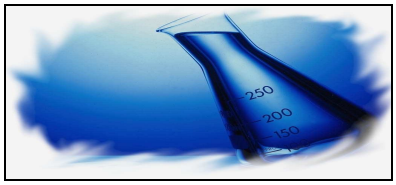
Université Sidi Mohammed Ben Abdellah
Faculté des Sciences et Techniques
www.fst-usmba.ac.ma

Année Universitaire : 2011-2012

Licence Sciences et Techniques : TACQ

Techniques d'analyses et contrôle de qualité



Mémoire de fin d'études

Pour l'Obtention du Diplôme de licence Sciences et Techniques

Validation Analytique de Dosage de la Metformine par la Méthode HPLC

Présenté par:

MOHAMED ADIL MAHRAZ

Encadré par:

- Pr.Youssef Khabbal, CHU Fès - FMP

- Pr. abdelhadi lhassani, FST de Fès

Soutenu Le Juin 2012 devant le jury composé de:

- **Pr. Youssef KHABBAL**
- **Pr. Abdelhadi LHASSANI**
- **Pr. Hamid WAHBI**
- **Pr. Jamal HAZM**

Stage effectué à : Unité de Pharmacologie au laboratoire central de CHU Fès

Dédicace

A mes très chers parents

A ceux que j'aime le plus au monde, A ceux qui m'ont tout donné sans compter.

Vous avez été pour moi tout au long de mes études le plus grand symbole d'amour de dévouement qui n'a ni cessé ni diminué.
En ce jour, j'espère réaliser l'un de vos rêves, et j'espère ne jamais vous décevoir, ni trahir votre confiance.
Que dieu vous garde et procure santé, bonheur, et longue vie pour que vous demeuriez le flambeau illuminant le chemin de vos enfants.

A mon très cher frère Amine,

Tu m'as toujours soutenu dans les moments difficiles. Ton affection n'a d'égale que ta gentillesse.
Avec mon grand amour, je te dédie ce travail en te souhaitant beaucoup de bonheur et un avenir plein de joie.

A mon très cher frère Adnane, sa femme Khadija,

Votre encouragement, affection et votre spontanéité de cœur me sont très chers.

Que dieu vous protège et vous offre un avenir plein de succès, de bonheur, et de santé.

A toute ma famille,

Je vous dédie ce travail en vous souhaitant tout le bonheur du monde.

A mon très cher ami genoun,

Je n'ai jamais connu un garçon de ta gentillesse et ton amabilité, jamais je n'oublierai tous

les moments passés ensemble.

Que ce travail, si modeste qu'il soit témoignage de ma gratitude et ma profonde affection.

A mes amis (es) et ceux qui me sont chers,

Je vous dédie ce travail avec mes sentiments les plus sincères, en mémoire de tous les moments agréables vécus ensemble.

A toute la promotion 2011/20112 de la faculté de sciences et techniques de fes Option : techniques d'analyses et contrôle de qualité.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le directeur du centre hospitalier universitaire Hassan II de Fès de m'avoir accueilli au sein de son établissement.

Je remercie particulièrement Pr. A. AMARTI, chef du laboratoire pour m'avoir autorisé d'effectuer mon stage de fin d'études.

Je remercie le Pr. Y. KHABBAL, d'avoir accepté de m'encadrer au sein de laboratoire de biochimie (unité de pharmacologie). Votre gentillesse extrême, votre compétence pratique, vos qualités humaines et professionnelles ainsi que votre compréhension à l'égard des étudiants m'inspirent une grande admiration et un profond respect.

Je remercie le Pr. Abdelhadi LHASSANI, pour la gentillesse et la spontanéité avec lesquelles vous avez bien voulu diriger ce travail.

Messieurs les jurys, je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail.

Liste d'abréviation

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance.

UV : Rayonnement ultraviolet.

P : Pression.

T : Température.

STP : Suivi Thérapeutique Pharmacologique.

ATP : Adénosine Triphosphate.

LDL : Cholestérol de faible densité.

VLDL : Cholestérol de très faible densité.

