

Partiel 2 - Analyse (sur 30 points) (2h00)

*Documents non autorisés - Calculatrice autorisée
Justifier les calculs
Séparer calcul littéral et numérique*

Exercice 1 : Compétition entre précipités (8 points)

L'allure du diagramme avec ses points anguleux A et B est caractéristique du phénomène de rupture d'équilibre qu'est l'apparition ou la disparition d'un précipité.

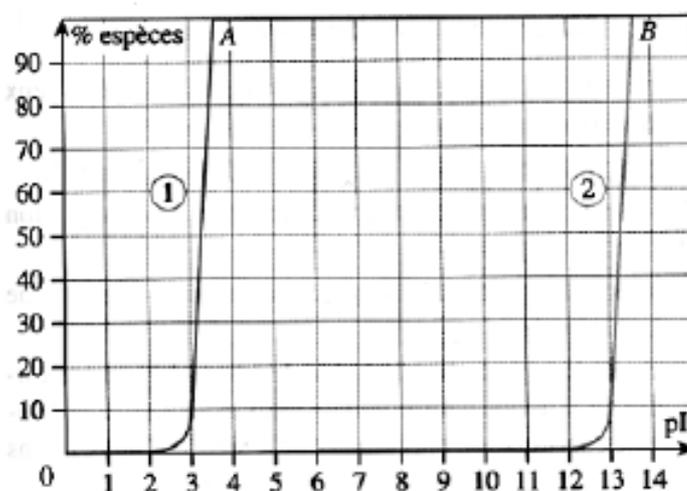
En présence d'ions iodure I^- , les ions Pb^{2+} donnent un précipité jaune d'iodure de plomb PbI_2 et les ions Hg^{2+} un précipité rouge-orangé HgI_2 .

1) **Écrire les deux réactions de précipitation correspondantes.**

Lorsqu'on ajoute goutte à goutte des ions Hg^{2+} dans un tube à essais contenant un précipité d'iodure de plomb, le précipité devient rouge-orangé dès les premières gouttes.

2) **Que peut-on conclure de cette observation ? Écrire l'équation de la réaction correspondante.**

3) Le document ci-après correspond à la simulation de l'ajout d'une solution d'ions iodure à une solution équimolaire en ions Pb^{2+} et Hg^{2+} , toutes deux à $0,100 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Les graphes tracés représentent le pourcentage de cations métalliques présents dans la solution en fonction de $pI = -\log[I^-]$.



- a - **Identifier les deux courbes tracées.**

- b - **Que représentent les points anguleux ? En déduire les produits de solubilité $K_s(\text{PbI}_2)$ et $K_s(\text{HgI}_2)$.** On donne $pI_A = 3,6$ et $pI_B = 13,6$.
- c - **Déterminer la valeur de la constante d'équilibre K^0 de la réaction qui se produit lorsqu'on met en présence des ions Hg^{2+} avec un précipité d'iodure de plomb** (réaction dont l'équation a été donnée dans la question 2)).
- d - **Conclure sur la réaction.**

Exercice 2 : Validation de méthode d'un médicament utilisé contre l'hypertension artérielle (18,5 points)

Le Captopril est un médicament utilisé dans le traitement de l'hypertension artérielle, l'insuffisance cardiaque, l'infarctus du myocarde et la néphropathie diabétique du diabète de type I (insulino-déficient).

Celui-ci appartient à la famille des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC). Il bloque la formation de l'angiotensine II, une substance responsable d'une contraction des artères qui augmente la tension artérielle et fatigue le cœur. Outre ses propriétés antihypertensives, le Captopril a un effet bénéfique en cas d'insuffisance cardiaque et après un infarctus.

Son utilisation au long cours permet également de freiner la détérioration du fonctionnement du rein chez les personnes atteintes de diabète insulino-dépendant.

Il se présente sous forme de poudre granuleuse, cristalline, blanche facilement soluble dans le méthanol.

