

Année 2023 - 2024

2^{ème} année BTS Bioanalyses et Contrôles

Activité technologique en analyse biochimique N°2



L. GODIN
<http://ligodin.free.fr>

ligodin@free.fr

TP n°2 : DOSAGE par H.P.L.C du BACLOFÈNE dans une SPÉCIALITÉ PHARMACEUTIQUE

1. TRAVAUX PRATIQUES	3
1.1. But	3
1.2. Matériels et réactifs	3
1.2.1. Les solvants utilisés de qualité HPLC	3
1.2.2. Les colonnes utilisées	4
1.2.3. Liste du matériel	4
2. MODE OPERATOIRE	5
2.1. Réalisation de la fiole "inconnue" et de la fiole étalon "mère"	5
2.2. Modification de la phase mobile : effet du pourcentage d'ACN dans l'eau UP acidifiée	6
2.2.1. Phase mobile : 55/45 ACN/eau acidifiée <u>à réaliser pratiquement</u>	6
2.2.2. Phase mobile : 65/35 ACN/ eau acidifiée <u>à réaliser pratiquement</u>	6
2.2.3. Phase mobile : 75/25 ACN/ eau acidifiée <u>à réaliser pratiquement</u>	6
2.3. Effet du greffage de la phase stationnaire et de la granulométrie de son support	7
2.3.1. Utilisation d'une colonne ODS Hypersil C18 avec phase mobile : 65/35 ACN/ eau acidifiée à analyser	7
2.3.2. Utilisation d'une colonne Accucore Urea HILIC avec phase mobile : 65/35 ACN/ eau acidifiée à analyser	7
2.4. Effet du débit	7
2.4.1. Débit à 1,2mL/min <u>à réaliser pratiquement</u>	7
2.4.2. Débit à 0,8 mL/min <u>à réaliser pratiquement</u>	7
2.5. Dosage par courbe d'étalonnage	8
2.5.1. Réalisation des fioles de la gamme d'étalonnage	8
2.5.2. Réalisation de la fiole contenant l'étalon de contrôle	8
3. CONCLUSION GENERALE	9
ANNEXE 1 : CHROMATOGRAMME OBTENU AVEC UNE COLONNE ODS HYPERSIL C18	10
ANNEXE 2 : CHROMATOGRAMME OBTENU AVEC UNE COLONNE HILIC – 2,6 μ	11
ANNEXE 3 : PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE QUELQUES SOLVANTS	12

4. RAPPORT D'ACTIVITE	14
4.1. Matériels et réactifs	14
4.1.1. Les solvants utilisés de qualité HPLC	14
4.2. Réalisation de la fiole "inconnue" et de la fiole étalon "mère"	14
4.3. Modification de la phase mobile : effet du pourcentage d'ACN dans l'eau UP acidifiée	15
4.3.1. Phase mobile : 55/45 ACN/eau acidifiée <u>à réaliser pratiquement</u>	15
4.3.2. Phase mobile : 65/35 ACN/ eau acidifiée <u>à réaliser pratiquement</u>	16
4.3.3. Phase mobile : 75/25 ACN/ eau acidifiée <u>à réaliser pratiquement</u>	17
4.4. Effet du greffage de la phase stationnaire et de la granulométrie de son support	18
4.4.1. Utilisation d'une colonne ODS Hypersil C18 avec phase mobile : 65/35 ACN/ eau acidifiée à analyser	18
4.4.2. Utilisation d'une colonne Accucore Urea HILIC avec phase mobile : 65/35 ACN/ eau acidifiée à analyser	18
4.5. Effet du débit	19
4.5.1. Débit à 1,2 mL/min <u>à réaliser pratiquement</u>	19
4.5.2. Débit à 0,8 mL/min <u>à réaliser pratiquement</u>	19
4.6. Dosage par courbe d'étalonnage	23
4.6.1. Réalisation des fioles de la gamme d'étalonnage	23
4.6.2. Réalisation de la fiole contenant l'étalon de contrôle	23
4.6.3. Obtention de la droite d'étalonnage	24
4.6.4. Calcul de la concentration des données à l'aide de la courbe d'étalonnage	28
4.7. Conclusion générale	29

1. TRAVAUX PRATIQUES

1.1. But

Il s'agit d'une séance d'initiation à la technique chromatographique liquide haute performance. Le but est la prise en main d'une chaîne CLHP dans une optique d'analyse qualitative et quantitative du **Baclofène dans une spécialité pharmaceutique**.