HDL : Cholestérol de Haute Densité.

ICH : International Conférence en Harmonisation.

SFSTP : Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques.

SF : Solution Fille.

SS : Solution Standard.

AMPK : actividad monophosphate kinase

Sommaire

Introduction générale 7

Présentation générale du laboratoire 8

I. La Metformine 11

I .1. Définition

I .2 Mode d'action biologique de la Metformine

I .3 Structure chimique 12

I .4 Propriétés physico-chimiques

I .5 La synthèse de la Metformine 13

I .6 Les utilisations médicales

I .7 Les effets indésirables

I .8 Les produits de santé naturels et Metformine 14

II. La validation analytique de dosage de la Metformine par la méthode HPLC 15

II .1 Définition et objectif de la validation

II .2 Les critères de la validation de la définition à la pratique

III. La méthode de dosage par HPLC 18

III .1 Principe de fonctionnement

III .2 Les composants d'une chaîne HPLC 19

III .3 Qualité de la séparation 23

IV. Matériels et méthodes 26

IV.1 Matériels

IV.2 Mode opératoire 27

IV.3 Validation de la technique analytique

V. Discussion 31

VI. Conclusion

VII. Références 33

Introduction générale

Le diabète de type 2 est une maladie caractérisée par une hyperglycémie chronique, c'est-à-dire par un taux trop élevé de glucose (sucre) dans le sang. Cette maladie survient généralement chez les adultes avançant en âge, et touche davantage les personnes obèses ou ayant un surplus de poids.

Chez un individu sain, le contrôle de la glycémie se fait par l'insuline, une hormone sécrétée par le pancréas. L'insuline permet l'entrée du sucre dans les cellules pour qu'il soit utilisé comme carburant, particulièrement dans les muscles et le foie. Chez une personne atteinte de diabète de type 2, l'organisme devient incapable de réguler la glycémie, c'est-à-dire le taux de glucose dans le sang. C'est alors que la glycémie s'élève (on parle d'hyperglycémie).À long terme, si la glycémie n'est pas abaissée par des traitements, cela peut causer de graves problèmes de santé, en particulier des **problèmes cardiovasculaires**.

L'objectif de ce stage est de valider une seule méthode en chromatographie liquide à haute performance Couplée à une détection à barrette diode efficace pour le dosage de la totalité de Metformine.

Cette technique serait employée Pour effectuer le SCREENING (détection) de Metformine ainsi que leur dosage dans les prélèvements de nature hospitalière. La mise au point a consisté en la détermination des paramètres instrumentaux pour L'ensemble des molécules en fonction de leurs propriétés physico-chimiques puis en La détermination du meilleur solvant d'extraction afin d'obtenir le meilleur rendement Possible.

La validation de la méthode vérifie les paramètres de linéarité des gammes d'étalonnages, de justesse et d'exactitude des contrôles de qualité.

Présentation générale du laboratoire

Figure 1 : CHU Hassan II Fès **Figure 2** : le laboratoire central

Le Laboratoire Central d'Analyses Médicales est conçu comme un pôle d'activité hospitalière comportant plusieurs spécialités d'analyses médicales :

- Anatomie pathologique;
- Bactériologie-Immunoanalyses;
- Parasitologie;
- Biochimie et pharmaco-toxicologie;
- Hématologie;
- Génétique médicale et biologie moléculaire.

Il se compose de :

- Salle de réception;
- Salle de prélèvements;
- Laboratoire de biochimie/Pharmacotoxicologie;
- Laboratoire d'hématologie;
- Laboratoire de bactériologie /Immunologie;
- Laboratoire de parasitologie;
- Laboratoire de génétique;
- Laboratoire d'anatomie pathologique.

Le laboratoire de biochimie dispose d'automates de dernière génération permettant de réaliser près de 100 analyses de biochimie courante, de protéines spécifiques et de médicaments. Il comporte également l'appareillage et les compétences nécessaires pour la réalisation des examens de pharmacologie et de toxicologie.

