
 La courbe de calibration est obtenue par 3 niveaux de standards.  
 Les résultats de l'échantillon sont exprimés en mg/mL.  
 Les résultats du QC sont exprimés en mg/mL.

## 14. VALIDATION TECHNIQUE

La courbe de calibration doit être acceptable si :  $R^2 > 0.99$ .  
 Le coefficient de variation des facteurs de réponse doit être (CV = RSD) : < 2%  
 Le coefficient de variation de la répétabilité (CVr) de l'échantillon et du QC doit être < 2%.  
 L'IC réelle de la solution de QC au risque de 5% doit se trouver entre 95 et 105% de la valeur nominale (pesée).

## 15. RÉFÉRENCES

2. Chemaxon. Chemicalize. [cité 20 septembre 2024]. Chemicalize - Instant Cheminformatics Solutions. Disponible sur: <https://chemicalize.com>

**Annexe 5 : Protocole de validation de la dopamine****PHA8 –PREVALIDATION de la dopamine chlorhydrate par UHPLC-UV****Arborescence :**MQ : [PHA MQ 8000](#)Processus : [PHA PROC 8008](#)Procédure : [PHA PRO 8027](#)**1. OBJET**

L'objectif de cette méthode est d'identifier et doser la dopamine chlorhydrate à 5.0 mg/mL et/ou diluée dans du glucose 5% des formulations suivantes :

- **Dopamine Fresenius sol perf 5.0 mg/mL**
- **Dopamine Fresenius sol perf 5.0 mg/mL diluée dans du G 5% pour les protocoles pédiatriques (de 4.9 à 2.0 mg/mL)**

**2. COMPOSITION****Principe actif :** Dopamine chlorhydrate**Excipients :** NaCl, Acétylcystéine, EDTA disodique**Solvant de dilution :** Glucose 5%**3. PRINCIPE**

L'échantillon est dilué et dosé par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée à un détecteur DAD avec la méthode d'étalonnage externe.

**4. DÉFINITIONS - ABRÉVIATIONS**

<b>DAD</b>	Diode Array Detector (détecteur à barrette de diodes)
<b>ACN</b>	Acétonitrile
<b>C</b>	Concentration
<b>CV</b>	Coefficient de variation
<b>CVr</b>	Coefficient de variation de répétabilité
<b>CV=RSD</b>	Coefficient de variation ou Relative standard deviation (terme anglais)
<b>FA</b>	Acide formique
<b>FRN</b>	Fournisseur
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Eau
<b>HPLC</b>	Chromatographie liquide à haute performance
<b>IC</b>	Intervalle de confiance
<b>LogP</b>	Coefficient de partage
<b>MW</b>	Poids moléculaire
<b>NaH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub></b>	Ammonium formate
<b>N°</b>	Numéro
<b>NS</b>	Numéro de série
<b>pKa</b>	Constante de dissociation
<b>QC</b>	Contrôle Qualité
<b>SCR</b>	Substance chimique de référence
<b>Std(s)</b>	Standards

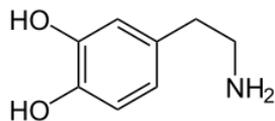
**5. SYNONYMES**

Dopamine

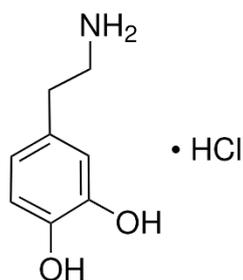
**Sel** : Dopamini hydrochloridum

**6. NOM CHIMIQUE ET STRUCTURE****Dopamine Base**

3,4 Dihydroxyphenethylamine  
 4-(2-aminoethyl)benzene-1,2-diol  
 $C_8H_{11}NO_2 = 153.18 \text{ g/mol}$   
 CAS – [51-61-6]

**Dopamine chlorhydrate**

$C_8H_{11}NO_2 \cdot HCl = 189.64 \text{ g/mol}$   
 CAS – [62-31-7]

**7. PROPRIÉTÉS PHYSICOCHIMIQUES****Dopamine chlorhydrate**

*Aspect* : Poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche. Se colore quand il est exposé à l'air et à la lumière.  
*Solubilité* : Facilement soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent, assez soluble dans l'acétone et dans le chlorure de méthylène.  
*Précautions* : Sensible à la lumière

**Point de fusion** : 248 - 250 °C

**LogP<sup>3</sup>** : - 2.25

**pKa<sup>1</sup>** : Base (Amine) = 9.31 ; Acide (Hydroxdes) = 9.99, 13.03

<sup>3</sup> Chemaxon. Chemicalize. [cité 30 octobre 2024]. Chemicalize - Instant Cheminformatics Solutions. Disponible sur: <https://chemicalize.com>

**8. MATÉRIEL****Standards :**

- Dopamine hydrochloride, Sigma Aldrich, N° FRN : H8502-5G, CAS [62-31-7]

**Appareillage :**

- HPLC Ultimate 3000 Rs ThermoScientific, équipé :
  - d'une pompe Rs Pump
  - d'un injecteur Rs Autosampler
  - d'un compartiment à colonne Rs Column compartment
  - d'un détecteur DAD Rs Diode array detector
  - d'un détecteur Corona Rs Corona Veo
  - d'un logiciel Chromelion
- Colonne : 1 colonne BEH Z-HILIC (Atlantis™ Premier UPLC, 95 Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 50 mm)
- Précolonne : VanGuard™ FIT (intégrée à la colonne)
- Balance semi-analytique
- Balance analytique
- Ballons jaugés 10 mL, 50 mL et 500 mL
- Flacons en verre
- Cylindres gradués
- Micropipettes à volume fixe (400 µL, 700 µL et 1000 µL)
- Macropipette 0.5-5 mL

**Réactifs :**

- Acétonitrile qualité HPLC, Merck, N° FRN 1.00030, ou qualité équivalente.
- Eau qualité HPLC, Merck, N° FRN 1.15333, ou qualité équivalente.
- Ammonium formate BioUltra 10 M in H<sub>2</sub>O 100 mL, Sigma-Aldrich, N° FRN 78314-100ML-F, ou qualité équivalente.
- Acide formique 99% qualité ULC/MS, Biosolve, N° FRN 069141 (0006914143BS), ou qualité équivalente.
- Glucose 5% iv (25g/500 mL), BBraun Medical AG (Sempach, Suisse), REF : 395168, ou Glucose 5% sol perf (20 miniflac(s) 50 mL), REF : 531029, Pharmacode : 2044131 ou qualité équivalente

**9. CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES HPLC**

**Colonne HPLC** : BEH Z-HILIC (Waters, Atlantis™ Première UPLC®, 95 Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 50 mm), N° FRN 186009981, avec pré-colonne intégrée (VanGuard FIT).

**Température du sampler** : 10°C

**Température de colonne** : 30 °C

**Phase mobile** : La phase mobile est constituée d'une **phase mobile B** et d'une **phase mobile C**

**Phase mobile A** : ACN / H<sub>2</sub>O (50 / 50)

**Phase mobile B** : H<sub>2</sub>O + ammonium formate 30 mM à pH = 3.0

**Phase mobile C** : ACN/H<sub>2</sub>O (85:15) + ammonium formate 30 mM, à pH=3.0

**Phase mobile D** : ACN / H<sub>2</sub>O (90 :10)

En **mode gradient** selon le tableau 1.

**Tableau 1 : Gradient utilisé pour l'analyse**

Temps (min)	%B	%C
0.00	0	100
2.80	55	45
3.10	55	45
3.20	0	100
5.20	0	100

**Durée totale de l'analyse** : 5.20 min

**Débit** : 0.5 mL/min

**Volume d'injection** : 5 µL

**Temps de rétention de la dopamine** : 1.547 ± 0.077

**Solution de lavage de l'aiguille (Phase mobile D)** : ACN / H<sub>2</sub>O (90 :10)

- Dans un cylindre gradué de 250 mL, verser 225 mL d'ACN et compléter à 250 mL avec de l'H<sub>2</sub>O.

**Rear Seal Wash** : MeOH / H<sub>2</sub>O (10 : 90)

- Dans un cylindre gradué de 250 mL, verser 225 mL d' H<sub>2</sub>O et compléter à 250 mL avec du MeOH.

**Lavage de la colonne** : ACN / H<sub>2</sub>O (50: 50) (**100% phase A**) pendant 10 min. Puis, ACN / H<sub>2</sub>O (90:10) (**100% phase D**) pendant 10 min.

**Stockage de la colonne** : ACN/H<sub>2</sub>O (90:10), soit 100% phase mobile D

**Longueur d'onde** : 280 nm

**10. PRÉPARATION DES SOLUTIONS, CONSERVATION, STABILITÉ****Phase Mobile B : H<sub>2</sub>O + 30 mM d'ammonium formate à pH = 3.0 (ajustement avec acide formique)**

Préparer environ 400 mL H<sub>2</sub>O dans un ballon jaugé de 500 mL et ajouter 1.5 mL d'ammonium formate (NaH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub>, 10 M). Ajuster le pH à 3.0 avec de l'acide formique CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ajouter environ 2.0 mL) puis compléter au trait de jauge avec H<sub>2</sub>O. Verser la solution dans un duran de 500 mL.

La phase mobile B se conserve pendant 1 semaine à température ambiante.

**Phase Mobile C : ACN/H<sub>2</sub>O (85:15) + ammonium formate 10 mM à pH=3.0 (ajustement avec acide formique)**

Dans un cylindre gradué de 100 mL, prélever 75 mL de la phase mobile B. Dans un cylindre gradué de 500 mL, mesurer 425 mL d'ACN. Verser le contenu des deux cylindres dans un duran de 500 mL.

La phase mobile C se conserve pendant 1 semaine à température ambiante.

**Diluant pour solutions standards de calibration et de validation (Std): ACN / H<sub>2</sub>O (90:10)**

Préparer 100 mL de diluant en mesurant 90 mL d'ACN et 10 mL d'H<sub>2</sub>O. Utiliser soit deux cylindres gradués de même précision (100 mL) ou prélever d'abord l'ACN, verser dans un flacon, bien sécher le cylindre et ensuite prélever l'eau et verser dans le flacon.

**Préparation des standards :**

**Solution mère (SM) :** Dans un ballon jaugé de 50 mL, dissoudre précisément **315.82 mg** de dopamine chlorhydrate (équivalent à 250 mg de dopamine base) dans un fond d'H<sub>2</sub>O HPLC. Compléter au trait de jauge avec l'H<sub>2</sub>O HPLC. (C<sub>SM dopamine base</sub> = **5.0 mg/mL**).

**Blanc standard :** 1 mL de diluant ACN / H<sub>2</sub>O (90 : 10)

**Solutions standards (Std) :** Pour chaque standard, prélever le volume de SM indiqué dans le *Tableau 2* et introduire dans un ballon jaugé de 10 mL. Compléter ensuite au trait de jauge avec le diluant ACN/H<sub>2</sub>O (90 :10).

**Tableau 2 : Préparation des solutions standards de calibration**

	Concentration des stds (µg/mL)	Volume de SM à prélever (µL)	Volume final total (mL)
<b>CStd1</b>	500	1000	10.0
<b>CStd2</b>	350	700	10.0
<b>CStd3</b>	200	400	10.0

Prélever ensuite 1 mL de solution standard et introduire dans des vials pour analyses HPLC.

*Note :* La masse de dopamine chlorhydrate à peser a été calculée en **dopamine base** et en tenant compte de la pureté du produit (≥ 98%) .

**11. PRÉPARATION LOT TEST DOPAMINE CHLORHYDRATE**

**Solution mère (VSM) :** Dans un ballon jaugé de 50 mL, dissoudre précisément **315.82 mg** de dopamine chlorhydrate (équivalent à 250 mg de dopamine base) dans un fond d'H<sub>2</sub>O HPLC. Compléter au trait de jauge avec l'H<sub>2</sub>O HPLC.

(C<sub>SM dopamine base</sub> = **5.0 mg/mL**).

**Blanc du lot test :** 1 mL de diluant ACN / Glucose 5% (90 : 10)

**Solutions standards (Std) :** Pour chaque standard, prélever le volume de SM indiqué dans le *Tableau 2* et introduire dans un ballon jaugé de 10 mL. Compléter ensuite au trait de jauge avec le diluant ACN/H<sub>2</sub>O (90 :10).

**Tableau 3 : Validation standards de validation**

	Concentration des Vstds (µg/mL)	Volume de VSM à prélever (µL)	Volume final total (mL)
<b>VStd1</b>	500	1000	10.0
<b>VStd2</b>	350	700	10.0
<b>VStd3</b>	200	400	10.0

Prélever ensuite 1 mL de solution standard et introduire dans des vials pour analyses HPLC.

Note : La masse de dopamine chlorhydrate à peser a été calculée en **dopamine base** et en tenant compte de la pureté du produit ( $\geq 98\%$ ) .

## 12. DÉROULEMENT

- Suivre l'instruction d'utilisation de l'HPLC.
- Equilibrer la colonne pendant au moins 50 minutes (phases mobiles et température de colonne appropriées).
- Les données de la courbe d'étalonnage dans la méthode pour les stds sont exprimées en  $\mu\text{g/mL}$ .
- La séquence analytique est présentée en annexe 1 dans le rapport Chroméléon.
- Conditionner le système avec des blancs avant de lancer la séquence de validation.
- Injecter la solution test (std2) 3 fois pour évaluer la conformité du système (indiqué CS dans le tableau 2).
  - Le temps de rétention la dopamine est de  $1.547 \pm 0.077$
  - Calculer le coefficient de variation, il doit être  $< 1\%$ .
- Injecter les standards 3 fois par ordre croissant de concentration pour la droite de calibration.
- Injecter l'échantillon à examiner 3 fois et, finalement injecter un QC 3 fois en fin de séquence.
- Compléter le logbook « Suivi de colonne ».

## 13. CALCUL ET RENDU DES RÉSULTATS

La dopamine est identifiée par son temps de rétention.

Les résultats sont calculés à partir des aires (surfaces) des pics.

La quantification de la dopamine se fait à l'aide du logiciel Chroméléon.

La courbe de calibration est obtenue par 3 niveaux de standards.

Les résultats de l'échantillon sont exprimés en  $\text{mg/mL}$ .

Les résultats du QC sont exprimés en  $\text{mg/mL}$ .

## 14. VALIDATION TECHNIQUE

La courbe de calibration doit être acceptable si :  $R^2 > 0.99$ .

Le coefficient de variation des facteurs de réponse doit être (CV = RSD) :  $< 2\%$

Le coefficient de variation de la répétabilité (CVr) de l'échantillon et du QC doit être  $< 2\%$ .

L'IC réelle de la solution de QC au risque de 5% doit se trouver entre 95 et 105% de la valeur nominale (pesée).

## 15. RÉFÉRENCES

3. Chemaxon. Chemicalize. [cité 30 octobre 2024]. Chemicalize - Instant Cheminformatics Solutions. Disponible sur: <https://chemicalize.com>

**Annexe 6 : Protocole de validation de l'isoprénaline****PHA8 –PREVALIDATION de la Isoprénaline chlorhydrate par UHPLC-UV****Arborescence :**MQ : [PHA MQ 8000](#)Processus : [PHA PROC 8008](#)Procédure : [PHA PRO 8027](#)**16. OBJET**

L'objectif de cette méthode est d'identifier et doser la dopamine chlorhydrate dans du NaCl 0.9% de la formulation suivante :

- **Isoprénaline HCl, sol inj, 0.1 mg/mL**

**17. COMPOSITION**

**Principe actif :** Isoprénaline chlorhydrate

**Excipients :** NaCl 0.9%

**18. PRINCIPE**

L'échantillon est dilué et dosé par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée à un détecteur DAD avec la méthode d'étalonnage externe.

**19. DÉFINITIONS - ABRÉVIATIONS**

<b>DAD</b>	Diode Array Detector (détecteur à barrette de diodes)
<b>ACN</b>	Acétonitrile
<b>C</b>	Concentration
<b>CV</b>	Coefficient de variation
<b>CVr</b>	Coefficient de variation de répétabilité
<b>CV=RSD</b>	Coefficient de variation ou Relative standard deviation (terme anglais)
<b>FA</b>	Acide formique
<b>FRN</b>	Fournisseur
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Eau
<b>HPLC</b>	Chromatographie liquide à haute performance
<b>IC</b>	Intervalle de confiance
<b>LogP</b>	Coefficient de partage
<b>MW</b>	Poids moléculaire
<b>NaH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub></b>	Ammonium formate
<b>N°</b>	Numéro
<b>NS</b>	Numéro de série
<b>pKa</b>	Constante de dissociation
<b>QC</b>	Contrôle Qualité
<b>SCR</b>	Substance chimique de référence
<b>Std(s)</b>	Standards

**20. SYNONYMES**

Isoprénaline ; Isoprotérenol, Isopropydrine

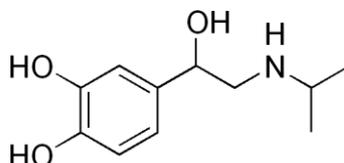
**Sel :** Isoprenalini hydrochloridum

**21. NOM CHIMIQUE ET STRUCTURE****Isoprénaline Base**

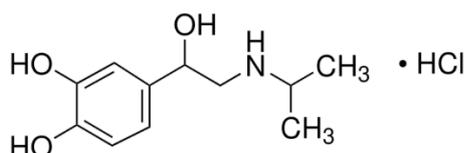
4-(1-Hydroxy-2-((1-méthylethyl)amino)ethyl)-1,2-benzenediol

 $C_{11}H_{17}NO_3 = 211.26 \text{ g/mol}$ 

CAS – [7683-59-2]

**Isoprénaline chlorhydrate** $C_{11}H_{17}NO_3 \cdot HCl = 247.72 \text{ g/mol}$ 

CAS – [51-30-9]

**22. PROPRIÉTÉS PHYSICOCHIMIQUES****Isoprénaline chlorhydrate***Aspect* : Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche.*Solubilité* : Facilement soluble dans l'eau, assez soluble dans l'éthanol à 96 pour cent, pratiquement insoluble dans le chlorure de méthylène.*Précautions* : Sensible à la lumière**Point de fusion** : 165 - 175 °C**LogP**<sup>4</sup> : 0.24**pKa**<sup>1</sup> : Base (Amine) = 8.96 ; Acide (Hydroxdes) = 9.81, 12.65, 14.38

<sup>4</sup> Chemaxon. Chemicalize. [cité 31 octobre 2024]. Chemicalize - Instant Cheminformatics Solutions. Disponible sur: <https://chemicalize.com>

**23. MATÉRIEL****Standards :**

- Isoprénaline hydrochloride, Sigma Aldrich, N° FRN : I5627-5G, CAS [62-31-7]

**Appareillage :**

- HPLC Ultimate 3000 Rs Thermoscientific, équipé :
  - d'une pompe Rs Pump
  - d'un injecteur Rs Autosampler
  - d'un compartiment à colonne Rs Column compartment
  - d'un détecteur DAD Rs Diode array detector
  - d'un détecteur Corona Rs Corona Veo
  - d'un logiciel Chromelion
- Colonne : 1 colonne BEH Z-HILIC (Atlantis™ Premier UPLC, 95 Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 50 mm)
- Précolonne : VanGuard™ FIT (intégrée à la colonne)
- Balance semi-analytique
- Balance analytique
- Ballons jaugés 10 mL, 100 mL et 500 mL
- Flacons en verre
- Cylindres gradués
- Micropipettes 1000 µL
- Macropipette 0.5-5 mL

**Réactifs :**

- Acétonitrile qualité HPLC, Merck, N° FRN 1.00030, ou qualité équivalente.
- Eau qualité HPLC, Merck, N° FRN 1.15333, ou qualité équivalente.
- Ammonium formate BioUltra 10 M in H<sub>2</sub>O 100 mL, Sigma-Aldrich, N° FRN 78314-100ML-F, ou qualité équivalente.
- Acide formique 99% qualité ULC/MS, Biosolve, N° FRN 069141 (0006914143BS), ou qualité équivalente.
- NaCl 0.9%, Bichsel AG (Interlaken, Suisse), REF : FE1001340, ou qualité équivalente.
- 

**24. CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES HPLC**

**Colonne HPLC** : BEH Z-HILIC (Waters, Atlantis™ Première UPLC®, 95 Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 50 mm), N° FRN 186009981, avec pré-colonne intégrée (VanGuard FIT).

**Température du sampler** : 10°C

**Température de colonne** : 30 °C

**Phase mobile** : La phase mobile est constituée d'une **phase mobile B** et d'une **phase mobile C**

**Phase mobile A** : ACN / H<sub>2</sub>O (50 / 50)

**Phase mobile B** : H<sub>2</sub>O + ammonium formate 30 mM à pH = 3.0

**Phase mobile C:** ACN/H<sub>2</sub>O (85:15) + ammonium formate 30 mM, à pH=3.0

**Phase mobile D :** ACN / H<sub>2</sub>O (90 :10)

En mode **gradient** selon le tableau 1.

**Tableau 1 : Gradient utilisé pour l'analyse**

Temps (min)	%B	%C
0.00	0	100
2.80	55	45
3.10	55	45
3.20	0	100
5.20	0	100

**Durée totale de l'analyse :** 5.20 min

**Débit :** 0.5 mL/min

**Volume d'injection :** 5 µL

**Temps de rétention de l'isoprénaline :** 0.791 ± 0.040

**Solution de lavage de l'aiguille (Phase mobile D) :** ACN / H<sub>2</sub>O (90 :10)

- Dans un cylindre gradué de 250 mL, verser 225 mL d'ACN et compléter à 250 mL avec du H<sub>2</sub>O.

**Rear Seal Wash :** MeOH / H<sub>2</sub>O (10 : 90)

- Dans un cylindre gradué de 250 mL, verser 225 mL d' H<sub>2</sub>O et compléter à 250 mL avec du MeOH.

**Lavage de la colonne :** ACN / H<sub>2</sub>O (50 : 50) (donc **100% phase A**) pendant 10 min. Puis, ACN / H<sub>2</sub>O (90 :10) (donc **100% phase D**) pendant 10 min.

**Stockage de la colonne :** ACN/H<sub>2</sub>O (90 :10), donc 100% phase mobile D

**Longueur d'onde :** 280 nm

## 25. PRÉPARATION DES SOLUTIONS, CONSERVATION, STABILITÉ

### **Phase Mobile B : H<sub>2</sub>O + 30 mM d'ammonium formate à pH = 3.0 (ajustement avec acide formique)**

Préparer environ 400 mL H<sub>2</sub>O dans un ballon jaugé de 500 mL et ajouter 1.5 mL d'ammonium formate (NaH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub>, 10 M). Ajuster le pH à 3.0 avec de l'acide formique CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ajouter environ 2.0 mL) puis compléter au trait de jauge avec H<sub>2</sub>O. Verser la solution dans un duran de 500 mL.

La phase mobile B se conserve pendant 1 semaine à température ambiante.

### **Phase Mobile C : ACN/H<sub>2</sub>O (85:15) + ammonium formate 10 mM à pH=3.0 (ajustement avec acide formique)**

Dans un cylindre gradué de 100 mL, prélever 75 mL de la phase mobile B. Dans un cylindre gradué de 500 mL, mesurer 425 mL d'ACN. Verser le contenu des deux cylindre dans un duran de 500 mL.

La phase mobile C se conserve pendant 1 semaine à température ambiante.

### **Diluant pour solutions standards (Std): ACN / H<sub>2</sub>O (85 : 15)**

Préparer 100 mL de diluant en mesurant 85 mL d'ACN et 15 mL d'H<sub>2</sub>O. Utiliser soit deux cylindres gradués de même précision (100 mL) ou prélever d'abord l'ACN, verser dans un flacon, bien sécher le cylindre et ensuite prélever l'eau et verser dans le flacon.

### **Diluant pour solutions standards de validation (VStd): ACN / NaCl 0.9% (85 : 15)**

Préparer 100 mL de diluant en mesurant 85 mL d'ACN et 15 mL de solution NaCl 0.9%. Utiliser soit deux cylindres gradués de même précision (100 mL) ou prélever d'abord l'ACN, verser dans un flacon, bien sécher le cylindre et ensuite prélever l'eau et verser dans le flacon.

**Préparation des standards :**

**Solution mère (SM) :** Dans un ballon jaugé de 100 mL, dissoudre précisément **59.52 mg** d'isoprénaline chlorhydrate (équivalent à 50 mg d'isoprénaline base) dans un fond d'H<sub>2</sub>O HPLC. Compléter au trait de jauge avec l' H<sub>2</sub>O HPLC.

(C<sub>SM</sub> Isoprénaline base = **500 µg/mL**).

**Blanc standard :** 1 mL de diluant ACN / H<sub>2</sub>O (85 : 15)

**Solution standards (Std) :** Pour chaque standard, prélever le volume de SM indiqué dans le *Tableau 2* et introduire dans un ballon jaugé de 10 mL. Compléter ensuite au trait de jauge avec le diluant ACN/H<sub>2</sub>O (85 :15).

**Tableau 2 : Préparation des solutions standards de calibration**

	Concentration des stds (µg/mL)	Volume de SM à prélever (µL)	Volume final total (mL)
<b>CStd1</b>	25.0	500	10
<b>CStd2</b>	20.0	400	10
<b>CStd3</b>	15.0	300	10

Prélever ensuite 1 mL de solution standard et introduire dans des vials pour analyses HPLC.

*Note : La masse de isoprénaline chlorhydrate à peser a été calculée en isoprénaline base et en tenant compte de la pureté du produit (≥ 98.5%) .*

## 26. PRÉPARATION LOT TEST ISOPRÉNALINE CHLORHYDRATE

**Solution mère (VSM) :** Dans un ballon jaugé de 100 mL, dissoudre précisément **59.52 mg** d'isoprénaline chlorhydrate (équivalent à 50 mg d'isoprénaline base) dans un fond de solution NaCl 0.9%. Compléter au trait de jauge avec la solution NaCl 0.9%.

(C<sub>VSM</sub> Isoprénaline base = **500 µg/mL**).

**Blanc du lot test :** 1 mL de diluant ACN / NaCl 0.9% (85 : 15)

**Solutions standards (Std) :** Pour chaque standard, prélever le volume de SM indiqué dans le *Tableau 2* et introduire dans un ballon jaugé de 10 mL. Compléter ensuite au trait de jauge avec le diluant ACN/NaCl 0.9% (85 :15).

**Tableau 3 : Validation standards de validation**

	Concentration des Vstds (µg/mL)	Volume de VSM à prélever (µL)	Volume final total (mL)
<b>VStd1</b>	25.0	500	10
<b>VStd2</b>	20.0	400	10
<b>VStd3</b>	15.0	300	10

Prélever ensuite 1 mL de solution standard et introduire dans des vials pour analyses HPLC.

*Note : La masse de isoprénaline chlorhydrate à peser a été calculée en isoprénaline base et en tenant compte de la pureté du produit (≥ 98.5%) .*

## 27. DÉROULEMENT

- Suivre l'instruction d'utilisation de l'HPLC.
- Equilibrer la colonne pendant au moins 50 minutes (phases mobiles et température de colonne appropriées).
- Les données de la courbe d'étalonnage dans la méthode pour les stds sont exprimées en **µg/mL**.
- La séquence analytique est présentée en annexe 1 dans le rapport Chroméléon.
- Conditionner le système avec des blancs avant de lancer la séquence de validation.
- Injecter la solution test (std2) 3 fois pour évaluer la conformité du système (indiqué CS dans le tableau 2).
  - Le temps de rétention l'isoprénaline est de 0.791 ± 0.040
  - Calculer le coefficient de variation, il doit être < 1%.
- Injecter les standards 3 fois par ordre croissant de concentration pour la droite de calibration.
- Injecter l'échantillon à examiner 3 fois et, finalement injecter un QC 3 fois en fin de séquence.

- Compléter le logbook « Suivi de colonne ».

## 28. CALCUL ET RENDU DES RÉSULTATS

L'isoprénaline est identifiée par son temps de rétention.  
Les résultats sont calculés à partir des aires (surfaces) des pics.  
La quantification de la Isoprénaline se fait à l'aide du logiciel Chroméléon.  
La courbe de calibration est obtenue par 3 niveaux de standards.  
Les résultats de l'échantillon sont exprimés en mg/mL.  
Les résultats du QC sont exprimés en mg/mL.

## 29. VALIDATION TECHNIQUE

La courbe de calibration doit être acceptable si :  $R^2 > 0.99$ .  
Le coefficient de variation des facteurs de réponse doit être (CV = RSD) :  $< 2\%$   
Le coefficient de variation de la répétabilité (CVr) de l'échantillon et du QC doit être  $< 2\%$ .  
L'IC réelle de la solution de QC au risque de 5% doit se trouver entre 95 et 105% de la valeur nominale (pesée).

## 30. RÉFÉRENCES

4. Chemaxon. Chemicalize. [cité 31 octobre 2024]. Chemicalize - Instant Cheminformatics Solutions. Disponible sur: <https://chemicalize.com>

**Annexe 7 : Calculs de la préparation des échantillons d'analyse durant le développement de la méthode****A) Préparation des solutions mères de catécholamines****Concentration cible** : 5 mg/mL**Volume final** : 10 mL**Diluant** : H<sub>2</sub>O qualité HPLC

$$m_{théorique\ de\ catécholamines} = C \left[ \frac{mg}{mL} \right] * V[mL] = 5 * 10 = 50\ mg$$

Afin que les résultats ne soient pas influencés par le type de sel utilisé (ici, les catécholamines étaient sous forme de sel chlorhydrate), les masses à peser ont été calculées en « catécholamine base », la pureté des standards utilisés n'a pas été prise en compte :

$$m_{adrénaline\ base} = m_{théorique} [mg] * \frac{M_{adrénaline\ HCl} \left[ \frac{g/mol}{g/mol} \right]}{M_{adrénaline\ base} \left[ \frac{g/mol}{g/mol} \right]} = 50 * \frac{219.67}{183.21} = 59.95\ mg$$

$$m_{noradrénaline\ base} = m_{théorique} [mg] * \frac{M_{noradrénaline\ HCl} \left[ \frac{g/mol}{g/mol} \right]}{M_{noradrénaline\ base} \left[ \frac{g/mol}{g/mol} \right]} = 50 * \frac{205.64}{169.18} = 60.77\ mg$$

$$m_{dopamine\ base} = m_{théorique} [mg] * \frac{M_{dopamine\ HCl} \left[ \frac{g/mol}{g/mol} \right]}{M_{dopamine\ base} \left[ \frac{g/mol}{g/mol} \right]} = 50 * \frac{189.64}{153.18} = 61.90\ mg$$

$$m_{isoprénaline\ base} = m_{théorique} [mg] * \frac{M_{isoprénaline\ HCl} \left[ \frac{g/mol}{g/mol} \right]}{M_{isoprénaline\ base} \left[ \frac{g/mol}{g/mol} \right]} = 50 * \frac{247.72}{211.26} = 58.62\ mg$$

Pour la dobutamine, le Dobutrex® 250 mg/50 mL (ou 5 mg/mL) a directement été utilisé comme tel. A ce stade, pour le développement de la méthode, la pureté des poudres utilisées n'a pas été prise en compte dans les calculs de masse.