Afin de réaliser cet objectif, vous vous appuierez sur l'étude de plusieurs thèmes :

- L'effet du solvant organique ACN, ainsi que son pourcentage par rapport à l'eau acidifiée, de la phase mobile ;
- L'influence du greffage de la phase stationnaire et de la granulométrie de son support ;
- L'effet du débit ;
- L'analyse quantitative du Baclofène par courbe d'étalonnage.

1.2. Matériels et réactifs

1.2.1. Les solvants utilisés de qualité HPLC

- Du méthanol MeOH qualité HPLC.
- De l'acétonitrile ou méthane nitrile ACN qualité HPLC.
- Du tétrahydrofurane THF qualité HPLC.
- De l'eau UP acidifiée à 0,1 % en acide phosphorique à 50 % pour un pH = 2,1.



Rapport

Déterminer le volume d'acide phosphorique à prélever pour obtenir de l'eau UP acidifiée à 0,1 %.

1.2.2. Les colonnes utilisées

Au cours de cette séance, vous allez être amenés à utiliser ou à exploiter :

- ✓ 3 colonnes ;

Chaque colonne utilisée possède des caractéristiques communes mais également, et c'est un des thèmes abordés au cours de votre séance d'aujourd'hui, des phases stationnaires différentes¹.

Tableau récapitulatif des caractéristiques des colonnes

Nom	Longueur (mm)	Diamètre interne (mm)	Taille des particules (µm)	Taille des pores (Å)	Aire (m ² /g)	Température d'utilisation maximale (°C)	Stabilité en pH
ODS Hypersil C18	100	4,6	5	120			2-7
Waters Atlantis HILIC	100	4,6	5	100	330	45	1-5
Thermo Scientific Accucore Urea HILIC	150	3	2,6				2-8

1.2.3. Liste du matériel

- Une seringue d'amorçage de 25 mL ;
- Des bouteilles de solvants de 1000 mL pour l'eau UP acidifiée, le méthanol (spécial HPLC) et l'acétonitrile (spécial HPLC) ; de l'eau ultrapure ;
- Une colonne Waters Atlantis HILIC (100 x 4,6 mm).
- Un pôt de poudre de 1 g Baclofène (cas n° 1134-47-0) ;
- UN comprimé de 10 mg issu d'une boîte de Baclofène® ;
- 2 fioles de 100 mL, 1 fiole de 50 mL et 6 fioles de 20 mL ;
- Une chaîne HPLC ProStar de chez Varian : triple pompe, interface de communication Star 800, détecteur spectrophotométrique PDA UV/visible 335, autosampler, pilotée via ethernet sous Windows 7 équipée du logiciel Galaxie version 1.10.

¹ Pour connaître les différentes phases stationnaires, se référer à la partie théorique de l'appareillage.

2. MODE OPERATOIRE

2.1. Réalisation de la fiole "inconnue" et de la fiole étalon "mère"

☞ Dissoudre dans un bécher de 100 mL, à l'aide d'un mélange 50/50 d'eau UP acidifiée/ACN, un comprimé de Baclofène® 10 mg, puis effectuer une agitation pendant environ 10 min.

Faire une filtration simple dans une fiole de 100 mL. Effectuer ensuite une dilution au demi, en utilisant une fiole de 50 mL.

Cette fiole sera appelée F_{inc} .