L'unité de pharmacologie a débuté en 2008, a pour objet la surveillance du risque d'effet indésirable résultant de l'utilisation des médicaments.

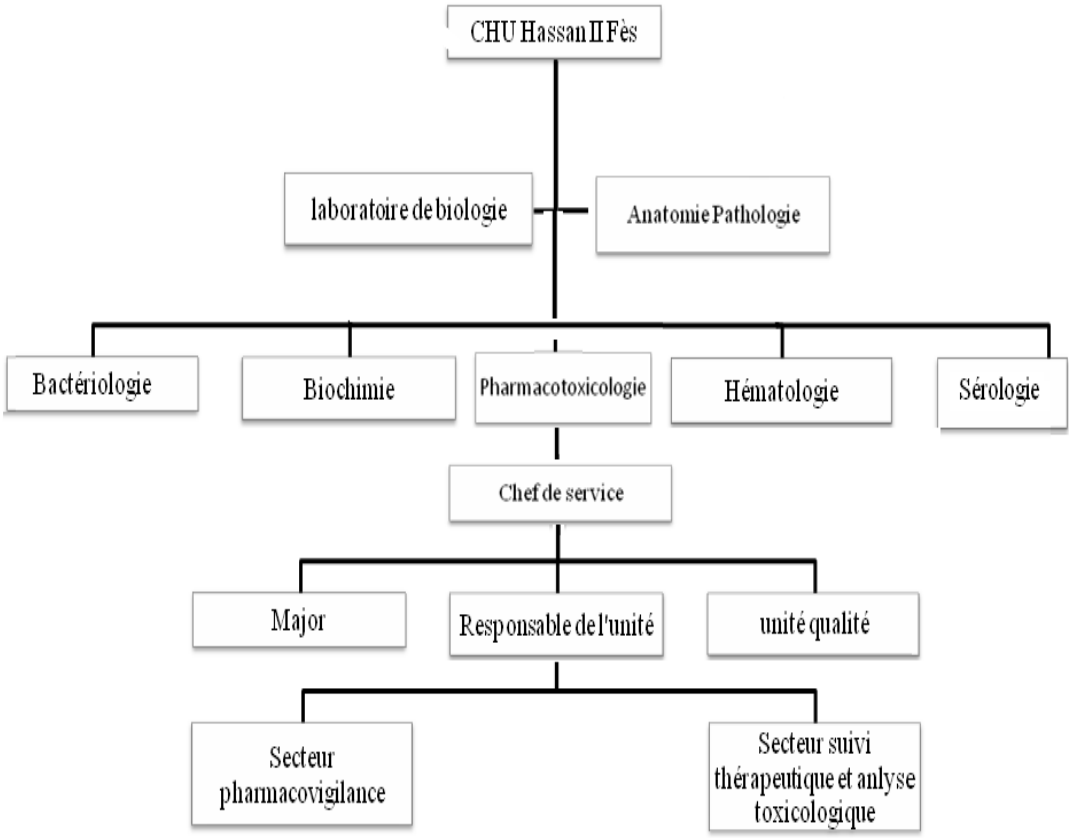


Figure 3: Organigramme descriptif du Centre hospitalier universitaire

Partie I :

Partie bibliographique

I. La Metformine

I .1. Définition

La Metformine est le médicament le plus prescrit pour traiter les patients atteints le diabète de type 2 appelé aussi diabète non insulinodépendant. Cette molécule réduit l'hyperglycémie en diminuant la production de glucose par le foie.

La Metformine est un antidiabétique oral sous l'appellation de Glucophage. Ce médicament est utilisé avec succès depuis plus de 40 ans pour traiter le diabète de type 2. En particulier chez les patients présentant de surpoids ou d'obésité. Ceci est dû à son efficacité et sa faible capacité à provoquer des hypoglycémies ainsi que l'absence de prise de poids. Bien que son utilisation soit très étendue et prouve de bonnes performances, le mécanisme d'action de la Metformine demeure mal compris.