**B) Préparation des solutions standards (C = 50 µg/mL)****Concentration cible** : 50 µg/mL**Volume final** : 10 mL**Diluant pour analyse en phase normale** : ACN/H<sub>2</sub>O (90 :10)**Diluant pour analyse en phase inverse** : ACN/H<sub>2</sub>O (10 :90)

$$C_{initial} \left[ \frac{\mu g}{mL} \right] * V_{initial} [mL] = C_{final} \left[ \frac{\mu g}{mL} \right] * V_{final} \left[ \frac{\mu g}{mL} \right]$$

$$\text{Donc : } V_{initial} = \frac{C_{final} * V_{final}}{C_{initial}} = \frac{50 * 10}{5000} = 0.1\ mL = 100\ \mu L$$

Pour obtenir les solutions standards, 100 µL des solutions mères préparées et de Dobutrex® ont été introduits dans différents ballons jaugés de 10 mL, ensuite complétés avec le diluant approprié.

Une 6<sup>ème</sup> solution, le mix, a été fabriquée en introduisant 100 µL de chaque solution mère et de Dobutrex® dans un même ballon jaugé de 10 mL puis le volume a été complété à la jauge avec le diluant approprié.

**Attention** : Le Dobutrex® contient également de la dobutamine chlorhydrate, mais le sel n'a pas été pris en compte ici : 100 µL ont été prélevés, comme pour toutes les autres solutions standards.

**Annexe 8 : Calculs de la préparation des échantillons d'analyse durant la validation de la méthode**

La démarche décrite ci-dessous a été suivie pour tous les protocoles de validation, bien que seul l'exemple de l'adrénaline ne soit présenté.

**A) Préparation de la solution mère d'adrénaline**

**Concentration cible** : 500 µg/mL

**Volume final** : 100 mL

**Diluant pour la calibration** : H<sub>2</sub>O qualité HPLC pour la calibration

**Diluant pour la validation** : NaCl 0.9%

$$m_{\text{théorique de catécholamines}} = C \left[ \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right] * V[\text{mL}] = 5 * 10 = 50 \text{ mg}$$

Afin que les résultats ne soient pas influencés par le type de sel utilisé (ici, adrénaline chlorhydrate), les masses à peser ont été calculées en « catécholamine base » et en tenant compte de la pureté du produit initial (ici, ≥ 98%) :

$$m_{\text{adrénaline base}} = m_{\text{théorique}} [\text{mg}] * \frac{M_{\text{adrénaline HCl}} \left[ \frac{\text{g/mol}}{\text{g/mol}} \right]}{M_{\text{adrénaline base}} \left[ \frac{\text{g/mol}}{\text{g/mol}} \right]} * \frac{1}{\text{pureté}} = 50 * \frac{219.67}{183.21} * \frac{1}{0.98} = 61.17 \text{ mg}$$

**B) Préparation des solutions standards d'adrénaline**

**Concentrations cibles** :

- Std 1 : 10 µg/mL
- Std 2 : 15 µg/mL
- Std 3 : 20 µg/mL

**Volume final** : 10 mL

**Diluant pour les standards de calibration** : ACN/H<sub>2</sub>O (85 :15)

**Diluant pour les standards de validation** : ACN/NaCl 0.9% (85 :15)

$$C_{\text{initial}} \left[ \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right] * V_{\text{initial}}[\text{mL}] = C_{\text{final}} \left[ \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right] * V_{\text{final}} \left[ \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right]$$

Pour Std1 :	$V_{\text{initial de solution mère}} = \frac{C_{\text{final}} * V_{\text{final}}}{C_{\text{initial}}} = \frac{10 * 10}{500} = 0.2 \text{ mL} = 200 \mu\text{L}$
Pour Std2 :	$V_{\text{initial de solution mère}} = \frac{C_{\text{final}} * V_{\text{final}}}{C_{\text{initial}}} = \frac{15 * 10}{500} = 0.3 \text{ mL} = 300 \mu\text{L}$
Pour Std3 :	$V_{\text{initial de solution mère}} = \frac{C_{\text{final}} * V_{\text{final}}}{C_{\text{initial}}} = \frac{20 * 10}{500} = 0.4 \text{ mL} = 400 \mu\text{L}$

**Annexe 9 : Protocole de la dégradation forcée des catécholamines****PHA8 – Dégradation forcée de l'adrénaline, la noradrénaline, la dopamine et l'isoprénaline en solution par UHPLC-UV****Arborescence :**MQ : [PHA\\_MQ\\_8000](#)Processus : [PHA\\_PROC\\_8008](#)Procédure : [PHA\\_PRO\\_8027](#)**1. OBJET**

L'objectif de ce protocole est d'évaluer la dégradation forcée de 4 catécholamines (adrénaline, noradrénaline, dopamine et isoprénaline) des formulations suivantes :

- **Adrénaline 2.0 mg/mL dans du NaCl 0.9 %**
- **NORadrénaline 2.0 mg/mL, dans du NaCl 0.9 %**
- **Dopamine 2.0 mg/mL dans du Glucose 5 %**
- **Isoprénaline 2.0 mg/mL dans du NaCl 0.9 %**

Selon le site internet de Pharmaguideline : <https://www.pharmaguideline.com/2014/08/forced-degradation-study-in-pharmaceutical-stability.html>.

**2. COMPOSITION**

**Principe actif :** Adrénaline hydrochloride (E) ; Noradrénaline hydrochloride (NE) ; Dopamine hydrochloride (DA) ; Isoprénaline hydrochloride (ISP)

**Excipients :** NaCl 0.9% (pour E, NE, ISP) ; Glucose 5% (pour DA)

**3. PRINCIPE**

L'échantillon est analysé par chromatographie liquide à ultra haute performance (UHPLC) couplée à un détecteur à barrettes de diodes (DAD).

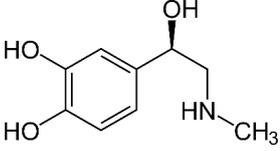
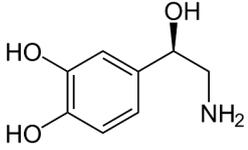
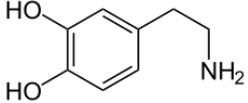
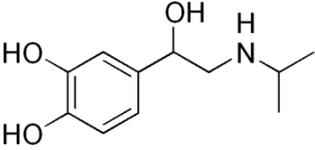
**4. DÉFINITIONS****Abréviations :**

E : Adrénaline (ou Epinephrine)  
 NE : Noradrénaline (ou Norépinéphrine)  
 DA : Dopamine  
 ISP : Isoprénaline  
 ACN : Acétonitrile  
 C : Concentration  
 CV : Coefficient de variation  
 CVr : Coefficient de variation de répétabilité  
 CV = RSD : Relative standard deviation (terme anglais)  
 FRN : Fournisseur  
 H<sub>2</sub>O : Eau  
 IC : Intervalle de confiance  
 LogP : Coefficient de partage  
 N° : Numéro  
 NS : Numéro de série  
 pKa : Constante de dissociation  
 QC : Contrôle Qualité  
 SCR : Substance chimique de référence  
 Std(s) : Standards  
 UHPLC : Chromatographie liquide à ultra haute performance  
 DAD : Détecteur à barrettes de diodes

**5. SYNONYMES****Principes actifs :**

- Adrénaline ; Epinéphrine ; Adrenalinum ; Adrenalini hydrochloridum (sel)
- Noradrénaline ; Norépinephrine ; Nordrenalinum ; L-Arterenol ; Levarterenol ; Nordrenalini hydrochloridum (sel)
- Dopamine ; Dopamini hydrochloridum (sel)
- Isoprénaline ; Isoprotérenol, Isopropydrine ; Isoprenalini hydrochloridum (sel)

## 6. NOM CHIMIQUE ET STRUCTURE

<p style="text-align: center;"><b>Adrénaline Base</b></p> 	<p>(1<i>R</i>)-1-(3,4-dihydroxyphényl)-2-(méthylamino)éthanol 4-[(1<i>R</i>)-1-hydroxy-2-(méthylamino)éthyl]benzene-1,2-diol (<i>R</i>)-(-)-3,4-Dihydroxy-<math>\alpha</math>-(méthylaminométhyl)benzyl alcohol</p> <p><math>C_{13}H_{19}NO_3 = 183.2 \text{ g/mol}</math> <math>C_9H_{13}NO_3 \cdot \text{HCl} = 219.7 \text{ g/mol}</math></p> <p><b>E base</b> : CAS – [51-43-4] <b>E HCl</b> : CAS – [55-31-2]</p>
<p style="text-align: center;"><b>NORadrénaline Base</b></p> 	<p>(<i>R</i>)-4-(2-Amino-1-hydroxyéthyl)-1,2-benzenediol</p> <p><math>C_8H_{11}NO_3 = 169,2 \text{ g/mol}</math> <math>C_8H_{11}NO_3 \cdot \text{HCl} = 205.6 \text{ g/mol}</math></p> <p>NE base : CAS – [51-41-2] NE HCl : CAS – [329-56-6]</p>
<p style="text-align: center;"><b>Dopamine</b></p> 	<p>3,4 Dihydroxyphenethylamine 4-(2-aminoéthyl)benzene-1,2-diol</p> <p><math>C_8H_{11}NO_2 = 153.18 \text{ g/mol}</math> <math>C_8H_{11}NO_2 \cdot \text{HCl} = 189.64 \text{ g/mol}</math></p> <p>DA base : CAS – [51-61-6] DA HCl : CAS – [62-31-7]</p>
<p style="text-align: center;"><b>Isoprénaline</b></p> 	<p>4-(1-Hydroxy-2-((1-méthylethyl)amino)éthyl)-1,2-benzenediol</p> <p><math>C_{11}H_{17}NO_3 = 211.26 \text{ g/mol}</math> <math>C_{11}H_{17}NO_3 \cdot \text{HCl} = 247.72 \text{ g/mol}</math></p> <p>ISP base : CAS – [7683-59-2] ISP HCl : CAS – [51-30-9]</p>

## 7. PROPRIÉTÉS PHYSICOCHIMIQUES

Molécules	Pt de fusion [°C]	**Solubilité dans l'eau <sup>5</sup>	Coeff de partage (logP) <sup>1</sup>
<b>Adrénaline</b>	env. 215 °C	5411.15 mg/mL	- 0.43
<b>Noradrénaline</b>	env. 220 °C	3489.35 mg/mL	- 0.649
<b>Dopamine</b>	248 - 250 °C	2604.85 mg/mL	- 2.25
<b>Isoprénaline</b>	165 - 175 °C	1368.25 mg/mL	0.24

\* Il s'agit de la solubilité des sels chrohydrate de chacune des molécules, à pH acide.

<sup>1</sup>Chemaxon. Chemicalize. [cité 19 novembre 2024]. Chemicalize - Instant Cheminformatics Solutions. Disponible sur: <https://chemicalize.com>

**8. MATÉRIEL****Standards :**

- Epinephrine Hydrochloride, Sigma Aldrich, N° FRN : E44642-5G
- DL-Norepinéphrine hydrochloride crystalline, Sigma Aldrich, N° FRN : A7256-5G
- Dopamine hydrochloride, Sigma Aldrich, N° FRN : H8502-5G
- Isoprénaline hydrochloride, Sigma Aldrich, N° FRN : I5627-5G

**Appareillage :**

- HPLC Ultimate 3000 Rs ThermoScientific, équipé :
  - d'une pompe Rs Pump
  - d'un injecteur Rs Autosampler
  - d'un compartiment à colonne Rs Column compartment
  - d'un détecteur DAD Rs Diode array detector
  - d'un détecteur Corona Rs Corona Veo
  - d'un logiciel Chromelion
- Colonne : 1 colonne BEH Z-HILIC (Atlantis™ Premier UPLC, 95 Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 50 mm)
- Précolonne : VanGuard™ FIT (intégrée à la colonne)
- Balance semi-analytique
- Balance analytique
- Ballons jaugés 10 mL (x 20) et 500 mL
- Flacons en verre
- Cylindres gradués
- Micropipettes 50-100 µL et 800 µL (fixe)
- Macropipette 0.5-5 mL

**Standards :**

- Epinephrine Hydrochloride, Sigma Aldrich, N° FRN : E44642-5G, CAS [329-63-5]
- DL-Norepinéphrine hydrochloride crystalline, Sigma Aldrich, N° FRN : A7256-5G, CAS [55.27.6]
- Dopamine hydrochloride, Sigma Aldrich, N° FRN : H8502-5G, CAS [62-31-7]
- Isoprénaline hydrochloride, Sigma Aldrich, N° FRN : I5627-5G, CAS [62-31-7]

**Réactifs :**

- Acétonitrile qualité HPLC, Merck, N° FRN 1.00030, ou qualité équivalente.
- Eau qualité HPLC, Merck, N° FRN 1.15333, ou qualité équivalente.
- Ammonium formate BioUltra 10 M in H<sub>2</sub>O 100 mL, Sigma-Aldrich, N° FRN 78314-100ML-F, ou qualité équivalente.
- Acide formique 99% qualité ULC/MS, Biosolve, N° FRN 069141 (0006914143BS), ou qualité équivalente.
- NaCl 0.9%, Bichsel AG (Interlaken, Suisse), REF : FE1001340, ou qualité équivalente.
- Glucose 5% iv (25g/500 mL), BBraun Medical AG (Sempach, Suisse), REF : 395168, ou Glucose 5% sol perf (20 miniflac(s) 50 mL), REF : 531029, Pharmacode : 2044131 ou qualité équivalente
- NaOH 1 M
- HCl 1 M
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30.5%

**9. CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES HPLC**

**Colonne HPLC** : BEH Z-HILIC (Waters, Atlantis™ Première UPLC®, 95 Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 50 mm), N° FRN 186009981, avec pré-colonne intégrée (VanGuard FIT).

**Température du sampler** : 10°C

**Température de colonne** : 30 °C

**Phase mobile** : La phase mobile est constituée d'une **phase mobile B** et d'une **phase mobile C**

**Phase mobile A** : ACN / H<sub>2</sub>O (50 / 50)

**Phase mobile B** : H<sub>2</sub>O + ammonium formate 30 mM à pH = 3.0

**Phase mobile C** : ACN/H<sub>2</sub>O (85:15) + ammonium formate 30 mM, à pH=3.0

**Phase mobile D** : ACN / H<sub>2</sub>O (90 :10)

En **mode gradient** selon le tableau 1.

**Tableau 1 : Gradient utilisé pour l'analyse**

Temps (min)	%B	%C
0.00	0	100
2.80	55	45
3.10	55	45
3.20	0	100
5.20	0	100

**Durée totale de l'analyse** : 5.20 min

**Débit** : 0.5 mL/min

**Volume d'injection** : 5 µL

**Temps de rétention de l'isoprénaline** : 0.791 ± 0.040

**Solution de lavage de l'aiguille (Phase mobile D)** : ACN / H<sub>2</sub>O (90 :10)

- Dans un cylindre gradué de 250 mL, verser 225 mL d'ACN et compléter à 250 mL avec du H<sub>2</sub>O.

**Rear Seal Wash** : MeOH / H<sub>2</sub>O (10 : 90)

- Dans un cylindre gradué de 250 mL, verser 225 mL d' H<sub>2</sub>O et compléter à 250 mL avec du MeOH.

**Lavage de la colonne** : ACN / H<sub>2</sub>O (50 : 50) (donc **100% phase A**) pendant 10 min. Puis, ACN / H<sub>2</sub>O (90 :10) (donc **100% phase D**) pendant 10 min.

**Stockage de la colonne** : ACN/H<sub>2</sub>O (90 :10), donc 100% phase mobile D

**Longueur d'onde** : 280 nm

**10. PRÉPARATION DES SOLUTIONS, CONSERVATION, STABILITÉ****Phase Mobile B : H<sub>2</sub>O + 30 mM d'ammonium formate à pH = 3.0 (ajustement avec acide formique)**

Préparer environ 900 mL H<sub>2</sub>O dans un ballon jaugé de 1 L et ajouter 3 mL d'ammonium formate (NaH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub>, 10 M). Ajuster le pH à 3.0 avec de l'acide formique CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (environ 4 mL) puis compléter au trait de jauge avec H<sub>2</sub>O. Verser la solution dans un duran de 1 L.

La phase mobile B se conserve pendant 1 semaine à température ambiante.

**Phase Mobile C : ACN/H<sub>2</sub>O (85:15) + ammonium formate 10 mM à pH=3.0 (ajustement avec acide formique)**

Dans un cylindre gradué 500 mL, mesurer 300 mL de la phase mobile B. Dans un cylindre gradué de 2000 mL, mesurer 1700 mL d'ACN. Verser les volumes mesurés dans un duran de 2 L.

La phase mobile C se conserve pendant 1 semaine à température ambiante.

**11. DÉGRADATION FORCÉE****PREPARATIONS A FAIRE EN AMONT****Solutions mères de catécholamines :**

- **ADRENALINE 2 mg/mL** : Peser précisément **122.37 mg** d'adrénaline HCl ≥ 98% (soit 100 mg d'adrénaline base) et dissoudre avec une solution de NaCl 0.9% dans un ballon jaugé de 50 mL  
(C<sub>adrénaline base</sub> = **2 mg/mL**).
- **NORADRENALINE 2 mg/mL** : Peser précisément **125.27 mg** de noradrénaline HCl ≥ 97% (soit 100 mg de noradrénaline base) et dissoudre avec une solution de NaCl 0.9% dans un ballon jaugé de 50 mL  
(C<sub>noradrénaline base</sub> = **2 mg/mL**).
- **DOPAMINE 2 mg/mL** : Peser précisément **126.33 mg** de dopamine HCl ≥ 98% (soit 100 mg de dopamine base) et dissoudre avec une solution de **Glc 5%** dans un ballon jaugé de 50 mL  
(C<sub>dopamine base</sub> = **2 mg/mL**).
- **ISOPRENALINE 2 mg/mL** : Peser précisément **119.04 mg** d'isoprénaline HCl ≥ 98.5% (soit 100 mg d'isoprénaline base) et dissoudre avec une solution de NaCl 0.9% dans un ballon jaugé de 50 mL  
(C<sub>isoprénaline base</sub> = **2 mg/mL**).

*Note : La quantité de catécholamines à peser a été définie en tenant compte du sel (ici : hydrochloride) et de la pureté des différents produits.*

**Réactifs :**

Pour avoir du **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 3,5%** : Dans un ballon jaugé de 25 mL, insérer 5 mL d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35 % et compléter à l'eau HPLC (C = 7 %). Puis, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 7 % sera utilisé par la suite pour les solutions témoin et contrôle de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Les solutions d'HCl 0.5 M, HCl 1 M, NaOH 0.5 M, HCl 0.5M sont déjà prêtes.

**Solutions témoins (C<sub>catécholamine</sub> = 1 mg/mL) :**

Puis, **pour chaque catécholamine**, insérer 5 mL de la solution mère dans un ballon jaugé de 10 mL et compléter au trait de jauge avec :

- **ACIDE** : HCl 1 M
- **BASE** : NaOH 1 M
- **H2O2** : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 7%
- **(x2) Température** : Eau qualité HPLC

Ainsi, les concentrations d'HCl et NaOH sont de 0.5 M, et la concentration d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est de 3.5% dans les solutions témoins

**Solutions contrôles :**

2 solutions :

- **E, NE, ISP** : Prélever 5 mL de NaCl 0.9% dans un ballon jaugé puis suivre la même procédure que pour les témoins.
- **DA** : Prélever 5 mL de Glc 5% dans un ballon jaugé puis suivre la même procédure que pour les témoins.

**HYDROLYSE :****ACIDE****Concentration cible d'HCl = 0.5 M.****Témoin acide** : À T0, T1, T2, T4, prélever 100 µL de la solution témoin de catécholamines (dans HCl 0.5 M), ajouter 100 µL de solution NaOH 0.5 M et 800 µL d'ACN. (**C<sub>adrénaline base</sub> = 0.1 mg/mL**)**Contrôle acide** : À T0, T1, T2, T4, prélever 100 µL de la solution contrôle, ajouter 100 µL de solution NaOH 0.5 M et 800 µL d'ACN.**BASE****Concentration cible de NaOH = 0.5 M.****Témoin basique** : À T0, T1, T2, T4, prélever 100 µL de la solution témoin de catécholamine (dans NaOH 0.5 M), ajouter 100 µL de solution HCl 0.5 M et 800 µL d'ACN. (**C<sub>adrénaline base</sub> = 0.1 mg/mL**)**Contrôle basique** : À T0, T1, T3, T6, prélever 100 µL de la solution contrôle, ajouter 100 µL de solution HCl 0.5 M et 800 µL d'ACN.**OXYDATION :****Concentration cible de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 3.5 %****Témoin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%** : À T0, T1, T2, T4, prélever 100 µL de la solution témoin de catécholamine, ajouter 100 µL d'H<sub>2</sub>O UHPLC-MS et ajouter 800 µL d'ACN. (**C<sub>adrénaline base</sub> = 0.1 mg/mL**)**Contrôle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%** : À T0, T1, T2, T4, prélever 100 µL de solution contrôle, ajouter 100 µL d'H<sub>2</sub>O UHPLC-MS et ajouter 800 µL d'ACN.**THERMIQUE :****Température cible = 25 et 60 °C****Témoin 60°C** : À T0, T1, T2, T4, prélever 100 µL de la solution témoin de catécholamine, ajouter 100 µL d'H<sub>2</sub>O UHPLC-MS et ajouter 800 µL d'ACN. (**C<sub>adrénaline base</sub> = 0.1 mg/mL**)**Contrôle 60°C** : À T0, T1, T2, T4, prélever 100 µL de solution contrôle ajouter 100 µL d'H<sub>2</sub>O UHPLC-MS et ajouter 800 µL d'ACN.**Témoin T<sub>amb</sub>** : À T0, T1, T2, T4, prélever 100 µL de la solution témoin à 25 °C, ajouter 100 µL d'H<sub>2</sub>O UHPLC-MS et ajouter 800 µL d'ACN. (**C<sub>adrénaline base</sub> = 0.1 mg/mL**)**Contrôle T<sub>amb</sub>** : À T0, T1, T2, T4, prélever 100 µL de solution contrôle ajouter 100 µL d'H<sub>2</sub>O UHPLC-MS et ajouter 800 µL d'ACN.

- ⇒ **Toutes les solutions témoins (à part test à T<sub>amb</sub>) sont conservées dans des vials de 10 mL, à l'abri de la lumière, à 60°C (étuve). Le témoin T<sub>amb</sub> a été placardé dans un placard à l'abri de la lumière.**  
**Précaution** : Lorsque les solutions sont sorties de l'étuve pour revenir à T<sub>amb</sub> (25 °C), couvrir d'une **feuille d'aluminium** pour les protéger de la lumière.

**12. DÉROULEMENT**

- Equilibrer la colonne pendant au moins 50 minutes (phases mobiles et température de colonne appropriées).
- Les données de la courbe d'étalonnage dans la méthode pour les stds sont exprimées en **µg/mL**.
- La séquence analytique est présentée en annexe 2 dans le rapport Chroméléon.
- Conditionner le système avec des blancs avant de lancer la séquence de validation.

**13. RÉFÉRENCES**

- ICH Topic Q1 A (R2) stability testing of new drugs substances and products. [CPMP/ICH/2736/99](#).
- Site Internet de Pharmaguideline: Forced degradation study in pharmaceutical stability. <https://www.pharmaguideline.com/2014/08/forced-degradation-study-in-pharmaceutical-stability.html>
- Guide méthodologique des études de stabilité des préparations. Partie 1 : préparations liquides. ISBN : 978-2-9526010-6-1.
- Siddiqui MR, Wabaidur SM, Alothman ZA, Rafiquee MZA, Khan MA, Sumbul S, et al. High throughput ultra performance liquid chromatography - Mass spectrometric method for determination of adrenaline and characterization of its stress degradation products : A mechanistic approach. Journal of the Chilean

- Chemical Society. 2018;63(1):3803-10, lien : [https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-97072018000103803&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-97072018000103803&script=sci_arttext)
- Walker SE, Law S, Garland J, Fung E, Iazzetta J. Stability of norepinephrine solutions in normal saline and 5% dextrose in water. The Canadian Journal of Hospital Pharmacy. 2010;63(2):113, lien : <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2858500/>

### Annexe 10 : Chromatogrammes de l'analyse UHPLC-UV des standards des cinq catécholamines par colonne RPLC

Les différents chromatogrammes obtenus par l'analyse individuelle des 5 standards (E, NE, DA, IPN, DOB) ont été superposés dans les représentations suivantes.

La Figure S1 illustre un essai d'optimisation de méthode où la proportion d'eau au début de la méthode a été diminuée. Les dtails de la méthode sont présentées directement sur la figure. Les conditions d'analyse utilisées pour les Figures S2 et S3 sont celles décrites en Annexe 2.A.2.

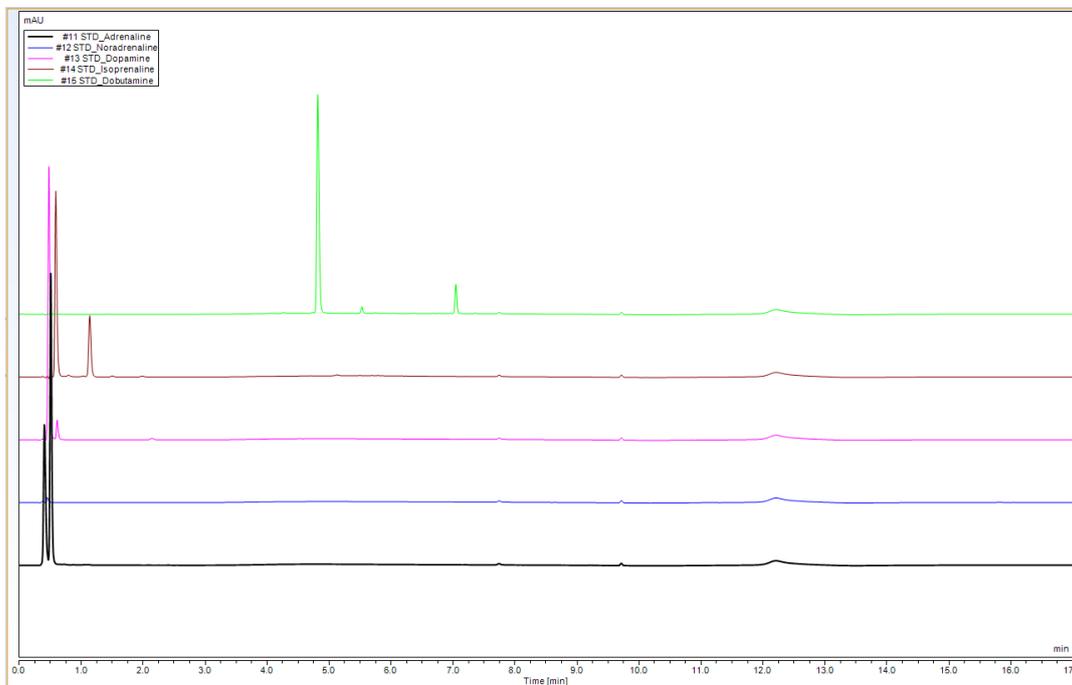


Figure S1 : Superposition des analyses des 5 catécholamines, HSS T3 (C18) 1.8 µm VanGuard™ Fit, 2.1 x 50 mm (Acquity™ Premier, Waters™, Massachusetts, Etats-Unis) – Gradient V1.0

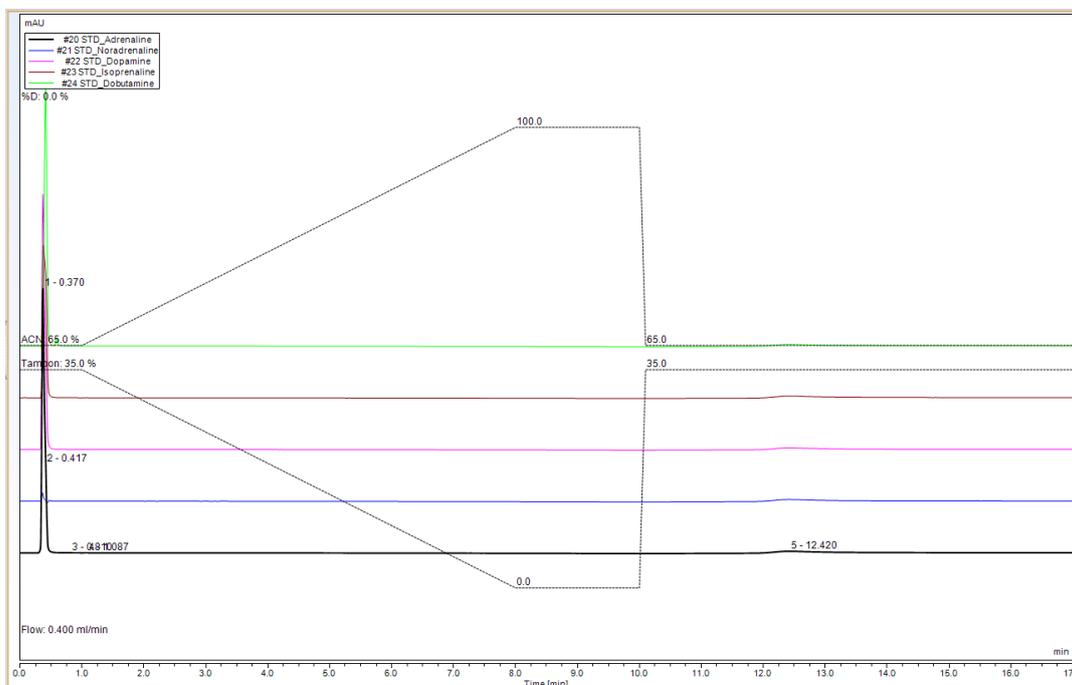


Figure S2 : Superposition des analyses des 5 catécholamines, BEH C8 1.7 µm VanGuard™ Fit, 2.1 x 50 mm (Acquity Premier, Waters™, Massachusetts, Etats-Unis) – Optimisation

