

M. e. H. Lees / 46

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

CENTRE UNIVERSITAIRE DE OUARGLA

INSTITUT DE CHIMIE INDUSTRIELLE

Mémoire de fin d'étude
Présenté en vue d'obtention du titre
INGENIEUR D'ETAT
Spécialité : Chimie industrielle
OPTION GENIE CHIMIQUE

Présenté par :
Zoubeidi Chahinaz

La mise au point d'une méthode
D'identification et de dosage d'un
Stimulant « Pseudoéphedrine, HCl »
Dans un milieu biologique « urines »

Encadreur :

Mr Ladjel. S.

Mr Bouaricoua. K.

● **Promotion 2000** ●

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

CENTRE UNIVERSITAIRE DE OUARGLA

INSTITUT DE CHIMIE INDUSTRIELLE

Mémoire de fin d'étude
Présenté en vue d'obtention du titre
INGENIEUR D'ETAT
Spécialité : Chimie industrielle
OPTION GENIE CHIMIQUE

Présenté par :
Zoubeidi Chahinaz

La mise au point d'une méthode
D'identification et de dosage d'un
Stimulant « Pseudoéphedrine, HCl »
Dans un milieu biologique « urines »

Encadreur :

Mr Ladjel. S.

Mr Bouaroua. K.

● Promotion 2000 ●

DEDICACES

Je dédie ce travail :

- A mes chères parents (Mekki, Fella) qui ont veillé avec une grande attention pour réaliser cette réussite dans mes études.
- A toutes personnes participées de m'aider pour faire se bon travail sans oublier mes proches(Ahmed, Samira).
- A mes frères : Amar, Saci, Lamin, Lzhar , Brahim, Idriss, Yassine, Mouhamed.
- A mes sœurs : Hayat, Linda, Anissa, Fetna, Zouhra, Nawel, Ghozlane, Samira, Ahlame.
- A tous la section de 5^{ème} année.
- A Karim, Touhami.

Z. Chahinaz

Remerciements

Ce travail a été réalisé au niveau des laboratoires de chimie analytique à l'CRD Saïdal .

Nous tenons en cette occasion à exprimer notre profonde reconnaissance à notre encadreur Mr R.Segni de leur conseils précieux qu'il nous a offert ainsi pour la confiance qu'il nous a accordé.

Que notre promoteur Mr K.Bouarioua assistant de recherche.

Nos remerciements à notre examinateur Mr Benaghzer.Mourad, ingénieur spécialiste chimie industrielle, pour son aide.

Mes remerciements sont également à Mme. Hamdi.N, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire de chimie analytique.

Enfin à tout le personnel de l'CRD Saïdal surtout ceux des laboratoires de chimie analytique, pharmaco-toxicologie et galénique, qui nous ont été d'une grande aide pendant la durée de réalisation de ce travail.

Et je tiens à remercier aussi, mes amis, messaouda, fadila, salah, achour, rafik, ...

Et tous qui m'ont aidé dans mon travail.

TABLE DES MATIERES

page

TABLE DES MATIERES.....	1
LISTE DES TABLEAUX.....	4
LISTES DES FIGURES.....	5
ABREVIATIONS.....	8
INTRODUCTION.....	8

PARTIE THEORIQUE

I- Les médicaments.....	9
1- Définition.....	9
2- Rappel de pharmacologie générale.....	9
II- Le pseudoephedrine, HCl.....	11
1- Introduction.....	11
2- Caractères et effets thérapeutiques.....	11
III- Les méthodes d'analyses utilisées.....	13
1-Spectrophotométrie UV- visible.....	13
1-1 Principe de la méthode.....	13
1-2 Loi de Béer et Lambert.....	13
2- Spectrophotométrie dans IR.....	15
2-1 Principe de la méthode.....	15
3-Notions de chromatographie.....	16
3-1 Définition.....	16
3-1 Classification des méthode chromatographiques.....	16
3-2-1 Selon la nature des phases.....	16
3-2-2 Selon la nature des phénomènes mise en jeu dans la séparation.....	16
3-2-2.a. La chromatographie d'adsorption.....	16
3-2-2.b. La chromatographie de partage.....	17
3-2-2.c. La chromatographie par d'échange d'ions.....	17
3-2-2.d. La chromatographie exclusion diffusion ...	17
3-2-3. Selon le procédé utilisé.....	17
3-2-3-a. La chromatographie sur surface.....	17
- La chromatographie sur papier (C.P.).....	17
- La chromatographie sur couche mince (C.C.M.)..	18
3-2-3.b. La chromatographie sur colonne.....	18
4-La Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance (C.L.H.P.).....	19
4-1- Introduction.....	19
4-2- Principe de base.....	19

4-3- L'appareillage d'un système C.L.H.P.....	19
4-4 les différents grandeurs caractéristiques correspondants	20
4-4-1 Grandeurs de rétentions.....	20
4-4-2. Efficacité d'une colonne.....	21
4-4-3. Sélectivité.....	21
4-4-4. Résolution.....	21
5- Validation d'une méthode d'analyse	23
5-1- Introduction	23
5-2- Définitions.....	23
5-2-1. Spécificité.....	23
5-2-2. Sélectivité.....	23
5-2-3 linéarité.....	24
5-2-4. Fidélité.....	24
5-2-4-a- Répétabilité.....	24
5-2-4-b-Reproductibilité.....	24
5-2-5. Seuil de détection.....	24
5-2-6. Seuil de quantification.....	24
5-3 Critères statistiques pour évaluer une méthode d'analyse	25

PARTIE EXPERIMENTALE :

I- Contrôle de qualité du « Pseudoephedrine, HCl »	26
II- Mise au point d'une méthode de dosage de « Pseudoephedrine, HCl »	28
1- Matériels et méthodes.....	28
1-1- Matériels utilisés.....	28
1-2- Méthodes	29
1-2-1. Optimisation des conditions opératoires :.....	29
1-2-1-1. Choix de la phase stationnaire.....	29
1-2-1-2. Choix de la phase mobile.....	29
1-2-1-3. Choix de longueur d'onde.....	31
1-2-1-4. Influence de polarité de la phase mobile.....	31
1-2-1-5. Influence de pH de la phase mobile	32
2- Validation de la méthode	37
2-1. Spécificité	37
2-2. Sélectivité.....	38
2-3. Linéarité.....	38
2-3-1. Linéarité de l'étalon.....	38
2-3-2. Linéarité de l'échantillon.....	39
2-4. Fidélité.....	44
2-4-1. Répétabilité.....	44
2-4-2. Reproductibilité.....	45
2-5. Limite de détection.....	49
2-6. Limite de quantification.....	49
III Application de la méthode de dosage du « pseudoephedrine, HCl »	

dans l'urine.....	50
1- Administration	50
2- Préparation des solutions à injecter dans l 'C.L.H.P.....	50
3-Interprétation & Conclusion.....	51
CONCLUSION GENERALE.....	53

BIBLIOGRAPHIE

ANNEXES

LISTE DES TABLEAUX

Tab.n°1 : Indication du valeurs de facteurs de capacité

Tab.n°2 : Les résultats des essais de contrôle de qualité du
« Pseudoéphédrine, HCl »

Tab.n°3 : Choix de la phase mobile

Tab.n°4 : Influence de polarité de la phase mobile

Tab.n°5 : Influence de pH de la phase mobile

Tab.n°6 : Etude de la linéarité du de l'étalon

Tab.n°7 : Etude de la linéarité du l'échantillon

Tab.n°8 : Etude de la répétitivité du « Pseudoéphédrine, HCl »

Tab.n°9 : Etude de la reproductibilité du « Pseudoéphédrine, HCl »

Tab.n°10 : Mode d'administration

Tab.n°11 : Les résultats obtenus après l'application de la méthode de dosage du

« Pseudoéphédrine, HCl » dans les urines

LISTE DES FIGURES

- Fig. n°1 : Schéma de principe d'appareillages de l'C.L.H.P.
- Fig. n°2 : Présentation des caractéristiques chromatographiques.
- Fig. n°3 : Choix de la phase stationnaire.
- Fig. n°4 : Choix de la phase mobile.
- Fig. n°5 : Choix de longueur d'onde.
- Fig. n°6 : Influence de la polarité de la phase mobile.
- Fig. n°7 : Influence de pH de la phase mobile.
- Fig. n°8 : Variation de Tr en fonction du % du tampon KH_2PO_4 .
- Fig. n°9 : Variation du Tr en fonction du pH de la phase mobile.
- Fig. n°10 : Etude de la spécificité.
- Fig. n°11 : Etude de la sélectivité.
- Fig. n°12 : Etude de la linéarité de l'Etalon
- Fig. n°13 : Etude de la linéarité de l'Echantillon.
- Fig. n°14 : Courbe d'Etalonnage du l'Etalon.
- Fig. n°15 : Courbe d'Etalonnage du l'Echantillon.
- Fig. n°16 : Etude de la répétitivité
- Fig. n°17 : Etude de la reproductibilité.
- Fig. n°18 : Etude de la limite de détection.
- Fig. n°19 : Application de dosage du « Pseudoephedrine, HCl » dans les urines.
- Fig. n°20 : Spectre d'identification par spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet
- Fig. n°21 : Spectrophotométrie d'absorption dans l'infra-rouge
- Fig. n°22 : Préparation de la gamme d'étalonnage de l'étalon.
- Fig. n°23 : Préparation de la gamme d'étalonnage de l'échantillon.

ABREVIATIONS

- atm : Atmosphère.
B.P.C. : bonded Phase Chromatographie (Chromatographie sur phase greffée).
C' : vitesse de lumière.
C : concentration d'une solution.
°C. : Degré Celsius.
°C/ mn : Degré Par Minute.
C.C.M. : Chromatographie sur couche mince.
Ch : Chromatographie.
CHCl₃ : Chloroforme.
CH₂Cl : Dichloroforme.
C₂H₅OH : Ethanol.
CH₃COOH : Acide acétique glacial.
CH₃OH : Méthanol.
Cl⁻ : Chlorures.
Cl HP : Chromatographie liquide à haute performance.
C.L.G. : Chromatographie liquide /gel.
C.L.L. : Chromatographie liquide/liquide.
cm : Centimètre.
C_m : Chromatographie sur papier. concentration du soluté dans la phase mobile.
comp : Comprimé.
C.P.
C.P.G. : Chromatographie en phase gazeuse.
C.P.L. : Chromatographie en phase liquide.
C_s : concentration du soluté dans la phase stationnaire. D.C.I. :
DO : Densité optique
E : Etalon.
ev : électron volt.
g : gramme.
H : hauteur.
h : heure.
H⁺ : hydrogène.
HCl : acide chlorhydrique
H₂O : eau.
H₂SO₄ : acide sulfurique.
H₃PO₄ : acide phosphorique.
I : l'intensité à la sortie d'une solution.
I₀ : l'intensité à l'entrée d'une solution.
IR : infrarouge.
K_d : coefficient de partage.

K': facteur de capacité.
K⁺ : ion de Potassium .
KBr : Bromure de Potassium..
K₂CO₃: Carbonates de potassium.
KH₂PO₄ : tampon phosphates de potassium.
L.D. : limite de détection.
Log : logarithme décimal
M : molaire.
Mg⁺⁺ : magnésium.
mg : milligramme.
mg/l : milligramme par litre.
mg/ml : milligramme par millilitre.
ml/min : millilitre par minute.
Na⁺ : ion de Sodium.
NaCl : chlorure de sodium.
NaOH : hydroxyde de sodium.
NH₃ : ammoniaque.
NH₄⁺ : ion d'ammonium.
NH₄COOCH₃ : acétates d'ammonium.
p.a : principe actif.
pH : potentiel en hydrogène.
ppm : particule par million.
Réf : référence.
Rs : résolution.
T : tolérance
T₀ : temps mort.
Tr : temps de rétention.
T° : température.
UV : ultra-violet.
W : la largeur de l a base de pics.
% : pourcentage.
nm : nanomètre.
α : la sélectivité
δ : sélectivité.
λ : longueur d'onde.
μ : micro.
μg/ml : micro gramme par millilitre.
μl : micro litre.

INTRODUCTION

La 'Pseudoephedrine, HCl' est un principe actif qui fait partie à la classe des alcaloïdes, il est très utilisé en temps qu'agent dopant et dans pas mal de préparations pharmaceutiques comme ingrédient et vu son importance thérapeutique, CRD SAIDAL à entamer Tout un axe de recherche afin de développer des méthodes de séparations et d'identifications de ces principes actifs.

C'est dans cet axe que m'a été proposé le présent sujet qui porte pour thème 'Mise au point d'une méthode d'identification et de dosage de la Pseudoephedrine, HCl dans le milieu biologique (urine)'.

Comme méthode de séparation on a opté pour la CLHP qui permet de séparer des mélanges complexes en un temps très court avec un système de détection très sensible et fiable.

Le plan de notre travail est composé d'une partie théorique qui englobe toutes les informations nécessaires récentes sur notre sujet et une partie pratique dans laquelle on a résumé l'ensemble des résultats trouvés ainsi que les interprétations adéquates.

En fin une conclusion générale résume le travail demandé.

I-LES MEDICAMENTS

1-Définition :

un médicament d'une façon très large, comme toute substance qui affecté les processus de la vie.

L'Organisation Mondiale de la Santé(O.M.S.) donne une définition plus stricte « le terme médicament s'entend à toute substance ou produit utilisé vue de modifier ou d'étudier un système physiologie, ou on etait pathologie dans l'intérêt de sujet au quel il administre[12].

2- RAPPEL DE PHARMACOLOGIE GENERALE

ORIGINE DE MEDICAMENTS

- Naturelles : Minérale, Animale, Végétale Artificielles : synthèse

CATEGORIES DES MEDICAMENTS

- Produit officinaux : Drogues (origine naturelle) [6]

- Produits chimiques purs

- Préparations galéniques(à partir de plusieurs drogues)

- Préparation magistrale : personnalisées pour une maladie

- Spécialité pharmaceutique : dénomination scientifique (Normalisation de L IUPAC)

- Dénomination commune (nom simple utilisable en tous pays)

dénomination commerciale

VOIE D'ADMINISTRATION

ORALES

Solides		liquides
Cachets		sirop
Comprimés	divers	potions
Dragées	enrobages	gouttes

Pilules	solutés	aqueux
Capsules		Alcooliques
arachi-		
Gelules		

Granulés
épidurale
Sachets

TRANSMEQUEUSES

Rectale
Bucco-lingatile
oculaires
Trachio bronchique
urinaires

PARENTERALE

- sous cutané
- intramusculaire
- intraveineuse
- intra artérielle

- intracardiaque
- intrachidiennne - sous
diennne

LOCALES

Application sur la peau
Application sur
les muqueuses génito-

Injection :
- Intra pleurale
- Intra articulaires

II- PSEUDOEPHEDRINE

1- INTRODUCTION :[11]

Les éphédras sont des sous arbrisseaux dioïque, leurs espèces renferment des quantités notables d'alcaloïdes, sont pour la plupart asiatiques.

Si l'on a identifié dans la drogue des flavonoïdes et des pranthocyanidols, ce sont surtout les substances azotées ce sont des dérivés de types phénéthylamine.

Le constituant majoritaire est presque toujours la (-) éphédrine (configuration 1R,2S) qui présente 40 à 90% des alcaloïdes totaux, et compagnie de (+) pseudoéphedrine de configuration(1S, 2S)ainsi que des dérivés nor et N,N diméthyl corres.

2-CARACTERES ET EFFETS THERAPEUTIQUES:

- **-Indication:[15]**

Traitement symptomatique de la congestion nasale au cours des affections aiguës rhino-pharyngés.

- **Posologie et mode d'administration:[15]**

- Par voie orale.

- Comprimé contient : 60mg de « Pseudoéphédrine,HCl ».

- **Contre indication:[15]**

- Risque de glaucome par fermeture de l'angle.

- Risque de rétention urinaire liée notamment à des troubles urétroprostatiques.

- Ils sont à éviter chez les femmes enceinte ou qui allaite.

- **Précautions d'emplois:[15]**

Comme tous les sympathomimétiques, la « Pseudoéphedrine, HCl » doit être utilisée avec prudence, chez les sujets hypertendus diabétiques, âgés ou cas des psychose.

Sportifs:

Substance interdite (Journal officiel du 7 mars 2000.)- Une Concentrations supérieure à $10\mu\text{g/ml}$ d'urine est considérée comme un résultat positif .

