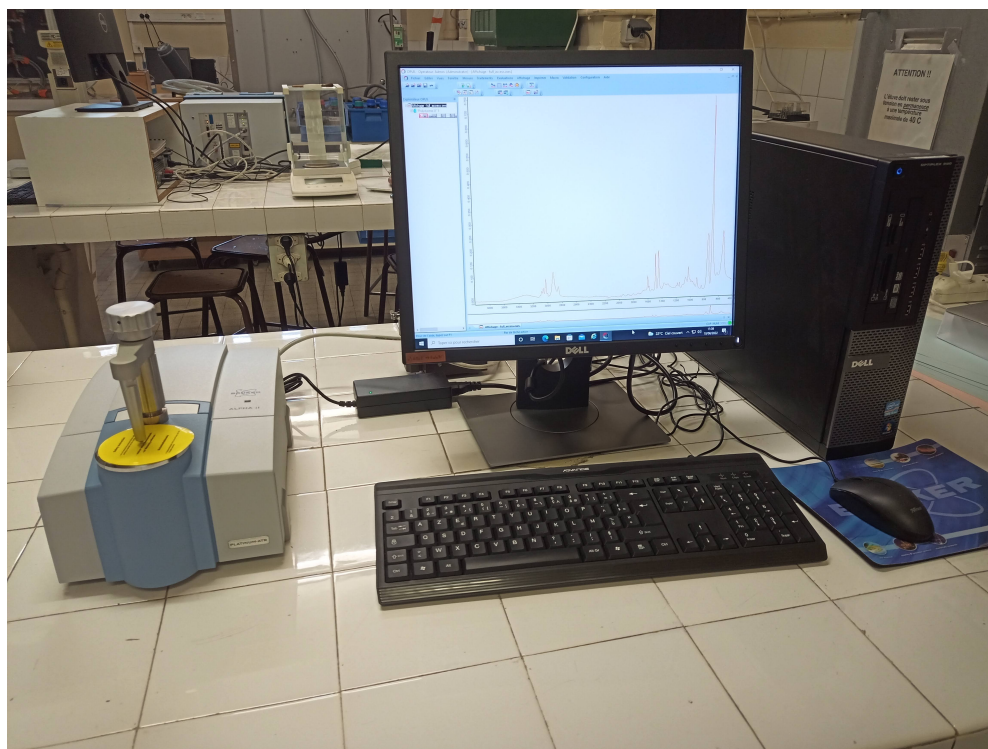


Année 2023 - 2024

2^{ème} année BTS Bioanalyses et Contrôles

Activité technologique en analyse biochimique N°3



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

godin.lionel@orange.fr

TP n°3 : Dosage de la Vitamine C dans une spécialité pharmaceutique

1. BUT	2
2. DOSAGE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE IR EN REFLEXION	2
2.1. Matériel et réactifs	2
2.2. Mode opératoire	3
2.2.1. Préparation de la gamme étalon	3
2.2.2. Réalisation de la fiole contenant l'étalon de contrôle	3
2.2.3. Réalisation de la fiole contenant l'échantillon à analyser	4
2.2.4. Mesures d'absorbance pour chaque étalon et échantillon	4
3. ANALYSE QUALITATIVE DE SPECTRES IR PAR REFLEXION	5
3.1. Analyse du spectre IR de la vitamine C dans l'eau	5
3.2. Acquisition et analyse du spectre IR de l'eau	5
4. DETERMINATION DE LA LOD ET LOQ	6
5. CONCLUSION GÉNÉRALE	6
6. RAPPORT D'ACTIVITÉ	8
6.1. Dosage spectrophotométrique IR en réflexion	8
6.1.1. Préparation de la gamme étalon	8
6.1.2. Réalisation de la fiole contenant l'étalon de contrôle	8
6.1.3. Droites d'étalonnage	9
6.1.4. Étude de l'étalon de contrôle	11
6.1.5. Dosage de la Vitamine C	11
6.2. Analyse qualitative des spectres IR par réflexion	13
6.2.1. Analyse du spectre IR de la vitamine C dans l'eau	13
6.2.2. Analyse du spectre IR de l'eau	15
6.3. Détermination de la LOD et LOQ	17
6.3.1. Tableaux de résultats à 1116 et 1148 cm^{-1}	17
6.3.2. Calcul de la LOD et de la LOQ à 1116 cm^{-1}	17
6.3.2. Calcul de la LOD et de la LOQ à 1148 cm^{-1}	17
6.4. Conclusion générale	17

1. BUT

On se propose de **vérifier la quantité annoncée en vitamine C** par l'industrie pharmaceutique dans une spécialité pharmaceutique en vente libre. Dans un premier temps, on procède à une **dissolution d'un comprimé effervescent dans un solvant approprié**, l'eau.

