

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

-----  
UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE  
TIZI OUZOU  
FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE

FILIERE : CHIMIE

**MEMOIRE DE MASTER**

SPECIALITE : *CHIMIE PHARMACEUTIQUE*

**THEME**

**Etude comparative de deux méthodes de dosage  
(HPLC et UV) dans une formulation sèche : cas  
du Paracétamol**

*Présenté par :*

***BOUAKIZ            KAMELIA***

***KHERROUBI      SADIA***

*Soutenu publiquement, le 15/07/2021*

*devant le Jury composé de :*

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>	<i>Affiliation</i>	<i>Qualité</i>
Mme HIKEM Djamila	MCA	UMMTO	Présidente
Mr BENCHOUAK Mounir	MAA	UMMTO	Examineur
Dr TOUBAL Lamia	Pharmacienne spécialiste en chimie analytique	CLCC Tizi-ouzou	Promotrice



## *Dédicace*

*C'est avec un grand plaisir et avec une profonde gratitude que je dédie ce modeste travail.*

*A la femme de ma vie maman « **Houria** » quoi que je fasse ou que je dise je ne saurai point te remercier comme il se doit tu as toujours été ma source de force pour faire face aux différents obstacles, Ce travail représente le si peu avec lequel je pourrai vous remercier pour tout vos sacrifices et prières tout au long de ce long cheminement*

*Mon diplôme vous appartient*

*A mon très cher père « **Akli** » qui me fait de moi une femme, merci pour l'encouragement, le soutiens et la confiance que tu m'as donnée*

*A mes chères sœurs « **Yasmine et Hayet** » quoi que soit les mots ne suffisent guère, pour exprimer l'attachement l'amour et l'affection que je porte pour vous*

*A mes chers neveux : « **Abd El Nour, Abd El Ghani et Amir** »*

*A mes grands parents maternel et paternel qu'Allah vous accueille en son vaste paradis, vous restez toujours gravés dans mon cœur*

*A mon binôme « **kamelia** » qui a partagé ce travaille avec mois, je te remercie pour tout les moments de joie, d'amitié et de souvenir qu'on a passes ensemble.*

*A tout les membres de ma famille et tout personne porte le Nom « **KHERROUBI** »*

*A tous mes amis, à tous ceux que j'aime et qui m'aime pour tous les précieux moments*

*Je dédie ce travail.*



***Sadia***

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail.*

*A ma famille. Qui m'a livrée une éducation digne son amour a fait de moi ce que je suis  
aujourd'hui.*

*Particulièrement à mon père « **MOKRANE** » aucune dédicace ne suffit pour exprimer  
le respect et l'estime que j'ai toujours à vous.*

*A ma mère « **MALIKA** » qui ma attendu avec patience les fruits de sa bonne éducation  
et ses dévouement*

*A ma deuxième mère ma tante « **DJIDJI** » la source de tendresse et l'exemple du  
dévouement qui n'jamais cessé de me soutenir.*

*A mon frère « **MASSI** » et ma sœur « **FATTA** » source de joie de bonheur.*

*A mon binôme qui partager ce travail avec moi, je te remercie pour tous les moments  
de joie, d'amitié et de souvenir qu'on a passé ensemble.*

*A mes amis spécialement à mes amies de l'enfance (**Joujou .Rima .Meriem .Tina**) et à*

*Tous mes amis que j'ai rencontrés dans ma vie et tout ce qui m'ont aidé à réaliser ce  
travail **Meriem** .....)*

*A mes grands parents que dieu les accueillent dans son vaste Paradis et ma grand  
mère que dieu la garde pour nous.*

## *REMERCIEMENT*

Avant tout nous remercions le bon Dieu de nous avoir aidé à mener ce travail jusqu' à la fin.

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce à la participation de plusieurs personnes à qui nous voudrions témoigner toute notre gratitude.

Nous voudrions dans un premier temps remercier, notre directrice de mémoire

**Dr « TOUBAL Lamia »** pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils.

Nous remercions monsieur « **BENCHOUAK** » et madame « **HIKEM** » Pour avoir d'accepter et de juger ce travail et pour toutes les remarques et critiques, en tant qu'examineurs.

Nous remercions également sans exception toutes les personnes qui ont coopérées de près ou de loin d'une manière ou d'une autre à l'aboutissement de ce travail.

*Merci à tous et à toutes*



## Abréviation

**PA** : principe actif

**LP** : libération prolongée

**CP**: comprimé

**PEG**: polyéthylène glycol

**FDA**: Food and Drug Administration

**NAPQI**: N-Acetyl-P-Benzo-Quinone

**COX** : Cyclooxygénase

**H2** : enzyme prostaglandine synthéase

**SNC** : Système nerveux centrale

**AINS** : anti inflammatoires non stéroïdiennes

**cyp450** : cytochrome p 450

**PO** : per ose (voie orale)

**IV** : voie intraveineuse

**POX** : peroxydase

**UV-visible** : ultra violet- visible

**E1** : énergie fondamental

**E2** : énergie d'émission

**A** : Absorbance

**T** : Transmittance

**HPLC** : chromatographie liquide haute performance

**Ø<sub>m</sub>**: phase mobile

**Ø<sub>s</sub>**: phase stationnaire.

**Med** : médicament

**[C]** : concentration.

## Liste des paramètres statistiques

$X_i$  : concentration de la solution  $i$

$Y_i$  : l'absorbance de la solution  $i$

$e_i^2$  : résidu

$X'$  : moyenne des concentrations

$Y'$  : moyenne des absorbances

$a$  : la pente de la droite d'étalonnage

$b$  : l'ordonnée à l'origine de droite d'étalonnage

$R$  : coefficient de corrélation

$A_{moy}$  : moyenne des aires de la solution standard

$\sigma$  : l'écart type

$\sigma^2$  : variance

$C_v$  : coefficients de variation

$m$  : masse

$C$  : concentration

$T$  : teneur

$A_{éch}$  : Air de pic d'échantillon

$A_{std}$  : Air de pic d'échantillon

$f_{éch}$  : facteur de dilution d'échantillon

$f_{std}$  : facteur de dilution d'échantillon

$PE_{éch}$  : prise d'essai d'échantillon

$PE_{std}$  : prise d'essai d'échantillon

$m_{PA}$  : masse de principe actif

$C_{éch}$  : concentration de l'échantillon

$C_{std}$  : concentration de solution standard

$V_{std}$  : volume de solution standard

$V_{éch}$  : volume de l'échantillon

# Liste des figures

Figure 1 : Plante de cinchona .....	5
Figure 2 : Joseph van Mehring .....	6
Figure 4 : Paracétamol.....	6
Figure 5 : Formule chimique et molécule de paracétamol.....	7
Figure 6 : Synthèse du paracétamol.....	8
Figure 7 : Voies de métabolisation .....	10
Figure 8: Mode d'action.....	11
Figure 9: schémas montrant la posologie du paracétamol.....	14
Figure 10 : toxicité.....	16
Figure 11: Spectrophotomètre UV-Visible.....	18
Figure 12: schéma de Principe d'UV-Visible .....	19
Figure 13: Domaine spectrale.....	20
Figure 14: Instrument UV-Visible.....	21
Figure 15: Intensité incidente et transmise .....	23
Figure 16: Transmittance et absorbance en fonction de la concentration.....	23
Figure 17: Domaine de validation de la loi BEER et LAMBERT .....	24
Figure 18: Droite d'étalonnage d'une substance S .....	26
Figure 19: Spectre d'absorption de deux composés contenu dans un même mélange.....	27
Figure 20: Principe de la chromatographie sur colonne .....	31
Figure 21: Vanne d'injection à six voies avec boucle d'échantillonnage à gauche : Position remplissage de la boucle -A, droite: Position d'injection dans la colonne .....	32
Figure 22: appareillage HPLC.....	35
Figure 23: Spectrophotomètre UV-Visible relié un ordinateur pour le traitement des données .....	48
Figure 24: Bain ultrasons.....	48
Figure 25: Balance analytique .....	49

Figure 26: Comprimés Expandol 500mg.....	50
Figure 27: Fiole contenant le diluant (NaOH).....	50
Figure 28: Centrifugeuse .....	55
Figure 29: Buchner .....	55
Figure 30: Différents composants d'un appareil HPLC relié à un ordinateur pour le traitement des données.....	56
Figure 31: Fiole contenant le diluant (solution de NaOH 0.1 M).....	56
Figure 32: Broyage des comprimés de paracétamol par le biais d'un mortier et un pilon.....	57
Figure 33: Centrifugation de la solution échantillon à 4000 tours/minute pendant 10 minutes	.58
Figure 34: Le diluant et la solution échantillon après centrifugation (séparation culot/ surnageant dans la SE).....	58

## Liste des tableaux

Tableau I: Propriétés physico-chimiques du paracétamol .....	9
Tableau II: les verreries utilisées dans le dosage spectrophotométrie UV-Visible .....	46
Tableau III: réactifs et métiers premier utilisés dans le dosage spectrophotométrique .....	47
Tableau IV: L'appareillage utilisé dans le dosage spectrophotométrique .....	47
Tableau V: Gamme d'étalonnage .....	48
Tableau VI: Verreries utilisées dans le dosage chromatographique .....	49
Tableau VII: Les réactifs utilisés dans le dosage chromatographique .....	51
Tableau VIII: Appareillage utilisés dans le dosage chromatographique .....	52
Tableau IX: Les caractères organoleptiques des comprimés d'Expandol 500 mg .....	53
Tableau X: Les masses individuelles des comprimés pesés d'Expandol 500 mg .....	54
Tableau XI: les absorbances des solutions standards .....	63
Tableau XII: Les aires des pics des six injections de la solution standard .....	64
Tableau XIII: Les intervalles de conformité de masse des comprimés d'Expandol 500 mg .....	65
Tableau XIV: les intervalles de conformité de la teneur en paracétamol des comprimés d'Expandol 500 mg .....	





# Table des matières

INTRODUCTION.....	2
Chapitre I : paracétamol .....	4
1. Historique .....	5
2. Définition.....	7
3. Structure chimique.....	7
4. Mécanisme de Synthèse du paracétamol .....	8
5. Propriétés physico-chimiques : [9, 10,11].....	8
6. Pharmacocinétique .....	9
7. Pharmacodynamique .....	11
8. Mécanisme d'action.....	11
9. Indications thérapeutiques.....	12
10. Contre-indications .....	12
11. Posologie .....	12
12. Effets indésirables .....	14
13. Toxicité au paracétamol .....	15
14. Précautions d'emploi.....	16
Chapitre II : Spectrophotométrie .....	17
UV-Visible	
1. Définition de spectrophotométrie UV/visible .....	18
2. Principe de spectrophotométrie UV/visible.....	18
3. Spectre UV-visible et domaine spectral .....	19

4.	Instrumentation.....	20
5.	Applications.....	21
6.	Loi de BEER et LAMBERT.....	22
6.	Méthodes utilisées en analyse quantitative.....	25
7.	Dosage simultanée de deux composés .....	27
8.	Intérêt de la spectrophotométrie UV en analyse quantitative.....	28
Chapitre III : Chromatographie HPLC .....		29
1.	Généralités.....	30
2.	Définition de la chromatographie HPLC.....	31
3.	Principe de l'HPLC .....	31
4.	Appareillage .....	31
5.	Analyse qualitative en HPLC .....	35
6.	Analyse quantitative en HPLC .....	38
7.	Applications de l'HPLC .....	42
Partie pratique.....		44
Matériels et méthodes.....		45
1).	Dosage du paracétamol par spectrophotomètre UV-visible.....	46
1.1).	Matériel .....	46
	1.2..Méthode.....	49
	Contrôle organoleptique .....	49
	Uniformité de masse.....	49
	Préparation des solutions.....	50
2)	Dosage du paracétamol dans les comprimés par chromatographie liquide haute performance (HPLC) .....	52
	Matériel .....	52
	Méthode.....	56
	Préparation des solutions.....	56
2.1.1)	Préparation du diluant : solution NaOH 0.1M .....	56
	Conditions chromatographiques.....	61
	Séquence analytique .....	61
Résultats et discussions .....		62
1)	Résultats .....	63
	Dosage du paracétamol par spectrophotomètre UV-visible.....	63
	Contrôle des caractères organoleptiques .....	63

Uniformité de masse.....	64
Dosage spectrophotométrique proprement dit.....	65
Dosage du paracétamol par chromatographie liquide haute performance (HPLC)	70
2. Discussions.....	72
Contrôle des caractères organoleptiques .....	72
Uniformité de masse.....	72
Dosage du paracétamol dans les comprimés d'EXPANDOL par spectrophotomètre UV-visible .....	73
Dosage du paracétamol dans les comprimés d'EXPANDOL par HPLC .....	73
Conclusion.....	75

# **Introduction Générale**

## INTRODUCTION

Le paracétamol (l'acétaminophène) est le médicament antalgique le plus connu et le plus utilisé dans le monde, il existe sous différentes formes pharmaceutiques et avec des dosages divers, afin de pouvoir satisfaire aux besoins des soins et cela pour toutes les tranches d'âge.

Le paracétamol est une substance active, ayant des propriétés antalgique, antipyrétique et anti-inflammatoire, largement indiquée dans le traitement des différentes manifestations douloureuses tel que les états grippaux, douleurs dentaires, articulaires, maux de tête ...

Pour garantir la qualité irréprochable du paracétamol dans le produit fini, on effectue de nombreux contrôles parmi eux le contrôle physico-chimique qui permet de vérifier le respect de ses spécifications tel que le dosage et la pureté...

Plusieurs techniques analytiques comme la spectrophotométrie UV –VIS, la chromatographie liquide à haute performance, la chromatographie sur couche mince, la potentiométrie directe ont été utilisées pour le dosage du paracétamol dans les formulations pharmaceutiques. Cependant, chaque technique analytique présente des avantages et des limites.

Notre travail réalisé au sein du laboratoire de chimie analytique de la faculté de médecine de Tizi-Ouzou consiste à faire une étude comparative du dosage du paracétamol dans le produit fini (EXPANDOL 500mg) en forme sèche (comprimés) par la technique spectrophotométrie UV-Visible qui est basée sur la propriété du paracétamol a absorbé certaines longueurs d'ondes du spectre UV et la technique chromatographique HPLC qui permet la réalisation d'une analyse quantitative des comprimés d'EXPANDOL 500mg en matière de leurs teneur en paracétamol.

L'objectif de cette étude comparative est de voir la possibilité de substituer la méthode usuelle (HPLC) par une méthode alternative (spectrophotométrie UV-VIS) pour le dosage du paracétamol dans le produit fini (comprimés d'EXPANDOL 500mg).

Ainsi, ce travail comporte deux parties :

**Une partie bibliographique**, qui comporte une présentation complète de notre molécule d'étude « **paracétamol** » ainsi que l'essentiel des techniques d'analyse utilisées dans la suite du travail, à savoir la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et la spectrophotométrie UV/Visible.

Une deuxième partie qui est **la partie expérimentale**, qui comporte les différentes étapes du dosage analytique du paracétamol dans le produit fini (EXPANDOL 500mg comprimés) par HPLC puis par spectrophotométrie UV-VIS à fin d'exposer les résultats qui débouchent sur une comparaison des deux techniques, une discussion et une conclusion.

# **Chapitre I**

## **Paracétamol**

## 1. Historique

Le paracétamol est une molécule plus que centenaire, née d'un heureux hasard, suite à une erreur de livraison <sup>[1]</sup>



**Figure 1 : Plante de cinchona**

En 1878, Harmon Northrop Morse synthétise le paracétamol autrement nommé « acétylaminophénol » dans le but de remplacer l'écorce de cinchona qui est une plante médicinale chère utilisée à l'époque pour soulager les douleurs et les états fébriles.

En 1886, Arnold Cahn et Paul Hep deux médecins strasbourgeois découvrent les propriétés de paracétamol en étudiant l'effet du naphthalène et ses dérivés sur les parasites intestinaux, le produit est sans efficacité ce qui nous mène à conclure que ce n'est pas celui-ci qui est utilisé dans la fabrication de paracétamol mais c'est l'acétanilide qui donnera naissance à deux molécules « phénacétène et le paracétamol ». <sup>[2]</sup>

En 1893, Joseph Von Mehring compare entre la toxicité de phénacétène et le paracétamol il a trouvé que cette dernière est plus toxique que phénacétène ce qui fait que le paracétamol est délaissé. <sup>[3]</sup>



**Figure 2 : Joseph van Mehring**

Vers les années cinquante, des essais cliniques montrent les propriétés antalgiques et antipyrétiques du paracétamol, la Food and Drug Administration « FDA » autorise donc la vente du Tynelol sur le marché américain (aux états unis) en 1956 et le doliprane et codoliprane en France en 1957.

Aujourd'hui, le paracétamol est le médicament antalgique le plus utilisé au monde entier grâce à son bon rapport bénéfice/risque et ses effets indésirables minimisés en comparant avec l'aspirine qui provoquent des effets parfois graves notamment les hémorragies, syndromes et les ulcères gastro intestinal. <sup>[4]</sup>



**Figure 3 : Comprimé de paracétamol**

## 2. Définition

Le paracétamol ou l'acétaminophène est la substance active qui entre dans la composition de nombreuses spécialités médicamenteuses présentées sous différentes formes et conditionnement <sup>[5]</sup> vendu en libre-service, il est utilisé soit seul ou en association avec d'autres médicaments <sup>[6]</sup>

Le paracétamol est de classe des analgésiques non salicylés, indiqué contre les fièvres et les douleurs d'intensités moyennes à forte. <sup>[7]</sup>



Figure 4 : Paracétamol

## 3. Structure chimique

Paracétamol nom vient de la contraction de para-acétyl-aminophénol.

