

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU

FACULTÉ DES SCIENCES

DÉPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIÈRE
FILIÈRE : CHIMIE

MÉMOIRE DE MASTER

SPÉCIALITÉ : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

THÈME

Evaluation des performances d'une méthode de dosage du diclofenac diéthylamine gel 1% par Chromatographie Liquide Ultra Performance (UPLC).

Présenté par : **Hamri Naima**

Organisme d'accueil : El Kendi

Soutenu publiquement le : 13/07/2022

Devant le Jury composé de :

Dr MAMOU Marzouk

MCA-HU

UMMTO

Examineur

Dr KICHOU Noura

MCA

UMMTO

Présidente

Dr MOUHEB Lynda

MCB

UMMTO

Encadrant

M^r.YAHIAOUI Idrice

Chef section de contrôle qualité El Kendi

Co-encadrant

REMERCIEMENTS

Avant tout, je remercie Dieu tout puissant de m'avoir donnée la chance d'étudier et de m'avoir donné la force, le courage, et la patience de supporter les difficultés et de dépasser la douleur. Ce projet de fin d'étude n'aurait pas pu aboutir sans la riche collaboration et l'aide précieuse et le soutien infailible de nombreuses personnes. Je désire leur témoigner nos gratitude via ces quelques lignes. Mes remerciements vont particulièrement à :

Ma promotrice : Madame **MOUHEB Lynda**, maitre de conférences B à l'UMMTO.

Quoique je dise, les mots ne seront jamais à la portée de ce que je ressens. Je tiens à vous remercier chaleureusement d'avoir bien voulu encadrer et suivre avec bienveillance la réalisation de ce travail, toutes mes reconnaissances pour vos précieux conseils, aides et surtout pour tout le temps que m'avez pu consacrer à ce mémoire, malgré vos responsabilités.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur **MAMOU Marzouk**, professeur, hospitalo-universitaire à l'UMMTO, d'avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner ce travail.

Mes remerciements vont également à Madame **KICHOU Noura**, maitre de conférences A à l'UMMTO de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette soutenance.

Il est particulièrement agréable de remercier Monsieur **YAHIAOUI Idrice**, mon co-promoteur, chef de section de contrôle qualité à El Kendi pour ses conseils qui m'ont permis de finaliser ce travail ainsi que son soutien tout au long de la réalisation de ce travail.

Mes sincères remerciements à M^{lle} **BOUMATI Anissa** pour son aide, ses conseils, sa gentillesse, et surtout soutien morale

DÉDICACES

Grâce à Allah le tout puissant, j'ai pu achever la réalisation de ce travail, que je tiens chaleureusement à le dédier :

A ceux que tous les mots ne suffisent pour leurs exprimer mon amour « mes chers parents » :

A qui je dois tout dans la vie, pour leurs confiances, leurs amours qui m'accompagnent au quotidien et leurs soutiens et encouragements dans mes études qui n'ont pas toujours été faciles.

A mes deux sœurs :

« LYZA et LAMIA »

Pour leurs soutiens et leurs patiences face à mon impatience et mes caprices.

À toutes ma famille :

Mes tantes mes oncles surtout mon oncle MEZIANE et sa femme NACERA le mari de ma sœur SAID, mes cousines « LYDIA, CYLIA, KAMILIA », pour leurs bienveillances et affection inconditionnelle.

À mes ami(e)s :

« Anissa, LILA »

Pour leurs aides morales leurs écoutes, leurs présences et leurs nombreux encouragements et conseils précieux tout au long de cette période.

Table des matières

-Liste des tableaux

-Liste des figures

-Liste des abréviations

Introduction1

PARTIE THEORIQUE

Chapitre I : Présentation de l'entreprise et du médicament

I. Présentation de l'entreprise EL KENDI	3
I.1 . Les médicaments produits par le laboratoire El KENDI	4
II. Description du TABIFLEX COOL ^R	4
II. 1. Description	4
II. 2. Composition.....	4
II. 3. Mode d'emploi	5
II. 4. Mécanisme d'action	6
II. 5. Effet secondaire	6
II. 6. Contre-indications.....	6
III. Diclofenac diethylamine	6
III. 1. Structures chimiques	7
III. 2. Les propriétés physico-chimiques.....	7
III. 3. Synthèse du diclofenac	8
III. 4. Pharmacocinétique.....	9
III. 5. Pharmacodynamie.....	10

Références

Chapitre II : Validation analytique

I. Définition de la validation analytique.....	11
I.1. Définition d'une méthode analytique.....	11
II. Objectif de la validation analytique.....	11

III.	Les différents types de procédure analytique.....	12
IV.	Aspect réglementaire.....	12
IV.1.	ICH (International Conference of Harmonisation).....	12
IV.2.	Pharmacopées.....	13
IV.3.	Bonne pratique de fabrication (BPF).....	13
IV.4.	Bonne pratique de laboratoire (BPL).....	14
V.	Paramètres de la validation analytique.....	14

Références

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre III : Matériel et Méthodes

I.	Matériel.....	17
I. 1.	Produits et réactifs utilisés.....	17
I. 2.	Instruments et verreries.....	17
I. 3.	Appareillage.....	18
I. 3. 1.	Chromatographie Liquide Ultra Performance UPLC.....	18
I. 3. 2.	Principe	18
I. 4.	Conditions chromatographiques.....	19
II.	Préparations des solutions	19
II. 1.	Méthodologie	19
II. 2.	Les normes.....	20
II. 3.	Formules de calculs	21
II. 4.	Méthodes utilisées pour évaluer les paramètres de la validation analytique.....	21
II. 4. 1.	Spécificité.....	21
II. 4. 2.	Linéarité	21
II. 4. 3.	Exactitude.....	22
II. 4. 4.	Précision.....	23
II. 4. 5.	Robustesse.....	24
II. 4. 5. 1.	Stabilité.....	24

Références

Chapitre IV : Résultats et discussion

I. Spécificité	25
II. Linéarité.....	27
III. Exactitude.....	29
IV. Précision.....	31
IV. 1. Répétabilité de l'injection.....	31
IV. 2. Répétabilité intra-analyse.....	32
IV. 3. Le fidèle intermédiaire.....	33
V. Robustesse.....	34
V. 1. Changement de paramètre.....	34
VI. Stabilité.....	35
Conclusion	38

Annexes

Résumé

Liste des figures

Figure 1 : Laboratoire El KENDI.....	3
Figure 2 : Tabiflex Cool ^R	4
Figure 3 : Structure chimique diclofenac.....	7
Figure 4 : Structure chimique du diethylamine.....	7
Figure 5 : Synthèse du diclofenac via 2-chlorobenzoïque acide et 2,6 dichloroaniline.....	8
Figure 6 : Principe général de fonctionnement de la chromatographie.....	18
Figure 7 : Image représentant UPLC et le rôle de chaque module.....	19
Figure 8 : Chromatogramme de la résolution.....	25
Figure 9 : Chromatogramme du Placebo.....	25
Figure 10 : Chromatogramme du diluent.....	26
Figure 11 : Chromatogramme de la phase mobile.....	26
Figure 12 : Chromatogramme du diclofenac diethylamine.....	26
Figure 13 : Courbe la linéarité.....	29

Liste des tableaux

Tableau 1 : récapitulatif des propriétés physico-chimiques et des utilisations des excipients du Tabiflex Cool ^R	5
Tableau 2 : Propriétés physico-chimiques du diclofenac et le diéthylamine.....	7
Tableau 3 : Choix des critères selon le type de méthodes d'analyse à valider.....	14
Tableau 4 : Récapitulatif des matières premières et réactifs utilisés.....	17
Tableau 5 : Récapitulatif des instruments et la verrerie utilisée.....	17
Tableau 6 : Conditions chromatographiques de l'UPLC.....	19
Tableau 7 : Solutions préparés.....	20
Tableau 8 : Solutions préparées pour la linéarité.....	22
Tableau 9 : Les différentes préparations de l'exactitude.....	23
Tableau 10 : Test de robustesse, changement de paramètres.....	24
Tableau 11 : Résultats de l'étude de linéarité et le calcul du RSD.....	28
Tableau 12 : Résultats du test d'exactitude pour diclofenac diéthylamine.....	30
Tableau 13 : Résultats de l'étude de la répétabilité du diclofenac diéthylamine.....	31
Tableau 14 : Résultats de la répétabilité d'intra-analyse du diclofenac diéthylamine.....	32
Tableau 15 : Résultats de l'étude de la fidélité intermédiaire du diclofenac diéthylamine.....	33
Tableau 16 : Résultats de l'étude de changement de paramètres chromatographiques du diclofenac diéthylamine.....	34
Tableau 17 : Résultats du test de stabilité de diclofenac diéthylamine dans l'auto-injecteur de l'UPLC après 24h.....	35
Tableau 18 : Résultats de l'étude de stabilité du diclofenac diéthylamine après 24 heure dans le réfrigérateur.....	36

Liste des abréviations

AINS : Anti Inflammatoire Non Stéroïdiens.

ICH : Internanional Conference of Harmonisation

SFPSTP : Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

BPF : Bonne Pratique de Fabrication

BPL : Bonne Pratique du Laboratoire

UPLC : Chromatographie Liquide Ultra Performance

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance

STM : Méthode de test Standard

RSD : Relative Standard Déviation

R : Coefficient de corrélation

Filtre PTFE : Polytétrafluoroéthylène

h : Heure

g : Gramme

mg : Milligramme

g/mol : Gramme par mol

M : Concentration molaire

L : Litre

ml : Millilitre

mL /min : Millilitre par minute

µL : Microlitre

v/v : Volume par volume

T° : Température

°C : Degré Celsius

cm : Centimètre

mm : Millimètre

nm : Nano mètre

Introduction générale

Introduction

L'industrie pharmaceutique est le secteur économique qui regroupe les activités de recherches, de fabrication, de conditionnement et de commercialisation des médicaments pour la prévention et le traitement des maladies. Elle est parmi les industries les plus rentables et importantes au monde.

Un médicament n'est pas un produit comme les autres. Il doit être conçu de manière réfléchie, précise et doit répondre à des exigences particulières. Pour répondre à ces exigences de qualité, d'efficacité et de sécurité, chaque industrie pharmaceutique se doit d'établir un bon système d'assurance qualité, et doivent s'assurer que toutes les opérations effectuées dans l'entreprise pharmaceutique sont conformes.

Le contrôle analytique fait partie du processus de l'assurance qualité et garantit la validité du médicament pendant toute sa durée de vie. Avec la mise en place des systèmes d'assurance qualité dans les laboratoires, la validation des méthodes d'analyse est aujourd'hui un objectif très important. Chaque laboratoire est tenu de prouver que les méthodes d'analyses employées pour le contrôle des médicaments sont parfaitement valides, fiables et qu'elles répondent aux objectifs bien précis.

En effet, si la fiabilité d'une méthode analytique n'est pas confirmée, la décision de conformité de cette dernière est annulée. C'est pour cela, qu'avant la mise en routine d'un produit, le laboratoire doit faire l'objet d'une validation d'une méthode analytique qui repose sur un ensemble de mesures expérimentales, tests analytiques qui permettent de prouver qu'une procédure est exacte et fiable.

Le stage pratique de ce projet de fin d'étude a été réalisé au niveau du laboratoire de contrôle qualité d'El-KENDI, industrie des médicaments agréée par le ministère de la santé en Algérie.

La méthode a été déjà validé par HPLC selon les procédures interne de la validation. L'objectif de ce travail a été de transférer la méthode sur un automate UPLC normalement acquis et de vérifier les performances de cette méthode.

Le contenu de ce manuscrit est réparti en deux grandes parties scindées en chapitres :

La première partie comprend une synthèse bibliographique composée de deux chapitres :

- Le chapitre I est dédié à la description du site de production et du médicament Tabiflex Cool^R. Le second chapitre traite quant à lui de l'essentiel portant sur la validation analytique.

Introduction

La deuxième partie est consacrée à la partie pratique et comprend également deux chapitres :

- Le chapitre III qui décrit le matériel et les méthodes utilisées pour évaluer les différents paramètres de la validation analytique.
- Enfin, le chapitre IV expose l'ensemble des résultats obtenus ainsi que leur interprétation.

***Chapitre I : Présentation de
l'entreprise et du médicament***

I. Présentation de l'entreprise EL KENDI

EL KENDI est une entreprise pharmaceutique implantée en Algérie située au niveau de la zone industrielle de Sidi Abdellah (Zéralda), avec investissement direct étranger reconnue comme l'un des acteurs majeurs dans le secteur du médicament. Créée en 2009, employant une équipe compétente qui dépasse 1100 personnes, cette dernière est classée deuxième entreprise pharmaceutique spécialisée dans la fabrication des médicaments génériques.

EL KENDI a pour objectif d'améliorer la qualité de vie de la communauté et faciliter l'accès à des produits de haute qualité et abordables. Elle a récemment intégré le groupe pharmaceutique régional MS Pharma qui est une plateforme lui permettant un accès rapide aux marchés du Maghreb et des pays africains francophones.

La fabrication des médicaments est faite selon les normes internationales, en effet le fabricant, l'analyste, ... assurent la sécurité du patient grâce à l'équipe pharmacovigilance qui suit l'évaluation et la déclaration de l'information. [1]



Figure 1 : Laboratoire EL KENDI

I. 1. Médicaments produits par le laboratoire EL KENDI

EL KENDI a un rôle majeur dans la fabrication de presque toutes les formes pharmaceutiques comme les formes sèches (comprimés, gélules, sachets), liquides, crèmes et gels. Environ 192 variétés de produits sont fabriquées et représentées sous différentes classes thérapeutiques telles que les anti infectieux (FLAZOL), les anti inflammatoires (RAPIDUS), antirhumatismaux (RHUMABREX), anxiolytique (AMITRAL), anti-acnéiques (ACNAL), antiseptique (AIRDITINE), stimulant cardiaque (AROVAN)...ect. [1]

II. Tabiflex Cool^R

II. 1. Description

Produit par le laboratoire pharmaceutique El KENDI, le Tabiflex Cool^R est un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS), appartenant à la classe thérapeutique (rhumatologie). [2] C'est un médicament ayant comme principe actif le diclofenac diéthylamine sous forme d'émulsion gel disponible en tube de 50 g.

Il est généralement utilisé pour le traitement des maladies rhumatismales telles que :

- Mal de dos, entorses et foulures
- Arthrose.
- Articulations périphériques.
- Chirurgie orthopédique
- Épaule gelée, luxations et fractures
- Syndromes de l'épaule-main.



Figure 2 : Tabiflex Cool^R

II. 2. Composition

- **Principe Actif** : diclofenac diéthylamine qui est la substance active. 100g de gel contient 1g de diclofenac diéthylamine. [2]
- **Excipients**

La présence d'excipients est indispensable pour assurer la conservation du médicament. Pour la formulation de cet émulsion gel, la réglementation industrielle d'EL KENDI utilise plusieurs excipients décrits dans le tableau suivant : [2]

Tableau 1 : récapitulatif des propriétés physico-chimiques et des utilisations des excipients du Tabiflex Cool^R [2]

Caractéristiques Excipients	Formule chimique	Propriétés physico-chimiques	Utilisations
Chlorocrésol	C ₇ H ₇ ClO	-Nom : 4-chloro-3- méthyl phénol - Peu soluble dans l'eau - Point de fusion (°C) 63–68 - État physique : cristaux blancs ou roses ou poudre cristalline [3]	Agent conservateur [4]
Carbomère	C ₃ H ₃ NaO ₂	-Macromolécules hydrophiles -Poids moléculaire haut entre 700 000 et 4 000 000 g/mol. [5]	-Agent gélifiant de la phase aqueuse. - stabilisateur d'émulsion. - offre une spécificité douce, agréable et forme des gels transparents. [6]
Propylène glycol	C ₃ H ₈ O ₂	-Température d'ébullition : 187° C. -Température de fusion -60° C -Miscible dans l'eau et l'alcool [7]	- Agent humidifiant. [8]
Alcool isopropylique	C ₃ H ₈ O	-Aspect : liquide incolore -Point d'ébullition : 82°C -Densité : 0,784 – 0,788 -Solubilité : complètement miscible dans l'eau. [9]	-Utiliser dans presque toute les formulation exemple : préparation cosmétologique, pharmaceutique, alimentaire... dans le but d'éviter une contamination microbienne. [10]
Trolamine	C ₆ H ₁₅ NO ₃	-Liquide hygroscopique incolore visqueux ou cristaux d'odeur caractéristique. [11]	- Elle fonctionne comme un solvant similaire aux alcools et peut être estérifiée et gonfler une couche de vernis ou d'huile. C'est également un solvant pénétrant [12]
Parfum de lavande	/	/	-Utiliser comme aromatisant dans différents domaines (pharmaceutique cosmétologie.) [13]

II. 3. Mode d'emploi

Le Tabiflex Cool^R est une préparation cutanée applicable dans la zone douloureuse 3 à 4 fois par jour en frottant légèrement. Elle est conseillée à partir de 12 ans. [14]

II. 4. Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action du Tabiflex Cool^R est l'inhibition de la cyclooxygénase (COX), enzyme clé de la biosynthèse de la prostaglandine. Cette enzyme a été conclue à l'existence de deux iso formes, la COX-1 et COX-2. La COX-1 est constitutivement exprimées dans les cellules normales (les plaquettes, le tractus gastro-intestinal, reins, etc.). Alors que la COX-2 est spécifiquement exprimée dans les cellules inflammatoires et implique des réponses inflammatoires aiguës et chroniques et parfois y'aura une inhibition de l'enzyme COX-1 c'est pour cela qu'il provoque pratiquement des effets indésirables sur le tractus gastro-intestinal. [15]

II. 5. Effets secondaires

Des effets secondaires sont possibles et peuvent se produire à partir d'ingrédients constituant le Tabiflex Cool^R. Ces effets secondaires sont possibles, mais ne se produisent pas toujours. Certains peuvent être rares mais graves. [2] à savoir : indigestion, gaz, nausée, diarrhée, constipation, maux de tête, vertiges, somnolence, nez encombré ou encore hypertension artérielle.

II.6. Contres indications

Le Tabiflex Cool^R est contre indiqué dans les cas suivants :

- ❖ À partir du début du 6^{ème} mois de grossesse. [2]
- ❖ Peau lésée comme dermatoses suintantes, eczéma, hypersensibilité, lésion infectée, brulures ou plaie et selon l'âge d'enfant et adolescent moins de 15 ans. [2].