III. LES METHODES D'ANALYSES UTILISEES:

1- SPECTROPHOTOMETRIE ULTRAT VIOLET ET VISIBLE:

1-1. Principe de la méthode :

Une analyse UV- Visible revient à déterminer les possibilités d'adsorption électroniques d'une molécule et à tracer de bande correspondant

Les transitions électroniques UV-Visible sont dues à l'absorption de quantum d'énergie lumineuse par un électron qui passe d'une orbitale liante à une orbitale antiliante. [10]

Les énergies mise en jeu varient en fonction de la longueur d'onde, et est données par la relation développé par Planck :

$$E = H * c / \lambda$$

E : énergie d'un quantum lumineuse (E en kcal / mol, ou ev.)

H : constante de Planck

C : vitesse de lumière

λ : longueur d'onde (ηm)

Les groupements chimiques susceptibles de conduire à une absorption de la lumière dans l'UV-Visible ($200 \eta\text{m} < \lambda < 800 \eta\text{m}$) sont appelées les chromophores ($\text{C}=\text{C}$; $\text{C}\equiv\text{C}$). Ces derniers se définissent par des transitions exploitables dans l'U.V. proche à partir de $200 \eta\text{m}$.

Il existe d'autre groupement incapables à eux seuls de provoquer l'absorption.

1-2. Loi de Béer - Lambert: [7]

Supposant qu'un faisceau de lumière monochromatique traverser une solution d'un corps absorbant, soit I° l'intensité du faisceau lumineuse à l'entrée de la solution et I son intensité à la sortie, soit c la concentration du corps absorbant.

[7]

la loi de Béer et celle de Lambert peuvent exprimer en une relation unique: [7]

$$\text{Log } I^{\circ} / I = L \cdot \epsilon \cdot C$$

I° : l'intensité lumineuse à l'entrée de la solution

I : l'intensité lumineuse à la sortie de la solution

L :  paisseur de flacon d'analyse de l'échantillon (en cm)

ϵ : coefficient d'adsorption molaire

C : la concentration de la solution de substance à analyser

La transition « T » est défini comme le rapport des deux intensités lumineuse : [7]

$$T = I / I^{\circ} \quad (\text{on l'exprime souvent en } \%)$$

La densité optique « Do » (ou absorbance) est le logarithme inverse du rapport inverse : [7]

$$Do = \log I^{\circ} / I = Ab$$

2- SPECTROPHOTOMETRE DANS L'INFRA-ROUGE :

2-1. Principe:

La spectrophotométrie IR a pour base l'absorption de l'énergie de photons ($h\nu$) donnant naissance à des vibrations moléculaires. [9]

Les photons d'une lumière monochromatique peuvent également entrer en collision élastique avec certains domaines moléculaires. [9]

Ce procédé d'identification c'est très largement développé au cours des dernières années, comme dans le cas précédent c'est la propriété des molécules d'absorber certaines radiations lumineuses qui va être mise à profit. [1]

Toute fois, l'absorption aura lieu ici à des longueurs d'ondes utilisées en pratique de 200 à 4000 cm^{-1} .

Les fréquences des bandes d'absorption seront en fonction des masses atomiques du vibreur, de la force de liaisons, et de la symétrie de la molécule. [1]

Le spectre IR d'une molécule organique est infiniment plus complexe que le spectre UV-Visible, Il comporte un très grand nombre de bandes exprimées en ηm on parle plutôt des fréquences de vibrations celles-ci sont exprimées en cm^{-1} . [10]

3. NOTIONS DE LA CHROMATOGRAPHIE

3-1. Définition:

C'est une méthode d'analyse immédiate par percolation d'un liquide, ou d'un gaz sur une matière poreuse, ou divisée, Il se produit alors des échanges répétés entre une phase fixe, qui est appelée phase stationnaire, et les constituant de la phase mobile. Se sépare, par suite de la différences de leurs vitesse de migration. .[1]

3-2. Classification :

On peut classer les méthodes chromatographies de trois manières différentes :

2-2-1. Selon la nature des phases:

La phase fixe (ou phase stationnaire) peut être, soit un liquide solide ayant des propriétés adsorbants, soit un liquide qui imprègne un solide, un liquide qui solvate un solide, et on fait intégrante(on parle, alors, de « gel »), soit, en fin, un solide à la surface du quel on a greffé des molécules appropriés. La phase mobile soit un liquide, Ou un gaz vecteur on distingue[17]

Ainsi:

1. chromatographie liquide – solide
2. chromatographie liquide - liquide
3. chromatographie gaz – solide
4. chromatographie gaz liquide

3-2-2. Selon la nature des phénomènes mise en jeu dans la séparation :

On distingue :

3-2-2-a. La chromatographie d'adsorption :

Lorsque la phase stationnaire est un solide doué de propriétés adsorbantes. [8]

Pour obtenir des séparations reproductibles il faut, donc maintenir constante la teneur en eau de l'adsorbant. [17]

3-2-2-b. La chromatographie de partage:

La séparation repose sur la différence de solubilité de la molécule dans les deux phases (liquides) pratiquement, non miscibles. Ou des différences interactions des solutés avec les motifs organiques. [16]

Actuellement, on utilise, pratiquement, plus que les phases greffées, et nous nous limitons. A cette forme de la chromatographie de partage qui est nommé:

chromatographie de partage sur phase stationnaire greffée « Bonded Phase Chromatograph » B.P.C, On distingue deux types : [9]

La chromatographie de partage de phase normal, Ou la phase stationnaire est polaire, et les phases mobiles sont peu polaires.

Ou, la chromatographie à polarité de phase inversée ou la phase stationnaire étant apolaire (plus souvent, les motifs greffés sont des chaînes carbonyles), la phase mobile est polaire.

3-2-2-c. La chromatographie par échange d'ions:

La phase stationnaire est formée de macromoléculaires (résines) portant des groupements fonctionnels acides ou basiques qui permettent l'échange de certains de leurs ions avec des ions de même signe du mélange à chromatographie. [8]

3-2-2-d. La chromatographie d'exclusion diffusion:

On désigne un processus au cours duquel, par passage des molécules à travers un gel de structure poreuse et en raison d'un effet de

tamis. Sous le terme de permutaton sur gel. [9]

3-2-3. Classification d'après le procédé utilisé :

On désigne ainsi :

3-2-3-a. La chromatographie sur surface :

-La Chromatographie sur papier (CP) : la phase stationnaire est un liquide maintenu sur un support de cellulose [16]

-La chromatographie sur couche mince (C.C.M) : La phase stationnaire dans ce cas est retenue sur une surface plane verre matiere plastique, ou feuille d'aluminium, qui est recouverte d'une couche mince (d'épaisseur :0.5 mm) de gel de silice, ou alumine. [8]

Elle est basée sur l'effet capillaire de la phase mobile à travers la phase stationnaire. [9]

3-2-2.b. La chromatographie sur colonne:

La phase stationnaire est une colonne cylindrique en verre ou en métal.

Selon les modalités de migration de la phase mobile on visage :[8]

-La chromatographie par développement ;

-La chromatographie par élution.

4- CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE C.L.H.P :

4-1. Introduction :

La lenteur des séparations de la chromatographie en phase liquide (sur colonne) était liée aux faibles vitesses d'élution nécessaire en raison de l'efficacité médiocre des colonnes utilisées (0.01 à 0.001cm.s^{-1}). [17]

Actuellement, on opère avec des vitesses linéaires de la phase mobile de l'ordre de 0.1 à 1cm.s^{-1} , vitesse comparable à celle de la chromatographie en phase gazeuse , dont elle est complémentaire[3]. On parle ici de la chromatographie liquide » à grande vitesse » ; « sous haute pression »; « de haute performance »; ou de performance »à haute résolution« . [17]

4-2. Principe de base:

On opère pratiquement exclusivement par élution, une faible quantité de l'échantillon à analyser est introduite au sommet de la colonne à l'aide d'injecteur , sous l'action de la phase mobile (éluant) qui est pressée par une pompe à haute performance (sous haute pression). On observe à la sortie du détecteur des pics symétriques, plus au moins séparées sur le chromatogramme .

4-3. L'appareillage d'un système de C.L.H.P. :

Un appareillage C.L.H.P. [3] comprend quatre parties principales :

- Une pompe ;
- Une colonne ;
- Un système d'injection ;
- Un détecteur ,avec un système d'analyse.

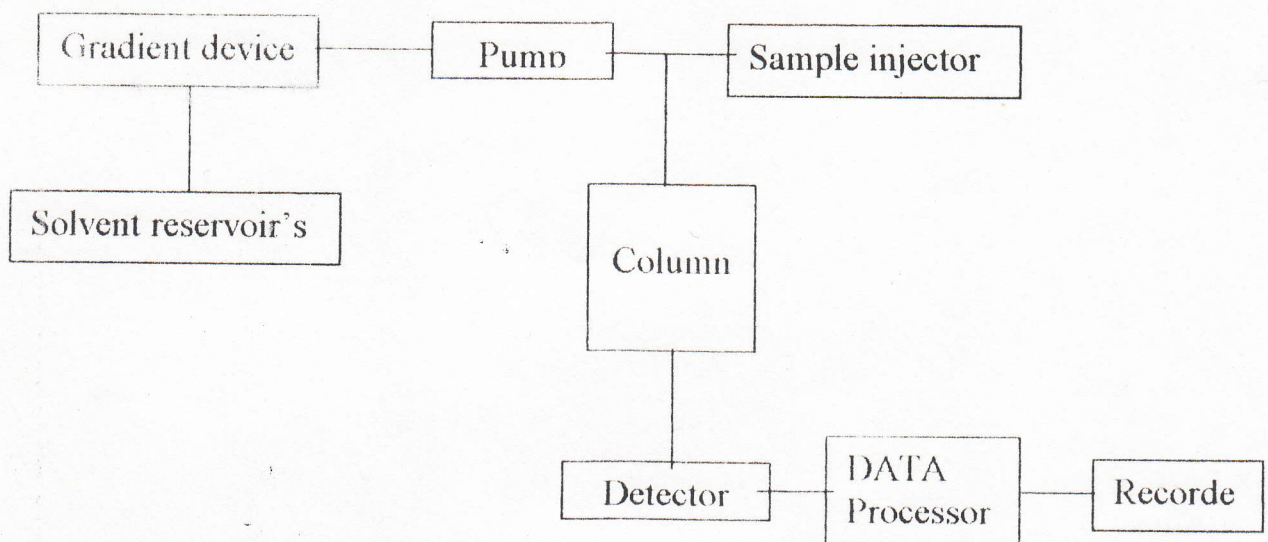


Fig. n°1 : Schéma d'appareillage de C.L.H.P

4-4. caractéristiques correspondants Les différents grandeurs :

4-4-1. Grandeurs de rétentions:

Temps de rétention t_R (min) : C'est le temps d'élution au maximum du pic mesuré à partir de l'injection. d'autre part, on peut définir le temps de rétention relatif t_R' , qui est la différence entre le temps de rétention t_R et t_{R0} . [8]

t_{R0} : est le temps qui mise la phase mobile pour parcourir la colonne.

$$t_R' = t_R - t_{R0}$$

• On utilise, pour caractériser la rétention d'un composé le facteur de capacité k' qui est défini par la relation : [8]

$$K' = C_s \cdot V_s / C_M \cdot V_M = K \cdot V_s / V_M$$

C_s : concentration de soluté à l'équilibre dans la phase mobile.

C_M : concentration de soluté à l'équilibre dans la phase stationnaire

$C_s/C_M = K$: coefficient de partage .

V_s : le volume de la phase stationnaire.

V_M : le volume de la phase éluente contenu dans la colonne.

K' peut être déterminer expérimentalement au moyen des relations suivantes: [17]

$$K' = (V_R - V_M) / V_M = (t_R - t_{R0}) / t_{R0}$$

Tab n°1: Les valeurs de K' indique que : [17]

K'	0	≤ 1	1	10
Composé	Non Retenu	Peu Retenu	Retenu	Trop retenu

4-4-2. Efficacité de la colonne :

Le nombre de plateaux théorique constitué une mesure de la capacité d'une colonne de séparation, On peut le calculé par les relations suivantes : [9]

$$N = 16(\text{tr} / w)^2 = 8 \cdot \text{Log } 2 \cdot (\text{tr} / \delta)^2$$

w : largeur de pic à la base

δ : largeur de pic à mi-hauteur

Pour pouvoir comparer entre deux colonnes de différentes longueurs, on définit la Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique (H.E.P.T. , ou H). [17]

$$H = L / N$$

4-4-3. La sélectivité:

Pour caractériser la distance séparant les sommets de deux pics consécutif 1 et 2, On utilise la sélectivité (ou rétention relative) définie par les relations: [17]

$$\alpha = (t_{R2} - t_{R1}) / (t_{R1} - t_{R0}) = K'_2 / K'_1$$

4-4-4. La résolution: La résolution R_S entre deux pics est définit par la relation: [17], [9]

$$R_S = 2(t_{R2} - t_{R1}) / (w_2 + w_1)$$

5- LA VALIDATION D'UNE METHODE D'ANALYSE :

5-1. Introduction:

La validation d'une méthode est une opération destinée à déterminer que toute procédure utilisée pour l'analyse d'un produit conduisant effectivement au bon résultat. [13]

En bioanalyse, la validation a pour objectif de démontrer et les performances de la procédure de dosage et de prouver que les résultats [5]obtenus sont dans les limites bien définies. [5]

Ces critères sont les suivants :[13]

-Critères fonctionnels :

- Sélectivité ;
- Spécificité ;
- Sensibilité.
- -Critères statistiques :
 - linéarité ;
 - Fidélité (répétabilité, reproductibilité).

Paramètres garantissent l'aptitude de la méthode à donner des résultats exacts et constants dans les conditions opératoires fixés par le laboratoire de mise au point : [1]

5-2. Définitions:

5-2-1.Spécificité :

Est une méthode d'analyse lorsqu'elle permet de vérifier le non-interférence le signal de la substance à analyser avec les constituants prévenus à la formation ou des produits de dégradation[5]

5-2-2. Sélectivité :

La sélectivité d'une procédure analytique est sa capacité à établir de manière univoque l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants potentiellement présents. [5]

5-2-3. Linéarité :

La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage, la relation existante entre la réponse (signal, exemple: Surface) et la concentration (quantité) en substance à examiner dans l'échantillon. [13]

5-2-4. Fidélité :

Est exprimée l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites la fidélité peut être évaluée à deux niveaux : [13]

-Répétabilité.

-Reproductibilité.

5-2-4-a. Répétabilité:

Est une expression quantitative de la précision, lorsque le même opérateur applique la même méthode sur le même échantillon, dans le même laboratoire, avec les mêmes appareils et les mêmes réactifs au cours de la même série d'analyse. [4]

5-2-4-b. Reproductibilité : Les variations typiques à étudier sont les effets jour, opérateurs, équipements,... etc.

L'utilisation ne doit pas être étudiée individuellement, l'utilisation d'un plan d'expériences est encouragée. [5]

5-2-5. Seuil de détection :

Le seuil de détection d'une procédure est la plus petite quantité à examiner dans un échantillon, pouvant être détectée mais non quantifiée comme une valeur exacte. [4]

5-2-6. Seuil de quantification :

Le seuil de quantification est définie comme la plus petite quantité de produit qu'il est possible de quantifier dans les conditions satisfaisantes de précision, c'est à dire avec une justesse et une fidélité acceptable. [1]

5-3. Critères statistiques pour évaluer une méthode:

Quand on répète n fois une mesure expérimentale sur un même échantillon (en sens chimique) pour estimer le bon résultat, la pratique consiste d'évaluer les critères suivants: [10]

1- La valeur centrale (valeur moyenne arithmétique des valeurs individuelles):

$$\bar{x} = (x_1 + x_2 + \dots + x_n) / n$$

2-. L'écart type d'un ensemble des résultats :

$$\delta = \sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2 / (n-1)}$$

3- Coefficient de variation(l'écart- type relatif) :

$$C_v = (\delta / \bar{x}) \cdot 100 \quad (\text{exprimé en \%})$$

CONTROLE DE QUALITE DE « Pseudoephedrine , HCl » :

Le dosage de principe actif est complémentaire à l'identification et à la vérification de sa pureté que reflète la différence entre la valeur théorique et la valeur expérimentale de l'ensemble des impuretés soit d'origine minérale ou organique.

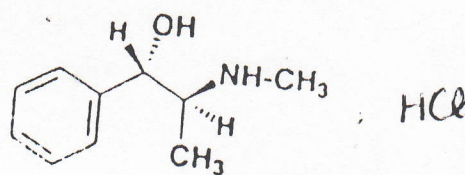
Les étapes suivies pour réaliser ce contrôle sont décrites dans la pharmacopée européenne.