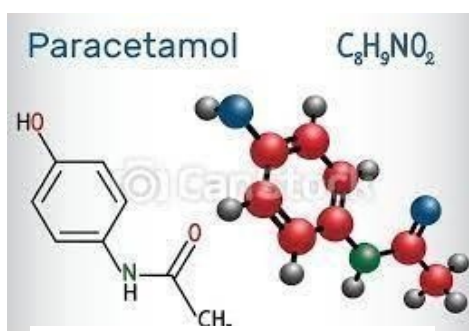


Figure 5 : Formule chimique et molécule de paracétamol

La molécule est composée d'un seul cycle benzénique substitué par un groupement Hydroxyle « OH » et par un groupement amide en position para de la structure. <sup>[8]</sup>

#### 4. Mécanisme de Synthèse du paracétamol

La synthèse de l'acétaminophène fut réalisée chimiquement en 1878 par Harmon Nothrop Morse, il s'agit d'une réduction du para-nitrophénol en para-aminophénol en présence d'étain dans l'acide acétique suivit d'une acylation par l'anhydride acétique en donnant l'amide N-(4-Hydroxy phényle éthane amide) comme le montre la synthèse ci-dessous. [8]

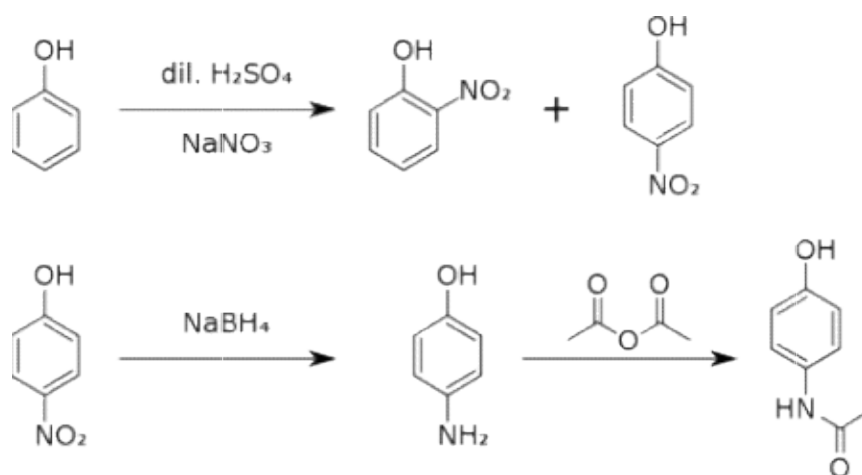


Figure 6 : Synthèse du paracétamol

#### 5. Propriétés physico-chimiques : [9, 10,11]

Les propriétés physiques et chimiques de paracétamol sont mentionnées dans de tableau ci-dessous

↗ Tableau I: Propriétés physico-chimiques du paracétamol

<i>Propriétés chimiques</i>	<i>Propriétés physiques</i>
Nom chimique : N-(4-Hydroxyphényl) acétamide	Point de fusion : 168-172°C
Nom IUPAC : 4-acétylaminophénol	Densité : 1.263g/mol
DCI : Paracétamol	Masse volumique : 1.293 g/ cm <sup>3</sup> .
Formule brute : C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	Solubilité : soluble dans l'eau -Facilement soluble dans alcool à 90% -Très peu soluble dans l'éther.
Masse molaire : 151.1626 g/mol et pKa=9.38	Aspect : poudre cristalline blanche à jaune pâle, inodore de saveur amère.

## 6. Pharmacocinétique

### ❖ Absorption

Voie orale : résorption rapide et complète par voie per os : le max de concentration plasmatique atteinte entre 30-60 minutes pour les comprimés et les poudres après ingestion et une demi vie plasmatique d'environ 2h.

Voie injectable : le médicament se trouve directement dans la circulation sanguine (biodisponibilité : 100%), possède la même efficacité que la voie orale.

## ❖ Distribution

Le paracétamol se diffuse rapidement vers tous les tissus en atteignant les organes cibles

[6] les concentrations sont comparables dans le sang, la salive et le plasma et la liaison aux protéines plasmatiques est faible. [12]

## ❖ Métabolisme

Métabolisé principalement dans le foie où il subit une glucuroconjugaison et sulfoconjugaison, il existe une autre voie mineure catalysée par CYP450 en formant un intermédiaire réactif (N-acétyl-p-benzoquinone-imine) abrégé en « NAPQI » qui est soit réduit et éliminé dans les urines après conjugaison avec la cystéine et l'acide mercaptopurique, ou bien dans certains cas son métabolite toxique est augmenté dans le sang ce qui est responsable d'une intoxication massive par le paracétamol.

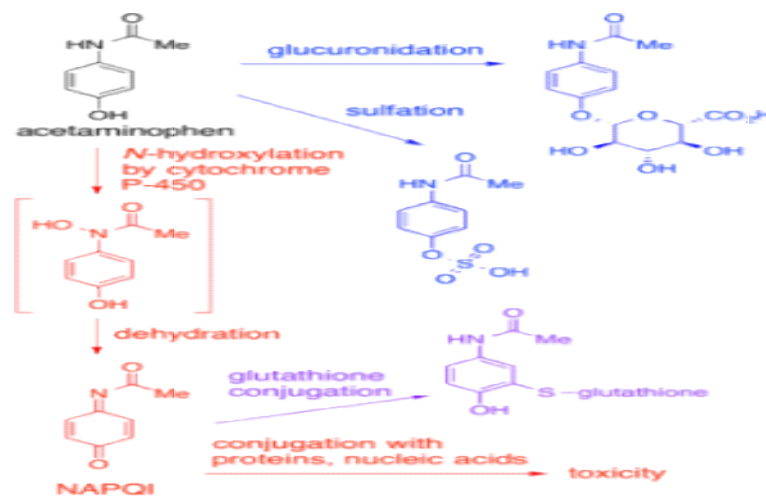


Figure 7 : Voies de métabolisation

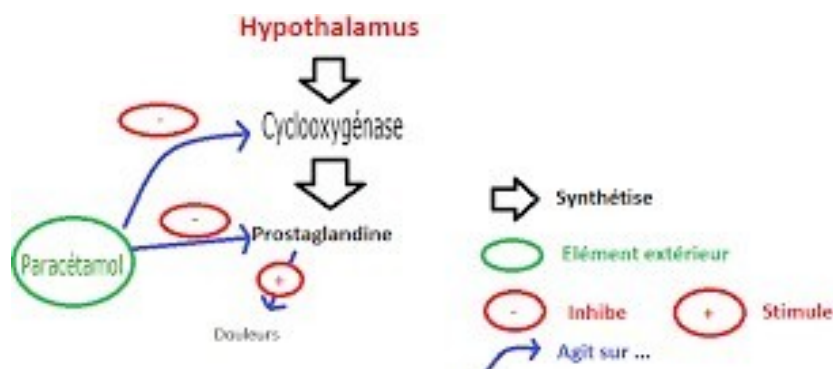
❖ Élimination : urinaire, rapide.

## 7. Pharmacodynamique

Le paracétamol permet de traiter les douleurs (antalgiques) et faire baisser les fièvres (antipyrétique) <sup>[12] [16]</sup>

## 8. Mécanisme d'action

Le paracétamol dispose d'une action inhibitrice en bloquant la cyclooxygénase « COX » qui possède une affinité au système nerveux central (SNC), il empêche la production des prostaglandines H2 synthétisées [6], celles-ci comportent deux sites d'action les COX1 et COX2 les cibles d'action des AINS et la peroxydase POX qui est la cible principale d'agissement, l'effet inhibiteur dépend du taux des radicaux libres présents dans le milieu, par ce mécanisme le paracétamol baisse la fièvre



**Figure 8 : Mode d'action**

D'autre part l'action antalgique de paracétamol est expliquée par la libération de l'acide arachidonique influe par COX permet de produire 02 types de prostaglandines instables G2 et H2 qui sont ensuite stabilisées par la peroxydase enfin ces prostaglandines E2 stables sensibilisent les nocicepteurs de douleurs. <sup>[13]</sup>

## 9. Indications thérapeutiques

-Traitement symptomatique des douleurs d'intensité légère à modérés et /ou d'états fébriles :

« Algies articulaires, céphalées états fébriles de tout origine ».

-Traitement symptomatique des douleurs d'arthrose. <sup>[12]</sup>

-Usage étendu en pédiatrie.

-Fréquemment associé à d'autres antalgiques (dextropropoxyphène, codéine, morphine) à mécanisme d'action différents « opiacés » dans le cas des douleurs majeures.

## 10. Contre-indications

Le paracétamol ne doit pas être pris en cas :

- Hypersensibilité au paracétamol ou à l'un de ses constituants (exceptionnelle).
- Insuffisance hépatocellulaire (allongement de demi-vie d'élimination) <sup>[12]</sup>
- Porphyrie. <sup>[14]</sup>

## 11. Posologie

Le paracétamol est le moins dangereux des antalgiques, si on respect la posologie qui se diffère selon l'âge

**❖ Chez les nourrissons et nouveau-né.**

Pour les nouveaux nés qui ont un âge postconceptionnel de 28 à 44 semaines d'aménorrhée, l'administration se fait que par voie intraveineuse à une dose de charge de 20 mg/kg, suivi de doses d'entretien de 10 mg/kg toutes les 6h entre 32 et 44 semaines d'aménorrhée et toutes les 12h entre 28 et 31 semaines. <sup>[15]</sup>

**• Chez les nourrissons de 44 semaines d'aménorrhée et les enfants plus âgés**

La dose quotidienne recommandée est de 15 mg/kg (1.5 mg/kg) toutes les 6 h quel que soit leurs poids. <sup>[15][16]</sup>

**• Chez les adultes**

La dose journalière par voie orale prescrite aux adultes est comprise entre 0.5 à 1 gr <sup>[16]</sup> sans dépasser la dose maximale de 3g/j pour les adultes qui pèsent moins de 50 kg ou présentent certains facteurs de risques (insuffisance hépatique et rénale, consommation d'alcool régulière et un état de jeune prolongé) <sup>[17]</sup> et la perfusion intraveineuse de paracétamol doit être prêt de 15 minutes jusqu'à 4 fois par jour avec un minimum d'intervalle de 4 h entre 02 administrations. <sup>[16]</sup>

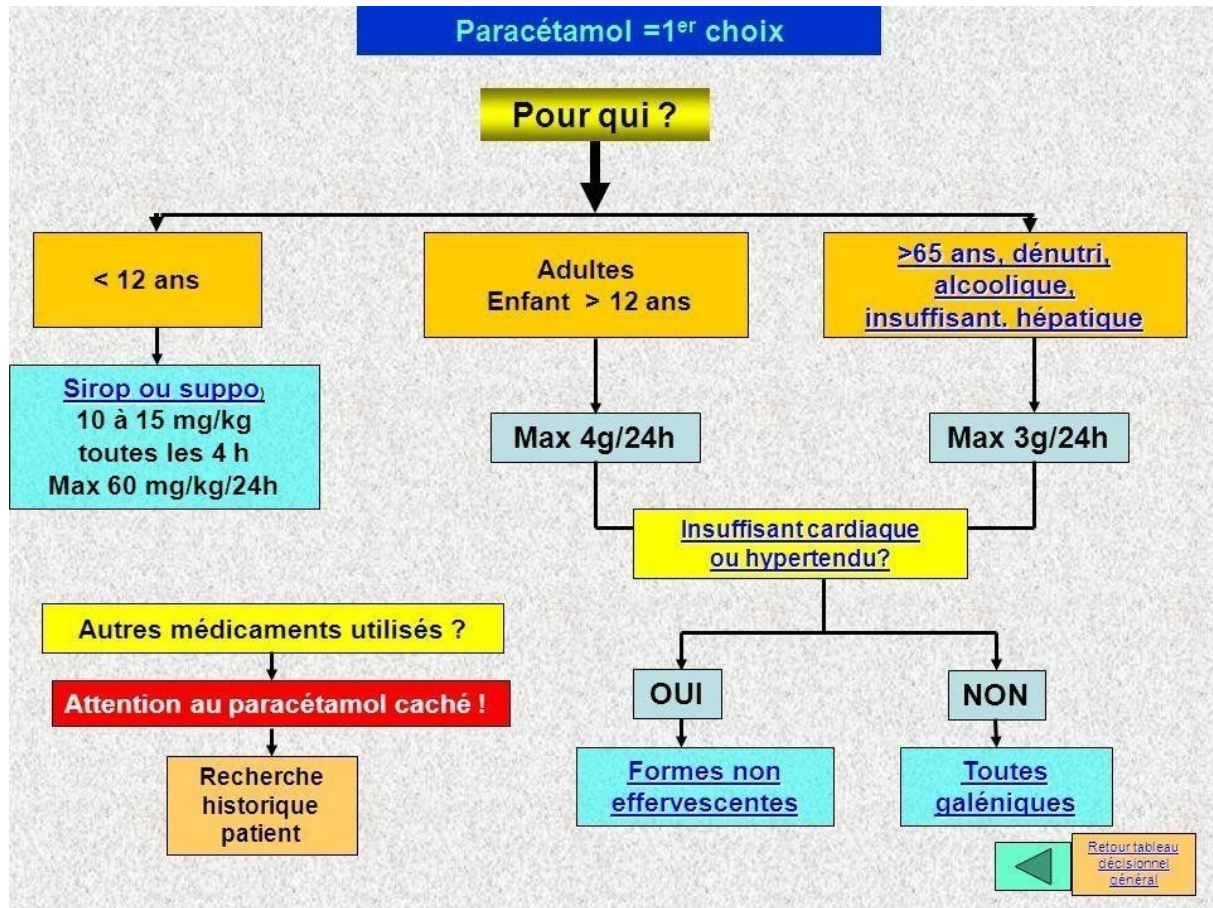


Figure 9 : Schémas montrant la posologie du paracétamol

## 12. Effets indésirables

Lorsque le paracétamol est bien toléré, il est rare qu'il présente des effets indésirables mais comme tout médicament dans des conditions bien définies il est susceptible de provoquer :

- Des réactions d'hypersensibilité :( choc anaphylactique, œdème de Quincke, érythème, urticaire et rash cutané). [12]

- Asthme (très rare)

- Insuffisance rénale chronique (consommation à long terme de paracétamol chez les alcoolismes peut induire une néphropathie chronique).

- Ulcération rectale. [18]

- Pancréatite aigüe en cas d'association avec d'autres médicaments

Notamment la codéine.

- Thrombopénie, leucopénie, et neutropénie (exceptionnellement)
- Rhabdomyolyse.
- Purpura vasculaire. [19]

### 13. Toxicité au paracétamol

**Surdosage** : un surdosage à partir de 10 gr de paracétamol en une seule prise chez l'adulte et de 150 mg/kg de poids corporel en une seule prise chez l'enfant est responsable de provoquer une **hépatite cytolytique** susceptible d'aboutir à une nécrose complète et irréversible s'expliquant par une insuffisance hépatocellulaire, une acidose métabolique et une encéphalopathie pouvant aller jusqu'au coma et la mort. Cette intoxication est stimulée chez les sujets âgés, les jeunes enfants, la femme enceinte et les alcoolismes. [6]

• **Les signes de toxicité se manifeste et s'aggrave au cours du temps :**

- Stade 01** (24 heures premiers) : nausées, vomissement « exceptionnellement coma avec acidose lactique »
- Stade 02** (24 h-72 h) : début d'hépatotoxicité « cytolysé ».
- Stade 03** (72h-96 h) : hépatotoxicité maximale – hépatite fulminante « ictère et encéphalopathie »
- insuffisance rénale.
- acidose lactique, hypoglycémie, coagulation [21].