III. Diclofenac diethylamine**✓ Diclofenac**

Le Diclofenac est un médicament anti-inflammatoire appartenant à la famille des médicaments inflammatoires non stéroïdiens (AINS). Ces derniers représentent une classe pharmacologique importante, largement utilisée en thérapeutique, capables d'exercer une action analgésique, anti-inflammatoire et antipyrétiques, réduisent l'inflammation, la fièvre et la douleur. Le diclofenac possède des propriétés antalgiques (contre les douleurs), antipyrétiques (contre la fièvre) et anti-inflammatoires (contre les inflammations). Il inhibe

aussi les fonctions plaquettaires pendant une courte durée, Ils ont surtout un mécanisme d'action principale de l'inhibition de la synthèse de la prostaglandine. [16]

✓ Diéthylamine

La diéthylamine est une amine secondaire qui se présente sous la forme d'un liquide fortement basique, soluble dans l'eau et l'éthanol. Elle est utilisée comme inhibiteur de corrosion et dans la fabrication de colorants et de résines ainsi que dans le domaine pharmaceutique. [17].

III. 1. Structures chimiques

Les figures suivantes représentent les structures chimiques du diclofenac et la diéthylamine [18], [19]

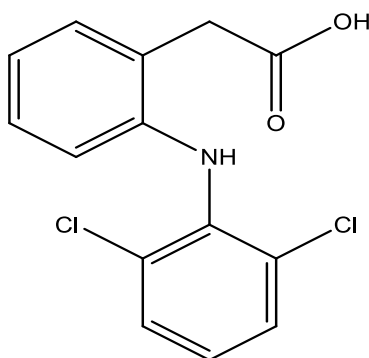


Figure 3 : structure chimique du diclofenac

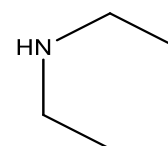


Figure 4 : structure chimique du diéthylamine

III. 2. Propriétés physico-chimique

Le tableau suivant présente les différentes propriétés physico chimiques du diclofenac et de la diéthylamine :

Tableau 2 : propriétés physico-chimiques du diclofenac et le diéthylamine [20] [18]

Classe chimique	Diclofenac [20]	Diéthylamine [18]
Nomenclature	Acide 2-[2-(2,6-dichlorophenyl)aminophényl] éthanoïque	N,N- diéthylamine
Formule brute	$C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$	$C_4H_{11}N$
Masse molaire	$296,149 \text{ g.mol}^{-1} \pm 0,017$	$73,1368 \pm 0,0042 \text{ g.mol}^{-1}$
T° de fusion	283 à 285 °C	-50° C

III. 3. Synthèse

La figure suivante représente la synthèse du diclofenac à partir de 2-chlorobenzoïque acide et 2,6-dichloroaniline. [21]

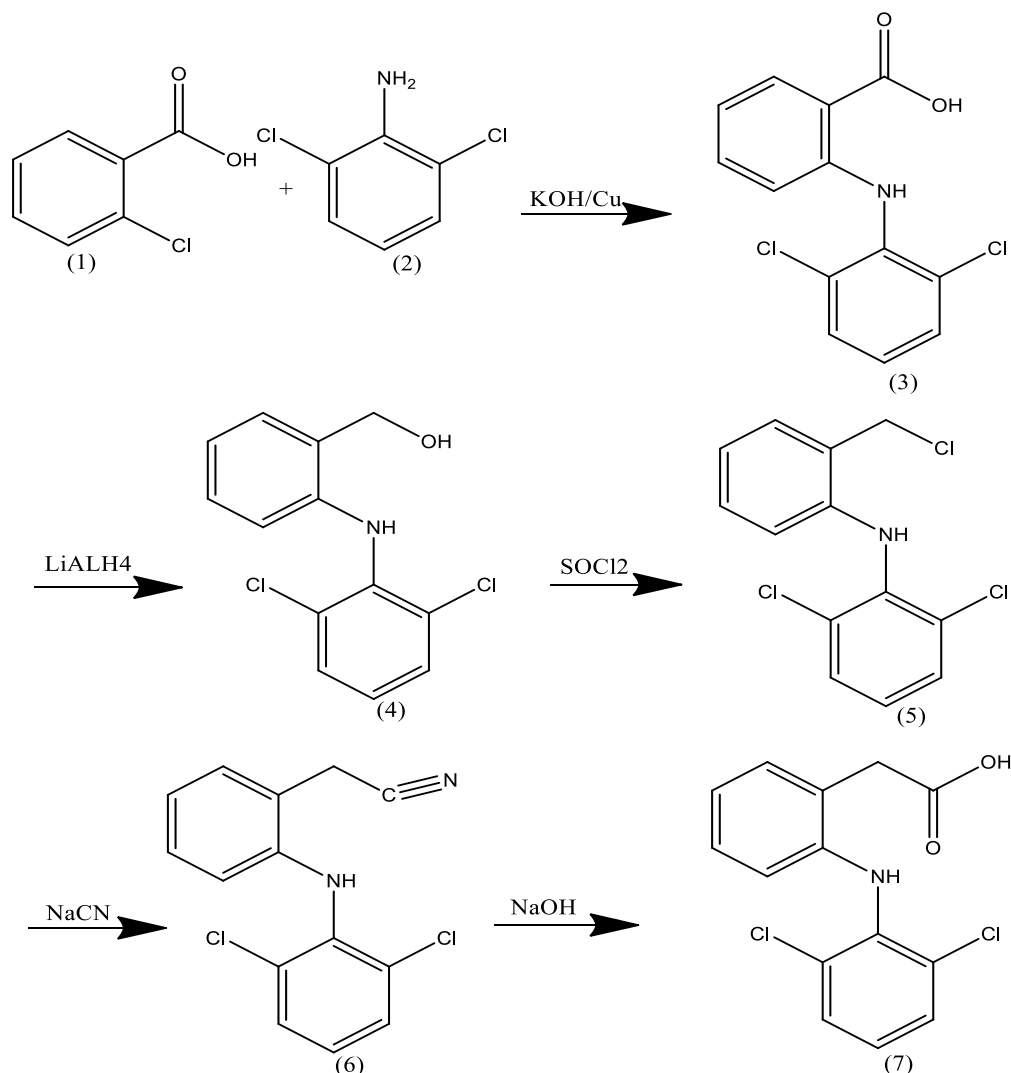


Figure 5 : synthèse du diclofenac via 2-chlorobenzoïque acide et 2,6 dichloroaniline [21]

❖ **Les étapes de la synthèse sont :**

Etape 1 : Réaction de substitution

Substitution de l'acide 2-chlorobenzoïque avec le 2,6-dichloroaniline. Le doublet du NH_2 qui est plus électrophile attaque le carbone portant le chlore, il y aura le départ de la molécule HCl à l'aide d'une base KOH/Cu formant ainsi le composé 3.

Etape 2 : Réaction de chloration

Dans cette étape, premièrement il y aura une réaction du catalyseur LiAlH_4 qui donne Al^+ , LiH_3 avec une case vide et H^- , ce dernier arrache l'hydrogène de la fonction alcool de l'acide, au même moment, le O^- est stabilisé par Li^+ . La case vide du LiH_3 est attirée par le doublet de l'oxygène de la fonction acide, ce qui forme un réseau entre O et LiH_2 , à l'aide d'un autre H^-

qui attaque le carbone portant le réseau former. Il y aura le départ du AlH_2O^- ; grâce à une molécule d'eau, il y aura la formation d'un alcool (composé 4), donc c'est une transformation de l'acide carboxylique en alcool.

Etape 3 : Réaction de chloration

Le composé (4) subit une chloration supplémentaire par le chlorure de thionyle, c'est la substitution du Cl et le départ du H_2O pour former le composé (5).

Etape 4 : Réaction de substitution

Le composé (5) subit une substitution nucléophile du composé cyanure et le départ du HCl pour donner le composé (6).

Etape 5 : Réaction d'hydrolyse

La dernière étape est une hydrolyse du cyanure avec l'hydroxyde de sodium qui conduit au diclofenac (composé 7)

III. 4. Pharmacocinétique**• Absorption**

La quantité du diclofenac absorbée à travers la peau est proportionnelle à la surface traitée et dépend à la fois de la dose totale appliquée et du degré d'hydratation cutanée.

La concentration mesurée dans le liquide synovial, de même que dans le tissu synovial, est 40 fois supérieurs aux concentrations plasmatiques. Le passage systématique du gel est faible par rapport à celui des formes orales du diclofenac. [22]

• Distribution

Les concentrations du diclofenac diéthylamine ont été mesurées dans le plasma, le tissu synovial et le liquide synovial après administration topique du gel sur les articulations de la main et du genou. Les concentrations plasmatiques maximales sont environ 100 fois inférieures à celles mesurées après l'administration orale de la même quantité du diclofenac. [22]

Le diclofenac s'accumule dans la peau, qui agit comme un réservoir à partir duquel le médicament est libéré de manière durable. De là, le diclofenac est distribué et persiste dans les tissus enflammés, comme l'articulation, où on le trouve à des concentrations pouvant être 20 fois supérieures à celle mesurée dans le plasma. [22]

• Métabolisme

Le diclofenac subit un métabolisme oxydatif, la biotransformation fait intervenir une glucoronisation de la molécule, mais essentiellement une hydroxylation simple et multiple de plusieurs métabolites phénoliques. Le principal métabolite phénolique qui est le 4'-hydroxy diclofenac est biologiquement actif mais moins que le diclofenac. [23]

- **Elimination**

La clairance systématique totale du diclofenac plasmatique est de 263 ± 56 ml /min, les demis vies d'élimination plasmatiques sont de 1 à 2 heures. Les métabolites y compris le principal métabolite qui est actif ; présentent également une demi vie de 1 à 3 heures. Le diclofenac et ses métabolites sont essentiellement excrétés dans les urines. [23].

III. 5. Pharmacodynamie

Le diclofénac diéthylamine réduit l'inflammation et par extension diminue les douleurs nociceptives et combat la fièvre. Il augmente également le risque de développer un ulcère gastro-intestinal en inhibant la production de mucus protecteur dans l'estomac. [23].

Références

- [1] : www.elkendi.com [consulté le 5 Avril à 14h]
- [2] : <https://www.tabletwise.net> [consulté le 03 juillet 2022]
- [3] : <https://www.anses.fr> (consulté 17 juin 2022)
- [4] : van Hoecke, H. (2016). Excipients à effet notoire des médicaments à action systémique en médecine bucco-dentaire (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).
- [5] : Soukrati, M. (2013). Préparations de docosanol nanoformulées pour usage topique.
- [6] : Djeraba, S., Nehal, C., & Zohra, F. (2022). Formulation d'un émulgel à base d'actifs naturels.
- [7] : <https://www.merckmillipore.com> [consulté le 03 juillet 2022]
- [8] : Cosmétiques, P.E. Applications pharmaceutiques et cosmétiques des suractifs.
- [9] : <https://www.idealchimic.ch> [consulté le 03 juillet 2022]
- [10] : Lange, C., Richardin, P., Desbene, P. L., Basselier, J. J., & HUC, A. (1985). Etude analytique des lourds du pétrole. *Analisis*, 13(7), 329-332.
- [11] : Posologique, F. S., & fin, U. S. O. Monographie sur les écrans solaires secondaires.
- [12] : Rodriguez, S. H. (2017). Les propriétés, actions et principales problématiques des gels de Pemulen® TR-2. Le choix de la base dans la formulation des gels.
- [13] : Ruggieri, M. (2021). Ethnographie d'un tourisme paysager : l'engouement chinois pour la lavande provençale au XXIe siècle (Doctoral dissertation, Paris, EHESS).
- [14] : <https://www.pharmnet-dz.com> [consulté le 03 juillet 2022]
- [15] : Benoit, E. Anti-inflammatoires non stéroïdien (AINS). Quelles différences d'efficacité, quels effets indésirables, quels critères de sélection.
- [16] : Roussel, A. M., & de Biochimie, E. Focus sur l'inflammation musculo-squelettique et tendineuse.
- [17] : Liu, G., Tian, P., Li, J., Zhang, D., Zhou, F., & Liu, Z. (2008). Synthesis, characterization and catalytic properties of SAPO-34 synthesized using diethylamine as a template. *Microporous and Mesoporous Materials*, 111(1-3), 143-149
- [18] : <https://www.anses.fr> [consulté le 03 juillet 2022]
- [19] : <https://www.merckmillipore.com> [consulté le 03 juillet 2022]
- [20] : Lopes, L. (2014). Matrizes híbridadas-siloxano poliéter contendo diclofenaco de sódio e complexos de platina (Doctoral dissertation, Université Paris Sud-Paris XI ; Universidade estadual paulista (São Paulo, Brésil)).
- [21] : En ligne Labidi, A. (2021). Synthèse du diclofénac. (Consulté le 19 juin 2022)

[22] : <https://go.drugbank.com> disponible sur DRUG BANK [consulter le 03 juillet 2022]

[23] : Bolduc, M. (2008). Concentration synoviale et plasmatique de diclofénac après son utilisation topique et orale chez le cheval.

Chapitre II : validation analytique

Au niveau du laboratoire, des méthodes analytiques sont utilisées pour permettre le contrôle qualité du médicament (contrôle microbiologique, d'aspect, d'identification, de pureté...). Elles se doivent par conséquent de répondre à leur utilisation attendue et de donner les résultats escomptés, d'autant plus que les médicaments ne sont pas des produits comme les autres du fait de leur finalité. Cependant toutes les industries pharmaceutiques se réfèrent à des normes différentes par exemple ICH, SFSTP ..., qui sont des guides et des documents portant les données les plus essentiels de la méthode.

I. Définition de la validation analytique

Les systèmes analytiques sont aujourd'hui capables de générer une très grande quantité de données. La validation analytique est l'opération par laquelle on s'assure que ses résultats répondent au problème de manière satisfaisante pour l'utilisateur. La norme **ISO/IEC 17025** décrit la validation comme la « confirmation par l'analyse et la disposition de preuves objectives que les requis particuliers pour un usage spécifique doivent être satisfaits » [1].

La validation, dans son terme général, est l'établissement de la preuve, en conformité avec les principes de Bonnes Pratiques de Fabrication, que la mise en œuvre ou l'utilisation de tout processus, procédure, matériel, matière première, article de conditionnement ou produit, activité ou système permet réellement d'atteindre les résultats escomptés. La validation est donc un exercice documenté, au cours duquel on veut démontrer que chaque étape d'un procédé se déroulera comme prévu initialement. [2]

I.1. Définition d'une méthode analytique

La procédure analytique fait référence à la manière de réaliser l'analyse. Elle doit décrire en détail les étapes nécessaires à la réalisation de chaque test analytique. Elle peut inclure, sans s'y limiter : la préparation de l'échantillon, de l'étalon de référence et des réactifs, l'utilisation de l'appareil, la génération de la courbe d'étalonnage, l'utilisation des formules de calcul. [3]

II. Objectifs de la validation analytique

L'objectif de la validation est de produire des résultats satisfaisants et reproductibles qui permettront la réalisation des études pharmacocinétique, de bioéquivalence, de biodisponibilité ou encore au cours des études toxicologiques chez l'animal puis chez l'homme afin de minimiser le risque tant au niveau du producteur que du futur consommateur. Ainsi ces méthodes sont essentielles dans la partie contrôle qualité qui permet de libérer des lots de produit finis sur le marché [4]. L'objectif d'une bonne procédure analytique est de pouvoir quantifier le plus exactement possible chacune des quantités inconnues que le laboratoire aura à déterminer. [5]

III. Différents types de procédures analytiques

La guideline de l'ICH décrit les procédures à appliquer pour valider les essais prescrits dans les monographies des pharmacopées. Ces essais peuvent être des tests d'identifications, des essais de puretés instrumentaux ou non, des dosages, les exigences de validation varieront selon le type d'essai considéré et la technique utilisée. [6]. On distingue les différents types d'analyse suivants :

Identification : vise à garantir l'identité d'un analyte dans un échantillon. Ceci se fait généralement par la comparaison de l'échantillon et d'un matériel de référence pour une certaine propriété (spectre, comportement chromatographique, réactivité chimique, etc)

Essais de pureté : qui peuvent être quantitatifs, essais des limites portant sur les impuretés contenues dans un échantillon.

Dosage : qui a pour but de mesurer la quantité de substance à analyser contenue dans un échantillon donné. Dans le contexte du présent document, le dosage représente une analyse quantitative des composants majeurs de la substance.

IV. Aspect réglementaire

L'industrie pharmaceutique est associée à un développement de nouveaux médicaments et doit suivre l'évolution constante des aspects réglementaires et techniques associés au procédé. En Algérie il n'existe pas de guides nationaux à suivre dans la production des médicaments, les industries ont recours aux guides internationaux à savoir :

IV. 1. ICH: International Conference of Harmonisation

L'idée d'une harmonisation des exigences réglementaires a été décidée par l'Europe, le Japon et les États-Unis. Cette idée a donné lieu à la Conférence Internationale sur l'Harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des produits pharmaceutiques à usage humain (ICH) en 1990 lors d'une conférence de l'OMS sur les autorités de réglementation pharmaceutique à Paris. [7]. Lors de la vente d'un produit pharmaceutique, le fabricant doit s'assurer que son produit est conforme aux réglementations et spécifications en vigueur. C'est dans ce cadre que des analyses sont réalisées en tout point de la production, dès la réception des matières premières, jusqu'à la libération du produit fini en passant par les étapes intermédiaires clefs. [8]. Les recommandations de l'ICH ont aidé à prévenir la duplication des essais cliniques et à minimiser l'utilisation des tests sur les animaux tout en veillant à la sécurité et à l'efficacité de même ils ont rationalisé le processus réglementaire pour les demandes de nouveaux médicaments, ainsi l'utilisation des méthodes analytique [7].