Rapport

- Vous indiquerez la méthode à suivre, pour calculer le volume V_{inc} à prélever.

☞ Préparer une solution mère dans une fiole F_M de 100 mL, dont la concentration en Baclofène aura pour valeur, environ exactement : $C_M = 100 \text{ mg.L}^{-1}$.

Cette dissolution s'effectuera, à l'aide du même mélange de solvant que précédemment, dans un bécher de 100 mL pendant environ 10 min, puis effectuer une filtration simple dans la fiole de 100 mL.



Rapport

- Vous indiquerez la masse exactement pesée $m_{\text{Baclofène}}$.

La chaîne HPLC que vous allez utiliser aujourd'hui peut être pilotée manuellement ou informatiquement grâce à un logiciel spécifique de la chaîne. Dans notre cas, il s'agit du logiciel **Galaxie** de chez Agilent.

2.2. Modification de la phase mobile : effet du pourcentage d'ACN dans l'eau UP acidifiée

UTILISATION D'UNE COLONNE Waters Atlantis HILIC

2.2.1. Phase mobile : 55/45 ACN/eau acidifiée, à réaliser pratiquement

Utiliser la notice technique de la chaîne HPLC

☞ Relever la pression p_1 en tête de colonne.



Rapport

- Expliquer pourquoi la détection s'effectue dans l'UV, et non pas dans le visible ?

2.2.2. Phase mobile : 65/35 ACN/eau acidifiée, à réaliser pratiquement

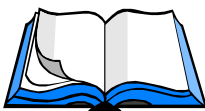
Utiliser la notice technique de la chaîne HPLC

☞ Relever la pression p_2 en tête de colonne.

2.2.3. Phase mobile : 75/25 ACN/eau acidifiée, à réaliser pratiquement

Utiliser la notice technique de la chaîne HPLC

☞ Relever la pression p_3 en tête de colonne.



Rapport

- Comparer les chromatogrammes obtenus et préciser en la justifiant quelle est la meilleure proportion de solvant à utiliser pour la suite.

2.3. Effet du greffage de la phase stationnaire et de la granulométrie de son support

UTILISATION de COLONNES C18 & HILIC

2.3.1. Utilisation d'une colonne ODS HYPERSIL C18 avec phase mobile : 65/35 ACN/eau acidifiée : Analyse des résultats

☞ Ce chromatogramme a été réalisé en 7 minutes à une pression de 25 bar, et se trouve en Annexe 1.

2.3.2. Utilisation d'une colonne Accucure Urea HILIC avec phase mobile : 65/35 ACN/eau acidifiée : Analyse des résultats

☞ Ce chromatogramme a été réalisé en 3 minutes à une pression de 200 bar, et se trouve en Annexe 2.



Rapport

- Rendre le chromatogramme obtenu en utilisant la colonne Waters Atlantis HILIC.
- Remplir un tableau récapitulatif des données chromatographiques.
- Conclure sur l'éluion du Baclofène. Calculer k' et préciser quelle est la meilleure colonne à utiliser pour la suite de l'étude.

2.4. Effets du débit

2.4.1. Débit à 1,2 mL/min à réaliser

Utiliser la notice technique de la chaîne HPLC

☞ Relever la pression p_4 en tête de colonne.

2.4.2. Débit à 0,8 mL/min à réaliser

Utiliser la notice technique de la chaîne HPLC

☞ Relever la pression p_5 en tête de colonne.



Rapport

- Rendre les deux chromatogrammes.
- Remplir un tableau récapitulatif des données chromatographiques.
- Quel est l'impact du débit sur le temps de rétention du Baclofène, la largeur à la base du pic ?
- Calculer les k' correspondant et conclure.
- Expliquer l'évolution des pressions.

