

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SALAH BOUBNIDER-CONSTANTINE 3.**



**FACULTE DE GENIE DES PROCEDES
DEPARTEMENT DE GENIE PHARMACEUTIQUE**

Filière : Génie des procédés

Spécialité : Génie pharmaceutique

Mémoire de Master

**Développement et validation d'une méthode
de dosage utilisée dans l'industrie
Pharmaceutique**

Dirigé par :

Dr. BENAÏSSA-KACEM CHAOUICHE Akila

Présenté par :

DAKHEMOUCHE Nassima

KIKAH Dounia

Année Universitaire 2021/2022

Session:(juin)

Table des matières

Dédicace	IV
Table des matières.....	VI
Liste des tableaux	XII
Liste des figures	XIII
Liste d’abréviations	XVI
Introduction générale.....	1
Partie théorique :	
1. Aperçu bibliographique.....	4
1.1. Introduction.....	4
1.2. Plantes médicinales.....	4
1.2.1. Utilisation des plantes médicinales.....	5
1.2.1.1. Médicaments à base de plantes	5
1.2.1.2. Compléments Alimentaires à base de plantes	6
1.2.2. Extraction des plantes médicinales.....	7
1.2.2.1. Introduction.....	7
1.2.2.2. Différents types d’extraction	7
1.2.2.2.1. Extraction par un Fluide	8
✓ Extraction Liquide-Liquide	8
✓ Extraction Liquide-Solide	8
1.2.2.2.2. Extraction par un Solide	9
1.2.2.3. Différentes étapes de l’extraction des plantes médicinales	10
1.2.2.3.1. Réduction de la taille	10
1.2.2.3.2. Etape d’extraction proprement dite	10
✓ Macération	10
1.2.2.3.3. Séparation Liquide-Solide	11
1.2.3. <i>Rhamnus alaternus</i>	11
1.2.3.1. Introduction	11
1.2.3.2. Caractéristiques morphologiques	12
1.2.3.3. Composition chimique de l’espèce <i>Rhamnus Alaternus</i>	12
1.2.3.3.1. Flavonoïdes	12
1.2.3.3.2. Tanins	14
1.2.3.3.3. Coumarines.....	15
1.3. Techniques analytiques utilisées dans le domaine pharmaceutique.....	15

1.3.1. Définition.....	15
1.3.2. Modes de séparation.....	16
1.3.3. Chromatographie liquide à haute performance.....	16
1.3.3.1. Principe	16
1.3.3.2. Equipement	17
✓ Pompe	18
✓ Injecteur	18
✓ phases stationnaires	18
✓ Phases mobiles	19
✓ La colonne	19
➤ La phase normale.....	19
➤ La phase inverse.....	20
✓ Détecteur	20
1.3.3.3. Avantages de la chromatographie liquide haute performance	20
1.3.3.4. Domaines d'application de l'HPLC.....	21
2. Développement et validation d'une méthode de dosage par HPLC.....	22
2.1. Définition d'une Méthode d'analyse.....	22
2.2. Raisons du développement de nouvelles méthodes d'analyse.....	22
2.2.1. Etapes de développement d'une méthode de dosage par HPLC.....	22
2.2.1.1. Comprendre les propriétés physicochimiques de la molécule médicamenteuse.....	23
2.2.1.2. Configurer les conditions HPLC.....	24
a. Sélection de tampon.....	24
b. Sélection du détecteur.....	25
1. Le détecteur spectrophotomètre UV-Visible.....	26
2. Le détecteur à indice de réfraction.....	26
3. Détecteur de fluorescence.....	26
4. Détecteurs électrochimiques	26
c. Phase mobile et mode d'élution	26
✓ Élu­tion Isocratique	26
✓ Gradient élu­tion	26
➤ Force de solvant de la phase mobile	27
d. Dimensions des colonnes.....	27
e. Longueur d'onde	27
f. Débit.....	28

