

Année 2023 - 2024

2<sup>ème</sup> année BTS Bioanalyses et Contrôles

# Activité technologique en analyse biochimique N°6



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

[godin.lionel@orange.fr](mailto:godin.lionel@orange.fr)

# TP n°6 : OPTIMISATION de MÉTHODE & DOSAGE de l'ETHANOL dans une SPÉCIALITÉ PHARMACEUTIQUE par CPG - HEADSPACE

<b>1. BUT ET CONTEXTE</b>	<b>2</b>
1.1. But de la manipulation	2
1.2. Contexte de la manipulation	2
1.3. Toxicité de l'éthanol	3
1.4. Caractéristiques de l'éthanol et du propanol	3
<b>2. MATERIEL ET REACTIFS</b>	<b>4</b>
<b>3. MODE OPERATOIRE</b>	<b>4</b>
3.1. Préparation des solutions inconnue, mère en éthanol et en propanol	4
3.1.1. Préparation de la solution de Bronchokod	4
3.1.2. Préparation de la solution mère d'éthanol et de propanol (étalon interne EI)	5
3.2. Optimisation de la méthode chromatographique	5
3.2.1. Procédure d'acquisition d'un chromatogramme en isotherme à 50°C	5
3.2.2. Procédure d'acquisition d'un chromatogramme en isotherme à 90°C	5
3.3. Identification des pics d'intérêts	6
3.4. Dosage de l'éthanol dans le Néocodion	6
3.4.1. Préparation de la gamme d'étalonnage interne, de l'étalon de contrôle et des inconnues	6
3.4.2. Passage de la gamme et traitements des résultats	7
3.4.3. Résultats	7
<b>4. CONCLUSION GENERALE</b>	<b>7</b>
<b>5. RAPPORT D'ACTIVITÉ</b>	<b>9</b>
5.1. Préparation des solutions	9
5.1.1. Préparation de la solution de Bronchokod	9
5.1.2. Préparation de la solution mère d'éthanol et de propanol	9
5.2. Optimisation de la méthode chromatographique	10
5.2.1. Chromatogramme en isotherme à 50°C	10
5.2.2. Chromatogramme en isotherme à 90°C	11
5.3. Identification des pics d'intérêts	13
5.4. Dosage de l'éthanol dans le Bronchokod	14
5.4.1. Intervalle d'acceptabilité	14
5.4.2. Compatibilité métrologique	15
5.5. Conclusion générale	21

# 1 BUT ET CONTEXTE

## 1.1. But de la manipulation

Le but de la manipulation est double :


- Préparer deux solutions mères d'éthanol et de propanol,
  - Qui doivent permettre de doser l'éthanol dans le Bronchokod.
  - Qui comprend un standard interne = **propanol**.
- Réaliser l'optimisation de la méthode de dosage chromatographique de l'alcool dans le Bronchokod.
- Utilisation de la méthode optimisée afin de doser l'alcool dans le Bronchokod par la méthode de l'étalon interne.

## 1.2. Contexte de la manipulation

Certains sirops contre la toux comme le Bronchokod présente une quantité d'alcool non négligeable qu'il faut contrôler.

La **quantité en éthanol** peut varier, selon le fabricant, **entre 8,3 % à 15,5 %**.

Voici la composition du médicament sous sa forme galénique de sirop adulte :

	<p>Bronchokod est un médicament présenté sous forme de flacon de 250 ml composé de 5 % de carbocistéine soit environ 750 mg par cuillère à soupe. Il est indiqué en cas d'affection respiratoire récente avec difficulté d'expectoration et en cas de toux grasse.</p> <p><b>BRONCHOKOD® Adulte</b> : sirop édulcorée à la saccharine sodique et au maltitol liquide ; flacon de 250 mL</p> <p>Substances actives : carbocistéine à 5 %.</p> <p>Excipients : Gomme xanthane, saccharine sodique, maltitol liquide, éthanol à 96 pour cent, hydroxyde de sodium, arôme caramel*, eau purifiée.</p> <p>*Composition de l'arôme caramel : diacétyl, propylène glycol, acide butyrique, méthylecyclopentenolone, maltol, 4-hydroxy-2,5-diméthyl-3(2H)-furanone, pipéronal et vanilline.</p>
---	---

## 1.3. Toxicité de l'éthanol

L'utilisation de ce médicament est dangereuse chez les sujets alcooliques et doit être prise en compte chez les femmes enceintes ou allaitant, les enfants et les groupes à haut risque tels que les insuffisants hépatiques ou les épileptiques.

La quantité d'alcool dans ce médicament peut modifier les effets d'autres médicaments.