Denomination commune internationale Chlorhydrate de Pseudoephedrine

Denomination chimique D-TRELO-METHYLAMINO-2-PHENYL-1-PROPANOL CHLORHYDRATE

Formule brute: $C_{10}H_{15}NO \cdot HCl$

Structure chimique :



Poids moléculaire: 210.70 g/mol

Les essais des résultats représentées dans le tableau :

Partie

Pratique

Tab n°2: résultats des essais de contrôle de qualité du pseudoephedrine , HCl :

Paramètres testés	Normes	Résultats
Aspects	Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche	Conforme
Solubilité: Eau (H ₂ O) Alcool (EthOH, 96%) Acétonitrile (CH ₃ CN) Chloroforme (CHCl ₃)	Très soluble Très soluble Très soluble Peu soluble	Conforme
Point de fusion	/	/
Spectrophotométrie IR	Spectre échantillon identique au spectre de référence	Conforme
Spectrophotométrie UV-visible	Présente trois maximum à : 251.4 nm 0.696 Ab 257.1 nm 0.876 Ab 262.8 nm 0.708 Ab	Conforme
Réaction chimique	/	/
Perte de dessiccation(%)	/	/
Cendres sulfuriques	/	/

D'après les résultats obtenus, « le Pseudoephedrine, HCl » est conforme aux spécification de la (BP.1993, USP.1995, Clark's)..

II- MISE AU POINT D'UNE METHODE DE DOSAGE PSEUDUEPHEDRINE, HCl PAR C.L.H.P:

1-Méthode et matériels:

1-1-.Matériels et réactifs:

*Réactifs :

- « Pseudoephedrine ,HCl » (Etalon)
- Eau ultra pure (pour H.P.L.C.)
- Acétonitrile MERC pour H.P.L.C..
- Tampon acétate d'ammonium pour H.P.L.C.
- Tampon dihydrogéné phosphate de potassium FLUKA (T=90%)
- Méthanol CHROMANORM pour H.P.L.C. (T=99.9%)

*Appareillages:

- Etuve MEMERT.
- Balance analytique de précision SARTORIUS
- Millépore pour filtration HV- 0.45 μ m
- Ultra-son ANNE MASSE S.A.
- Chromatographie liquide de type SCHIMADZU:
 - Une pompe L.C.-10 AD SCHIMADZU
 - - Un détecteur SPD – M10 AV.DAD(Diode .Array .Détecter.)
 - [SIL – 10 AD] Auto injecteur.
 - Colonne de type : Symmétry Shield. RP C-₁₈, 5 μ m, 3.9 x 150 mm (WATERS); Pré colonne C-₁₈.

1-2. Méthodes:

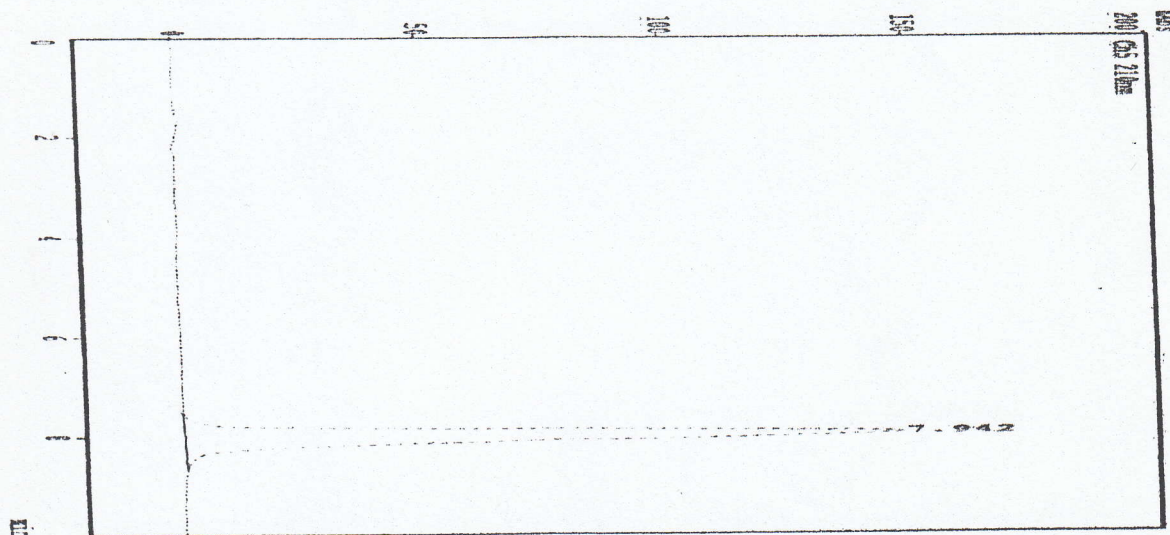
1-2-1. Optimisation des conditions opératoires:

La recherche des conditions optimales de « Pseudoephedrine ,HCl » dans un milieu biologique est réalisée en mesurant les paramètres classiques de rétention pour augmenter la sensibilité et la spécificité de la méthode chromatographique.

1-2-1-1. Choix de la phase stationnaire :

Nos travaux ont été effectués sur un seul type de colonne C-18 sous les mêmes conditions de phase mobile, de longueur d'onde (voir fig. n°3).

Fig. n°3: Choix de la phase stationnaire



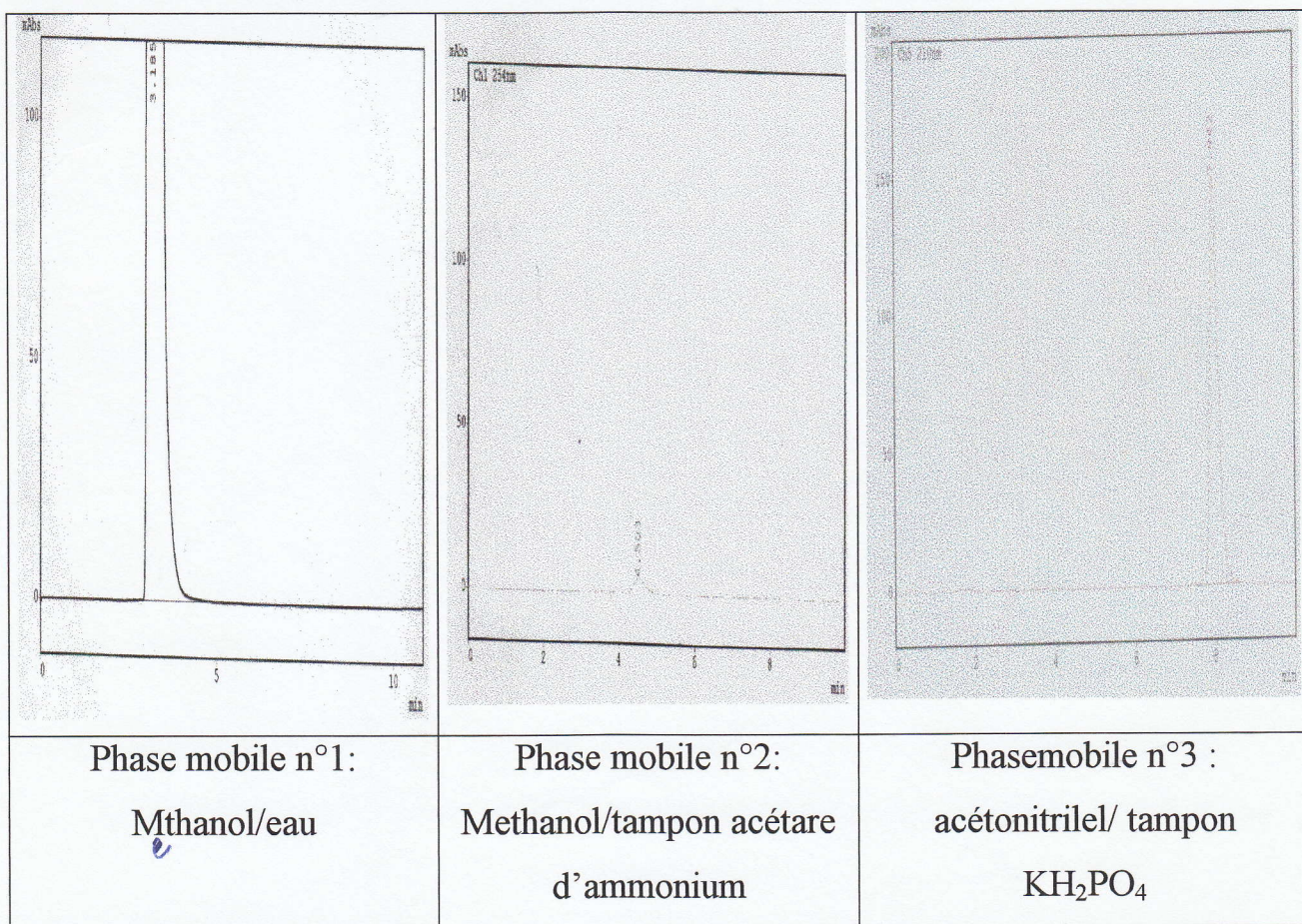
1-2-1-2. Choix de la phase mobile :

Nous avons procédé aux choix de la phase mobile, trois systèmes proposés par la bibliographie. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau n°3, vu les résultats obtenus, nous avons opté pour le système n°3 soit Acétonitrile / tampon KH_2PO_4

Tab n°3 : choix de la phase mobile

Phase mobile	proportion	t _R de pseudoephedrine, HCl	Remarque
Methanol /Tampon KH ₂ PO ₄	70-30	3.185	t _R court. Pic large avec un traîner
Methanol/Tampon CH ₃ COONH ₄	89-11	4.503	Pic faible avec un t _R court La phase mobile
Acetonitrile/tampon KH ₂ PO ₄	92-8	8.192	Un pics symétrie Avec un t _R suffisant.

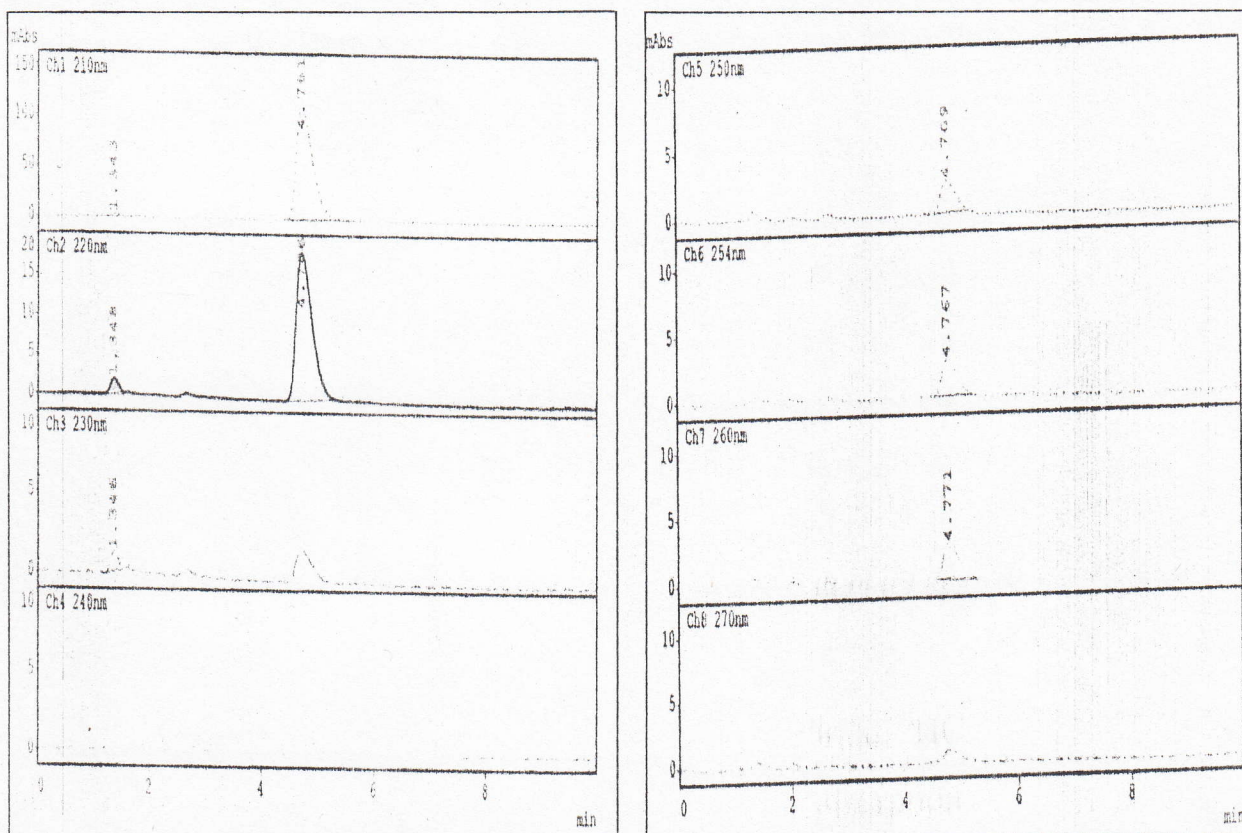
Fig. n°4 :Choix de la phase mobile



1-2-1-3. Choix de la longueur d'onde :

Le balayage d'une solution de « pseudoephedrine, HCl » dans la phase mobile entre 210-270 nm, présente un maximum d'adsorption à 210 nm. (voir Fig n° 5)

Fig. n 5: Choix de la longueur d'onde



1-2-1-4. Influence de la polarité de la phase mobile :

A fin d'améliorer la résolution du « Pseudoephedrine, HCl », Nous avons fait varier la proportion du tampon KH_2O_4 80% - 96% .Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau n°4:

Tab n°4 : influences de la polarité de la phase mobile.

% Tampon KH_2PO_4	% Acetonitrile	t_R d'étalon (min)
80	20	4.050
85	15	4.655
90	10	5.817
92	08	8.195
94	06	9.565
96	04	12.700

t_R est en relation avec la polarité de la phase mobile. Nous avons remarqué, d'après la courbe de la fig. n 8 que le temps de rétention augmente avec la polarité croissante de la phase mobile donc avec un pourcentage du tampon de KH_2PO_4 .

Pour une polarité de 92% on obtient un temps de rétention optimale qui permet:

- Une analyse spécifique pour le « pseudoephedrine, HCl » que celles de composés d'urine.
- Une analyse courte et suffisante pour le dosage de « Pseudoephedrine HCl ».

1-2-1-5. Influence du pH de la phase mobile:

Nous préparons six solutions contenant 60 $\mu\text{g/ml}$ de « Pseudoephedrine, HCl », le pH de ces solutions varie entre 3 et 8.

Tab n°5: Influence de pH de la phase mobile sur t_R

PH	3	3.5	4	5	6	8
t_R (min)	7.282	7.389	7.526	8.197	8.236	11.435

On observe que le t_R augmente quand on augmente le pH, pH = 5 c'est le plus adéquat pour donner un t_R suffisant pour notre analyse.

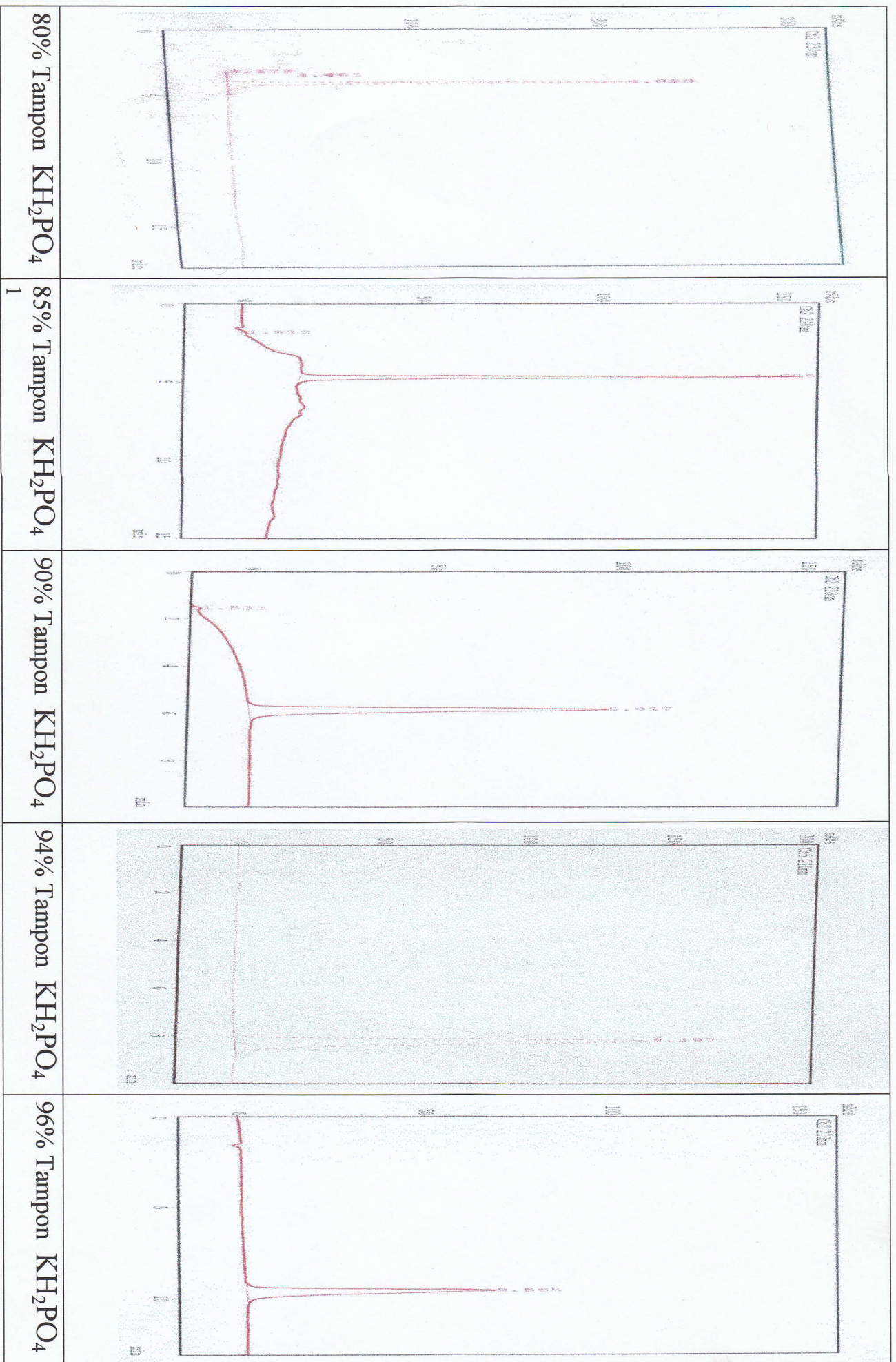


Fig n° 6: L'influence de polarité de la phase mobile.