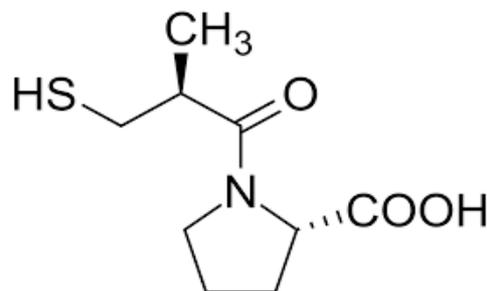


Figure 1 - Structure chimique du Captopril

Le dosage de ce médicament s'effectue à l'aide d'analyse HPLC (High Performance Liquid Chromatography), il est indispensable d'élaborer cette méthode d'analyse et de la valider selon des critères bien définis.

Remarque : aucune connaissance sur l'analyse HPLC n'est requise pour répondre aux questions.

1) Indiquer quelle est le but de la validation d'une méthode d'analyse.

La validation des méthodes d'analyses suit les recommandations de documents de référence officiels.

Les méthodes d'analyses sont validées selon les critères suivants :

- **Conformité du système** : Des valeurs minimales de paramètres chromatographiques (résolution, nombre de plateaux théoriques, facteur de rétention, *tailing factor*) sont à respecter pour démontrer la fiabilité de l'appareil.
- **Spécificité** : Capacité de la méthode de permettre une évolution non équivoque de l'analyte en présence de composants qui sont susceptibles d'être présents. Concrètement, elle représente la capacité de faire la discrimination analyte/substances interférentes. On l'évalue en montrant l'absence de signaux liés aux excipients ou aux solvants.
- **Linéarité** : Capacité dans un intervalle donné d'obtenir des résultats de dosages directement proportionnels à la concentration ou à la quantité d'analyte dans un échantillon. C'est la relation linéaire signal-concentration. On l'établit en traçant une droite d'étalonnage, évaluée par un coefficient de détermination r^2 ($\geq 0,998$).
- **Exactitude** : Etroitesse d'accord entre la valeur trouvée et la valeur acceptée soit comme valeur conventionnellement vraie soit comme valeur de référence. C'est l'écart d'une valeur obtenue par rapport à une valeur considérée comme exacte.
- **Fidélité** : Etroitesse d'accord entre une série de mesures obtenues dans des conditions prescrites à partir de prises d'essais multiples provenant d'un même échantillon homogène. Elle étudie le degré de dispersion des résultats.

On y distingue :

- **Répétabilité** : exprime la fidélité évaluée dans des conditions opératoires identiques et dans un court intervalle de temps. Elle est déterminée à partir d'un même échantillon, évaluée dans des conditions opératoires identiques (même analyste, même équipement, même laboratoire).
- **Fidélité intermédiaire**.
- **Stabilité des échantillons en solution** : Vérifiée par comparaison des facteurs de réponse entre une solution fraîche et une solution datant d'au moins 16 heures.
- **Robustesse** : Capacité du protocole de rester non affecté par des variations faibles mais délibérément introduites dans les paramètres de la méthode. Elle fournit une indication sur sa fiabilité dans des conditions normales d'utilisation. Les variations faibles sont des modifications contrôlées des conditions d'application (changements délibérés de température, débit, composition de phase mobile...).
- **LOD et LOQ**.

2) Préciser quelles sont les différences entre répétabilité et fidélité intermédiaire.

A – Préparation des échantillons de Captopril à préparer en vue de la validation

Pour la préparation des échantillons HPLC, une masse de 1 g ($\pm 10\%$) de Captopril est ajoutée à une masse de 9 g ($\pm 10\%$) de lactose (excipients). Après homogénéisation de la préparation, celle-ci est répartie en dix prélèvements d'une masse approximative de 200 mg ($\pm 10\%$).

Ces prélèvements sont introduits dans des fioles jaugées de 20 mL à l'aide d'un sabot de pesée, elles sont ensuite complétées avec du méthanol.

1) Un tableau de résultat est présenté en annexe 1, à compléter et à rendre avec la copie.

2) Indiquer si les résultats obtenus sont conformes sachant que l'écart par rapport à la concentration théorique ne doit pas dépasser $\pm 10\%$.

B – Validation de méthode

I - Étude de la spécificité :

Un échantillon blanc (méthanol) et un échantillon d'excipients sont injectés dans le système. Les chromatogrammes obtenus, ainsi que le chromatogramme du captopril, pour une détection d'absorption à 220 nm, sont présentés en figures 2,3 et 4.