L'éthanol est un dépresseur du système nerveux central, et il est considéré comme une drogue psychotrope. Il agit sur le système nerveux central en interagissant principalement avec les récepteurs GABA, augmentant l'effet d'inhibiteur du neurotransmetteur acide  $\gamma$ -aminobutyrique (ou GABA). Le GABA est un ralentisseur de l'activité des neurones (à l'opposé du glutamate qui est lui un accélérateur de l'information) ; ainsi, en se fixant sur les récepteurs du GABA, l'éthanol exagère le ralentissement du cerveau. Il agit donc comme un modulateur allostérique positif. L'éthanol agit aussi sur les récepteurs de la sérotonine, du glutamate, de l'acétylcholine et de la dopamine. Ses effets négatifs peuvent être exacerbés par le plomb qui renforce le stress oxydatif. Le plomb potentialise l'effet de l'alcool sur le système nerveux central (SNC)

Une consommation prolongée d'éthanol peut ainsi provoquer des lésions permanentes au cerveau et aux autres organes. Le sevrage alcoolique peut provoquer divers symptômes, comme le trouble du déficit de l'attention, une augmentation de la transpiration, de la tachycardie, des trémulations (tremblement des extrémités), parfois des nausées ou des vomissements, une déshydratation, des malaises, de l'hypertension artérielle. Parfois il s'accompagne d'une crise d'épilepsie, d'hallucinations visuelles, tactiles ou auditives, c'est le *delirium tremens* dans sa forme la plus sévère. Éventuellement, et dans de rares cas, des douleurs au niveau de la mâchoire jusqu'au crâne peuvent apparaître. Il a aussi été mis en évidence que l'éthanol entraînait des modifications visibles à l'œil nu de la taille de la matière grise.

## 1.4. Caractéristiques de l'éthanol et du propanol

Caractéristiques physico-chimique de l'éthanol et de l'étalon interne utilisé, le propanol :

Composés	masse molaire (g.mol <sup>-1</sup> )	température d'ébullition (°C)	densité	Aspect	solubilité
Ethanol	46,1	78,4	0,789	liquide à température ambiante	très soluble dans l'eau
propanol	60,1	97	0,803	liquide à température ambiante	très soluble dans l'eau

## 2. MATERIEL ET REACTIFS

- 2 fioles de 10 mL ;
- De l'eau UP comme solvant ;
- De l'éthanol pur ;
- Une bouteille de Bronchokod® ;
- Du propanol utilisé comme étalon interne ;
- Une micropipette P100-1000 ;
- **Headspace TurboMatrix HS16 Perkin-Elmer** relié par une ligne de transfert inerte de 1 m sur le Chromatographe GC450.
- **Des vials de 20 mL avec bouchons à vis magnétique et septa adaptés.**
- **Chromatographe Varian GC450** piloté via réseau par un PC sous windows XP équipé du logiciel **CompassCDS 3.0** ; celui-ci est équipé de deux colonnes, deux injecteurs et un TCD.

**Attention à ne jamais mettre en service avant d'avoir vérifié le passage effectif du gaz vecteur dans le TCD**

- \* Gaz vecteur : Hélium
- \* Colonnes : ① Colonne apolaire, (CP CIL 5) 100 % méthyl, en position médium L = 15 m ;  
② Colonne polaire, (CP – WAX 52 CB) en PolyÉthylèneGlycol (PEG), en position frontale L = 15 m.
- \* Sortie du signal sur un intégrateur à microprocesseur.
- \* Injection via un Headspace.

## 3. MODE OPERATOIRE

### 3.1. Préparation des solutions inconnue, mère en éthanol et en propanol

#### 3.1.1. Préparation d'un vial de 1 mL de Bronchokod dans lequel on rajoute l'étalon interne : le propanol



Rapport

Calculer la masse  $m_{\text{EtOH}}$  d'éthanol moyenne indiquée par le fabricant du Bronchokod®, sachant qu'il y a 11,9 % d'éthanol soit 11,9 mL pour 100 mL de sirop.

En déduire la concentration en éthanol dans le Bronchokod®.

On utilisera la même concentration pour l'étalon interne : le propanol.

➤ À l'aide de la P100-1000, déposer 1 mL de sirop dans un vial de 10 mL. Placer le vial ainsi rempli sur le plateau d'une balance et tarer. Rajouter à l'aide d'un compte-goutte, une masse environ exactement de 93,89 mg de propanol pur. **Noter la valeur exacte pesée dans le CL.**

Remarque : il faut 5 gouttes pour obtenir 97 mg de propanol !