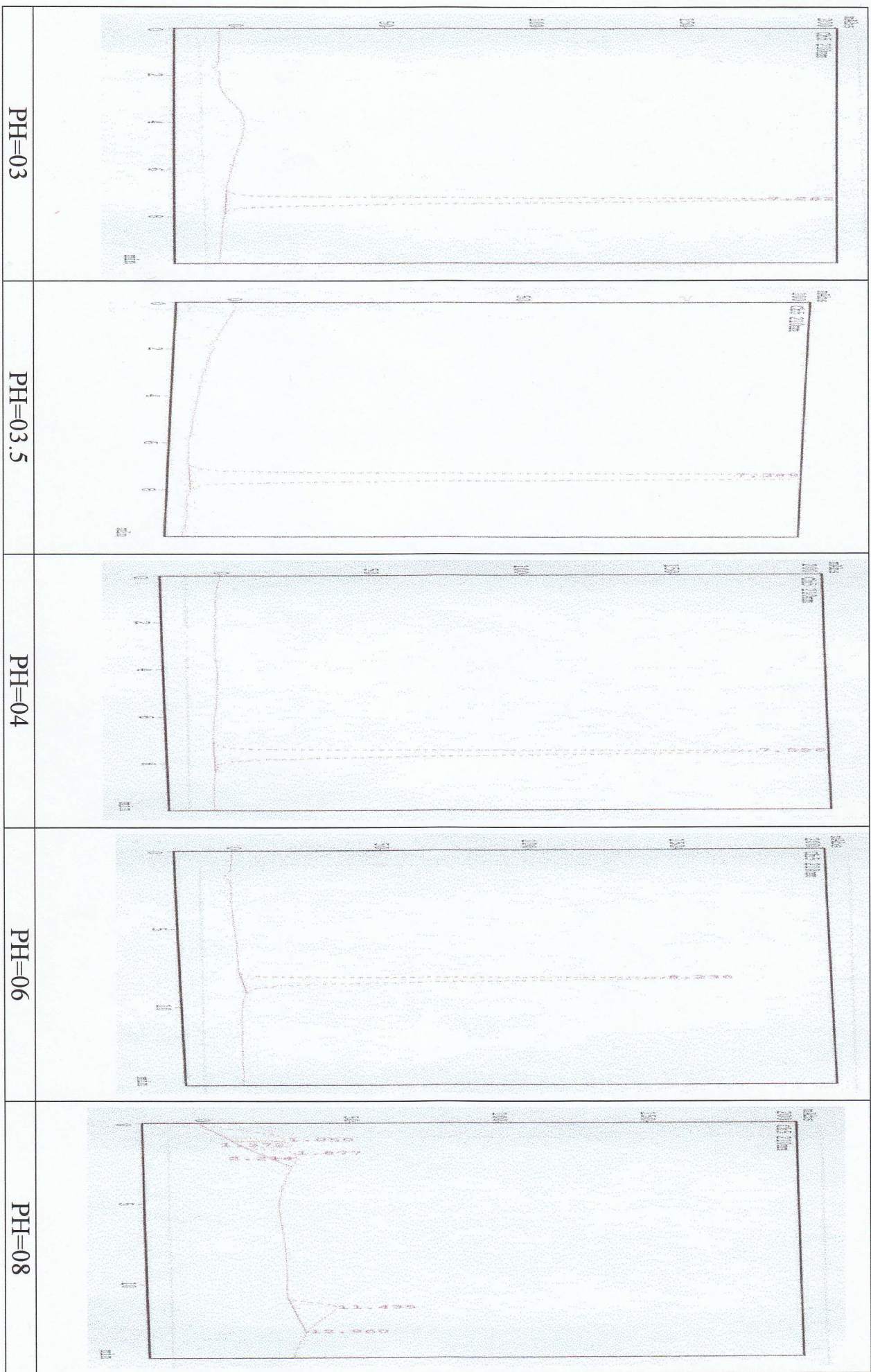


Fig n°7 : Influence de pH de la phase mobile sur tr

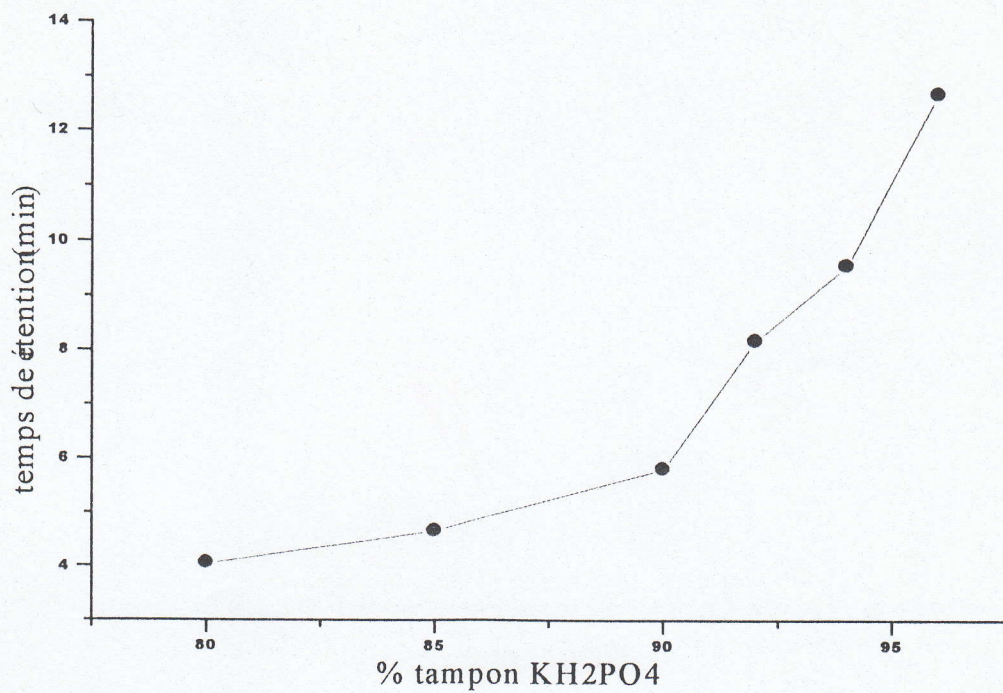


Fig n°8: Variation de tR en fonction de polarité de la phase mobile

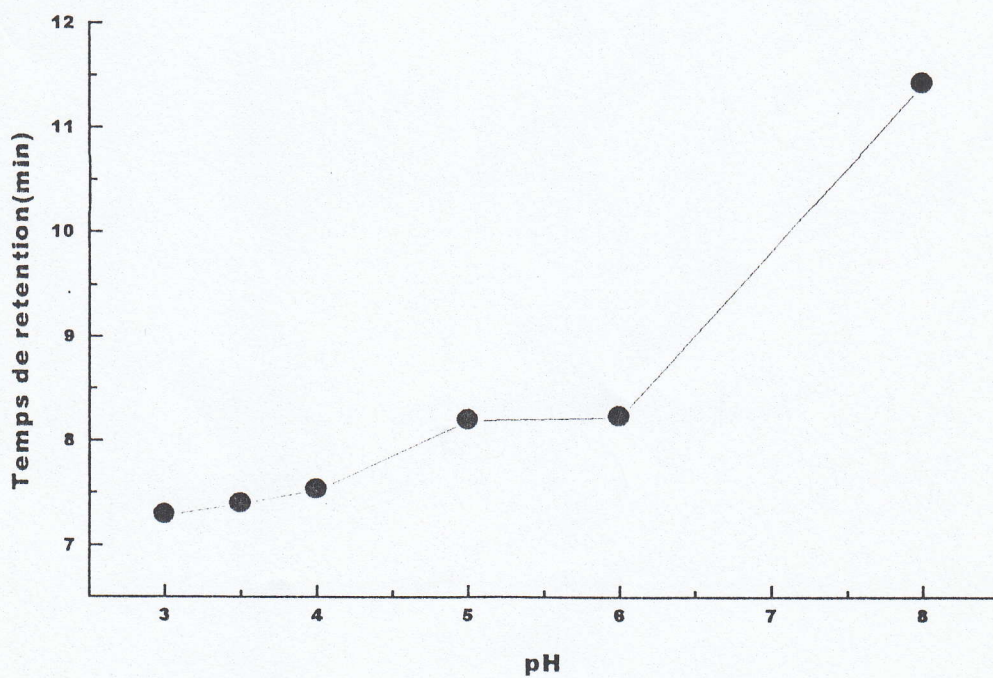


Fig n°9: Variation de tR en fonction de pH de la phase mobile

Les résultats retenus les conditions chromatographies optimales suivantes :

CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES

COLONNE :	SYMETRY SHILD RP-18 DI 15 μ m, 3.9x150mm
PHASE MOBILE :	1-TAMPON KH ₂ PO ₄ 92%
	2-ACETONITRILE 8%
2- LONGUEUR D'ONDE	210nm
DEBIT	1ml/min
SOLUTION INJECTEE	L'ETALON INTERNE
	DANS LA PHASE MOBILE
VOLUME INJECTE	20 μ l
pH AJUSTE	4.9

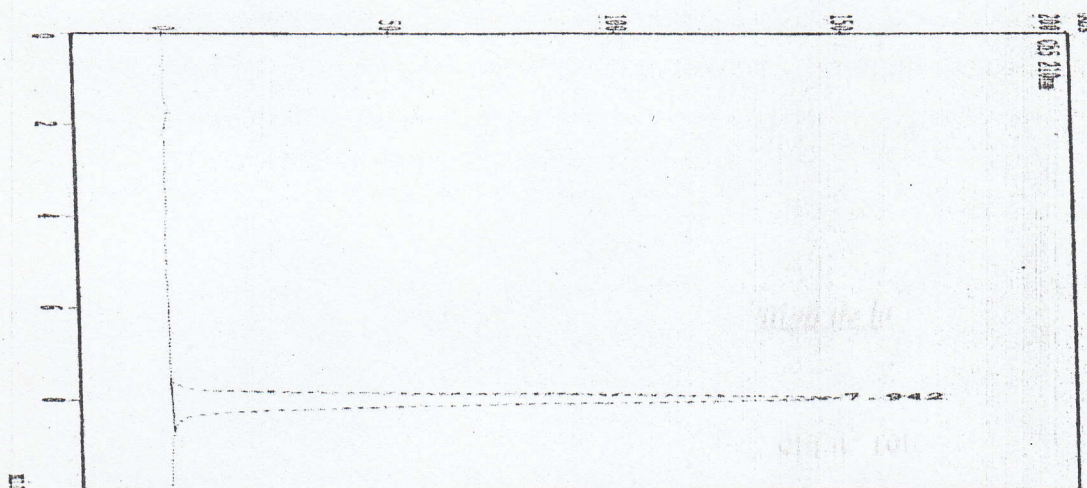
2. VALIDATION DE LA METHODE :

Les conditions chromatographiques optimales étant retenues, nous nous sommes attelés à étudier les critères de fiabilité de la méthode.

2-1. Spécificité :

Nous avons procédé à l'injection d'une solution contenant les urines sans « Pseudoephedrine ,HCl ». La **fig n°10** montre l'absence de tout pic au temps de rétention correspond au « Pseudoephedrine, HCl ».

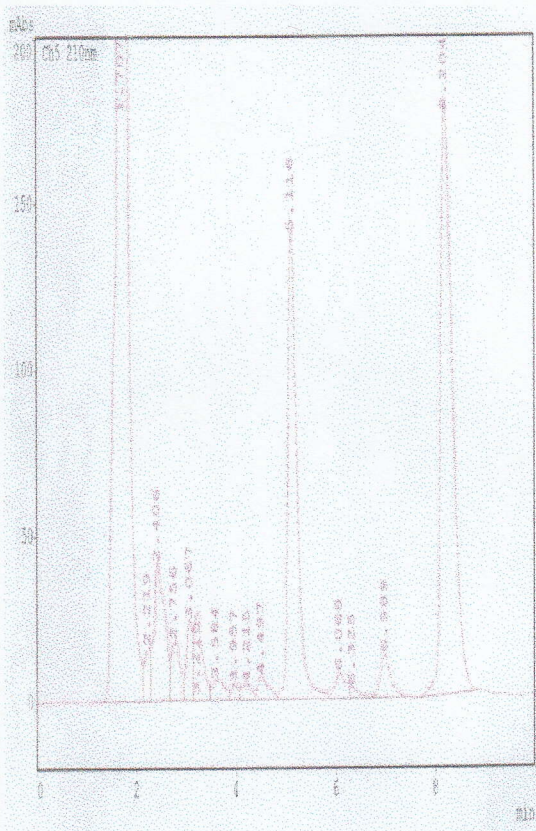
Fig n° 10: Etude de la spécificité.



2-2.Sélectivité :

Nous avons procédé à l'injection d'une solution contenant les urines et le « Pseudoephedrine ,HCl », la fig n°11 montre la sélectivité de pic de « Pseudoephedrine ,HCl » que celle des composés de l'urine.

fig. n° 11: Etude de la sélectivité



L'équation de la droite de la forme $y = Ax + B$ est calculée à partir des valeurs du tableau n°6.

Tab n°6 : Etude de linéarité de l'étalon :

Concentration de « Pseudoephedrine, HCl »(µg/ml)	20	40	60	80	100
Surfaces des pics de l'étalon	753988	1529333	2308293	3179245	3915346

Les valeurs expérimentales portant en abscisse les concentrations du « Pseudoephedrine,HCl » et en ordonnée les surfaces sont portées sur la **fig n°12**. L'équation de la droite de régression est $Y = 39803.14 \cdot X - 54547.4$. et le coefficient de corrélation de 0.99974 montre la très bonne linéarité de la méthode.

2-3-2. Linéarité de l'échantillon :

Cinq solutions d'échantillon de « Pseudoephedrine,HCl » de concentrations varient de 20 à 100 µg/ml (dans l'urine). ont été préparées suivant le schéma décrit par la **fig n°23**.

Les résultats obtenus à partir des chromatogrammes présentés dans la **fig n°13**, sont apportés dans le tableau n°7, et à partir desquels on a pu calculer l'équation de la droite.