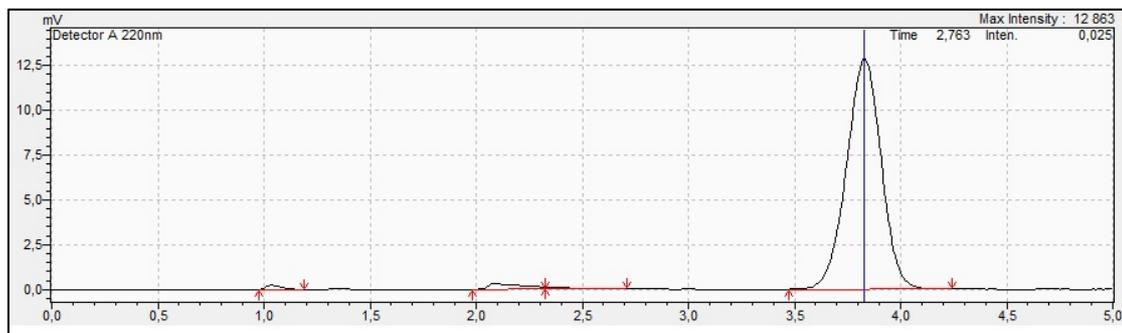


Figure 2 : Chromatogramme du captopril (0,2 g.L⁻¹)

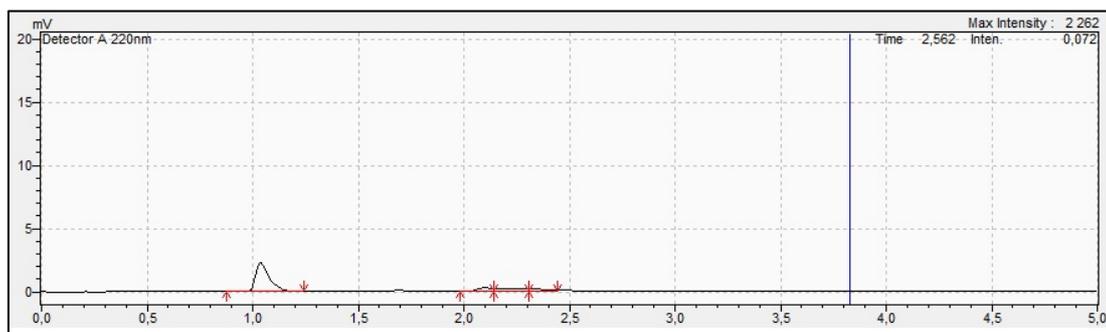


Figure 3 : Chromatogramme du mélange d'excipients

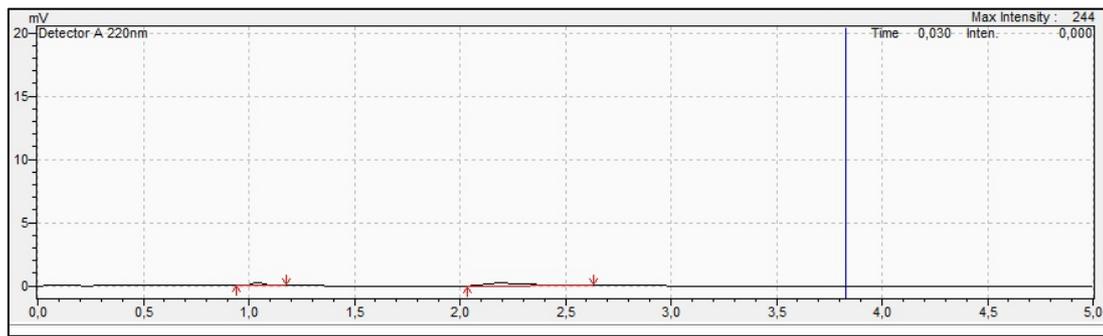


Figure 4 : Chromatogramme du méthanol

1) Conclure sur la spécificité en justifiant votre réponse.

II - Étude de la linéarité :

La linéarité de la méthode est évaluée à partir de 5 niveaux de concentration correspondant respectivement à 25%, 50%, 100%, 250% et 500% de la concentration cible ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$), avec 3 répétitions pour chaque niveau. La droite de régression linéaire (figure 5) est obtenue par la méthode des moindres carrés sous la forme $y = ax + b$, où a représente la pente de la droite, b l'ordonnée à l'origine. y représente l'aire sous le pic, et x représente la concentration en g.L^{-1} .