g. Température	28
2.2.1.3. Préparation de solutions d'échantillons pour le développement de méthodes.....	28
2.2.1.4. Optimisation de la méthode.....	29
2.2.1.4.1. Système de conformité	29
A. Nombre de plaques théoriques/Efficacité (N).....	29
B. Facteur de capacité (k ou k').....	30
C. Facteur de séparation (α)	31
D. Résolution (Rs).....	31
E. Facteur de trainé ou facteur d'asymétrie	32
2.2.1.5. Validation d'une méthode de Dosage.....	34
2.2.1.5.1. Définition de la validation analytique	34
2.2.1.5.2. Pourquoi Revalider.....	34
2.2.1.5.3. Critères de validation	35
2.2.1.5.4. Contexte Règlementaire	36
2.2.1.5.5. Définition des critères de la validation analytique d'une méthode de dosage.....	37
a. Spécificité/Sélectivité.....	37
b. Linéarité /Etalonnage	37
c. Exactitude.....	38
d. Précision.....	39
✓ Répétabilité.....	39
✓ Précision intermédiaire.....	39
✓ Reproductibilité.....	40
e. Écart d'utilisation.....	40
f. Robustesse.....	40
• Stabilité des solutions d'analyse.....	40
• Temps d'extraction	40
3. Produits Nutraceutiques.....	42
3.1 Introduction	42
3.2. Réglementations En Vigueur Spécifiques Aux Nutraceutiques.....	42
3.3. Définition d'un complément alimentaire	43
3.3.1. Contrôle et analyse des compléments alimentaires	43
3.4. Complément Alimentaire à base de la quercetine 250 mg gélule.....	44
3.4.1. Introduction	44
3.4.1.1. Description de la quercetine	44

3.4.1.2. Propriété physicochimique de la quercetine.....	45
3.4.1.3. Biodisponibilité et pharmacocinétique de la quercetine	46
3.4.1.4. Activités pharmacologiques de la quercetine	46
a. Activité Antioxydant	46
b. Activité Antimicrobiennes	47
c. Activité Antivirale	47
d. Activité anti-inflammatoires.....	48
e. Activité Antiprotozoaire	48
f. Allergies, Asthme, Rhume Des Foins et Urticaire.....	49
g. Ulcère et Gastrite	49
h. Cancer et Apoptose.....	49
i. Affections Neurodégénératives	49
j. Prévention des maladies cardiovasculaires.....	50
3.4.1.5. Interaction quercetine-Médicament.....	50
3.4.1.6. Effets secondaires toxiques de la quercetine	50
3.4.1.7. Complément Alimentaire à base de la quercetine	51
A. Description du Produit	51
B. Posologie	51
C. Ingrédients	52
D. Précautions d'emploi	52
E. Conditions de conservation.....	52
Partie expérimentale :	
4. Matériel et Méthodes.....	53
4.1. Produits chimiques /Réactifs et standard /Excipient.....	53
4.2. Instrumentation.....	53
4.3. Analyse de l'extrait 100% de la plante <i>Rhamnus Alaternus</i> et leurs Fractions.....	54
4.3.1. Caractéristiques physicochimiques.....	55
4.3.2. Méthodes de dosage par HPLC utilisées	56
4.3.2.1. Première méthode.....	56
4.3.2.2. Deuxième Méthode : Détermination de la Quercetine (Test Flavonoïdes).....	57
4.3.2.3. Troisième Méthode :Détermination de l'acide caféique (test des acides phénoliques).....	57
4.4. Développement et validation de la méthode de dosage de la quercetine dans un produit fini (Gélule).....	58

4.4.1. Préparation des solutions (Etalon et Essais).....	59
4.4.1.1. Etalon pour développement	59
4.4.1.2. Solutions pour validation	59
4.4.2. Validation de la méthode.....	59
✓ Spécificité.....	60
✓ Linéarité et Courbe d'étalonnage.....	60
✓ Exactitude.....	60
✓ Précision ou Fidélité.....	61
4.5. Procédé de Fabrication.....	61
4.5.1. Procédé Proposé.....	62
• Mélange Initial	62
• Granulation Humide	62
• Séchage	63
• Calibrage	63
• Mélange Final et Homogénéisation	63
• Remplissage	63
5. RESULTATS ET DISCUSSION.....	64
5.1. Résultats d'analyse de l'extrait de la plante <i>Rhamnus Alaternus</i> et leurs fractions.....	64
5.1.1. Première Méthode.....	64
5.1.2. Deuxième Méthode.....	65
5.1.3. Troisième Méthode.....	66
5.2. Développement de la méthode de dosage	70
5.2.1. Choix De La Longueur D'onde	71
5.2.2. Choix de volume d'injection.....	71
5.2.3. Choix de la composition de la phase mobile.....	73
5.2.4. Choix du débit.....	74
5.2.5. Choix de la température.....	75
5.2.6. Choix du pH du tampon de la phase mobile.....	77
5.2.7. Conclusion.....	78
5.3. Résultats de la validation Analytique.....	79
5.3.1. Spécificité	79
5.3.2. Linéarité	80
5.3.2.1. Etude statistique de la linéarité	80