Tab n°7: Etude de L'échantillon:

Concentration de pseudoephedrine(µg/ml)	20	40	60	80	100
Surface de pic de l'étalon	698487	1567859	2345327	3113408	3853453

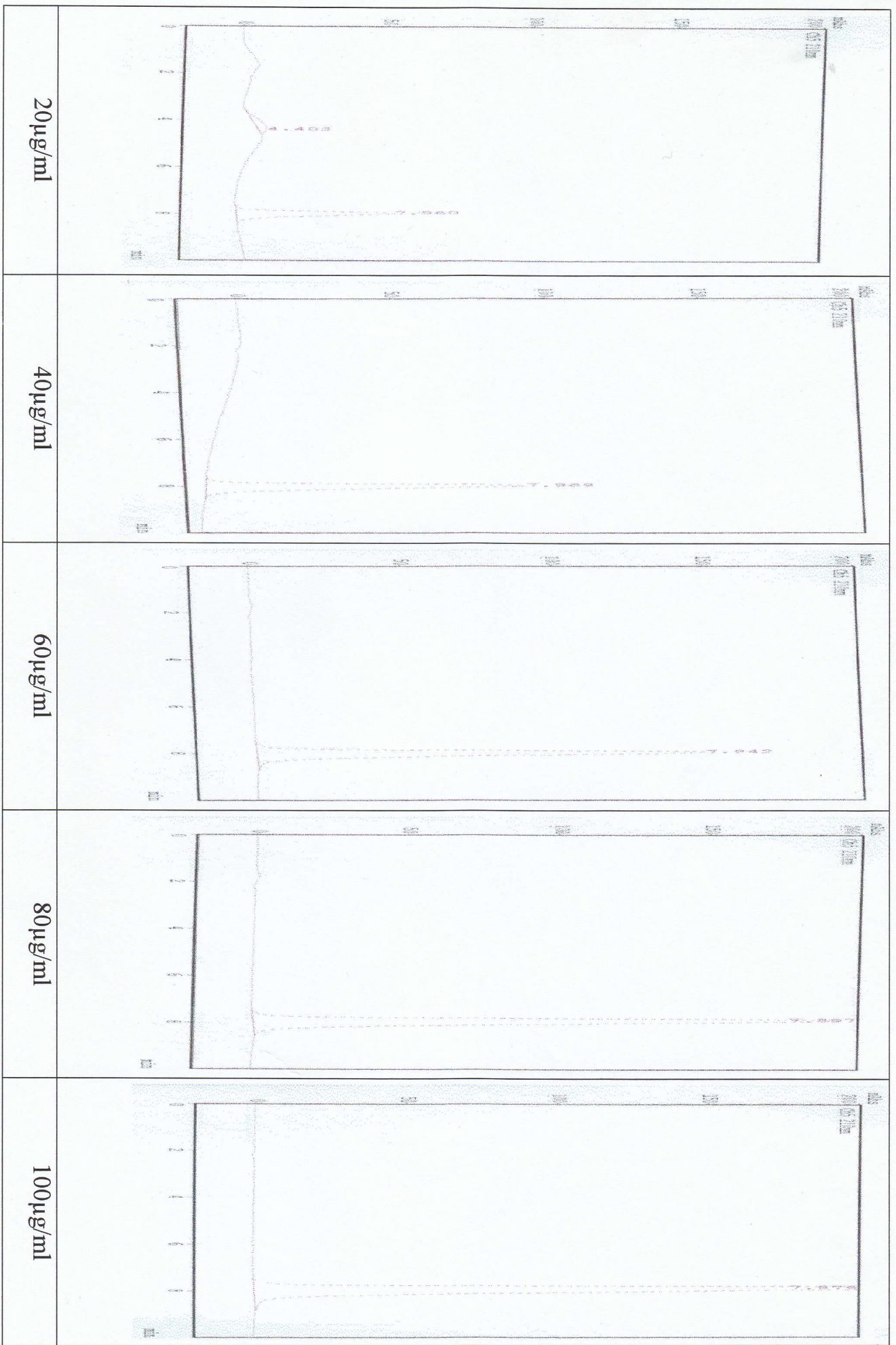


Fig n°12 : Etude de la linearité de l' étalon

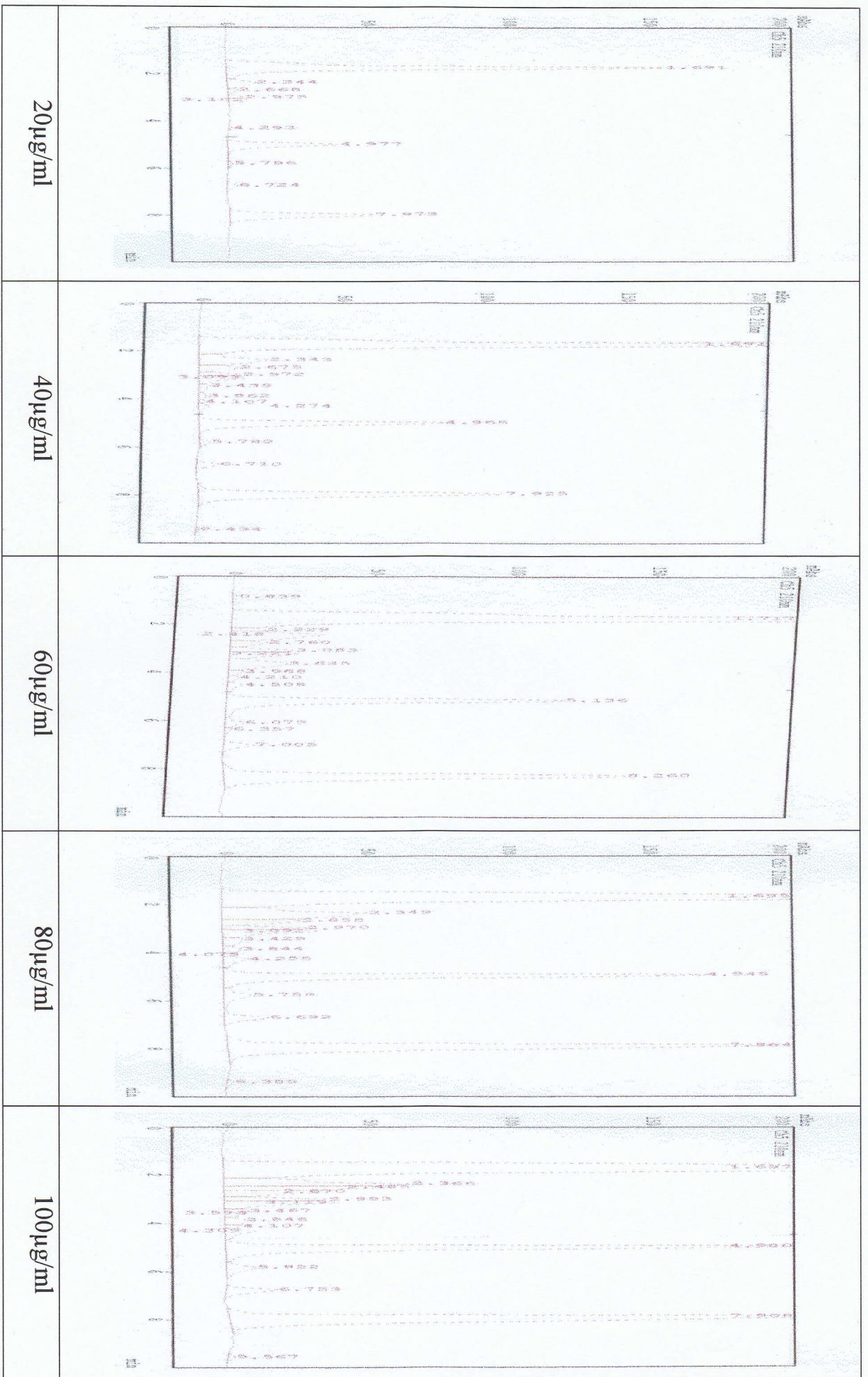


Fig n°13 : Etude de la linearité de l' échantillon

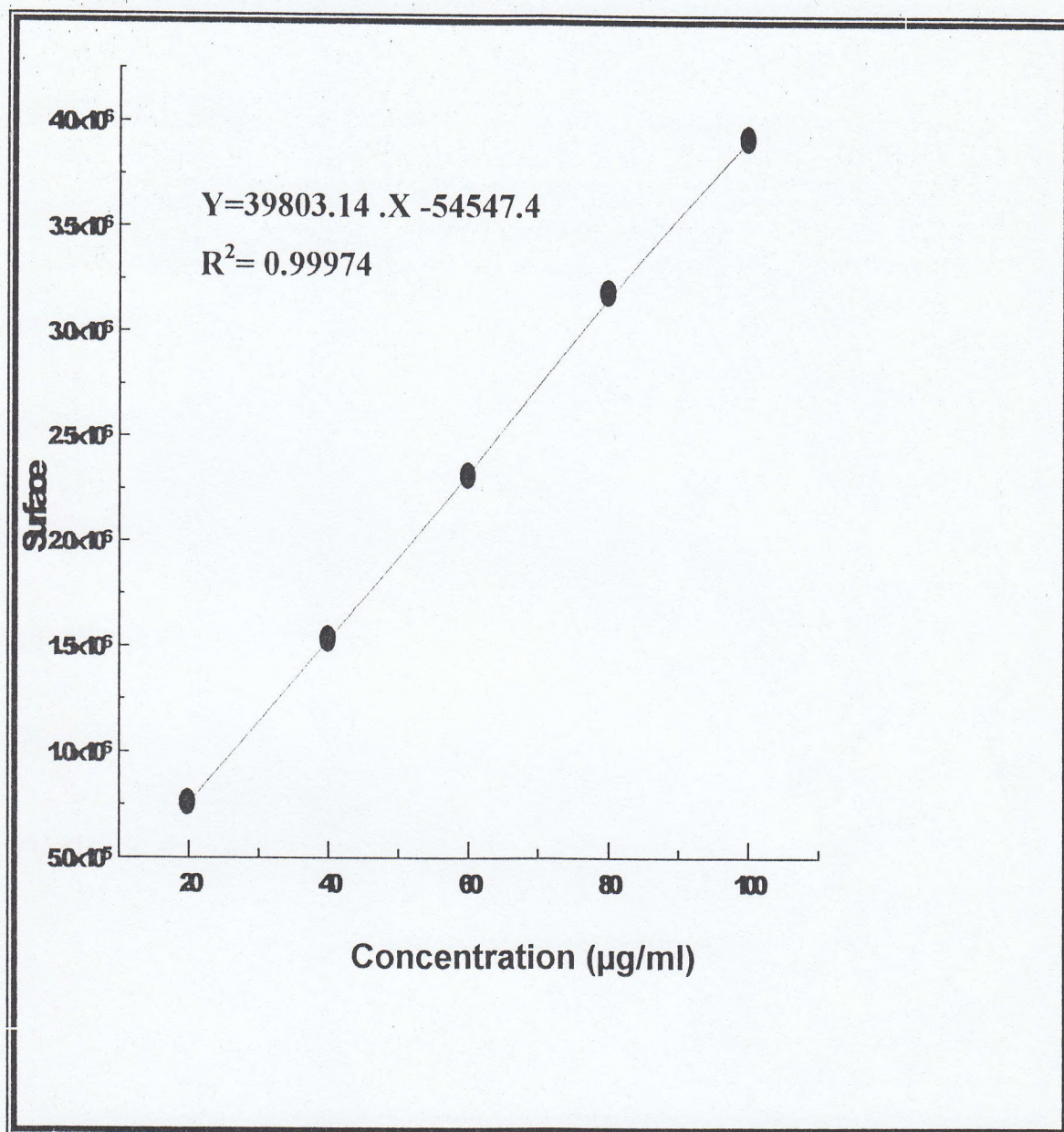


Fig n°14: courbe d'étalonnage de la linéarité de l'étalon.

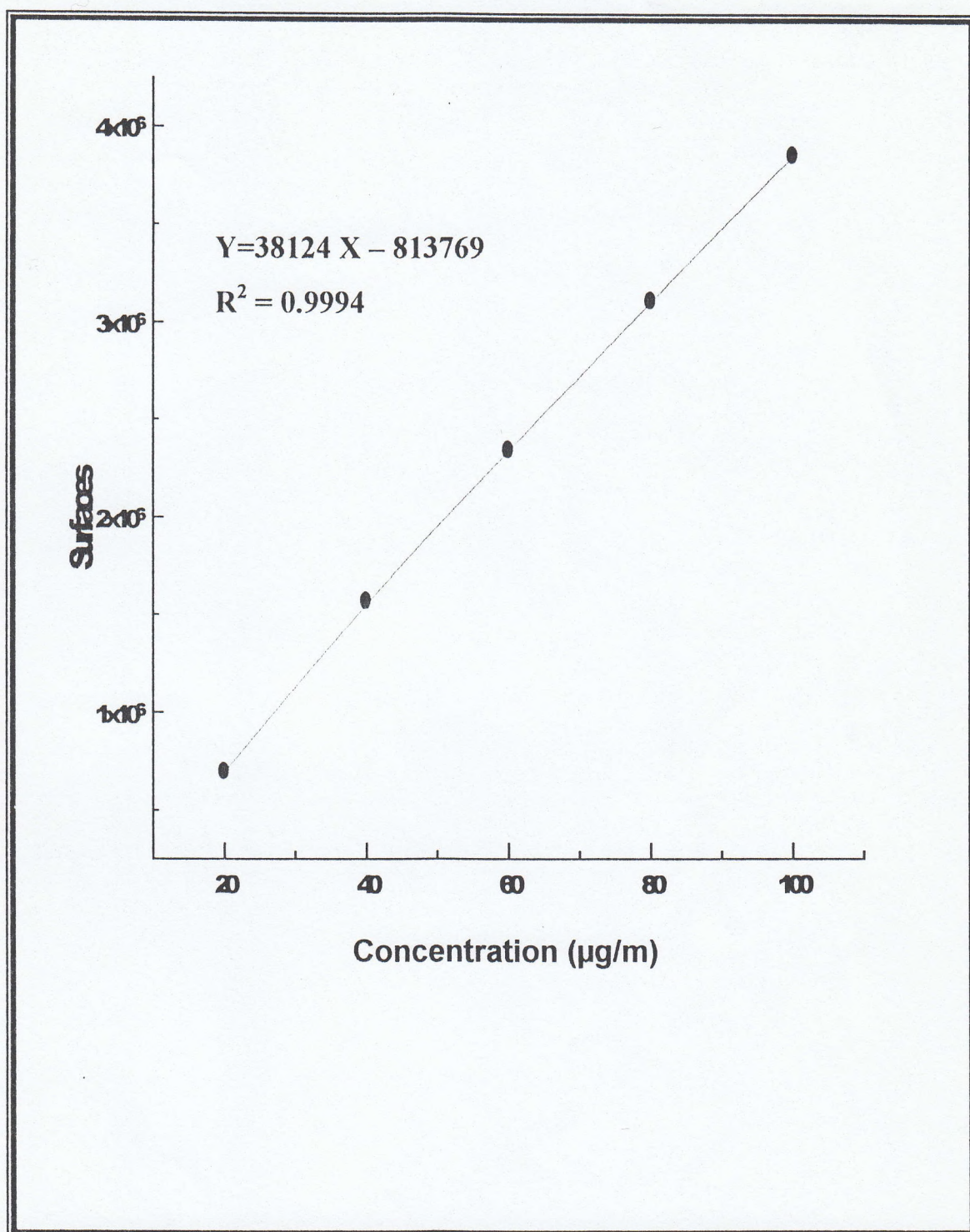


Fig. n°15 : courbe d'étalonnage du échantillon

Les valeurs expérimentales portées sur la **fig n° 13** nous en permis de tracer la droite de régression de la forme $Y = -38124 X - 813769$ et coefficient de corrélation 0.9994.

2-4. Fidélité : Ce paramètre comprend la répétabilité et la reproductibilité de la méthode.

2-4-1- Répétabilité : une solution contenant l'étalon 60 μ g de « Pseudoephedrine,-HCl » a été injectée dix fois dans le chromatographe, les chromatogrammes obtenus sont rapportées sur la **fig n°16**.

Les surfaces des pics sont résumées dans le tableau n°8, Nous avons calculé à partir de ces valeurs la moyenne, l'écart type et le coefficient de variation.

Tab n°8: Etude de la répétabilité du « Pseudoephedrine,HCl »

N x (i)	Surface de pic de l'étalon
1	2345679
2	2336748
3	2349159
4	2337383
5	2346211
6	2329907
7	2343753
8	2336672
9	2336483
10	2340685

$$\bar{X} = 2337028.8.$$

$$\delta = 15683.873$$

$$C_V = 0.49 \%$$

2-4-2.Reproductibilité:

Pour évaluer la reproductibilité nous préparons pendant cinq jours une solution contenant 60 µg de « Pseudoephedrine, HCl » .

Les résultats obtenus à partir des chromatogrammes reportés sur la fig n°:17 Sont présentés dans le tableau n°9.

Tableau n°9: Etude de la reproductibilité du « Pseudoephedrine, HCl » .

Jours	1	2	3	4	5
Surfaces du pics	2314561	2326463	2362508	2378029	2308293

$$X = 2337970.8$$

$$\delta = 30691.8$$

$$C_v = 1.31\%$$

Les coefficients de variation qui restent très faibles aussi bien dans l'étude de la répétabilité que dans celle de la reproductibilité montrent une excellente précision de notre méthode.