Les guidelines dédiées à la validation analytique sont :

- **Q2A: Text on Validation of Analytical Procedures**

C'est un document qui décrit les caractéristiques qui doivent être prises en compte au cours de la validation. [6]

- **Q2B : Methodology** : Son objectif est de donner des différentes recommandations et caractéristiques pour chaque méthode, par conséquent le document fournit une signification sur les données qui devraient d'être présentées dans un dossier d'enregistrement. [6]

En 2005 une modification du guideline Q2B est renommée en Q2R1 avec un nouveau titre « validation des procédures analytiques : Text and Methodology ». [6]

En 2022 une révision complète des guidelines a été appliquée pour inclure les récentes procédures analytiques. Ce document est accepté par l'assemblée de l'ICH et publier pour consultation publique. [9]

IV. 2. Pharmacopées

Les pharmacopées sont des recueils réglementaires obligatoires à l'intention des professionnels de santé d'un pays déterminé, contenant une description des médicaments d'usage courant en médecine et notamment la formule de constitution, la composition analytique, les critères de pureté des matières premières entrant dans la fabrication des médicaments, les constantes physiques, les principales propriétés chimiques et méthodes pouvant être utilisées pour leur identification et dans le cas des médicaments composés, la formule et le mode de préparation [10]. Les pharmacopées sont constituées de différentes monographies. Chaque monographie est un ensemble de spécifications qui définissent les caractéristiques qualitatives et quantitatives d'une substance en vue d'assurer une qualité optimale compatible avec les exigences de santé publique [11]. Il existe plusieurs pharmacopées à savoir :

- Pharmacopée Européenne.
- Pharmacopée Japonaise.
- Pharmacopée Américaine.

IV. 3. Les Bonnes pratiques du laboratoire (BPF)

L'OMS définit les bonnes pratiques de fabrication (BPF) comme étant « un des éléments de l'assurance de la qualité. Elles garantissent que les produits sont fabriqués et contrôlés de façon uniforme et selon des normes de qualité adaptées à leur utilisation et spécifiées dans l'autorisation de mise sur le marché » [12]

IV. 4. Les Bonnes pratiques de laboratoire (BPL)

Dans un laboratoire, l'assurance de qualité englobe toutes les étapes pour assurer la réalisation des résultats. Cette exigence concerne toutes les procédures scientifiques et techniques des investigations du laboratoire. En d'autres termes, les BPL sont un système de garantie de la qualité portant sur le mode d'organisation des études de sécurité non cliniques ayant trait à la santé et à l'environnement et sur les conditions dans lesquelles ces études sont planifiées, réalisées, contrôlées, enregistrées, archivées et diffusées. [13]

V. Critères de la validation analytique

Les principaux critères de validation sont ceux couramment utilisés dans les laboratoires d'analyse et dont la nécessité de l'étude a fait l'objet d'un large consensus. On mentionne le choix de ces critères selon la méthode d'analyse dans le tableau suivant :

Tableau 3 : choix des critères selon le type de méthodes d'analyse à valider [14]

Performance de la méthode analytique	Catégorie 1	Catégorie 2		Catégorie 3	Catégorie 4
		Quantitative	Limites testées		
Exactitude	Oui	Oui	*	*	Non
Précision	Oui	Oui	Oui	Oui	Non
Spécificité	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Limite de détection	Non	Non	Oui	*	Non
Limite de quantification	Non	Oui	Non	*	Non
Linéarité	Oui	Oui	Non	*	Non
Gamme	Oui	Oui	*	*	Non
Robustesse	Oui	Oui	Oui	Oui	Non

(*) peut-être nécessaire, selon la nature des tests spécifiés.

Catégorie 1 : méthodes analytiques de détermination pour la quantification (dosage) des principaux composants des ingrédients actifs, y compris les conservateurs. [14]

Catégorie 2 : méthodes analytiques de détermination des impuretés de dégradation. Ces méthodes incluent des dosages quantitatifs et des tests de limites. [14]

Catégorie 3 : méthodes analytiques pour la détermination des caractéristiques de performance telles que la dissolution et la libération de médicament. [14]

Catégorie 4 : tests d'identifications. [14]

1. Spécificité : permet de prouver que le signal (réponse) ne provient que de la substance à analyser en présence d'autres composés (impuretés, excipients...), ce paramètre doit d'être déterminé dans les premières étapes afin de vérifier que les autres n'interfèrent pas [15]

2. Linéarité : la linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la quantité. Exemple : la concentration. [16]

3. Précision : la précision exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites. La fidélité fournit une indication sur les erreurs liées au hasard [17] et peut être évaluée à trois niveaux :

3.1 La répétabilité : les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur un échantillon d'essai, dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps ; avec plusieurs injections dans le système choisi [17]

3.2 La fidélité intra-analyse : a la même définition que la répétabilité, seulement dans ce paramètre on effectue l'analyse sur différentes solutions du même échantillon [18]

3.3 La fidélité intermédiaire : les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essai identiques dans le même laboratoire, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents et pendant un intervalle de temps donné [17]

4. Exactitude : l'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée « valeur conventionnellement vraie ». L'étroitesse de l'accord ainsi observée est la résultante de la somme des erreurs systématique et aléatoire, en d'autres termes l'erreur totale liée au résultat. Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité. [19].

5. Robustesse : c'est la capacité de donner des résultats proches en présence du changement des conditions expérimentales susceptibles d'avoir lieu lors de l'utilisation de la procédure. [20]

6. Stabilité : la stabilité de la substance à analyser doit être testée pendant la phase de développement et confirmée au terme de la validation de la procédure de dosage puisqu'elle conditionne la validité des autres critères, faire des tests avec plusieurs changements de conditions [21]

Références

- [1]. ISO/IEC :17025. 2005 [consulté le 20 Avril à 10h].
- [2] : VIAL, J. (2006). Journée de Formation Scientifique en Spectrométrie Atomique. Définition de la validation de méthodes et outils associés. Laboratoire Environnement et Chimie Analytique de l'ESPCI. Paris, 14. [3] : Belabda, S. (2021). Validation Analytique d'une méthode de dosage de l'atorvastatine (doctoral dissertation)
- [4] : Jhilal, F., Ihssane, B., Bouchafra, H., Sfaira, M., Hadrami, E. E., & Saffaj, T. (2013). Profil d'incertitude : une nouvelle stratégie globale pour la validation analytique et l'estimation de l'incertitude de mesure. *Les technologies de laboratoire*, 8(30).
- [5] : Hubert Ph, Nguyen JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. SFSTP. Validation des procédures analytiques quantitatives, harmonisation des démarches. PARTIE I Généralité ; 2003).
- [6]: Guideline, I. H. T. (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1), 1(20), 05.
- [7] :(Hubert, P., Nguyen-Huu, J. J., Boulanger, B., Chapuzet, E., Cohen, N., Compagnon, P. A., ... & Valat, L. (2006). Validation des procédures analytiques quantitatives : harmonisation des démarches-Partie III. Exemples d'application. *STP pharma pratiques*, 16(2).)
- [8] : Bouklouze, A., & Cherrah, Y. (2009). Validation analytique selon la nouvelle approche des basée sur l'erreur total (profil d'exactitude). *Les technologies de laboratoire*,4(14)
- [9] : Guideline, I. H. T. (2022). Validation of analytical procedures Q2 (R1). In International conference of harmonization. Geneva, Switzerland.
- [10]: <https://medicament.ooreka.fr> [consulté le 02 juillet 2022]
- [11]: Jaussaud, P. (2012). *Les pharmacopées*.
- [12]: Bryant, J. H., Khan, K. S., Hyder, A. A., & World Health Organization. (1997). L'éthique, l'équité et l'actualisation de la stratégie OMS de la santé pour tous. In *Forum mondial de la santé 1997* ; 18 (2): 115-123.
- [13] : Kahl, M., Mounquengui, A., turk, J., Farges, G., & El kirat, K. (2012). Propositions d'évolution nanobiotechnologies sur les « bonnes pratiques de laboratoires ». *IRBM news*, 33(1-2), 15-19).
- [14] (Magrin, H. (2019). Système de revue des validations de méthodes analytiques : application aux substances actives d'un site fabricant de matières premières à usage pharmaceutique

- [15] : : Kaouni, H. (2010). Etude comparative de la validation analytique d'une méthode de dosage d'amlodipine besilate dans une spécialité pharmaceutique Par HPLC/UV Démarche classique vs nouvelle approche (Doctoral dissertation)
- [16] : (Feinberg, M. (2009). Labo-Stat : Guide de validation des méthodes d'analyse (pp. 360-p). Tec et Doc.)
- [17] : Hubert, P., Nguyen-Huu, J. J., Boulanger, B., Chapuzet, E., Chiap, P., Cohen, N., ... &Valat, L. (2003). Validation des procédures analytiques quantitatives, harmonisation des démarches. STP Pharma Pratiques, 13(3), 101-138.)
- [18] : Ammar, O. U. A. H. A. B. IV. Différents types de contrôle IV. 1. Contrôle Physico chimique.
- [19] : Pinguet, I. (2015). Validation analytique : application de la procédure SFSTP 2003-2006 au domaine de la phytothérapie. Sciences pharmaceutiques, P14.
- [20]: Swartz, M. E., &Krull, I. S. (2018). Analytical method development and validation. CRC press
- [21] : (Mabrouki,M. (2022). Implémentation de la guideline ICH Q3D au sein d'un site de production pharmaceutique au maroc : analyse de risque et dosage par ICP-MS).

Chapitre III : Matériel et méthodes

L'objectif de ce travail a été de transférer la méthode analytique HPLC en Chromatographie Liquide Ultra Performance UPLC du test de dosage du gel Tabiflex Cool^R, en utilisant un protocole interne du laboratoire contrôle qualité d'EL KENDI en suivant le référentiel ICH, des paramètres d'un protocole expérimental préalablement établi dans le dossier technique du produit et un matériel conforme aux normes appropriées.

I. Matériel

I. 1. Produits utilisés

Les différents réactifs et matières premières utilisées dans ce travail sont mentionnées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 4 : récapitulatif des matières premières et réactifs utilisés

Matières premières	Réactifs
<p><i>Diclofenac diethylamine</i> : substances de références qui est le principe actif du Tabiflex Cool^R fournie par EL KENDI.</p> <p><i>Placebo</i> : préparation au laboratoire contrôle qualité EL KENDI à base d'excipients.</p> <p><i>USP Diclofenac impureté A</i> : fournie par le laboratoire contrôle qualité, utiliser pour la préparation de la résolution.</p> <p><i>Gel 1,16 % du diclofenac diethylamine</i> : médicament produit par l'industrie pharmaceutique EL KENDI (Tabiflex Cool^R).</p>	<p>-Acide ortho phosphorique 85%. Méthanol.</p> <p>- mono sodium ortho phosphate.</p> <p>-Eau purifiée.</p> <p>-Acétonitrile.</p> <p>-Standard du <i>diclofenac diethylamine</i> de pureté 100,8%</p> <p>-Placebo : composé de l'ensemble des excipients.</p>

I. 2. Instruments et verreries

Le tableau résume les instruments et la verrerie utilisés lors de la manipulation.

Tableau 5 : récapitulatif des instruments et verrerie utilisée

Verreries	Instruments
<p>Fioles jaugées (20 ml, 25 ml, 100ml).</p> <p>Béchers (100 ml, 250ml, 500ml, 1000ml, 2000ml).</p> <p>Eprouvette de 1L.</p> <p>Flacons 1L et 2L</p> <p>Pipettes graduées (2ml, 3ml, 5ml, 10ml)</p> <p>Seringue</p>	<p>Pro pipettes</p> <p>Barreaux magnétiques.</p> <p>Filtre PTFE 0,45 µm.</p> <p>Papier aluminium.</p> <p>Papier filtre de fine porosité.</p>

I. 3. Appareillage

I. 3. 1. Chromatographie Liquide Ultra Performance UPLC

L'UPLC utilisé est de la marque Water, classe UPLC-H équipé d'un détecteur UV-Visible

La chromatographie Liquide Ultra Performance est l'un des développements les plus significatifs dans le domaine de la séparation. Le système UPLC permet de réduire le temps et le cout d'analyse d'un échantillon, et permet d'effectuer les séparations les plus complexes. [1] Le principe général de la chromatographie est présenté dans la figure suivante : [2]

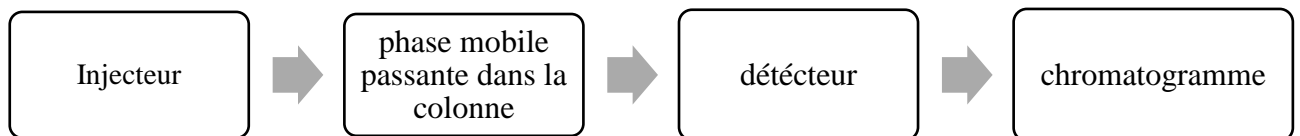


Figure 6 : Principe général de fonctionnement de la chromatographie [2]

I. 3. 2. Principe de l'UPLC

L'UPLC est une technique relativement nouvelle qui diffère des techniques traditionnelles par la taille des particules de la phase stationnaire et par la capacité de travailler avec des grandes pressions allant jusqu'à 1200 bars. [3]. Les colonnes UPLC sont remplies de petites particules de taille $< 2 \mu\text{m}$, alors que les colonnes HPLC sont habituellement remplies de particules de 3 à 5 μm , ce qui permet une meilleure séparation par rapport aux colonnes HPLC. [3]. Le principe fondamental de l'UPLC est basé sur l'équation de Van Deemter qui confirme la relation entre le débit et la hauteur des plateaux (efficacité de la colonne). [3]

Les différents instruments de la Chromatographie Liquide Ultra Performance sont représentés dans la figure ci-dessous.



- 1** : le flacon de la phase mobile
- 2** : support des flacons (phase mobile et solvant de lavage)
- 3** : détecteur
- 4** : emplacement de colonne
- 5** : système d'injection (emplacement des vials rempli d'échantillon à analyser)
- 6** : pompe

Figure 7 : Image représentant un UPLC et le rôle de chaque module

I. 4. Conditions chromatographiques

Les conditions chromatographiques exigées et utilisées sont illustrées dans le tableau suivant.

Tableau 6 : conditions chromatographiques de l'UPLC

Colonne C8	Longueur 25 cm. Diamètre interne 4.6mm. Diamètre des particules 5 μm .
Longueur d'onde (nm)	254 nm (longueur d'onde maximale d'absorption).
Débit (ml/min)	0,21 ml/min
Volume d'injection (μL)	0,4 (μL)
Température ($^{\circ}\text{C}$)	30 $^{\circ}\text{C}$
Temps de rétention (min)	3,474
Durée (min)	5 min

II. Préparations des solutions

III. 1. Méthodologie

Nous avons procédé à l'évaluation des performances d'une méthode analytique du dosage du diclofénac diéthylamine dans un gel par chromatographie liquide ultra performance « UPLC ».

L'objectif est l'analyse des différents protocoles des critères de la validation analytique avec une étude comparative aux normes bien connues et décrites dans l'ICH.

En se référant à la méthode du produit étudié qui décrit le protocole opératoire de la méthode « partie dosage du diclofenac diéthylamine », différentes solutions ont été préparés et sont regroupés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 7 : Solutions préparés

Echantillon	Protocole
Solution tampon à pH = 2,5 composer de deux solutions tampon A et B	Solution A : dissoudre 1.988 g du mono sodium ortho phosphate dans 1L d'eau purifiée
	Solution B : solubiliser 0,7ml d'acide phosphorique à 85% dans de l'eau purifiée.
La phase mobile	-mélanger la solution tampon à pH=2,5 avec le méthanol dans un rapport 30 :70 (v/v) en utilisant deux éprouvettes d'1L. Filtrer la solution sur un filtre de fine porosité, dégazer la solution en utilisant un sonicateur.
Le Diluant	-mélanger l'eau purifié et le méthanol dans le rapport 30/70 (v/v)
La solution de résolution	-dissoudre 0,75mg du standard diclofenac diéthylamine, dans une fiole de 100ml. - pipeter 1ml de l'impureté A (impureté connu utilisé dans la résolution), verser dans la même fiole. -solubiliser tout le mélange avec le diluant.
Solution mère standard de concentration 1M	-peser 100mg du standard diclofenac diéthylamine. - verser dans une fiole de 100ml, solubiliser avec le diluant
La solution standard 100% de concentration 0,1M	-prélever 10ml de la solution standard mère dans une fiole de 100ml, compléter avec le diluant
Préparation des solutions avec l'échantillon Tabiflex Cool^R gel	-peser 0,862mg du tabiflex dans des fioles de 100ml, diluer avec 80ml de diluant, agiter 30 minutes, puis compléter avec le diluant. -prélever une quantité d'environ 10ml et les verser dans des tubes centrifuges et centrifuger 10 minutes.

III. 2. Les normes

Dans notre cas du dosage du diclofenac diéthylamine, les normes à suivre selon l'ICH et la réglementation intérieure de l'industrie pharmaceutique EL KENDI stipule que le RSD (Relative Standard Déviation = écart type relatif) doit être inférieur à 2% dans tous les

paramètres à étudier sauf dans le cas de la linéarité où on rajoute au RSD, le coefficient de corrélation (R) compris entre 0,999 et 1.

III. 3. Formules de calcul

$$\text{Recouvrement (\%)} = \frac{\text{surface du pic de l'échantillon} \times \text{poids du standard}}{\text{la surface du pic du standard} \times \text{poids de l'échantillon}} \times 100$$

$$\text{RSD} = \frac{\text{ecart type}}{\text{moyenne des surfaces}} \times 100$$

Ecart type relative des aires des pics :

$$\sigma = \frac{1}{16} \sum (y_i - Y')^2 \quad \text{Avec : } y_i \text{ est l'air du pic pour l'injection } i.$$

Y' est la moyenne des aires des pics

III. 4. Méthodes utilisées pour évaluer les paramètres de la validation analytique

III. 4.1. Spécificité

La procédure interne du laboratoire évalue la spécificité par la solution standard seulement. La démarche consiste à comparer entre les pics du diluant, de la phase mobile, de la solution de résolution, du placebo, et du principe actif pour démontrer qu'une des solutions déjà citée n'interfèrent pas avec le principe actif.

Mode opératoire

Selon les conditions opératoires de la technique, plusieurs viales ont été préparées et remplies avec les solutions placebo, diluant, résolution (impureté A et diclofenac diéthylamine) et phase mobile. Il est à noter que ces préparations ont été réalisées en duplicate pour confirmer les résultats.

Avant de faire les injections des solutions citées ci-dessus, il a d'abord fallu injecter dans le système la solution de résolution, afin de démontrer la bonne séparation dans le système.

III.4. 2. Linéarité

Selon (**I'ICH Q2(R1) page 8**) la linéarité peut être évaluée soit en utilisant le standard et la matrice (standard+ placebo), soit en utilisant le standard seulement.

La procédure interne du laboratoire évalue ce paramètre avec standard seulement. Pour cela une série de concentrations (50, 80, 100, 120,150) % a été préparé par dilution de la solution mère standard de concentration égale à 1mg/ml (citer dans le tableau 9). Ce paramètre permet de démontrer qu'il existe une linéarité entre la concentration et les surfaces des pics.