5.3.2.1.1 Droites de régression	80
5.3.2.1.2 Interprétation	80
5.3.3. Exactitude	81
5.3.3.1. Estimation de l'intervalle de confiance du recouvrement moyen	82
5.3.3.2. Interprétation	82
5.3.4. Précision	82
5.3.4.1. Résultats de la Répétabilité.....	82
5.3.4.2. Résultats de la précision intermédiaire.....	83
5.3.4.3. Etude statistique de la Précision	83
5.3.4.4. Interprétation.....	84
5.4. Suivi et Contrôle du produit formulé (Complément Alimentaire Quercetine 250 mg Gélule).....	84
• Séchage	84
• Dosage du produit intermédiaire	84
• Remplissage.....	84
Conclusion générale et perspectives.....	85
Références bibliographiques	87
Annexe.....	93

Résumé

A travers ce travail, nous avons effectué un développement et une validation d'une méthode de dosage d'un produit fini : Complément alimentaire **Quercetine 250mg gélule** par Chromatographie Liquide à Haute Performance à polarité de phases inversée couplée à un détecteur DAD en se basant dans cette démarche sur les bases scientifiques en vigueur et sur les critères décrits par le référentiel (ICH Q2) .

L'utilisation de la HPLC comme technique de dosage du Complément alimentaire **Quercetine 250mg gélule**, a été testée pour les critères suivants : Spécificité, Exactitude, Linéarité, et Précision dans le cadre d'une validation interne au laboratoire.

Nos résultats expérimentaux montrent que la méthode choisie pour cette étude est : Spécifique dont on a prouvé qu'il n y a pas d'interférence entre la substance à doser et la matrice/diluant, linéaire dont la droite de régression est d'une équation $Y=36736950 X - 41049.6$ et un coefficient de détermination égale à 0.9947, Précise dont le RSD de la répétabilité est 1.66% de et le RSD de la précision intermédiaire est de 1.61%, et exacte avec une moyenne des taux de recouvrements égale à 99.75%. La technique s'est montrée valide pour l'utilisation, définie dans l'écart d'utilisation allant de 0.016 mg/ml jusqu'à 0.024 mg/ml de la quercetine.

Puisque la quercetine existe dans les feuilles de la plante *Rhamnus Alaternus*, on a proposé de procéder à la formulation d'un complément alimentaire à base de cette molécule naturelle, qui sera donc **Quercetine 250 mg gélule**, de développer, et de valider une méthode de quantification de cette molécule dans son produit fini.

Mots clés : plante, racine, *Rhamnus alaternus*, extrait, macération, HPLC-DAD, quercetine, développement d'une méthode de dosage, validation analytique, ICH, formulation, complément alimentaire, gélule.

الملخص

من خلال هذا العمل ، قمنا بتطوير والتحقق من طريقة التحليل الكمي لجرعة منتج نهائي : المكمل الغذائي **كيرسيتين 250 مع كبسولة** بواسطة كروماتوجرافيا سائلة عالية الأداء مع قطبية معكوسة الطور مقترنة بجهاز DAD بطرق مبنية على أسس علمية ووفقاً للمعايير الموضحة في المرجع ICH(Q2)

تم اختبار استخدام HPLC كتقنية قياس كمي للمكمل الغذائي **كيرسيتين 250 مع كبسولة** للمعايير التالية: الخصوصية والدقة والخطية ودقة التكرار كجزء من التحقق الداخلي من صحة طريقة التحليل الكمي في المختبر.

تظهر نتائجنا التجريبية أن الطريقة التي تم اختيارها لهذه الدراسة هي: خاصة والتي تم إثبات عدم وجود تداخل بين المادة

المراد فحصها والمصفوفة / المادة المخففة. خطية بالمعادلة التالية لخط الانحدار $Y = 36736950 X - 41049.6$ ومعامل تحديد يساوي 0.9947 ، دقيقة في التكرار حيث ان RSD قابلية التكرار يساوي 1.66% و RSD الدقة المتوسطة يساوي 1.61% ودقيقة في نتائج الاسترداد بمتوسط معدل استرداد يساوي 99.75%. لقد ثبت أن هذه التقنية صالحة للاستخدام، حيث تم تحديدها في نطاق الاستخدام الذي يتراوح من 0.016 مجم / مل إلى 0.024 مجم / مل من كيرسيتين.

نظرًا لوجود الكيرسيتين في أوراق نبات *Rhamnus Alaternus* فقد تم اقتراح تركيبة لمكمل غذائي بناءً على هذا الجزيء الطبيعي ، والذي سيكون **كيرسيتين 250 مع كبسولة** و تطوير والتحقق من صحة طريقة التحليل الكمي لهذا الجزيء في المنتج النهائي .

الكلمات المفتاحية : نبات ، جذر ، *Rhamnus Alaternus*، مستخلص ، نقع ، HPLC-DAD ، كيرسيتين تطوير طريقة التحليل الكمي ، التحقق التحليلي ، ICH ، تركيبة ، مكمل غذائي ، كبسولة.