

Chapitre II : Matériel et méthodes

Notre étude est menée sur la mise en évidence de la qualité d'un médicament générique « CLOFENAL[®] 75mg/3ml » qui a été réalisée à l'unité (ANTIBIOTICAL) de SAIDAL (MEDEA), entre la période du 10/02/2019 au 31/05/2019. Nous avons réalisé le contrôle physico-chimique du principe actif, du mélange final et du produit fini, en suivant les normes de la pharmacopée Européenne.

II.1. Présentation de produit CLOFENAL[®] 75mg/3ml

Le Diclofenac (75mg/3ml) est un anti-inflammatoire non stéroïdiens approuvé pour plusieurs usages à travers le monde. C'est un dérivé de l'acide phénylacétique du groupe des acides arylcarboxyliques.



Figure II.1 : CLOFENAL[®] solution injectable 75mg/3ml

II.1.1. Structure chimique de Clofenal

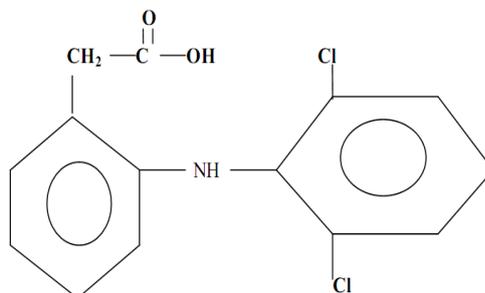


Figure II.2 : Formule de Clofenal

II.1.2. Forme et présentations

CLOFENAL 75mg/3ml, est une solution injectable remplie dans une ampoule de 3 ml et conditionnée dans une boîte de deux ampoules.

II.1.3. Posologie et mode d'administration

- * **Posologie** : une ampoule à 75mg par jour en une seule injection.
- * **Mode d'administration** : Les injections doivent être faites d'une façon rigoureusement aseptique dans la partie externe du cadran supéro-externe de la fesse, profondément et lentement ; lorsqu'elles sont répétées, il est recommandé de changer de côté à chaque injection.

II.1.4. Indications

Elles procèdent de l'activité anti-inflammatoire du diclofinac, de l'importance des manifestations d'intolérance auxquelles le médicament donne lieu et de sa place dans l'éventail des produits anti-inflammatoires actuellement disponibles. Elles sont limitées chez l'adulte et l'enfant à partir de 15 ans, au traitement symptomatique de courte durée des rhumatismes inflammatoires en poussée, lombalgies aiguës, radiculalgies, crises de coliques néphrétiques.

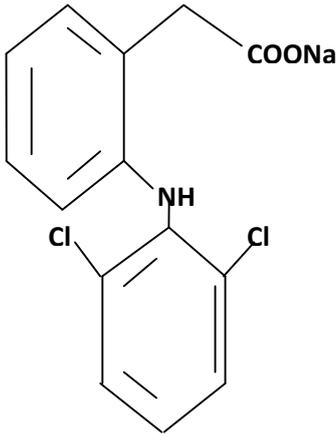
II.2. Composition du CLOFENAL[®] 75mg/3ml

La solution injectable de CLOFENAL[®] 75mg/3ml contient deux types d'ingrédients :

II.2.1. Principe actif : nommé (Diclofinac de sodium).

Diclofinac de sodium l'élément qui joue un rôle principal du médicament, ce principe actif est caractérisé par des propriétés physiques chimiques présentées dans le tableau II.1.

Tableau II.1 : Propriétés physico-chimiques du Diclofénac de sodium.

Dénomination commun (DCI)	Diclofénac sodique
Nom chimique	Déclofénacum-natricum
Aspect	Poudre cristalline, blanche faiblement jaunâtre, faiblement hygroscopique.
Formule développée	 $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$ Mr=318.1
Solubilité	Assez soluble dans l'eau, facilement soluble dans le méthanol, soluble dans les alcools, peu soluble dans l'acétone, pratiquement insoluble dans les éthers.

II.2.2. Excipients

La solution injectable CLOFENAL[®] est composée de six excipients : L'alcool benzylique, Metabisulfite de sodium, Mannitol, Propylène glycol, Hydroxyde de sodium, Eau pour préparation injectable (EPPI). Ces derniers ont des différents effets présentés dans le tableau II.2 suivant.