On **élaborera une gamme d'étalonnage en acide ascorbique étalon**, afin de pouvoir doser la quantité de vitamine C dans la spécialité pharmaceutique.

Dans un second temps, on **analysera le spectre IR de la vitamine C**, puis on déterminera la quantité en masse de vitamine C au moyen de la spectroscopie dans le moyen infrarouge, par réflexion totale atténuée (ATR).

2. DOSAGE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE IR EN REFLEXION

2.1. Matériel et réactifs

- Un comprimé effervescent 1000 mg.
- De l'acide ascorbique ($s = 330 \text{ g.L}^{-1}$).
- 1 fiole jaugée de 50 mL.
- 7 fioles jaugées de 10 mL et 7 compte-gouttes.
- 1 bécher de 25 mL.
- 1 entonnoir en verre avec filtre plissé adapté pour une fiole de 10 mL.
- Un chauffage-agitateur magnétique.
- Une balance électronique du labo. TASS.
- Un spectrophotomètre IRTF **ALPHA II BRUKER** équipé d'un module ATR constitué d'un **crystal Diamant**.

2.2. Mode opératoire

2.2.1. Préparation de la gamme étalon

☞ **Préparer une solution mère d'acide ascorbique** de concentration environ exactement $C_M = 200 \text{ g.L}^{-1}$. Pour cela, peser une masse m_{aa} d'acide ascorbique pur dans un bécher de 50 mL, à dissoudre avec un volume d'eau (inférieur à 40 mL) sous agitation et léger chauffage pendant une dizaine de minutes, afin d'obtenir une solution limpide de couleur ambrée. Vous placerez l'ensemble dans une fiole jaugée de 50 mL que vous complétez avec de l'eau.

Homogénéiser la fiole, en agitant à la main avant de compléter jusqu'au trait de jauge !

On appellera cette fiole, la fiole mère que l'on notera F_M .

☞ **Préparation de la gamme** : Préparer les différentes fioles filles de 10 mL, suivant le tableau ci-dessous :

Fioles	$V(F_M)$ (mL)	C_{aa} (g.L^{-1})
1	2	
2	4	
3	6	
4	8	
5	10	



Rapport

Donner la valeur de m_{aa} .

Remplir le tableau précédent. Donner un exemple de calcul de la concentration dans une des fioles filles.

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

☞ **Préparation de l'étalon de contrôle** : Préparer une fiole CQ de 10 mL, en utilisant $V(F_M) = 5 \text{ mL}$.



Rapport

Donner la concentration C_{ref} correspondante.

2.2.3. Réalisation de la fiole contenant l'échantillon à analyser

☛ **Dissoudre un comprimé effervescent** de vitamine C dans un bécher de 25 mL recouvert d'un verre de montre. Le volume d'eau devra être **inférieur à 10 mL**, et vous procéderez à une agitation lente pendant une quinzaine de minutes. Vous filtrerez l'ensemble dans une fiole jaugée de 10 mL (**Attention** : filtration très lente qui dure environ 30 minutes) que vous complétez avec de l'eau. Homogénéiser la fiole.

2.2.4. Mesures d'absorbance pour chaque étalon et échantillon

☛ Pour l'acquisition des spectres étalon, de l'étalon de contrôle et de l'inconnue :

Utiliser la notice technique du spectrophotomètre IRTF Bruker Alpha II

☛ Vous utiliserez la méthode intitulée : Méthode-ATR-VitamineC.xpm, pour laquelle, Les paramètres de scan sont les suivants :

- **Nombre de Scans : 40**
- **Résolution : 2 cm⁻¹**
- **Apodisation : Norton-Beer weak**
- **Range : 4000 - 600 cm⁻¹**

- Pour chaque fiole étalon homogénéisée, acquérir les spectres 3 fois.
- Pour la fiole « étalon de contrôle » homogénéisée, faites une seule acquisition, et pour la fiole échantillon homogénéisée, en faire 2.
- On peut alors établir 2 courbes d'étalonnage aux nombres d'onde 1116 et 1148 cm⁻¹ donnant la hauteur de la bande en fonction de la concentration.