➤ Fermer le vial avec un bouchon à vis, et le placer en position 1 sur le carrousel du HS16.

### 3.1.2. Préparation de la solution mère d'éthanol et la solution mère de propanol (étalon interne EI)

➤ Placer une fiole de 10 mL sur le plateau de la balance et tarer. À l'aide d'un compte-goutte, peser environ exactement 3,13 g d'éthanol pur. Compléter à l'eau UP jusqu'au trait de jauge. Cette fiole sera la fiole mère  $S_M(\text{EtOH})$  qui servira pour élaborer la future gamme d'étalonnage.

**Noter la valeur exacte pesée dans le CL.** En déduire la concentration en solution mère d'éthanol  $C_M(\text{EtOH})$ .

➤ Faire la même chose pour le propanol. Cette fiole sera la fiole mère  $S_M(\text{PropOH})$  qui servira pour élaborer la future gamme d'étalonnage.

**Noter la valeur exacte pesée dans le CL.** En déduire la concentration en solution mère de propanol  $C_M(\text{PropOH})$ .

## 3.2. Optimisation de la méthode chromatographique

### 3.2.1. Procédure d'acquisition des chromatogrammes en isotherme à 50°C

**Utiliser la notice technique du Turbomatrix HS16 et du chromatographe GC450 Varian**

### 3.2.2. Procédure d'acquisition des chromatogrammes en isotherme à 90°C

**Utiliser la notice technique du Turbomatrix HS16 et du chromatographe GC450 Varian**



Rapport

Comparer les chromatogrammes entre eux.

Que dire de la durée d'analyse et de la forme des pics en fonction de la valeur de l'isotherme de température ?

En déduire la meilleure isotherme d'analyse.

### 3.3. Identification des pics d'intérêts

Utiliser la notice technique du Turbomatrix HS16 et du chromatographe GC450 Varian



Rapport

Donner les temps de rétention caractéristiques de l'éthanol et du propanol dans les conditions chromatographiques idéales déterminées précédemment. Expliquer pourquoi l'éthanol "sort" avant le propanol ?  
Que représente le 1<sup>er</sup> pic ?

### 3.4. Dosage de l'éthanol dans le Bronchokod<sup>®</sup>

#### 3.4.1. Préparation de la gamme d'étalonnage interne, de l'étalon de contrôle et des inconnus

➤ **Préparation de la gamme** : l'étalon interne sera prélevé à l'aide d'une P100-1000 dans la fiole contenant la solution mère de propanol.

L'éthanol sera prélevé dans la fiole contenant la solution mère d'éthanol.

Préparer la gamme d'étalonnage en vials de 10 mL avec bouchon adéquat + septum, suivant le tableau ci-dessous : (Attention : vous réaliserez cette gamme en **duplicata**)

Vials	EI (propanol) (mL)	Ethanol (mL)	Concentration exacte en EI (g/L)	Concentration exacte en éthanol (g/L)
1	0,3	0,1		
2	0,3	0,2		
3	0,3	0,3		
4	0,3	0,4		
5	0,3	0,5		
6	0,3	0,6		

Vous complétez avec de l'eau UP, qsp 1 mL.

➤ **Préparation de l'étalon de contrôle** : vous préparez un vial CQ, dans laquelle vous placerez 0,3 mL d'EI et 0,35 mL d'éthanol, complété à l'eau UP, qsp 1 mL.

Vial	EI (propanol) (mL)	Ethanol (mL)	Concentration exacte en EI (g/L)	Concentration exacte en éthanol (g/L)
CQ	0,3	0,35		$C_{ref} =$

➤ **Préparation de 2 vials inconnus** : À l'aide de la P100-1000, déposer 1 mL de sirop dans un vial de 10 mL. Placer le vial ainsi rempli sur le plateau d'une balance et tarer. Rajouter à l'aide d'un compte-goutte, une masse environ exactement de 93,89 mg de propanol pur. Recommencer la procédure une autre fois et **noter les valeurs exactes pesées dans le CL**.

➤ Fermer les vials avec un bouchon à vis, et les placer en position 14 et 15 sur le carrousel du HS16.

### 3.4.2. Passage de la gamme et traitement des résultats

Utiliser la notice technique du Turbomatrix HS16 et du chromatographe GC450 Varian

### 3.4.3. Résultats



Rapport

Relever la valeur de la concentration en éthanol dans l'étalon de contrôle  $C_{EQ}$  donnée par le logiciel. Rechercher si cette valeur est comprise dans l'intervalle d'acceptabilité  $C_{ref} \pm 10\%$



Rapport

Indiquer les valeurs  $C_1$  et  $C_2$  des concentrations en éthanol dans la solution inconnue.