L'évaluation de ce paramètre se fait par vérification du coefficient de corrélation (R) et un RSD < 2%. Le tableau suivant regroupe les différentes préparations de ce paramètre :

Tableau 8 : solutions préparées pour la linéarité

Niveau	1	2	3	4	5
Nombres d'injections	3	3	3	3	3
Niveau de concentrations	50%	80%	100%	120%	150%
Volume pipeté à partir de la solution mère	5 ml	2 ml	10 ml	3 ml	3 ml
Volumes des fioles utilisés	100 ml	25 ml	100 ml	25ml	20 ml
Concentrations	0,05mg /ml	0,08 mg /ml	0,1 mg /ml	0,12 mg /ml	0,15 mg /ml

Critères d'acceptations

- Les résultats obtenus doivent être similaire.
- Le coefficient de corrélation (R) compris entre 0,999 et 1.
- RSD < 2%.
- Equation de la droite de régression : $y = ax + b$

Avec : y : aire du pic du diclofenac diethylamine.

x : concentration du diclofenac diethylamine.

III.4.3 Exactitude

Selon la procédure interne du laboratoire, l'exactitude est évaluée sur trois concentrations à savoir (50- 100- 150) %. L'évaluation de ce paramètre passe par plusieurs étapes à savoir :

1^{ère} étape : pour chaque niveau, trois pesées du diclofenac diethylamine ont été effectuées et diluées dans une fiole de 100ml, à chaque niveau de concentration correspond donc 3 solutions du diclofenac.

2^{ème} étape : préparations du placebo.

3^{ème} étape : prélever 5ml de chaque préparation du diclofenac diethylamine, rajouter 5 ml du placebo dans une fiole de 50 ml, puis le mélange.

4^{ème} étape : remplir 2 viales de chaque solution pour établir 2 injections ; en utilisant un filtre PTFE 0,45 μ m.

Tableau 9 : Les différentes préparations de l'exactitude

Niveau	1	2	3
Pourcentage (%)	50%	100%	150%
Nombre de préparations pour chaque niveau	3	3	3
Pesée du diclofenac diéthylamine (mg)	50,0 mg	100,0 mg	150,0 mg
Volume à prélever de la solution diclofenac diéthylamine	5 ml	5 ml	5 ml
Concentration du diclofenac diéthylamine mg/ml	0,05 mg/ml	0,1 mg/ml	0,15 mg /ml
Concentration du placebo (stock) mg/ml	86,21 mg/ml		
Volume à prélever du stock placebo (ml)	5 ml	5 ml	5 ml
Volume des fioles utilisées (ml)	50 ml	50 ml	50 ml

Critères d'acceptations

- RSD < 2%
- Pourcentage de recouvrement compris entre 98% - 102,0%

III.4.4. Précision

- **Répétabilité :**

Selon la procédure interne du laboratoire, qui précause évaluer la répétabilité de l'injection avec la solution standard, le changement du temps de rétention est étudié dans le but de comparer ce dernier avec les aires de chaque injection. Le mode opératoire suivi pour l'évaluation de ce paramètre consiste à :

- Dissoudre 100mg du diclofenac diéthylamine dans 100ml du diluant
- Remplir les viales de cette solution, et établir 10 injections sur un court intervalle de temps

Critères d'acceptations

- RSD < 2%

- **Précision intra-analyse** : a le même concept que la répétabilité. Dans ce paramètre seulement 6 solutions échantillons ont été préparée (solution d'essai) avec deux injections pour chaque préparation.
- **Fidélité intermédiaire** : a pour objectif d'évaluer l'influence des phénomènes aléatoires qui peuvent survenir lors de la manipulation en analysant le même échantillon dans différentes conditions, différents jours, différent analyste et différents équipements.

Dans notre cas, on a suivi les mêmes étapes que la précision intra-analyse pour la préparation de deux séries de solutions par un analyste différent et un changement de balance. Cette préparation a été faite dans une autre journée.

Critères d'acceptations

- RSD < 2% s

III. 4. 5. Robustesse

- **Changements de paramètres**

Pour vérifier si la méthode reste toujours fiable ; un changement des paramètres chromatographiques ont été effectués avec une variation bien précise.

L'étude de la variation de la longueur d'onde a été faite en utilisant deux longueurs d'ondes ; 252nm et 256nm (± 2 nm de la longueur utilisée dans les conditions normales), et le changement du débit ($\pm 50\%$ du débit utilisée dans les conditions normales). Ces variations sont regroupées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 10 : Test de robustesse, changement de paramètres

Paramètres	Changement requis	Paramètres utilisés au début	+ la valeur à changer	- la valeur à changer
Débit (ml/min)	$\pm 0,5$	0.21 ml/min	0,71 ml/min	0,315 ml/min
La longueur d'onde	± 2	254 nm	256 nm	252 nm

III. 4. 6. Stabilité de l'échantillon après 24h

Cette étude permet de définir la stabilité maximale dans le temps des solutions préparées (échantillons) selon la température (température ambiante et à basse température).

1^{ère} étape : préparer 6 solutions échantillon du gel Tabiflex Cool^R 1 %

2^{ème} étape : remplir 12 viales, placer les 6 dans l'auto-injecteur de l'UPLC pendant 24 heure, et les 6 autres dans le réfrigérateur pendant 24 heures.

Références

[1] : Maheux, M. (2012). Stratégies analytiques par chromatographie liquide avec détection en spectrométrie de masse afin d'évaluer l'activité de neuf enzymes du cytochrome P450.

[2] : Mekoudjou, M., & Larondelle, Y. " Détermination du profil en acides gras de l'huile des graines de momordica charantia par chromatographie UPC2

[3] : Nguyen, D. T. T. (2007). Analyses rapides et ultra-rapides en chromatographie liquide : application aux composés pharmaceutiques (Doctoral dissertation, University of Geneva).

Chapitre IV : Résultats et discussion

L'objectif de ce chapitre est de prouver que la méthode de dosage du diclofenac diéthylamine est conforme aux normes de l'ICH et aux normes internes d'EL KENDI en utilisant la technique de l'UPLC.

I. Spécificité

Les figures ci-dessous représentent les différents chromatogrammes des solutions de résolution, placebo, diluant, phase mobile et le standard (diclofenac diéthylamine) :

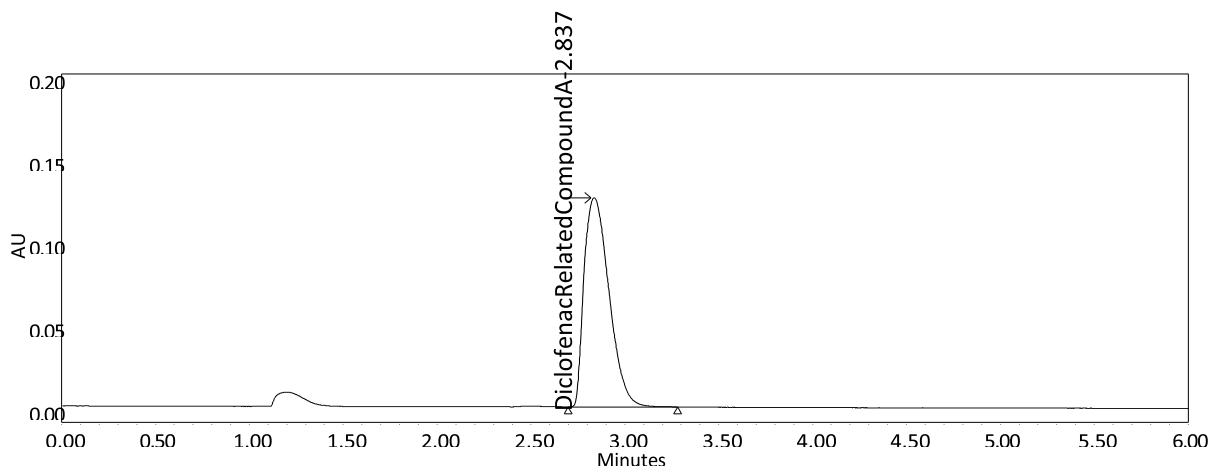


Figure 8 : chromatogramme de la résolution

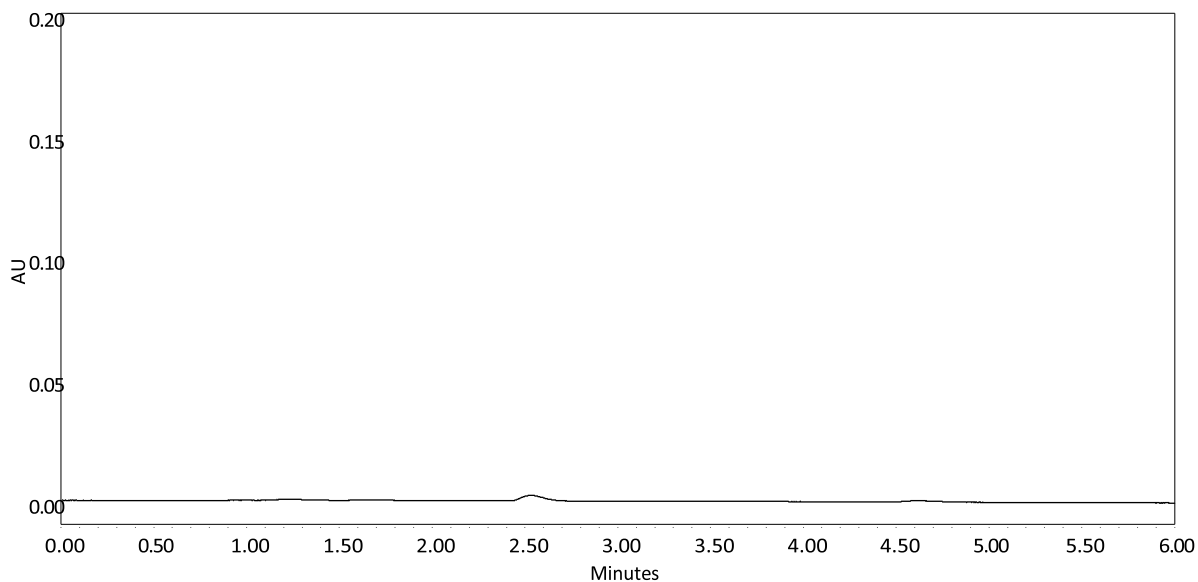


Figure 9 : chromatogramme du Placebo

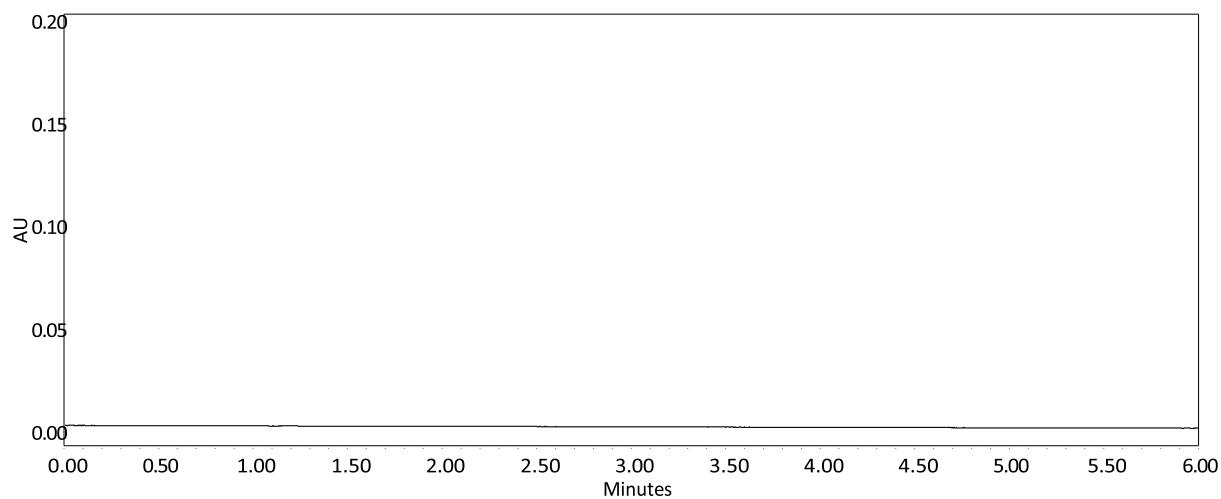


Figure 10 : chromatogramme du diluent

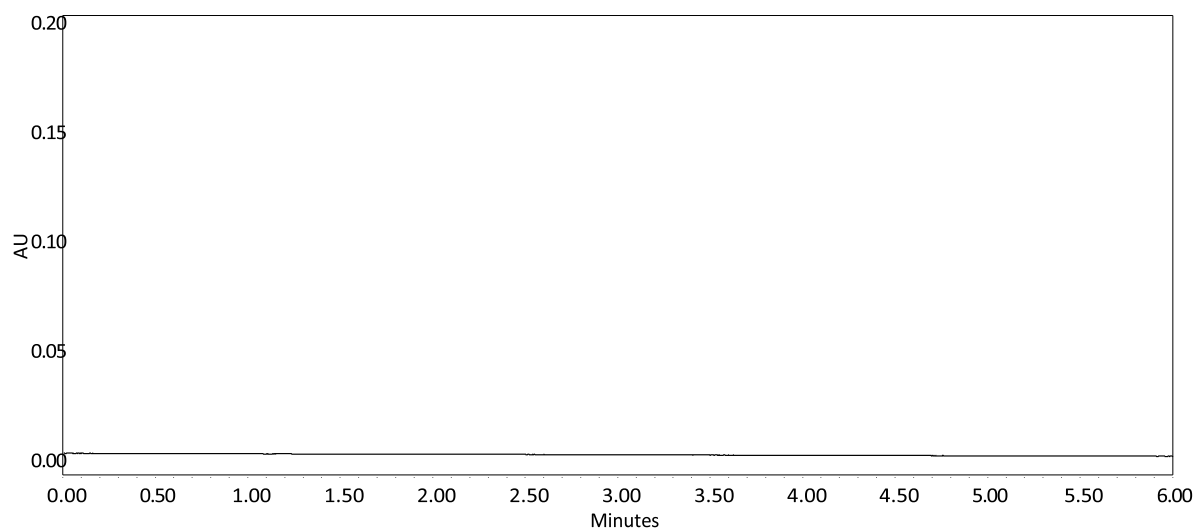


Figure 11 : chromatogramme de la phase mobile

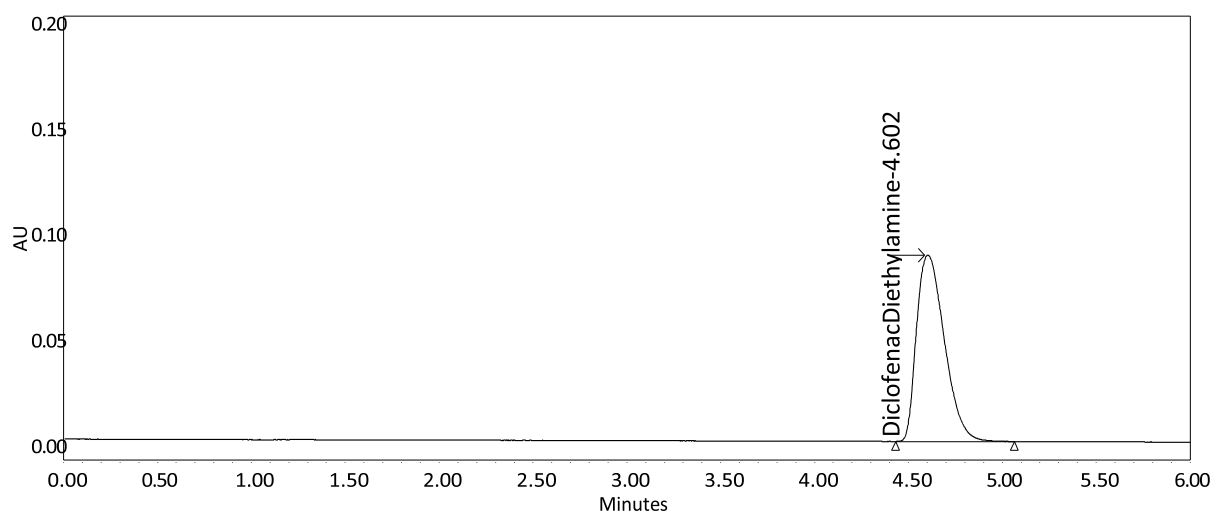


Figure 12 : chromatogramme du diclofenac diethylamine

Interprétation :

- La figure 10 présente 2 pics, le pic principal du diclofenac diéthylamine et un pic secondaire de l'impureté A. Le but de ce chromatogramme a été de confirmer la bonne séparation dans la colonne. Aucun pic n'a été détecté, ce qui prouve qu'il n'y a aucune interférence entre le placebo et la phase mobile, par conséquent le signal détecté provient seulement du principe actif.

On constate l'apparition d'un pic secondaire avec un temps de rétention d'1,5min et un autre pic principal à 2,837min. La résolution entre les deux pics est dans les normes. En effet, elle est de 6,7 valeur supérieure à 6,5 qui représente la limite fixée par la procédure.

- Les figures 11, 12 et 13 représentent les chromatogrammes des solutions placebo, diluant et phase mobile. Elles ont été intégrées avec la même méthode du processus (méthode paramétrée à l'aide de laquelle le pic principal est détecté et calculé à un temps bien déterminé). Aucun pic n'a été détecté, ce qui prouve qu'il n'y a aucune interférence entre le placebo, et la phase mobile, par conséquent le signal provient seulement du principe actif.
- La figure 14 représente le pic du diclofénac diéthylamine a un temps de rétention de 4,602 min, la séparation est faite rapidement et est exclusive au diclofenac diéthylamine.

Conclusion

Selon les résultats obtenus :

- ✓ La résolution montre qu'il y'a une très bonne séparation entre les deux pics, ce qui signifie que le pic relatif au diclofénac diéthylamine est pur et est spécifique au diclofénac diéthylamine seulement.
- ✓ Les composants de la solution n'ont aucune interférence avec la substance active, donc la méthode est spécifique, permet d'identifier la substance active.

II. Linéarité

Suite à l'analyse, les résultats des surfaces du diclofenac diéthylamine ainsi que les valeurs des RSD de l'étude de linéarité sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 11 : Résultats de l'étude de linéarité et le calcul du RSD.