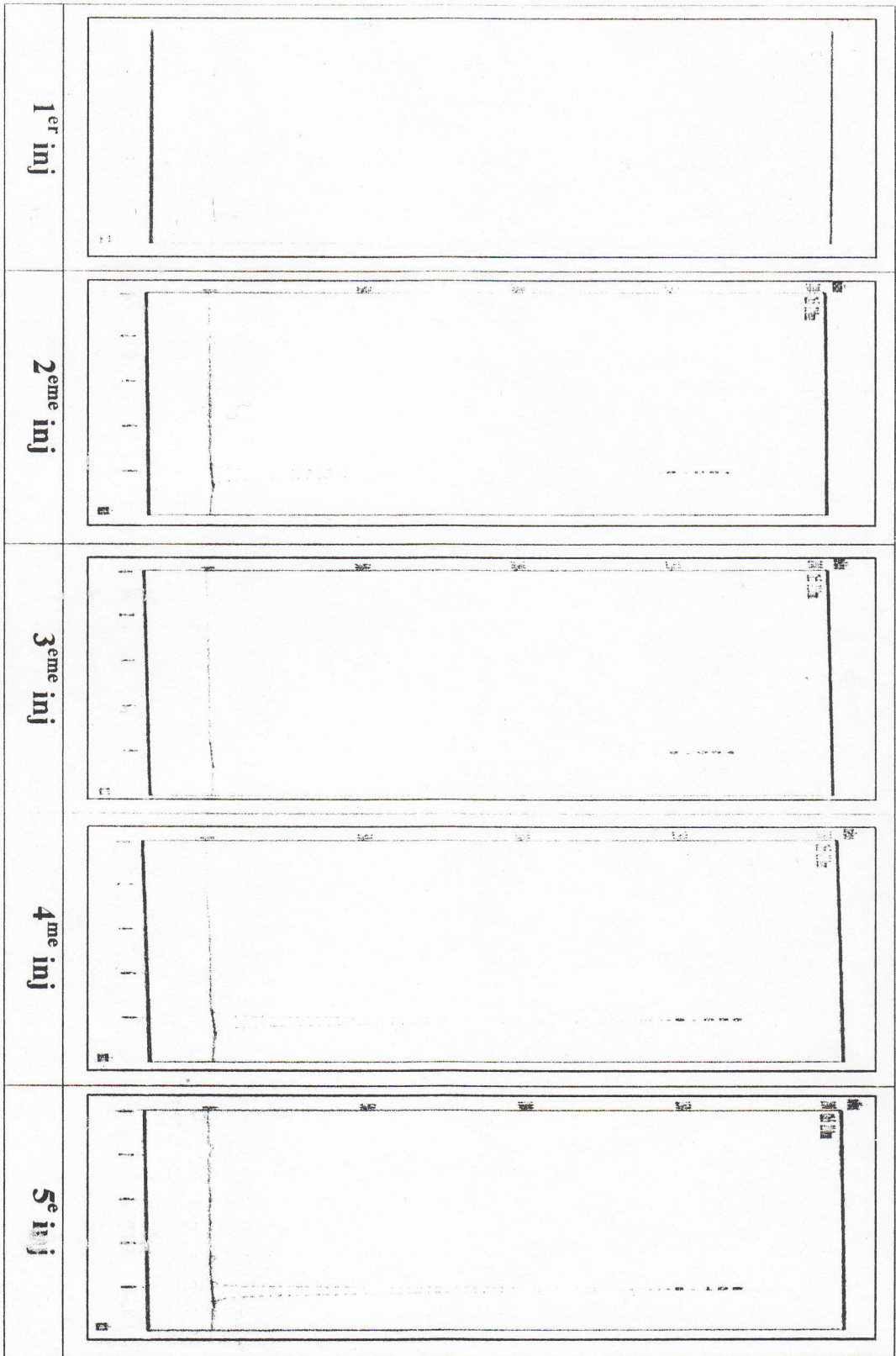


Fig. N°16: Etude de la repetabilité

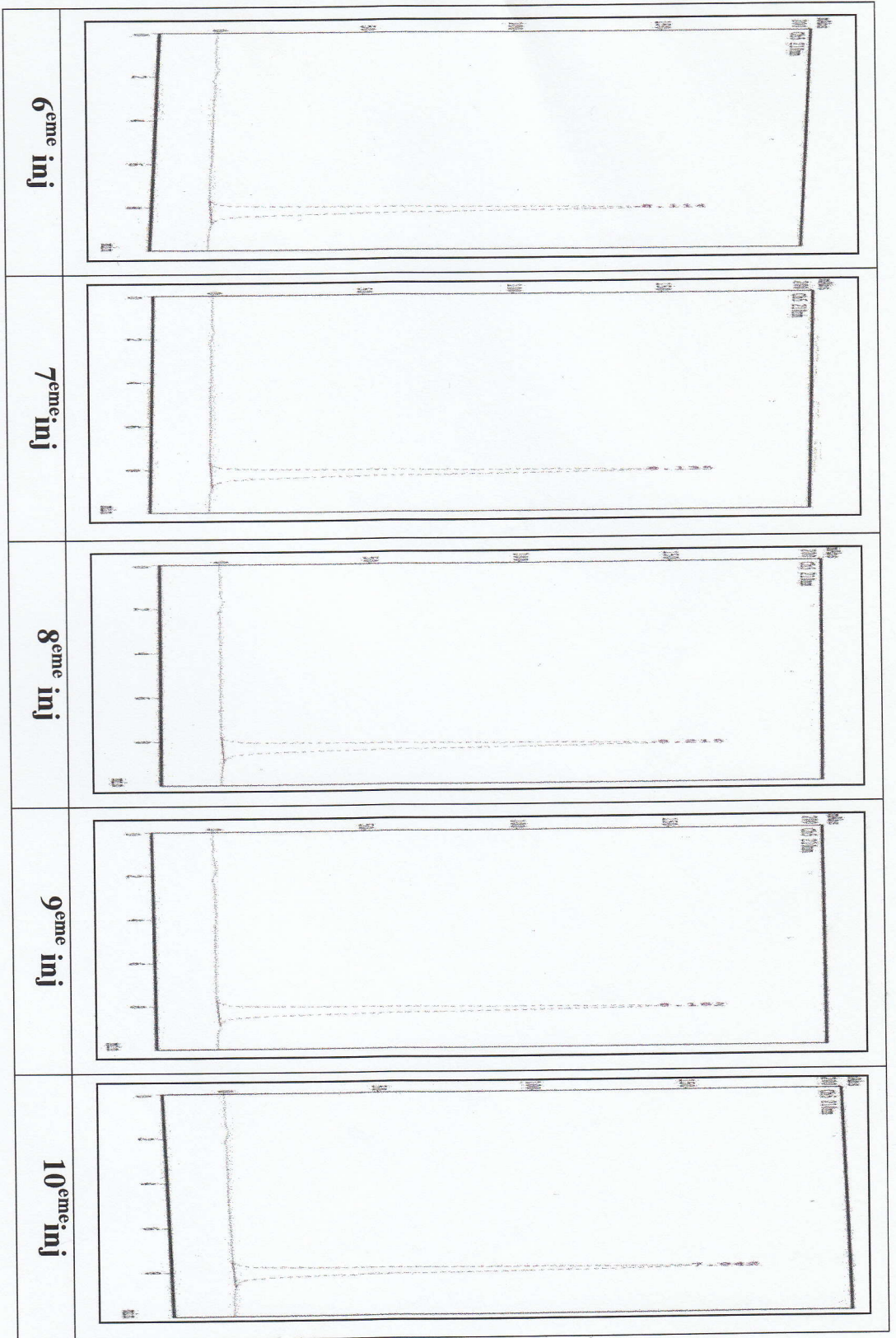


Fig. N°16: Etude de la repetabilité

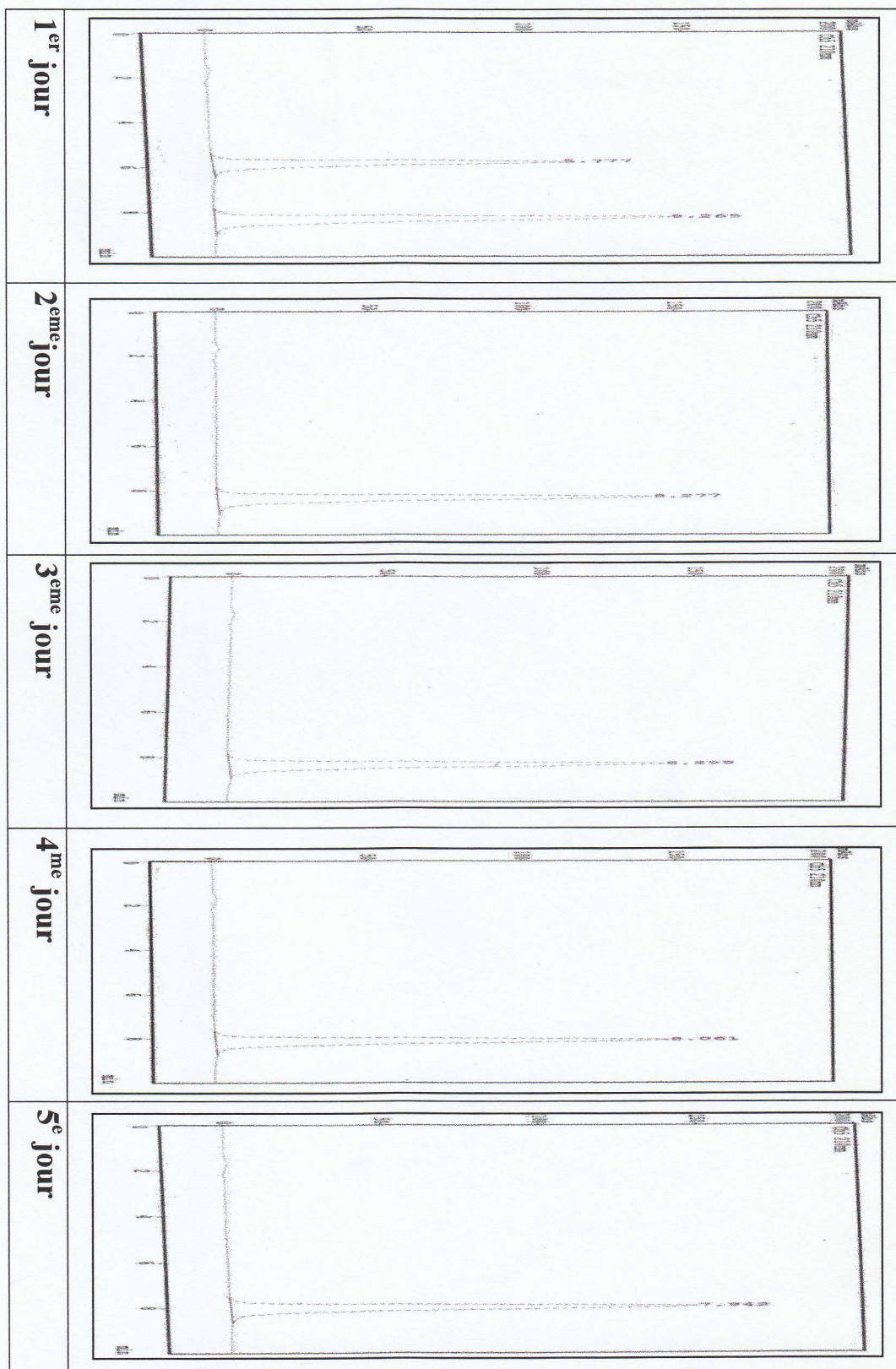


Fig. N°17: Etude de la reproductibilité

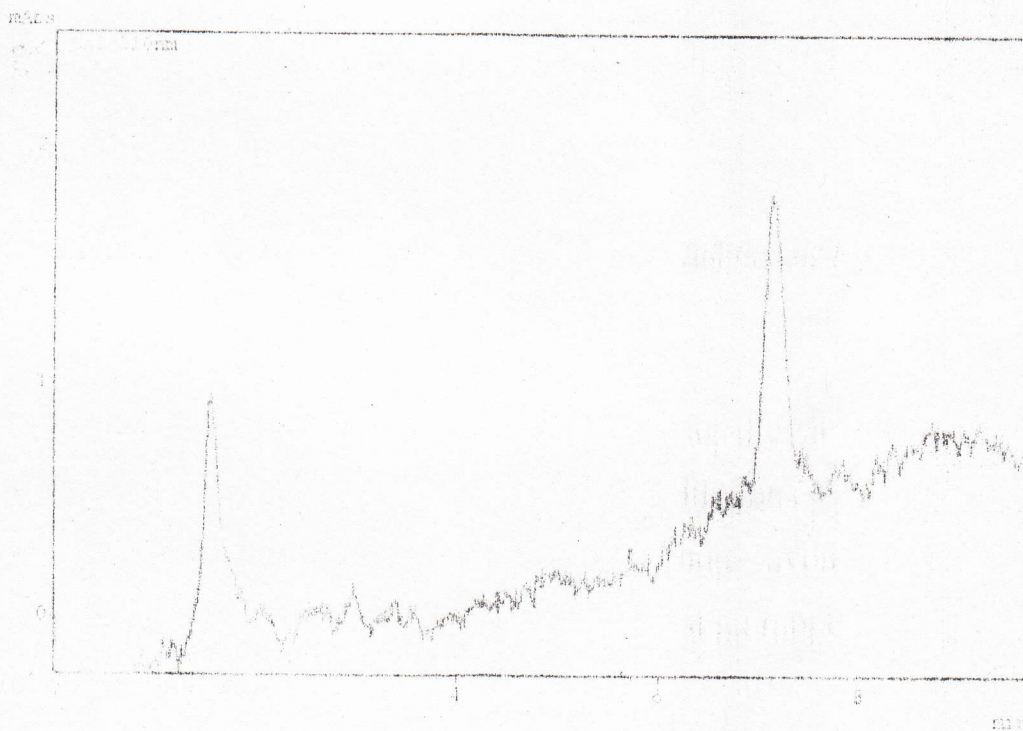
2-5.Limite de détection :

La détermination de la limite de détection permet d'évaluer la sensibilité de la méthode, nous l'avons estimé en effectuant des dilutions successives d'une solution de 10^{-3} mg de « Pseudoephedrine, HCl », nous avons déterminés la concentration de plus petite pic détectable correspondant au rapport de surface (bruit de fond supérieur ou égale à deux).

(voir chromatogramme fig. n°18).

La plus petite concentration est égale à: $0.01 \mu\text{g} / \text{ml}$.

fig. n° 18 : Etude de la limite de détection.



2-6.La limite de quantification :

De même manière, nous l'avons estimé, en effectuant, aussi, des dilutions successives d'une solution de concentration 10^{-2} mg /ml de « Pseudoephedrine, HCl ».

Nous avons déterminé la concentration minimale ou la méthode est non linéaire (est égale à $8 \mu\text{g}/\text{ml}$).

III.L'application de la méthode de dosage «Pseudoephedrine, HCl» dans l'Urine :

1.Administration :

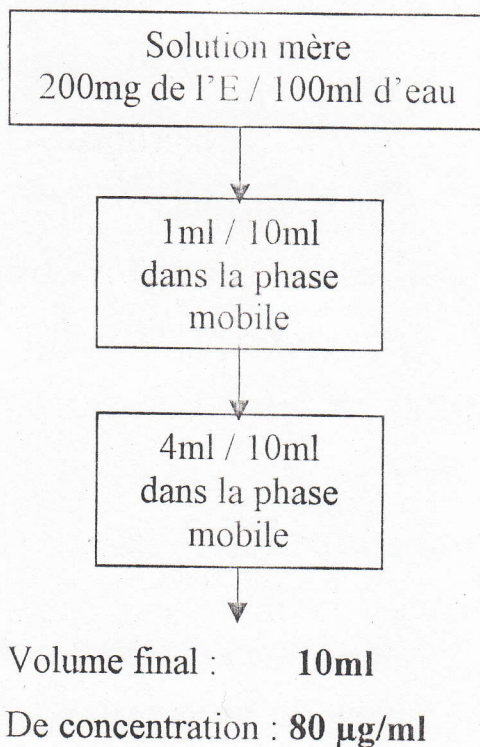
Nous avons étudiée la molécule de « Pseudoephedrine, HCl », après 24 heures de son administration chez un sujet (humain).

Tab n°10: mode d'administration.