2.5. Dosage par courbe d'étalonnage

2.5.1. Réalisation des fioles de la gamme d'étalonnage

➤ **Préparation de la gamme** : Préparer différentes fioles filles de 20 mL, suivant le tableau ci-dessous :

Fioles	V(F _M) (mL)	C _{filie} (mg.L ⁻¹)
1	4	
2	8	
3	12	
4	16	
5	20	



Rapport

Indiquer la méthode suivie pour calculer le volume de prélèvement V de Baclofène.
Compléter le tableau.

2.5.2. Réalisation de la fiole contenant l'étalon de contrôle

➤ **Préparation de l'étalon de contrôle** : Préparer une fiole CQ de 20 mL, en utilisant V(F_M) = 10 mL.



Rapport

Donner la concentration C_{ref} correspondante.

➤ **Pour l'analyse chromatographique de la gamme, de l'étalon de contrôle et de l'inconnue** :

Utiliser la notice technique de la chaîne HPLC



Rapport

- Imprimer la droite d'étalonnage avec tous les paramètres utiles.
- Relever la concentration de l'étalon de contrôle (inconnue-connue) C_{EQ} et rechercher si la valeur mesurée (C_{EQ}) est comprise dans l'intervalle d'acceptabilité, soit $C_{ref} \pm 10 \%$
- Relever les concentrations de Baclofène inconnue C_1 et C_2 en mg/L.
- Vérifier la compatibilité métrologique dans le cas des deux essais précédemment effectués en répétabilité à l'aide de l'annexe métrologique.
- En déduire la concentration en Baclofène obtenue dans la spécialité pharmaceutique. Vous exprimerez le résultat comme indiqué dans l'annexe métrologique. Comparer avec la valeur fabricant.

3. CONCLUSION GENERALE

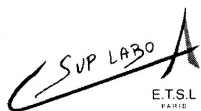


Rapport

Conclure sur l'ensemble des manipulations réalisées.

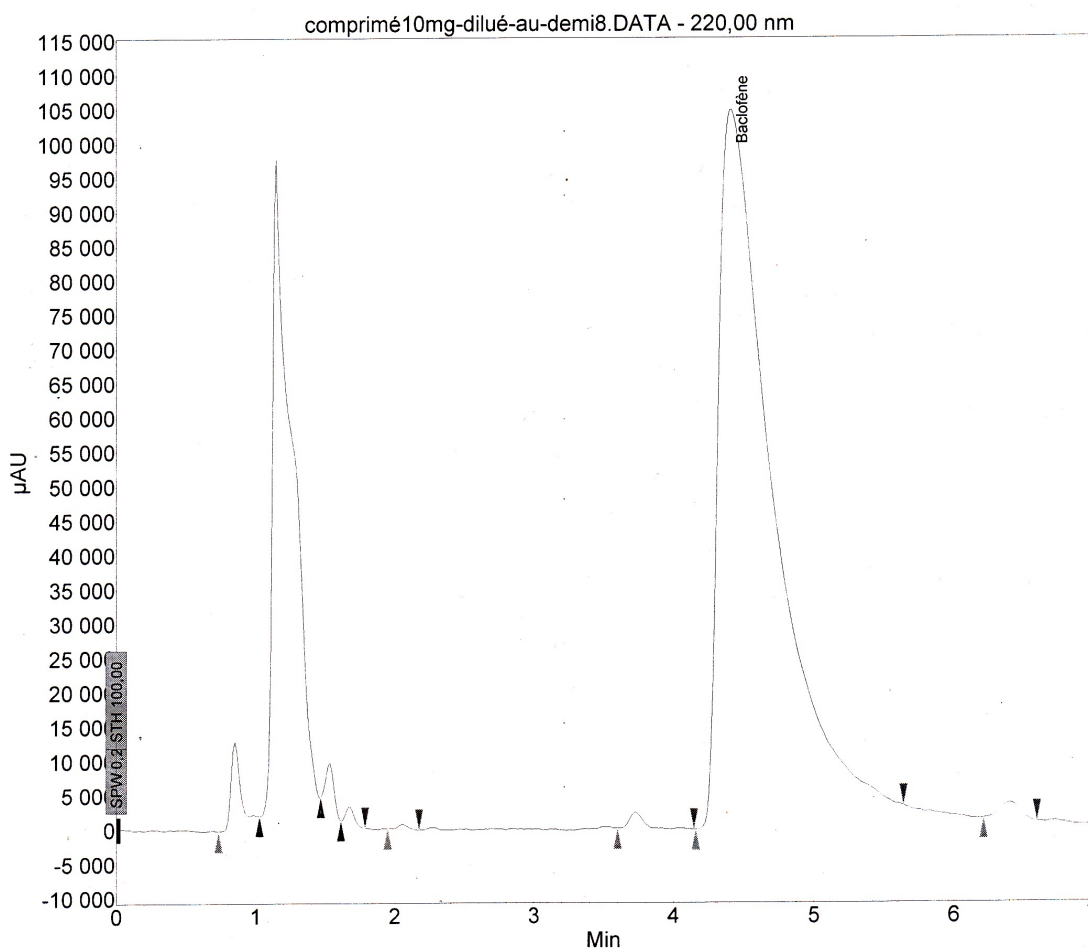
ANNEXE 1 :