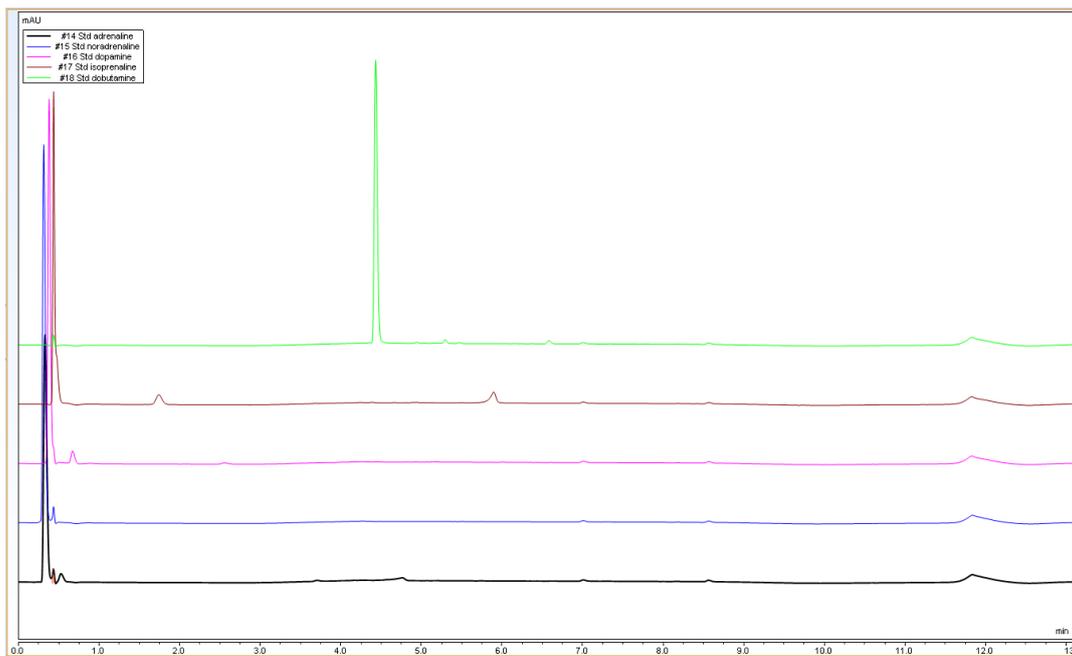
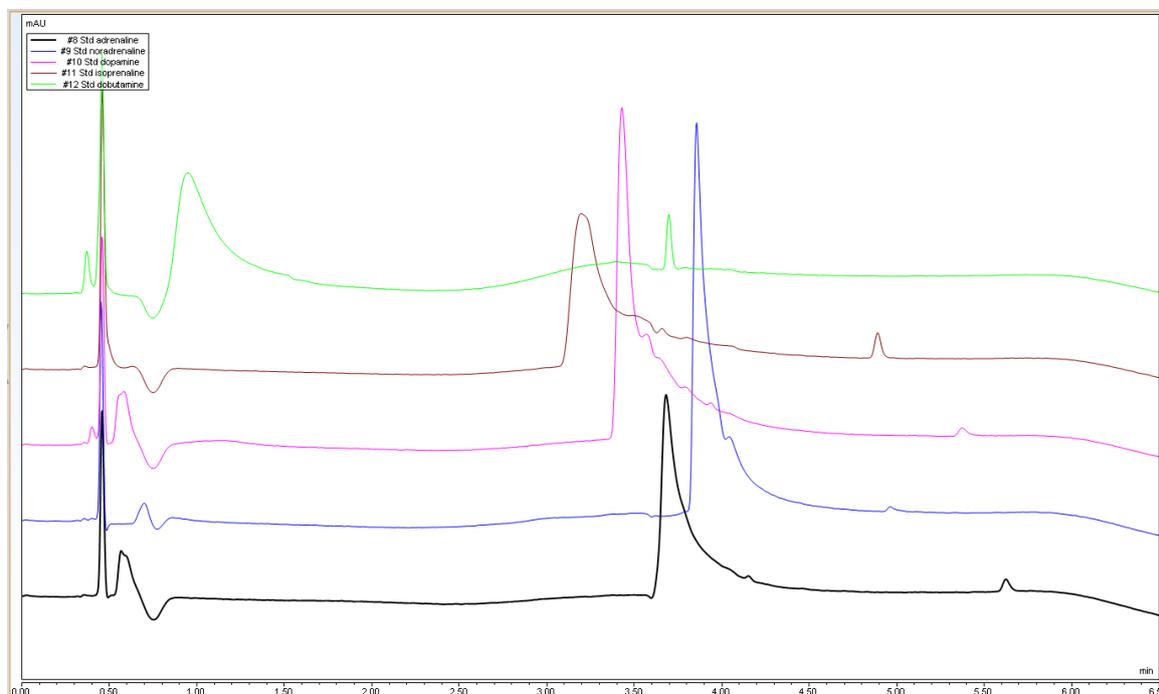


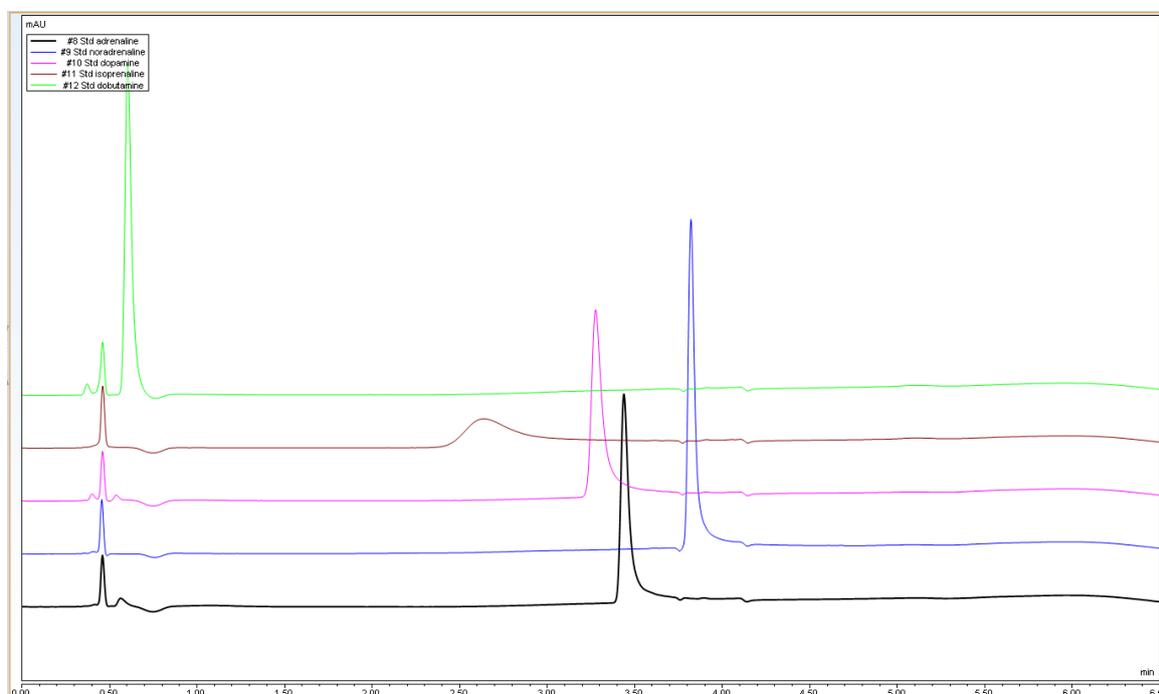
Figure S3 : Superposition des analyses des 5 catécholamines, NUCLEODUR® (Phényl-hexyl), CPS Guard column holder, 2.0 x 50 mm (NUCLEODUR™, Macherey-Nagel, Massachusetts, Etats-Unis) – Gradient V1.0

**Annexe 11 : Chromatogrammes de l'analyse UHPLC-UV des standards des cinq catécholamines par colonne HILIC**

Les différents chromatogrammes obtenus par l'analyse individuelle des 5 standards (E, NE, DA, IPN, DOB) ont été superposés dans les représentations suivantes. Les conditions d'analyse utilisées sont celles décrites en Annexe 2.B.



**Figure S4 : Superposition des analyses des 5 catécholamines, BEH Amide 1.7 µm VanGuard™ Fit, 2.1 x 50 mm (Acquity Premier, Waters™, Massachusetts, Etats-Unis) – Gradient N1.0, pH=9**



**Figure S5 : Superposition des analyses des 5 catécholamines, BEH Amide 1.7 µm VanGuard™ Fit, 2.1 x 50 mm (Acquity Premier, Waters™, Massachusetts, Etats-Unis) – Gradient N1.0, 30 mM AF**

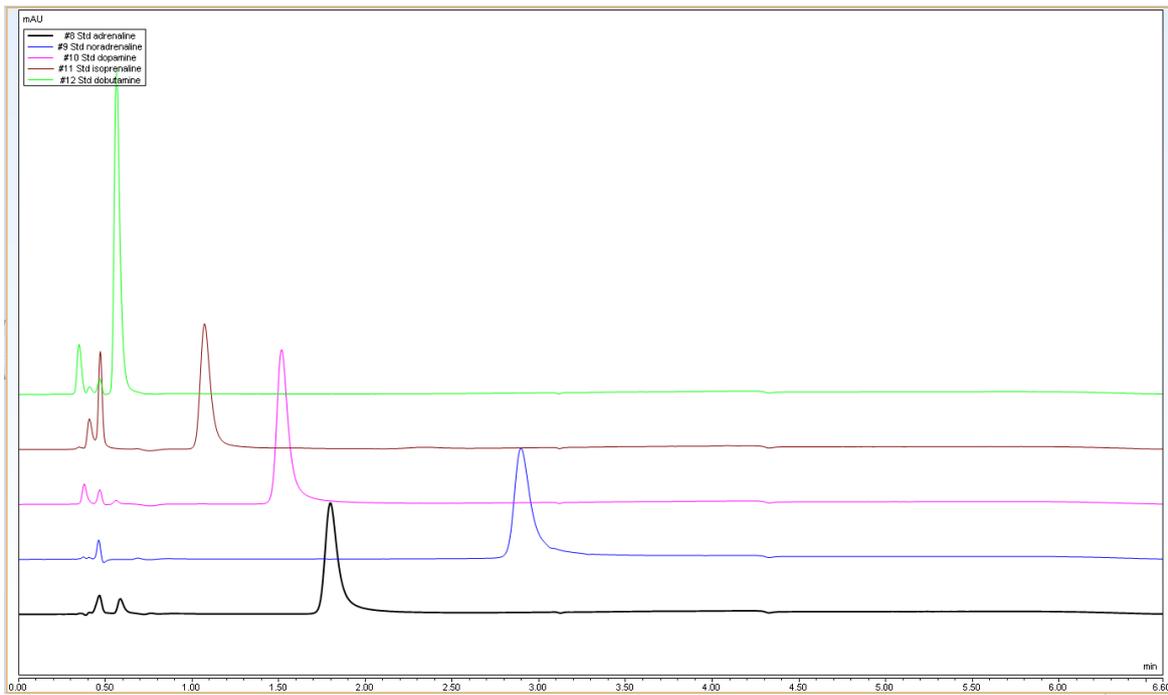


Figure S6 : Superposition des analyses des 5 catécholamines, BEH Amide 1.7 µm VanGuard™ Fit, 2.1 x 50 mm (Acquity Premier, Waters™, Massachusetts, Etats-Unis) – Gradient N1.4

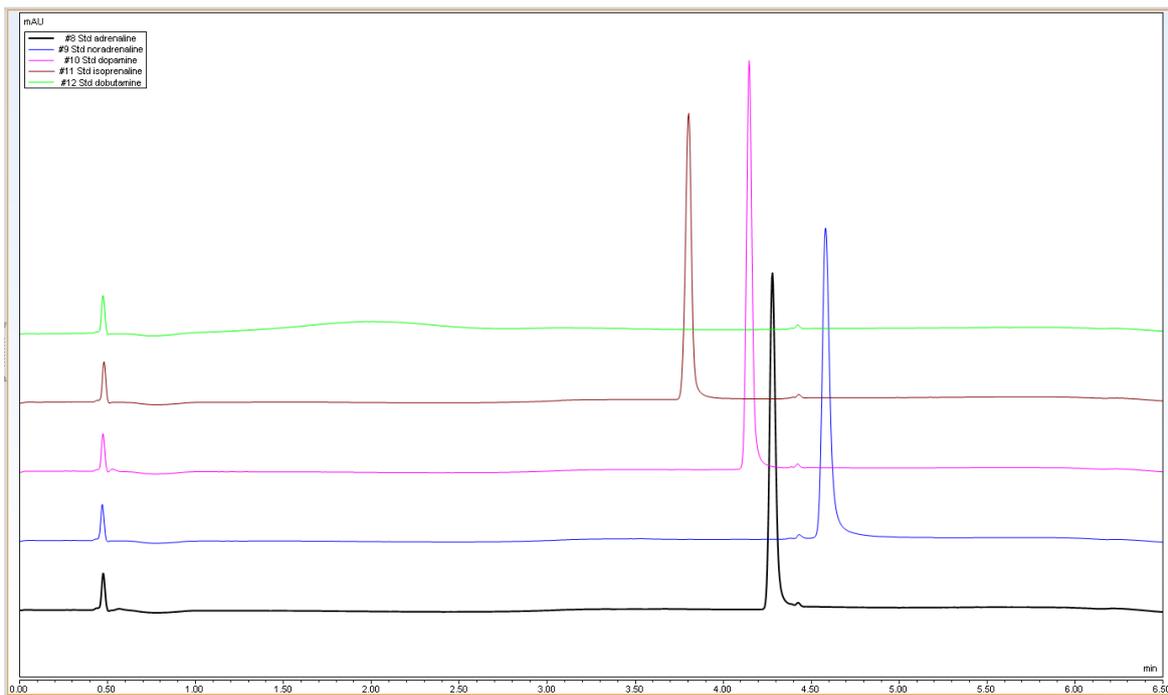
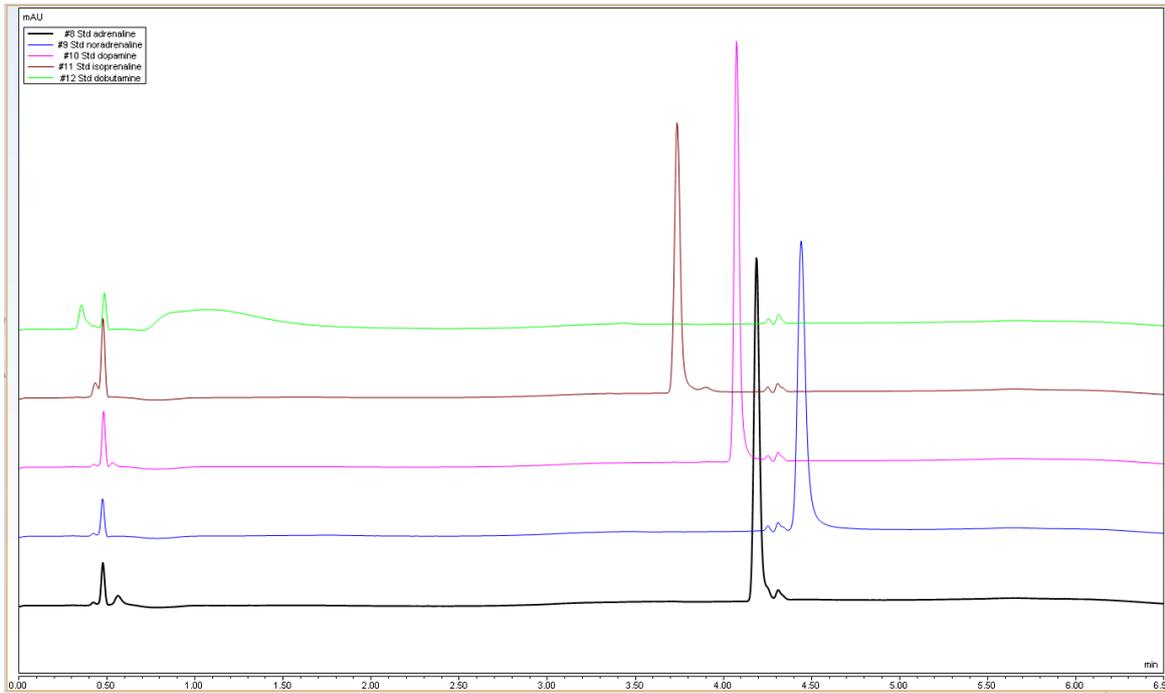
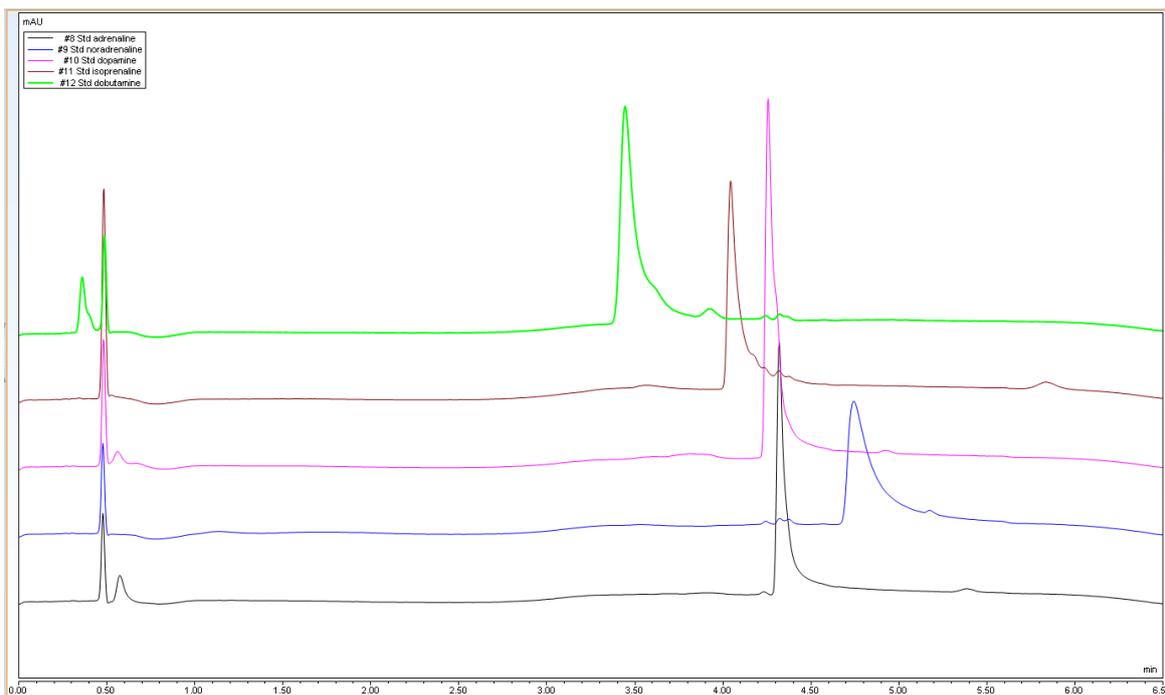


Figure S7 : Superposition des analyses des 5 catécholamines, BEH Z-HILIC 1.7 µm VanGuard™ Fit, 2.1 x 50 mm (Atlantis™ Premier, Waters™, Massachusetts, Etats-Unis) – Gradient N1.0, pH=3.0



**Figure S8 : Superposition des analyses des 5 catécholamines, BEH Z-HILIC 1.7  $\mu$ m VanGuard™ Fit, 2.1 x 50 mm (Atlantis™ Premier, Waters™, Massachusetts, Etats-Unis) – Gradient N1.0, 30 mM AF**



**Figure S9 : Superposition des analyses des 5 catécholamines, BEH Z-HILIC 1.7  $\mu$ m VanGuard™ Fit, 2.1 x 50 mm (Atlantis™ Premier, Waters™, Massachusetts, Etats-Unis) – Gradient N1.0, pH=9.0**

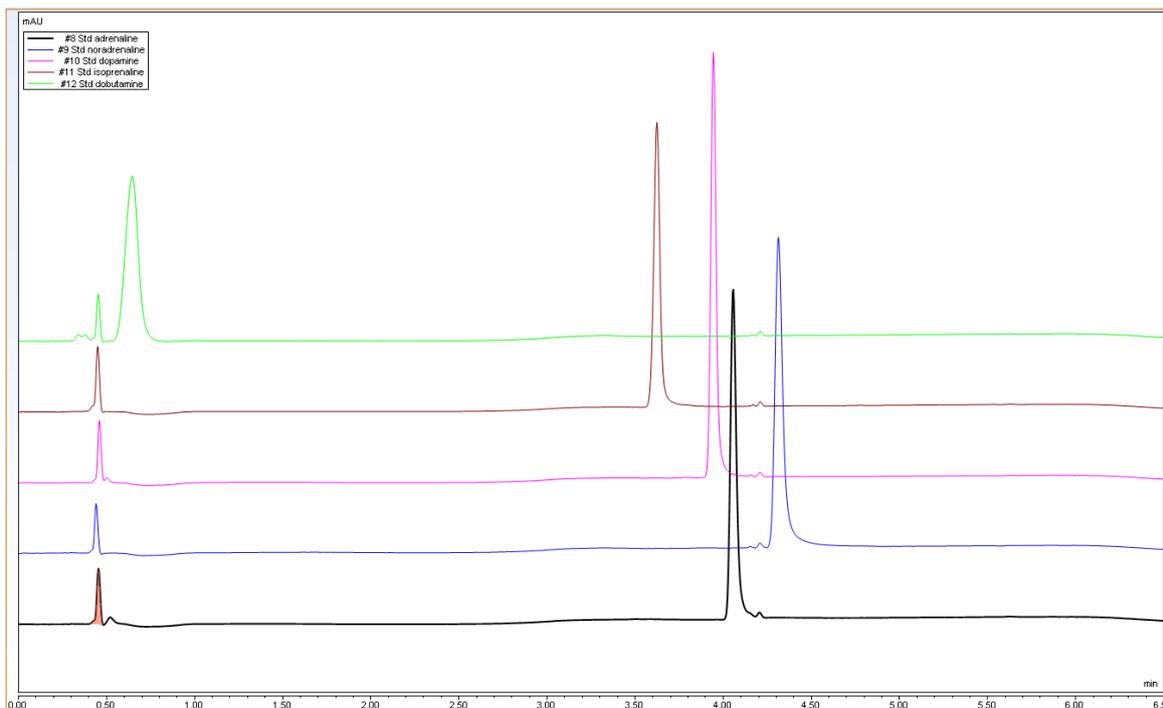


Figure S10 : Superposition des analyses des 5 catécholamines, BEH Z-HILIC 1.7 µm VanGuard™ Fit, 2.1 x 50 mm (Atlantis™ Premier, Waters™, Massachusetts, Etats-Unis) – Gradient N1.6, pH=3.0

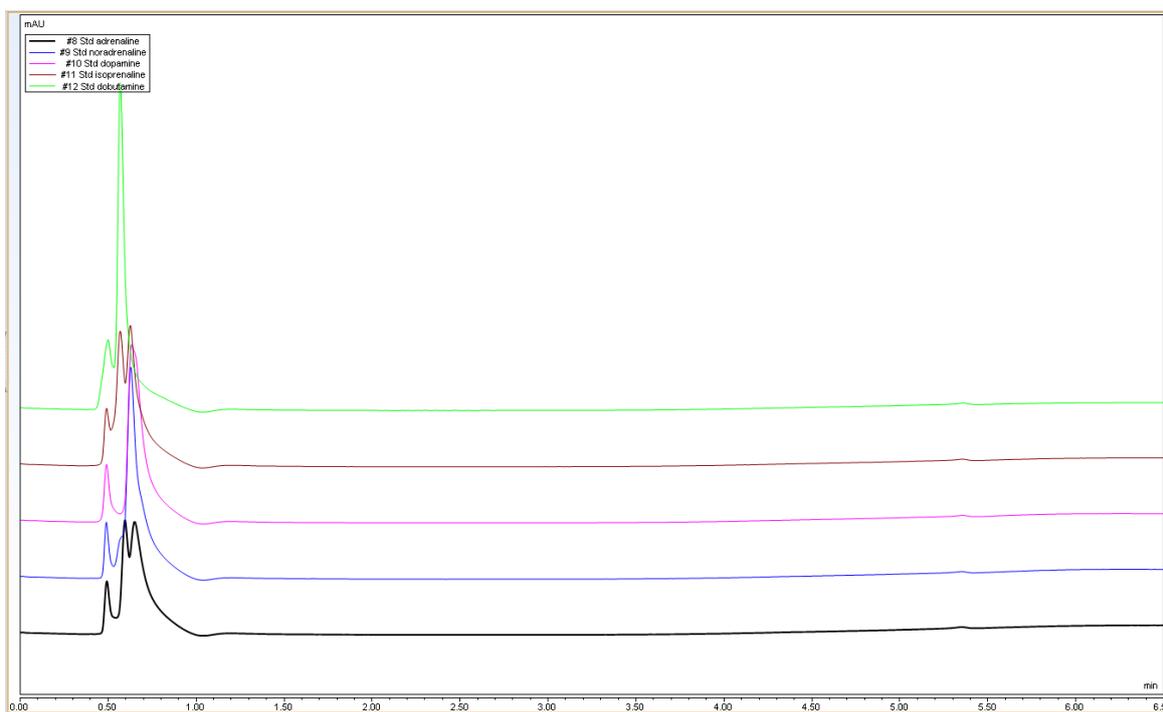
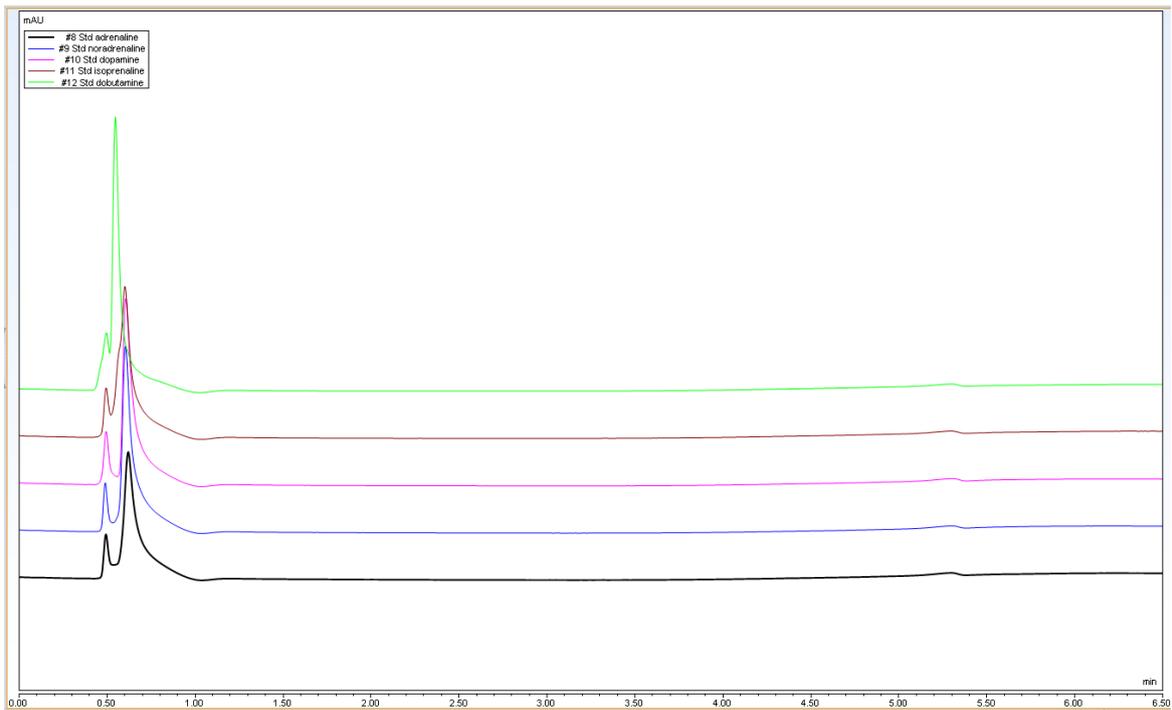
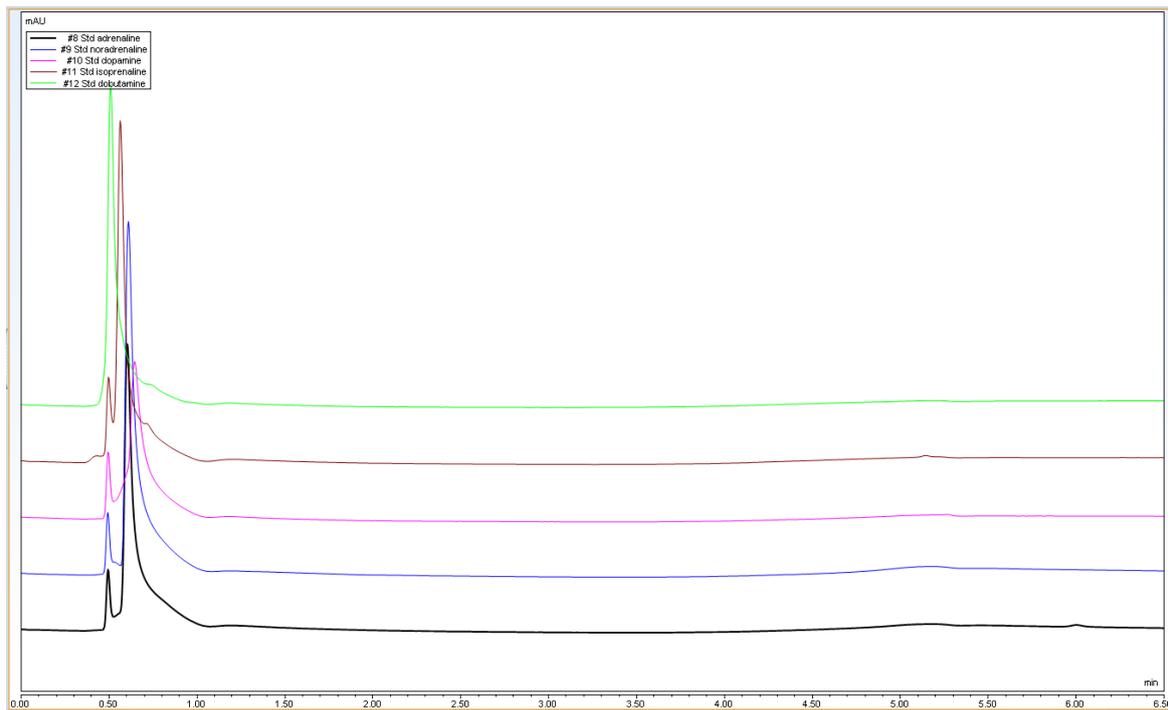


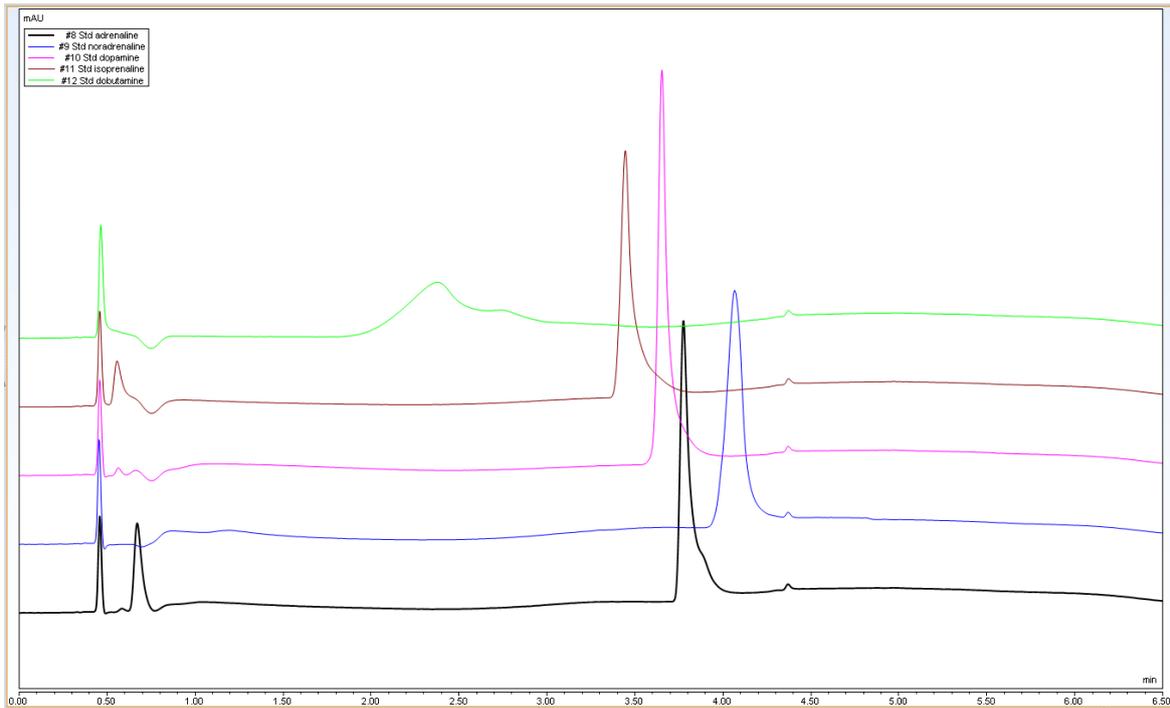
Figure S11 : Superposition des analyses des 5 catécholamines, Core-shell HILIC 1.7 µm, 2.1 x 51 mm (Core-shell, Kinetex™, Waldems, Allemagne) – Gradient N1.0, pH=3.0