Chez les personnes atteintes le diabète de type 2, la glycémie se maintient au-dessus des valeurs normales. À long terme, des graves complications vasculaires peuvent survenir si la glycémie n'est pas revenue à ses valeurs normales, alors, la Metformine réduit l'hyperglycémie par inhibition de la production excessive de glucose par le foie. (1)

I .2 Mode d'action biologique de la Metformine

Dans cette nouvelle étude, Marc Foretz, chercheur au CNRS, Benoit Viollet, chercheur à l'Inserm et leur équipe (Inserm U1016, CNRS, UMR8104, Université Paris Descartes) ont démontré que la modulation de l'activité de l'AMPK n'a pas de conséquence directe sur la régulation de la production de glucose par le foie. De plus, ils ont prouvé que le mode d'action à court terme de la Metformine est indépendant de l'AMPK et d'un effet génitique. Finalement, ces chercheurs montrent que le médicament inhibe la production de glucose hépatique par un mécanisme purement énergétique en modifiant le fonctionnement des mitochondries, un organite cellulaire produisant de l'énergie sous forme d'ATP.

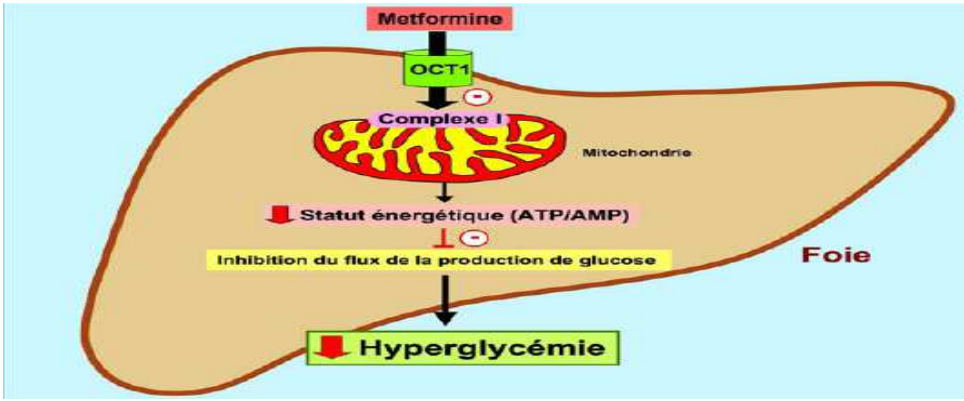


Figure 4 : *Schéma de* mécanisme d'action de la Metformine

En effet, la formation de glucose par le foie nécessite un apport important d'énergie sous forme d'ATP. L'administration de Metformine entraîne une diminution modérée de la production d'ATP dans les cellules du foie mais suffisante pour réduire le flux de la production de glucose hépatique. (2 ,3)

I .3 Structure chimique

- Formule brute : $C_4H_{11}N_5$
- Nomenclature : *N, N-diamide* Dimethylimidodicarbonimidic

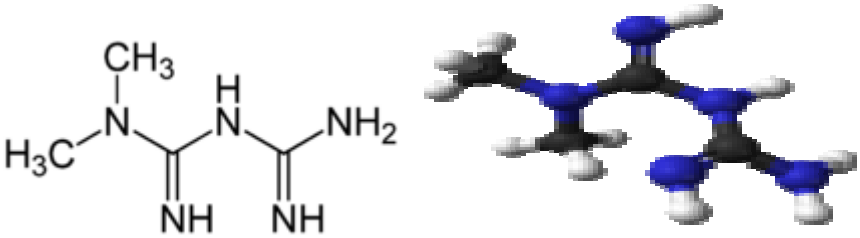


Figure 5: Schéma de la structure chimique de la Metformine

I .4 Propriétés physico-chimiques

Le tableau ci-contre récapitule les propriétés physico-chimiques de la Metformine

Tableau 1: Propriétés physico-chimiques de la Metformine

Propriétés chimiques	Formule brute	$C_4H_{11}N_5$
	Masse molaire	129,16 $g.mol^{-1}$
	Pka	2,8 et 11,5
Propriétés physiques	T° fusion	218-220 °C
	Solubilité	Dans l'eau et l'alcool éthylique à 95%

I .5 La synthèse de la Metformine

Comme d'habitude, la synthèse de la Metformine, initialement décrite en 1922 et reproduite dans plusieurs brevets et publications ultérieures, implique la réaction de la diméthylamine chlorhydrate et 2-cyanoguanidine (dicyandiamide) avec chauffage.