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

Donner la valeur retenue pour la concentration en éthanol  $C_{Ethanol}$ . Vous exprimerez le résultat comme indiqué dans l'annexe métrologique.



Rapport

Rendre la courbe d'étalonnage interne et indiquer la concentration en g/L en éthanol dans le Bronchokod.

Déterminer la masse  $m_{éthanol}$  d'éthanol, et le % d'éthanol dans le Bronchokod.

Comparer avec la valeur indiquée par le fabricant.

## 4. CONCLUSION GENERALE



Rapport

Conclure sur l'ensemble des manipulations réalisées.





# 5. TP N° 6 : RAPPORT D'ACTIVITÉ : OPTIMISATION DE METHODE & DOSAGE DE L'ÉTHANOL DANS LE BRONCHOKOD PAR CPG - HEADSPACE

## 5.1. Préparation des solutions

### 5.1.1. Préparation de la solution inconnue de Bronchokod

Calculer la masse  $m_{\text{EtOH}}$  d'éthanol moyenne indiquée par le fabricant du Bronchokod<sup>®</sup>, sachant qu'il y a 11,9 % d'éthanol soit 11,9 mL pour 100 mL de sirop.

En déduire la concentration en éthanol dans le Bronchokod<sup>®</sup>.

### 5.1.2. Préparation des solutions mères d'éthanol et de propanol

Calculer la concentration en éthanol dans la fiole mère correspondante,  $C_M(\text{EtOH})$  :

Calculer la concentration en propanol dans la fiole mère correspondante,  $C_M(\text{PropOH})$  :

## 5.2. Optimisation de la méthode chromatographique

### 5.2.1. Chromatogramme en isotherme à 50°C

Chromatogramme sauvegardé  
en isotherme à 50°C à coller ici

## 5.2.2. Chromatogramme en isotherme à 90°C

Chromatogramme sauvegardé  
en isotherme à 90°C à coller ici

Comparer les chromatogrammes entre eux.

Que dire de la durée d'analyse et de la forme des pics (hauteur, aire et largeur) en fonction de la valeur de l'isotherme ?

En déduire la meilleure isotherme d'analyse.

### 5.3. Identification des pics d'intérêt

#### Chromatogramme d'un vial « vide »

Chromatogramme sauvegardé  
du vial « vide » à coller ici

Donner les temps de rétention caractéristiques de l'éthanol et du propanol dans les conditions chromatographiques idéales déterminées précédemment.

Expliquer pourquoi l'éthanol "sort" avant le propanol ?

Que représente le 1<sup>er</sup> pic ?

## 5.4. Dosage de l'éthanol dans le Bronchokod

### 5.4.1. Intervalle d'acceptabilité

Compléter le tableau ci-dessous :

Vials	EI (propanol) (mL)	Ethanol (mL)	Concentration exacte en EI (g/L)	Concentration exacte en éthanol (g/L)
1	0,3	0,1		
2	0,3	0,2		
3	0,3	0,3		
4	0,3	0,4		
5	0,3	0,5		
6	0,3	0,6		

Relever la valeur de la concentration en éthanol dans l'étalon de contrôle  $C_{EQ}$  donnée par le logiciel.  
Rechercher si cette valeur est comprise dans l'intervalle d'acceptabilité  $C_{ref} \pm 10 \%$  et conclure.

## 5.4.2. Compatibilité métrologique

Indiquer les valeurs  $C_1$  et  $C_2$  des concentrations en éthanol dans la solution inconnue.

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

Donner la valeur retenue pour la concentration en éthanol  $C_{\text{Ethanol}}$ . Vous exprimerez le résultat comme indiqué dans l'annexe métrologique.



Rendre la courbe d'étalonnage interne, le chromatogramme correspondant à l'étalon de contrôle et les 2 chromatogrammes inconnus. Coller les 4 feuilles correspondantes ci-dessous :

*Courbe d'étalonnage à coller  
ici*

Chromatogramme sauvegardé  
CQ  
à coller ici

Chromatogramme sauvegardé  
incl  
à coller ici

Chromatogramme sauvegardé  
inc2  
à coller ici

- Indiquer la concentration en g/L en éthanol dans le Bronchokod.
- Déterminer la masse  $m_{\text{Ethanol}}$  d'éthanol, et le % d'éthanol dans le Bronchokod.
- Comparer avec la valeur indiquée par le fabricant.

## 5.5. Conclusion générale

Conclure sur l'ensemble des manipulations réalisées. Discuter des difficultés éventuellement rencontrées.