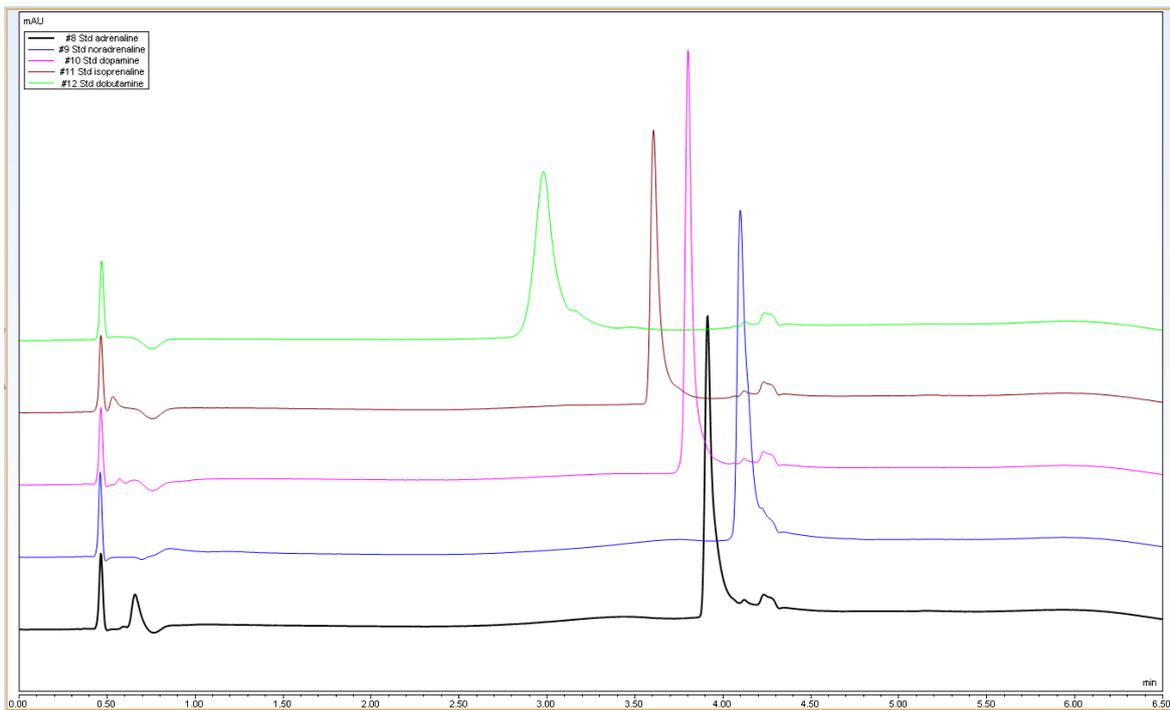
**Figure S12 : Superposition des analyses des 5 catécholamines, Core-shell HILIC 1.7  $\mu$ m, 2.1 x 51 mm (Core-shell, Kinetex™, Waldems, Allemagne) – Gradient N1.0, 30 mM AF**



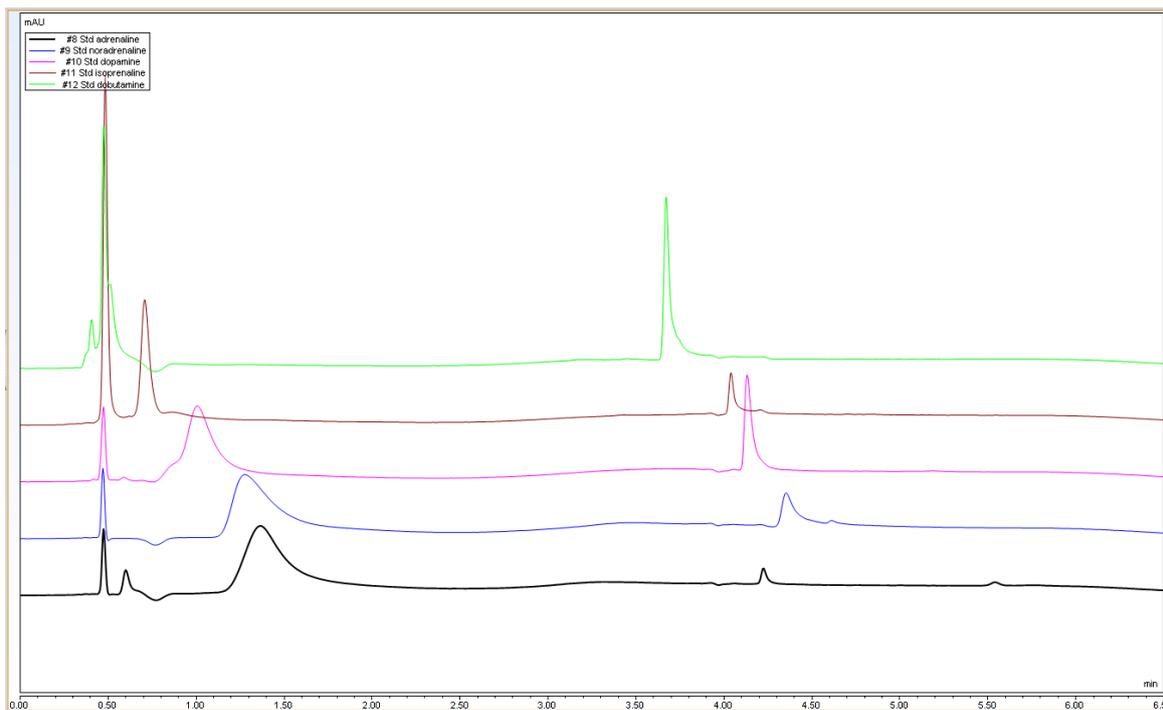
**Figure S13 : Superposition des analyses des 5 catécholamines, Core-shell HILIC 1.7  $\mu$ m, 2.1 x 51 mm (Core-shell, Kinetex™, Waldems, Allemagne) – Gradient N1.0, pH=9.0**



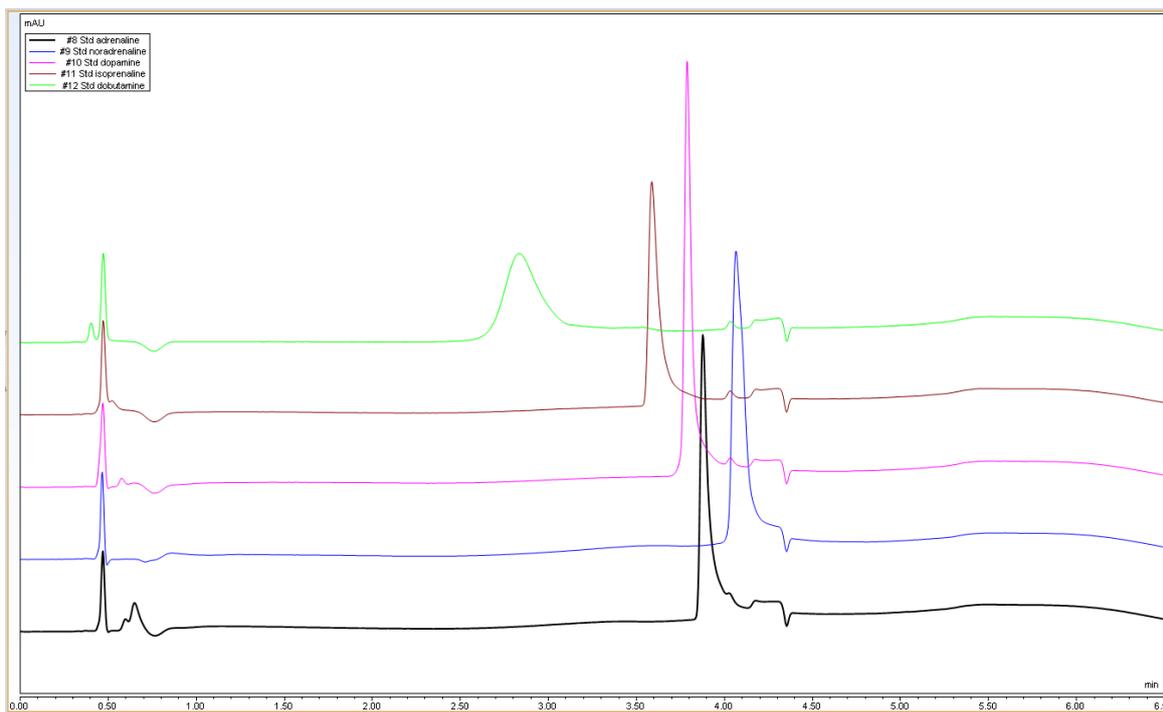
**Figure S14 : Superposition des analyses des 5 catécholamines, NUCLEODUR HILIC 1.8  $\mu$ m, 2.0 x 50 mm (NUCLEODUR, Macherey-Nagel, Hoerd, France) – Gradient N1.0, pH=3.0**



**Figure S15 : Superposition des analyses des 5 catécholamines, NUCLEODUR HILIC 1.8  $\mu$ m, 2.0 x 50 mm (NUCLEODUR, Macherey-Nagel, Hoerd, France) – Gradient N1.0, 30 mM AF**



**Figure S16 : Superposition des analyses des 5 catécholamines, NUCLEODUR HILIC 1.8  $\mu$ m, 2.0 x 50 mm (NUCLEODUR, Macherey-Nagel, Hoerd, France) – Gradient N1.0, pH=9.0**



**Figure S17 : Superposition des analyses des 5 catécholamines, NUCLEODUR HILIC 1.8  $\mu$ m, 2.0 x 50 mm (NUCLEODUR, Macherey-Nagel, Hoerd, France) – Gradient N1.0, 50 mM d'AF**

## Annexe 12 : Données brutes Chroméliéon obtenues durant le test des sept colonnes UHPLC

Colonnes	Phases	Méthodes	Pics UHPLC	tR [min]	Area [mAU* min]	Height [mAU]	Width 50% [min]	Asym. EP	Rs	N
male	BEH Amide (Waters)	N1.0	Injection	0.457	0.281	11.0933	0.02	1.05	n.a.	2311
			Adrénaline	3.527	3.792	61.4700	0.04	2.14	n.a.	35766
			Noradrénaline	3.857	4.715	77.3800	0.05	2.38	n.a.	38709
			Dopamine	3.367	4.569	58.6100	0.05	2.09	n.a.	21747
			Isoprénaline	2.997	3.930	20.9700	0.11	2.97	n.a.	4243
			Dobutamine	0.693	4.055	66.0200	0.05	1.15	n.a.	973
		N1.0	Injection	0.478	0.2944	10.79	0.023	0.87	n.a.	2321
			Adrénaline	3.437	3.9623	56.39	0.047	2.55	n.a.	29825
			Noradrénaline	3.820	4.6964	89.51	0.039	2.01	n.a.	51910
			Dopamine	3.277	4.3905	50.55	0.062	2.38	n.a.	15242
			Isoprénaline	2.637	3.1837	7.47	0.309	2.97	n.a.	403
			Dobutamine	0.603	4.0939	89.28	0.040	1.56	n.a.	1268
	N1.0	Injection	0.460	0.4484	10.39	0.023	0.94	n.a.	2160	
		Adrénaline	3.683	2.2863	12.17	0.107	4.97	n.a.	6600	
		Noradrénaline	3.857	2.9011	23.34	0.076	5.40	n.a.	14099	
		Dopamine	3.430	3.3338	19.85	0.081	5.81	n.a.	9875	
		Isoprénaline	3.197	1.9466	8.61	0.174	2.73	n.a.	1877	
		Dobutamine	0.947	3.2181	8.48	0.266	3.40	n.a.	70	
	N1.4	Injection	0.467	0.2833	4.81	0.029	2.12	n.a.	1482	
		Adrénaline	1.797	3.5815	36.75	0.076	1.82	n.a.	3058	
Noradrénaline		2.897	4.4800	36.20	0.098	1.92	n.a.	4796		
Dopamine		1.517	4.4845	51.05	0.070	1.67	n.a.	2638		
Isoprénaline		1.070	3.0785	41.38	0.062	1.55	n.a.	1636		
Dobutamine		0.563	4.3031	108.07	0.035	1.47	n.a.	1455		
BEH Z-HLIC (Waters)	N1.0	Injection	0.482	0.2602	10.67	0.022	0.77	n.a.	2751	
		Adrénaline	4.280	4.1118	100.97	0.036	1.21	n.a.	78917	
		Noradrénaline	4.583	4.6811	92.42	0.045	1.27	n.a.	58159	
		Dopamine	4.147	4.6013	122.49	0.034	1.17	n.a.	83162	
		Isoprénaline	3.803	3.4290	85.34	0.037	0.99	n.a.	59456	
		Dobutamine	1.973	4.2209	3.46	0.995	1.18	n.a.	22	
	N1.0	Injection	0.481	0.2758	10.81	0.022	0.94	n.a.	2743	
		Adrénaline	4.187	4.0692	103.10	0.034	1.29	n.a.	83038	
		Noradrénaline	4.440	4.8214	86.72	0.048	1.43	n.a.	47667	
		Dopamine	4.073	4.4907	126.17	0.032	1.31	n.a.	91430	
		Isoprénaline	3.737	3.3768	81.22	0.036	1.23	n.a.	59767	
		Dobutamine	1.073	4.1657	6.15	0.635	1.91	n.a.	16	
N1.0	Injection	0.483	0.4482	11.96	0.022	0.56	n.a.	2760		
	Adrénaline	4.320	2.6529	34.14	0.041	4.03	n.a.	60102		
	Noradrénaline	4.743	3.3362	16.71	0.132	5.20	n.a.	7102		
	Dopamine	4.257	3.2593	48.21	0.050	2.84	n.a.	39578		
	Isoprénaline	4.043	2.6104	28.13	0.056	4.78	n.a.	28652		
	Dobutamine	3.443	3.5062	29.34	0.080	3.00	n.a.	10392		

Colonnes phase no				Retention times (min)						n.a.	Area
				Injection	Adrénaline	Noradrénaline	Dopamine	Isoprénaline	Dobutamine		
Core-shell (Phénoménex)	(B) H2O + AF 10 mM + FA, pH3 (C) ACN pur	N1.6	Injection	0.451	0.3307	14.55	0.021	0.86	n.a.	2652	
			Adrénaline	4.057	3.9369	96.79	0.036	1.26	n.a.	70348	
			Noradrénaline	4.313	5.0253	91.20	0.046	1.45	n.a.	48182	
			Dopamine	3.943	4.6053	124.96	0.032	1.21	n.a.	81806	
			Isoprénaline	3.623	3.3318	82.51	0.037	1.04	n.a.	53557	
			Dobutamine	0.647	4.2072	48.65	0.080	1.02	n.a.	359	
Core-shell (Phénoménex)	(B) AF 30 mM + FA, pH3 (C) ACN pur	N1.6	Injection	0.462	0.3015	14.21	0.020	1.10	n.a.	2866	
			Adrénaline	3.987	3.9945	103.55	0.034	1.32	n.a.	75001	
			Noradrénaline	4.193	5.1808	101.96	0.042	1.44	n.a.	55455	
			Dopamine	3.887	4.5410	135.85	0.030	1.23	n.a.	94034	
			Isoprénaline	3.570	3.2439	81.55	0.036	1.11	n.a.	54728	
			Dobutamine	0.600	4.1986	62.53	0.061	1.17	n.a.	531	
Core-shell (Phénoménex)	(B) H2O + AF 10 mM + FA, pH3 (C) ACN pur	N1.0	Injection	0.493	1.3657	23.80	0.021	10.70	n.a.	3066	
			Adrénaline	0.597	5.8482	36.88	0.134	4.81	n.a.	110	
			Noradrénaline	0.630	6.9723	68.03	0.059	1.95	n.a.	635	
			Dopamine	0.633	6.3714	56.83	0.085	3.49	n.a.	309	
			Isoprénaline	0.627	6.6339	45.14	0.120	1.24	n.a.	152	
			Dobutamine	0.570	6.7472	105.95	0.040	1.67	n.a.	1149	
Core-shell (Phénoménex)	(B) H2O + AF 30 mM + FA, pH3 (C) ACN pur	N1.0	Injection	0.4920	1.46	26.793	0.021	10.35	n.a.	2986	
			Adrénaline	0.6200	5.89	55.930	0.066	2.80	n.a.	495	
			Noradrénaline	0.6030	7.19	81.780	0.052	2.68	n.a.	743	
			Dopamine	0.6070	6.98	82.220	0.055	3.64	n.a.	669	
			Isoprénaline	0.6000	7.04	66.690	0.074	1.70	n.a.	368	
			Dobutamine	0.5470	7.47	120.840	0.039	1.81	n.a.	1102	
Core-shell (Phénoménex)	(B) H2O + AF 10 mM pH9 (C) ACN pur	N1.0	Injection	0.4957	1.09	20.610	0.021	10.25	n.a.	3070	
			Adrénaline	0.6030	7.31	91.400	0.045	4.50	n.a.	991	
			Noradrénaline	0.6100	9.34	113.720	0.050	4.20	n.a.	837	
			Dopamine	0.6470	6.17	50.500	0.071	1.88	n.a.	464	
			Isoprénaline	0.5630	7.74	108.790	0.042	2.20	n.a.	996	
			Dobutamine	0.5070	7.26	102.930	0.041	3.18	n.a.	826	
NUCLEODUR HILIC (M. N.)	(B) H2O + AF 10 mM + FA, pH3 (C) ACN pur	N1.0	Injection	0.4580	0.40	11.697	0.022	1.10	n.a.	2410	
			Adrénaline	0.3777	2.71	36.910	0.051	2.61	n.a.	30930	
			Noradrénaline	4.0670	3.58	31.030	0.096	1.19	n.a.	9876	
			Dopamine	3.6530	3.61	51.950	0.049	2.01	n.a.	30679	
			Isoprénaline	3.4470	2.88	32.440	0.059	2.31	n.a.	18756	
			Dobutamine	2.3770	3.71	6.810	0.373	1.70	n.a.	225	
NUCLEODUR HILIC (M. N.)	(B) H2O + AF 30 mM + FA, pH3 (C) ACN pur	N1.0	Injection	0.4343	0.18	4.850	0.023	0.58	n.a.	1949	
			Adrénaline	3.9130	2.59	48.290	0.039	2.27	n.a.	56496	
			Noradrénaline	4.0970	3.64	52.350	0.057	2.83	n.a.	28170	
			Dopamine	3.8000	3.28	67.480	0.038	1.88	n.a.	54720	
			Isoprénaline	3.6070	2.23	43.280	0.044	1.62	n.a.	37503	
			Dobutamine	2.9800	2.79	24.380	0.103	1.10	n.a.	4672	
NUCLEODUR HILIC (M. N.)	(B) H2O + AF 10 mM pH9 (C) ACN pur	N1.0	Injection	0.4830	0.79	13.910	0.023	1.41	n.a.	2378	
			Adrénaline	4.2230	0.11	3.150	0.031	1.51	n.a.	104534	
			Noradrénaline	4.3530	0.77	6.910	0.075	3.67	n.a.	18581	
			Dopamine	4.1330	1.08	19.590	0.044	2.24	n.a.	49701	
			Isoprénaline	4.0400	0.21	7.510	0.026	1.29	n.a.	129333	
			Dobutamine	3.6700	1.65	33.440	0.033	2.88	n.a.	69453	

Colonnes phase inverse	Colonne	Composition	V1.0	Injection		Adrénaline		Noradrénaline		Dopamine		Isoprénaline		Dobutamine			
				0.423	1.76	25.510	0.051	1.77	n.a.	382	0.407	5.59	151.860	0.032	1.41	n.a.	918
NUCLEODUR Phényl-hexyl (M.N.)	BEH C8 (Waters)	(B) H2O + FA 0.1% (C) ACN + FA 0.1%	V1.0	0.400	0.09	2.210	0.034	1.67	n.a.	766	0.433	6.08	169.980	0.032	1.53	n.a.	1037
				0.507	4.62	153.540	0.027	1.40	n.a.	1937	3.607	5.53	24.170	0.235	2.71	n.a.	1307
				0.423	1.80	25.620	0.051	1.77	n.a.	380	0.407	5.61	152.010	0.032	1.41	n.a.	917
				0.400	0.09	2.210	0.034	1.65	n.a.	766	0.433	6.08	169.980	0.032	1.53	n.a.	1037
				0.507	4.62	153.540	0.027	1.40	n.a.	1937	3.607	5.65	24.310	0.237	2.75	n.a.	1280
				0.434	0.18	4.850	0.023	0.58	n.a.	1949	0.430	6.35	118.840	0.037	2.17	n.a.	767
	HSS T3 (Waters)	(B) H2O + AF 10mM + FA (C) ACN/H2O (90:10) + AF 10mM + FA	V1.0	0.413	0.13	1.750	0.049	2.09	n.a.	399	0.477	6.47	160.950	0.033	1.28	n.a.	1132
				0.560	4.67	125.830	0.032	1.46	n.a.	1694	4.397	5.61	87.910	0.060	1.45	n.a.	29528
				0.353	0.77	6.910	0.075	3.67	n.a.	18581	0.273	4.30	126.330	0.031	1.25	n.a.	425
				0.280	5.05	188.910	0.024	1.03	n.a.	745	0.293	4.86	150.170	0.030	1.22	n.a.	537
				0.337	3.74	122.640	0.028	1.21	n.a.	792	3.820	4.46	70.360	0.059	1.32	n.a.	23033
				0.434	0.18	4.850	0.023	0.58	n.a.	1949	0.330	4.06	87.700	0.044	1.30	n.a.	312
BEH C8 (Waters)	(B) H2O + AF 10mM + FA (C) ACN/H2O (90:10) + AF 10mM + FA	V1.0	0.313	5.06	134.160	0.035	1.32	n.a.	449	0.380	4.66	128.880	0.034	1.27	n.a.	702	
			0.437	3.35	108.620	0.024	2.07	n.a.	1843	4.440	4.38	99.320	0.041	1.14	n.a.	64122	
															min	0.020	0.560
															MAX	0.995	10.700

## Annexe 13 : Développement du score pour analyser la performance des sept colonnes UHPLC

Légende : Cases vertes si &gt; 0.800, cases jaunes si &gt; 0.700 mais &lt; 0.800

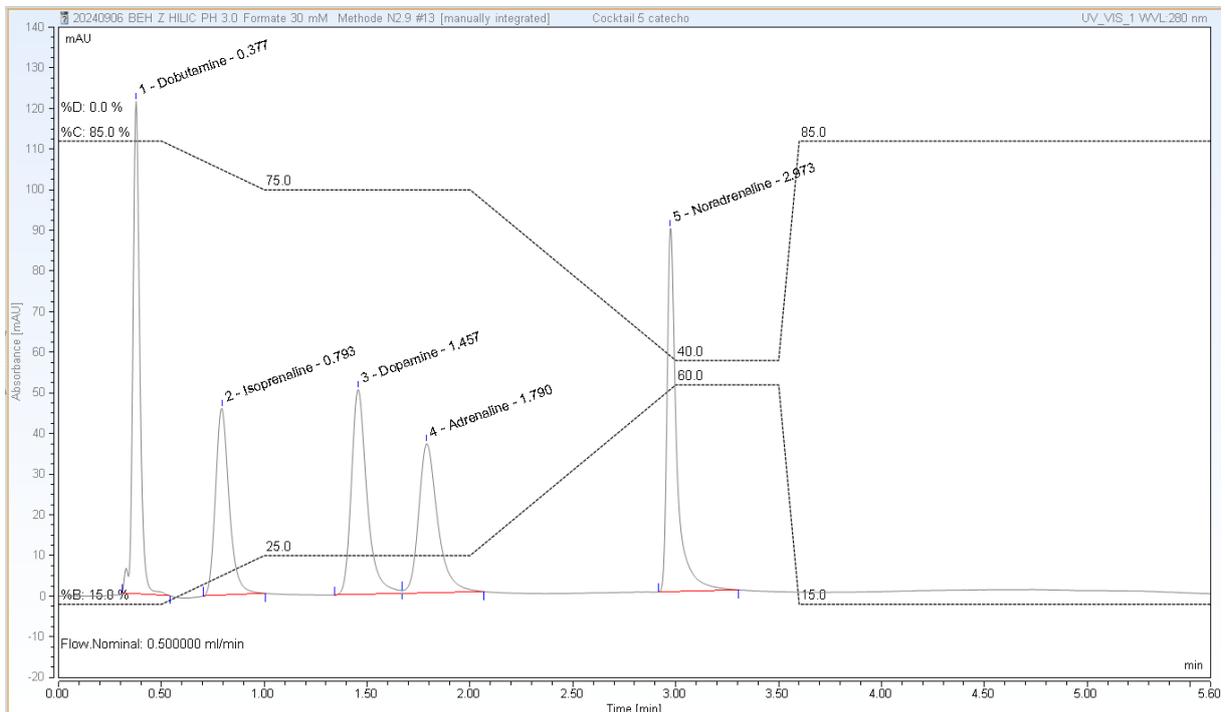
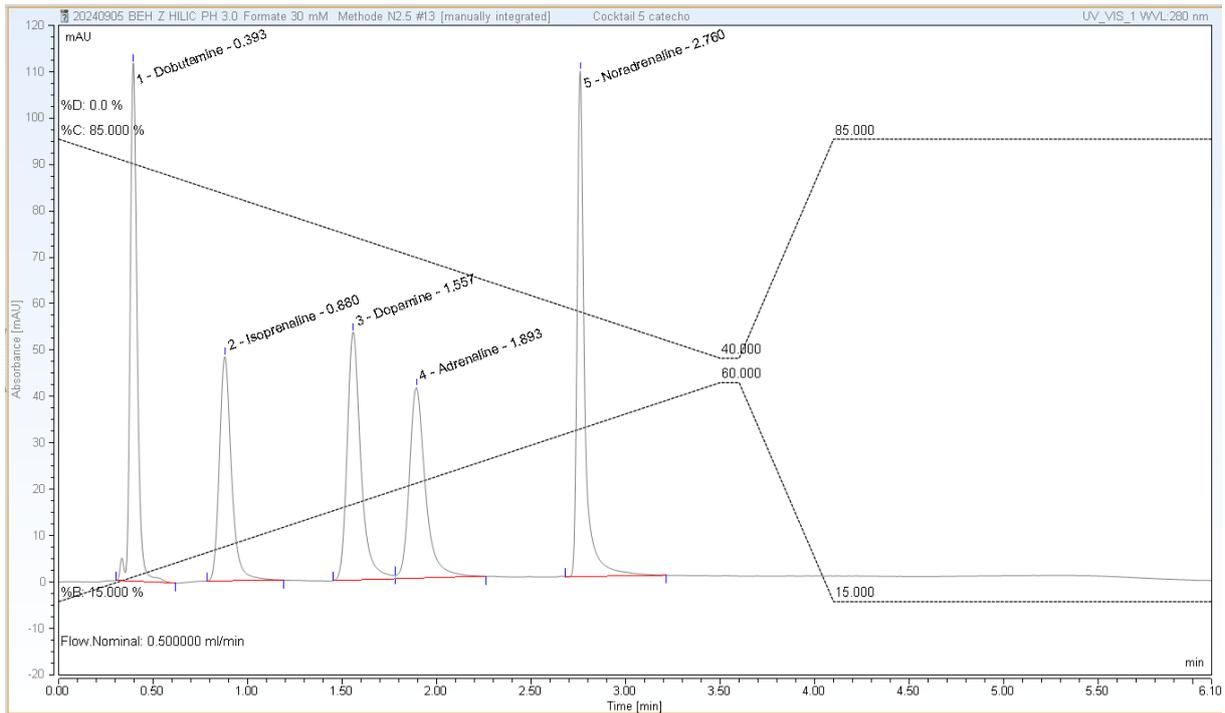
Colonnes	Phases	Méthodes	Pics UHPLC	Temps de rétention			Hauteur des pics			Asymétrie [EP]	Largeur à mi-hauteur [min]	SCORE
				kapp	Lkapp	Skapp	Pics	Intensité max [mAU]	I/10			
BEH Amide (Waters)	(B) H2O + AF 10 mM + FA, pH3 (C) ACN pur	N1.0	Injection									
			Adrénaline	6.718	0.887	0.875	E	152.0100	0.404	0.844	0.975	0.779
			Noradrénaline	7.440	0.926	0.908	NE	188.9100	0.410	0.821	0.973	0.791
			Dopamine	6.368	0.867	0.858	DA	169.9800	0.345	0.849	0.965	0.750
			Isoprénaline	5.558	0.817	0.815	IPN	153.5400	0.137	0.762	0.910	0.610
			Dobutamine	0.516	0.181	0.275	DOB	120.8400	0.546	0.942	0.967	0.466
	(B) H2O + AF 30 mM + FA, pH3 (C) ACN pur	N1.0	Injection									
			Adrénaline	6.195	0.857	0.849			0.371	0.804	0.972	0.750
			Noradrénaline	6.997	0.903	0.888			0.474	0.857	0.981	0.808
			Dopamine	5.860	0.836	0.832			0.297	0.821	0.957	0.716
			Isoprénaline	4.521	0.742	0.752			0.049	0.762	0.704	0.472
			Dobutamine	0.262	0.101	0.207			0.739	0.901	0.979	0.424
	(B) H2O + AF 10 mM pH9 (C) ACN pur	N1.0	Injection									
			Adrénaline	7.015	0.904	0.889			0.080	0.565	0.911	0.554
			Noradrénaline	7.394	0.924	0.906			0.124	0.523	0.943	0.597
			Dopamine	6.465	0.873	0.863			0.117	0.482	0.937	0.569
			Isoprénaline	5.958	0.842	0.837			0.056	0.786	0.842	0.528
			Dobutamine	1.061	0.314	0.388			0.070	0.720	0.748	0.361
	(B) H2O + AF 10 mM + FA, pH3 (C) ACN/H2O (90:10) +AF 10mM	N1.4	Injection									
			Adrénaline	2.848	0.585	0.618			0.242	0.876	0.943	0.601
Noradrénaline			5.203	0.793	0.795			0.192	0.866	0.920	0.652	
Dopamine			2.248	0.512	0.556			0.300	0.891	0.949	0.593	
Isoprénaline			1.291	0.360	0.427			0.270	0.902	0.957	0.512	
Dobutamine			0.206	0.081	0.190			0.894	0.910	0.985	0.420	
(B) H2O + AF 10 mM + FA, pH3 (C) ACN pur	N1.0	Injection										
		Adrénaline	7.874	0.948	0.927			0.664	0.936	0.984	0.887	
		Noradrénaline	8.502	0.978	0.952			0.489	0.930	0.974	0.852	
		Dopamine	7.598	0.934	0.915			0.721	0.940	0.986	0.894	
		Isoprénaline	6.885	0.897	0.883			0.556	0.958	0.983	0.844	
		Dobutamine	3.091	0.612	0.641			0.029	0.939	0.000	0.000	