• **La prise en charge des intoxications aiguës consiste à faire :**

- Un lavage gastrique
- Administration de charbon actif (diminue 50 à 80% de paracétamol et neutralise la N-Acétyle cystéine).
- Administration de l'antidote IV : pour régénérer le glutathion réduit qui permet la réduction de métabolite toxique. [6]

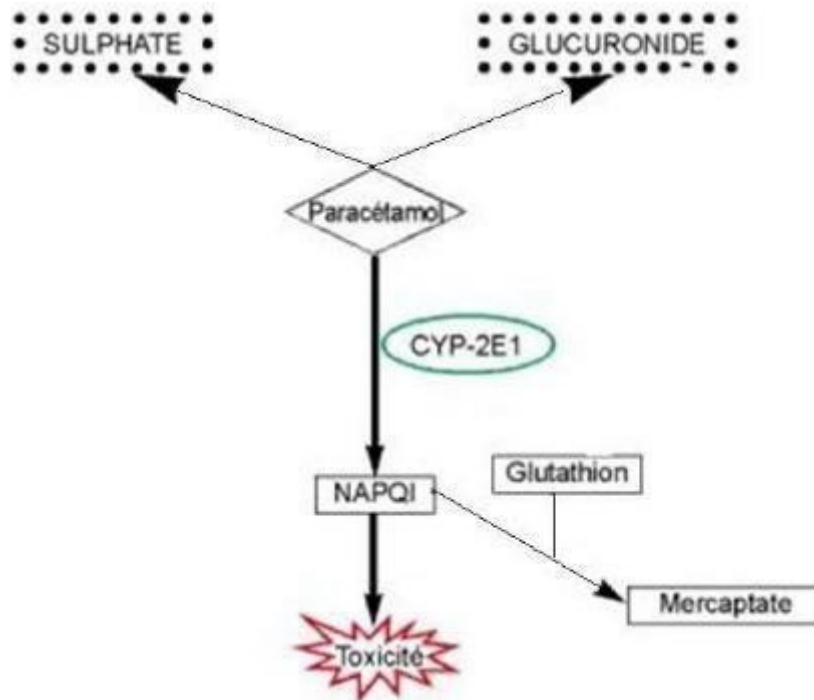


Figure 10 : Toxicité

#### 14. Précautions d'emploi

- Respecter les doses maximales recommandées : chez l'adulte et l'enfant de plus de 50 kg, la dose totale de paracétamol ne doit pas dépasser 4gr/jour.
- Vérifier l'absence de paracétamol dans la composition d'autres médicaments pour éviter le surdosage. <sup>[12]</sup>
- Utilisation prudente ou déconseillée en cas d'insuffisance hépatocellulaire, insuffisance rénale sévère (clairance de la créatinine  $\leq 30$ ml/min), alcoolisme chronique, malnutrition chronique et déshydratation. <sup>[22]</sup>

# **Chapitre II**

**Spectrophotométrie**

**UV-Visible**

## 1. Définition de spectrophotométrie UV/visible

La spectrophotométrie UV/visible c'est l'une des méthodes d'analyse quantitative et qualitative utilisé dans différents domaines telle que la recherche scientifique, l'industrie pharmaceutique, la chimie clinique et le contrôle de qualité.

Cette méthode consiste à mesurer l'absorbance « densité optique » d'une substance chimique en solution limpide [23]

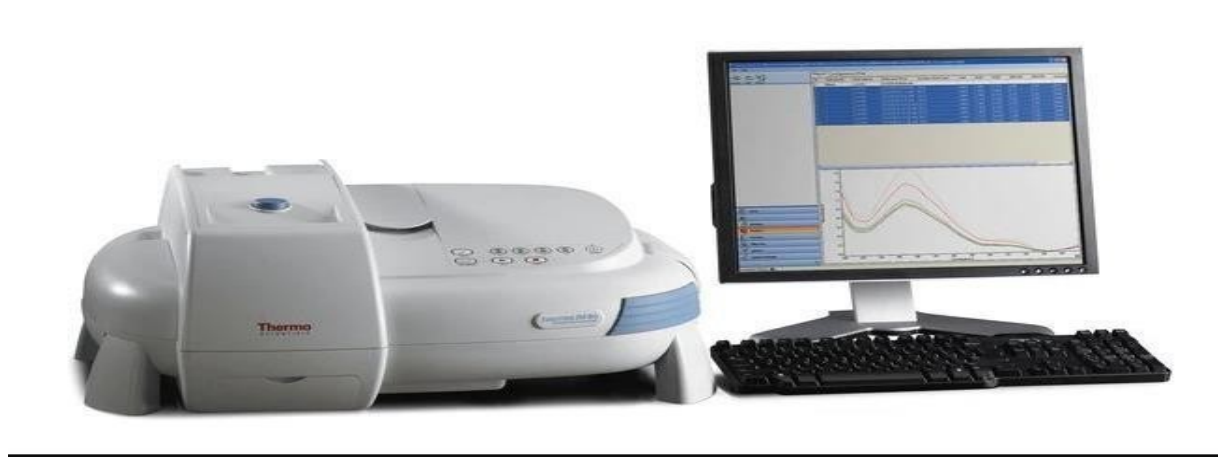


Figure 1 : Spectrophotomètre UV-Visible

## 2. Principe de spectrophotométrie UV/visible.

La spectrophotométrie UV/visible est basée sur l'aptitude de certaines molécules à absorber de la lumière dans le domaine UV/visible (entre 200 et 800nm). [24]

L'absorption du rayonnement UV/visible provoque une transition électronique entre deux niveau d'énergie tel que un électron passe de l'état fondamentale d'énergie  $E_1$  vers un état excité d'énergie  $E_2$  son retour donc à l'orbital initiale cède une petite quantité d'énergie soit sous forme de rayonnement noté :  $\Delta E = E_2 - E_1$  (émission) soit sous forme de chaleur. [42]

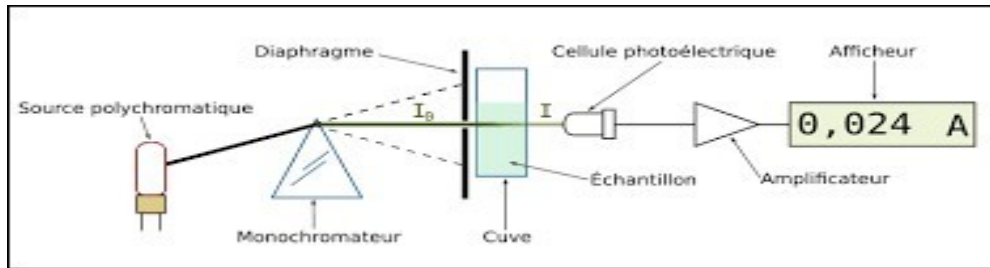


Figure 2 : schéma de Principe d'UV-Visible

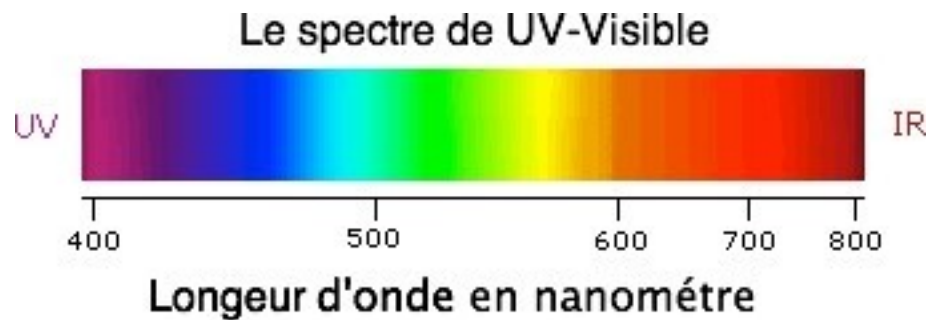
### 3. Spectre UV-visible et domaine spectral

Les spectres sont des diagrammes qui représentent l'absorption d'une radiation UV-visible traversant l'échantillon à étudié en fonction de la longueur d'onde de radiation , plusieurs paramètres permettent la quantification de l'absorption d'une radiation tel que l'absorbance « A », transmittance « T », et coefficient d'extinction molaire «  $\epsilon_m$  ».

Il existant deux paramètres importants en spectroscopie UV-visible sont les longueurs d'onde des maximum et minimum d'absorption et l'intensité d'absorption mesuré par le coefficient d'extinction molaire [23]

Le domaine UV-visible est divisé en trois plages :

- UV lointain ( $\lambda$  inférieur à 200nm)
- UV proche ( $\lambda$  entre 200 et 400nm)
- Visible ( $\lambda$  entre 400-800 nm). [26]



**Figure 3 : Domaine spectrale**

#### **4. Instrumentation**

Le spectromètre est un appareil qui enregistre la variation de l'absorbance  $A$  ou la transmittance  $T$  d'une radiation en fonction de la longueur d'onde  $\lambda$  ou le nombre d'onde respectivement, cet appareil est constitué de différents compartiments :

**Source lumineuse** : c'est une lampe à filament de tungstène (émettre dans la zone de 350-1700 nm), ou une lampe hydrogène (ou à deutérium pour des intensités plus élevées <sup>[23]</sup>)

**Monochromateur** : c'est un modèle simple et peu encombrant <sup>[25]</sup> qui permettent de convertir la lumière polychromatique en une lumière monochromatique et de sélectionner la longueur d'onde du travail. Il se compose d'une fenêtre d'entrée, système de dispersion pour la décomposition de la lumière blanche en différents composants et une fenêtre de sortie pour sélectionner la longueur d'onde.

**Cellule** : susceptible de contenir l'échantillon, elle doit être saisie lors de la manipulation par ses faces mates, et d'être rincée avant chaque manipulation par la solution échantillon. <sup>[23]</sup>

**Détecteur photoélectrique** : permet de capter un signal lumineux et de le transformer en signal électrique. <sup>[25]</sup>

**Un ordinateur** : pour le traitement de signal et l'affichage.

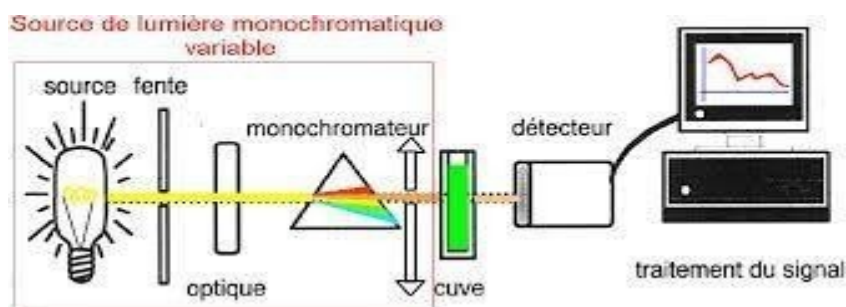


Figure 4 : Instrument UV-Visible

## 5. Applications

### ➤ Etude structurale :

Étude de la liaison hydrogène, de l'isomérisation cis-trans, la polymérisation ....

### ➤ Etude des équilibres cinétiques :

Détermination de la vitesse de réaction en suivant l'évolution chromatographique de l'absorbance. [25]

### ➤ Analyse qualitative.

### ➤ Analyse structurale et identification.

-L'étude des spectres ultraviolets ne peut à elle seule permettre l'identification certaine d'un analyte.

- Les informations qualitatives (epsilon, et lambda min et max) fournies par cette méthode peuvent parfois compléter les données obtenues par des techniques plus puissantes telles que la spectroscopie dans l'infrarouge, la spectrométrie de masse, la RMN...

-Dans des conditions particulières, les spectres dans l'ultra-violet sont utilisés pour une confirmation de structure ou pour une identification.

-On utilise soit la comparaison avec des spectres de référence, soit des règles empiriques telles que les « règles de WOODWARD FIESER »

-Dans le cas de mélanges simples avec peu de constituants qui absorbent, on peut cependant identifier des espèces. Cette identification est rendue plus performante via l'analyse multi variable

-La spectrométrie UV/visible est aussi utilisée pour la caractérisation des ions minéraux.

### Contrôle de la pureté

La présence d'impuretés peut modifier le spectre d'absorption UV/Vis et se traduit par des :

-Changement des positions des maxima d'absorption.

-Apparition d'épaulements ou de pics supplémentaires par effet d'enveloppe des spectres.

Pour un composé, le coefficient d'absorption molaire  $\epsilon_\lambda$  est constant dans un solvant donné.



**Exemples de molécules identifiées par spectrométrie UV/Visible selon la pharmacopée européenne : le di phosphate de primaquine, La vitamine A <sup>[41]</sup>.**

- **Analyse quantitative** : la spectrophotométrie UV/visible est une méthode d'analyse quantitative dans les limites de concentrations de l'ordre de  $10^{-4}$  mol/l et  $10^{-5}$  mol/l à travers la loi de BEER LAMBERT <sup>[23]</sup>

### 6. Loi de BEER et LAMBERT

L'UV-visible est largement exploitée en analyse quantitative, depuis fort longtemps dans le domaine du visible. Les mesures reposent sur la loi de BEER LAMBERT, qui relie l'absorbance de la lumière à la concentration d'un composé en solution.

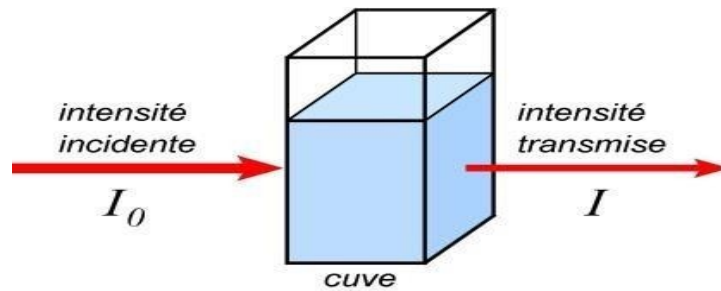
$$A_\lambda = \epsilon \cdot L \cdot C$$

$\epsilon$  : Coefficient d'absorption molaire (l/mol. cm).

$A$  : Absorbance ou densité optique

$L$  : Epaisseur ou longueur du chemin optique en (cm)

$C$  : Concentration molaire en mol /l. <sup>[26]</sup>



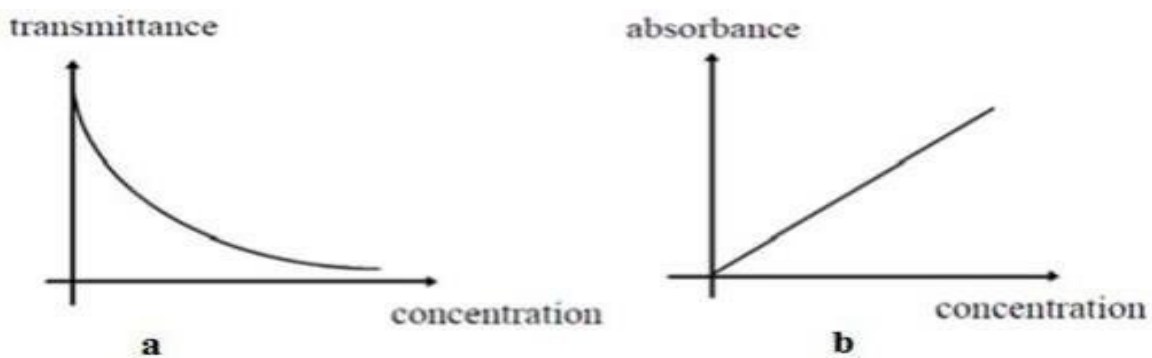
**Figure 5 : Intensité incidente et transmise**

La transmittance (T) est reliée à l'absorbance par l'expression suivant :

$$A = -\log T$$

La transmittance (T) est le rapport de l'intensité du faisceau transmis (I) sur l'intensité du faisceau initial ( $I_0$ ) souvent exprimé en pourcentage. <sup>[27]</sup>

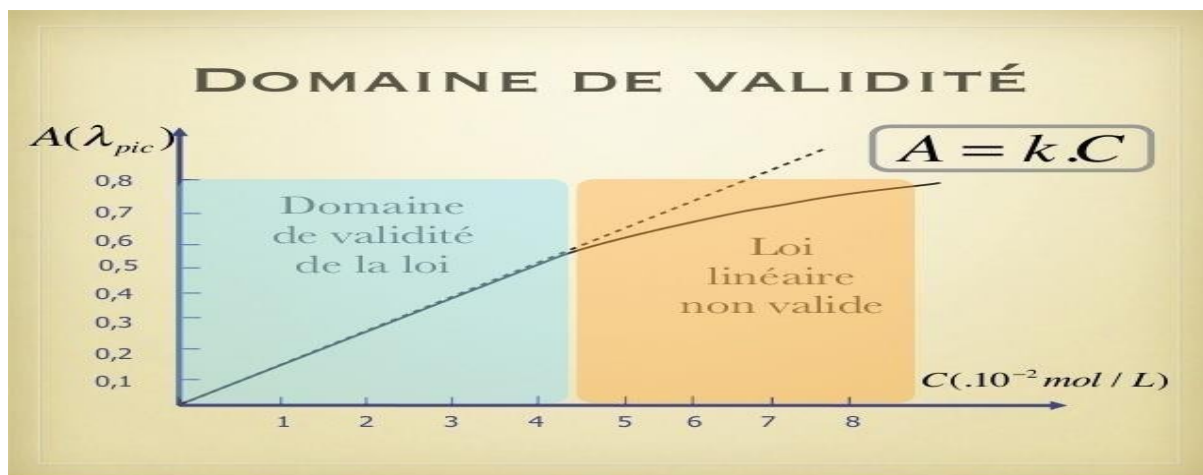
$$T = \frac{I}{I_0} \cdot 100 \quad \Rightarrow \quad A = \log \frac{I_0}{I}$$



**Figure 6 : Transmittance et absorbance en fonction de la concentration**

**Conditions de validation de la loi de BEER et LAMBERT**

- ✓ La lumière utilisée doit être monochromatique
- ✓ Les concentrations doivent être faibles
- ✓ La solution ne doit pas être ni fluorescente ni hétérogène.
- ✓ Le soluté ne doit pas donner lieu à des transformations photochimiques.
- ✓ Le soluté ne doit pas donner d'associations variables avec le solvant. [26]

**Figure 7 : Domaine de validation de la loi BEER et LAMBERT**

### Additivité des absorbances

Lorsque la solution renferme plusieurs solutés absorbants à une même longueur d'onde et qu'il n'y a pas d'interactions entre eux, la loi de BEER LAMBERT est additive.

Et de ce fait l'absorbance totale des solutions est la somme des absorbances des différents constituants contenues dans la solution.

$$A = A_1 + A_2 = L (\epsilon_1 C_1 + \epsilon_2 C_2)$$

$A$  : absorbance des deux composés.       $A_1$  : absorbance du composé 1.

$C_1$  : concentration du composé 1.       $A_2$  : absorbance du composé 2.