Rapport

- Rendre les deux courbes d'étalonnage en appliquant un modèle linéaire.



Rapport

- Relever les concentrations de l'étalon de contrôle (inconnue-connue) C_{EQ} et rechercher si les valeurs mesurées (C_{EQ}) sont comprises dans l'intervalle d'acceptabilité, soit $C_{ref} \pm 10\%$ (à faire pour chaque nombre d'onde).
- Relever les concentrations en vitamine C inconnues C_1 et C_2 en $g.L^{-1}$.
- Vérifier la compatibilité métrologique dans le cas des deux essais précédemment effectués en répétabilité à l'aide de l'annexe métrologique (à faire pour chaque nombre d'onde).



Rapport

- Déterminer, la quantité en masse de vitamine C dans le comprimé.

3. ANALYSE QUALITATIVE DE SPECTRES IR PAR REFLEXION

3.1. Analyse du spectre IR de la vitamine C dans l'eau

☞ Imprimer un des spectres obtenus, avec la position des bandes identifiées.

3.2. Acquisition et analyse du spectre IR de l'eau

☞ Faire l'acquisition du spectre du solvant seul, et imprimer le spectre avec la position des bandes identifiées.



Rapport

- Indiquer le type de fonctions organiques prépondérantes dans la structure de la vitamine C et de son solvant l'eau.
- Faire une analyse spectrale intelligente des deux spectres (cf annexe 1 et 2 de la partie théorique pour l'analyse spectrale).

4. DETERMINATION DE LA LOD ET DE LA LOQ

☛ Acquérir 10 spectres de l'eau.

☛ Doser simultanément les 10 spectres, à l'aide des deux méthodes **Quant** précédentes et remplir un tableau de 2 x 10 valeurs de concentration correspondantes.



Rapport

- Calculer les LOD et LOQ.

5. CONCLUSION GÉNÉRALE



Rapport

Commenter l'ensemble des manipulations réalisées.

Comparer la valeur obtenue, avec celle du fabricant, et conclure.

6. RAPPORT D'ACTIVITÉ : DOSAGE DE LA VITAMINE C PAR SPECTROMÉTRIE IRTF

6.1. Dosage spectrophotométrique IR en réflexion

6.1.1. Préparation de la gamme étalon

- ☞ Indiquer la masse d'acide ascorbique pure, que vous avez pesé : $m_{aa} =$
- ☞ Donner la concentration exacte en acide ascorbique dans la fiole mère F_M : $C_M =$

☛ Préparation de la gamme : remplir le tableau ci-dessous :

Fioles	V(F_M) (mL)	C_{aa} (g.L ⁻¹)
1	2	
2	4	
3	6	
4	8	
5	10	

- Donner un exemple de calcul :

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

- Donner la concentration C_{ref} correspondante :

6.1.3. Droites d'étalonnage

- Imprimer les deux courbes d'étalonnage en appliquant un modèle linéaire :

Droite d'étalonnage de la
vitamine C à $\approx 1116 \text{ cm}^{-1}$
à coller ici

Droite d'étalonnage de la
vitamine C à $\approx 1148 \text{ cm}^{-1}$
à coller ici

6.1.4. Étude de l'étalon de contrôle

- Remplir le tableau ci-dessous, par les valeurs données par OPUS :

cc	C_{EQ} en g.L ⁻¹ pour la bande vers 1116 cm ⁻¹	écart relatif σ en g.L ⁻¹ pour la bande vers 1116 cm ⁻¹	C_{EQ} en g.L ⁻¹ pour la bande vers 1148 cm ⁻¹	écart relatif σ en g.L ⁻¹ pour la bande vers 1148 cm ⁻¹
valeur				

- À l'aide de la concentration de l'étalon de contrôle à 1116 cm⁻¹ (inconnue-connue) C_{EQ} , chercher si la valeur mesurée (C_Q) est comprise dans l'intervalle d'acceptabilité, soit $C_{ref} \pm 10\%$.

- À l'aide de la concentration de l'étalon de contrôle à 1148 cm⁻¹ (inconnue-connue) C_{EQ} , chercher si la valeur mesurée (C_Q) est comprise dans l'intervalle d'acceptabilité, soit $C_{ref} \pm 10\%$.