Colonne phase normale				Injection								
Colonne phase normale	BEH Z-HILIC (Waters)	(B) H2O + AF30 mM + FA, pH3 (C) ACN pur	N1.0	Injection								
				Adrénaline	7.705	0.940	0.920	0.678	0.928	0.986	0.886	
				Noradrénaline	8.231	0.965	0.941	0.459	0.914	0.971	0.835	
				Dopamine	7.468	0.928	0.909	0.742	0.926	0.988	0.894	
				Isoprénaline	6.769	0.890	0.878	0.529	0.934	0.984	0.831	
		Dobutamine	1.231	0.348	0.417	0.051	0.867	0.369	0.325			
		(B) H2O + AF 10 mM pH9 (C) ACN pur	N1.0	Injection								
				Adrénaline	7.944	0.952	0.930	0.225	0.658	0.978	0.699	
	Noradrénaline			8.820	0.992	0.964	0.088	0.542	0.885	0.580		
	Dopamine			7.814	0.945	0.924	0.284	0.775	0.969	0.743		
	Isoprénaline			7.371	0.923	0.905	0.183	0.584	0.963	0.651		
	Dobutamine	6.128	0.853	0.846	0.243	0.759	0.938	0.687				
	(B) H2O + AF 10 mM + FA, pH3 (C) ACN pur	N1.6	Injection									
			Adrénaline	7.989	0.954	0.932	0.637	0.931	0.984	0.882		
			Noradrénaline	8.556	0.980	0.954	0.483	0.912	0.973	0.848		
			Dopamine	7.736	0.941	0.921	0.735	0.936	0.988	0.900		
Isoprénaline			7.027	0.905	0.890	0.537	0.953	0.983	0.841			
Dobutamine	0.434	0.156	0.254	0.403	0.955	0.938	0.425					
(B) H2O + AF30 mM + FA, pH3 (C) ACN pur	N1.6	Injection										
		Adrénaline	7.624	0.936	0.916	0.681	0.925	0.986	0.884			
		Noradrénaline	8.069	0.958	0.935	0.540	0.913	0.977	0.856			
		Dopamine	7.407	0.925	0.907	0.799	0.934	0.990	0.905			
		Isoprénaline	6.722	0.888	0.875	0.531	0.946	0.984	0.832			
Dobutamine	0.298	0.113	0.217	0.517	0.940	0.958	0.410					
Core-shell (Phénoménex)	(B) H2O + AF 10 mM + FA, pH3 (C) ACN pur	N1.0	Injection									
			Adrénaline	0.211	0.083	0.192	0.243	0.581	0.883	0.309		
			Noradrénaline	0.278	0.106	0.211	0.360	0.863	0.960	0.376		
			Dopamine	0.284	0.109	0.213	0.334	0.711	0.933	0.359		
			Isoprénaline	0.272	0.104	0.210	0.294	0.933	0.897	0.363		
	Dobutamine	0.156	0.063	0.174	0.877	0.891	0.979	0.399				
	(B) H2O + AF30 mM + FA, pH3 (C) ACN pur	N1.0	Injection									
			Adrénaline	0.260	0.100	0.206	0.368	0.779	0.953	0.366		
			Noradrénaline	0.226	0.088	0.196	0.433	0.791	0.967	0.368		
			Dopamine	0.234	0.091	0.198	0.484	0.696	0.964	0.369		
			Isoprénaline	0.220	0.086	0.194	0.434	0.888	0.945	0.372		
	Dobutamine	0.112	0.046	0.160	1.000	0.877	0.981	0.390				
(B) H2O + AF 10 mM pH9 (C) ACN pur	N1.0	Injection										
		Adrénaline	0.217	0.085	0.193	0.601	0.611	0.974	0.370			
		Noradrénaline	0.231	0.090	0.198	0.602	0.641	0.969	0.377			
		Dopamine	0.305	0.116	0.219	0.297	0.870	0.948	0.370			
		Isoprénaline	0.136	0.055	0.168	0.709	0.838	0.977	0.374			
Dobutamine	0.023	0.010	0.129	0.852	0.742	0.978	0.332					

Colonne phase inverse	NUCLEODUR HILIC (M.N.)	(B) H2O + AF 10 mM + FA, pH3 (C) ACN pur	N1.0	Injection											
				Adrénaline	-0.175	-0.084	0.050		0.243	0.798	0.968	0.169			
				Noradrénaline	7.880	0.948	0.927		0.164	0.938	0.922	0.695			
				Dopamine	6.976	0.902	0.887		0.306	0.857	0.970	0.750			
				Isoprénaline	6.526	0.877	0.866		0.211	0.827	0.960	0.691			
		Dobutamine	4.190	0.715	0.729		0.056	0.888	0.638	0.481					
		(B) H2O + AF 30 mM + FA, pH3 (C) ACN pur	N1.0	Injection											
				Adrénaline	8.009	0.955	0.932		0.318	0.831	0.981	0.771			
				Noradrénaline	8.433	0.975	0.949		0.277	0.776	0.962	0.749			
	Dopamine			7.749	0.942	0.922		0.397	0.870	0.982	0.802				
	Isoprénaline			7.305	0.919	0.902		0.284	0.882	0.975	0.751				
	Dobutamine	5.861	0.836	0.832		0.214	0.901	0.910	0.682						
	(B) H2O + AF 10 mM pH9 (C) ACN pur	N1.0	Injection												
			Adrénaline	7.743	0.942	0.921		0.021	0.906	0.989	0.494				
			Noradrénaline	8.012	0.955	0.932		0.037	0.693	0.944	0.518				
Dopamine			7.557	0.932	0.913		0.115	0.834	0.975	0.644					
Isoprénaline			7.364	0.922	0.905		0.049	0.928	0.994	0.568					
Dobutamine	6.598	0.881	0.869		0.277	0.771	0.987	0.719							
Colonne phase normale	BEH C8 (Waters)	(B) H2O + FA 0.1% (C) ACN + FA 0.1%	V1.0	Injection											
				Adrénaline	-0.038	-0.017	0.107		0.999	0.916	0.988	0.321			
				Noradrénaline	-0.054	-0.024	0.100		0.012	0.891	0.986	0.148			
				Dopamine	0.024	0.010	0.130		1.000	0.904	0.988	0.353			
				Isoprénaline	0.199	0.079	0.188		1.000	0.917	0.993	0.427			
	Dobutamine	7.527	0.931	0.912		0.200	0.788	0.779	0.673						
	HSS T3 (Waters)	(B) H2O + AF 10mM + FA (C) ACN/H2O (90:10) + AF 10mM + FA	V1.0	Injection											
				Adrénaline	-0.038	-0.017	0.107		1.000	0.916	0.988	0.321			
				Noradrénaline	-0.054	-0.024	0.100		0.012	0.893	0.986	0.148			
				Dopamine	0.024	0.010	0.130		1.000	0.904	0.988	0.353			
				Isoprénaline	0.199	0.079	0.188		1.000	0.917	0.993	0.427			
	Dobutamine	7.527	0.931	0.912		0.201	0.784	0.777	0.673						
	ényl-hexyl (M.N.)	(B) H2O + FA 0.1% (C) ACN + FA 0.1%	V1.0	Injection											
				Adrénaline	-0.010	-0.004	0.117		0.782	0.841	0.983	0.318			
				Noradrénaline	-0.049	-0.022	0.102		0.009	0.849	0.970	0.142			
Dopamine				0.098	0.041	0.156		0.947	0.929	0.987	0.385				
Isoprénaline				0.289	0.110	0.215		0.820	0.911	0.988	0.440				
Dobutamine	9.124	1.005	0.975		0.727	0.912	0.959	0.916							
ényl-hexyl (M.N.)	(B) H2O + FA 0.1% (C) ACN + FA 0.1%	V1.0	Injection												
			Adrénaline	-0.227	-0.112	0.026		0.831	0.932	0.989	0.154				
			Noradrénaline	-0.207	-0.101	0.035		1.000	0.954	0.996	0.187				
			Dopamine	-0.170	-0.081	0.052		0.883	0.935	0.990	0.221				
			Isoprénaline	-0.045	-0.020	0.104		0.799	0.936	0.992	0.307				
Dobutamine	9.822	1.034	1.000		0.582	0.925	0.960	0.896							

NUCLEODUR Phé	(B) H <sub>2</sub> O + AF 10mM + FA (C) ACN/H <sub>2</sub> O (90:10) + AF 10mM + FA	V1.0	Injection									
			Adrénaline	-0.240	-0.119	0.020			0.577	0.927	0.975	0.125
			Noradrénaline	-0.279	-0.142	0.000			0.710	0.925	0.985	0.000
			Dopamine	-0.125	-0.058	0.072			0.758	0.930	0.986	0.252
			Isoprénaline	0.006	0.003	0.123			0.707	0.851	0.996	0.322
			Dobutamine	9.223	1.010	0.979			0.822	0.943	0.978	0.945
			<b>min</b>	-0.279	-0.142	0.000	<b>min</b>	0.009	0.482	0.000	0.000	
			<b>MAX</b>	9.822	1.034	1.000	<b>MAX</b>	1.000	0.958	0.996	0.945	

**Annexe 14 : Chromatogrammes obtenus durant la phase d'optimisation de la méthode analytique**



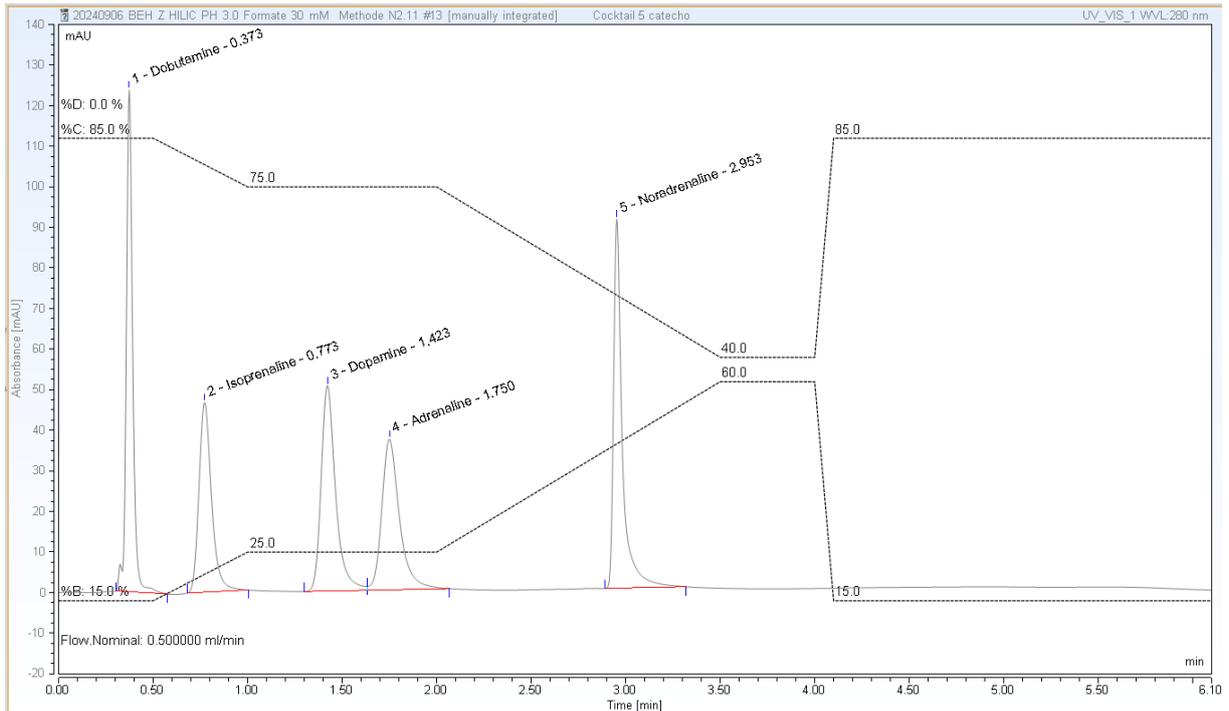


Figure S20 : Chromatogramme de l'analyse du mélange des 5 catécholamines, méthode gradient N2.11

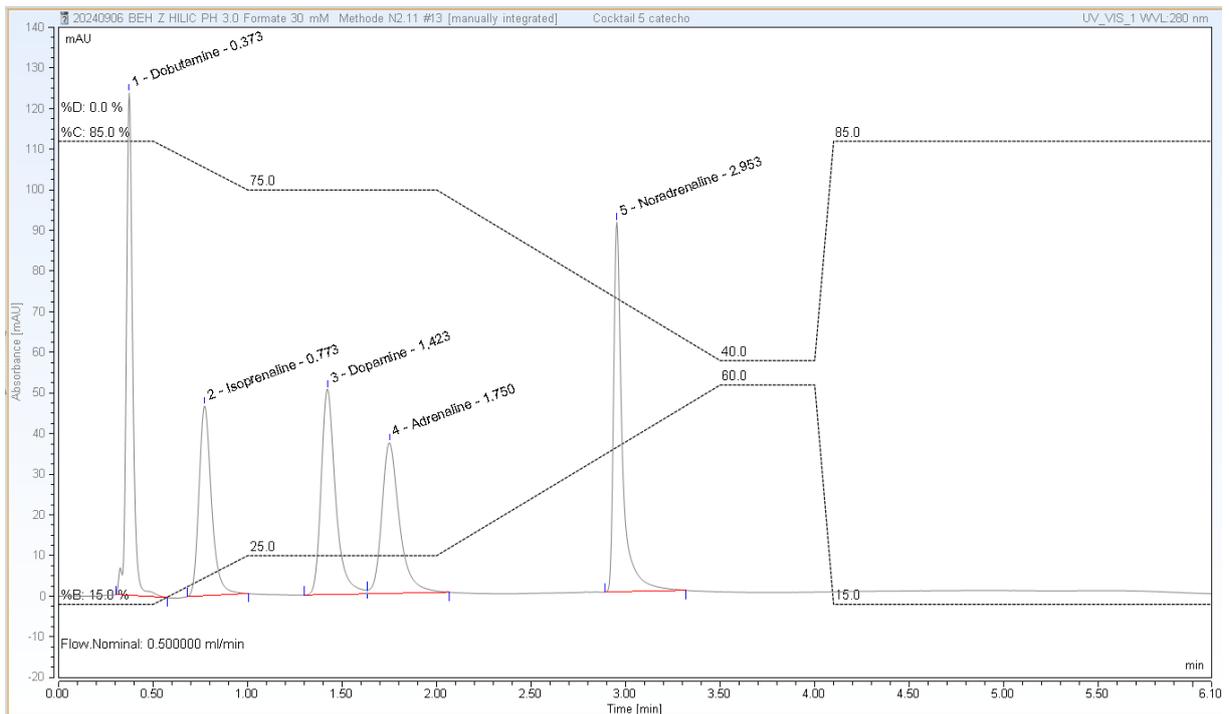
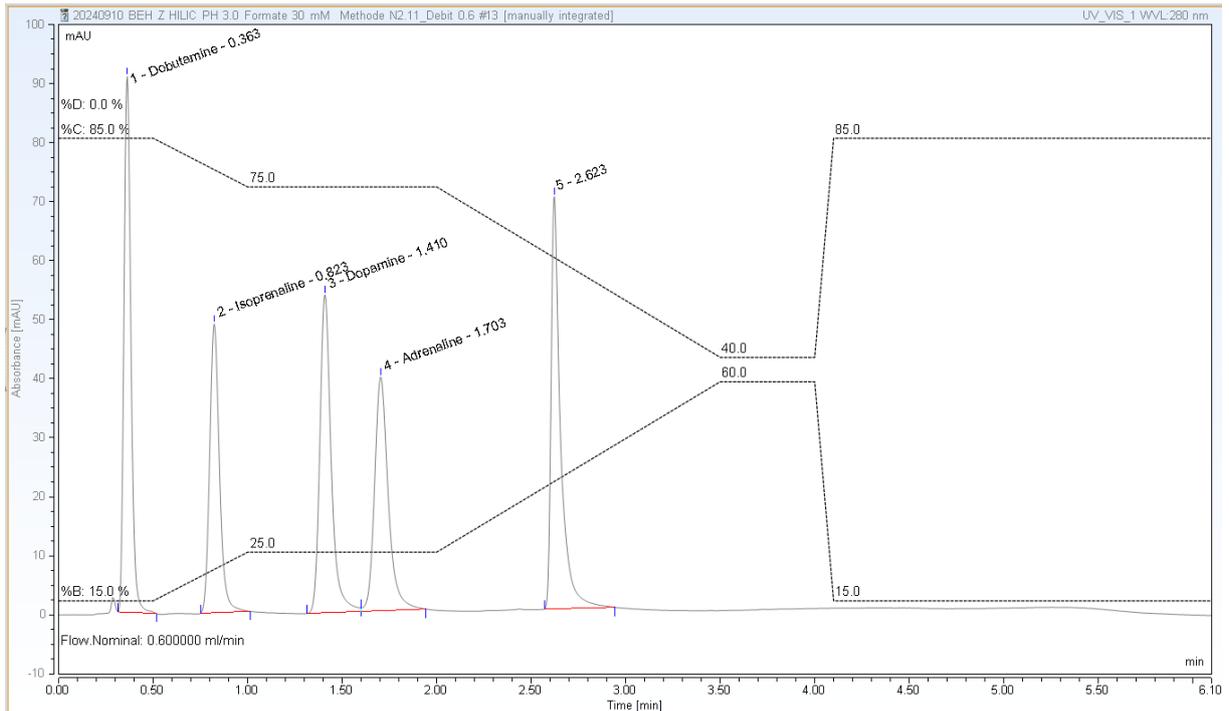
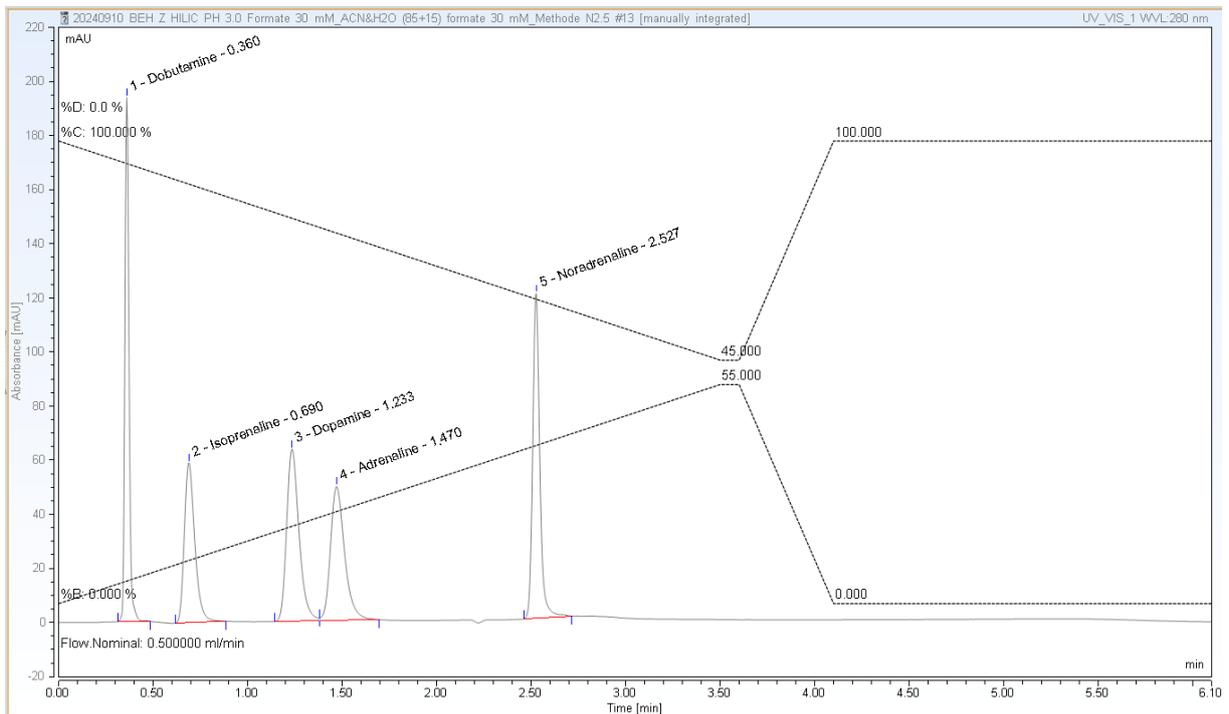


Figure S21 : Chromatogramme de l'analyse du mélange des 5 catécholamines, méthode N2.11, gradient, pH=3.0, (B) H<sub>2</sub>O + AF 30 mM et (C) ACN



**Figure S22 : Chromatogramme de l'analyse du mélange des 5 catécholamines, méthode N2.11, gradient, pH=3.0, (B) H<sub>2</sub>O + AF 30 mM et (C) ACN, débit 0.6 mL/min**



**Figure S23 : Chromatogramme de l'analyse du mélange des 5 catécholamines, méthode N2.5, gradient, pH=3.0, (B) H<sub>2</sub>O + AF 30 mM et (C) ACN/H<sub>2</sub>O (85 :15) + AF 30 mM**

**Annexe 15 : Données brutes Chroméléon obtenues durant la phase d'optimisation de la méthode analytique**

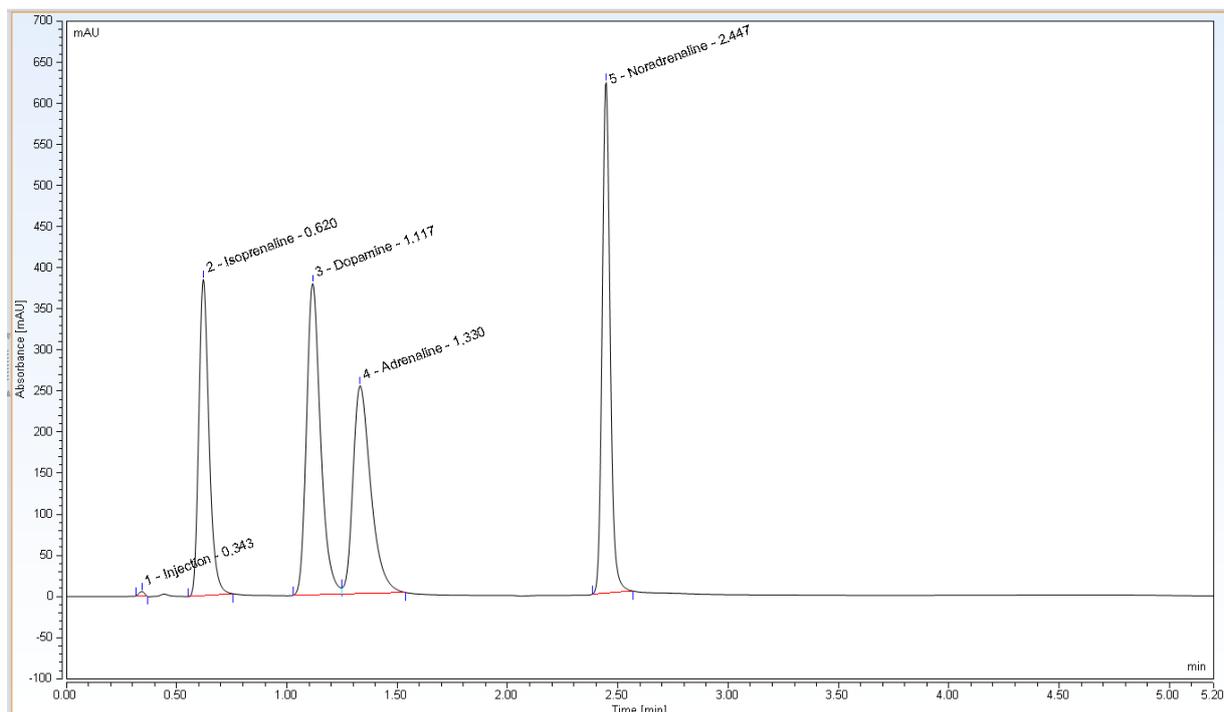
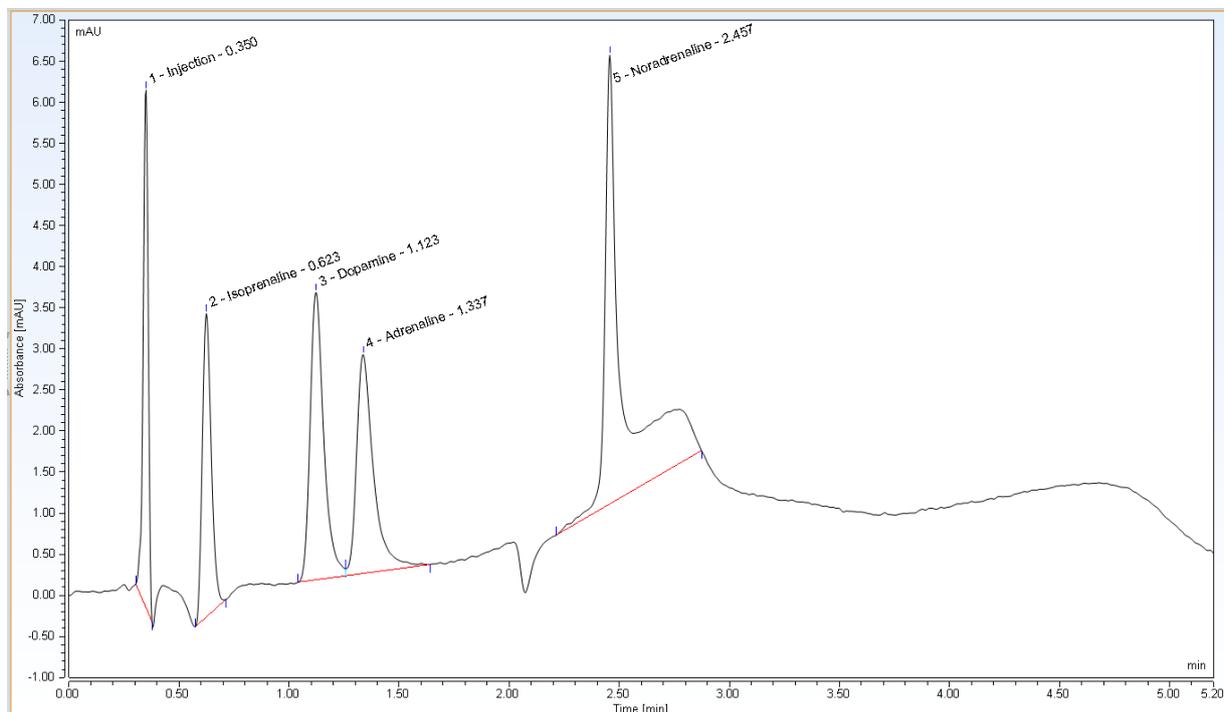
Légende :

- **Asymétrie** : Cases vertes si  $\leq 1.5$ , cases rouges si  $> 1.5$
- **Rs** : Cases vertes si  $\geq 1.5$ , cases rouges si  $< 1.5$
- **N** : Cases rouges si  $< 5'000$

Colonnes	Phases	Méthodes	Pics UHPLC	tR [min]	Area [mAU*min]	Height [mAU]	Width 50% [min]	Asym. EP	Rs	N	Sélectivité	
											k	$\alpha$
	(B) H2O + AF 30 mM + FA, pH3 (C) ACN pur	N2.3 (isocratique)	Injection	0.400	0.06	1.740	0.027	2.46	n.a.	1220		
			Dobutamine	0.527	4.38	105.280	0.038	1.09	6.45	1073	0.318	-
			Isoprénaline	1.160	3.33	54.310	0.053	1.18	7.29	2608	1.900	5.984
			Dopamine	1.930	4.35	56.530	0.063	1.39	3.16	5121	3.825	2.013
			Adrénaline	2.323	3.68	38.010	0.077	1.53	5.64	4982	4.808	1.257
			Noradrénaline	3.923	4.58	16.200	0.243	2.14	n.a.	1439	8.808	1.832
	(B) H2O + AF 30 mM + FA, pH3 (C) ACN pur	N2.4	Injection	0.373	0.08	3.580	0.022	1.18	n.a.	1630		
			Dobutamine	0.450	4.40	122.110	0.033	1.11	6.27	1032	0.206	-
			Isoprénaline	0.990	3.37	52.970	0.054	1.25	6.39	1833	1.654	8.013
			Dopamine	1.687	4.32	55.150	0.063	1.47	2.76	3911	3.523	2.130
			Adrénaline	2.050	3.65	37.830	0.079	1.49	10.14	3743	4.496	1.276
			Noradrénaline	3.090	4.89	85.530	0.040	2.17	n.a.	32426	7.284	1.620
	(B) H2O + AF 30 mM + FA, pH3 (C) ACN pur	N2.5	Injection	0.357	0.11	4.270	0.022	0.81	n.a.	1424		
			Dobutamine	0.407	4.33	131.900	0.030	1.15	5.58	1006	0.140	-
			Isoprénaline	0.880	3.35	48.610	0.059	1.25	5.79	1247	1.465	10.460
			Dopamine	1.557	4.30	52.880	0.067	1.45	2.52	3004	3.361	2.294
			Adrénaline	1.897	3.79	38.390	0.079	1.57	8.45	3179	4.314	1.283
			Noradrénaline	2.760	5.02	101.760	0.037	1.75	n.a.	31301	6.731	1.560
	(B) H2O + AF 30 mM + FA, pH3 (C) ACN pur	N2.6	Injection	0.390	0.22	9.340	0.022	0.91	n.a.	1760		
			Dobutamine	0.463	4.34	110.980	0.035	1.18	6.27	945	0.187	-
Isoprénaline			1.797	3.00	17.880	0.144	1.34	6.39	868	3.608	19.274	
Dopamine			3.127	4.58	91.560	0.039	1.47	2.76	35515	7.018	1.945	
Adrénaline			3.273	3.99	90.730	0.034	1.55	10.14	51412	7.392	1.053	
Noradrénaline			3.623	4.87	124.750	0.032	1.33	n.a.	68926	8.290	1.121	
(B) H2O + AF 30 mM + FA, pH3 (C) ACN pur	N2.7	Injection	0.343	0.18	6.300	0.023	0.84	n.a.	1195			
		Dobutamine	0.390	4.01	135.460	0.028	1.18	1.09	1032	0.108	-	
		Isoprénaline	0.767	3.50	46.430	0.063	1.33	7.57	826	1.236	11.459	
		Dopamine	1.423	4.16	50.440	0.070	1.45	7.84	2286	3.149	2.547	
		Adrénaline	1.747	3.50	34.470	0.087	1.50	2.33	2257	4.093	1.300	
		Noradrénaline	2.957	4.91	86.260	0.042	2.04	6.09	27379	7.621	1.862	