Tableau II.2 : L'effet des excipients dans un médicament.

L'excipient	Son effet	Sa formule chimique
L'alcool benzylique	L'alcool benzylique est un Conservateur et solvant	 <p>C₇H₈O Mr=108.1</p>
Metabisulfite de sodium	Est un antioxydant, et agent de conservation	<p>Na₂S₂O₅ Mr=190.1</p>
Mannitol "monnitolum"	C'est un agent de suspension	<pre> CH2OH HO — C — H HO — C — H H — C — OH H — C — OH CH2OH </pre> <p>C₆H₁₄O₆;Mr=182.2</p>
Propylene glycol	Pouvoir solvant étendu	<p>CH₃.....CHOH.....CH₂OH</p> <p>C₃H₈O₂ Mr=76.1</p>
Hydroxyde de sodium "Natrii hydroxydum"	On utilise le NaOH pour ajustement de PH	<p>NaOH Mr=40.00</p>
Eau pour préparation injectable "EPPI"	Pour préparation	<p>H₂O Mr=18.02</p>

II.3. Procédé de fabrication du Clofenal (75mg/3ml)

Les procédures de fabrication doivent être choisies en fonction des objectifs à atteindre et du matériel à utiliser selon la pharmacopée européenne (1997), la fabrication comprend les étapes décrites dans (Figure II.3).