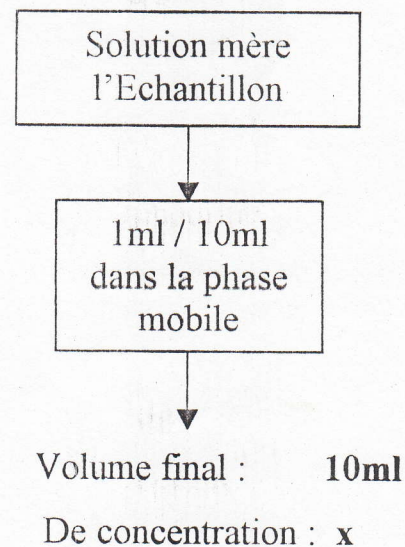
Sujet	Sexe	âge	Heure d'administration	Heure de récupération	Volume éliminé après 24 heure
1	féminin	23 ans	0.00 heure	24 heure	1025 ml

2.Préparations des solutions à injecter dans la C.L.H.P :

Etalon :



Echantillon :



Tab n°11: Les résultats obtenus après l'application de la méthode du dosage « pseudoéphédrine , HCl » dans les urines.

	Concentration	Surface	Quantité absorbée de la pseudoephedrine, HCl après une comprimé de 180 mg
Etalon	$200/100 \cdot 4/10 \cdot 1/10 = 80\mu\text{g/ml}$	3294227	180mg (100%)
Echantillon	$X=2993565/3294227x$ $200/100 \times 1/10 \times 4/10 \times 10 \times 100$	2993565	/

Calcul :

$$X = 2993565/3294227 \times 200/100 \times 1/10 \times 4/10 \times 10 \times 100$$

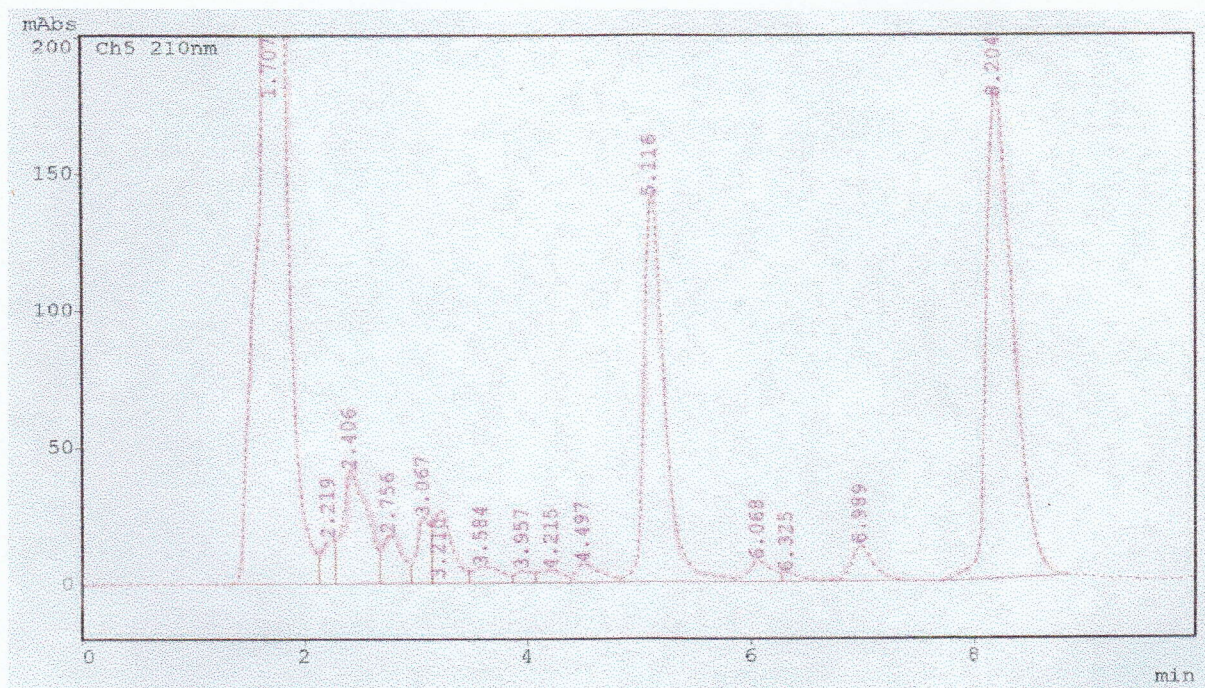
$$X = 72.69\%$$

3. Interprétation & Conclusion :

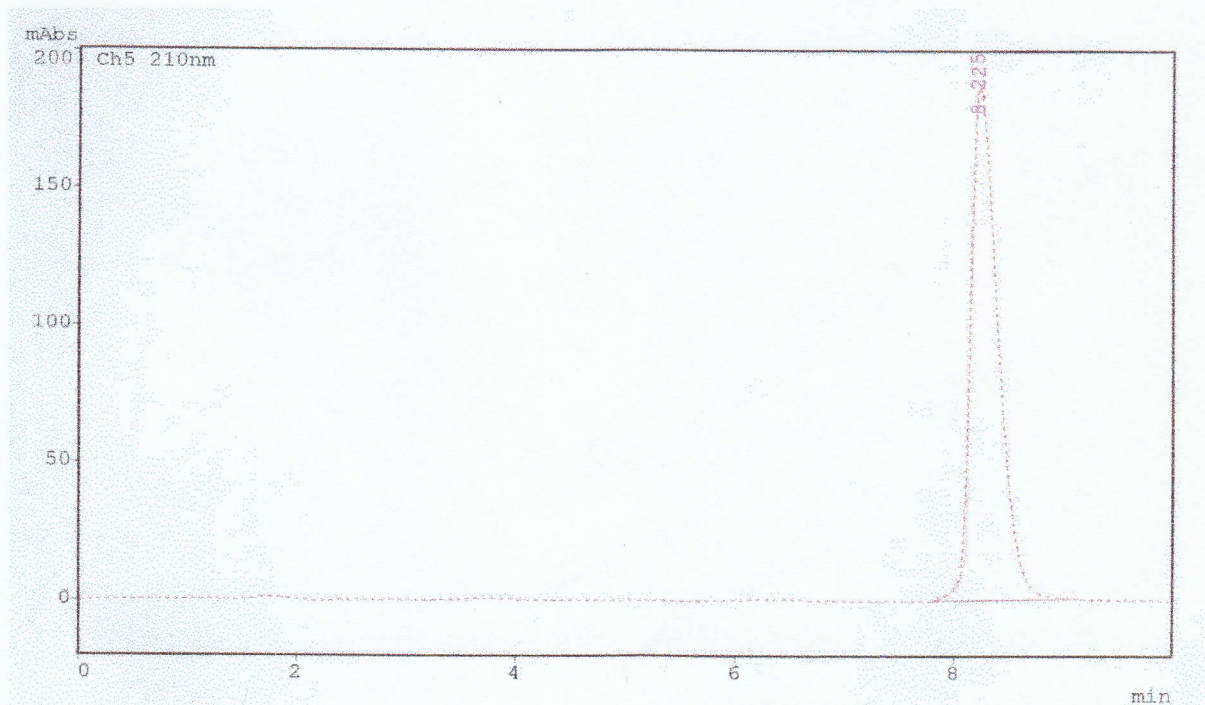
D'après la pharmacologie clinique, les normes de la quantité éliminée de « Pseudoephedrine, HCl » inchangée dans les urines varie de 70% à 90% par rapport à la quantité absorbée.

Les résultats obtenus permettent (Fig n°19) de constater chez les sujet que la quantité éliminée du médicament dans les urines après 24h d'administration est dans la norme .

Par conséquent notre méthode est validée, car elle répond à tous les critères de validation.



échantillon



Étalons

Fig.n°19 application de dosage du « Pseudoephine, HCl » dans les urines .

CONCLUSION GENERALE

La chromatographie apporte une contribution particulièrement importante Pour répondre aux problèmes d'identifications et de dosages dans le cadre de l'étude de la bioéquivalence de notre substance, la « Pseudoephedrine, HCl ».

On a procédé à une recherche analytique très poussée afin de mettre au point une méthode de dosage de « Pseudoephedrine, HCl » par CLHP.

La validation de cette méthode obtenue après exploitation statistique des résultats démontre sa fiabilité.

Elle donne de bons résultats du fait qu'elle présente une limite de détection assez basse (10 ng/ml) et confirmée par la très bonne linéarité avec un coefficient de corrélation de 0.99974 et des coefficients de variations faibles (0.49% pour la répétabilité, et 1.31% pour la reproductibilité).

Ainsi la très linéarité de la méthode sur l'échantillon, ou le coefficient de corrélation est perfectionné (coefficient de corrélation est égale à 0.9994).

Elle permet d'appliquer cette méthode pour doser, et identifier la « Pseudoephedrine, HCl » dans le milieu biologique « urine ».

BIBLIOGRAPHIE

- 1- ALBERT LESPAGNOL : CHIMIE DES MEDICAMENTS
Tome I, 1978, France
- 2- ANONYME : the United States Pharmacopoeia USP, the notion formuly
- 3- Blaque- Belair : Dictionnaire Medical Pharmacologique et Thérapeutique
3^{ème} édition, 3^{ème} tirage, 1985, France
- 4- C.H.JEFFERY, J. BASSE , J.MENDHAM , R.C.DENNEY :
VOLGEL'S Quantitative Chimecal Analysis
5^{ème} édition, 1994, Canada
- 5-E.CHAPUZET ,N.MERCIER : Methodes chromatographiques de dosage dans
les milieux biologiques
Stratégie de validation
Rapport de commission SESTP (3),1997
P :169-194,france
- 6-Georges PAUL : MEDIANA EURESCO
Analyse sequencielle du médicament
1974, France.
- 7-G CHARLOT
Chimie Analytique Générale
Tome : II , 1989, France.

8-G MAHZIER ; M HAMOUN

Abrégé de Chimie Analytique

II-méthode de séparation

2^{ème} édition : MASSON, 1986, France.

9-Georg Schewedt : Méthode d'Analyse

ATLAS DE POCHE

Edition : CAMOUN, 1994, France.

10- HERVER MORIN Théorie de l'échantillonnage

1993, Canada

11-Jean BRUETON Pharmacognosie Phytochimie

PLANTES MEDICINALE

3^{ème} édition, 1999, France

12- J.P.GIROUD, G.MATHE , G.MEYNIEL

Pharmacologie clinique

base de la thérapeutique.II

1978 France.

13- L.A.Q.T

leguide d'Assurance de qualité et de traçabilité

1^{ère} édition-1996, France

14- Morter Matria, Clark's-Isolation and Identification of the Drugs-

Vol: 2, 2^{ème} édition, pp:944-945, 1986, Grant Britten .

15-VIDAL 75^{ème} édition , 1999, France.

16-Journal of pharmacologie etbiomedical Analyse, volume,12,N°12

pp 1601-1606 :1994- Grant Britten .

Bibliographie

17- Manuel pratique des méthodes d'analyses-CPL-

18- Symmetry shield TM Applications –Note Book-WATERS –1998-USA

Annexe

22

Fig. n° 21 : Spectrophotometrie d'absorption dans l'IR

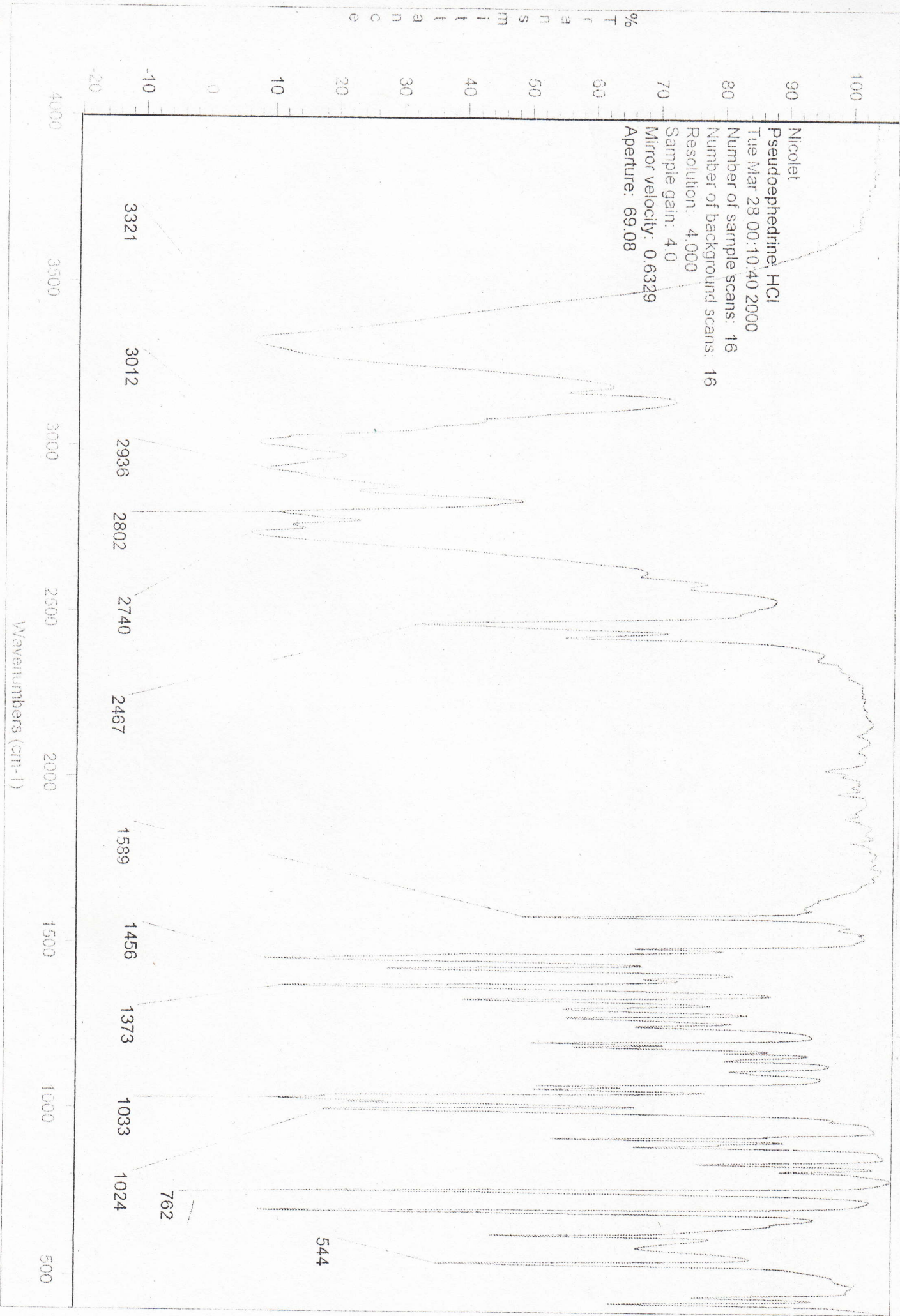


Fig.N°20 : spectre d'identification par spectrophotométrie d'absorption dans l'U.V-visible

CECIL DE 9050

Serial No: 109107

Time: 164:162

Speed: 600 nm/min

Average: 1.0 nm

Bandwidth: 2.0 nm

Plate 1a

Operator:

Reference:

Sample:

Wavelength (nm)	Absorbance
257.4	0.876
251.4	0.656
262.8	0.700
278.1	0.027
291.6	0.019
304.5	0.019
318.0	0.019
331.9	0.018
345.3	0.019