Colonne phase normale - BEH Z-HILIC (Waters)	Essais d'optimisation	(B) H2O + AF 30 mM + FA, pH3 (C) ACN pur	N2.8	Injection	0.343	0.17	5.830	0.024	0.85	n.a.	1180		
				Dobutamine	0.383	4.41	140.800	0.028	1.10	4.48	1003	0.117	-
				Isoprénaline	0.787	3.25	45.320	0.063	1.28	5.22	875	1.294	11.100
				Dopamine	1.437	4.33	50.970	0.070	1.48	2.26	2318	3.190	2.464
				Adrénaline	1.767	3.66	34.470	0.087	1.54	10.61	2277	4.152	1.302
				Noradrénaline	2.973	4.75	82.670	0.044	2.05	n.a.	25700	7.668	1.847
				Dobutamine	0.387	4.43	137.910	0.029	1.04	4.77	1005	0.128	-
				Isoprénaline	0.797	3.16	44.050	0.063	1.29	5.38	898	1.324	10.318
				Dopamine	1.460	4.23	49.720	0.071	1.47	2.32	2355	3.257	2.460
				Adrénaline	1.800	3.54	33.630	0.087	1.55	10.34	2354	4.248	1.304
Noradrénaline	2.980	4.80	84.620	0.043	2.05	n.a.	27144	7.688	1.810				
Dobutamine	0.383	4.39	138.960	0.028	1.03	4.50	1007	0.126	-				
Isoprénaline	0.780	3.16	43.740	0.063	1.32	5.26	848	1.294	10.233				
Dopamine	1.427	4.23	49.360	0.071	1.49	2.26	2235	3.197	2.470				
Adrénaline	1.773	3.51	33.540	0.087	1.53	10.22	2284	4.215	1.318				
Noradrénaline	2.897	4.80	100.270	0.037	1.92	n.a.	34053	7.521	1.784				
Dobutamine	0.387	4.42	136.970	0.029	1.02	4.62	995	0.128	-				
Isoprénaline	0.783	3.14	44.170	0.062	1.25	5.28	880	1.283	10.000				
Dopamine	1.440	4.23	50.040	0.070	1.46	2.26	2336	3.198	2.493				
Adrénaline	1.760	3.57	34.020	0.087	1.52	10.52	2281	4.131	1.292				
Noradrénaline	2.960	4.79	85.430	0.042	2.08	n.a.	27480	7.630	1.847				
Dobutamine	0.393	4.40	134.960	0.029	1.11	4.98	996	0.133	-				
Isoprénaline	0.820	3.08	44.280	0.061	1.25	5.55	993	1.363	10.283				
Dopamine	1.477	4.16	50.650	0.069	1.40	2.41	2536	3.256	2.389				
Adrénaline	1.817	3.51	35.430	0.083	1.55	10.75	2648	4.236	1.301				
Noradrénaline	2.987	4.67	86.710	0.041	1.91	n.a.	29231	7.608	1.796				
Dobutamine	0.383	4.60	143.760	0.029	1.09	4.51	990	0.126	-				
Isoprénaline	0.773	3.59	51.020	0.062	1.22	5.26	869	1.274	10.070				
Dopamine	1.427	4.30	52.430	0.070	1.38	2.25	2272	3.197	2.510				
Adrénaline	1.747	3.50	34.980	0.088	1.41	10.43	2205	4.138	1.294				
Noradrénaline	2.960	4.64	83.960	0.043	2.01	n.a.	25760	7.706	1.862				
Dobutamine	0.390	4.57	141.530	0.029	1.03	4.75	1001	0.137	-				
Isoprénaline	0.797	3.60	49.910	0.062	1.30	5.37	903	1.324	9.660				
Dopamine	1.453	4.48	53.470	0.070	1.44	2.31	2383	3.236	2.445				
Adrénaline	1.793	3.84	36.320	0.086	1.55	9.36	2382	4.227	1.306				
Noradrénaline	3.323	4.26	33.280	0.103	2.00	n.a.	5741	8.688	2.055				
Dobutamine	0.380	3.71	112.880	0.030	1.08	5.85	865	0.214	-				
Isoprénaline	0.830	2.89	51.790	0.049	1.24	6.06	1581	1.652	7.716				
Dopamine	1.417	3.65	54.150	0.057	1.36	2.59	3468	3.527	2.135				
Adrénaline	1.713	3.08	36.830	0.070	1.41	9.13	3299	4.473	1.268				
Noradrénaline	2.627	3.95	64.800	0.048	2.12	n.a.	16915	7.393	1.653				

(B) H20 + AF 30 mM + FA, pH3 (C) ACN pur	N2.3 (isocratique) Débit 0.6 mL/min	Injection	0.333	0.04	1.370	0.025	1.75	n.a.	987		
		Dobutamine	0.443	3.76	99.930	0.034	1.12	6.12	924	0.330	-
		Isoprénaline	0.967	2.88	53.030	0.048	1.22	6.89	2273	1.904	5.764
		Dopamine	1.610	3.67	55.300	0.056	1.32	2.93	4588	3.835	2.014
		Adrénaline	1.933	3.12	36.690	0.069	1.51	5.75	4384	4.805	1.253
		Noradrénaline	3.300	3.80	17.150	0.192	1.57	n.a.	1639	8.910	1.854
(B) H20 + AF 30 mM + FA, pH3 (C) ACN/H2O + AF 30 mM + FA, pH3	N2.3 (isocratique)	Injection	0.377	0.15	3.840	0.029	2.27	n.a.	924		
		Dobutamine	0.410	4.87	115.520	0.039	1.12	6.95	608	0.088	-
		Isoprénaline	0.867	3.67	72.810	0.046	1.22	6.24	1994	1.300	14.848
		Dopamine	1.490	4.74	77.590	0.054	1.26	2.4	4179	2.952	2.271
		Adrénaline	1.767	4.07	56.180	0.064	1.26	10.06	4184	3.687	1.249
		Noradrénaline	3.070	4.90	53.550	0.080	1.30	n.a.	8077	7.143	1.937
(B) H20 + AF 30 mM + FA, pH3 (C) ACN/H2O + AF 30 mM + FA, pH3	N2.5	Injection	0.363	0.15	5.800	0.026	1.09	n.a.	1063		
		Dobutamine	0.380	4.83	189.040	0.024	1.12	4.84	1441	0.047	-
		Isoprénaline	0.700	3.72	65.690	0.050	1.28	5.08	1070	0.928	19.824
		Dopamine	1.247	4.73	71.610	0.058	1.34	1.92	2555	2.435	2.623
		Adrénaline	1.477	4.14	55.920	0.064	1.39	10.81	2941	3.069	1.260
		Noradrénaline	2.530	5.15	117.360	0.038	1.18	n.a.	24002	5.970	1.945
(B) H20 + AF 30 mM + FA, pH3 (C) ACN/H2O + AF 30 mM + FA, pH3	N2.11	Injection	0.350	0.18	6.710	0.024	0.81	n.a.	1154		
		Dobutamine	0.363	4.66	195.980	0.023	1.08	4.34	1439	0.037	-
		Isoprénaline	0.627	3.62	70.210	0.046	1.33	4.86	1049	0.791	21.308
		Dopamine	1.130	4.61	66.500	0.061	1.38	1.56	1911	2.229	2.816
		Adrénaline	1.357	4.10	47.970	0.072	1.57	11.41	1946	2.877	1.291
		Noradrénaline	2.693	5.20	90.710	0.049	1.29	n.a.	17040	6.694	2.327
(B) H20 + AF 30 mM + FA, pH3 (C) ACN/H2O + AF 30 mM + FA, pH3	N2.13	Injection	0.350	0.18	6.660	0.024	0.81	n.a.	1160		
		Dobutamine	0.363	4.71	197.370	0.023	1.08	4.29	1434	0.037	-
		Isoprénaline	0.623	3.59	71.780	0.045	1.29	4.85	1067	0.780	21.000
		Dopamine	1.123	4.70	67.490	0.061	1.33	1.54	1885	2.209	2.832
		Adrénaline	1.337	4.12	48.190	0.074	1.55	11.3	1830	2.820	1.277
		Noradrénaline	2.687	5.10	90.450	0.049	1.28	n.a.	16718	6.677	2.368
(B) H20 + AF 30 mM + FA, pH3 (C) ACN/H2O + AF 30 mM + FA, pH3	N2.3.1	Injection	0.353	0.16	6.330	0.024	1.03	n.a.	1204		
		Dobutamine	0.367	4.73	192.490	0.023	1.15	4.45	1416	0.040	-
		Isoprénaline	0.643	3.57	67.480	0.047	1.35	4.91	1028	0.822	20.714
		Dopamine	1.163	4.67	66.540	0.061	1.35	1.67	2037	2.295	2.793
		Adrénaline	1.390	4.06	49.490	0.070	1.52	10.66	2175	2.938	1.280
		Noradrénaline	2.830	4.90	54.860	0.076	1.35	n.a.	7668	7.017	2.389
(B) H20 + AF 30 mM + FA, pH3 (C) ACN/H2O + AF 30 mM + FA, pH3	N2.5.1	Injection	0.353	0.18	6.530	0.024	0.79	n.a.	1164		
		Dobutamine	0.367	4.71	194.920	0.023	1.13	4.42	1451	0.040	-
		Isoprénaline	0.640	3.57	68.040	0.047	1.32	4.88	1038	0.813	20.500
		Dopamine	1.147	4.62	66.080	0.061	1.37	1.61	1959	2.249	2.767
		Adrénaline	1.373	3.95	45.860	0.075	1.50	10.28	1840	2.890	1.285
		Noradrénaline	2.513	4.96	110.820	0.039	1.23	n.a.	22475	6.119	2.118
(B) H20 + AF 30 mM + FA, pH3 (C) ACN/H2O + AF 30 mM + FA, pH4	N2.5.2	Injection	0.350	0.18	6.620	0.024	0.81	n.a.	1155		
		Dobutamine	0.363	4.66	190.870	0.023	1.18	4.36	1395	0.037	-
		Isoprénaline	0.637	3.61	68.250	0.047	1.31	4.86	1037	0.820	22.077
		Dopamine	1.140	4.56	65.650	0.061	1.38	1.64	1943	2.257	2.753
		Adrénaline	1.367	3.90	50.660	0.066	1.48	10.75	2358	2.906	1.287
		Noradrénaline	2.467	5.12	117.280	0.038	1.23	n.a.	23336	6.049	2.082

**Annexe 16 : Résultats chromatographiques obtenus pour la concentration la plus haute (250.00 µg/mL) et la plus basse (2.50 µg/mL) lors l'estimation de la LOD****Figure S24 : Chromatogramme de l'analyse du mélange des 5 catécholamine (C = 250.00 µg/mL)****Figure S25 : Chromatogramme de l'analyse du mélange des 5 catécholamine (C = 2.50 µg/mL)**

**Annexe 17 : Résultats bruts de la dégradation forcée de l'adrénaline**

Adrénaline						
Temps [jour]	Témoin	Conditions	Aire* temps [mAU*min]	Moyenne aire* temps [mAU*min]	Ecart-type [%]	Dégradation [%]
0	Qrl acide	NaCl 0.9%+HCl				
0	Acide	HCl 0.5M	5.7000	5.7592	5.242%	75.145%
0	Acide	HCl 0.5M	5.7998			
0	Acide	HCl 0.5M	5.7777			
0	Qrl base	NaCl 0.9%+NaOH				
0	Base	NaOH 0.5M	2.9624	3.0438	7.068%	39.715%
0	Base	NaOH 0.5M	3.0790			
0	Base	NaOH 0.5M	3.0899			
0	Qrl oxydation	NaCl 0.9%+H2O2				
0	Oxydation	H2O2 3.5%	7.4063	7.4530	8.329%	97.247%
0	Oxydation	H2O2 3.5%	7.5492			
0	Oxydation	H2O2 3.5%	7.4036			
0	Qrl Tambiante	NaCl 0.9%+T25°C				
0	Tambiante	25°C	7.5294	7.6640	11.992%	100.000%
0	Tambiante	25°C	7.7033			
0	Tambiante	25°C	7.7594			
0	Qrl T élevée	NaCl 0.9%+T60°C				
0	T élevée	60°C	7.6885	7.7024	3.769%	100.500%
0	T élevée	60°C	7.6728			
0	T élevée	60°C	7.7448			
1	Qrl acide	NaCl 0.9%+HCl				
1	Acide	HCl 0.5M	5.4598	5.5850	11.097%	72.872%
1	Acide	HCl 0.5M	5.6713			
1	Acide	HCl 0.5M	5.6238			
1	Qrl base	NaCl 0.9%+NaOH				
1	Base	NaOH 0.5M	NA	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	Base	NaOH 0.5M	NA			
1	Base	NaOH 0.5M	NA			
1	Qrl oxydation	NaCl 0.9%+H2O3				
1	Oxydation	H2O2 3.5%	5.0300	5.0699	3.664%	66.152%
1	Oxydation	H2O2 3.5%	5.1020			
1	Oxydation	H2O2 3.5%	5.0778			
1	Qrl Tambiante	NaCl 0.9%+T25°C				
1	Tambiante	25°C	6.8094	6.9422	11.517%	90.582%
1	Tambiante	25°C	7.0147			
1	Tambiante	25°C	7.0025			
1	Qrl T élevée	NaCl 0.9%+T60°C				
1	T élevée	60°C	6.243	6.3609	10.377%	82.996%
1	T élevée	60°C	6.399			
1	T élevée	60°C	6.440			
2	Qrl acide	NaCl 0.9%+HCl				
2	Acide	HCl 0.5M	4.5597	4.5808	1.862%	59.770%
2	Acide	HCl 0.5M	4.5950			
2	Acide	HCl 0.5M	4.5876			
2	Qrl base	NaCl 0.9%+NaOH				
2	Base	NaOH 0.5M	NA	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	Base	NaOH 0.5M	NA			
2	Base	NaOH 0.5M	NA			
2	Qrl oxydation	NaCl 0.9%+H2O4				
2	Oxydation	H2O2 3.5%	4.4513	4.4922	4.120%	58.614%
2	Oxydation	H2O2 3.5%	4.5337			
2	Oxydation	H2O2 3.5%	4.4916			
2	Qrl Tambiante	NaCl 0.9%+T25°C				
2	Tambiante	25°C	6.9779	7.0711	8.383%	92.264%
2	Tambiante	25°C	7.1403			
2	Tambiante	25°C	7.0952			
2	Qrl T élevée	NaCl 0.9%+T60°C				
2	T élevée	60°C	6.0219	6.0412	4.404%	78.825%
2	T élevée	60°C	6.0916			
2	T élevée	60°C	6.0101			
4	Qrl acide	NaCl 0.9%+HCl				
4	Acide	HCl 0.5M	4.2019	4.7337	47.009%	61.765%
4	Acide	HCl 0.5M	4.9054			
4	Acide	HCl 0.5M	5.0938			
4	Qrl base	NaCl 0.9%+NaOH				
4	Base	NaOH 0.5M	NA	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	Base	NaOH 0.5M	NA			
4	Base	NaOH 0.5M	NA			
4	Qrl oxydation	NaCl 0.9%+H2O5				
4	Oxydation	H2O2 3.5%	4.0294	3.9923	3.578%	52.091%
4	Oxydation	H2O2 3.5%	3.9895			
4	Oxydation	H2O2 3.5%	3.9580			
4	Qrl Tambiante	NaCl 0.9%+T25°C				
4	Tambiante	25°C	6.8826	7.0680	16.604%	92.223%
4	Tambiante	25°C	7.2030			
4	Tambiante	25°C	7.1184			
4	Qrl T élevée	NaCl 0.9%+T60°C				
4	T élevée	60°C	5.7414	5.8223	7.076%	75.969%
4	T élevée	60°C	5.8528			
4	T élevée	60°C	5.8727			

**Annexe 18 : Résultats bruts de la dégradation forcée de la noradrénaline**

Noradrénaline						
Temps [jour]	Témoin	Conditions	Aire* temps [mAU* min]	Moyenne aire* temps [mAU* min]	Ecart-type [%]	Dégradation [%]
0	Ctrl acide	NaO 0.9%+HCl				
0	Acide	HCl 0.5M	6.6731	6.7796	9.571%	78.469%
0	Acide	HCl 0.5M	6.8584			
0	Acide	HCl 0.5M	6.8073			
0	Ctrl base	NaO 0.9%+NaOH				
0	Base	NaOH 0.5M	0.5762	0.5933	1.529%	6.867%
0	Base	NaOH 0.5M	0.5882			
0	Base	NaOH 0.5M	0.6056			
0	Ctrl oxydation	NaO 0.9%+H2O2				
0	Oxydation	H2O2 3.5%	8.8094	8.9011	9.241%	103.024%
0	Oxydation	H2O2 3.5%	8.9942			
0	Oxydation	H2O2 3.5%	8.8998			
0	Ctrl Tambiante	NaO 0.9%+ T25°C				
0	Tambiante	25°C	8.6399	8.6399	#DIV/0!	100.000%
0	Tambiante	25°C	-			
0	Tambiante	25°C	-			
0	Ctrl Télévée	NaO 0.9%+ T60°C				
0	Télévée	60°C	8.7695	8.8392	6.499%	102.307%
0	Télévée	60°C	8.8981			
0	Télévée	60°C	8.8501			
1	Ctrl acide	NaO 0.9%+HCl				
1	Acide	HCl 0.5M	5.9858	5.9858	4.025%	69.281%
1	Acide	HCl 0.5M	6.0261			
1	Acide	HCl 0.5M	5.9456			
1	Ctrl base	NaO 0.9%+ NaOH				
1	Base	NaOH 0.5M	0.4730	0.5982	11.472%	6.923%
1	Base	NaOH 0.5M	0.6232			
1	Base	NaOH 0.5M	0.6983			
1	Ctrl oxydation	NaO 0.9%+H2O3				
1	Oxydation	H2O2 3.5%	6.5723	6.6634	9.580%	77.124%
1	Oxydation	H2O2 3.5%	6.6546			
1	Oxydation	H2O2 3.5%	6.7633			
1	Ctrl Tambiante	NaO 0.9%+ T25°C				
1	Tambiante	25°C	8.8550	8.8550	#DIV/0!	102.490%
1	Tambiante	25°C	-			
1	Tambiante	25°C	-			
1	Ctrl Télévée	NaO 0.9%+ T60°C				
1	Télévée	60°C	8.7133	8.7816	6.051%	101.640%
1	Télévée	60°C	8.8286			
1	Télévée	60°C	8.8028			
2	Ctrl acide	NaO 0.9%+HCl				
2	Acide	HCl 0.5M	5.3638	5.5663	19.002%	64.426%
2	Acide	HCl 0.5M	5.7407			
2	Acide	HCl 0.5M	5.5945			
2	Ctrl base	NaO 0.9%+ NaOH				
2	Base	NaOH 0.5M	NA	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	Base	NaOH 0.5M	NA			
2	Base	NaOH 0.5M	NA			
2	Ctrl oxydation	NaO 0.9%+H2O4				
2	Oxydation	H2O2 3.5%	5.4379	5.4839	4.282%	63.472%
2	Oxydation	H2O2 3.5%	5.5226			
2	Oxydation	H2O2 3.5%	5.4912			
2	Ctrl Tambiante	NaO 0.9%+ T25°C				
2	Tambiante	25°C	8.7896	8.7896	#DIV/0!	101.733%
2	Tambiante	25°C	-			
2	Tambiante	25°C	-			
2	Ctrl Télévée	NaO 0.9%+ T60°C				
2	Télévée	60°C	8.4843	8.5655	8.469%	99.139%
2	Télévée	60°C	8.6533			
2	Télévée	60°C	8.5589			
4	Ctrl acide	NaO 0.9%+HCl				
4	Acide	HCl 0.5M	6.3239	6.4988	17.081%	75.218%
4	Acide	HCl 0.5M	6.6652			
4	Acide	HCl 0.5M	6.5073			
4	Ctrl base	NaO 0.9%+ NaOH				
4	Base	NaOH 0.5M	NA	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	Base	NaOH 0.5M	NA			
4	Base	NaOH 0.5M	NA			
4	Ctrl oxydation	NaO 0.9%+H2O5				
4	Oxydation	H2O2 3.5%	5.0388	5.0851	4.261%	58.856%
4	Oxydation	H2O2 3.5%	5.1227			
4	Oxydation	H2O2 3.5%	5.0937			
4	Ctrl Tambiante	NaO 0.9%+ T25°C				
4	Tambiante	25°C	8.3622	8.4354	6.463%	97.633%
4	Tambiante	25°C	8.4847			
4	Tambiante	25°C	8.4592			
4	Ctrl Télévée	NaO 0.9%+ T60°C				
4	Télévée	60°C	7.8921	7.9864	8.455%	92.436%
4	Télévée	60°C	8.0115			
4	Télévée	60°C	8.0555			

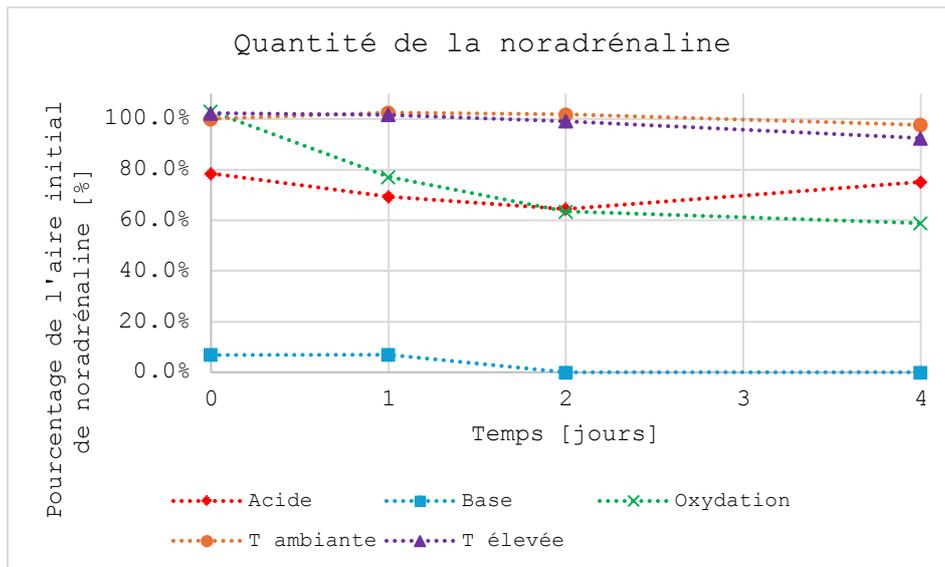


Figure S26 : Evolution de la quantité de noradrénaline au fil du temps en conditions acide, basique, oxydative et à température élevée

Annexe 19 : Résultats bruts de la dégradation forcée de la dopamine

Dopamine						
Temps [jour]	Témoins	Conditions	Aire* temps [mAU* min]	Moyenne aire* temps [mAU* min]	Ecart-type [%]	Dégradation [%]
0	Ctrl acide	Glc 5%+HCl				
0	Acide	HCl 0.5M	6.5007	6.6014	8.976%	76.144%
0	Acide	HCl 0.5M	6.6305			
0	Acide	HCl 0.5M	6.6730			
0	Ctrl base	Glc 5%+NaOH				
0	Base	NaOH 0.5M	2.4830	2.5663	7.333%	29.601%
0	Base	NaOH 0.5M	2.5948			
0	Base	NaOH 0.5M	2.6211			
0	Ctrl oxydation	Glc 5%+H2O2				
0	Oxydation	H2O2 3.5%	8.8799	8.9971	11.127%	103.776%
0	Oxydation	H2O2 3.5%	9.1013			
0	Oxydation	H2O2 3.5%	9.0100			
0	Ctrl Tambiante	Glc 5%+ T25°C				
0	Tambiante	25°C	8.5716	8.6697	8.546%	100.000%
0	Tambiante	25°C	8.7282			
0	Tambiante	25°C	8.7092			
0	Ctrl Télévée	Glc 5%+ T60°C				
0	Télévée	60°C	9.1100	9.1296	7.910%	105.305%
0	Télévée	60°C	9.0622			
0	Télévée	60°C	9.2167			
1	Ctrl acide	Glc 5%+HCl				
1	Acide	HCl 0.5M	6.7402	6.7756	6.349%	78.153%
1	Acide	HCl 0.5M	6.7377			
1	Acide	HCl 0.5M	6.8489			
1	Ctrl base	Glc 5%+NaOH				
1	Base	NaOH 0.5M	NA	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	Base	NaOH 0.5M	NA			
1	Base	NaOH 0.5M	NA			
1	Ctrl oxydation	Glc 5%+H2O3				
1	Oxydation	H2O2 3.5%	6.2969	6.3023	4.908%	72.694%
1	Oxydation	H2O2 3.5%	6.2562			
1	Oxydation	H2O2 3.5%	6.3539			
1	Ctrl Tambiante	Glc 5%+ T25°C				
1	Tambiante	25°C	8.8609	8.9678	9.295%	103.439%
1	Tambiante	25°C	9.0296			
1	Tambiante	25°C	9.0129			
1	Ctrl Télévée	Glc 5%+ T60°C				
1	Télévée	60°C	8.5883	8.8013	18.999%	101.518%
1	Télévée	60°C	8.9533			
1	Télévée	60°C	8.8623			
2	Ctrl acide	Glc 5%+HCl				
2	Acide	HCl 0.5M	6.9956	7.0105	2.104%	80.863%
2	Acide	HCl 0.5M	7.0014			
2	Acide	HCl 0.5M	7.0346			
2	Ctrl base	Glc 5%+NaOH				
2	Base	NaOH 0.5M	NA	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	Base	NaOH 0.5M	NA			
2	Base	NaOH 0.5M	NA			
2	Ctrl oxydation	Glc 5%+H2O4				
2	Oxydation	H2O2 3.5%	5.9700	6.0243	4.712%	69.487%
2	Oxydation	H2O2 3.5%	6.0548			
2	Oxydation	H2O2 3.5%	6.0480			
2	Ctrl Tambiante	Glc 5%+ T25°C				
2	Tambiante	25°C	8.1669	8.3185	14.093%	95.950%
2	Tambiante	25°C	8.4455			
2	Tambiante	25°C	8.3432			
2	Ctrl Télévée	Glc 5%+ T60°C				
2	Télévée	60°C	8.0202	8.1385	10.563%	93.874%
2	Télévée	60°C	8.2233			
2	Télévée	60°C	8.1721			
4	Ctrl acide	Glc 5%+HCl				
4	Acide	HCl 0.5M	6.7352	6.8408	9.205%	78.905%
4	Acide	HCl 0.5M	6.8828			
4	Acide	HCl 0.5M	6.9043			
4	Ctrl base	Glc 5%+NaOH				
4	Base	NaOH 0.5M	NA	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	Base	NaOH 0.5M	NA			
4	Base	NaOH 0.5M	NA			
4	Ctrl oxydation	Glc 5%+H2O6				
4	Oxydation	H2O2 3.5%	5.0210	5.0107	5.236%	57.796%
4	Oxydation	H2O2 3.5%	5.0572			
4	Oxydation	H2O2 3.5%	4.9540			
4	Ctrl Tambiante	Glc 5%+ T25°C				
4	Tambiante	25°C	8.6548	8.6982	10.248%	100.329%
4	Tambiante	25°C	8.8152			
4	Tambiante	25°C	8.6245			
4	Ctrl Télévée	Glc 5%+ T60°C				
4	Télévée	60°C	8.3636	8.4701	9.227%	97.698%
4	Télévée	60°C	8.5260			
4	Télévée	60°C	8.5207			

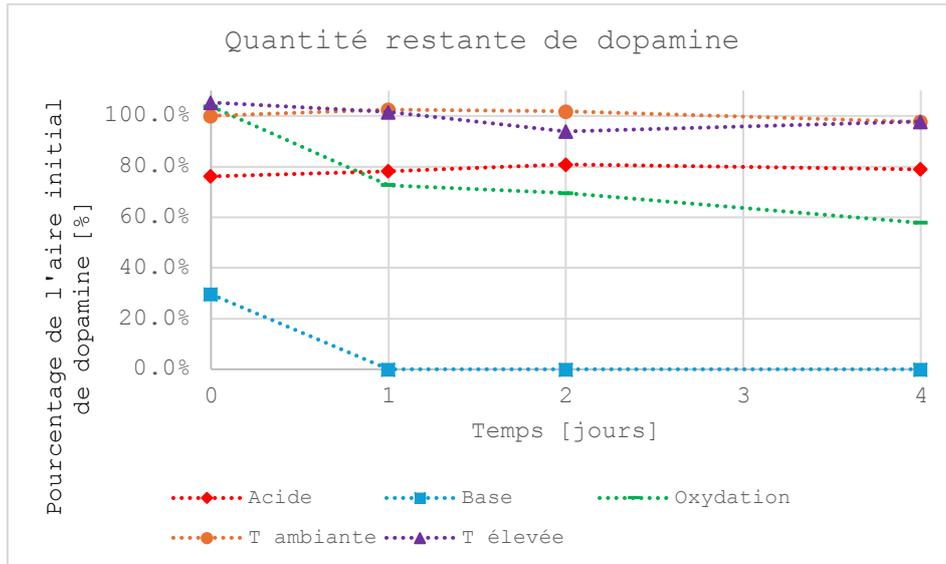
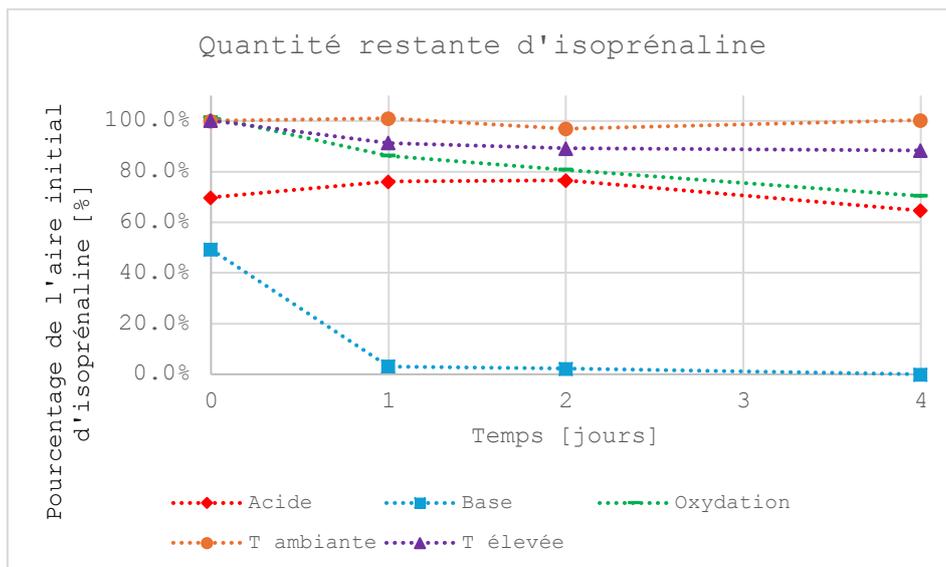


Figure S27 : Evolution de la quantité de dopamine au fil du temps en conditions acide, basique, oxydative et à température élevée

**Annexe 20 : Résultats bruts de la dégradation forcée de l'isoprénaline**

Isoprénaline						
Temps [jour]	Témoin	Conditions	Aire* temps [mAU* min]	Moyenne aire* temps [mAU* min]	Ecart-type [%]	Dégradation [%]
0	Ctrl acide	NaO 0.9%+HCl				
0	Acide	HCl 0.5M	5.1645	5.1251	4.364%	69.726%
0	Acide	HCl 0.5M	5.1326			
0	Acide	HCl 0.5M	5.0782			
0	Ctrl base	NaO 0.9%+NaOH				
0	Base	NaOH 0.5M	3.5824	3.6217	4.592%	49.273%
0	Base	NaOH 0.5M	3.6106			
0	Base	NaOH 0.5M	3.6722			
0	Ctrl oxydation	NaO 0.9%+H2O2				
0	Oxydation	H2O2 3.5%	7.3945	7.4586	6.215%	101.472%
0	Oxydation	H2O2 3.5%	7.5186			
0	Oxydation	H2O2 3.5%	7.4626			
0	Ctrl Tambiante	NaO 0.9%+ T25°C				
0	Tambiante	25°C	7.2250	7.3504	10.857%	100.000%
0	Tambiante	25°C	7.4125			
0	Tambiante	25°C	7.4136			
0	Ctrl T élevée	NaO 0.9%+ T60°C				
0	T élevée	60°C	7.2641	7.3613	8.446%	100.149%
0	T élevée	60°C	7.4034			
0	T élevée	60°C	7.4165			
1	Ctrl acide	NaO 0.9%+HCl				
1	Acide	HCl 0.5M	5.5101	5.5881	6.937%	76.025%
1	Acide	HCl 0.5M	5.6428			
1	Acide	HCl 0.5M	5.6115			
1	Ctrl base	NaO 0.9%+ NaOH				
1	Base	NaOH 0.5M	0.2280	0.2290	0.197%	3.116%
1	Base	NaOH 0.5M	0.2313			
1	Base	NaOH 0.5M	0.2278			
1	Ctrl oxydation	NaO 0.9%+H2O3				
1	Oxydation	H2O2 3.5%	6.2881	6.3418	4.736%	86.278%
1	Oxydation	H2O2 3.5%	6.3595			
1	Oxydation	H2O2 3.5%	6.3777			
1	Ctrl Tambiante	NaO 0.9%+ T25°C				
1	Tambiante	25°C	7.3290	7.4249	8.313%	101.014%
1	Tambiante	25°C	7.4758			
1	Tambiante	25°C	7.4700			
1	Ctrl T élevée	NaO 0.9%+ T60°C				
1	T élevée	60°C	6.6742	6.7096	3.382%	91.282%
1	T élevée	60°C	6.7416			
1	T élevée	60°C	6.7129			
2	Ctrl acide	NaO 0.9%+HCl				
2	Acide	HCl 0.5M	5.6263	5.6269	1.446%	76.553%
2	Acide	HCl 0.5M	5.6417			
2	Acide	HCl 0.5M	5.6128			
2	Ctrl base	NaO 0.9%+ NaOH				
2	Base	NaOH 0.5M	0.1598	0.1618	0.236%	2.201%
2	Base	NaOH 0.5M	0.1644			
2	Base	NaOH 0.5M	0.1612			
2	Ctrl oxydation	NaO 0.9%+H2O4				
2	Oxydation	H2O2 3.5%	5.8916	5.9300	4.061%	80.676%
2	Oxydation	H2O2 3.5%	5.9725			
2	Oxydation	H2O2 3.5%	5.9258			
2	Ctrl Tambiante	NaO 0.9%+ T25°C				
2	Tambiante	25°C	7.0783	7.1240	4.039%	96.921%
2	Tambiante	25°C	7.1548			
2	Tambiante	25°C	7.1390			
2	Ctrl T élevée	NaO 0.9%+ T60°C				
2	T élevée	60°C	6.5300	6.5550	2.177%	89.179%
2	T élevée	60°C	6.5698			
2	T élevée	60°C	6.5652			
4	Ctrl acide	NaO 0.9%+HCl				
4	Acide	HCl 0.5M	4.7499	4.7489	0.409%	64.608%
4	Acide	HCl 0.5M	4.7444			
4	Acide	HCl 0.5M	4.7524			
4	Ctrl base	NaO 0.9%+ NaOH				
4	Base	NaOH 0.5M	NA	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	Base	NaOH 0.5M	NA			
4	Base	NaOH 0.5M	NA			
4	Ctrl oxydation	NaO 0.9%+H2O6				
4	Oxydation	H2O2 3.5%	5.2020	5.1725	3.162%	70.370%
4	Oxydation	H2O2 3.5%	5.1391			
4	Oxydation	H2O2 3.5%	5.1763			
4	Ctrl Tambiante	NaO 0.9%+ T25°C				
4	Tambiante	25°C	7.3337	7.3738	3.510%	100.318%
4	Tambiante	25°C	7.3991			
4	Tambiante	25°C	7.3885			
4	Ctrl T élevée	NaO 0.9%+ T60°C				
4	T élevée	60°C	6.3952	6.4939	8.557%	88.348%
4	T élevée	60°C	6.5467			
4	T élevée	60°C	6.5399			



**Figure S28 : Evolution de la quantité d'isoprénaline au fil du temps en condition acide, basique, oxydative et à température élevée**

## Annexe 21 : Résultats bruts de validation de l'adrénaline

Le Tableau suivant ainsi que la Figure S29 contient les données brutes des droites de calibrations obtenues lors de chaque série de validation.