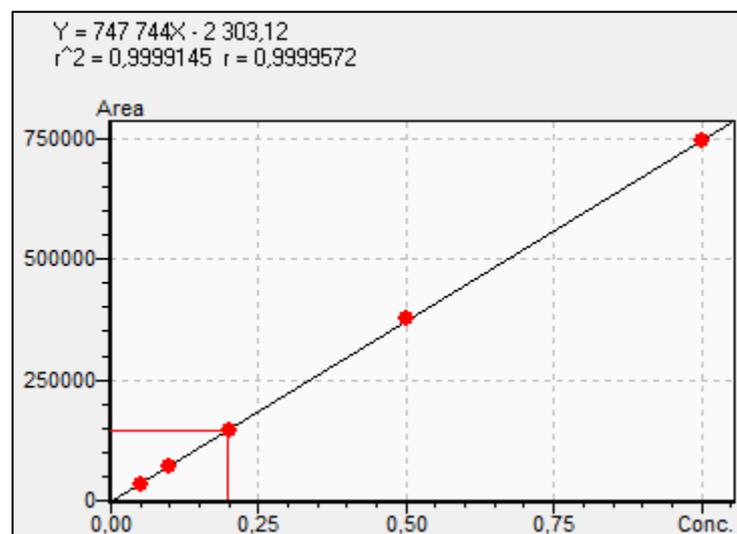


Figure 5 : Droite d'étalonnage du captopril

2) Conclure sur la linéarité en indiquant l'intervalle de concentrations. Justifier votre réponse.

3) Pour compléter l'étude de linéarité, la norme impose l'utilisation d'un test de Fischer-Snedecor. Les résultats des essais sur cinq niveaux de concentration sont donnés dans l'annexe 2.

Calculer la **variance expérimentale** s^2_{exp} et la **variance** s^2_{def} en donnant leur unité convenable.

4) Calculer la statistique F de Fischer-Snedecor, puis conclure sur la linéarité.

On donne $f_{\text{table}}(0,95;3;10) = 3,71$.

5) Indiquer ce que veulent dire les trois valeurs numériques données entre parenthèse de f_{table} .

III - Étude de l'exactitude :

Les résultats des études d'exactitude sont obtenus en calculant les taux de recouvrement :

$$t_{\text{rec}} = \frac{\text{valeur réellement mesurée}}{\text{valeur théorique}} \times 100$$

de la méthode par rapport à des solutions de concentrations connues.

6) Compléter le tableau fourni en annexe 3, à rendre avec la copie.

7) Conclure sur l'exactitude de la méthode en justifiant votre réponse. Les normes d'acceptation étant de $(100 \pm 2) \%$.

IV – 1/ Étude de la répétabilité :

6 injections d'une même solution à la concentration cible ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$) sont réalisées le 1^{er} jour.

Données :

On rappelle que le calcul de la moyenne, de l'écart-type sur une grandeur x, obéissant à une loi normale, sont données par les relations suivantes :

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad \text{et} \quad s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Le coefficient de variation est donnée par :

$$CV = \frac{s}{\bar{x}}$$

8) Les moyennes, écart-types et coefficients de variation (CV%) pour le temps de rétention, l'aire sous le pic et la hauteur du pic sont à calculer (annexe 4 à rendre avec la copie).

9) Conclure sur la répétabilité sachant que les normes d'acceptation sont pour un CV% < 2 %.

IV – 2/ Étude de la fidélité intermédiaire :

Une solution de captopril à la concentration cible ($0,25 \text{ g.L}^{-1}$) est préparée le 3^{ème} jour par un opérateur différent avec un numéro de lot de colonne différent. 6 injections de cette solution sont réalisées. Les coefficients de variation (CV%) pour le temps de rétention, l'aire sous le

pic et la hauteur du pic sont calculés (tableau 5 en annexe 4), fournissant des valeurs dans les normes d'acceptation ($\%RSD \leq 2$).

10) Conclure sur la fidélité intermédiaire sachant que les normes d'acceptation sont pour un CV% < 2 %.