Chromatogram : comprimé de 10 mg de Baclofène dissoud dans un mélange 50-50 ACN-eau acidifiée, puis dilué au demi Sur colonne **ODS Hypersil C18**



Acquired : 11/06/2021 14:00:40
 Processed : 11/06/2021 14:09:28
 Printed : 11/06/2021 14:09:52

System : HPLC
 Method : Baclofene-65-35-ACN-eauacidifiée



Results :

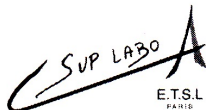
Index	Name	Time [Min]	Quantity [mg/l]	Height [µAU]	Area [µAU.Min]	Area % [%]	As. USP	Res. USP	Width USP [Min]
1	UNKNOWN	0.85	0.12	12979.0	1162.2	1.784	1.90	0.00	0.13
2	UNKNOWN	1.15	1.75	97676.7	16516.4	25.348	2.70	1.60	0.24
3	UNKNOWN	1.53	0.09	9617.3	859.6	1.319	1.10	3.28	0.00
4	UNKNOWN	1.67	0.03	3212.1	259.1	0.398	1.41	0.00	0.00
5	UNKNOWN	2.05	0.01	723.8	61.5	0.094	0.84	5.09	0.15
6	UNKNOWN	3.73	0.03	2365.0	280.1	0.430	1.05	10.13	0.18
7	Baclofène	4.41	0.00	104264.4	45592.4	69.970	3.71	1.69	0.62
8	UNKNOWN	6.41	0.05	2492.1	428.2	0.657	0.83	4.36	0.29
Total			2.07	233330.3	65159.5	100.000			

$p = 25 \text{ bar}$

ANNEXE 2 :

Chromatogram : comprimé de 10 mg de Baclofène dissoud dans un mélange
50-50 ACN-eau acidifiée, puis dilué au demi