Droites de calibration de l'adrénaline					
Séries	1	2	3	4	5
Pente	0.077517	0.081889	0.082006	0.081220	0.078690
Ordonnées à l'origine	-0.18	-0.21	-0.20	-1.91E-01	-1.99E-01
R <sup>2</sup>	0.99901	0.99880	0.99981	0.99913	0.99882

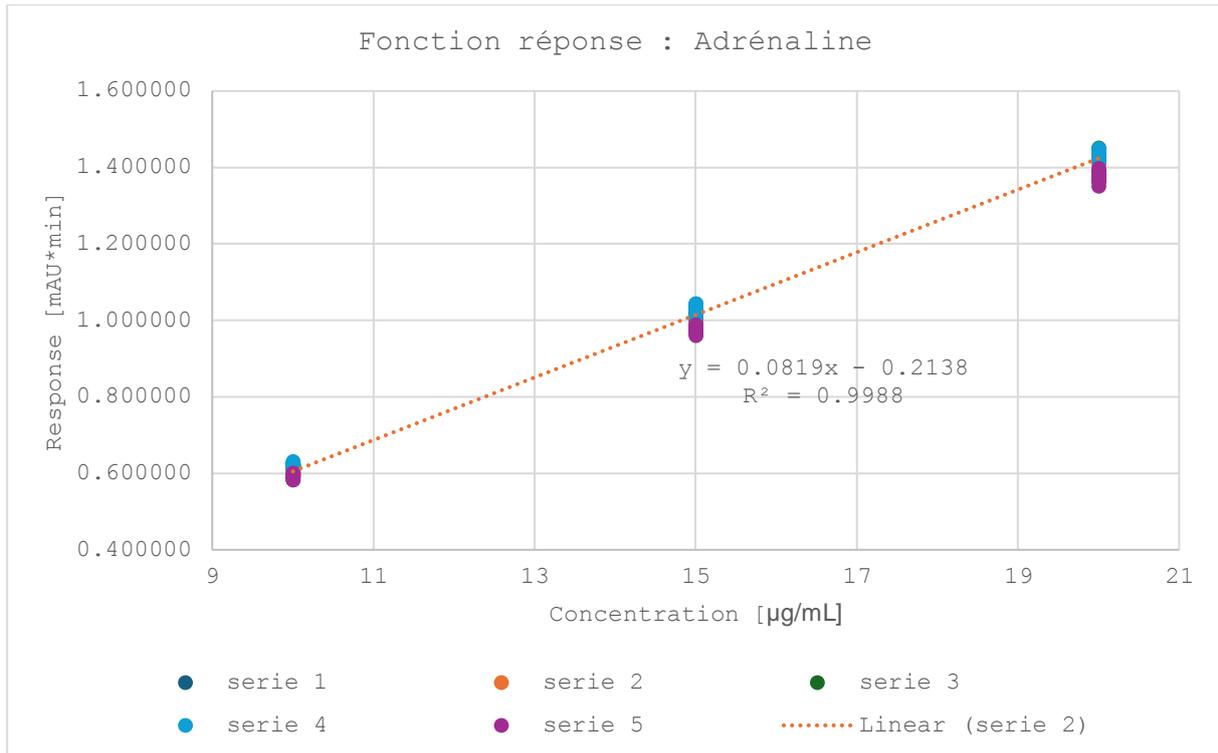


Figure S29 : Droites de calibration de l'adrénaline durant le processus de validation

Le Tableau ci-dessous contient les données brutes de l'incertitude relative de mesure de la méthode UHPLC-UV pour l'adrénaline.

Profil d'incertitude relative de l'adrénaline					
VALIDATION	CONCENTRATION	SIT	t	Rel. Uncert.	limit sup
1st Validation point	10.0	1.8%	2.45	4.42%	5.00%
2nd Validation point	15.0	1.6%	2.25	3.60%	5.00%
3rd Validation point	20.0	1.7%	2.42	4.12%	5.00%

Statistics sheet for analytical method validation													
CALIBRATION							VALIDATION						
N°	CONCENTRATION	serie 1	serie 2	serie 3	serie 4	serie 5	N°	CONCENTRATION	serie 1	serie 2	serie 3	serie 4	serie 5
1	10	0.600400	0.595400	0.619800	0.612900	0.592700	1	10	0.630800	0.639900	0.646600	0.615900	0.607500
2	10	0.609800	0.598500	0.627700	0.609100	0.604500	2	10	0.628400	0.625400	0.645000	0.615000	0.603100
3	10	0.595500	0.601900	0.619300	0.619300	0.589200	3	10	0.616400	0.633800	0.646600	0.621100	0.608200
4	10	0.597400	0.610200	0.619000	0.617300	0.582700	4	10	0.618800	0.630300	0.651400	0.626800	0.603400
5	10	0.600700	0.618700	0.622600	0.621100	0.592200	5	10	0.620200	0.644300	0.659600	0.629600	0.604200
6	10	0.594500	0.609300	0.622500	0.616200	0.590000	6	10	0.621800	0.645700	0.649700	0.630800	0.599500
7	10	0.584100	0.639600	0.620800	0.626600	0.592500	7	10	0.619600	0.638500	0.642200	0.618600	0.589300
8	10	0.610000	0.611700	0.616200	0.627600	0.594600	8	10	0.608600	0.637900	0.642000	0.624200	0.602000
9	10	0.589100	0.608900	0.614100	0.629800	0.592500	9	10	0.611400	0.643600	0.639100	0.621200	0.599700
10							10						
11							11						
12							12						
13							13						
14							14						
15							15						
16	15	0.996800	0.987600	1.030200	1.026500	0.978600	16	15	1.003100	1.035600	1.033800	1.014600	0.989500
17	15	1.004400	0.991300	1.022100	1.009000	0.967900	17	15	1.011500	1.029700	1.029400	1.019900	0.980000
18	15	1.007500	1.006400	1.029200	1.023500	0.960000	18	15	1.014900	1.046000	1.027800	1.032400	0.985100
19	15	1.007800	1.007800	1.024700	1.027900	0.965800	19	15	1.024700	1.053300	1.022300	1.038400	0.977600
20	15	0.983600	1.020900	1.031900	1.042700	0.977300	20	15	1.007300	1.054200	1.044700	1.016300	0.987600
21	15	0.985000	1.029500	1.037600	1.043800	0.983200	21	15	1.004900	1.053500	1.033000	1.017100	0.979500
22	15	0.975400	1.016700	1.021900	1.043100	0.988100	22	15	0.987900	1.028500	1.018700	1.029100	0.981100
23	15	0.970100	1.023100	1.026300	1.011400	0.963200	23	15	1.023300	1.031300	1.019200	1.018000	0.985300
24	15	0.968500	1.016800	1.030000	1.031100	0.974100	24	15	1.017600	1.037700	1.019400	1.034300	0.980600
25							25						
26							26						
27							27						
28							28						
29							29						
30							30						
31	20	1.364100	1.408500	1.445700	1.421500	1.397200	31	20	1.387500	1.447200	1.433300	1.434600	1.368400
32	20	1.376300	1.439400	1.437900	1.440000	1.368300	32	20	1.408500	1.464800	1.448800	1.442100	1.384500
33	20	1.368100	1.423200	1.437800	1.430200	1.350000	33	20	1.420200	1.420200	1.440800	1.458900	1.371700
34	20	1.366700	1.411400	1.441800	1.437100	1.380200	34	20	1.388100	1.458800	1.430300	1.443800	1.389800
35	20	1.365500	1.414300	1.440000	1.443400	1.364400	35	20	1.434400	1.466800	1.428600	1.442300	1.396400
36	20	1.379500	1.423700	1.450200	1.436800	1.372300	36	20	1.407300	1.461300	1.442600	1.439300	1.381200
37	20	1.370000	1.426000	1.440200	1.424800	1.385800	37	20	1.399400	1.478900	1.412500	1.425500	1.356500
38	20	1.370700	1.443400	1.429600	1.448000	1.388600	38	20	1.420400	1.473100	1.411400	1.425000	1.362000
39	20	1.389100	1.441300	1.435400	1.429300	1.389900	39	20	1.406800	1.470000	1.420000	1.437000	1.374900

RECALCULATED CONCENTRATION							RECOVERY (%)								
N°	CONCENTRATION	serie 1	serie 2	serie 3	serie 4	serie 5	serie 6	RECOVERY (%)	serie 1	serie 2	serie 3	serie 4	serie 5	serie 6	
1	10	10.43	10.43	10.33	9.93	10.25	#DIV/0!	1	10	104%	104%	103%	99%	103%	#DIV/0!
2	10	10.37	10.25	10.32	9.92	10.19	#DIV/0!	2	10	104%	103%	102%	99%	102%	#DIV/0!
3	10	10.24	10.35	10.33	10.00	10.26	#DIV/0!	3	10	102%	104%	103%	100%	103%	#DIV/0!
4	10	10.26	10.31	10.39	10.06	10.20	#DIV/0!	4	10	103%	103%	104%	101%	102%	#DIV/0!
5	10	10.29	10.48	10.45	10.10	10.21	#DIV/0!	5	10	103%	104%	105%	102%	105%	#DIV/0!
6	10	10.31	10.50	10.37	10.11	10.15	#DIV/0!	6	10	103%	105%	104%	101%	101%	#DIV/0!
7	10	10.29	10.41	10.28	9.96	10.02	#DIV/0!	7	10	103%	104%	103%	100%	100%	#DIV/0!
8	10	10.14	10.40	10.30	10.03	10.18	#DIV/0!	8	10	101%	104%	103%	100%	102%	#DIV/0!
9	10	10.18	10.47	10.24	10.00	10.15	#DIV/0!	9	10	102%	105%	102%	100%	102%	#DIV/0!
10		2.29	2.61	2.45	2.35	2.53	#DIV/0!	10		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
11		2.29	2.61	2.45	2.35	2.53	#DIV/0!	11		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
12		2.29	2.61	2.45	2.35	2.53	#DIV/0!	12		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
13		2.29	2.61	2.45	2.35	2.53	#DIV/0!	13		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
14		2.29	2.61	2.45	2.35	2.53	#DIV/0!	14		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
15		2.29	2.61	2.45	2.35	2.53	#DIV/0!	15		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
16	15	15.23	15.26	15.05	14.84	14.85	#DIV/0!	16	15	102%	102%	100%	99%	99%	#DIV/0!
17	15	15.34	15.31	15.00	14.91	14.98	#DIV/0!	17	15	102%	102%	100%	99%	100%	#DIV/0!
18	15	15.39	15.38	15.06	14.98	15.05	#DIV/0!	18	15	103%	103%	100%	100%	100%	#DIV/0!
19	15	14.67	15.44	14.91	14.76	14.95	#DIV/0!	19	15	98%	103%	99%	98%	100%	#DIV/0!
20	15	15.29	15.48	15.19	14.86	15.08	#DIV/0!	20	15	102%	103%	101%	99%	101%	#DIV/0!
21	15	15.26	15.48	15.05	14.87	14.98	#DIV/0!	21	15	102%	103%	100%	99%	100%	#DIV/0!
22	15	15.04	15.17	14.87	15.02	14.87	#DIV/0!	22	15	101%	99%	100%	100%	100%	#DIV/0!
23	15	15.49	15.20	14.88	15.05	14.88	#DIV/0!	23	15	103%	101%	99%	99%	100%	#DIV/0!
24	15	15.42	15.28	14.88	15.08	14.99	#DIV/0!	24	15	103%	102%	99%	101%	100%	#DIV/0!
25		2.29	2.61	2.45	2.35	2.53	#DIV/0!	25		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
26		2.29	2.61	2.45	2.35	2.53	#DIV/0!	26		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
27		2.29	2.61	2.45	2.35	2.53	#DIV/0!	27		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
28		2.29	2.61	2.45	2.35	2.53	#DIV/0!	28		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
29		2.29	2.61	2.45	2.35	2.53	#DIV/0!	29		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
30		2.29	2.61	2.45	2.35	2.53	#DIV/0!	30		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
31	20	20.19	20.28	20.01	19.92	20.01	#DIV/0!	31	20	101%	100%	100%	100%	100%	#DIV/0!
32	20	20.46	20.50	20.12	20.10	20.12	#DIV/0!	32	20	102%	102%	101%	101%	101%	#DIV/0!
33	20	20.61	20.02	20.21	19.96	20.21	#DIV/0!	33	20	103%	100%	100%	100%	100%	#DIV/0!
34	20	20.20	20.43	19.89	20.12	20.19	#DIV/0!	34	20	101%	102%	99%	101%	101%	#DIV/0!
35	20	20.80	20.52	19.87	20.11	20.28	#DIV/0!	35	20	104%	103%	99%	103%	101%	#DIV/0!
36	20	20.45	20.46	20.07	20.08	20.07	#DIV/0!	36	20	102%	100%	100%	100%	100%	#DIV/0!
37	20	20.35	20.67	19.67	19.90	19.81	#DIV/0!	37	20	102%	103%	98%	99%	99%	#DIV/0!
38	20	20.62	19.66	19.67	19.89	19.84	#DIV/0!	38	20	103%	103%	98%	99%	99%	#DIV/0!
39	20	20.44	20.56	19.76	20.04	20.00	#DIV/0!	39	20	102%	103%	99%	100%	100%	#DIV/0!



## Annexe 22 : Résultats bruts de validation de la noradrénaline

Le Tableau suivant ainsi que la Figure S30 contient les données brutes des droites de calibrations obtenues lors de chaque série de validation.

Droites de calibration de la noradrénaline					
Séries	1	2	3	4	5
Pente	0.095743	0.094218	0.094739	0.093480	0.090638
Ordonnées à l'origine	-0.14	-0.12	-0.13	-1.44E-01	-1.08E-01
R <sup>2</sup>	0.99889	0.99838	0.99720	0.99892	0.99898

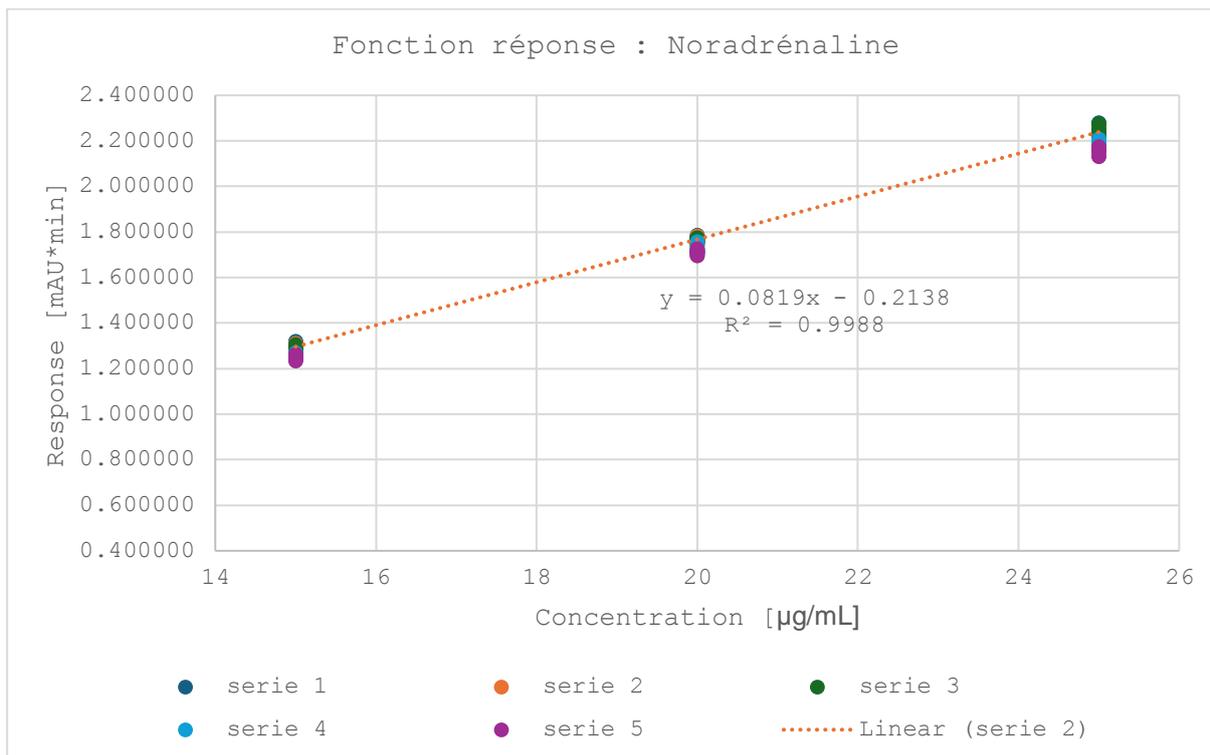


Figure S30 : Droites de calibration de la noradrénaline durant le processus de validation

Le Tableau ci-dessous contient les données brutes de l'incertitude relative de mesure de la méthode UHPLC-UV pour la noradrénaline.

Profil d'incertitude relative de la noradrénaline					
VALIDATION	CONCENTRATION	SIT	t	Rel. Uncert.	limit sup
1st Validation point	15.0	1.7%	2.05	3.47%	5.00%
2nd Validation point	20.0	1.6%	2.14	3.43%	5.00%
3rd Validation point	25.0	1.3%	2.15	2.87%	5.00%

Statistics sheet for analytical method validation																			
CALIBRATION										VALIDATION									
N°	CONCENTRATION	serie 1	serie 2	serie 3	serie 4	serie 5	N°	CONCENTRATION	serie 1	serie 2	serie 3	serie 4	serie 5						
1	15	1.278100	1.281200	1.283800	1.250000	1.223800	1	15	1.298400	1.296600	1.274300	1.258100	1.223100						
2	15	1.298500	1.295000	1.284900	1.269300	1.256600	2	15	1.302200	1.311800	1.308400	1.290400	1.263500						
3	15	1.294200	1.302100	1.285100	1.269300	1.261300	3	15	1.317400	1.318800	1.290000	1.262200	1.272100						
4	15	1.304000	1.286600	1.265600	1.254500	1.242600	4	15	1.345600	1.311500	1.276700	1.250100	1.289300						
5	15	1.312000	1.299400	1.292800	1.249200	1.266400	5	15	1.380000	1.321500	1.314500	1.246800	1.278200						
6	15	1.300300	1.307400	1.302000	1.239700	1.248100	6	15	1.318200	1.329100	1.285200	1.248400	1.283600						
7	15	1.292800	1.294700	1.286000	1.268400	1.247100	7	15	1.303600	1.302800	1.278500	1.247100	1.290200						
8	15	1.321100	1.302400	1.307800	1.251600	1.248100	8	15	1.284700	1.281700	1.301900	1.226800	1.276400						
9	15	1.317300	1.312500	1.299000	1.265500	1.243700	9	15	1.278900	1.292300	1.298000	1.244000	1.291400						
10							10												
11							11												
12							12												
13							13												
14							14												
15							15												
16	20	1.754400	1.757100	1.713200	1.708400	1.695500	16	20	1.750500	1.839800	1.750000	1.759500	1.768600						
17	20	1.773200	1.760800	1.755200	1.723200	1.727100	17	20	1.821100	1.816800	1.786700	1.751900	1.779600						
18	20	1.787300	1.759000	1.745800	1.716900	1.716500	18	20	1.817700	1.794300	1.779300	1.771900	1.777200						
19	20	1.778400	1.775000	1.757800	1.724700	1.695600	19	20	1.802800	1.808300	1.775700	1.727700	1.741200						
20	20	1.786100	1.781500	1.775700	1.759100	1.699800	20	20	1.839700	1.815200	1.765700	1.771300	1.752700						
21	20	1.782000	1.784200	1.775600	1.726800	1.710900	21	20	1.852400	1.801600	1.773900	1.806200	1.784800						
22	20	1.755520	1.758300	1.760200	1.720300	1.707800	22	20	1.778400	1.804300	1.737900	1.770500	1.757000						
23	20	1.780300	1.798400	1.770200	1.743200	1.713200	23	20	1.827600	1.792300	1.792300	1.775300	1.781000						
24	20	1.770400	1.745100	1.769500	1.727400	1.714600	24	20	1.798200	1.799000	1.777700	1.768100	1.773300						
25							25												
26							26												
27							27												
28							28												
29							29												
30							30												
31	25	2.238800	2.251800	2.190100	2.193900	2.130900	31	25	2.328000	2.307000	2.222300	2.246100	2.228900						
32	25	2.259600	2.262600	2.250700	2.170800	2.175400	32	25	2.349800	2.311200	2.251600	2.218900	2.244600						
33	25	2.251500	2.252800	2.248500	2.177000	2.184500	33	25	2.348300	2.319800	2.301000	2.266600	2.271800						
34	25	2.247000	2.206300	2.201800	2.198900	2.169000	34	25	2.272500	2.285400	2.235000	2.267100	2.200700						
35	25	2.278700	2.206200	2.273100	2.203100	2.158800	35	25	2.347100	2.325700	2.273500	2.252500	2.256500						
36	25	2.280100	2.218200	2.276900	2.202100	2.158600	36	25	2.318000	2.338000	2.278200	2.242800	2.242800						
37	25	2.264300	2.248900	2.228100	2.209600	2.193400	37	25	2.320300	2.308500	2.237700	2.225800	2.211700						
38	25	2.267900	2.256400	2.228400	2.194000	2.164300	38	25	2.343700	2.303800	2.280300	2.265400	2.225900						
39	25	2.247300	2.258200	2.236700	2.178400	2.150200	39	25	2.318900	2.322000	2.254400	2.249500	2.208800						

RECALCULATED CONCENTRATION										RECOVERY (%)									
N°	CONCENTRATION	serie 1	serie 2	serie 3	serie 4	serie 5	serie 6	N°	RECOVERY (%)	serie 1	serie 2	serie 3	serie 4	serie 5	serie 6				
1	15	14.89	15.03	14.86	15.30	14.88	#DIV/0!	1	15	99%	100%	99%	100%	98%	#DIV/0!				
2	15	15.10	15.16	15.22	14.72	15.10	#DIV/0!	2	15	101%	101%	101%	98%	101%	#DIV/0!				
3	15	15.18	15.24	15.02	15.08	15.22	#DIV/0!	3	15	101%	102%	100%	101%	101%	#DIV/0!				
4	15	15.48	15.16	14.88	14.91	15.41	#DIV/0!	4	15	103%	101%	99%	103%	99%	#DIV/0!				
5	15	15.84	15.27	15.28	14.87	15.29	#DIV/0!	5	15	106%	102%	102%	99%	102%	#DIV/0!				
6	15	15.19	15.35	15.00	14.89	15.35	#DIV/0!	6	15	101%	102%	100%	99%	102%	#DIV/0!				
7	15	15.07	15.07	14.90	14.88	15.42	#DIV/0!	7	15	100%	99%	99%	103%	99%	#DIV/0!				
8	15	14.84	14.84	14.66	15.27	15.47	#DIV/0!	8	15	99%	99%	101%	98%	102%	#DIV/0!				
9	15	14.78	14.96	15.11	14.85	15.44	#DIV/0!	9	15	99%	100%	101%	99%	103%	#DIV/0!				
10		1.42	1.24	1.41	1.54	1.19	#DIV/0!	10		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!				
11		1.42	1.24	1.41	1.54	1.19	#DIV/0!	11		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!				
12		1.42	1.24	1.41	1.54	1.19	#DIV/0!	12		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!				
13		1.42	1.24	1.41	1.54	1.19	#DIV/0!	13		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!				
14		1.42	1.24	1.41	1.54	1.19	#DIV/0!	14		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!				
15		1.42	1.24	1.41	1.54	1.19	#DIV/0!	15		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!				
16	20	19.71	20.77	19.88	20.36	20.70	#DIV/0!	16	20	99%	104%	99%	102%	104%	#DIV/0!				
17	20	20.45	20.52	20.28	20.82	20.70	#DIV/0!	17	20	102%	103%	101%	104%	104%	#DIV/0!				
18	20	20.41	20.28	20.19	19.92	20.80	#DIV/0!	18	20	102%	101%	101%	100%	104%	#DIV/0!				
19	20	20.25	20.43	20.15	20.02	20.40	#DIV/0!	19	20	101%	102%	101%	100%	102%	#DIV/0!				
20	20	20.64	20.51	20.04	20.49	20.53	#DIV/0!	20	20	103%	103%	100%	102%	103%	#DIV/0!				
21	20	20.77	20.36	20.13	20.86	20.88	#DIV/0!	21	20	104%	102%	101%	104%	104%	#DIV/0!				
22	20	20.39	20.39	19.75	20.48	20.57	#DIV/0!	22	20	100%	99%	102%	102%	103%	#DIV/0!				
23	20	20.51	20.26	20.14	20.59	20.69	#DIV/0!	23	20	103%	101%	102%	103%	103%	#DIV/0!				
24	20	20.21	20.33	20.17	20.45	20.75	#DIV/0!	24	20	102%	102%	101%	102%	104%	#DIV/0!				
25		1.42	1.24	1.41	1.54	1.19	#DIV/0!	25		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!				
26		1.42	1.24	1.41	1.54	1.19	#DIV/0!	26		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!				
27		1.42	1.24	1.41	1.54	1.19	#DIV/0!	27		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!				
28		1.42	1.24	1.41	1.54	1.19	#DIV/0!	28		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!				
29		1.42	1.24	1.41	1.54	1.19	#DIV/0!	29		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!				
30		1.42	1.24	1.41	1.54	1.19	#DIV/0!	30		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!				
31	25	25.74	25.73	24.86	25.57	25.78	#DIV/0!	31	25	103%	103%	99%	102%	103%	#DIV/0!				
32	25	25.97	25.77	25.17	25.28	25.73	#DIV/0!	32	25	104%	103%	101%	101%	103%	#DIV/0!				
33	25	25.95	25.86	25.69	25.79	25.25	#DIV/0!	33	25	104%	103%	103%	103%	103%	#DIV/0!				
34	25	25.16	25.50	25.00	25.79	25.47	#DIV/0!	34	25	101%	102%	100%	103%	102%	#DIV/0!				
35	25	25.94	25.92	25.40	25.64	26.09	#DIV/0!	35	25	104%	104%	102%	103%	104%	#DIV/0!				
36	25	25.64	26.06	25.45	25.36	25.93	#DIV/0!	36	25	103%	104%	102%	101%	104%	#DIV/0!				
37	25	25.86	25.74	25.03	25.35	25.59	#DIV/0!	37	25	103%	103%	100%	101%	102%	#DIV/0!				
38	25	25.90	25.69	25.48	25.77	25.75	#DIV/0!	38	25	104%	103%	102%	103%	103%	#DIV/0!				
39	25	25.64	25.89	25.20	25.60	25.56	#DIV/0!	39	25	103%	104%	101%	102%	102%	#DIV/0!				



## Annexe 23 : Résultats bruts de validation de la dopamine

Le Tableau suivant ainsi que la Figure S31 contient les données brutes des droites de calibrations obtenues lors de chaque série de validation.