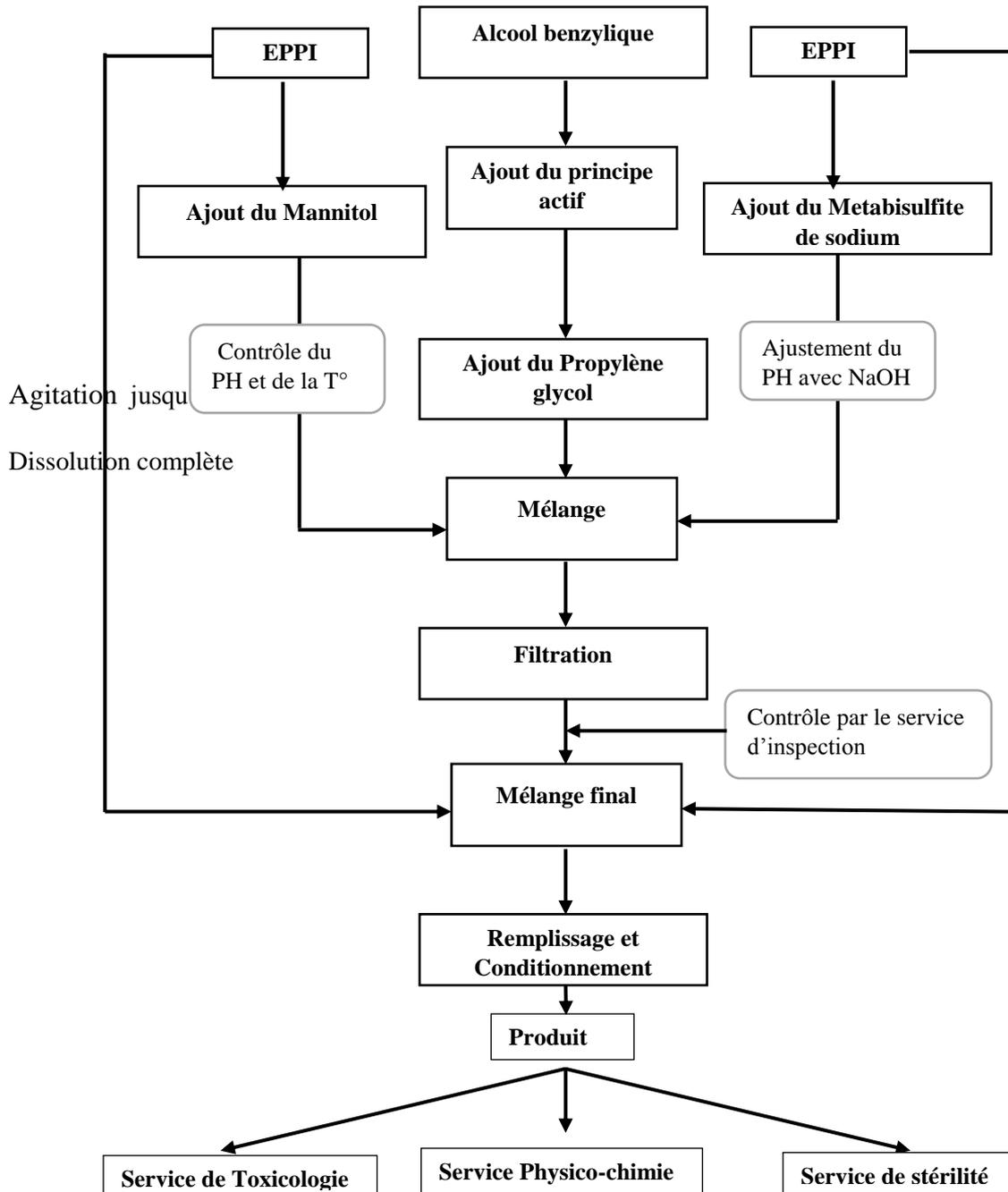


Figure II.3 : Schéma des différentes étapes de production du Clofenal(75mg/3ml) « Solution injectable ».

II.3.1. Etapes de fabrication de Clofenal(75mg/3ml)

Avant la préparation, il faut passer par une étape très importante qui est la stérilisation du matériel utilisé dans la fabrication du médicament. Il y a deux voies de stérilisation :

- Stérilisation par voie humide des pièces machines et tenues dans un autoclave ;
- Stérilisation par voie sèche des ampoules vides transparentes de 3 ml à 270 C° pendant 2h30 dans l'étuve ;

Il y a également la stérilisation du réacteur qui est réalisée pendant 30 min à une température de 121°C et une pression de 1.1 bar en ligne.

La 2^{ème} étape s'agit du remplissage du réacteur à 80% d'eau distillée, on ajoute ensuite le Mannitol et on agite pendant 20min.

En 3^{ème} étape on dissout dans un récipient le principe actif (le diclofenac sodique) dans l'alcool benzylique. Après dissolution complète du PA, on ajoute le Propylène glycol. Ce qui va faire le Mélange A.

La 4^{ème} étape est la dissolution, dans un autre récipient, le Metabisulfite de sodium dans l'eau pour préparation injectable (EPPA) et le pH est ajusté avec NaOH, ceci est le Mélange B.

On verse ensuite les mélanges A et B dans le réacteur et on laisse sous agitation (avec barbotage de l'azote) pendant 20 min. Enfin, on réalise une Pré filtration sur un filtre de 0.45 µm d'ouverture et une filtration stérilisante sur un filtre de 0.22µm ± 0.1 du mélange final.

Les analyses de contrôle de qualité sont effectuées par le service d'inspection qui permet la confirmation de la conformité du produit fini. C'est alors qu'on passe à l'étape de remplissage des ampoules dans la zone stérile (Z.A.C). Le remplissage (ZAC) se fait à température T = 21°C, et à une pression entre 1,5 et 2,5 mmH₂O.

II.4. Contrôles de qualité du médicament**II.4.1. Contrôle de qualité du principe actif (Diclofenac sodique)**

Avant que la zone de production commence son travail qui est en principe la production de la solution injectable de CLOFENAL[®] (75mg/3ml), il est mené que les travailleurs reçoivent un bulletin. Ce dernier est agréé par le responsable de laboratoire et le directeur de laboratoire ainsi que le directeur de production. Il assure le déblocage (identification) des matières premières ce que veut dire l'analyse de principe actif par laboratoire physico chimique et

microbiologie où ils assurent leurs conformités. Cette dernière est établie par des normes à atteindre pour valider le produit, ces normes sont prises de la pharmacopée européenne.

a) Aspect

L'aspect de la poudre de Diclofenac sodique est estimé visuellement.

b) Solubilité

○ **Principe**

La solubilité est la capacité d'une substance à être mise en solution et être dissoute pour obtenir un liquide homogène[23].

Tableau II.3 : Indication de la solubilité.