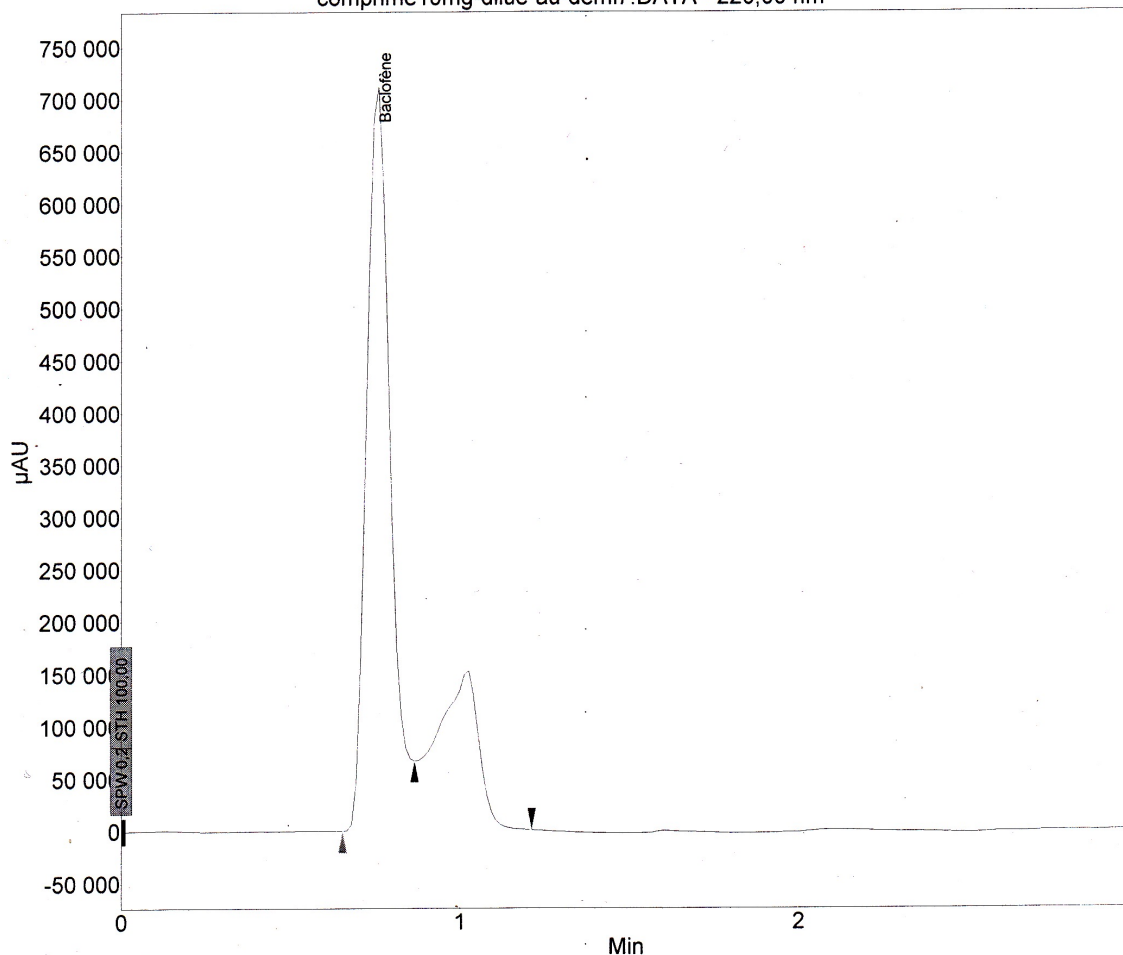
sur colonne **HILIC 2, μm**



Acquired : 11/06/2021 12:46:57
Processed : 11/06/2021 12:51:33
Printed : 11/06/2021 12:52:11

System : HPLC
Method : **Baclofene-65-35-ACN-eauacidifiée**

comprimé10mg-dilué-au-demi7.DATA - 220,00 nm



Results :

Index	Name	Time [Min]	Quantity [mg/l]	Height [µAU]	Area [µAU.Min]	Area % [%]	As. USP	Res. USP	Width USP [Min]
1	Baclofène	0.76	0.00	711635.2	57870.3	72.076	1.26	0.00	0.14
2	UNKNOWN	1.03	2.37	152475.7	22419.8	27.924	0.77	1.46	0.23
Total			2.37	864110.9	80290.2	100.000			

$p = 200 \text{ bar}$

ANNEXE 3 :