$C_2$  : concentration du composé 2.       $L$  : longueur de la cuve.

$\epsilon_1$  : coefficient d'absorption molaire du composé 1.       $\epsilon_2$  : coefficient d'absorption molaire du composé 2 [26]

## 6. Méthodes utilisées en analyse quantitative

### 6.1. Méthode directe

Lorsque seul le composé à doser qui absorbe à la longueur d'onde du travail.

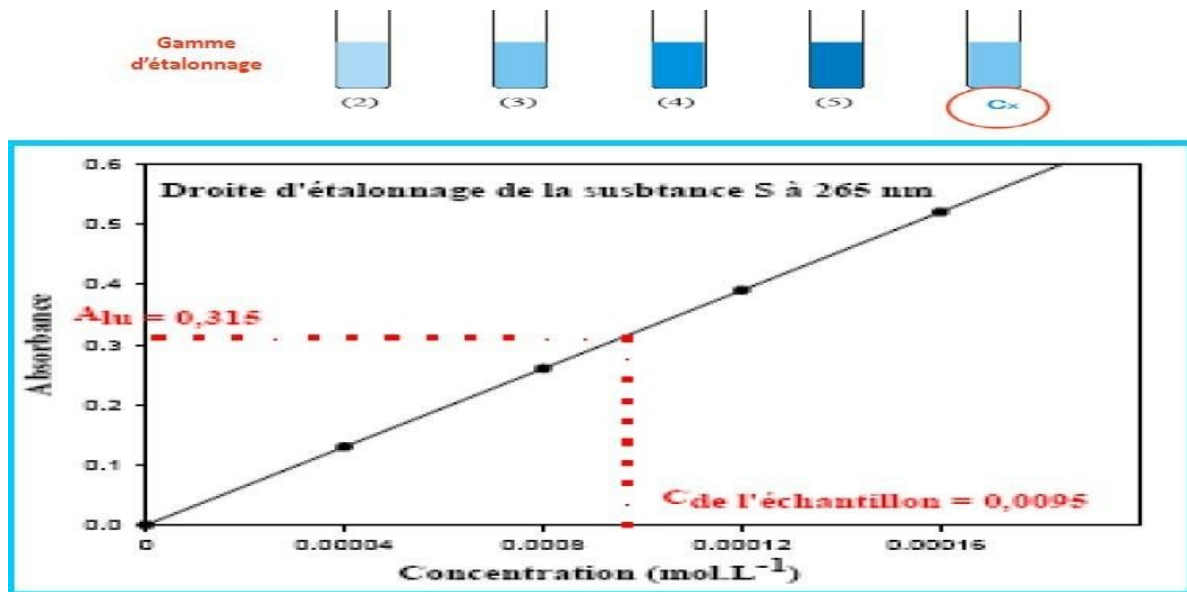
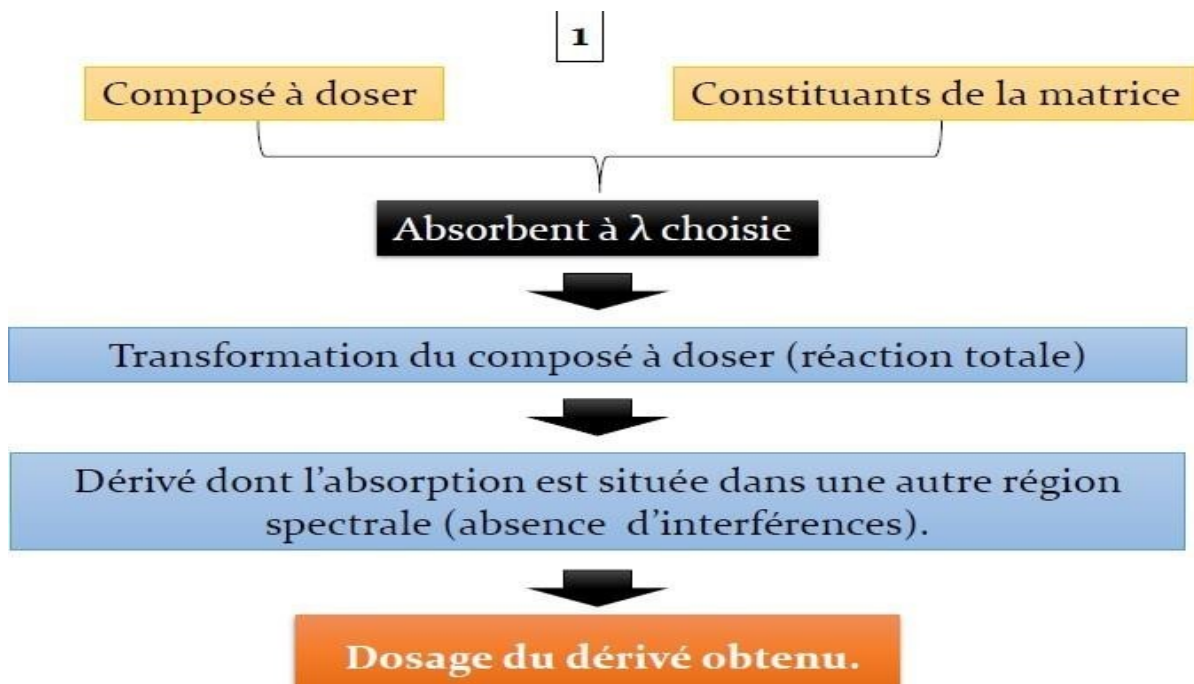
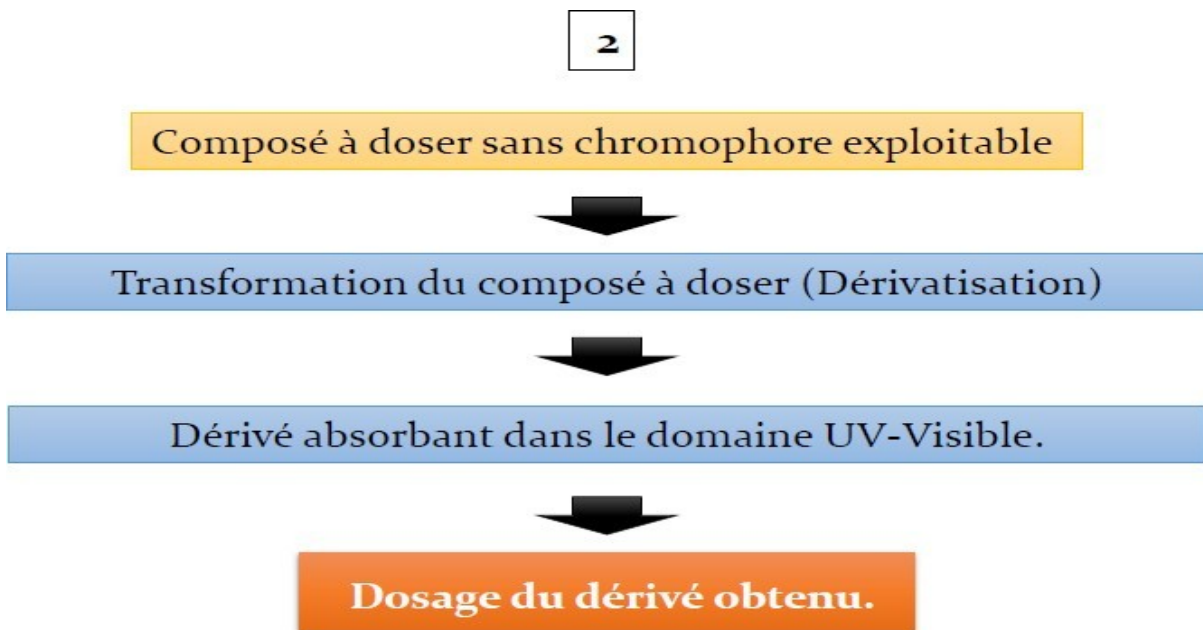


Figure 8: Droite d'étalonnage d'une substance S

### 6.2. Méthode indirecte

2 cas peuvent se présenter :





### 7. Dosage simultanée de deux composés

Un des avantages de la spectrométrie UV/vis est le dosage simultané de deux ou plusieurs composés colorés à condition que chacun d'entre eux n'ait pas une absorbance importante à la longueur d'onde maximale de l'autre substance.

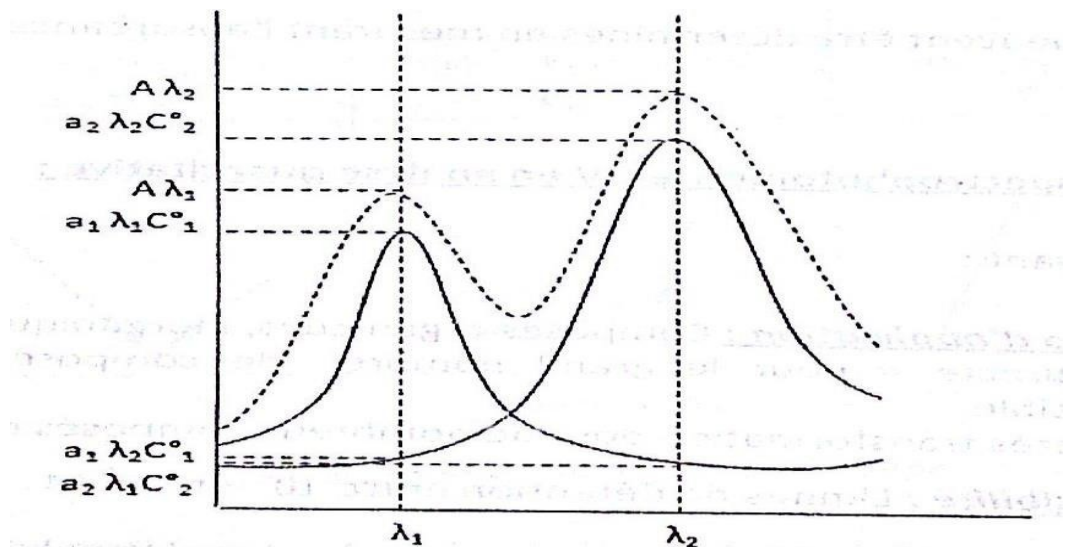


Figure 9: Spectre d'absorption de deux composés contenu dans un même mélange

$\lambda_1$  : maximum d'absorption du composé 1 dont la concentration est C1.

$\lambda_2$  : maximum d'absorption du composé 2 dont la concentration est C2 .

$\epsilon_1$  et  $\epsilon_2$  : coefficients d'extinction molaire des composés 1 et 2.

$$(A_1)_{\lambda_1} + (A_2)_{\lambda_1} = A_{\lambda_1}$$

$$(A_1)_{\lambda_2} + (A_2)_{\lambda_2} = A_{\lambda_2}$$

$$\left. \begin{array}{l} A_{\lambda_1} = l \epsilon_{1\lambda_1} \cdot C_1 + l \epsilon_{2\lambda_1} \cdot C_2 \\ A_{\lambda_2} = l \epsilon_{1\lambda_2} \cdot C_1 + l \epsilon_{2\lambda_2} \cdot C_2 \end{array} \right\} 2 \text{ équations à 2 inconnues } C_1 \text{ et } C_2$$

## 8. Intérêt de la spectrophotométrie UV en analyse quantitative

Méthode rapide ayant :

**Vaste champ d'application** : Composés organiques, inorganiques et biochimiques. -----

Analyse directe = pour le grand nombre de composés qui absorbent dans L'UV et le visible.

Analyse après transformation pour de nombreux composés non absorbant.

**Grande sensibilité** : Limites de détection entre  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$  M.

Bonne sélectivité.

**Bonne précision.**

**Facilité de mise en œuvre et possibilité d'automatisation.** <sup>[41]</sup>

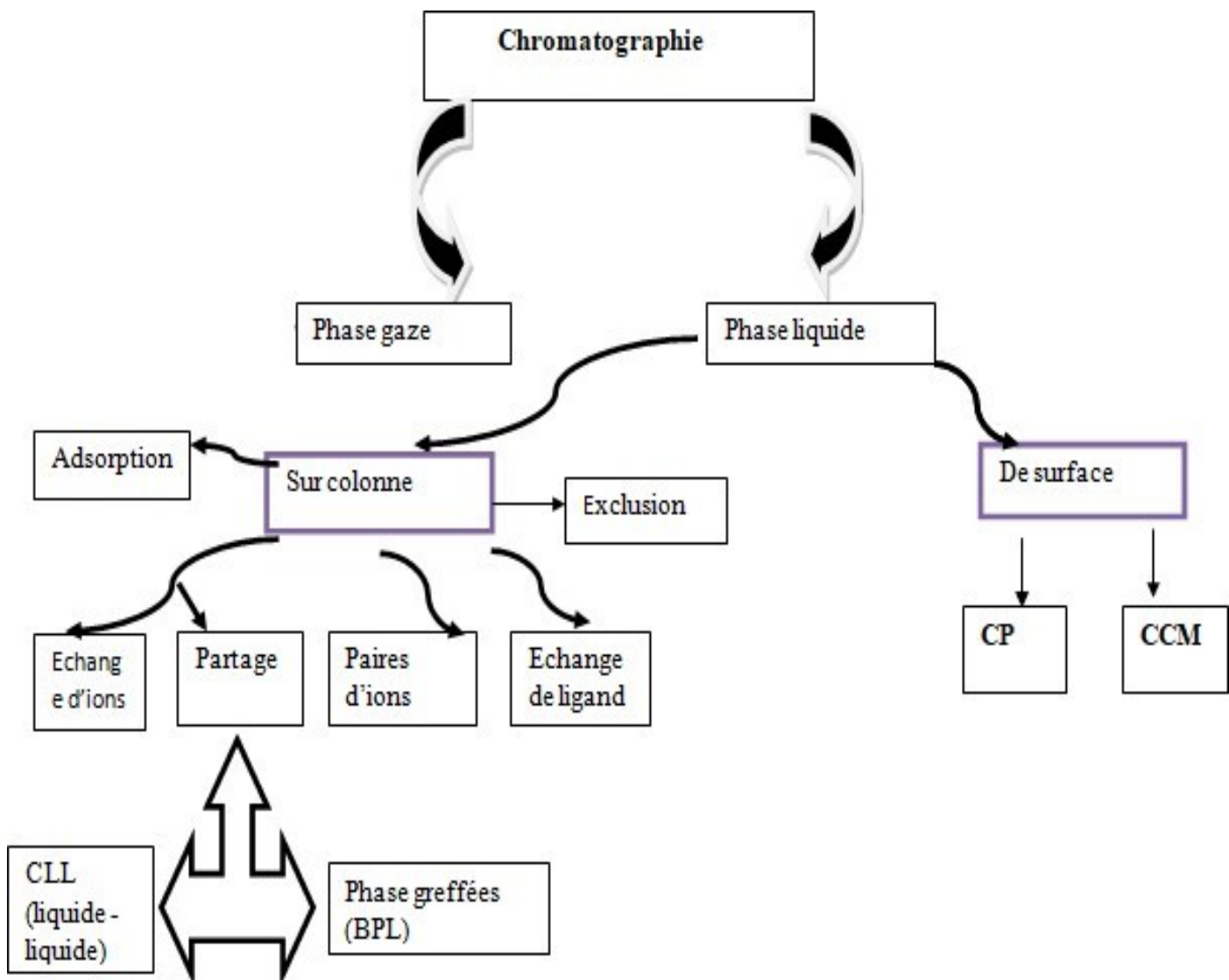
# **Chapitre III**

## **Chromatographie HPLC**

## 1. Généralités

La chromatographie est une technique analytique importante qui permet la séparation, identification des constituants d'un échantillon donné pour des fins qualitatives et/ou des analyses quantitatives [28], son principe est basé sur la différence d'affinité des constituants de l'échantillon vis-à-vis de la phase stationnaire et de la phase mobile.

Il existe plusieurs techniques Chromatographiques : [36]



## 2. Définition de la chromatographie HPLC

La Chromatographie liquide haute performance (HPLC : High performance liquid chromatography) <sup>[29]</sup> est une des techniques chromatographiques les plus récentes permettant la séparation, identification et de dosage des composés chimiques. <sup>[30][31]</sup> Elle est caractérisée par l'utilisation de divers phénomènes physiques : adsorption, partage, échange d'ions, exclusion diffusion. <sup>[32]</sup>

## 3. Principe de l'HPLC

La chromatographie HPLC est une technique de séparation sur colonne qui repose sur la distribution des espèces entre 2 phases non miscibles : une phase stationnaire contenue dans une colonne et une phase mobile liquide dont le flux traverse la totalité de la colonne <sup>[34]</sup>.

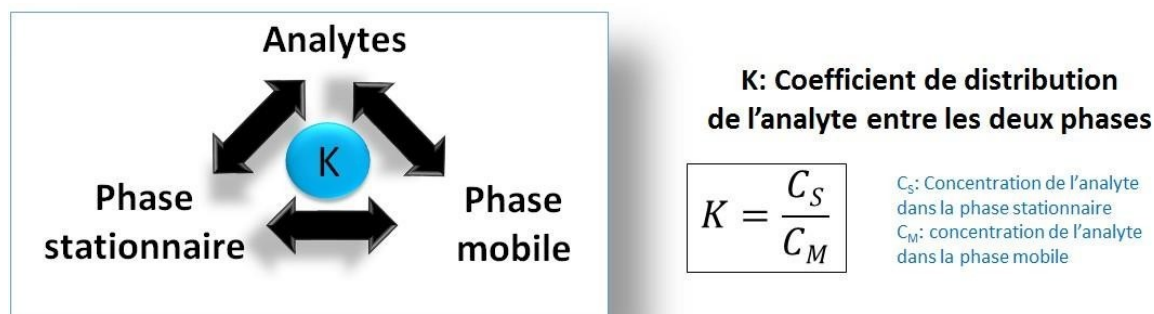


Figure 1 : Principe de la chromatographie sur colonne

## 4. Appareillage

Les principaux composants d'une chaîne HPLC sont :

### 4.1) Réservoir de la phase mobile (solvant) :

Est une bouteille en verre dans lequel plonge un tube avec une extrémité filtrante en téflon, il contient la phase mobile en quantité suffisante équipé de dispositif de barbotage d'azote ou d'agitation magnétique pour piéger les gaz dissout en particulier l'oxygène.