6.1.5. Dosage de la vitamine C

- Pour l'échantillon **inconnue 1** : remplir le tableau ci-dessous, par les valeurs données par OPUS :

inconnue n° 1	C_{11} en g.L ⁻¹ pour la bande vers 1116 cm ⁻¹	écart relatif σ en g.L ⁻¹ pour la bande vers 1116 cm ⁻¹	C_{12} en g.L ⁻¹ pour la bande vers 1148 cm ⁻¹	écart relatif σ en g.L ⁻¹ pour la bande vers 1148 cm ⁻¹
C_1				

- Pour l'échantillon **inconnue 2** : remplir le tableau ci-dessous, par les valeurs données par OPUS :

inconnue n° 2	C_{21} en g.L ⁻¹ pour la bande vers 1116 cm ⁻¹	écart relatif σ en g.L ⁻¹ pour la bande vers 1116 cm ⁻¹	C_{22} en g.L ⁻¹ pour la bande vers 1148 cm ⁻¹	écart relatif σ en g.L ⁻¹ pour la bande vers 1148 cm ⁻¹
C_2				

- Vérifier la compatibilité métrologique entre C_{11} et C_{21} en répétabilité à l'aide de l'annexe métrologique.

- Vérifier la compatibilité métrologique entre C_{12} et C_{22} en répétabilité à l'aide de l'annexe métrologique.

- Pour la **valeur finalement retenue** : remplir le tableau ci-dessous :

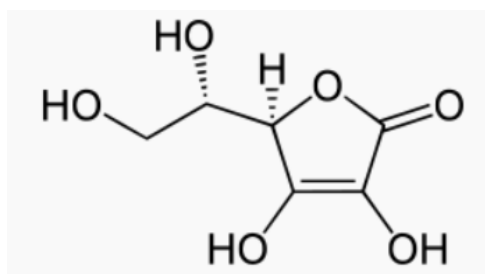
inconnue	C_1 en g.L ⁻¹ pour la bande vers 1116 cm ⁻¹	écart relatif σ en g.L ⁻¹ pour la bande vers 1116 cm ⁻¹	C_2 en g.L ⁻¹ pour la bande vers 1148 cm ⁻¹	écart relatif σ en g.L ⁻¹ pour la bande vers 1148 cm ⁻¹
C_{aa}				

- Déterminer, la quantité en masse de la vitamine C dans le comprimé.

6.2. Analyse qualitative des spectres IR par réflexion

6.2.1. Analyse du spectre IR de la vitamine C dans l'eau

Soit la structure chimique de l'acide ascorbique :



- Indiquer les fonctions organiques principales dans la structure de l'acide ascorbique :

Spectre IR de la vitamine C
dans l'eau
à coller ici

6.2.2. Analyse du spectre IR de l'eau

*Spectre IR de l'eau
à coller ici*

- Faire une analyse spectrale des spectres précédents. Vous indiquerez la liaison, le mode de vibration (élongation ou déformation), le nombre d'onde avec son unité, la forme et l'intensité de la bande observée.

Vous indiquerez particulièrement la correspondance sur les bandes vers 1048 cm^{-1} , 1116 cm^{-1} , 1148 cm^{-1} , et vous indiquerez pourquoi, vous ne voyez pas les bandes d'élongation des fonctions organiques principales de l'acide ascorbique.

Vers $3330\text{-}3340\text{ cm}^{-1}$, et vers $1630\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$ pour le solvant.

6.3. Détermination de la LOD et LOQ

6.3.1. Tableaux de résultats à 1116 cm⁻¹ et à 1148 cm⁻¹

Spectres	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C _{référence} (g.L ⁻¹)										

Calculer la moyenne et l'écart-type sur C_{référence} : < C_{référence} > et s(réf.) à 1116 cm⁻¹.

Spectres	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C _{référence} (g.L ⁻¹)										

Calculer la moyenne et l'écart-type sur C_{référence} : < C_{référence} > et s'(réf.) à 1148 cm⁻¹.

6.3.2. Calcul de la LOD et de la LOQ à 1116 cm⁻¹

$$\text{LOD} = \frac{3.s(\text{réf.})}{a} = \quad \text{et} \quad \text{LOQ} = \frac{10.s(\text{réf.})}{a} =$$

6.3.3. Calcul de la LOQ et de la LOQ à 1148 cm⁻¹

$$\text{LOD} = \frac{3.s'(\text{réf.})}{a'} = \quad \text{et} \quad \text{LOQ} = \frac{10.s'(\text{réf.})}{a'} =$$

6.4. Conclusion générale

Commenter l'ensemble des manipulations réalisées.

Comparer la valeur obtenue, en tenant compte de l'écart relatif avec la valeur fabricant, et conclure.