Droites de calibration de la dopamine					
Séries	1	2	3	4	5
Pente	0.113376	0.115084	0.114604	0.114205	0.113173
Ordonnées à l'origine	-0.89	-1.86	-2.18	-2.52E+00	-2.12E+00
R <sup>2</sup>	0.99977	0.99950	0.99918	0.99963	0.99959

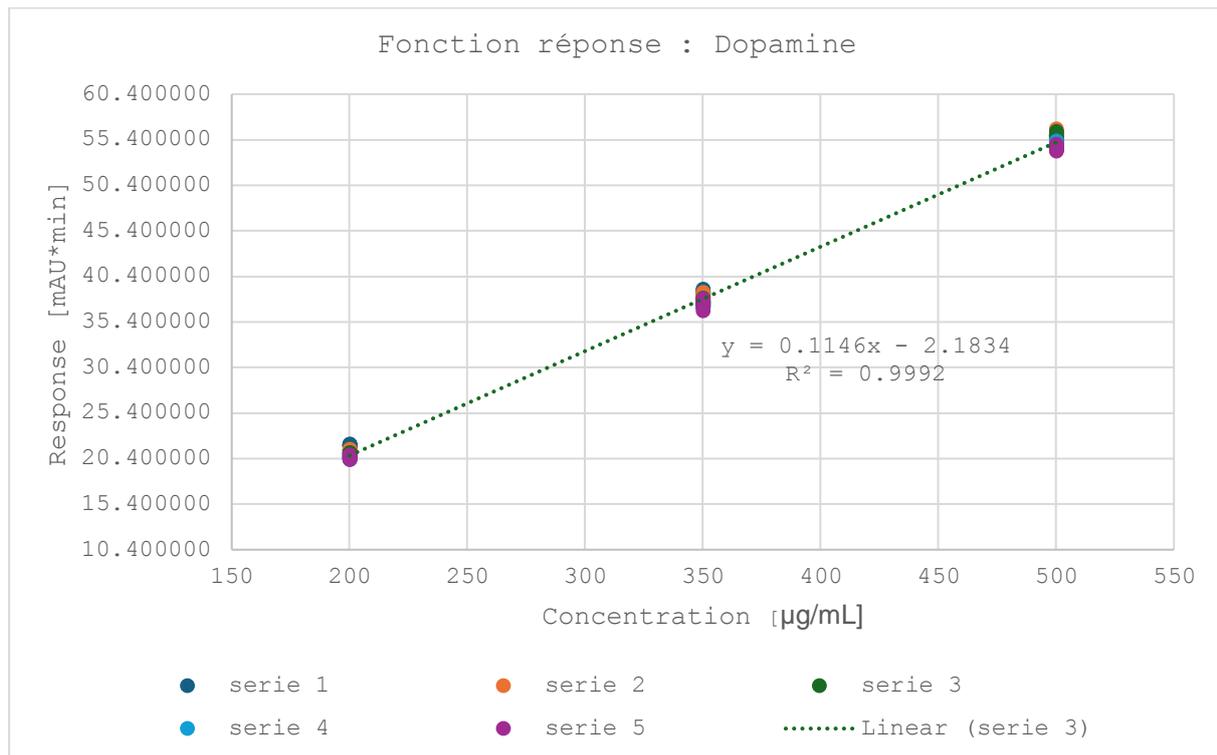


Figure S31 : Droites de calibration de la dopamine durant le processus de validation

Le Tableau ci-dessous contient les données brutes de l'incertitude relative de mesure de la méthode UHPLC-UV pour la dopamine.

Profil d'incertitude relative de la dopamine					
VALIDATION	CONCENTRATION	SIT	t	Rel. Uncert.	limit sup
1st Validation point	200.0	1.1%	2.23	2.53%	5.00%
2nd Validation point	350.0	0.9%	2.11	1.98%	5.00%
3rd Validation point	500.0	0.8%	2.06	1.71%	5.00%

CALIBRATION						VALIDATION							
N°	CONCENTRATION	serie 1	serie 2	serie 3	serie 4	serie 5	N°	CONCENTRATION	serie 1	serie 2	serie 3	serie 4	serie 5
1	200	21.703000	20.380400	20.543000	20.323000	20.332400	1	200	21.304100	20.753300	20.683000	20.363900	19.844700
2	200	21.844500	21.390000	20.776500	20.738400	20.627600	2	200	21.630800	20.686000	20.627000	20.627000	20.327200
3	200	21.992900	21.414200	20.886500	20.352500	20.789500	3	200	21.511700	21.137900	20.848500	20.633300	20.442000
4	200	21.754900	21.238100	20.920600	20.410200	20.373500	4	200	21.349100	20.948500	20.656000	20.394800	19.991600
5	200	21.909700	21.383900	20.970700	20.643200	20.799400	5	200	21.753100	20.943000	20.664100	20.425800	20.248300
6	200	21.884200	21.349800	21.092700	20.525700	20.612000	6	200	21.738600	21.389400	20.494600	20.560900	20.562800
7	200	21.735100	21.240700	20.993900	20.528900	20.283600	7	200	21.394800	20.994200	20.647100	20.557600	20.198200
8	200	21.982900	21.179600	20.802700	20.545600	20.491700	8	200	21.570700	20.985600	20.547000	20.498100	20.266400
9	200	21.943400	21.247400	20.731200	20.434800	20.661700	9	200	21.385000	21.233000	20.622700	20.657100	20.341700
10							10						
11							11						
12							12						
13							13						
14							14						
15							15						
16	350	38.410800	37.647900	37.662400	36.981000	37.074300	16	350	38.723600	37.494900	36.861400	37.160200	36.511400
17	350	38.376100	37.951700	38.044800	37.136700	37.524000	17	350	38.252300	37.914300	37.254500	37.579600	37.120200
18	350	38.741000	38.113500	37.885000	37.371200	37.704500	18	350	38.364000	38.192600	37.300400	37.650600	36.721600
19	350	38.863200	38.112100	37.863000	37.053900	36.598500	19	350	38.364800	37.731000	36.889900	37.134600	36.749300
20	350	38.006500	38.264900	37.421100	37.259300	37.465300	20	350	38.695500	37.862300	37.827800	37.150600	36.918500
21	350	38.655900	38.235500	37.487000	37.113800	37.475500	21	350	38.436300	38.264600	37.529200	37.076900	37.380200
22	350	38.586200	38.308000	37.345700	37.107400	37.261000	22	350	38.481600	37.761500	36.821300	37.245200	36.424200
23	350	38.686900	38.514000	37.746300	37.245300	37.977500	23	350	38.578500	38.402200	37.445500	37.814600	36.694900
24	350	38.505900	38.660000	37.629600	37.221700	37.369600	24	350	38.473300	38.200100	37.158900	37.398400	37.241300
25							25						
26							26						
27							27						
28							28						
29							29						
30							30						
31	500	55.451800	55.406600	54.899600	54.504700	54.553300	31	500	56.206100	55.191100	54.918500	54.096800	53.776800
32	500	55.626700	55.692700	54.753900	54.314400	54.548400	32	500	56.392600	55.061700	54.775100	54.663500	54.086000
33	500	55.946700	55.696500	55.123700	55.351000	54.339600	33	500	55.585900	54.676900	55.116200	54.315500	54.406800
34	500	55.876600	55.462800	54.630800	54.555200	54.401500	34	500	56.248600	55.050800	54.961400	53.930800	53.720600
35	500	56.319600	56.591500	55.188100	54.829900	55.874600	35	500	55.875600	55.262200	54.806600	55.084000	54.781100
36	500	56.134900	56.037500	56.332600	54.637200	54.919700	36	500	55.962900	56.062100	54.545100	54.397500	54.516700
37	500	55.821400	55.403300	54.895900	55.043000	54.136700	37	500	55.509600	55.305700	55.068400	54.267100	53.634000
38	500	55.842200	55.765300	55.596800	54.677800	54.233200	38	500	56.156200	56.023900	55.186800	55.253300	53.379000
39	500	55.846000	56.064200	55.928500	54.675200	54.674100	39	500	56.219000	55.729400	54.710800	54.366700	53.377000

RECALCULATED CONCENTRATION						RECOVERY (%)								
N°	CONCENTRATION	serie 1	serie 2	serie 3	serie 4	serie 5	serie 6	RECOVERY (%)	serie 1	serie 2	serie 3	serie 4	serie 5	serie 6
1	200	198.72	198.50	199.53	200.40	198.98	#DIV/0!	1	200	98%	98%	100%	100%	97%
2	200	198.33	198.13	198.71	202.70	198.37	#DIV/0!	2	200	100%	99%	101%	99%	#DIV/0!
3	200	197.55	199.84	200.97	202.75	199.38	#DIV/0!	3	200	99%	100%	101%	100%	#DIV/0!
4	200	198.20	199.29	200.67	200.67	195.40	#DIV/0!	4	200	99%	100%	100%	98%	#DIV/0!
5	200	199.69	198.15	199.36	200.94	197.67	#DIV/0!	5	200	100%	99%	100%	100%	#DIV/0!
6	200	199.55	202.02	197.79	202.12	200.62	#DIV/0!	6	200	100%	101%	99%	101%	#DIV/0!
7	200	198.52	199.21	197.23	202.09	197.23	#DIV/0!	7	200	99%	98%	100%	99%	#DIV/0!
8	200	198.07	198.52	198.34	201.57	197.83	#DIV/0!	8	200	99%	99%	99%	101%	#DIV/0!
9	200	200.67	200.67	199.00	202.96	198.49	#DIV/0!	9	200	98%	100%	99%	101%	#DIV/0!
10		7.81	16.17	19.05	22.09	18.75	#DIV/0!	10		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
11		7.81	16.17	19.05	22.09	18.75	#DIV/0!	11		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
12		7.81	16.17	19.05	22.09	18.75	#DIV/0!	12		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
13		7.81	16.17	19.05	22.09	18.75	#DIV/0!	13		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
14		7.81	16.17	19.05	22.09	18.75	#DIV/0!	14		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
15		7.81	16.17	19.05	22.09	18.75	#DIV/0!	15		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
16	350	349.36	341.97	340.69	347.47	341.37	#DIV/0!	16	350	100%	98%	97%	99%	#DIV/0!
17	350	345.20	345.62	351.14	346.75	346.75	#DIV/0!	17	350	99%	99%	98%	100%	#DIV/0!
18	350	346.19	348.04	344.52	351.76	343.23	#DIV/0!	18	350	99%	99%	98%	101%	#DIV/0!
19	350	346.19	344.03	340.94	347.24	343.47	#DIV/0!	19	350	99%	98%	97%	99%	#DIV/0!
20	350	347.99	346.04	349.21	344.97	344.97	#DIV/0!	20	350	99%	100%	99%	99%	#DIV/0!
21	350	346.83	348.66	346.52	346.74	348.05	#DIV/0!	21	350	99%	100%	99%	100%	#DIV/0!
22	350	347.22	344.29	340.34	348.21	340.60	#DIV/0!	22	350	99%	99%	97%	99%	#DIV/0!
23	350	348.08	349.86	345.79	353.20	342.99	#DIV/0!	23	350	99%	100%	99%	101%	#DIV/0!
24	350	347.15	348.10	343.29	349.55	347.82	#DIV/0!	24	350	99%	99%	100%	99%	#DIV/0!
25		7.81	16.17	19.05	22.09	18.75	#DIV/0!	25		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
26		7.81	16.17	19.05	22.09	18.75	#DIV/0!	26		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
27		7.81	16.17	19.05	22.09	18.75	#DIV/0!	27		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
28		7.81	16.17	19.05	22.09	18.75	#DIV/0!	28		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
29		7.81	16.17	19.05	22.09	18.75	#DIV/0!	29		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
30		7.81	16.17	19.05	22.09	18.75	#DIV/0!	30		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
31	500	496.74	496.74	498.25	496.77	493.93	#DIV/0!	31	500	101%	99%	100%	99%	#DIV/0!
32	500	494.62	497.00	496.66	496.66	496.66	#DIV/0!	32	500	101%	99%	100%	99%	#DIV/0!
33	500	496.09	493.01	499.68	499.52	497.88	#DIV/0!	33	500	100%	99%	100%	100%	#DIV/0!
34	500	503.93	494.52	498.63	494.31	493.43	#DIV/0!	34	500	101%	99%	100%	99%	#DIV/0!
35	500	496.36	497.27	504.41	502.80	502.80	#DIV/0!	35	500	100%	99%	101%	99%	#DIV/0!
36	500	501.41	503.31	495.00	500.46	500.46	#DIV/0!	36	500	100%	101%	99%	100%	#DIV/0!
37	500	497.86	496.74	499.55	497.26	492.67	#DIV/0!	37	500	100%	99%	100%	99%	#DIV/0!
38	500	503.12	503.60	505.89	493.41	493.41	#DIV/0!	38	500	101%	101%	101%	98%	#DIV/0!
39	500	503.67	500.42	496.44	498.13	490.40	#DIV/0!	39	500	101%	100%	100%	98%	#DIV/0!

RELATIVE BIAS (%)							
	RELATIVE BIAS (%)	serie 1	serie 2	serie 3	serie 4	serie 5	serie 6
1	200	-2%	-2%	0%	0%	-3%	#DIV/0!
2	200	-1%	-1%	0%	1%	-1%	#DIV/0!
3	200	-1%	0%	0%	1%	0%	#DIV/0!
4	200	-2%	0%	0%	0%	-2%	#DIV/0!
5	200	0%	-1%	0%	0%	-1%	#DIV/0!
6	200	0%	1%	-1%	1%	0%	#DIV/0!
7	200	-2%	-1%	0%	1%	-1%	#DIV/0!
8	200	-1%	-1%	-1%	1%	-1%	#DIV/0!
9	200	-2%	0%	-1%	1%	-1%	#DIV/0!
10		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
11		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
12		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
13		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
14		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
15		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
16	350	0%	-2%	-3%	-1%	-2%	#DIV/0!
17	350	-1%	-2%	-2%	0%	-2%	#DIV/0!
18	350	-1%	-1%	-2%	1%	-2%	#DIV/0!
19	350	-1%	-2%	-3%	-1%	-2%	#DIV/0!
20	350	-1%	0%	-1%	-1%	-2%	#DIV/0!
21	350	-1%	0%	-1%	-1%	0%	#DIV/0!
22	350	-1%	-2%	-3%	-1%	-3%	#DIV/0!
23	350	-1%	0%	-1%	1%	-2%	#DIV/0!
24	350	-1%	-1%	-2%	0%	-1%	#DIV/0!
25		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
26		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
27		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
28		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
29		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
30		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
31	500	1%	-1%	0%	-1%	-1%	#DIV/0!
32	500	1%	-1%	0%	0%	-1%	#DIV/0!
33	500	0%	-1%	0%	0%	0%	#DIV/0!
34	500	1%	-1%	0%	-1%	-1%	#DIV/0!
35	500	0%	-1%	-1%	1%	1%	#DIV/0!
36	500	0%	1%	-1%	0%	0%	#DIV/0!
37	500	0%	-1%	0%	-1%	-1%	#DIV/0!
38	500	1%	1%	0%	1%	-2%	#DIV/0!
39	500	1%	0%	-1%	0%	-2%	#DIV/0!

1st Validation point - based on recovery (%)						
CONCENTRATION	serie 1	serie 2	serie 3	serie 4	serie 5	serie 6
200	97.9%	98.3%	99.8%	100.2%	99.8%	97.5%
200	99.2%	99.6%	99.4%	101.4%	99.2%	#DIV/0!
200	98.8%	99.9%	100.5%	101.4%	99.7%	#DIV/0!
200	98.1%	99.1%	99.6%	100.3%	97.7%	#DIV/0!
200	99.8%	99.1%	99.7%	100.5%	98.8%	#DIV/0!
200	99.8%	101.3%	98.9%	101.1%	100.3%	#DIV/0!
200	98.3%	99.3%	99.6%	101.0%	98.6%	#DIV/0!
200	99.0%	99.3%	99.2%	100.8%	98.9%	#DIV/0!
200	98.2%	100.3%	99.5%	101.5%	99.2%	#DIV/0!
0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
MEAN	98.8%	99.5%	99.6%	100.9%	98.9%	#DIV/0!
VARIANCE	5.36E-05	6.44E-05	1.95E-05	2.29E-05	5.36E-05	#DIV/0!
N°	9	9	9	9	9	0
	s2W	s2B	s2IP			
	4.80E-05	6.63E-05	1.14E-04			
	Trueness	RSDr - Repeatability	RSDR - Reproducibility			
200	99.53%	0.69%	1.07E-02			
<b>Parameters</b>		N (Series x Repetitions)		45		
t	2.02	Nb Series		5		
df	44	Nb Repetitions		9		
Risk α	0.05	Risk β		95%		
		limit		5%		

2nd Validation point - based on recovery (%)						
CONCENTRATION	serie 1	serie 2	serie 3	serie 4	serie 5	serie 6
350	99.8%	97.7%	97.3%	99.3%	97.5%	#DIV/0!
350	98.6%	98.7%	98.3%	100.3%	99.1%	#DIV/0!
350	98.9%	99.4%	98.4%	100.5%	98.1%	#DIV/0!
350	98.9%	98.3%	97.4%	99.2%	98.1%	#DIV/0!
350	99.4%	98.9%	99.8%	99.3%	99.8%	#DIV/0!
350	99.1%	99.6%	99.0%	99.1%	99.7%	#DIV/0!
350	99.2%	98.4%	97.2%	99.5%	97.3%	#DIV/0!
350	99.5%	100.0%	98.8%	100.9%	98.0%	#DIV/0!
350	99.2%	99.5%	98.1%	99.9%	98.4%	#DIV/0!
0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
MEAN	99.2%	98.9%	98.3%	99.8%	98.4%	#DIV/0!
VARIANCE	1.24E-05	5.40E-05	7.26E-05	4.45E-05	6.83E-05	#DIV/0!
N°	9	9	9	9	9	0
	s2W	s2B	s2IP			
	5.04E-05	3.10E-05	8.13E-05			
	Trueness	RSDr - Repeatability	RSDR - Reproducibility			
350	98.92%	0.71%	0.90%			

3rd Validation point - based on recovery (%)						
CONCENTRATION	serie 1	serie 2	serie 3	serie 4	serie 5	serie 6
500	100.7%	99.1%	99.7%	99.2%	98.8%	#DIV/0!
500	101.0%	98.9%	99.4%	100.1%	99.3%	#DIV/0!
500	99.6%	98.6%	100.0%	99.5%	99.9%	#DIV/0!
500	100.8%	98.9%	99.7%	98.9%	98.7%	#DIV/0!
500	100.1%	99.3%	99.5%	100.9%	100.6%	#DIV/0!
500	100.3%	100.7%	99.0%	99.7%	100.1%	#DIV/0!
500	99.6%	99.3%	99.9%	99.5%	98.5%	#DIV/0!
500	100.6%	100.6%	100.1%	101.2%	98.1%	#DIV/0!
500	100.7%	100.1%	99.3%	99.6%	98.1%	#DIV/0!
0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
MEAN	100.4%	99.5%	99.6%	99.8%	99.1%	#DIV/0!
VARIANCE	2.75E-05	5.72E-05	1.32E-05	5.89E-05	8.10E-05	#DIV/0!
N°	9	9	9	9	9	0
	s2W	s2B	s2IP			
	4.76E-05	1.66E-05	6.42E-05			
	Trueness	RSDr - Repeatability	RSDR - Reproducibility			
500	99.69%	0.69%	0.80%			

## Annexe 24 : Résultats bruts de validation de l'isoprénaline

Le Tableau suivant ainsi que la Figure S32 contient les données brutes des droites de calibrations obtenues lors de chaque série de validation.

Droites de calibration de l'isoprénaline					
Séries	1	2	3	4	5
Pente	0.070420	0.073954	0.075111	0.073533	0.073248
Ordonnées à l'origine	-0.02	-0.02	-0.11	-6.74E-02	-1.25E-01
R <sup>2</sup>	0.99754	0.99714	0.99498	0.99720	0.99255

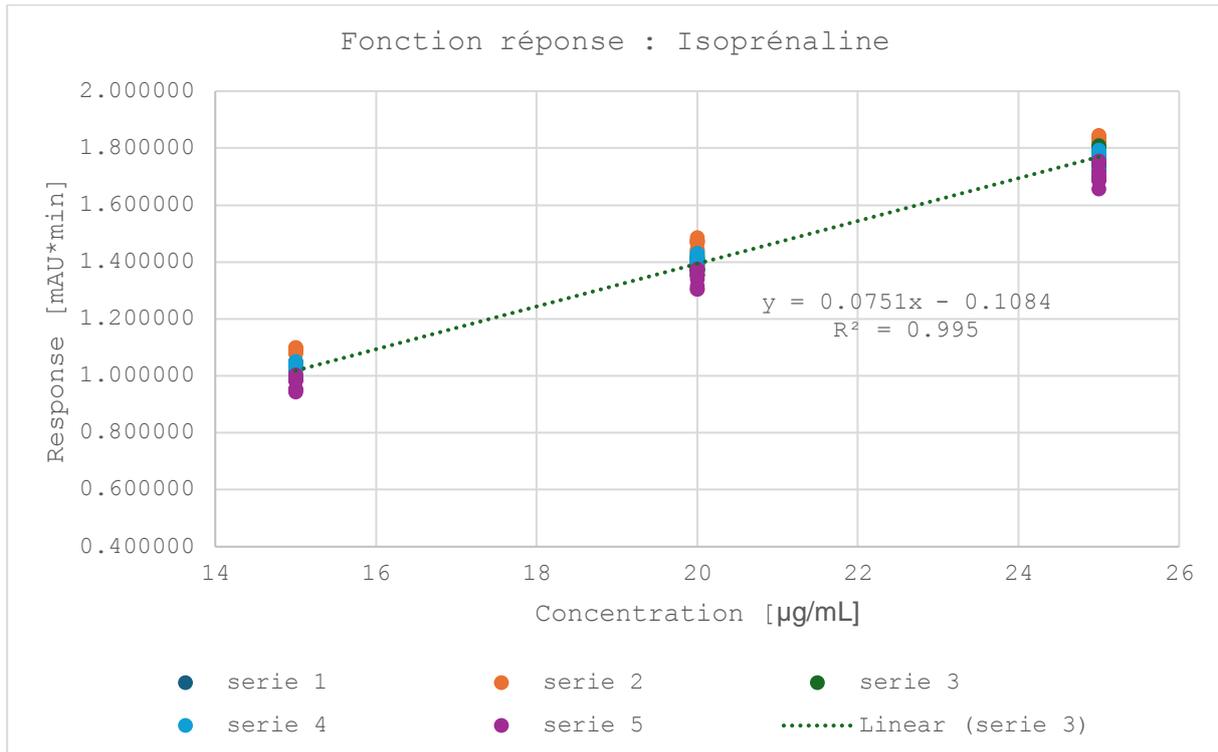


Figure S32 : Droites de calibration de l'isoprénaline durant le processus de validation

Le Tableau ci-dessous contient les données de l'incertitude relative de mesure de la méthode UHPLC-UV pour l'isoprénaline.

Profil d'incertitude relative de la dopamine					
VALIDATION	CONCENTRATION	SIT	t	Rel. Uncert.	limit sup
1st Validation point	15.0	2.1%	2.02	4.14%	5.00%
2nd Validation point	20.0	1.9%	2.04	3.84%	5.00%
3rd Validation point	25.0	1.6%	2.11	3.39%	5.00%

Statistics sheet for analytical method validation																			
CALIBRATION										VALIDATION									
N°	CONCENTRATION	serie 1	serie 2	serie 3	serie 4	serie 5	N°	CONCENTRATION	serie 1	serie 2	serie 3	serie 4	serie 5						
1	15	1.029300	1.063000	0.991700	1.036500	0.951700	1	15	1.043600	1.042700	1.026500	1.046500	0.976700						
2	15	1.034400	1.029700	1.051100	1.051100	0.982800	2	15	1.061400	1.069800	1.039800	1.016500	1.018500						
3	15	1.038000	1.099000	1.022900	1.028600	1.002500	3	15	1.065300	1.020500	1.111900	1.019000	1.017700						
4	15	1.032900	1.031500	1.031900	1.031500	0.943400	4	15	1.030500	1.087200	1.061500	1.060900	0.988100						
5	15	1.042100	1.088800	1.025100	1.025100	0.947200	5	15	1.049500	1.093200	1.015400	1.081400	0.957300						
6	15	1.046900	1.047800	1.041200	1.041200	0.954700	6	15	1.047300	1.045200	1.043700	1.043700	1.038000						
7	15	1.031400	1.077900	1.030800	1.045200	0.993700	7	15	1.046400	1.042700	1.022000	1.058700	0.975800						
8	15	1.036600	1.098400	1.036200	1.035000	0.984400	8	15	1.060900	1.091900	1.036300	1.071600	0.979000						
9	15	1.044700	1.097300	1.035100	0.995500	0.985200	9	15	1.062800	1.080300	1.071600	1.036300	1.029500						
10							10												
11							11												
12							12												
13							13												
14							14												
15							15												
16	20	1.376100	1.475600	1.395000	1.405500	1.340000	16	20	1.373500	1.416200	1.424300	1.420100	1.323100						
17	20	1.404900	1.469900	1.377800	1.408000	1.304800	17	20	1.415700	1.454900	1.445800	1.413400	1.351600						
18	20	1.398600	1.486400	1.371900	1.401700	1.353300	18	20	1.429600	1.431400	1.462500	1.451600	1.367900						
19	20	1.433400	1.391900	1.391400	1.304500	1.379900	19	20	1.379900	1.467000	1.407900	1.381300	1.325300						
20	20	1.375200	1.472900	1.426000	1.373900	1.429200	20	20	1.421200	1.456900	1.468600	1.370400	1.235500						
21	20	1.369000	1.442800	1.418900	1.429400	1.367900	21	20	1.403600	1.479500	1.375100	1.431600	1.331000						
22	20	1.389300	1.441300	1.388100	1.407500	1.315900	22	20	1.394900	1.464900	1.408500	1.420300	1.302500						
23	20	1.409600	1.464700	1.413000	1.413000	1.353500	23	20	1.423000	1.447400	1.419700	1.334200	1.342000						
24	20	1.411600	1.475200	1.353500	1.406400	1.376500	24	20	1.432900	1.496200	1.407400	1.427400	1.354500						
25							25												
26							26												
27							27												
28							28												
29							29												
30							30												
31	25	1.720800	1.822800	1.747200	1.773200	1.684600	31	25	1.759200	1.821200	1.748000	1.792200	1.692700						
32	25	1.732300	1.826700	1.802100	1.794000	1.714600	32	25	1.741100	1.880500	1.734400	1.785000	1.742600						
33	25	1.729500	1.835100	1.809500	1.777700	1.743900	33	25	1.799600	1.872500	1.782200	1.745100	1.682300						
34	25	1.741500	1.797600	1.773300	1.771700	1.698900	34	25	1.748400	1.825700	1.765800	1.768700	1.688300						
35	25	1.728300	1.805300	1.776500	1.726600	1.704200	35	25	1.753800	1.868700	1.775400	1.787600	1.706700						
36	25	1.724200	1.844000	1.772600	1.766000	1.750000	36	25	1.794200	1.755000	1.778800	1.790200	1.726500						
37	25	1.739400	1.830600	1.762000	1.760100	1.655900	37	25	1.798600	1.851100	1.751900	1.729300	1.704600						
38	25	1.754900	1.825900	1.765200	1.756400	1.693000	38	25	1.807400	1.874400	1.769700	1.807200	1.738400						
39	25	1.765800	1.841800	1.765900	1.782000	1.690000	39	25	1.798600	1.857900	1.738400	1.798500	1.729000						

RECALCULATED CONCENTRATION										RECOVERY (%)									
N°	CONCENTRATION	serie 1	serie 2	serie 3	serie 4	serie 5	serie 6	RECOVERY (%)	serie 1	serie 2	serie 3	serie 4	serie 5	serie 6					
1	15	15.13	14.38	15.11	15.13	15.04	#DIV/0!	1	15	101%	98%	101%	103%	#DIV/0!					
2	15	15.38	15.15	14.89	14.72	15.61	#DIV/0!	2	15	103%	101%	99%	104%	#DIV/0!					
3	15	15.43	15.32	15.01	14.76	14.92	#DIV/0!	3	15	103%	102%	100%	98%	#DIV/0!					
4	15	14.94	15.58	15.34	15.20	15.20	#DIV/0!	4	15	100%	104%	102%	101%	#DIV/0!					
5	15	15.21	15.07	14.96	15.62	14.78	#DIV/0!	5	15	101%	100%	100%	104%	#DIV/0!					
6	15	15.18	15.16	15.36	15.11	15.47	#DIV/0!	6	15	101%	101%	102%	101%	#DIV/0!					
7	15	15.17	14.38	15.05	15.31	15.03	#DIV/0!	7	15	101%	96%	100%	102%	#DIV/0!					
8	15	15.37	15.05	15.24	15.49	15.07	#DIV/0!	8	15	102%	100%	102%	103%	#DIV/0!					
9	15	14.89	14.89	15.71	15.01	15.76	#DIV/0!	9	15	103%	99%	105%	100%	#DIV/0!					
10		0.31	0.28	1.44	0.92	1.71	#DIV/0!	10		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!					
11		0.31	0.28	1.44	0.92	1.71	#DIV/0!	11		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!					
12		0.31	0.28	1.44	0.92	1.71	#DIV/0!	12		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!					
13		0.31	0.28	1.44	0.92	1.71	#DIV/0!	13		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!					
14		0.31	0.28	1.44	0.92	1.71	#DIV/0!	14		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!					
15		0.31	0.28	1.44	0.92	1.71	#DIV/0!	15		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!					
16	20	19.81	19.43	20.41	20.23	19.77	#DIV/0!	16	20	99%	97%	102%	101%	#DIV/0!					
17	20	20.41	19.96	20.69	20.14	20.16	#DIV/0!	17	20	102%	100%	103%	101%	#DIV/0!					
18	20	20.61	19.64	20.91	20.66	20.38	#DIV/0!	18	20	103%	98%	105%	103%	#DIV/0!					
19	20	19.90	19.99	20.19	19.70	19.80	#DIV/0!	19	20	100%	100%	101%	99%	#DIV/0!					
20	20	20.49	20.01	19.69	20.48	19.37	#DIV/0!	20	20	102%	100%	98%	102%	#DIV/0!					
21	20	20.24	20.29	19.75	20.38	19.88	#DIV/0!	21	20	101%	101%	99%	102%	#DIV/0!					
22	20	20.11	20.09	20.19	20.23	19.49	#DIV/0!	22	20	101%	100%	101%	97%	#DIV/0!					
23	20	20.51	19.86	20.34	20.45	19.92	#DIV/0!	23	20	103%	98%	102%	102%	#DIV/0!					
24	20	20.65	20.18	20.52	20.33	20.20	#DIV/0!	24	20	103%	103%	102%	101%	#DIV/0!					
25		0.31	0.28	1.44	0.92	1.71	#DIV/0!	25		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!					
26		0.31	0.28	1.44	0.92	1.71	#DIV/0!	26		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!					
27		0.31	0.28	1.44	0.92	1.71	#DIV/0!	27		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!					
28		0.31	0.28	1.44	0.92	1.71	#DIV/0!	28		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!					
29		0.31	0.28	1.44	0.92	1.71	#DIV/0!	29		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!					
30		0.31	0.28	1.44	0.92	1.71	#DIV/0!	30		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!					
31	25	25.29	24.91	24.71	25.29	24.82	#DIV/0!	31	25	101%	100%	99%	101%	#DIV/0!					
32	25	25.44	25.03	24.53	25.19	25.50	#DIV/0!	32	25	103%	102%	98%	102%	#DIV/0!					
33	25	25.86	25.60	24.44	25.53	25.33	#DIV/0!	33	25	103%	102%	98%	102%	#DIV/0!					
34	25	25.13	24.97	24.95	24.94	24.76	#DIV/0!	34	25	101%	100%	100%	99%	#DIV/0!					
35	25	25.55	25.08	25.08	25.23	25.01	#DIV/0!	35	25	101%	102%	100%	101%	#DIV/0!					
36	25	25.79	25.32	25.13	25.26	25.28	#DIV/0!	36	25	103%	101%	101%	101%	#DIV/0!					
37	25	25.28	25.32	24.76	24.88	25.32	#DIV/0!	37	25	103%	101%	99%	101%	#DIV/0!					
38	25	25.97	25.63	25.00	25.49	25.44	#DIV/0!	38	25	104%	103%	100%	102%	#DIV/0!					
39	25	25.85	25.41	24.59	25.37	25.31	#DIV/0!	39	25	103%	102%	98%	101%	#DIV/0!					