V – Stabilité des solutions :

La stabilité dans le temps des échantillons en solution d'analyse est vérifiée en comparant les réponses (aire et taux de recouvrement) d'une solution à la concentration cible injectée 6 fois, à T_0 et à T_0+24h (Les résultats sont donnés dans le tableau 6 en annexe 5 **à rendre avec la copie**).

11) Calculer le biais relatif en % et conclure sur la stabilité des échantillons sachant que le biais doit être inférieure en valeur absolue à 1 %.

VI – Robustesse :

Des variations faibles mais délibérément introduites des paramètres de la méthode d'analyse fournissent une indication sur sa fiabilité dans des conditions normales d'utilisation. Dans cette étude, une diminution de $5^\circ C$ de la température et une diminution de 0,2 mL/min du débit a été apporté (cf résultats tableau 7 en annexe 6).

12) Conclure sur la robustesse de la méthode d'analyse.

VII – LOD et LOQ :

13) Définir la limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) d'une procédure analytique.

14) La limite de détection de l'appareil pour le captopril est calculée à partir d'un rapport signal/bruit égal à 3.

La limite de quantification de l'appareil pour le captopril est calculée à partir d'un rapport signal/bruit égal à 10.

On donne le rapport $S/N = 0,000035 \text{ g.L}^{-1}$.

Calculer les valeurs de la LOD et LOQ.

Exercice 3 : (3,5 points)

Une solution aqueuse de permanganate de potassium dont la concentration molaire vaut $C_1 = 0,128 \text{ mmol.L}^{-1}$, a une transmittance de 50 % à 525 nm, si on utilise une cuve de 10 mm de parcours optique.

1) Indiquer, de façon générale, ce qu'est un spectre d'absorption, ainsi que les définitions des deux grandeurs qui peuvent se trouver en ordonnée d'un tel spectre.

- 2) Calculer le coefficient d'absorption molaire du permanganate pour cette longueur d'onde.
- 3) Si on double la concentration, calculer l'absorbance et la transmittance de la nouvelle solution.

FIN DE L'ÉPREUVE

ANNEXE 1 : La conformité des préparations

Masse prélevement (g)	Concentration théorique Captopril (g/L)	Concentration en Captopril mesurée (g/L)	Écart par rapport à la concentration théorique (%)
0,20050	1,00250	0,98227	-2
0,20065		1,02603	2
0,20045	1,00225	1,00479	0
0,20017	1,00085	1,02373	2
0,20046	1,00230	0,96388	
0,20052	1,00260	0,99870	0
0,20040	1,00200	1,02419	2
0,20021		1,01414	
0,20075	1,00375	0,96817	-4
0,20035	1,00175	0,97639	-3

Tableau 1 : conformité des préparations

ANNEXE 2 : LA LINÉARITÉ : Test de Fischer-Snedecor

Des mesurages répétés sont effectués pour plusieurs niveaux du mesurande :

- k niveaux d'indice i ;
- n répétitions d'indice j.

On obtient un ensemble de valeurs mesurées y_{ij} .

• En tenant compte de **tous les niveaux** on calcule :

- la **variance expérimentale** s_{exp}^2 qui quantifie la dispersion de toutes les valeurs mesurées (y_{ij}) autour de leur moyenne à chaque niveau \bar{y}_i .

Elle donne donc une estimation du **défaut de fidélité** de la procédure de mesure :

$$s_{\text{exp}}^2 = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^n (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{k(n-1)}$$

- la **variance** s_{def}^2 qui quantifie la dispersion des moyennes \bar{y}_i par rapport aux valeurs correspondantes recalculées \hat{y}_i .

Elle donne donc une estimation du **défaut d'ajustement** des valeurs mesurées par rapport à la droite :

$$s_{\text{def}}^2 = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^n (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2}{k-2} = \frac{\sum_{i=1}^k n(\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2}{k-2}$$

Ce test permet de comparer les deux variances s_{def}^2 et s_{exp}^2 en calculant la statistique f observée :

$$f_{\text{obs}} = \frac{s_{\text{def}}^2}{s_{\text{exp}}^2}$$

Hypothèse nulle H_0 à tester : $s_{\text{def}}^2 \leq s_{\text{exp}}^2$

Ceci signifie que la dispersion des moyennes autour de la droite de régression est plus faible que la dispersion expérimentale des valeurs mesurées autour de leur moyenne à chaque niveau; autrement dit, le modèle linéaire est bien adapté dans le domaine étudié.