Propriétés physico - chimiques de quelques solvants utilisés en chromatographie

solvant	masse molaire (g)	polarité E° Al ₂ O ₃	viscosité (cP ²⁰)	"cut-off" UV* (nm)	densité (d ²⁰)	indice de réfraction (n ²⁰)
EAU <i>solvant le plus polaire</i>	18	>> 1,1	1,00	---	1	1,333
méthanol	32	0,95	0,60	210	0,79	1,329
ethanol	46	0,88	1,20	210	0,79	1,361
acétonitrile	41	0,65	0,37	210	0,79	1,344
diméthyl sulfoxyde	78	0,62	2,24	---	1,10	1,101
dioxane	88	0,56	1,54	220	1,03	1,422
tétrahydrofurane	72	0,45	---	220	0,89	1,408
butanol - 1	74	---	2,98	---	0,81	1,399
chloroforme	119	0,40	0,57	245	1,49	1,443
éthyl éther	74	0,38	0,23	220	0,71	1,353
iso - propyl - éther	102	0,28	0,37	220	0,72	1,363
tétrachlorure de carbone	154	0,18	0,97	265	1,59	1,466
cyclohexane	84	0,04	1,00	210	0,78	1,427
isooctane	114	0,01	---	210	0,69	1,392
n - pentane	72	0,00	0,23	210	0,63	1,358

*Le "cut-off" est la longueur d'onde à partir de laquelle l'absorbance du solvant est telle que l'on ne peut plus l'utiliser (voir figure).

4. TP N° 2 : RAPPORT D'ACTIVITÉ : DOSAGE PAR HPLC DU BACLOFENE CONTENUE DANS UNE SPECIALITE PHARMACEUTIQUE

4.1. Matériels et réactifs

4.1.1. Les solvants utilisés de qualité HPLC

- Déterminer le volume d'acide phosphorique (pureté à 85 %) à prélever pour obtenir de l'eau UP acidifiée à 0,1 % ($\rho = 1,6 \text{ kg.L}^{-1}$; $M = 98 \text{ g.mol}^{-1}$).
- Représenter la forme chimique (formule topologique) de la molécule de Baclofène à cette valeur de pH ($\text{pK}_{a1}(\text{COOH}) = 3,5$ et $\text{pK}_{a2}(\text{NH}_2) = 9,2$).

4.2. Réalisation de la fiole « inconnue » et de la fiole étalon « mère »

- Calcul du volume V_{inc} à prélever :

- Masse exacte pesée en Baclofène étalon : $m_{\text{Baclofène}} =$

4.3. Modification de la phase mobile : effet du pourcentage d'ACN dans l'eau UP acidifiée

4.3.1. Phase mobile : 55/45 ACN/eau acidifiée

- Imprimer le chromatogramme correspondant obtenu sur colonne Atlantis HILIC, le coller ci-après.
Relever la pression p_1 en tête de colonne :

Chromatogramme du
Baclofène en 55/45 ACN/Eau
à coller ici

4.3.2. Phase mobile : 65/35 ACN/eau acidifiée

- Imprimer le chromatogramme correspondant obtenu sur colonne Atlantis HILIC, le coller ci-après.
Relever la pression p_2 en tête de colonne :

Chromatogramme du
Baclofène en 65/35 ACN/Eau
à coller ici

4.3.3. Phase mobile : 75/25 ACN/eau acidifiée

- Imprimer le chromatogramme correspondant obtenu sur colonne Atlantis HILIC, le coller ci-après.
Relever la pression p_3 en tête de colonne :

Chromatogramme du
Baclofène en 75/25 ACN/Eau
à coller ici

- Expliquer pourquoi la détection s'effectue dans l'UV, et non pas dans le visible ?
- Comparer les chromatogrammes obtenus et préciser en la justifiant, quelle est la meilleure proportion de solvant à utiliser pour la suite ?

4.4. Effet du greffage de la phase stationnaire et de la granulométrie de son support

4.4.1. Utilisation d'une colonne ODS HYPERSIL C18 avec phase mobile : 65/35 ACN/eau acidifiée : Analyse des résultats

☞ Ce chromatogramme a été réalisé en 7 minutes à une pression de 25 bar, et se trouve en Annexe 1.