#### 4.2) La Pompe d'injection :

A pour rôle d'écouler la phase mobile à l'intérieur de la colonne en exerçant une haute pression, elle permet de travailler soit :

**En mode isocratique** : c'est-à-dire avec 100% de même éluant tout au long de l'analyse.

Ou bien en **mode gradient** : qui veut dire que la composition de la phase mobile change au cours de l'analyse. <sup>[33]</sup>

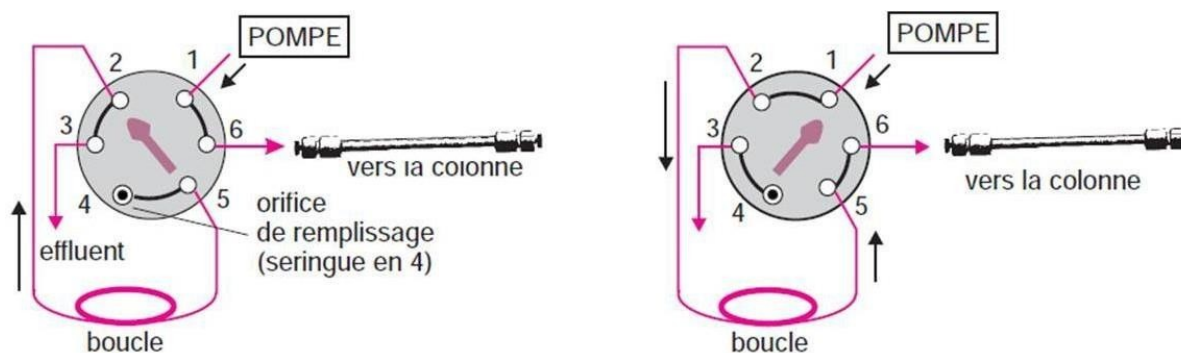
Cette pompe doit être très puissante car la viscosité des solvants et la granulométrie très fine des phases stationnaires entraînent des différences de pression ou des pertes de charges entre le sommet et l'extrémité des colonnes qui peuvent parfois être importantes (50 à 100 bars).

La pompe est munie d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant. <sup>[40]</sup>

#### 4.3) Injecteur

L'injection doit se faire en un temps très bref afin de ne pas perturber le régime d'écoulement dans la colonne et le détecteur.

L'injecteur le plus utilisé c'est la vanne à boucle externe qui permet d'avoir un volume constant, chose qui est très importante notamment en analyse quantitative. <sup>[31]</sup>



**Figure 2 : Vanne d'injection à six voies avec boucle d'échantillonnage à gauche :**

**Position remplissage de la boucle -A, droite : Position d'injection dans la colonne**

#### 4.4) Colonne

-Les colonnes en HPLC sont usuellement en acier inoxydable. [39]

-La plupart des colonnes ont une longueur de 10 à 30 cm et un diamètre intérieur de 4 à 10 $\mu$ m.

-Depuis peu, existent des micros colonnes à haute performance qui ont un diamètre de 1 à 4,6 mm et une longueur de 3 à 7,5 cm. Ces colonnes qui sont remplies de particules de 3 à 5 $\mu$ m. Présentent les avantages de la rapidité et d'une consommation minimale de solvant.

-Cette dernière propriété est d'une importance considérable car les solvants de haute pureté pour la HPLC sont très coûteux.

-La colonne est souvent précédée pour augmenter sa durée de vie, d'une pré-colonne dite colonne de garde, courte de 1 cm, qui retient les composés indésirables. On change périodiquement cette pré-colonne, bien qu'il soit par ailleurs conseillé de faire passer les échantillons avant analyse à travers un filtre de porosité inférieure à 0,5µm.

#### 4.5) Détecteur

En HPLC, il existe des détecteurs spécifiques de grande sensibilité. Dès lors, le dispositif utilisé dépend de la nature de l'échantillon.

##### ❖ Critères de choix du système de détection

- Fournir une réponse stable, rapide et reproductible.
- Garantir une bonne sensibilité de détection.
- Ne pas altérer la qualité de la séparation.
- Linéarité : réponse proportionnelle à la concentration à chaque instant.
- Minimiser le bruit de fond (réponse aléatoire de la ligne de base).
- Limite de détection faible compatible avec les résultats attendus.

##### ❖ Classification des détecteurs CLHP

###### ➤ Détecteurs universels

Intéressants dans le cas de mélange de composition inconnue.

Basés sur la mesure d'une propriété globale de l'effluent chromatographique.

Exemples :

- ✓ Réfractomètre différentiel.
- ✓ Détecteur évaporatif à diffusion de lumière.
- ✓ Spectromètre de masse

###### ➤ Détecteurs spécifiques

Avantageux pour doser des traces détectables parmi d'autres produits non détectables.

Basés sur les propriétés physico-chimiques particulières des analytes à doser.

Exemples :

- ✓ Spectrophotomètre UV-Visible.
- ✓ Spectrofluorimètre.
- ✓ Détecteurs électrochimiques (ampèremètre ; conductimètre, coulomètre) · [40]

#### 4.6) Enregistreur (intégrateur) :

Permet d'enregistrer et d'afficher les données sous forme d'un ensemble de pics qu'on appelle chromatogramme. [36]

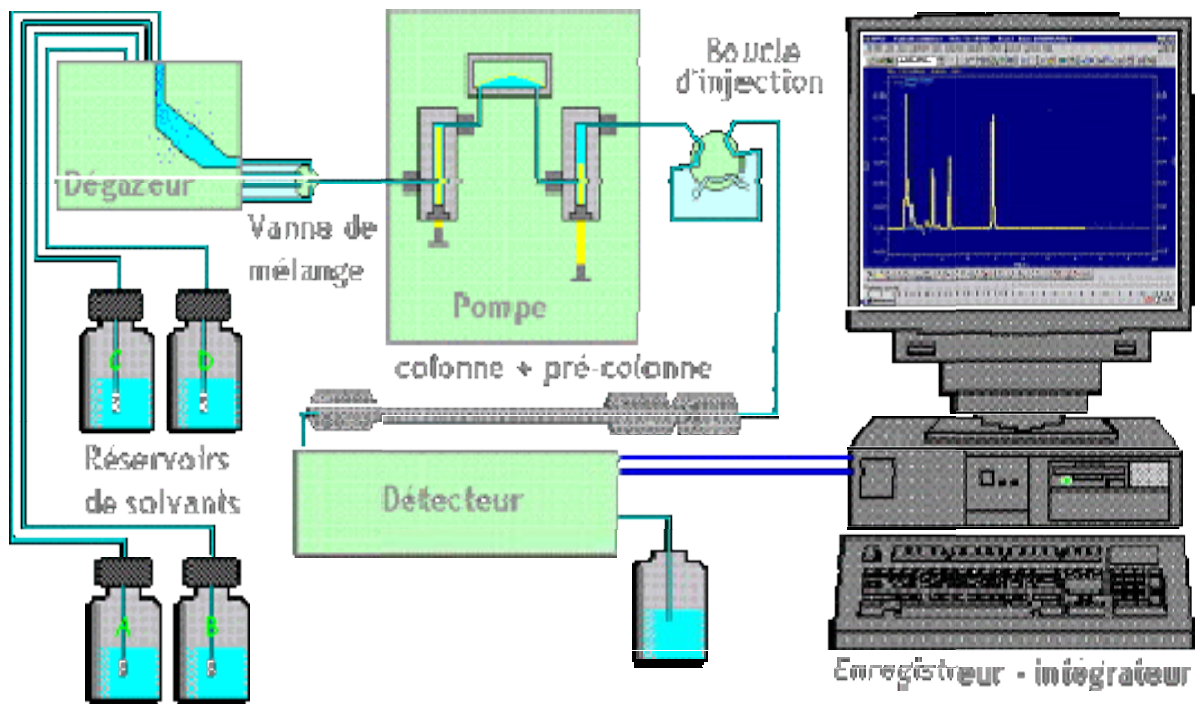


Figure 3 : appareillage HPLC

## 5) Analyse qualitative en HPLC :

Elle utilise un ensemble de paramètres

### 5.1) grandeurs de rétention.

- **Temps de rétention  $t_r$**  : temps écoulé entre l'injection et le sommet du pic.
- **Temps de rétention réduit (corrigé)** :  $t'_r = t_r - t_m$ .
- **Volume de rétention  $V_r$**  : le volume de la phase mobile nécessaire à entrainer le soluté jusqu'à la sortie de la colonne, sur le chromatogramme, il correspond au volume de la phase mobile qui s'est écoulé entre l'instant de l'injection et celui correspondant au sommet du pic.

Soit :

**D** le débit de la phase mobile d'où :  $V_r = t_r \times D$ .

Le volume de la phase mobile de la colonne (ou volume mort  $V_m$ ) peut être calculé sur le chromatogramme par introduction d'un composé non retenu par la phase stationnaire selon :

$$V_m = t_m \cdot D$$

Les volumes «  $V_r$  » et «  $V_m$  » sont reliés par une formule appelée Equation fondamentale de la chromatographie.  $V_r = V_m + K V_s$

$V_s$  : volume de la phase stationnaire.

**K** : coefficient de distribution du soluté entre la phase mobile et la phase stationnaire.

$$K = C_s / C$$

- **acteur de rétention (facteur de capacité).**

$$K' = Q_s / Q_m$$

Expression de «  $V_r$  » et  $t_r$  en fonction de «  $K'$  » : à partir de l'expression de  $k'$  :

$V_s = K' \cdot V_m / K_D$  En remplaçant  $V_s$  dans l'équation fondamentale:  $V_r = (1 + k') V_m$ .

De même :  $t_r = (1 + K') t_m$ .

Plus «  $K'$  » est grand, plus le composé est retenu longtemps dans la colonne et plus le pics' élargira).

### 5.2) L'Efficacité de la colonne

L'efficacité de la colonne est exprimée en nombre de plateaux théoriques, elle traduit la fitness des pics.

$$N = 16 \left( \frac{t_r}{w} \right)^2 = 5.54 \left( \frac{t_r}{\delta} \right)^2$$

$\delta$  : Largeur des pics à mi-hauteur ( $\delta = \sigma \sqrt{5.54}$ ).  
 $\sigma$  : L'écart type ( $\sigma = \frac{t_r^2}{N}$ ).  
 $W$  : largeur du pic à la base ( $w = 4\sigma$ ).

$L$ : la longueur de colonne

$N$  : nombre de plateaux théoriques.

Plus le nombre de plateau est élevé, plus la colonne est efficace.

### 5.3) Résolution

La résolution permet d'explorer l'aptitude du système chromatographique à séparer les constituants de l'échantillon en question, la résolution " $R_s$ " entre deux pics est définie par la relation suivante :

$$R_s = 2 \left( \frac{t_{r2} - t_{r1}}{w_2 + w_1} \right)$$

#### 5.4) Sélectivité

La sélectivité permet d'étudier la position entre deux pics adjacents, la sélectivité est exprimée par la grandeur  $\alpha$  qui est donné par la relation suivante.

$$\alpha = \frac{t'_{r2}}{t'_{r1}}$$

$T'r$  : le temps de rétention réduit qui correspond à la différence entre le temps de rétention du composé et le temps mort de la colonne. [37]

### 6. Analyse quantitative en HPLC

Pour un réglage donné de l'appareil, il y a une **relation linéaire** entre l'**aire** du pic (ou sa **hauteur**) et la **quantité du composé** responsable de ce pic dans l'échantillon injecté. [36]

$$m_i = K_i A_i$$

$m_i$  : masse du composé « i » injectée dans la colonne

$K_i$  : coefficient de réponse absolu du composé « i »

$A_i$  : aire du pic d'élution du composé « i »

Le coefficient absolu «  $K_i$  », dépend du réglage du chromatographe. Ce n'est pas un paramètre intrinsèque du composé.

En pratique, il existe cinq méthodes quantitatives en HPLC :

➤ **Etalonnage externe.**

La solution référence est de composition connue et la solution échantillon est de composition inconnue.

Pour la solution de référence on a :

$$c_e = A_e \times k \rightarrow k = \frac{c_e}{A_e}$$

Et pour la solution échantillon, on pourra déterminer la concentration de chaque un des constituants en appliquant la relation suivante :

$$C = k \times A \rightarrow C = \frac{c_e \cdot A}{A_e}$$

$K_i$  : coefficient de réponse.

$A_i$  : Air de pic.<sup>[38]</sup>

### 6.1) Etalonnage interne

Cette méthode consiste à déterminer le coefficient de réponse relatif  $K_i/K_e$  en introduisant un étalon interne à une certaine concentration  $C_E$  connue à la fois dans la solution échantillon et la solution étalon, cette méthode permet de pallier au problème de la non reproductibilité des volumes injectés.

#### a) Solution d'étalonnage

On a :

$$\begin{cases} m_1 = k_1 \cdot A_1 \\ m_2 = k_2 \cdot A_2 \\ m_E = k_E \cdot A_E \end{cases}$$

Et on a :

$$\begin{cases} \frac{m_1}{m_E} = \frac{K_1 A_1}{K_E A_E} \\ \frac{m_2}{m_E} = \frac{K_2 A_2}{K_E A_E} \end{cases}$$

Ces rapports permettent de calculer les coefficients de réponse relatifs de (1) et (2) vis-à-vis d

« *E* » choisi comme étalon, et désignés par  $K_{1/E}$  et  $K_{2/E}$

$$\left\{ \begin{array}{l} k_{1/E} = \frac{K_1}{K_E} = \frac{m_1 \times m_E}{m_E \times A_1} \\ k_{2/E} = \frac{K_2}{K_E} = \frac{m_2 \times m_E}{m_E \times A_1} \end{array} \right.$$

Comme les masses «  $m_i$  » réellement injectées sont proportionnelles aux concentrations

Massiques correspondantes «  $C_i$  »:  $(m_i = C_i \cdot V)$

On déduit les deux expressions :

$$\left\{ \begin{array}{l} k_{1/E} = \frac{C_1 \times A_E}{C_E \times A_1} \\ k_{2/E} = \frac{C_2 \times A_E}{C_E \times A_2} \end{array} \right.$$

**b) Solution échantillon**

La seconde étape de l'analyse consiste à chromatographier un volume quelconque d'une solution échantillon dans laquelle a été ajoutée une quantité connue de l'étalon « *E* ».

Soient  $A'_1, A'_2, A'_3$ , les aires du nouveau chromatogramme obtenu dans les mêmes conditions opératoires. Si  $m'_1, m'_2, m'_E$ , désignent les masses de 1, 2 et E réellement introduites dans la colonne, on aura :

$$\frac{m'_1}{m'_E} = K_{1/E} \frac{A'_1}{A'_E} \quad \text{et} \quad \frac{m'_2}{m'_E} = K_{2/E} \frac{A'_2}{A'_E}$$

A partir des coefficients relatifs calculés dans la première expérience (solution d'étalonnage) ainsi que de la concentration de l'étalon interne dans l'échantillon,  $C'_E$ , connue, on accède à :

$$C'_1 = C'_E K_{1/E} \frac{A'_1}{A'_E} \quad \text{et} \quad C'_2 = C'_E K_{2/E} \frac{A'_2}{A'_E}$$

En généralisant à n constituants, on peut calculer la concentration massique du soluté i au moyen de l'expression :

$$C'_1 = C'_E \times K_{1/E} \frac{A'_1}{A'_E} \quad \text{Et} \quad C'_2 = C'_E \times K_{2/E} \frac{A'_2}{A'_E}$$

### c) Caractéristiques d'un bon étalon interne.

Il doit être pur et ne pas se trouver initialement dans l'échantillon.

Son pic d'éluion doit être bien résolu par rapport à tous ceux qui forment le chromatogramme de l'échantillon.

Son temps de rétention doit être proche de celui (ou de ceux) du (ou des soluté(s) à doser.

Sa concentration doit être proche ou supérieure à celle des autres solutés pour être dans les conditions d'une réponse linéaire du détecteur.

Il doit être inerte vis-à-vis des composés de l'échantillon.

- **Etalonnage diffé**
- **Normalisation interne**
- **Méthode des ajouts dosés** <sup>[40]</sup>

## 7) Applications de l'HPLC

L'HPLC c'est une méthode de choix pour la séparation des substances peu volatiles, les analytes sensibles à la température « Thermolabile » ainsi les substances volatilisés.

Cette technique est très utilisée dans plusieurs domaines de sciences, en particulier :

### ❖ AGROALIMENTAIRE

- la détermination de la teneur en acides carboxyliques (acide lactique, acide tartrique, malique, succinique et citrique).
- l'analyse des résidus, des additifs ou des toxines.