Terme descriptifs	Volumes approximatifs de solvant en millilitres par grammes de substances
Très soluble	Inférieur à 1
Facilement soluble	De 1 à 10
Soluble	De 10 à 30
Assez soluble	De 30 à 100
Peu soluble	De 100 à 1000
Très peu soluble	De 1000 à 10000
Pratiquement insoluble	Plus de 10000

○ **Mode opératoire**

A l'aide d'une balance de précision (SARTORIUS) (Figure II.4), on pèse des quantités différentes de diclofenac sodique et on met dans :

- Le tube 1 : 100 mg de diclofenac sodique dans 10 ml d'eau distillée ;
- Le tube 2 : 1g de diclofenac sodique dans 10 ml de méthanol ;
- Le tube 3 : 100 mg de diclofenac sodique dans 3 ml d'éthanol à 96 % ;
- Le tube 4 : 10 mg de diclofenac sodique dans 10 ml d'acétone.

On agite les 4 tubes pendant 2 à 3 min.



Figure II.4 : Balance de précision

c) Identification D

○ **Principe**

L'identification D est une étape importante, qui consiste à analyser le principe actif par la réaction (b) de sodium (virage de la couleur bleue de la flamme du bec bunsen au jaune).

○ **Mode opératoire**

Dans un tube, on met 60 mg de diclofenac sodique et 0.5 ml de méthanol. On mélange la solution obtenue et on introduit une anse en platine dans le tube puis on la met sur la flamme bleue du bec bunsen. Si cette dernière vire au jaune cela veut dire que la poudre de diclofenac sodique contient du sodium (Na).

d) Point de fusion

○ **Principe**

Détermination de la température de fusion ; la température à laquelle un corps fond, c'est -à-dire passe de l'état solide à l'état liquide [24].

Le point de fusion consiste à dissoudre le Diclofenac sodique dans un fusiomètre à une température d'environ 280 °C.

○ **Mode opératoire**

Dans le flacon contenant la poudre de Diclofenac sodique, on laisse tomber le tube capillaire à point de fusion pour le remplissage jusqu'à environ 4mm de sa hauteur, on chauffe ce fusiomètre jusqu'à 10 °C au-dessous de la température de fusion attendue, puis on introduit ce tube dans le fusiomètre « Culatti » (Figure II.5), quand la température arrive à 280°C on

remarque que le diclofenac sodique devient transparent, on augmente la T° de 1 à 2 $^\circ\text{C}$ pour assurer son bon équilibre. On détermine la T° à laquelle le diclofenac sodique passe de l'état solide à l'état liquide c'est -à-dire la T° de début de fusion.



Figure II.5 : Fusiomètre « Culatti »

e) Métaux lourds

o Principe

Les métaux lourds sont ceux qui précipitent à $\text{pH}=3.5$ sous forme de sulfures colorés par l'action des ions sulfures ou des réactifs capable de les engendrer, (Thio acétamide hydrolysé en milieu alcalin), la concentration des métaux lourds doit être ≤ 10 ppm.

o Mode opératoire

Dans un creuset, on met 2g de Diclofenac sodique et on effectue une calcination jusqu'à la disparition totale de la poudre de Diclofenac sodique.

On rince le creuset avec l'eau distillée et on la met dans un tube à essai, puis on complète ce volume à 12 ml avec l'eau distillée, et on ajoute :

- 2 ml d'une solution tampon acétate de $\text{pH} = 3,5$. (Ce tube est nommé : Echantillon).
- 1,2 ml de réactif 1 (voir annexe 03, N^o2). Ce réactif doit être récemment préparé et chauffé au bain marie pendant 2 minutes.

Tube témoin : 2 ml de solution de plomb (Pb) à 10 ppm sont mis dans un tube à essai. On ajoute : 12 ml d'eau distillée ; 1,2 ml de réactif et 2 ml de solution tampon acétate. On agite ces 2 tubes à l'agitateur pendant 2 min, et on fait leur comparaison visuellement.

f) Identification par spectrophotomètre U.V**o Principe**

La solution (Diclofenac sodique + Méthanol) est limpide, son absorbance mesurée dans l'U.V à 440 nm n'est pas supérieure à 0,05.

o Mode opératoire

Dans un tube à essai, on introduit 1,25 g de Diclofenac sodique, on ajoute un volume de méthanol pour dissoudre la poudre et on complète le volume à 25 ml avec le même solvant. On introduit une cuve contenant le blanc (méthanol) dans un spectrophotomètre U.V (Figure II.6), et dans l'autre cuve l'eau distillée. On détermine l'absorbance à 440 nm, puis on retire la cuve de l'eau distillée, on jette cette eau et on la remplit de la solution échantillon, puis on détermine son absorbance à 440 nm.