Préparations		Concentration du Diclofenac Diethylamine (mg/ml)	Surface	Paramètres A calculer	Résultats
niveau 1 à 50%	Injections	1	0,05	434640	
		2	0,05	439578	
		3	0,05	441245	
					Ecart type
				Moyenne	438487,66667
				% RSD	0,78334
niveau 2 à 80%	Injections	1	0,08	719176	
		2	0,08	720171	
		3	0,08	719823	
					Ecart type
				Moyenne	719723,33333
				% RSD	0,07016
niveau 3 à 100%	Injections	1	0,1	882969	
		2	0,1	883487	
		3	0,1	885143	
					Ecart type
				Moyenne	883866,33333
				% RSD	0,12848
niveau 4 à 120%	Injections	1	0,12	1063338	
		2	0,12	1062652	
		3	0,12	1058962	
					Ecart type
				Moyenne	1061650,66667
				% RSD	0,22169
niveau 5 à 150%	Injections	1	0,15	1343952	
		2	0,15	1343409	
		3	0,15	1343769	
					Ecart type
				Moyenne	1343710,00000
				% RSD	0,02056

La figure suivante montre une droite de la moyenne des surfaces des pics en fonction des concentrations :

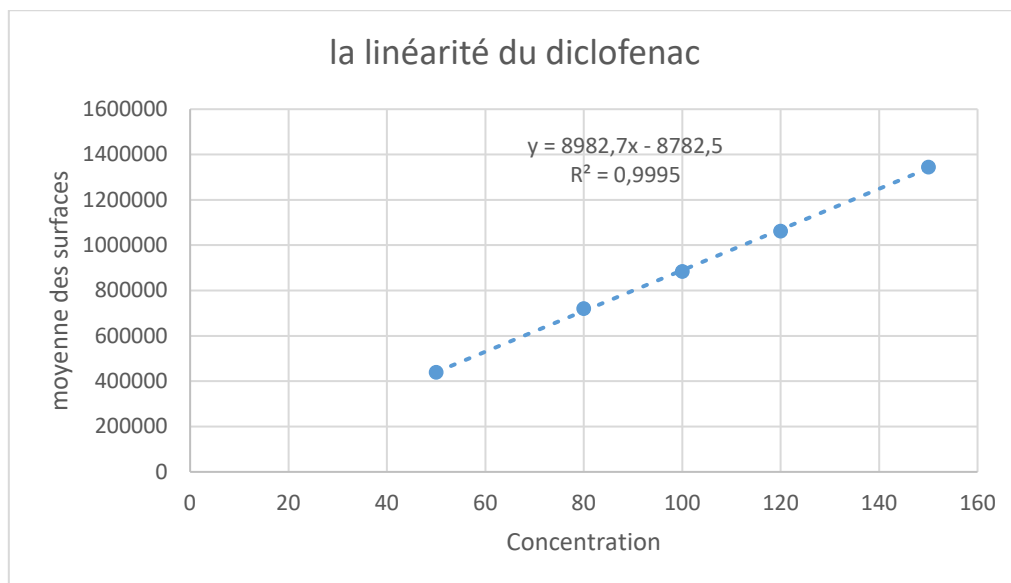


Figure 13 : courbe la linéarité.

• Interprétation

Selon les résultats obtenus dans le tableau 12 :

La moyenne des surfaces des chromatogrammes augmente proportionnellement avec la concentration, ce qui mène à tracer une droite linéaire. De plus, le RSD de chaque niveau est le RSD final est inférieur à 2%, ce qui est dans les normes.

D'après la figure 17, la linéarité est confirmée par :

-la droite de régression tracer à partir des données précédentes (surfaces des pics et concentration), l'équation de cette droite est : $y = 8992,7x + 97823,5$.

- Un facteur de corrélation acceptable $R = 0,9997$ est obtenu.

Conclusion

Les résultats de linéarité montrent que la valeur du coefficient de corrélation répond au critère d'acceptation $R=0,999 \geq 1$.

L'écart type relatif par niveau répond au critère d'acceptation $RSD \leq 2 \%$, ce qui répond aux critères d'acceptation indiqués dans l'ICH et les normes intérieures du laboratoire contrôle qualité EL KENDI. La méthode est donc linéaire.

III. Exactitude

L'exactitude est exprimée par le taux de recouvrement, le RSD, la moyenne des surfaces de chaque niveau de concentration théorique et le RSD final. Le tableau suivant montre les résultats obtenus :

Tableau 12 : résultats du test d'exactitude pour diclofenac diéthylamine

Exactitude					Résultats		
Préparations		Surfaces	Moyenne des surfaces	% RSD des surfaces	Recouvrement %		
Préparations du standard		879006	888214	0,84074			
		885377					
		893257					
		895216					
Niveau 1 à 50%	Préparation 1 ^{er} injection	442408	442794		99,7	Niveau 1 à 50%	
	Préparation 1 ^{2^{eme}} injection	443180					
	Préparation 2 ^{1^{er}} injection	442226	441464	0,21307	99,4	Ecart type	0,19229
	Préparation 2 ^{2^{eme}} injection	440702				Moyenne	99,48496
	Préparation 3 ^{1^{er}} injection	441036	441201		99,3	% RSD	0,19329
	Préparation 3 ^{2^{eme}} injection	441366					
Niveau 2 à 100%	Préparation 1 ^{1^{er}} injection	871998	871957		98,2	Niveau 2 à 100%	
	Préparation 1	871915					
	Préparation 2 ^{1^{er}} injection	883622	882530	1,04777	99,4	Ecart type	0,97896
	Préparation 2 ^{2^{eme}} injection	881437				Moyenne	99,21357
	Préparation 3 ^{1^{er}} injection	896993	889201		100,1	% RSD	0,98672
	Préparation 3 ^{2^{eme}} injection	881408					
niveau 3 à 150%	Préparation 1 ^{1^{er}} injection	1341074	1340311		100,6	Niveau 3 à 150%	
	Préparation 1 ^{2^{eme}} injection	1339548					
	Préparation 2 ^{1^{er}} injection	1334001	1333784	0,2455	100,1	Ecart type	0,26985
	Préparation 2 ^{2^{eme}} injection	1333567				Moyenne	100,42012
	Préparation 3 ^{1^{er}} injection	1340361	1339660		100,6	% RSD	0,26872
	Préparation 3 ^{2^{eme}} injection	1338959					
					% RSD	0,75557	

- **Interprétation**

L'exactitude est confirmée par :

- Le calcul de recouvrement de chaque niveau, les résultats obtenus sont entre compris entre 98,0% et 102,0%.
- Le RSD de chaque niveau est $< 2\%$.
- La moyenne des RSD finale est $\leq 2\%$.

Les critères d'acceptation sont confirmés.

- **Conclusion**

En se référant aux résultats obtenus, la méthode mise au point dans ce présent travail est exacte pour l'intervalle de 50 à 150%.

IV. Précision

IV. 1. Répétabilité de l'injection

Les résultats des surfaces et des temps de rétention de l'étude de la répétabilité de l'injection sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 13 : résultats de l'étude de la répétabilité du diclofenac diéthylamine.

Nombre d'injections	Surface du diclofenac diéthylamine	Temps de rétention du pic du diclofenac diéthylamine (min)
1	903996	4,606
2	902484	4,603
3	901579	4,606
4	899922	4,603
5	901795	4,601
6	902389	4,603
7	904476	4,596
8	904700	4,595
9	904596	4,598
10	905643	4,596
moyenne	903158,0000	4,601
% RSD	0,2	0,1

- **Interprétation**

Les résultats de la répétabilité montrent que les valeurs des temps de rétention ainsi que la surface des pics sont les mêmes pour toutes les différentes injections pour la concentration utilisée, ce qui a donné un RSD inférieur correspondant donc aux normes.

IV.2. Intra-analyse

Les résultats de la répétabilité intra-analyse sont regroupés dans le tableau 15 :

Tableau 14 : résultats de la répétabilité d'intra-analyse du diclofenac diéthylamine

Nombre de solutions	Nombre d'injections	Taux de recouvrement	La moyenne de surfaces des deux injections	Le RSD des deux injections
Solution 1	1 ^{ère} injection	101,80102	101,75458	0,06
	2 ^{ème} injection	101,70813		
Solution 2	1 ^{ère} injection	100,97336	100,86855	0,15
	2 ^{ème} injection	100,76374		
Solution 3	1 ^{ère} injection	98,33265	98,38474	0,07
	2 ^{ème} injection	98,43682		
Solution 4	1 ^{ère} injection	101,02468	101,21507	0,27
	2 ^{ème} injection	101,40545		
Solution 5	1 ^{ère} injection	101,72866	101,69577	0,05
	2 ^{ème} injection	101,66288		
Solution 6	1 ^{ère} injection	100,18304	100,09338	0,13
	2 ^{ème} injection	100,00371		
	Ecart type relatif	1,21963	1,27436	
	Moyenne	100,66868	100,66868	
	RSD %	1,21152	1,26589	
	Critères d'acceptations		%RSD ≤ 2.0	

- **Interprétation**

Dans le tableau 15, le taux de recouvrement des pics des différentes solutions sont similaires, et le RSD est inférieur à 2%, ce qui répond toujours aux normes de l'ICH.

IV. 3. Fidèle intermédiaire

Le tableau suivant résume les différents résultats des surfaces et la valeur du RSD de chaque série de solutions d'échantillon étudié que ce soit pour l'analyste 1 et pour l'analyste 2 :

Tableau 15 : résultats de l'étude de la fidélité intermédiaire du diclofenac diéthylamine.

Analyste	Equipement utilisée	Solutions échantillons	Pourcentages des recouvrements		
Analyste 1	UPLC EQ0410 Balance E0051	1	101,75458s		
		2	100,86855		
		3	98,38474		
		4	101,21507	Ecart type	1,27436
		5	101,69577	Moyenne	100,66868
		6	100,09338	%RSD	1,26589
Analyste 2	UPLC EQ0410 Balance E0080	1	102,95906		
		2	99,83073		
		3	100,56579		
		4	100,15245	Ecart type	1,26348
		5	100,3387	Moyenne	100,53140
		6	99,34165	%RSD	1,25680
Comparaison entre Analyste 1 et 2		Ecart type	1,21200		
		Moyenne	100,60004		
		%RSD	1,20477		

- **Interprétation**

Les résultats des surfaces des échantillons préparés par l'analyste 1 et l'analyste ont les mêmes valeurs, c'est-à-dire même avec le changement d'analyste et de balance, les résultats n'ont pas changé, il n'y a aucune influence sur les résultats, le RSD est toujours inférieur à 2% dans les deux cas ce qui est dans les normes.

- **Conclusion**

La conformité de la répétabilité de l'injection, d'intra analyse et celle de la précision intermédiaire mènent à conclure que la méthode est précise.

V. Robustesse

• Changement de paramètres

Les résultats des surfaces des pic, le temps de rétention et le RSD, le facteur de symétrie des conditions chromatographiques normales et de chaque changement de paramètre sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 16 : résultats de l'étude de changement de paramètres chromatographiques du diclofenac diéthylamine

	Paramètres		Temps de rétention du pic du diclofenac diéthylamine (min)		Facteur de symétrie du pic du diclofenac diéthylamine (moyenne)		Surface du pic diclofenac diéthylamine dans le standard (moyenne des surfaces)	
Conditions normales	Longueur d'onde (nm)	254 nm	4,625	% RSD avec les valeurs initiaux	1,4	% RSD avec les valeurs initiaux	893295	% RSD avec les valeurs initiaux
	Débit (ml/min)	0,21 ml/min						
Changement de paramètres	Longueur d'onde (nm) (± 2 nm)	252nm	4,792	2,50795	1,4	0,00000	404018	26,66828
		256 nm	4,721	1,45265	1,4	0,00000	497623	20,11494
	Débit (ml/min) ($\pm 50\%$)	0,105 ml/min	9,290	47,41147	1,2	10,87857	897173	0,15315
		0,315 ml/min	3,125	27,37188	1,5	4,87660	591775	14,35669

• Interprétation

Les résultats obtenus dans le tableau montrent que :

- Diminuer la longueur d'onde de (-2nm) (=252nm), a une influence sur la surface du pic principal (la surface du pic est inférieure par rapport à celle dans les conditions normales), d'où le RSD > 2 %

-Augmenter la longueur d'onde de 2 nm (= 256 nm) a aussi influencé sur le pic principal, la surface est toujours inférieure, d'où le RSD > 2 %

- La diminution du débit de 50%, a conduit à l'augmentation du temps de rétention jusqu'à 9,290 minutes, ce qui ralentit la séparation donnant un RSD très inférieur à 2%. Le facteur de

symétrie (la forme du pic) a diminué, c'est-à-dire que la forme du pic a diminué, d'où le RSD > 2 ; cela ne répond pas aux normes.

-En augmentant de 50% (0,315 ml/min) :

- ✓ Le temps de rétention 3,125 min, est inférieur à celui des conditions normales, la séparation est donc très rapide d'où un RSD > 2 %.
- ✓ Le facteur de symétrie a légèrement augmenté mais a une influence sur la surface du pic qui a légèrement augmenté aussi par rapport à celle des conditions normales menant à un RSD très supérieur à 2 ce qui ne répond pas aux normes.

- **Conclusion**

D'après les résultats obtenus, on peut conclure que la méthode est intolérante aux changements de paramètres.

IV. Test de stabilité

- **La stabilité dans l'auto-injecteur**

Les résultats des surfaces des solutions initiales, des surfaces des solutions mises dans l'auto-injecteur après 24 heures, ainsi les coefficients de variations (RSD %) sont regroupés dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 17 : résultats du test de stabilité de diclofenac diéthylamine dans l'auto-injecteur de l'UPLC après 24h.

	Solutions initiales	Après 24 heures dans l'auto-injecteur	
	Résultats	Résultats	% RSD
Solution échantillon 1	101,75458	100,87869	0,61130
Solution échantillon 2	100,86855	100,40448	0,32607
Solution échantillon 3	98,38474	98,46618	0,05851
Solution échantillon 4	101,21507	100,97609	0,16715
Solution échantillon 5	101,69577	104,55956	1,96359
Solution échantillon 6	100,09338	100,17553	0,05801

- **Stabilité dans le réfrigérateur**

Les résultats des surfaces des solutions initiales, des surfaces des solutions mises dans le réfrigérateur après 24 heures, ainsi que les coefficients de variations (RSD %) sont regroupés dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 18 : résultats de l'étude de stabilité du diclofenac diéthylamine après 24 heures dans le réfrigérateur.

	Solutions initiale	Après 24 heures dans le réfrigérateur	
	Résultats	Résultats des surfaces	% RSD -
Solution échantillon 1	101,75458	99,65450	1,47459
Solution échantillon 2	100,86855	100,07256	0,56021
Solution échantillon 3	98,38474	99,71679	0,95093
Solution échantillon 4	101,21507	99,81007	0,98842
Solution échantillon 5	101,69577	98,80265	2,04066
Solution échantillon 6	100,09338	102,98238	2,01189

- **Interprétation des résultats des tableaux 17 et 18**

Les tableaux précédents englobent les résultats des surfaces des solutions mises au réfrigérateur et dans l'auto-injecteur. Les valeurs obtenues sont très proches avec un RSD inférieur à 2 % sauf dans le cas des solutions 5 et 6 mises au réfrigérateur le RSD a légèrement augmenté mais reste toujours valable, ce qui est conforme aux spécifications préétablies par l'ICH.

- **Conclusion**

Selon les résultats obtenus, on peut conclure que le diclofenac diéthylamine est stable pour une durée d'au moins 24h dans l'auto-injecteur de l'appareil à une température ambiante et à une température allant de 2 à 5°C.

Conclusion générale

Conclusion

Avant la libération d'un médicament sur le marché, la validation de la méthode est une étape importante et nécessaire pour garantir la qualité du produit qui va être délivré aux patients. Les laboratoires pharmaceutiques sont tenus de prouver que les méthodes utilisées lors de ce contrôle sont parfaitement valides et fiables, en procédant à leur validation.

L'objectif de ce travail a été de prouver et d'évaluer une méthode simple, efficace, et surtout rapide du dosage du diclofenac diéthylamine gel fabriqué par le laboratoire EL KENDI par UPLC.

Cette étude a été examinée selon le protocole interne du laboratoire et les normes internationales ICH « International Conference of Harmonisation ».

Les résultats obtenus ont répondu à toutes les exigences et performances spécifiques élaborées dans cette approche harmonisée. Les paramètres étudiés (spécificité, exactitude, précision, linéarité), étaient dans les normes de validité, sauf dans le cas de la robustesse (changement de paramètre chromatographique) qui a donné un résultat invalide suggérant ainsi que la méthode ne tolère pas ce changement.

L'étude des critères de validation des méthodes analytiques a été effectuée en utilisant la technique de l'UPLC. Cette dernière a rempli toutes les exigences et performances spécifiques pour le dosage du diclofenac diéthylamine en forme gel. Ainsi cette technique s'est avérée spécifique, linéaire, exacte, et fidèle, ce qui prouve sa validité et son aptitude à être utilisée pour le dosage de ce médicament.

En conclusion, cette étude est très bénéfique pour le laboratoire contrôle qualité EL KENDI et sera donc utilisée pour leurs lots de routine avant leurs libérations.