-l'analyse des hydrates de carbone (sucre et amidon).

❖ **PHARMACIE**

-la recherche des impuretés dans les matières premières.

-l'analyse quantitative et l'identification du principe actif PA dans les formes pharmaceutiques.

-Les études de stabilité des matières premières et produits finis.

-Les études pharmacocinétiques et métaboliques des médicaments

❖ **MEDECINE**

Très utilisé dans les laboratoires de toxicologie et en médecine légale

❖ **BIOPHARMACIE**

Analyse des masses molaires de polypeptides, protéines nucléaires

# **Partie pratique**

# **Matériels et méthodes**

La partie pratique de ce travail est réalisé au sein du laboratoire chimie analytique de département de pharmacie de l'université mouloud Mammeri Tizi-Ouzou.

L'objectif de cette partie consiste à comparer les résultats du **dosage d'un principe actif** « **Paracétamol** » contenu dans un **produit fini** en formulation **comprimé** « **EXPANDOL 500mg** » en utilisant deux techniques d'analyse, à savoir la **chromatographie liquide haute performance** et la **spectrophotométrie UV/visible**.

## 1). Dosage du paracétamol par spectrophotomètre UV-visible.

### 1.1). Matériel.

#### 1.1.1). Verrerie.

La verrerie utilisée dans le dosage spectrophotométrique est énumérée ci-dessous.



**Tableau I: les verreries utilisées dans le dosage spectrophotométrie UV-Visible**

Verrerie	Usage
<b>Fioles (100, 1000 ml)</b>	Préparation des différentes Solution (échantillon et standard).
<b>Pipettes jaugées</b>	Prélever des volumes avec précision
<b>Mortier et pilon</b>	Broyage
<b>Eprouvettes</b>	Mesurer des volumes
<b>Béchers</b>	Prélever des quantités de solvants à partir des flacons commerciaux
<b>Entonnoir</b>	Verser sans projections
<b>Autre : papier filtre</b>	Filtration

### 1.1.2) Réactifs

Les réactifs utilisés dans le dosage spectrophotométrique sont classés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau II : réactif et métiers premier utilisés dans le dosages pectrophotométrique**

Réactifs	Usage
<b>NaOH</b>	Diluant
<b>Paracétamol standard</b>	Substance de référence utilisée pour établir la Gamme d'étalonnage
<b>L'eau distillée</b>	Préparation du diluant et rinçage du Matériel
<b>Expandol</b>	Matrice d'étude

### 1.1.3) Appareillage

Les équipements utilisés au cours du dosage spectrophotométrique sont

↗ **Tableau III : L'appareillage utilisé dans le dosage spectrophotométrique**

Equipement	Référence	Usage
<b>Balance analytique</b>	KERN ALT 220-5DAM	Peser avec précision de l'ordre de $10^{-6}$
<b>Bain ultrasons</b>	Advantage- Lab AL 04-06	Dissoudre et Homogénéiser
<b>Spectrophotomètre UV-Visible</b>	Perkin Elmer lambda 25	Mesure l'absorbance



**Figure 1 : Spectrophotomètre UV-Visible relié un ordinateur pour le traitement des données**



**Figure 2 : Bain ultrasons**



**Figure 3 : Balance analytique**

## **1.2. Méthode**

### **1.2.1. Contrôle organoleptique.**

Contrôle organoleptique c'est un contrôle visuel consiste à apprécier la forme, couleur, aspect et l'odeur.

### **1.2.2. Uniformité de masse.**

Peser individuellement 20 comprimés du produit fini puis calculer leur masse moyenne.

Sur les 20 unités pesées 2 peuvent s'écarter de 5% de la masse moyenne mais aucun ne doit s'écarter de 10% (normes pharmacopée Européenne 8 Edition).



Figure 4 : Comprimés Expandol 500mg

### 1.1.3. Préparation des solutions.

#### Préparation du diluant : (solution de NaOH).

Dans une fiole de 1000 ml, peser exactement 4.0g de NaOH, dissoudre dans un volume suffisant d'eau en mettant la fiole dans le bain à ultrasons puis compléter au trait de jauge avec le même solvant (eau).



Figure 5 : Fiole contenant le diluant (NaOH)

- Préparation de la gamme d'étalonnage.
- ❖ Solution standard du paracétamol à 100% (masse/volume) :

Dans une fiole de 100 ml, peser 100 mg de paracétamol standard, dissoudre avec un volume suffisant de NaOH 0.1 M et compléter au trait de jauge avec le même milieu puis faire une dilution 2/100 dans la soude 0.1M (diluant préparé précédemment).

Une gamme de solutions standards est préparée en suivant les mêmes étapes que la solution Standard 100% conformément au tableau ci-dessous.

↗ **Tableau IV : Gamme d'étalonnage**

Solution	% de Concentration (masse/volume)	Prise d'essai du paracétamol en mg	Suivre les mêmes étapes que la préparation de la solution standard 100%	Concentration en mg/ml
1	80,0 %	80,0		0,016
2	90,0 %	90,0		0,018
3	100,0 %	100,0		0,02
4	110,0 %	110,0		0,022
5	120,0 %	120,0		0,024

#### Préparation de la Solution échantillon.

Broyer les 20 comprimés utilisés dans le test poids moyenne et uniformité de mass. Dans une fiole de 100 ml, peser une quantité de la poudre équivalente à 100 mg du paracétamol, ajouter 80 ml de *NaOH* 0,1 M et agiter pendant 5 minutes, compléter au trait de jauge avec la soude 0,1 M.

Filtrer environ 15 ml de cette solution à travers un papier filtre (ou un filtre seringue), éliminer les 5 premières ml. Sur le filtrat obtenu faire une dilution 2/100 dans la *NaOH* 0,1 M

#### Conditions analytiques

- ✓ Longueur d'onde d'absorption = 298 nm
- ✓ Longueur de trajet optique ; cuve en quarts de 1 cm d

## 2) Dosage du paracétamol dans les comprimés par chromatographie liquide haute performance (HPLC).

### 2.1. Matériel

#### 2.1.1. Verrerie

La verrerie utilisée au cours du dosage chromatographique est décrite ci-dessous.

↗ **Tableau V : Verreries utilisées dans le dosage chromatographique**

Verreries	Usage
<b>Fioles (25, 50, 100,1000 ml)</b>	Préparation des différentes solutions et dilutions
<b>Pipettes jaugés et pro pipettes</b>	Prélever des volumes avec précision
<b>Mortier et pilon</b>	Broyage des comprimés d'EXPANDOL
<b>Eprouvette</b>	Mesure des différents volumes
<b>Becher</b>	Prélever des quantités de solvants à partir de flacons commerciaux
<b>Entonnoir</b>	Versement sans projections
<b>Tubes à essais</b>	Centrifugation
<b>Vials</b>	Outil servant à contenir les solutions en vue d'une analyse par HPLC

## 2.1.2. Réactifs.

Les réactifs utilisés dans le dosage chromatographique sont cités dans le tableau ci-dessous

↗ **Tableau VI : Les réactifs utilisés dans le dosage chromatographique**

Réactifs	Usage
NaOH	Diluant
Paracétamol standards	Etalonnage
Paracétamol Expandol	Echantillonnage
Tétrabutylammonium hydroxide méthanolique	Solvant polaire de la phase mobile
Potassium monobasique (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Préparation du tampon de la phase mobile
Potassium dibasique (HK <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Préparation du tampon de la phase mobile

### 2.1.3. Appareillage

Les équipements utilisés au cours du dosage chromatographique sont énumérés ci-dessous.

**Tableau VII : Appareillage utilisés dans le dosage chromatographique**

Equipement	Référence	Usage
BALANCE ANALYTIQ	KERN ALT 220- 5DAM	Peser
<b>Bain ultrason</b>	Advantage -Lab. AL 04-06	Homogénéiser et dissoudre
<b>Centrifuge</b>	<b>ZENTRIF UGEN EBA 20</b>	Séparation sous l'effet d'une force centrifuge
<b>Buchner</b>	<b>4465/02/F M/08</b>	Filtration de laphase Mobile
<b>HPLC</b>	<b>SHIMADZU</b>	Dosage de Paracétamol



**Figure 6 : Centrifugeuse**



**Figure 7 : Buchner**



**Figure 8 : Différents composants d'un appareil HPLC relié à un ordinateur pour le traitement des données**

## **2.2. Méthode**

### **2.2.1 Préparation des solutions**

#### **❖ Préparation du diluant : solution NaOH 0.1M**

Dans une fiole de 1000 ml, peser exactement 4.0g de NaOH, dissoudre dans un volume suffisant d'eau en introduisant la fiole dans le bain à ultrasons puis compléter au trait de jauge avec le même solvant.



**Figure 9 : Fiole contenant le diluant (solution de NaOH 0.1 M)**

❖ **Préparation de la solution standard de paracétamol 0.05 mg/ml.**

Dans une fiole de 50 ml, peser 50 mg de paracétamol standard, dissoudre avec un volume suffisant de *NaOH* 0.1M et compléter au trait de jauge avec le même milieu .faire une dilution 5/100 dans la soude 0.1M.

❖ **Préparation de la solution échantillon.**

-Peser 5 comprimés de paracétamol et déterminer leur poids moyenne.

-Broyer finement ces comprimés dans un mortier et peser environ 275 mg de la poudre dans une fiole de 50 ml.

-Ajouter environ 30 ml du diluant et agiter manuellement pendant 30 secondes, puis mettre aux ultrasons pendant 5 minutes.

-Compléter au trait de jauge avec le diluant puis agiter à nouveau par retournement.



**Figure 10 : Broyage des comprimés de paracétamol par le biais d'un mortier et un pilon**

-Centrifuger environ 10 ml de cette solution à 4000 tours/ minute pendant 5 minutes puis effectuer une double dilution 5 dans 25 puis 5 dans 100.



**Figure 11 : Centrifugation de la solution échantillon à 4000 tours/minute pendant 10minutes**

✂ Remarque

Lors de la centrifugation, il convient d'équilibrer le tube contenant la solution échantillon (SE) par un tube contenant le même volume en diluant (NaOH 0.1M).



**Figure 12 : Le diluant et la solution échantillon après centrifugation (séparation culot/surnageant dans la SE)**

❖ **Préparation de la phase mobile.**

La Phase mobile est composée de : 250 ml de tetrabutylammonium hydroxyde méthanolique – 375 ml de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.05 M – 375 ml de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.05 M

- **Préparation de la solution du tetrabutylammonium hydroxyde méthanolique.**

Dans une fiole de 500 ml peser 2.3g de tetrabutylammonium hydroxyde méthanolique, dissoudre dans un volume suffisamment d'eau et compléter avec le même solvant jusqu'à trait de jauge.

- **Préparation du tampon ( $K_2HPO_4/ KH_2PO_4$ ).**

- **Préparation de la solution de phosphate mono potassique ( $KH_2PO_4$ )  $C=0.05M$ .**

Calcul de la masse de ( $KH_2PO_4$ ) nécessaire à être utilisée pour préparer un volume de 500 ml

$$C = \frac{m}{M \cdot v} \rightarrow m = 3.40g$$

Avec :

$$v = 500ml$$

$M=136gr/mol$  (la masse molaire du  $KH_2PO_4$ ).

Dans une fiole de 500 ml peser 3.4 g de potassium monobasique dissoudre dans un volume suffisamment d'eau et compléter au trait de jauge avec le même solvant.

- **Préparation de la solution de phosphate dipotassique ( $K_2HPO_4$ )  $C=0.05M$ .**

Calcul de la masse de ( $K_2HPO_4$ ) nécessaire à être utilisée pour préparer un volume de 500 ml

$$C = \frac{m}{M \cdot v} \rightarrow m = 4.35g$$

Avec :

$$v = 500ml$$

$M=174gr/mol$  (la masse molaire du  $K_2HPO_4$ ).

Dans une fiole de 500 ml peser 4.35 g de phosphate dipotassique, dissoudre dans un volume suffisamment d'eau et compléter au trait de jauge avec le même solvant.

- **La phase mobile est préparée en introduisant dans une fiole de 2000ml :**

-250 ml de la solution tetrabutylammonium hydroxyde méthanolique.

-375 ml de la solution de phosphate monopotassique  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

-375 ml de la solution de phosphate dipotassique  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .

Bien mélanger afin d'assurer l'homogénéité de la solution.

### 3. Conditions chromatographiques.

- La Phase mobile : 250 ml de tetrabutylammonium hydroxyde méthanolique à 4.6 g/l – 375 ml de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.05 M – 375 ml de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.05 M
- Colonne : C18.150× 4.6, diamètre des particules 5  $\mu\text{m}$ .
- Détection d'injection : UV à 245 nm
- Volume d'injection 20  $\mu\text{l}$
- Température ambiante.

### 4. Séquence analytique

Injecter la solution standard 6 fois .soit  $A_{\text{standard}}$  la moyenne des aires des pics du paracétamol .le système n'est conforme que si le coefficient de variation des aires des pic paracétamol des chromatogrammes obtenus à partir de la solution standard est inférieure ou égale à 2.0 %.

Injecter la solution échantillon et noter l'aire du pic de paracétamol  $A_{\text{ech}}$ .

# **Résultats et discussions**

## 1) Résultats

### 1.1. Dosage du paracétamol par spectrophotomètre UV-visible.

#### 1.1.1. Contrôle des caractères organoleptiques.

Les caractères organoleptiques considérés étaient la forme, l'odeur, aspect, couleur, les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

↗ **Tableau I : Les caractères organoleptiques des comprimés d'Expandol 500 mg**

Comprimés	Caractère
Forme	Ronds
Couleur	Blanc
Odeur	Inodores
Aspect	Sécables. non enrobés

### 1.1.2. Uniformité de masse

La masse des 20 Comprimés sont présentés dans le tableau suivant.

↗ **Tableau II : Les masses individuelles des comprimés pesés d'Expandol 500 mg**

CP	Masse (mg)	CP	Masse (mg)
1	586.8	11	569.7
2	570.4	12	585.5
3	575.9	13	581.3
4	568.2	14	587.5
5	568.5	15	577.7
6	570	16	578.6
7	582.4	17	583.9
8	565.1	18	571.1
9	585	19	584
10	575.9	20	584.4
<b>Masse Maximum</b>	<b>587.500mg</b>		
<b>Masse minimum</b>	<b>565.100mg</b>		
<b>Masse moyenne</b>	<b>577.595mg</b>		

### 1.1.3. Dosage spectrophotométrique proprement dit.

#### ❖ Établissement de la droite d'étalonnage

Le tableau ci-dessous présente les absorbances des solutions standards aux différentes concentrations décrites précédemment (chapitre IV).

↗ **Tableau III : les absorbances des solutions standards**

Solution	Prise d'essai du paracétamol en mg	Concentration s(mg/ml)	Absorbance des solutions standards			moyenne (yi)
			lecteur 1	lecteur 2	lecteur 3	
1	80	0,016	0,289	0,29	0,288	0,289
2	90	0,018	0,353	0,35	0,35	0,351
3	100	0,02	0,431	0,43	0,43	0,430
4	110	0,022	0,475	0,48	0,478	0,478
5	120	0,024	0,533	0,531	0,531	0,532

#### ❖ Calcule des paramètres de la droite d'étalonnage : a, b et R2.

La droite d'étalonnage a une équation de la forme :  **$y = ax + b$** .

Solution	$x_i$ [C] en mg/ml	$Y_i$ (A)	$(x_i - x')$	$(x_i - x')^2$	$(y_i - y')$	$(y_i - y')^2$	$(x_i - x')(y_i - y')$
1	0.016	0.289	-0.004	0.000016	-0.127	0.016129	0.000508
2	0.018	0.351	-0.002	0.000004	-0.065	0.004225	0.00013
3	0.02	0.430	0	0	0.014	0.000196	0
4	0.022	0.478	0.002	0.000004	0.062	0.003844	0.000124
5	0.024	0.532	0.004	0.000016	0.116	0.013456	0.00046
	Moyenne $x'$ = 0.02	Moyenne $y'$ = 0.416	---	$\sum = 4.10^{-5}$	---	$\sum = 0.0378$	$\sum = 0.00122$

✂ Calcule de la pente a.