Figure II.6 : Spectrophotomètre U.V « PERKIN ELMER LAMBDA »

g) Perte à la dessiccation**o Principe**

Cet essai permet de déterminer la proportion de tous les produits volatils susceptibles d'être éliminés dans des conditions spécifiques :

- Eau (humidité de proportions variables) ;
- Eau d'hydratation ;
- Des solvants organiques.

La limite d'acceptation de la perte à la dessiccation doit être $\leq 0,5$ %.

- **Mode opératoire**

On pèse 1 g de Diclofenac sodique dans un verre de montre, qu'on met dans un dessiccateur. On sort le verre de montre et on le pose dans l'étuve (Figure II.7) réglée à 105°C pendant 3h. Après, on le récupère dans le dessiccateur et on effectue la pesée.



Figure II.7 :Etuve

La perte à dessiccation est calculée selon la formule suivante :

$$PP = \frac{Vv+Va}{p} 100 \quad (1)$$

PP : perte à la dessiccation (en %) ;

Vv : poids du verre de montre + échantillon avant dessiccation (en g) ;

Va : poids du verre de montre + échantillon après dessiccation (en g) ;

P : la pesée de Diclofenac sodique avant dessiccation (en g).

h) Dosage potentiométrique (Titrimétrie)

- **Principe**

La mesure des potentiels au cours d'une réaction permet de doser les solutions, on peut également calculer la concentration des espèces.

- **Mode opératoire**

On pèse 0,250 g de Diclofenac sodique qu'on met dans un bécher puis on ajoute 30 ml d'acide acétique glacial. On met ce bécher dans un potentiographe (Figure II.8) et on laisse sous agitation. Lorsqu'on observe que la poudre est complètement dissoute on appuie sur un

bouton qui laisse couler l'acide perchlorique (0,1M) goûte à goûte. A la première goutte de l'acide perchlorique, le potentiographe commence à tracer le graphe jusqu'à la fin du titrage.



Figure II.8 : Potentiographe « Karl Fisher »

On calcule le titre selon la formule suivante :

$$\text{Titre (\%)} = \frac{Dv \cdot EqG \cdot F \cdot 100}{p} \quad (2)$$

Titre sur tel que (Tstq) (sans base d'anhydre)

Dv : volume consommé – volume blanc (en ml) ;

Eq. G : équivalent gramme

$$1 \text{ eq. g} = \frac{\text{Masse molaire}}{\text{Nombre de mole}=1} * \text{Normalité}$$

F : facteur de solution titrant $\text{HClO}_4 = 0,1 \text{ N} = 1,0047$;

P : la pesée de Diclofenac sodique (en mg).

Titre sur base d'anhydre (Tsba) :

$$\text{Tsba} = \text{Tstq} * \frac{100}{100 - \text{perte en poids}} \quad (3)$$

Pour le Diclofenac sodique, la pharmacopée européenne demande le titre sur base anhydre.

II.4.2. Contrôle de qualité du mélange final

a) Mesure du pH

○ Principe

Le pH est une grandeur qui représente conventionnellement la concentration en ions hydrogène d'une solution aqueuse. Sa détermination est effectuée par mesure de la différence de potentiel entre deux électrodes choisies plongeant dans la solution à examiner.

○ Mode opératoire

On prend un certain volume de mélange final dans un bécher et on introduit l'électrode, le pH mètre (Figure II.9) indique la valeur du pH.



Figure II.9 : pH mètre « MEROHM »

b) Dosage au spectrophotomètre U.V

○ Principe

On appelle dosage d'un élément, la détermination de la masse de cet élément dans une certaine masse d'un mélange ou d'une combinaison.

Dans le cas d'un mélange il faut s'assurer que celui-ci est homogène sinon le dosage n'a pas de sens.

○ **Mode opératoire 00**

La solution standard est préparée comme suit :

120 mg de Diclofenac sodique (standard de référence) sont mis dans une fiole jaugée et on ajoute 100 ml d'eau distillée.