Wavelength (nm)	Absorbance
358.7	0.018
372.2	0.018
385.7	0.018
399.2	0.018
412.7	0.018
426.2	0.018
439.7	0.018
453.2	0.018
466.7	0.018
480.2	0.018
493.7	0.018
507.2	0.018
520.7	0.018
534.2	0.018
547.7	0.018
561.2	0.018
574.7	0.018
588.2	0.018
601.7	0.018
615.2	0.018
628.7	0.018
642.2	0.018
655.7	0.018
669.2	0.018
682.7	0.018
696.2	0.018
709.7	0.018
723.2	0.018
736.7	0.018
750.2	0.018
763.7	0.018
777.2	0.018
790.7	0.018
804.2	0.018
817.7	0.018
831.2	0.018
844.7	0.018
858.2	0.018
871.7	0.018
885.2	0.018
898.7	0.018
912.2	0.018
925.7	0.018
939.2	0.018
952.7	0.018
966.2	0.018
979.7	0.018
993.2	0.018
1006.7	0.018
1020.2	0.018
1033.7	0.018
1047.2	0.018
1060.7	0.018
1074.2	0.018
1087.7	0.018
1101.2	0.018
1114.7	0.018
1128.2	0.018
1141.7	0.018
1155.2	0.018
1168.7	0.018
1182.2	0.018
1195.7	0.018
1209.2	0.018
1222.7	0.018
1236.2	0.018
1249.7	0.018
1263.2	0.018
1276.7	0.018
1290.2	0.018
1303.7	0.018
1317.2	0.018
1330.7	0.018
1344.2	0.018
1357.7	0.018
1371.2	0.018
1384.7	0.018
1398.2	0.018
1411.7	0.018
1425.2	0.018
1438.7	0.018
1452.2	0.018
1465.7	0.018
1479.2	0.018
1492.7	0.018
1506.2	0.018
1519.7	0.018
1533.2	0.018
1546.7	0.018
1560.2	0.018
1573.7	0.018
1587.2	0.018
1600.7	0.018
1614.2	0.018
1627.7	0.018
1641.2	0.018
1654.7	0.018
1668.2	0.018
1681.7	0.018
1695.2	0.018
1708.7	0.018
1722.2	0.018
1735.7	0.018
1749.2	0.018
1762.7	0.018
1776.2	0.018
1789.7	0.018
1803.2	0.018
1816.7	0.018
1830.2	0.018
1843.7	0.018
1857.2	0.018
1870.7	0.018
1884.2	0.018
1897.7	0.018
1911.2	0.018
1924.7	0.018
1938.2	0.018
1951.7	0.018
1965.2	0.018
1978.7	0.018
1992.2	0.018
2005.7	0.018
2019.2	0.018
2032.7	0.018
2046.2	0.018
2059.7	0.018
2073.2	0.018
2086.7	0.018
2100.2	0.018
2113.7	0.018
2127.2	0.018
2140.7	0.018
2154.2	0.018
2167.7	0.018
2181.2	0.018
2194.7	0.018
2208.2	0.018
2221.7	0.018
2235.2	0.018
2248.7	0.018
2262.2	0.018
2275.7	0.018
2289.2	0.018
2302.7	0.018
2316.2	0.018
2329.7	0.018
2343.2	0.018
2356.7	0.018
2370.2	0.018
2383.7	0.018
2397.2	0.018
2410.7	0.018
2424.2	0.018
2437.7	0.018
2451.2	0.018
2464.7	0.018
2478.2	0.018
2491.7	0.018
2505.2	0.018
2518.7	0.018
2532.2	0.018
2545.7	0.018
2559.2	0.018
2572.7	0.018
2586.2	0.018
2599.7	0.018
2613.2	0.018
2626.7	0.018
2640.2	0.018
2653.7	0.018
2667.2	0.018
2680.7	0.018
2694.2	0.018
2707.7	0.018
2721.2	0.018
2734.7	0.018
2748.2	0.018
2761.7	0.018
2775.2	0.018
2788.7	0.018
2802.2	0.018
2815.7	0.018
2829.2	0.018
2842.7	0.018
2856.2	0.018
2869.7	0.018
2883.2	0.018
2896.7	0.018
2910.2	0.018
2923.7	0.018
2937.2	0.018
2950.7	0.018
2964.2	0.018
2977.7	0.018
2991.2	0.018
3004.7	0.018
3018.2	0.018
3031.7	0.018
3045.2	0.018
3058.7	0.018
3072.2	0.018
3085.7	0.018
3099.2	0.018
3112.7	0.018
3126.2	0.018
3139.7	0.018
3153.2	0.018
3166.7	0.018
3180.2	0.018
3193.7	0.018
3207.2	0.018
3220.7	0.018
3234.2	0.018
3247.7	0.018
3261.2	0.018
3274.7	0.018
3288.2	0.018
3301.7	0.018
3315.2	0.018
3328.7	0.018
3342.2	0.018
3355.7	0.018
3369.2	0.018
3382.7	0.018
3396.2	0.018
3409.7	0.018
3423.2	0.018
3436.7	0.018
3450.2	0.018
3463.7	0.018
3477.2	0.018
3490.7	0.018
3504.2	0.018
3517.7	0.018
3531.2	0.018
3544.7	0.018
3558.2	0.018
3571.7	0.018
3585.2	0.018
3598.7	0.018
3612.2	0.018
3625.7	0.018
3639.2	0.018
3652.7	0.018
3666.2	0.018
3679.7	0.018
3693.2	0.018
3706.7	0.018
3720.2	0.018
3733.7	0.018
3747.2	0.018
3760.7	0.018
3774.2	0.018
3787.7	0.018
3801.2	0.018
3814.7	0.018
3828.2	0.018
3841.7	0.018
3855.2	0.018
3868.7	0.018
3882.2	0.018
3895.7	0.018
3909.2	0.018
3922.7	0.018
3936.2	0.018
3949.7	0.018
3963.2	0.018
3976.7	0.018
3990.2	0.018
4003.7	0.018
4017.2	0.018
4030.7	0.018
4044.2	0.018
4057.7	0.018
4071.2	0.018
4084.7	0.018
4098.2	0.018
4111.7	0.018
4125.2	0.018
4138.7	0.018
4152.2	0.018
4165.7	0.018
4179.2	0.018
4192.7	0.018
4206.2	0.018
4219.7	0.018
4233.2	0.018
4246.7	0.018
4260.2	0.018
4273.7	0.018
4287.2	0.018
4300.7	0.018
4314.2	0.018
4327.7	0.018
4341.2	0.018
4354.7	0.018
4368.2	0.018
4381.7	0.018
4395.2	0.018
4408.7	0.018
4422.2	0.018
4435.7	0.018
4449.2	0.018
4462.7	0.018
4476.2	0.018
4489.7	0.018
4503.2	0.018
4516.7	0.018
4530.2	0.018
4543.7	0.018
4557.2	0.018
4570.7	0.018
4584.2	0.018
4597.7	0.018
4611.2	0.018
4624.7	0.018
4638.2	0.018
4651.7	0.018
4665.2	0.018
4678.7	0.018
4692.2	0.018
4705.7	0.018
4719.2	0.018
4732.7	0.018
4746.2	0.018
4759.7	0.018
4773.2	0.018
4786.7	0.018
4800.2	0.018
4813.7	0.018
4827.2	0.018
4840.7	0.018
4854.2	0.018
4867.7	0.018
4881.2	0.018
4894.7	0.018
4908.2	0.018
4921.7	0.018
4935.2	0.018
4948.7	0.018
4962.2	0.018
4975.7	0.018
4989.2	0.018
5002.7	0.018
5016.2	0.018
5029.7	0.018
5043.2	0.018
5056.7	0.018
5070.2	0.018
5083.7	0.018
5097.2	0.018
5110.7	0.018
5124.2	0.018
5137.7	0.018
5151.2	0.018
5164.7	0.018
5178.2	0.018
5191.7	0.018
5205.2	0.018
5218.7	0.018
5232.2	0.018
5245.7	0.018
5259.2	0.018
5272.7	0.018
5286.2	0.018
5299.7	0.018
5313.2	0.018
5326.7	0.018
5340.2	0.018
5353.7	0.018
5367.2	0.018
5380.7	0.018
5394.2	0.018
5407.7	0.018
5421.2	0.018
5434.7	0.018
5448.2	0.018
5461.7	0.018
5475.2	0.018
5488.7	0.018
5502.2	0.018
5515.7	0.018
5529.2	0.018
5542.7	0.018
5556.2	0.018
5569.7	0.018
5583.2	0.018
5596.7	0.018
5610.2	0.018
5623.7	0.018
5637.2	0.018
5650.7	0.018
5664.2	0.018
5677.7	0.018
5691.2	0.018
5704.7	0.018
5718.2	0.018
5731.7	0.018
5745.2	0.018
5758.7	0.018
5772.2	0.018
5785.7	0.018
5799.2	0.018
5812.7	0.018
5826.2	0.018
5839.7	0.018
5853.2	0.018
5866.7	0.018
5880.2	0.018
5893.7	0.018
5907.2	0.018
5920.7	0.018
5934.2	0.018
5947.7	0.018
5961.2	0.018
5974.7	0.018
5988.2	0.018
6001.7	0.018
6015.2	0.018
6028.7	0.018
6042.2	0.018
6055.7	0.018
6069.2	0.018
6082.7	0.018
6096.2	0.018
6109.7	0.018
6123.2	0.018
6136.7	0.018
6150.2	0.018
6163.7	0.018
6177.2	0.018
6190.7	0.018
6204.2	0.018
6217.7	0.018
6231.2	0.018
6244.7	0.018
6258.2	0.018
6271.7	0.018
6285.2	0.018
6298.7	0.018
6312.2	0.018
6325.7	0.018
6339.2	0.018
6352.7	0.018

Fig n°22: Présentation de la gamme d'étalonnage de l'étalon :

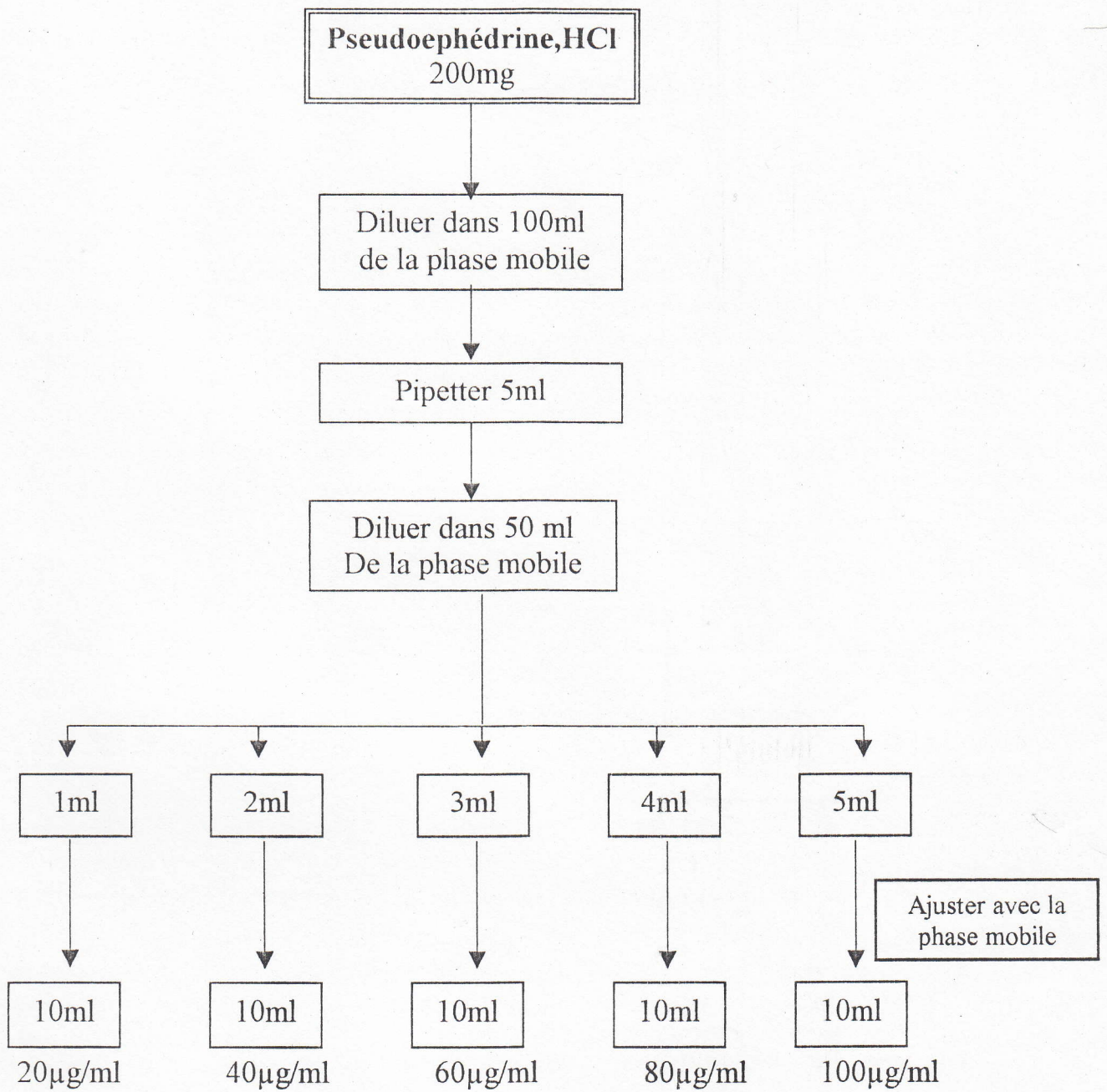
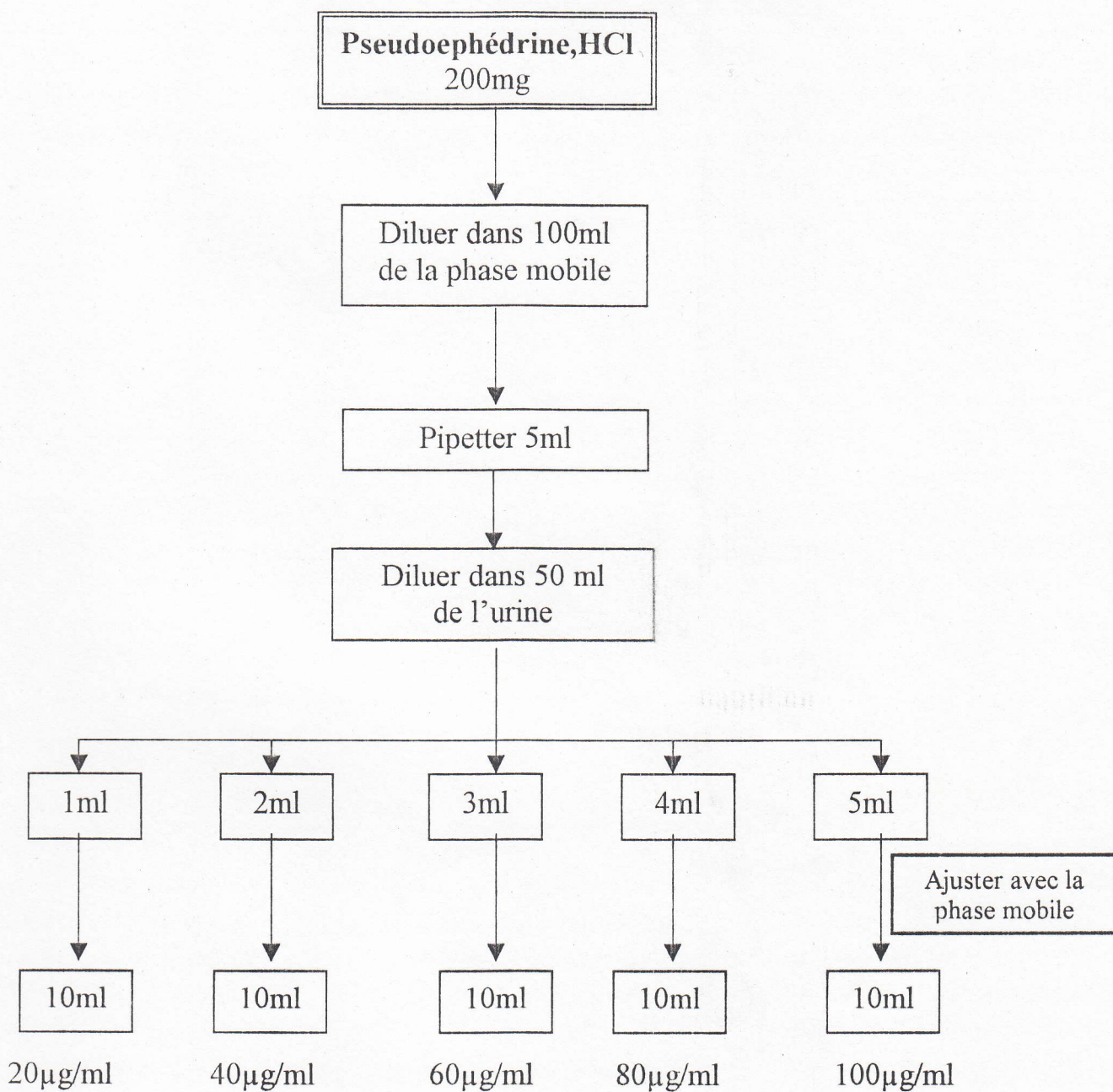


fig. 23 : Préparation de gamme d'étalonnage de l'échantillon :



Paramètre majeur	Constituant mineur	Constituant en traces	Constituant
Répétabilité sur solution témoin	< 1%	< 1%	< 1%
Coefficient de corrélation sur échantillon de référence	> 0.999	> 0.980	>0.970
Coefficient de corrélation sur échantillon reconstitué	> 0.998	> 0.960	> 0.950
Ecart type de répétabilité sur échantillon manufacturé	< 1.5%	< 3%	<5%
Limite de détection (en % de la concentration normale dosée)	< 0.5%	< 1%	<5%
Limite de quantification (en % de la concentration normale dosée)	< 1%	< 3%	<10%
Ecart type de reproductibilité sur échantillon manufacturé	< 2.5%	< 5%	<10%
Ecart type de fidélité	< 4%	< 8%	< 15%
Ecart de justesse	< 2%	< 4%	< 10%

Tab12 : Types d'échantillons et critères d'acceptation