✓ Formule de calcul

$$a = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x'_i)(y_i - y'_i)}{\sum_{i=1}^n (x_i - x'_i)^2} = 30.5$$

✂ calcule de l'ordonnée à l'origine b

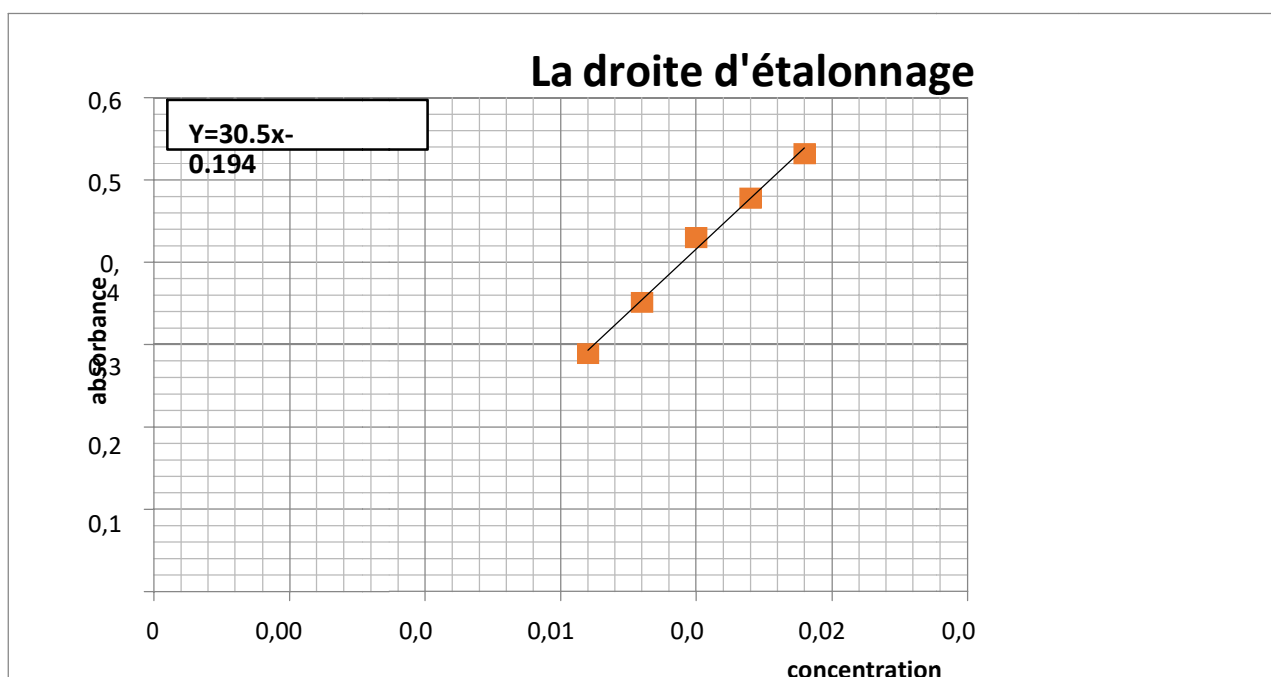
✓ Formule de calcul

$$b = y' - ax' \rightarrow b = -0.194$$

Calcul de coefficient de corrélation R<sup>2</sup>

✓ Formule de calcul

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^{i=n} (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^{i=n} (y_i - \bar{y})^2}} = 0.99$$



Le droit d'absorbance en fonction de concentration

L'absorbance mesurée de notre solution échantillon est de ( $A=0.43$ )

A partir de la courbe la concentration de l'échantillon : ( $C_{\text{échantillon}}=0.0208 \text{ mg/ml}$ ).

✂ **Calcul de la teneur en paracétamol dans les comprimés (Expandol).**

À partir de la loi de dilution :

$$C_{\text{mère}} = c_{\text{filie}} \times 50 = \frac{m}{v} \rightarrow m = c_{\text{mère}} \times v = c_{\text{filie}} \times 50 \times 100$$

$$m = 0.0208 \times 50 \times 100 = 104 \text{ mg}$$

$m \Rightarrow \text{PE}=115.5 \text{ mg}$

$T \Rightarrow m_{\text{moy}}=577.595$

$T=104 \times \frac{577.595}{115.5} = 520 \text{ mg/cp}$
--

## 1.2. Dosage du paracétamol par chromatographie liquide haute performance(HPLC).

La masse moyenne des comprimés : 572 mg.

$$A_{\text{std moy}} = 3582317.667$$

$$A_{\text{ech}} = 3417862$$

$$PE_{\text{ech}} = 275.59 \text{ mg}$$

$$PE_{\text{std}} = 49.95 \text{ mg}$$

### ➤ Conformité du système

$$A_{\text{std moy}} = \sum_{std}^n \frac{A_i}{n}$$

**Tableau I: Les aires des pics des six injections de la solution standard**

Injection	Aires des pics
1	3580723
2	3578082
3	3586083
4	3579587
5	3584049
6	3585370
$A_{std}$	3582315.667
Ecart type	3300
Coefficient de variation	0.092

Le système conforme car le coefficient de variation = 0.092 < 2%

➤ **Démonstration de la formule et calcul de la teneur en paracétamol dans les comprimés d'Expandol.**

On appliquant le principe de l'étalonnage externe on a :

$$m_{\text{échantillon}} = c_{\text{ech}} \times v_{\text{ech}} = A_{\text{ech}} \times k$$

$$m_{\text{std}} = c_{\text{std}} \times v_{\text{std}} = A_{\text{std}} \times k$$

$$\frac{c_{\text{ech}}}{c_{\text{std}}} = \frac{A_{\text{ech}}}{A_{\text{std}}} \Rightarrow C_{\text{ech}} = C_{\text{std}} \frac{A_{\text{ech}}}{A_{\text{std}}}$$

$$\left. \begin{array}{l} C_{\text{ech}} = \frac{m_{\text{PA}}}{v_{\text{ech}}} \times f_{\text{ech}} \\ C_{\text{std}} = \frac{PE_{\text{std}}}{v_{\text{std}}} \times f_{\text{std}} \end{array} \right\} C_{\text{ech}} = \frac{m_{\text{pa}}}{v_{\text{ech}}} \times f_{\text{ech}} = \frac{PE_{\text{std}}}{v_{\text{std}}} \times f_{\text{std}} \times \frac{A_{\text{ech}}}{A_{\text{STD}}}$$

$$m_{\text{PA}} = \frac{1}{f_{\text{ech}}} \times v_{\text{ech}} \times \frac{PE_{\text{std}}}{v_{\text{std}}} \times f_{\text{std}} \times \frac{A_{\text{ech}}}{A_{\text{STD}}}$$

$$m_{\text{PA}} = \frac{49.95}{50} \times \frac{5}{100} \times 100 \times 50 \times \frac{3417862}{3582315.667}$$

$$m_{\text{PA}} = 238.28 \text{ mg}$$

## 2. Discussions

### 2.1. Contrôle des caractères organoleptiques.

Au cours de notre examination aux comprimés d'EXPANDOL 500mg , nous avons constaté qu'aucun comprimé ne présente des signes d'altération organoleptique. Ce qui nous mène supposé que la teneur en paracétamol dans ces comprimés sera conforme à ce qui est déclaré (500mg)

### 2.2. Uniformité de masse.

La masse moyenne des 20 comprimés pesés d'Expandol 500mg est de 577.595 mg. En se référant aux normes de la pharmacopée européenne 8<sup>ème</sup> édition, l'essai de L'uniformité de masse est satisfait si il y au plus deux comprimés qui s'écartent de 5% la masse moyenne et qu'aucun ne s'écarte de 10%.

Calculer l'intervalle de conformité de masse On a

Masse moyenne  $\longrightarrow$  100%  
 $x$   $\longrightarrow$  5%

$$x = \frac{577.595 \times 5}{100} = 28.88 \text{ mg}$$

Pour vérifier la conformité de l'essai, nous avons comparé les résultats de masse individuelle de chaque comprimé aux normes du tableau suivant :

📄 **Tableau V : Les intervalles de conformité de masse des comprimés d'Expandol 500 mg**

Normes	5%	10%
Masse	577.595±28.88	577.595±57.759

On constate que :

- ✓ Aucun comprimé ne s'écarte de 5% de la masse moyenne
- ✓ Aucun comprimé ne s'écarte de 10%

Donc :

les comprimés d'Expandol 500mg satisfaits à l'essai d'uniformité de masse

### 2.3. Dosage du paracétamol dans les comprimés d'EXPANDOL par spectrophotomètre UV-visible

La mise en œuvre de la spectrophotométrie UV-visible a permis la détermination de la teneur en paracétamol dans les comprimés d'Expandol 500 mg, et la pharmacopée européenne.8ème édition a donné des normes par rapport à la valeur déclarée par le fabricant afin de juger la conformité des comprimés en matières de teneur en paracétamol.

A partir de ces données-là, on compare les résultats obtenus au cours de notre dosage avec ceux déclaré par le fabricant.

☞ calcule l'intervalle de conformité

$$\begin{array}{l} \text{Masse de comprimés} \quad \rightleftharpoons \quad 100\% \\ x \quad \quad \quad \quad \quad \quad \rightleftharpoons \quad 5\% \end{array}$$

$$x = 500 \times \frac{5}{100} = 25\text{mg}$$

**Tableau VI : les intervalles de conformité de la teneur en paracétamol des comprimés d'Expandol 500 mg**

Normes	(500-25)mg	(500+25)mg
Teneur	475	525

L'étude à montrer que la teneur de l'Expandol par spectrophotométrie UV-visible correspond à 520 mg/Cp.

Par références aux normes mentionnées dans le tableau ci-dessus, il en résulte que la teneur en Paracétamol dans les comprimés d'EXPANDOL 500mg est jugée conforme.

#### **2.4. Dosage du paracétamol dans les comprimés d'EXPANDOL par HPLC**

La mise en œuvre de l'analyse HPLC pour le dosage du paracétamol dans les comprimés d'Expandol 500mg nous a permis la détermination de leurs teneur en principe actif (paracétamol) qui de 494.56 mg

En suivant le même raisonnement que celui mener en UV et en comparant cette valeur à l'intervalle de conformité [475-525], Les comprimés d'EXPANDOL 500mg ont été jugés conforme en matières de teneur en paracétamol.

#### **3. Comparaison entre les deux techniques (HPLC et UV) en matière de dosage du paracétamol dans les comprimés d'EXPANDOL 500mg.**

D'après les résultats obtenus avec les deux techniques, nous avons constaté que les deux techniques ont donné des valeurs conformes aux normes de la pharmacopée européenne 8<sup>ème</sup> édition.

La teneur obtenue suite à l'analyse par HPLC est plus proche à la valeur théorique cible (500mg).

A partir de là on pourra dire qu'en matières du dosage du paracétamol dans la forme sèche (comprimés), la technique HPLC est la plus adaptée avec une meilleure exactitude

La mise en œuvre de l'analyse HPLC pour le dosage du paracétamol de comprimés d'Expandol 500mg nous a permis la détermination de leurs teneur principe actif (paracétamol) qui de 494.56 mg

# Conclusion

Le paracétamol ou l'acétaminophène est la substance active qui entre dans la composition de nombreuses spécialités médicamenteuses présentées sous différentes formes et conditionnement, vendu en libre-service, il est utilisé soit seul ou en association avec d'autres médicaments.

Le paracétamol, appartenant à la classe des analgésiques non salicylés ayant des propriétés antalgique, antipyrétique et anti-inflammatoire, est indiqué dans les états de fièvre ainsi que les douleurs d'intensités moyennes à forte.

La détermination de la teneur en paracétamol dans les comprimés d'EXPANDOL 500mg (forme sèche) par la méthode spectrophotométrique UV-Vis et par l'HPLC a fait l'objet de notre étude.

L'étude comparative du dosage de paracétamol par les deux méthodes analytiques citées avant, n'a révélé aucune non-conformité. Toutefois, la comparaison statistique reste toujours nécessaire pour mettre un appui sur l'exactitude des résultats obtenus.

D'autre part, le dosage par la méthode spectrophotométrique UV-Vis est plus simple, rapide et moins coûteux par rapport à la méthode chromatographique (HPLC) ; même si cette dernière reste la méthode de référence pour sa spécificité, sa sensibilité et sa fiabilité et l'exactitude de ses résultats.

En conséquence, la méthode chromatographique HPLC est préférée pour une meilleure précision des résultats dans une formulation sèche, mais cela n'exclut pas l'utilisation de la méthode spectrophotométrique (UV/Visible) en cas d'une cadence de travail, ou pour des raisons économiques (coût et temps d'analyse) ou d'une éventuelle panne de l'équipement.

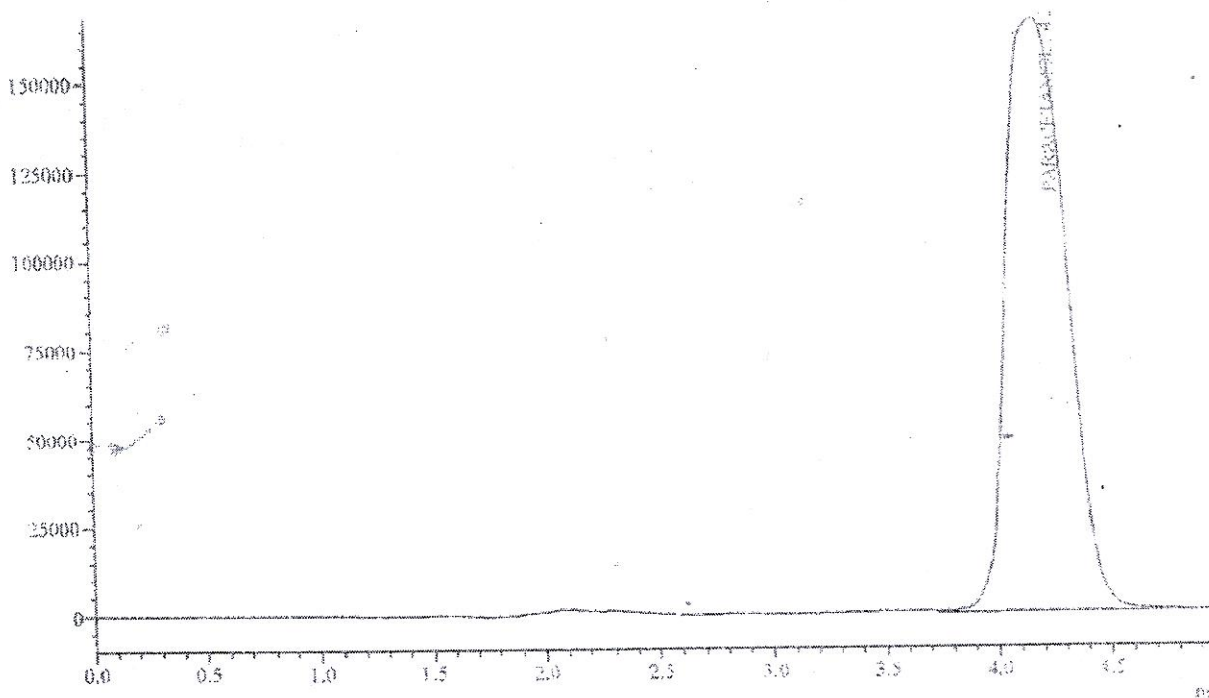
# **Références bibliographiques**

- [1] : C.Marec.2005. « Histoire de paracétamol ». Le praticien en anesthésie réanimation.vol 9.4.page 321.
- [2] : DRIAD.2009. « Stabilité de paracétamol application à un sachet produit en industrie pharmaceutique (thèse doctorat).NANCY université Henneri Poincare. Faculté de pharmacie.
- [3] : B. Pierre Yves Tromblay. Toxicologie clinique. « Historique de l'acétaminophène » .INSPQ-Institut national de santé publique du Québec.
- [4] : J. Laëtitia.2014. « Toxicité de paracétamol ». Résultat d'une étude multicentrique relative aux intoxications volontaires au paracétamol dans les SAU. Adultes Français (thèse pour diplôme d'état docteur en pharmacie). Université ANGERS.
- [5] : Pharmacopée européenne 6<sup>ème</sup> édition .janvier 2008.
- [6] : M.Vaubourdolle.2007. « Médicaments ».3ème édition .Walters Kluwer France. Le moniteur. ISBN: 978-2-915585-41-4.
- [7] : [http:// Santé. Le figaro.fr /santé/traitement/analgesique-paracetamol/ définition.](http://Santé.Lefigaro.fr/santé/traitement/analgesique-paracetamol/definition)
- [8] : pharmacopée .européenne. Édition 7.
- [9] : Nicouladfrant.1997.Aspirine-paracétamol des Faus jumeaux ? (thèse doctorat). faculté de pharmacie limoges.
- [10] : pharmacopée. Européenne. Edition 6.
- [11] : O. Allo.2013. « La préparation en un tour de main ». 9<sup>ème</sup> éd.Walters Kluwer.France.ISBN:978-2-36292-014-1.
- [12]: Dr.S.Sebbah.A.Leghemzi.F.El-Moffock.2014.Magazine "SAIDAL SANTE" .n° 20. Alger. Groupe Saidal .ISSN:2170-080X.
- [13]: D.Barriere.C.Mallet.A.Eschalier. « Le paracétamol de nouvelle cible pour un vieux médicament ».L'institut UPSA de douleur. La lettre .n°33.page 3.
- [14]: H.Raybaud.Fièvre de l'enfant et de nourrisson.www.esculape.com
- [15]: F.Veykmans.2014.posologie de paracétamol IV chez le nouveau née et les nourrissons de moins de 10 kg-archive pédiatrie.vol 21.9.page 932-933.
- [16]:H.Lullman.K.Mohr.L.Hein.2010. « Atlas de poche de pharmacologie ».4 ème édition. Lavoisier Paris. Agnès Aubert. ISBN :978-2-257-00069-9.
- [17] :F.Viguiet. C.Rossle.L.Zerhouni.A.Rouleau.C.Bennel.2016. « Impact de pharmaciens clinicien à l'hôpital pour prévenir les posologies. « Supra thérapeutique du paracétamol ».annale pharmaceutique Française. vol 74.6.page 482-488.
- [18] : B.Taieb.2017.ETUDE CONFORMATIONNEL D'acétaminophène. Structure et stabilité. Page 22.
- [19] : J.N.Dangoumau,Moore,M.Molimard et all .2006.PHARMACOLOGIE GÉNÉRALE. Département de pharmacologie. Unniversité.Segalen bordeaux.2.page324-326.