4.4.2. Utilisation d'une colonne Accucore Urea HILIC avec phase mobile : 65/35 ACN/eau acidifiée : Analyse des résultats

☞ Ce chromatogramme a été réalisé en 3 minutes à une pression de 200 bar, et se trouve en Annexe 2.

- Remplir un tableau récapitulatif des données chromatographiques :

Colonnes utilisées	Facteur de capacité k'	t _R (min)	Aire (μAU.min)	R _S	Facteur d'asymétrie A _s	Largeur à la base du pic w (min)
ODS HYPERSIL C18, 5 μm						
Atlantis HILIC 5 μm						
Accucore Urea HILIC 2,6 μm						

- Conclure sur l'élution du Baclofène. Donner un exemple de calcul de k'. Préciser quelle est la meilleure colonne à utiliser pour la suite de l'étude.

4.5. Effets du débit

4.5.1. Débit à 1,2 mL/min

Relever la pression p₄ :

4.5.2. Débit à 0,8 mL/min

Relever la pression p₅ :

- Imprimer le chromatogramme à 0,8 mL/min correspondant, le coller ci-après.

Chromato. obtenu pour un
débit de 0,8 mL/min 65/35
ACN/eau acidifiée
à coller ici

- Imprimer le chromatogramme à 1,2 mL/min correspondant, le coller ci-après.

Chromato. obtenu pour un
débit de 1,2 mL/min 65/35
ACN/eau acidifiée
à coller ici

- Remplir un tableau récapitulatif des données chromatographiques :

Débit (mL/min)	Facteur de capacité k'	t _R (min)	Aire (μAU.min)	R _s	Facteur d'asymétrie A _s	Largeur à la base du pic w (min)
0,8						
1,0						
1,2						

- Quel est l'impact du débit sur le temps de rétention du Baclofène, ainsi que sur les autres facteurs ?
- Expliquer l'évolution des pressions.
- Conclure en précisant le chromatogramme fournissant le meilleur compromis ?

4.6. Dosage par courbe d'étalonnage

4.6.1. Réalisation des fioles de la gamme d'étalonnage

☛ Compléter le tableau ci-dessous :

$C_M =$

Fioles	V(F _M) (mL)	C _{fille} (mg.L ⁻¹)
1	4	
2	8	
3	12	
4	16	
5	20	

Donner un exemple de calcul :

4.6.2. Réalisation de la fiole contenant l'étalon de contrôle

☞ Donner la concentration C_{ref} correspondante.

4.6.3. Obtention de la droite d'étalonnage

Imprimer la droite d'étalonnage avec tous les paramètres utiles :

Droite d'étalonnage à coller ici

Données de la droite
d'étalonnage à coller ici

Chromatogramme inconnu
n° 1 à coller ici

Chromatogramme inconnu
n° 2 à coller ici

4.6.4. Calcul de la concentration des données à l'aide de la courbe d'étalonnage

- Relever la concentration de l'étalon de contrôle (inconnue-connue) C_{EQ} et rechercher si la valeur mesurée (C_{EQ}) est comprise dans l'intervalle d'acceptabilité, soit $C_{ref} \pm 10\%$

- Relever les concentrations du Baclofène inconnue C_1 et C_2 en $mg.L^{-1}$

- $C_1 =$

- $C_2 =$

- Vérifier la compatibilité métrologique dans le cas des deux essais précédemment effectués en répétabilité à l'aide de l'annexe métrologique.

- En déduire la concentration en Baclofène obtenue dans la spécialité pharmaceutique. Vous exprimerez le résultat comme indiqué dans l'annexe métrologique.

4.7. Conclusion générale

- Conclure sur l'ensemble des manipulations réalisées. Comparer avec la valeur fabricant. Discuter des difficultés éventuellement rencontrées.