Les annexes

Annexes1 : chromatogramme de quelques injections du test de linéarité

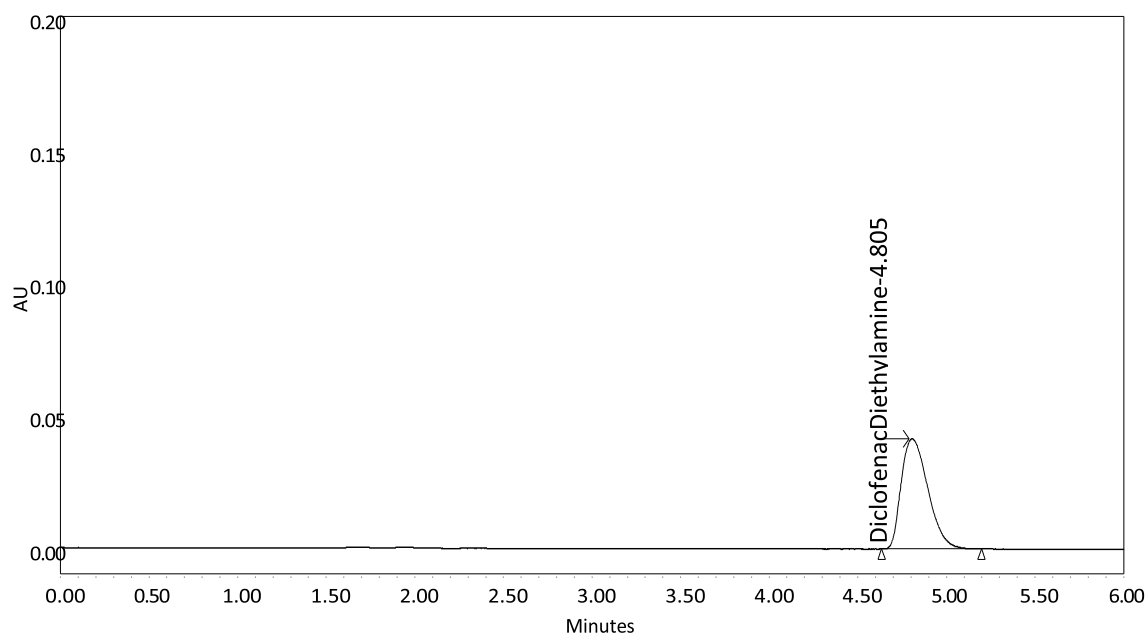


Figure 1 : Chromatogramme de l'injection 1 du niveau (50 %)

Tableau 1 : récapitulatif des résultats du chromatogramme de la linéarité de l'injection 1 (50%)

	Nom	Temps de retention	surface	Surface %	Hauteur	forme de symétrie
1	Diclofenac Diethylamine	4.805	434640	100.00	41491	1.4

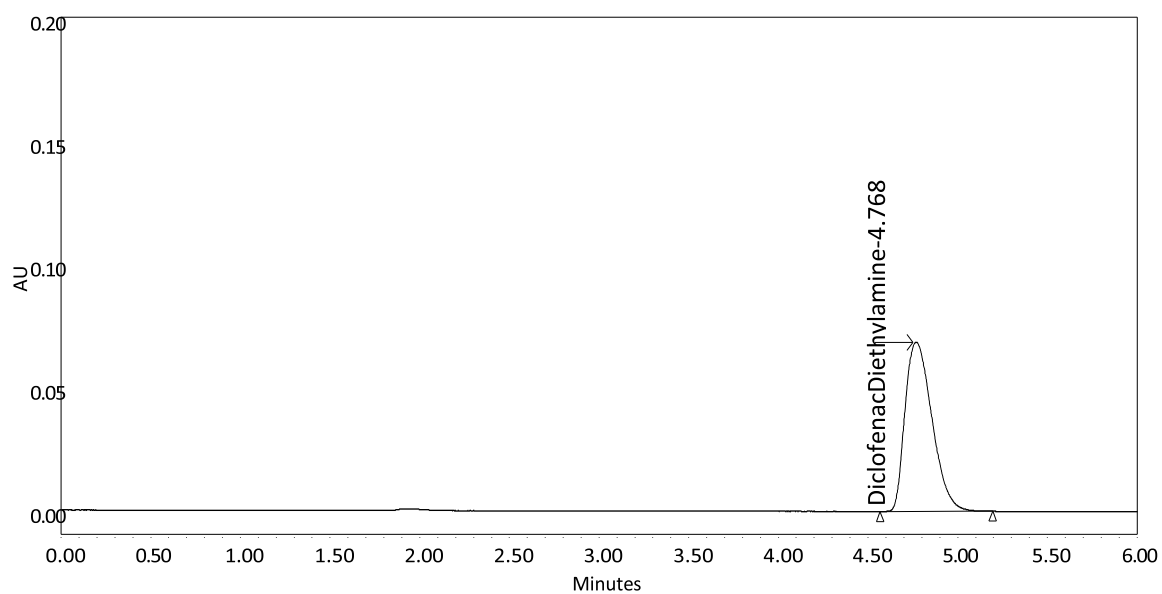


Figure 2 : chromatogramme de l'injection 1 du niveau 80%

Tableau 2 : récapitulatif des résultats du chromatogramme de la linéarité de l'injection 1 (80%)

Nom	Temp de retention	Surfaces	Surface %	Hauteur	forme de symétrie
Diclofenac Diethylamine	4.768	719176	100.00	68825	1.4

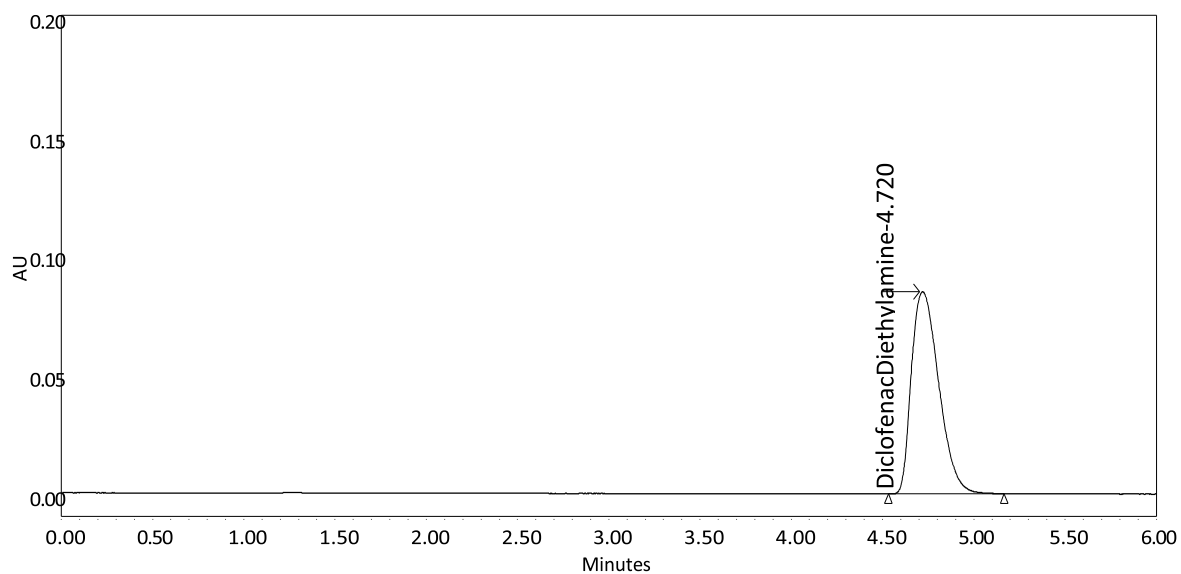


Figure 3 : chromatogramme de l'injection 1 du niveau 100%

Tableau 3 : récapitulatif des résultats du chromatogramme de la linéarité de l'injection 1 (100%)

	Nom	Temp de retention	surface	Surface %	Hauteur	forme de symétrie
1	Diclofenac Diethylamine	4.720	882969	100.00	84698	1.4

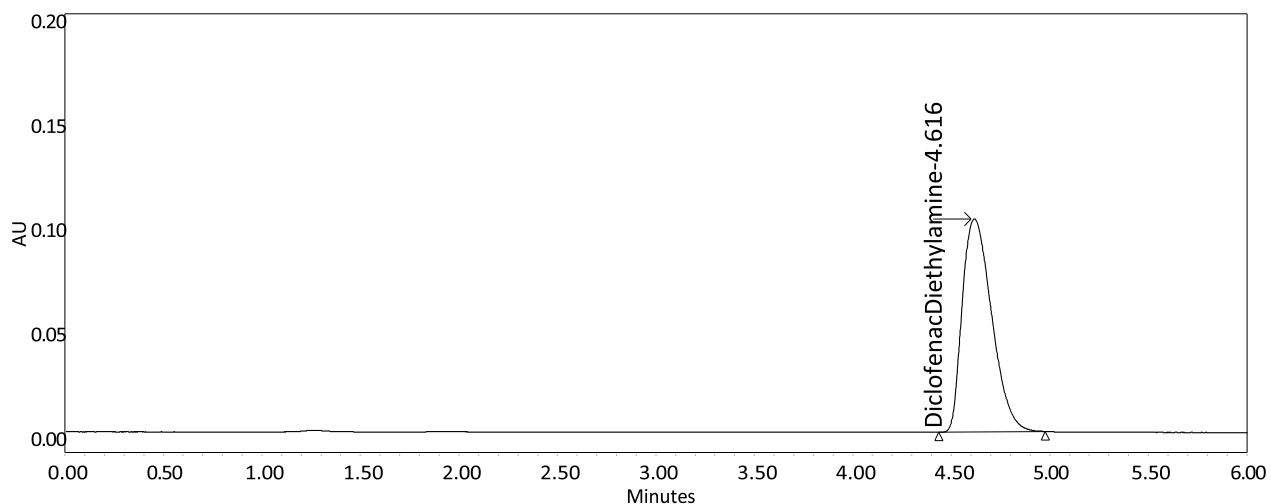


Figure 4 : chromatogramme de l'injection 1 du niveau 120%

Tableau 4 : récapitulatif des résultats du chromatogramme de la linéarité de l'injection 1 (120%)

	Nom	Temps de retention	surface	Surface %	Hauteur	forme de symétrie
1	Diclofenac Diethylamine	4.616	1063338	100.00	102049	1.4

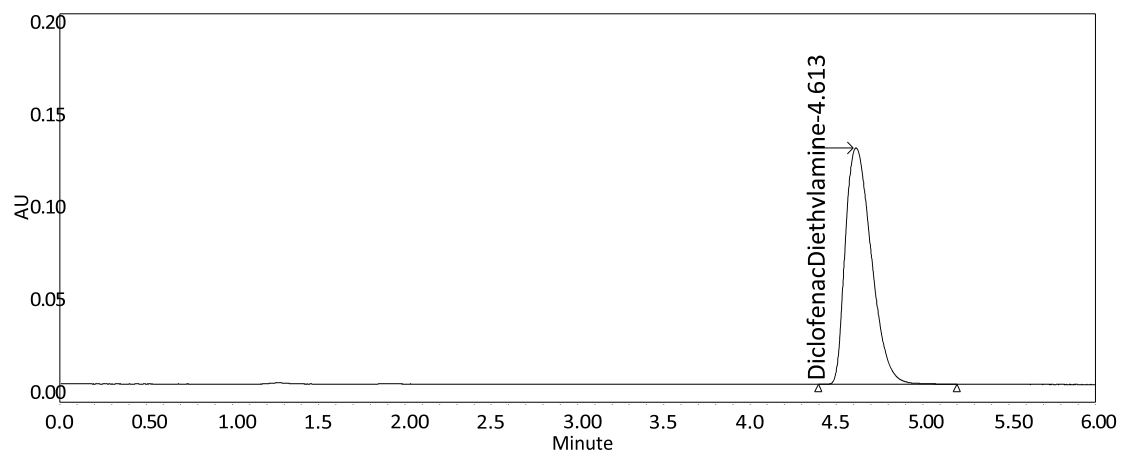


Figure 5 : chromatogramme de l'injection 1 du niveau 150%

Tableau 5 : récapitulatif des résultats du chromatogramme de la linéarité de l'injection 1 (150%)

	Nom	Temps de retention	surface	Surface %	Hauteur	forme de symétrie
1	Diclofenac Diethylamine	4.613	1343952	100.00	127871	1.4

Annexe 2 : chromatogrammes du test de stabilité

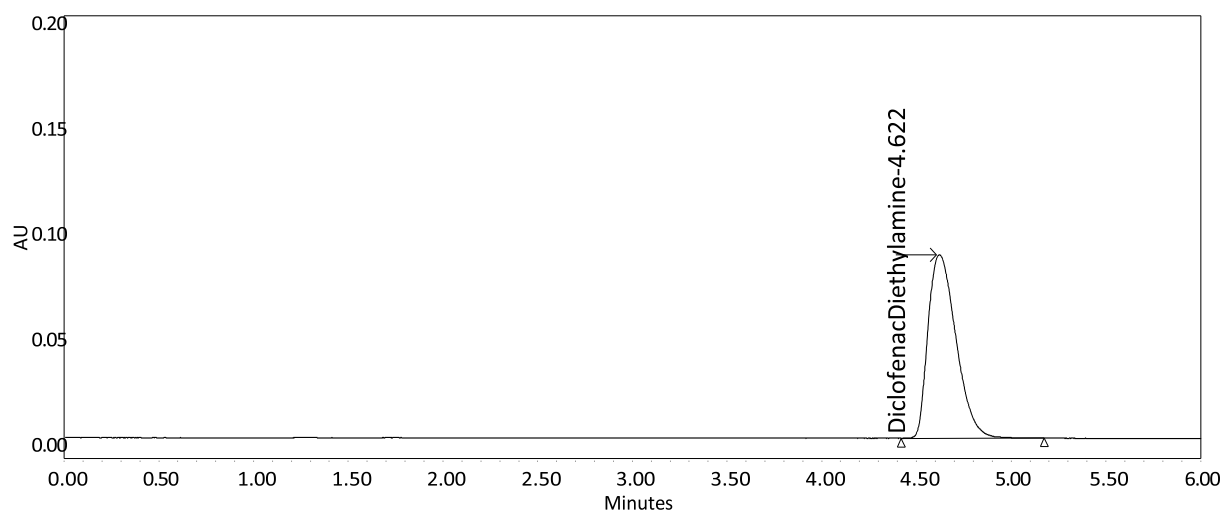


Figure 6 : chromatogramme du standard après 24 h dans l'auto-injecteur de l'UPLC (1^{ère} solution)

Tableau 6 : récapitulatif des résultats du chromatogramme du test de stabilité après 24 h dans l'auto-injecteur (1^{ère} solution)

Nom	Temp de retention	Surface		Hauteur	forme de symétrie
Diclofenac Diethylamine	4.622	896080	100.00	87006	1.4

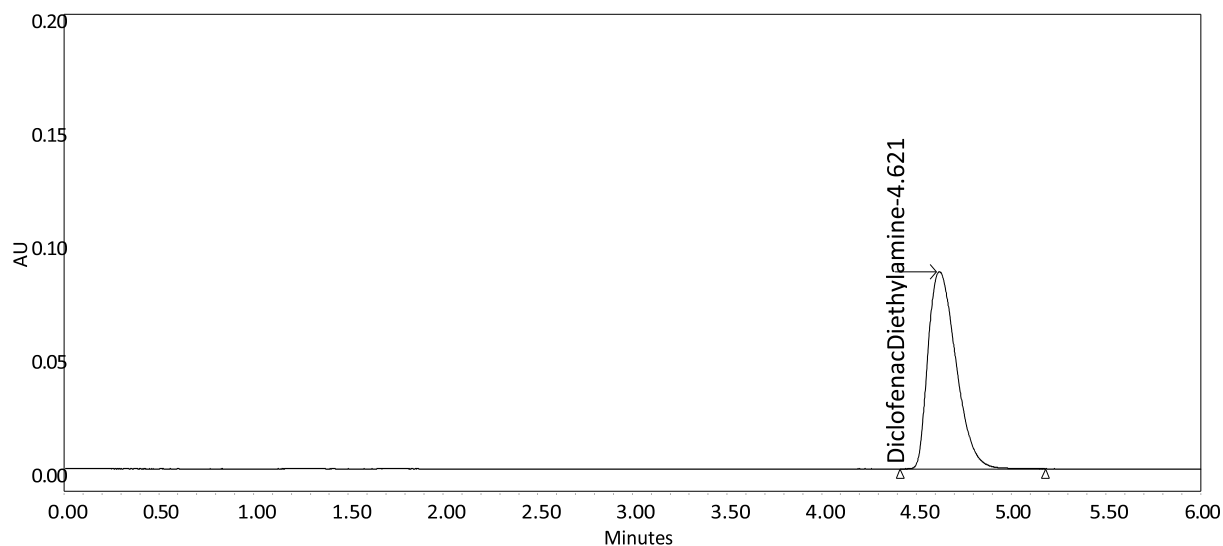


Figure 7 : chromatogramme du standard après 24 h dans l'auto-injecteur de l'UPLC (6^{ème} solution)

Tableau 7 : récapitulatif des résultats du chromatogramme du test de stabilité après 24 h dans l'auto-injecteur (6^{ème} solution)

Nom	Temp de retention	Surface	Surface %	Hauteur	forme de symétrie
Diclofenac Diethylamine	4.621	891281	100.00	86847	1.4

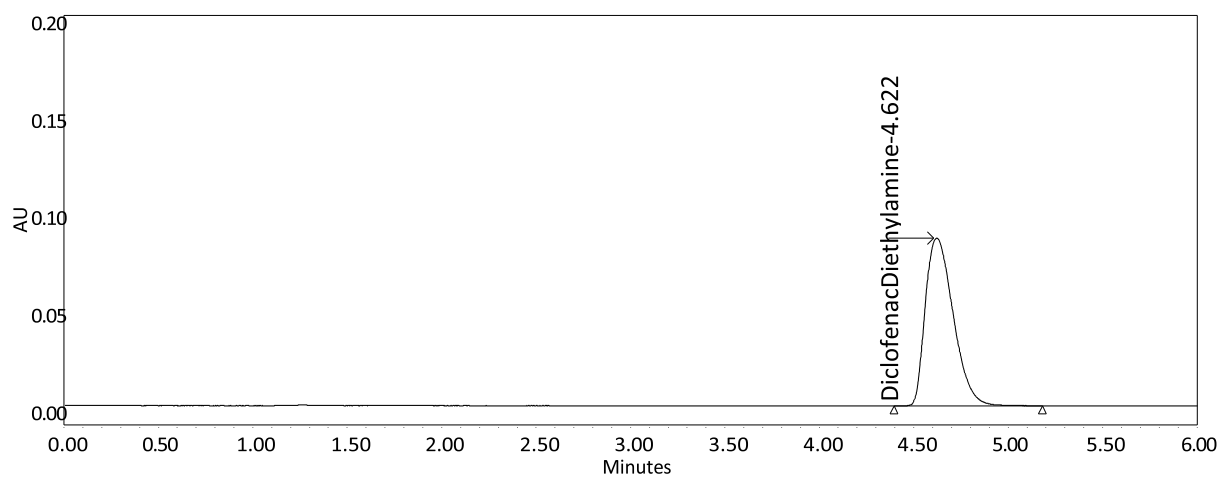


Figure 8 : chromatogramme du standard après 24 h dans le réfrigérateur (1^{ère} solution)

Tableau 8 : récapitulatif des résultats du chromatogramme du test de stabilité après 24 dans le réfrigérateur (1^{ère} solution)

	Nom	Temp de retention	Surface	Surface %	Hauteur	forme de symétrie
1	Diclofenac Diethylamine	4.622	886395	100.00	86037	1.4