On introduit un barreau magnétique et on laisse la fiole sous agitation pendant quelques minutes. Après, on prélève 1 ml de cette solution qu'on met dans une fiole jaugée de 200 ml et on complète le volume à 200 ml avec NaOH (0,01N). On l'agite et on la nomme : standard.

La solution échantillon :

On prend 5 ml de mélange final et on les introduit dans une fiole, puis on complète avec 100 ml d'eau distillée. On agite et on prélève 1 ml de cette solution qu'on met dans une fiole jaugée de 200 ml avec une solution de NaOH (0,01 N) et on agite aussi pendant quelques minutes. On note sur cette fiole : échantillon.

On prend les 2 cuves pour spectrophotomètre. On remplit une avec du blanc (NaOH 0,01 N) et l'autre avec l'eau distillée et on détermine l'absorbance du blanc à 275 nm. Puis, on jette l'eau distillée de la cuve et on la remplace par la solution échantillon et on détermine l'absorbance du Diclofenac sodique dans le mélange. Le titre est donné par la formule :

$$\text{Titre (mg /3ml)} = \frac{DO_{Ech} \cdot P_{STD} \cdot P_i \cdot V_i}{DO_{STD} \cdot 5} \quad (4)$$

DO_{Ech} : L'absorbance d'échantillon

DO_{STD} : L'absorbance du standard.

P_{STD} : Poids du standard ;

P_i : pureté %

V_i : Volume total d'une ampoule de Clofenal : 3 ml ;

II.4.3. Contrôle de qualité du produit fini (Clofenal)

a) Aspect

L'aspect du Clofenal est estimé par un simple contrôle visuel des ampoules et de leur contenu.

b) Volume moyen

On prend 3 ampoules de Clofenal et à l'aide d'une seringue stérile, on transfère le contenu des ampoules dans un cylindre gradué, et on détermine le volume moyen selon la formule suivante :

$$V_m = \frac{V_C}{n} \text{ (5)}$$

V_m : volume moyen (en ml) ;

V_C : volume contenu dans le cylindre gradué (en ml) ;

n : nombre d'ampoules utilisées.

- **Norme** : 3 à 3,3 ml.

c) Mesure du pH

Le pH est mesuré de la même façon que le mélange final.

- **Mode opératoire**

Dans un bécher on met un volume de 15 ml de Clofenal, on plonge l'électrode et on lit la valeur du pH de ce produit.

- **Norme** : 8,0 à 9,0.

d) Identification par spectrophotométrie U.V

- **Principe**

L'identification s'effectue par spectrophotométrie UV.

- **Mode d'opérateur**

- **Solution standard**

On introduit 125 mg du Diclofenac sodique de référence (puissance 99,69%) dans une fiole jaugée, on ajoute 100 ml d'eau distillée et on agite. Puis on prélève 1 ml de cette solution qu'on met dans une autre fiole et on complète le volume à 200 ml avec du NaOH (0,01N) et on agite.

La concentration du standard est donnée par la formule suivante :

$$\text{Concentration STD (mg /ml)} = \frac{\text{Pesée}_{STD}(\text{mg})}{\text{Volume d'eau(ml)}} \times \frac{1}{\text{Volume (NaOH)}} \text{ (6)}$$

La concentration de la solution standard obtenue est de 6 mg/ml.

- **Solution échantillon**

On prend 5 ml du Clofenal (produit fini) « c'est l'équivalent de 125mg » et on opère de la même manière que pour le standard.

$$\text{Concentration Ech} = \frac{\text{Volume Ech}}{\text{Volume d'eau}} \times \frac{1}{\text{Volume (NaOH)}} \quad (7)$$

Dans deux cuves, on met dans l'une le standard et dans l'autre l'échantillon. On règle le Spectrophotomètre U.V à chaque fois à une longueur d'onde $\lambda = 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, \dots 310$ nm.

On détermine l'absorbance du standard et de l'échantillon, pour toutes ces longueurs d'onde. On trace ensuite les 2 graphes $DO = f(\lambda)$.

- **Norme** : max d'absorbance des deux solutions à $\lambda = 275$ nm.

e) **Dosage par spectrophotométrie U.V**

Le mode opératoire est donné dans le paragraphe précédent.

- **Norme** : 67,5 à 82,5 mg/3ml.