Interprétation :

La statistique f_{obs} obtenue est comparée à la valeur critique ($f_{critique}$) donnée dans la table de Fisher-Snedecor au niveau de confiance $(1 - \alpha)$ (généralement 95 %), pour k niveau et pour n répétitions :

$$f((1 - \alpha) ; (k - 2) ; (k(n - 1)))$$

- Si $f_{obs} \leq f_{critique}$: hypothèse acceptée ; linéarité vérifiée avec un niveau de confiance de 95 %.
- Si $f_{obs} > f_{critique}$: hypothèse rejetée ; linéarité non vérifiée avec un niveau de confiance de 95 %. Il faut alors :
 - soit revoir les limites de la zone de linéarité ;
 - soit introduire une composante “non linéaire”.

Résultats des essais obtenus pour chaque niveaux de concentration :

i	x_i (g/L)	Essai 1 : y_{i1} (g/L)	Essai 2 : y_{i2} (g/L)	Essai 3 : y_{i3} (g/L)	\bar{y}_i (g/L)	\hat{y}_i (g/L)	$\bar{y}_i - \hat{y}_i$ (g/L)	$y_{i1} - \bar{y}_i$ (g/L)	$y_{i2} - \bar{y}_i$ (g/L)	$y_{i3} - \bar{y}_i$ (g/L)
1	0,05	0,049	0,051	0,0485	0,05	0,05	0,001	-0,001	0,001	-0,001
2	0,1	0,099	0,101	0,1	0,10	0,10	0,001	-0,001	0,001	0,000
3	0,2	0,198	0,201	0,202	0,20	0,20	0,000	-0,002	0,001	0,002
4	0,5	0,498	0,503	0,5	0,50	0,50	-0,004	-0,002	0,003	0,000
5	1	0,98	1,04	1,02	1,01	1,01	0,002	-0,033	0,027	0,007

Tableau 2 : mesurages répétés en vu de son utilisation pour déterminer la statistique f_{obs}

ANNEXE 3 : EXACTITUDE

i	xi (g/L)	Essai 1 : y _{i1} (g/L)	Essai 2 : y _{i2} (g/L)	Essai 3 : y _{i3} (g/L)	Essai 1 : t _{rec} (%)	Essai 2 : t _{rec} (%)	Essai 3 : t _{rec} (%)	moyenne : t _{rec} (%)
1	0,05	0,049	0,051	0,0485				
2	0,1	0,099	0,101	0,1				
3	0,2	0,198	0,201	0,202				
4	0,5	0,498	0,503	0,5				
5	1	0,98	1,04	1,02				

Tableau 3 : exactitude

ANNEXE 4 : RÉPÉTABILITÉ & FIDÉLITÉ INTERMÉDIAIRE

N° injection	Temps de rétention (min)	Hauteur de pic	Aire sous le pic
1	3,832	12 862	146 057
2	3,83	13 023	148 190
3	3,83	13 205	150 295
4	3,833	13 142	149 616
5	3,83	13 076	148 637
6	3,83	13 096	148 792
Moyenne			
écart-type			
CV (%)			

Tableau 4 : Répétabilité

N° injection	Temps de rétention (min)	Hauteur de pic	Aire sous le pic
1	3,837	13 121	149 600
2	3,836	13 092	149 128
3	3,835	13 054	148 430
4	3,836	13 041	148 311
5	3,836	13 084	148 658
6	3,835	13 226	150 276
Moyenne	3,836	13 103	149 067
CV (%)	0,014	0,508	0,510

Tableau 5 : Fidélité intermédiaire

ANNEXE 5 : Stabilité des solutions en solution

	Aire sous le pic (n=6)
Echantillon à T₀	148 598
Echantillon à T₀+72h	148 004
biais relatif (%)	

*Tableau 6 : Stabilité des échantillons en solution***ANNEXE 6 : Robustesse de la méthode**

Paramètre	Valeur	Norme
Nombre de plateaux théoriques	2254	> 2000
<i>Tailing factor</i>	0,947	≤ 2

Tableau 7 : Robustesse de la méthode