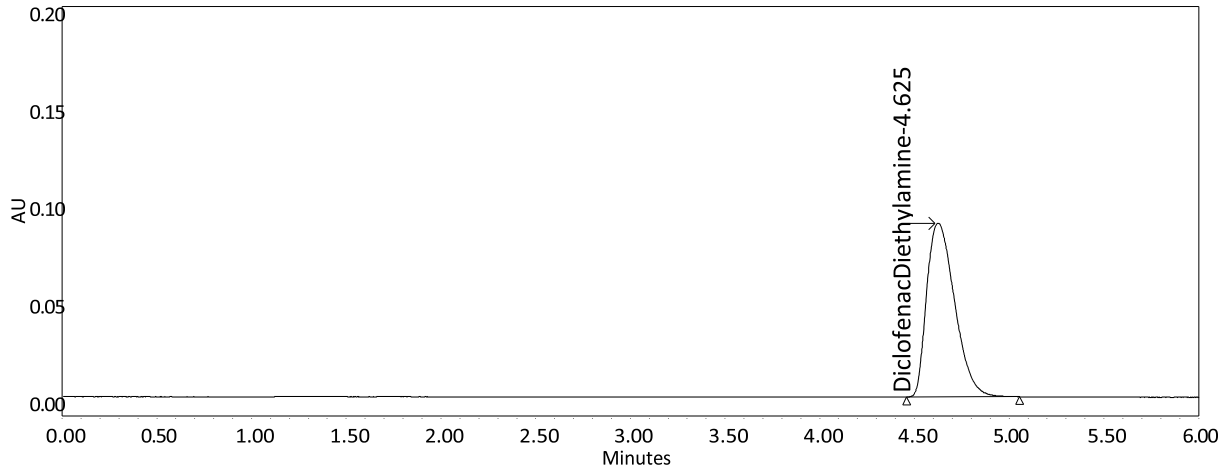


Figure 9 : chromatogramme du standard après 24 h dans le réfrigérateur (6^{ème} solution)

Tableau 9 : récapitulatif des résultats du chromatogramme du test de stabilité après 24 dans le réfrigérateur (6^{ème} solution)

	Nom	Temp de retention	Surface	Surface %	Hauteur	forme de symétrie
1	Diclofenac Diethylamine	4.625	918017	100.00	89162	1.4

Annexes 3 : chromatogrammes du test de robustesse (changement de conditions chromatographique)

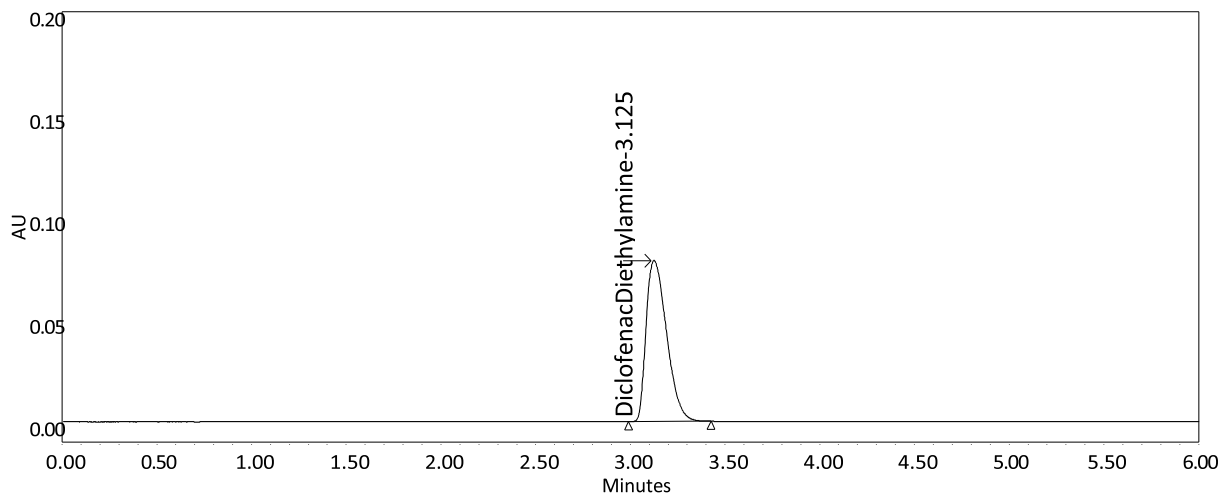


Figure 10 : chromatogramme du standard en augmentant le débit de 50%

Tableau 10 : récapitulatif des résultats du chromatogramme en augmentant le débit (50%)

	Nom	Temp de retention	Surface	Surface %	Hauteur	forme de symétrie
1	Diclofenac Diethylamine	3.125	591775	100.00	78674	1.5

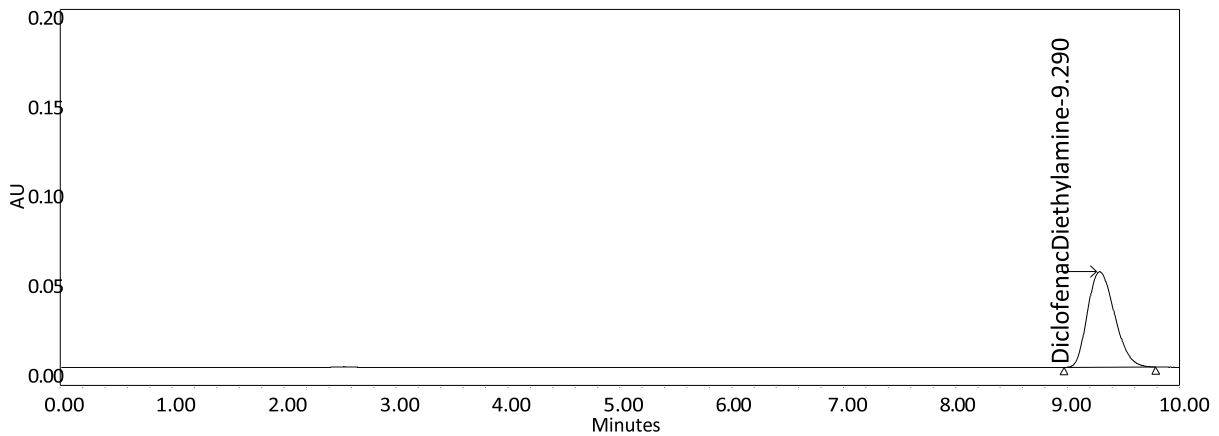


Figure 11 : chromatogramme du standard en diminuant le débit de 50%

Tableau 11 : récapitulatif des résultats du chromatogramme en diminuant le débit (-50%)

	Nom	Temp de retention	surface	Surface %	Hauteur	forme de symétrie
1	Diclofenac Diethylamine	9.290	897173	100.00	53420	1.2

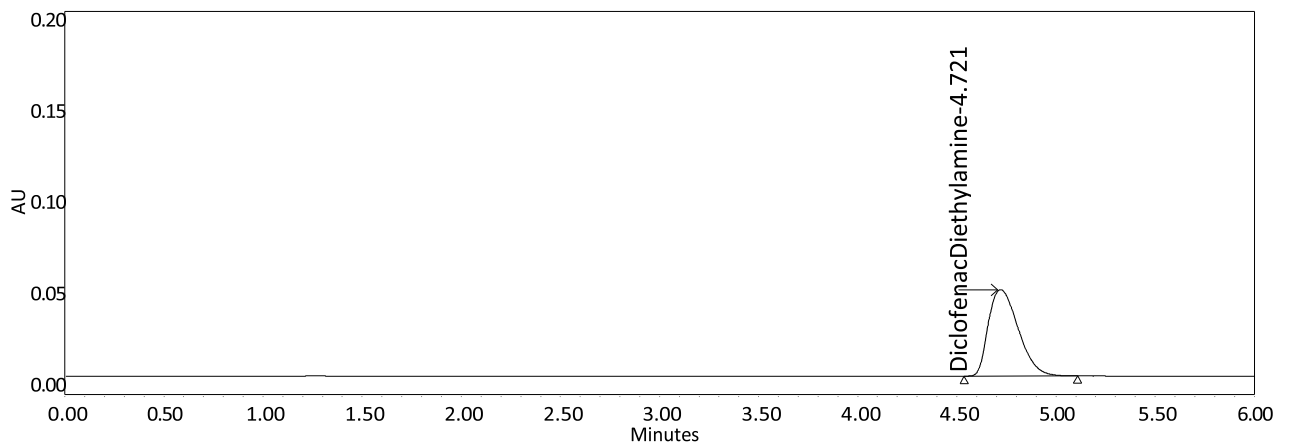


Figure12 : chromatogramme du standard à $\lambda = 256$ nm

Tableau 12 : récapitulatif des résultats du chromatogramme du standard à $\lambda = 256$ nm

	Nom	Temps de retention	surface	Surface %	Hauteur	forme de symétrie
1	Diclofenac Diethylamine	4.721	497623	100.00	47351	1.4

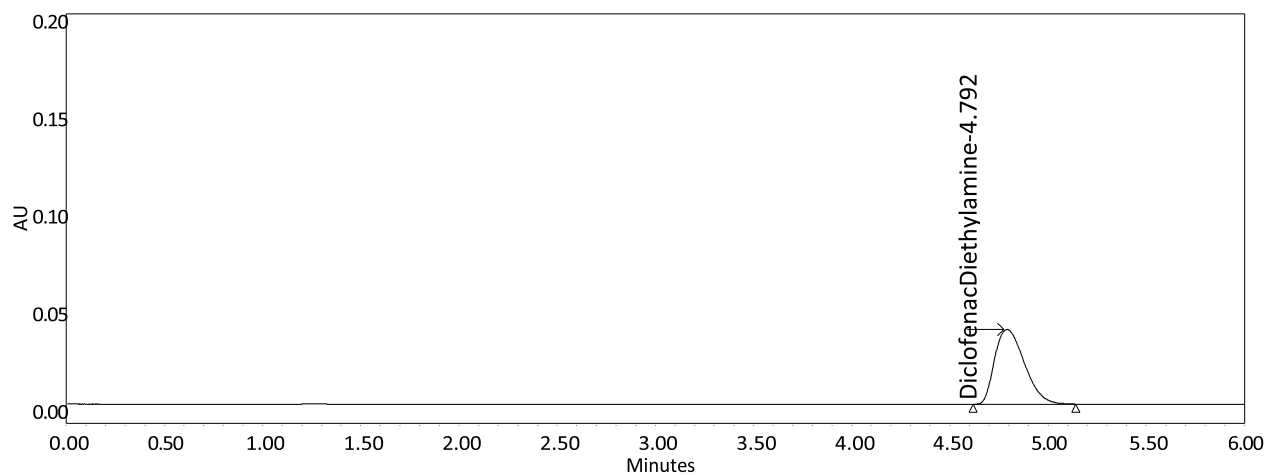


Figure 13 : chromatogramme du standard à $\lambda = 252$ nm

Tableau 13 : récapitulatif des résultats du chromatogramme du standard à $\lambda = 256$ nm

	Nom	Temp de retention	Surface	surface %	Hauteur	forme de symétrie
1	Diclofenac Diethylamine	4.792	404018	100.00	38334	1.4

Annexes 3 : chromatogrammes du test de précision

- **Répétabilité de l'injection**

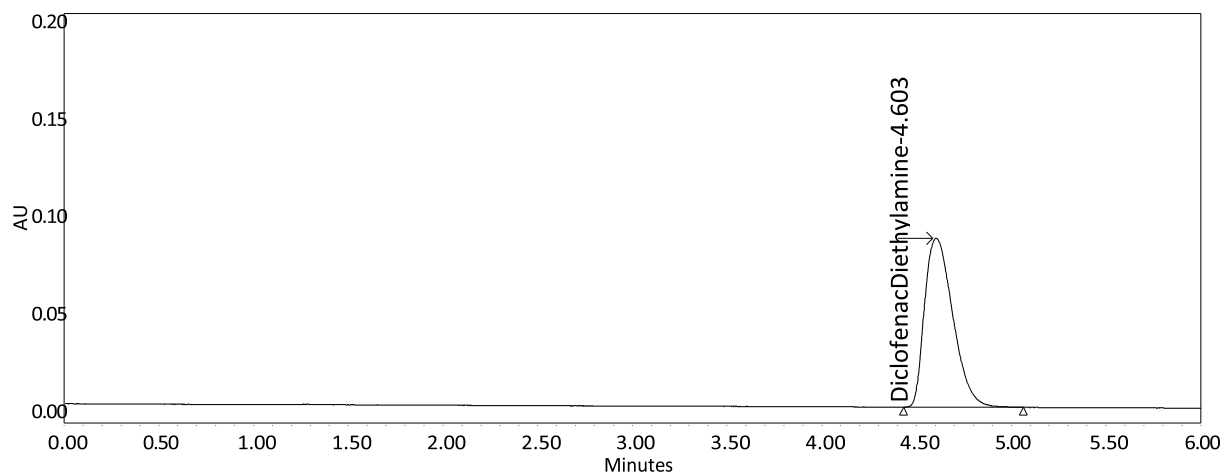


Figure 14 : chromatogramme du standard du test de répétabilité de l'injection (1^{ère} injection)

Tableau 14 : récapitulatif des résultats du chromatogramme du standard du test de répétabilité de l'injection (1^{ère} injection)

	Nom	Temp de retention	Surface	Surface %	Hauteur	forme de symétrie
1	Diclofenac Diethylamine	4.603	899922	100.00	86641	1.4

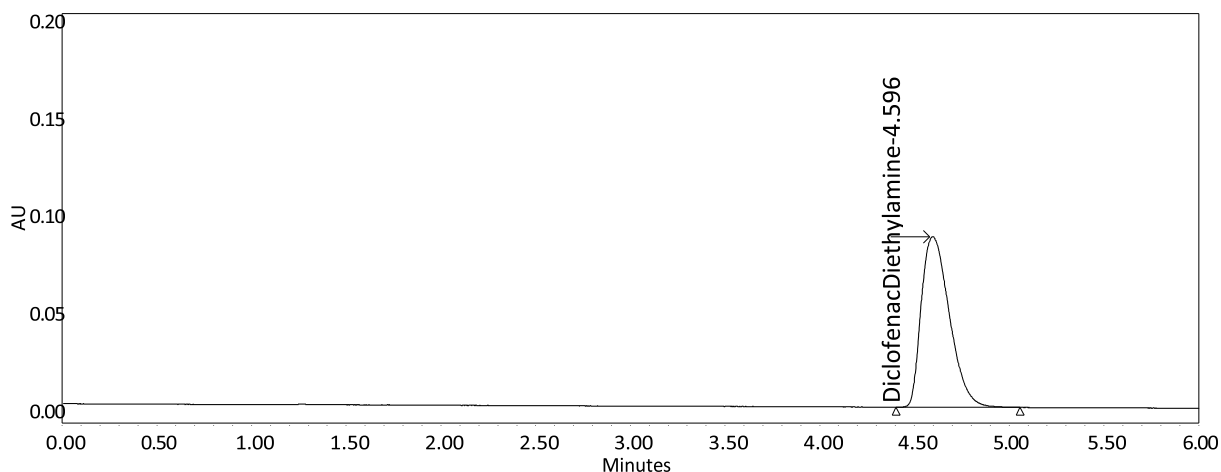


Figure 15 : chromatogramme du standard du test de répétabilité de l'injection (10^{ème} injection)

Tableau 15 : récapitulatif des résultats du chromatogramme du standard du test de répétabilité de l'injection (10^{ème} injection)

	Nom	Temp de retention	Surface	Surface %	Hauteur	forme de symétrie
1	Diclofenac Diethylamine	4.596	905643	100.00	87407	1.4

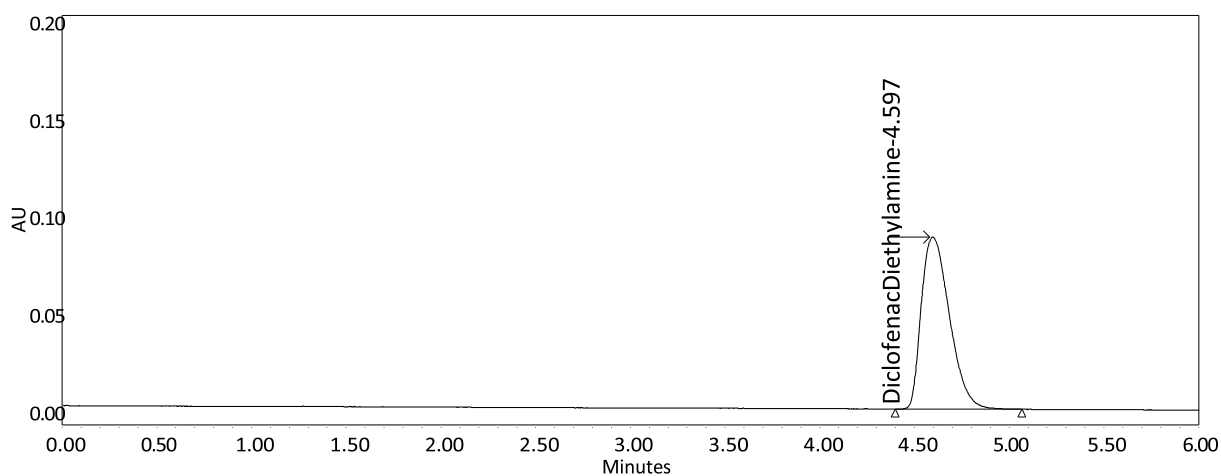


Figure 16 : chromatogramme du standard du test de répétabilité de l'intra-analyse (1^{ère} solution)

Tableau 17 : récapitulatif des résultats du chromatogramme du standard du test de répétabilité intra-analyse (solution 1)

	Nom	Temp de retention	Surface	Surface %	Hauteur	forme de symétrie
1	Diclofenac Diethylamine	4.597	912957	100.00	88175	1.4