- [20]: I. Saad AL bachir.PH.Hantson.2018. Le paracétamol à dose thérapeutique: quelle population à risque d'hépatotoxicité ? .toxicologie analytique et clinique. Vol 30.page 19-34.
- [21] : N.Lerolle.J.Demiselle.A.Mercat.2017.petit manuel du service en médecine intensive réanimation : 80 procédures en poche. France. Elsevier Masson. ISBN : 978-2-294-75365-7.
- [22] : G.Chevrel, V. Dessus.2009.paracétamol : analgésique périphérique-paralgalan-nourrissons et enfants -300 médicaments injectables. Page 22-23.
- [23] G.L.Burgot, G.L.Burgot.2017.chimie analytique .paris .
- [24] G-L-Migot .2014.chimie organique analytique, Hermann, ISBN : 9782-705688660
- [25] Dr.Bowining.1974.méthode spectroscopie 4èd .France .Masson et Cie
- [26] P. Rouessac .A Rouessac .2014.analyse chimique (méthode et technique instrumentale .7 éd .France
- [27] S.Hocine.2017.méthode d'analyse spectroscopique chimie organique .Alger. ISBN9789961-0-1995-5.
- [28] M<sup>elle</sup> Alexandra CAMUT .2009.misse en place de contrôle.
- [29] : O-Coskum, 2016, « Technique de séparation », Nord clin Istanbul, 3(2).
- [30] : A-Ladram,G-Camus, « la chromatographie », publié 15.05.12
- [31] : G-Burgot, J-L-Burgot, 2017, « Chimie analytique », Lavoisier TEC et DOC .Paris
- [32] : G-Chevalier, P-rohrbag, C-Bollet, M-Cauch, « identification et dosage des impuretés du binorilate par HPLC, journal of chromatography, 138(1), page 133-201.
- [33] : G-Mahuzier, M-Hamon, « abrégé de la chimie analytique »-méthodes de séparation-, 2 ème édition, Masson, Paris, ISBN : 2-225-806802.
- [34] : Anonyme. HPLC principe et appareillage .biochimie moléculaire.20 juin 2016.
- [35]: Haider obayes Hachim, 2018, « chromatography and HPLC principles, 1-9.
- [36] : mendhem, Denney, Barnes, Thomas, 2006, analyse chimique quantitative de Vogel, 6<sup>ème</sup> édition, Paris, ISBN : 978-2-8041-4799-0.
- [37] : R. Rosset, M. Caude .2 ème édition .manuel pratique de chromatographie en phase liquide .Masson .ISBN 2-225-85126-3.
- [38]: A.Rouessac, F.Rouessac, 2004. 6 Ed. Analyse chimique (méthodes et technique instrumentales modernes). Masson. Paris. ISBN:2-100-48425-7.
- [39]: M. Hourk, Phd. Frsc, A.Jay, Siegel. 3 ème Edition .2015. Separation of forensic science .page 121-151
- [40] C. Mahuzier,M.Hamon,D.ferrier ,p. prognon . Abrégé de chimie analytique.Tome 2-méthodes de séparation. Masson 3 éd. 1999.
- [41] .f. rouessac .A.Rouessac, D. Cruché.2001.Masson 2 éd . analyse chimique .Méthode et technique instrumentales modernes
- [42] A. Eloi.2012.introduction à la spectroscopie UV-visible, culture science chimie, E N S éducol. Paris.

# **ANNEXES**

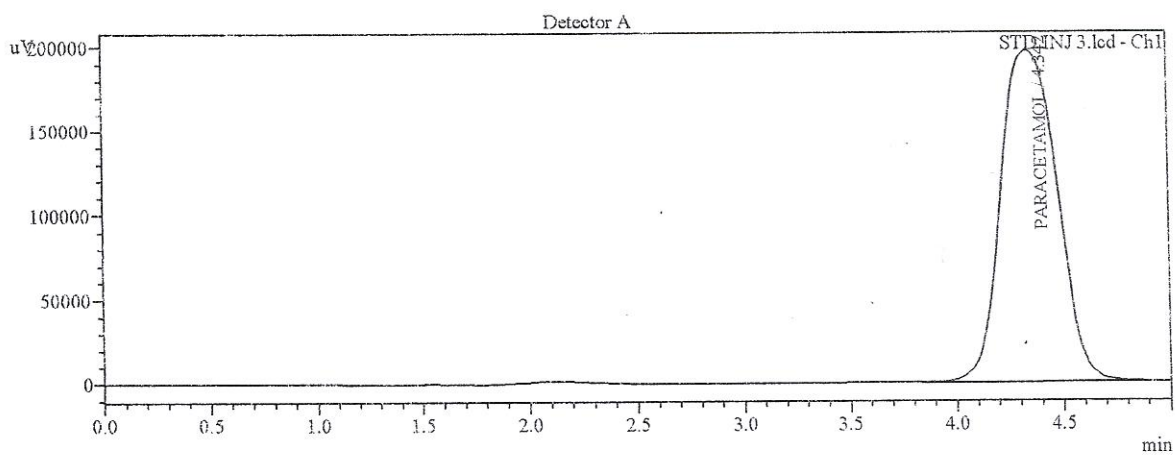
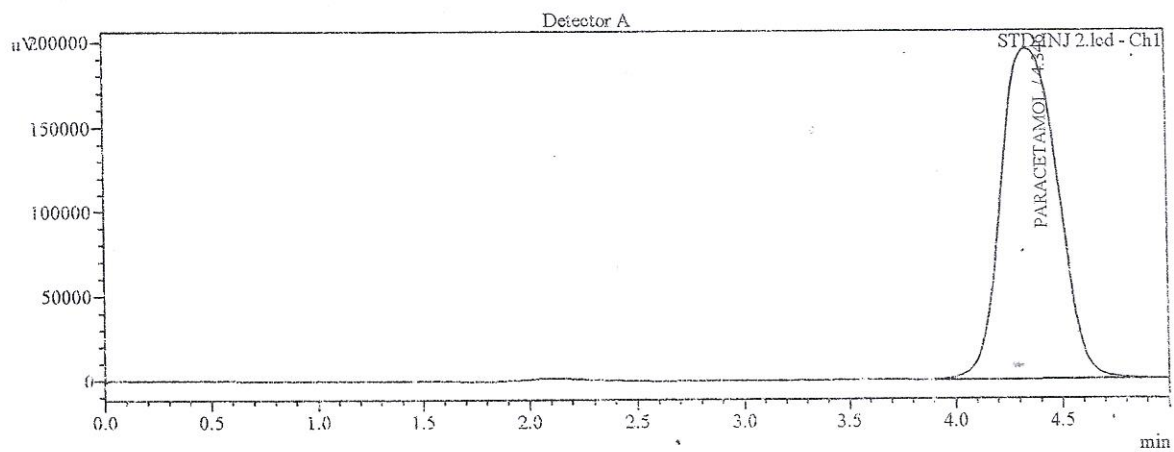
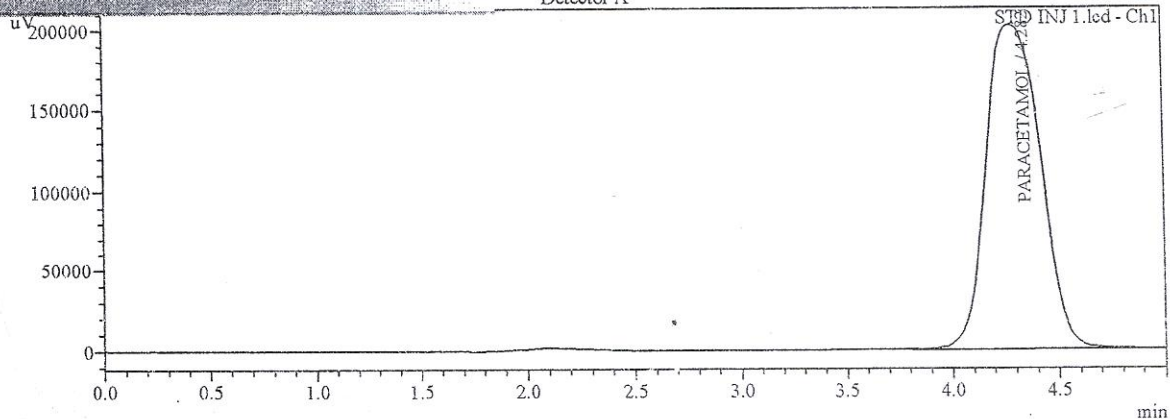
Method Filename : methode G6 paracetamol.lcm  
 Batch Filename : BATCH G6.lcb  
 Report Filename : Default.lcr  
 Date Acquired : 01/01/2006 03:39:15  
 Data Processed : 01/01/2006 03:44:16

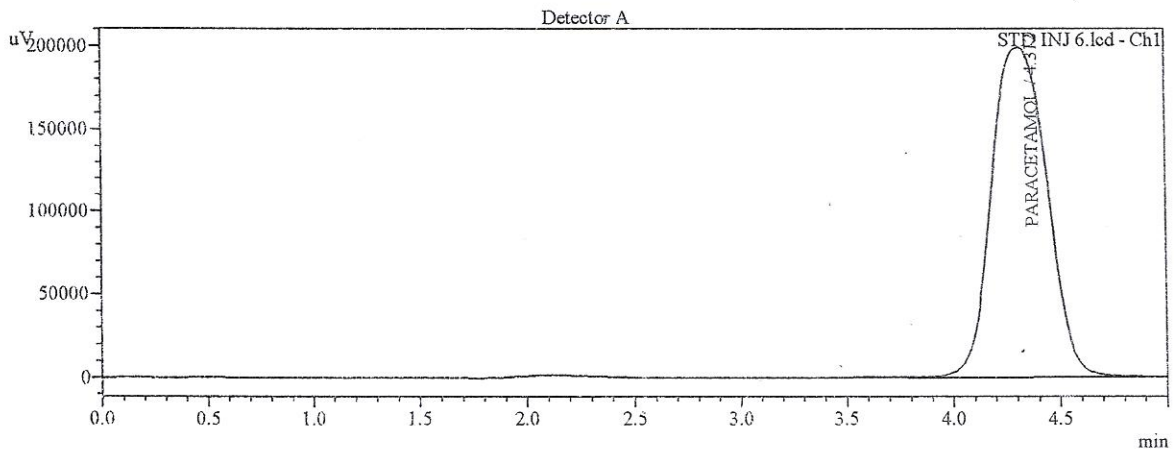
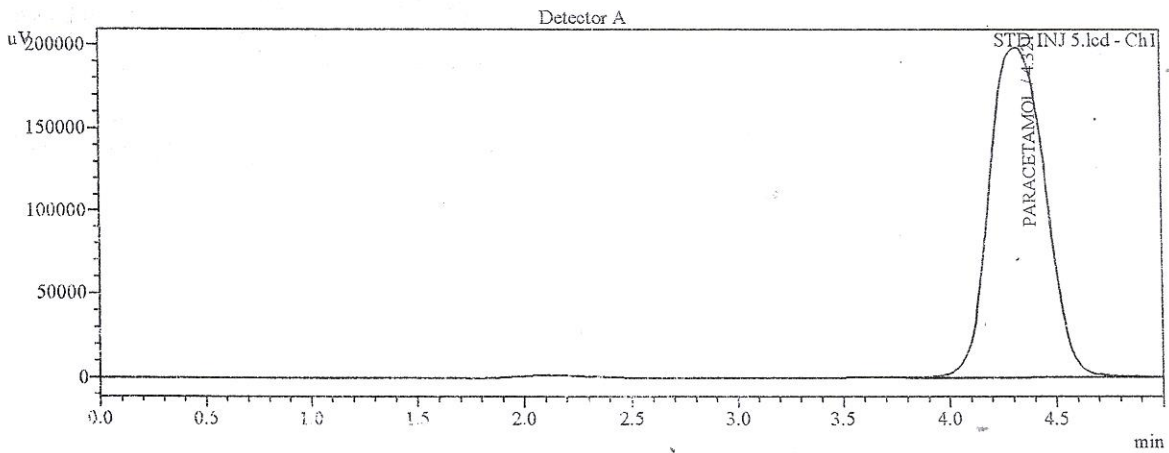
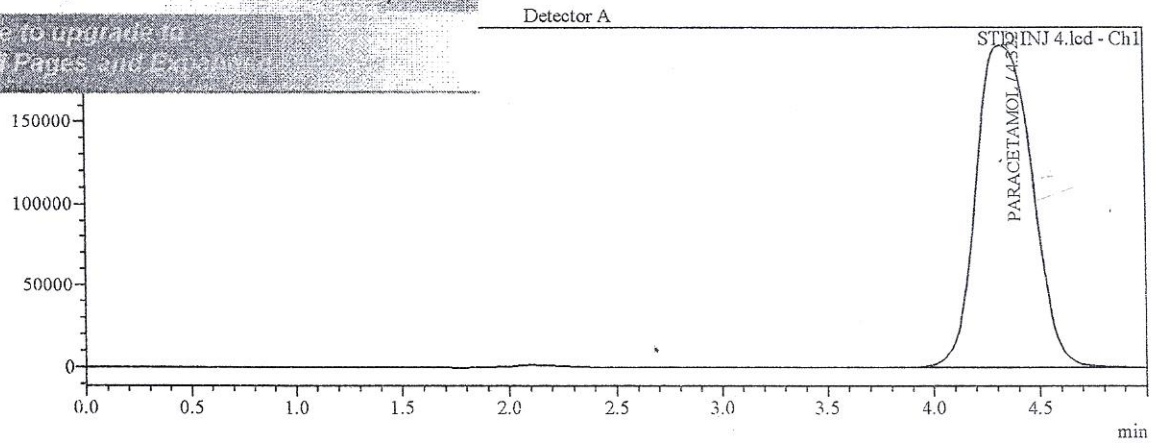


<<Detector A>>

Title	Sample Name	Sample ID	PARACETAMOL
BOUAKIZ/KHERROUBI	BOUAKIZ	KHERROUBI	3417862
Average			3417862
% RSD			0.000
Maximum			3417862
Minimum			3417862
Standard Deviation			0

Summary (Concentration)  
Detector A





<< Detector A >>

Title	Sample Name	Sample ID	PARACETAMO
STD INJ 1.lcd	STD 1	STD G8	3580723
STD INJ 2.lcd	STD 2	STD G8	3578082
STD INJ 3.lcd	STD 3	STD G8	3586083
STD INJ 4.lcd	STD 4	STD G8	3579587
STD INJ 5.lcd	STD 5	STD G8	3584049
STD INJ 6.lcd	STD 6	STD G8	3585370
Average			3582316
%RSD			0.092
Maximum			3586083
Minimum			3578082
Standard Deviation			3300

## Résumé

L'industrie pharmaceutique attache une grande importance à la qualité et l'efficacité de produit, pour cela le médicament est assujetti à de nombreuses recherches qui exploitent plusieurs contrôles tout au long du cycle de vie du médicament.

Le paracétamol est une substance ayant des propriétés antalgique, antipyrétique et anti-inflammatoire, largement indiquée dans le traitement des différentes manifestations douloureuses tel que les états grippaux, douleurs dentaires, articulaires, maux de tête .... Pour garantir la qualité irréprochable du paracétamol dans le produit fini on effectue de nombreux contrôles parmi eux le contrôle physico-chimique qui permet de vérifier le respect de ses spécification tel que le dosage et la pureté etc.

Notre travail consistait à faire une étude comparative du dosage du paracétamol dans les comprimés d'EXPANDOL 500mg par la technique chromatographique liquide à haute performance HPLC et la technique spectrophotométrique UV-VIS. Le résultat de l'étude n'a révélé en aucun cas une non-conformité en matière du dosage de paracétamol dans les comprimés d'EXPANDOL 500mg ,mais pour des raisons de précision et d'exactitude, la méthode chromatographique (HPLC) est préférée pour des résultats plus précis et suffisamment proches des dosages réels du paracétamol dans ces comprimés, mais cela n'exclut pas l'utilisation de la méthode spectrophotométrique UV-VIS en cas d'une cadence de travail et pour des raisons économiques (le temps et le cout de l'analyse) ou pour une éventuelle panne de l'équipement.

**Mots clés :** Etude comparative, paracétamol, Chromatographie liquide à haute performance (HPLC), Spectrophotométrie UV-Visible

## **Abstract**

The pharmaceutical industry attaches great importance to the quality and efficacy of the product, for this reason the drug is subject to numerous researches that exploit several controls throughout the life cycle of the drug.

Paracetamol is a substance with analgesic, antipyretic and anti-inflammatory properties, widely indicated in the treatment of different painful manifestations such as flu-like conditions, dental pain, joint pain, headaches .... To guarantee the irreproachable quality of paracetamol in the finished product, many controls are carried out, among them the physicochemical control which allows to verify the respect of its specifications such as the dosage and the purity etc.

Our work consisted in making a comparative study of the dosage of paracetamol in EXPANDOL 500mg tablets by the HPLC high performance liquid chromatographic technique and the UV-VIS spectrophotometric technique. The result of the study did not reveal any non-compliance in the determination of paracetamol in EXPANDOL 500mg tablets, but for reasons of precision and accuracy, the chromatographic method (HPLC) is preferred for more accurate results and sufficiently close to the actual determination of paracetamol in these tablets, but this does not exclude the use of the UV-VIS spectrophotometric method in case of a high work rate and for economic reasons (time and cost of the analysis) or for a possible failure of the equipment.

Key words: Comparative study, paracetamol , High performance liquid chromatography (HPLC) , UV-Visible spectrophotometry