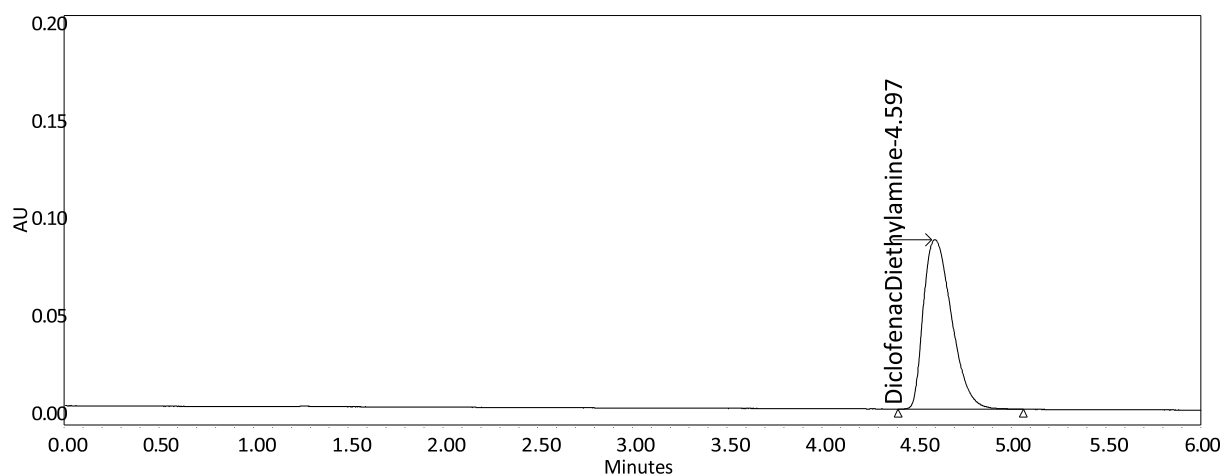


Figure 18 : chromatogramme du standard du test de répétabilité de l'intra-analyse (6^{ème} solution)

Tableau 18 : récapitulatif des résultats du chromatogramme du standard du test de répétabilité intra-analyse (solution 6)

	Nom	Temps de retention	Surface	Surface %	Hauteur	forme de symétrie
1	Diclofenac Diethylamine	4.597	901697	100.00	86964	1.4

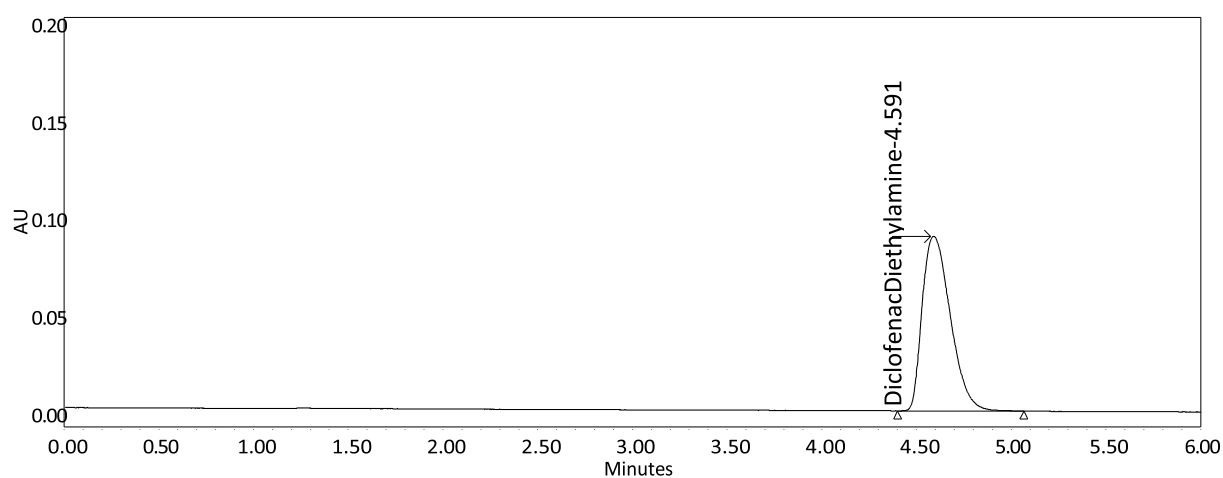


Figure 19 : chromatogramme du standard du test de répétabilité du fidèle intermédiaire (1^{ère} solution)

Tableau 19 : récapitulatif des résultats du chromatogramme du standard du test de répétabilité du fidèle intermédiaire (solution 1)

	Nom	Temps de retention	surface	Surface %	Hauteur	La forme du pic
1	Diclofenac Diethylamine	4.591	926923	100.00	89570	1.4

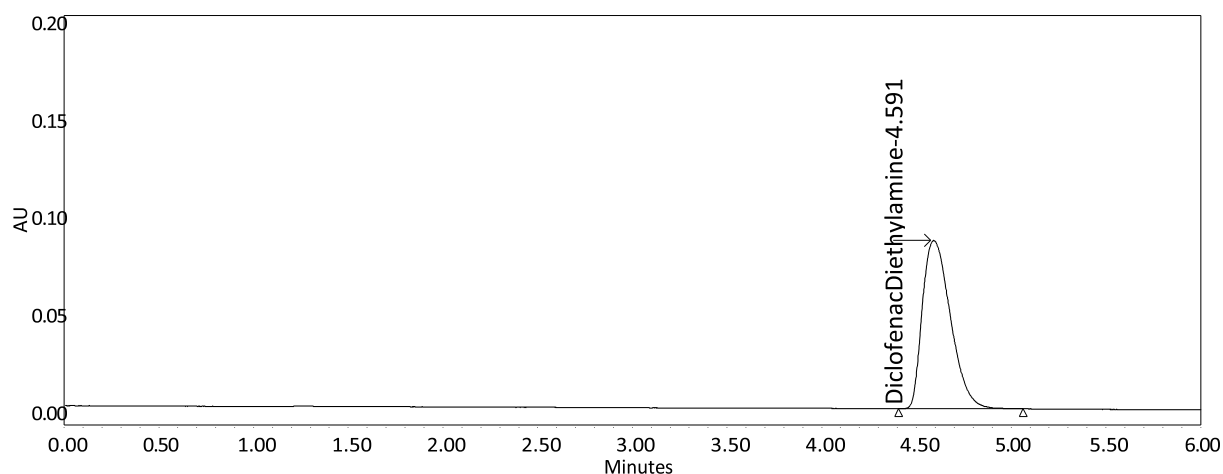


Figure 20 : chromatogramme du standard du test de répétabilité du fidèle intermédiaire (6^{ème} solution)

Tableau 20 : récapitulatif des résultats du chromatogramme du standard du test de répétabilité du fidèle intermédiaire (solution 6)

	Nom	Temp de retention	Surface		Hauteur	forme de symétrie
1	Diclofenac Diethylamine	4.591	893852	100.00	86299	1.4

Annexes 4 : chromatogrammes du test d'exactitude

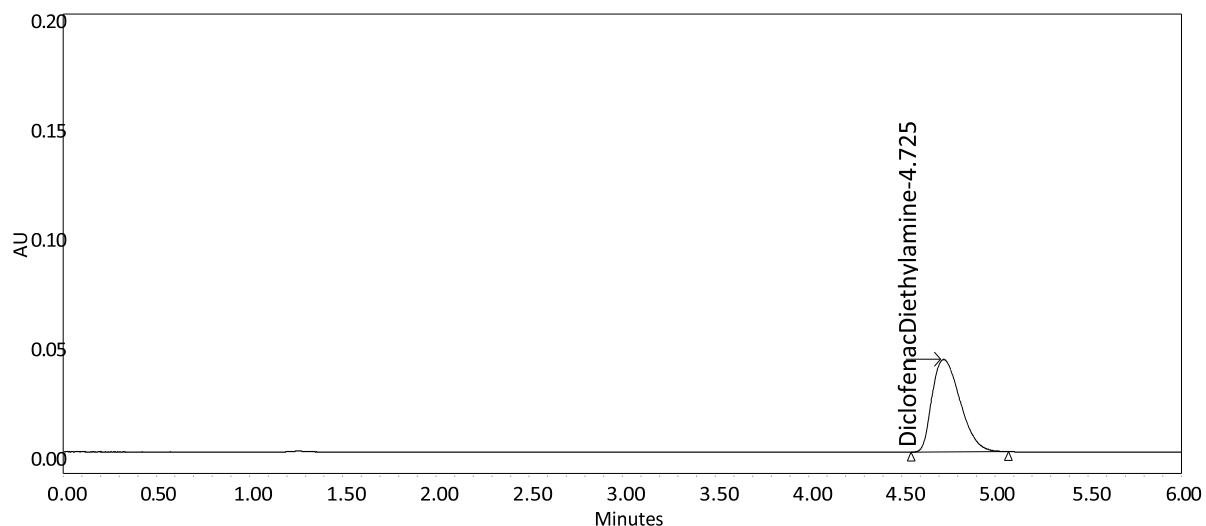


Figure 21 : chromatogramme de l'échantillon du test d'exactitude niveau 50 %

Tableau 21 : récapitulatif des résultats du chromatogramme de l'échantillon du test d'exactitude niveau 50%

	Nom	Temp de retention	surface	Surface %	Hauteur	forme de symétrie
1	Diclofenac Diethylamine	4.725	442408	100.00	42308	1.4

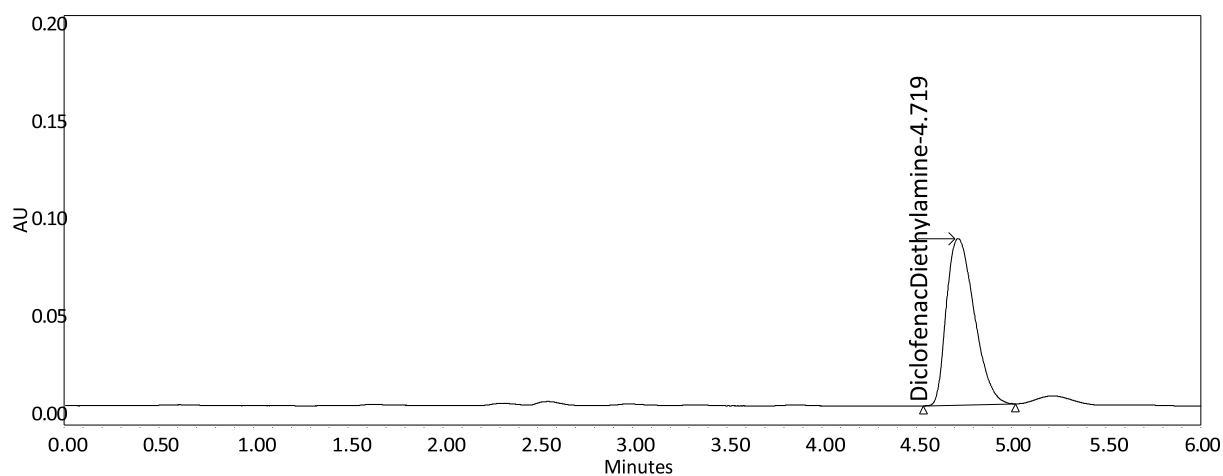


Figure 22 : chromatogramme de l'échantillon du test d'exactitude niveau 100 %

Tableau 22 : récapitulatif des résultats du chromatogramme de l'échantillon du test d'exactitude niveau 100%

Nom	Temp de retention	surface	Surface %	Hauteur	forme de symétrie
Diclofenac Diethylamine	4.719	871998	100.00	85480	1.4

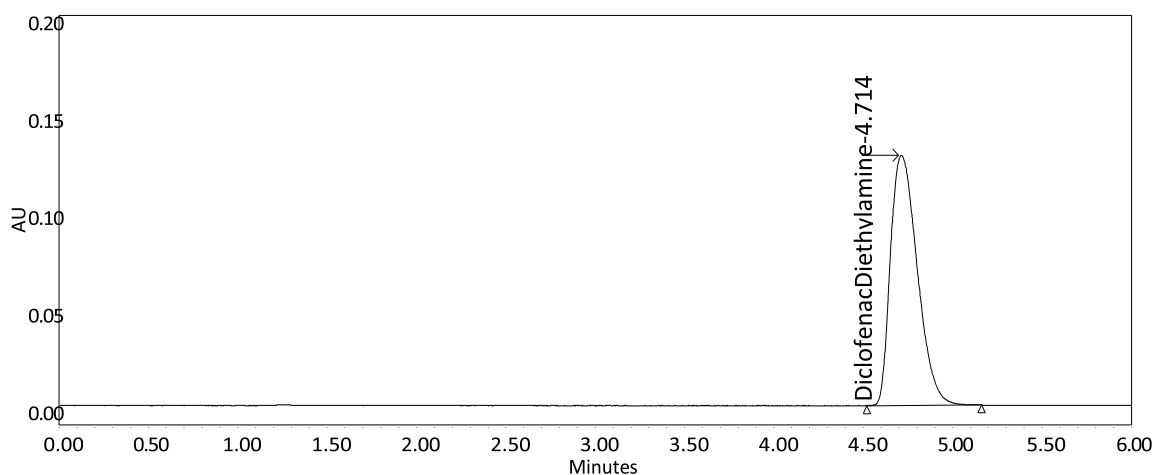


Figure 23 : chromatogramme de l'échantillon du test d'exactitude niveau 150 %

Tableau 23 : récapitulatif des résultats du chromatogramme de l'échantillon du test d'exactitude niveau 150%

Nom	Temp de retention	Surface	Surface %	Hauteur	forme de symétrie
Diclofenac Diethylamine	4.714	1341074	100.00	128297	1.4

Annexes 5 : Equipements et verreries utilisés pour cette étude



Figure 23 : filtration sous -vide



Figure 24 : centrifuge



Figure 25 : colonne griffée ACQUITY UPLC BEH C8, 2.1 * 100 mm



Figure 26 : Balance



Figure 27 : remplissage des viales à l'aide d'un Filtre PTFE 0,45 μm .

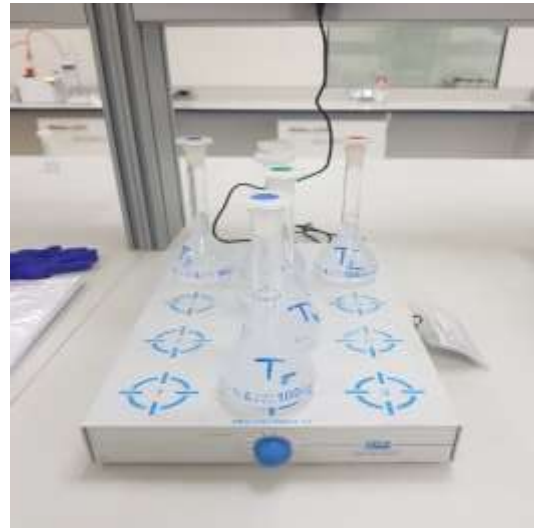


Figure 28 : Agitation de la solution Échantillon

Annexe 5 : Chromatographie Liquide Ultra Performance

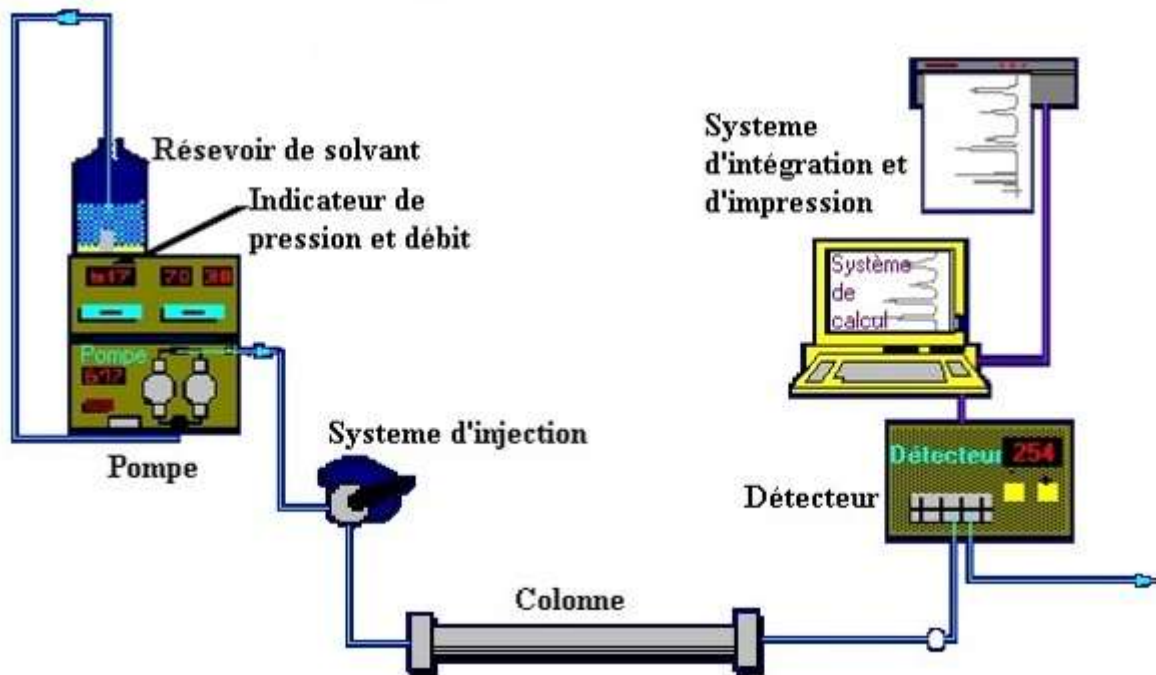


Figure 29 : schéma d'une chaîne d'UPLC

Résumé

Le contrôle qualité des produits pharmaceutiques constitue une exigence réglementaire à laquelle doivent répondre tous les laboratoires pharmaceutiques. Pour ce faire, ces derniers utilisent des méthodes analytiques.

Le but du présent travail a été d'évaluer les performances d'une méthode du dosage du diclofenac diéthylamine gel par Chromatographie Liquide à Haute Performance (UPLC), en se référant à la norme internationale ICH (International Conference of Harmonisation). Pour cela, plusieurs paramètres ont été étudiés, à savoir : la linéarité, l'exactitude, la spécificité, la robustesse, la stabilité et la précision, en suivant le protocole décrit par le laboratoire de contrôle qualité d'EL KENDI.

Les résultats obtenus respectent les exigences de l'ICH dans un intervalle de [50-150%]. Ainsi, la méthode analytique suivie s'est avérée efficace et fiable, et peut être utilisée en routine pour le dosage du diclofenac diéthylamine dans un gel.

Mots clés : El Kendi, Diclofenac diéthylamine, Dosage, UPLC.

Abstract

The quality control of pharmaceutical products is a regulatory requirement that all pharmaceutical companies must meet. To do so, they use analytical methods.

The aim of the present work was to evaluate the performance of a method for the determination of diclofenac diethylamine gel by High Performance Liquid Chromatography (UPLC), referring to the international standard ICH (International Conference of Harmonization). For this, several parameters were studied, namely: linearity, accuracy, specificity, robustness, stability and precision, following the protocol described by the quality control laboratory of EL KENDI.

Results obtained meet the requirements of the ICH within an interval of [50-150%]. Thus, the analytical method proves to be efficient and reliable, and can be used routinely for the determination of diclofenac diethylamine in a gel.

Keywords : El Kendi, Diclofenac diethylamine, Dosage, UPLC.