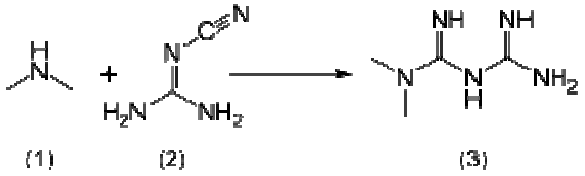


Figure 6: La réaction de la diméthylamine chlorhydrate et 2-cyanoguanidine (dicyandiamide)

Selon la procédure décrite dans le brevet 1975 Aron, et *l'Encyclopédie Fabrication de produits pharmaceutiques*, équimolaires quantités de diméthylamine et 2-cyanoguanidine sont dissous dans le toluène avec système de refroidissement pour faire un concentré solution, et une quantité équimolaire de chlorure d'hydrogène on ajoute lentement. Le mélange commence à bouillir sur son propre, et après refroidissement, le chlorhydrate de Metformine précipite avec un 96% de rendement. (4)

I .6 Les utilisations médicales

L'utilisation de la Metformine est faite principalement dans le traitement de diabète sucré de type 2. En particulier, les personnes obèses. Après plus de 10 ans de traitement par la Metformine, une réduction des complications du diabète et de la mortalité globale d'environ 30% est remarquée par rapport à ceux utilisant de l'insuline et des sulfonylurées (glibenclamide et le chlorpropamide), et d'environ 40% par rapport au groupe qui ont suivis seulement des conseils diététiques. Cette différence s'est tenue sur des gens qui ont été suivis pendant cinq à 10 ans après l'étude. Comme le contrôle intensif de la glycémie par la Metformine semble diminuer le risque de diabète liés aux points de terminaison dans les personnes souffrant de surpoids et qui sont atteints de diabète, et est associée à un gain au niveau de la réduction de poids et encore des attaques hypoglycémiques minimes comparable à ceux qui prennent de l'insuline et des sulfonylurées, d'où ce traitement peut être considéré comme un traitement de première ligne pharmacologique de choix pour ce groupe. (5)

I .7 Les effets indésirables

La plus commune effet négatif de la Metformine est troubles gastro-intestinaux, y compris la diarrhée , des crampes, des nausées, des vomissements et une augmentation des flatulences ; la Metformine est plus communément associé à des effets secondaires gastro-intestinaux que la plupart des autres médicaments antidiabétiques. L'effet secondaire le plus potentiellement grave en conséquence d'utilisation du Metformine est l'acidose lactique; cette complication est très rare, et la grande majorité de ces cas semblent être liés à la comorbidité, comme une insuffisance hépatique ou rénale, plutôt que de la Metformine lui-même.

La Metformine a également été signalé à diminuer les taux sanguins de l'hormone thyréotrope chez les personnes avec une hypothyroïdie, et chez les hommes, la testostérone La signification clinique de ces changements est encore inconnue. (6)

I .8 Les produits de santé naturels et Metformine

- *Vitamine B12 et Metformine*

Selon les études épidémiologiques, la neuropathie diabétique périphérique (NDP) a une prévalence de 26 à 47% chez les diabétiques. Tel que mentionné plus haut, la prise de Metformine peut entraîner une déficience en vitamine B12 avec comme conséquence des problèmes de NDP. In vivo, de très hautes doses de méthylcobalamine (une des deux formes de coenzymes de la vitamine B12) ont stimulé la régénération nerveuse.

- *Vitamine C et Metformine*

La vitamine C, associée à la Metformine, réduit le cholestérol total, le cholestérol de faible densité (LDL) et le cholestérol de très faible densité (VLDL), sans avoir d’effet sur le cholestérol de haute densité (HDL).

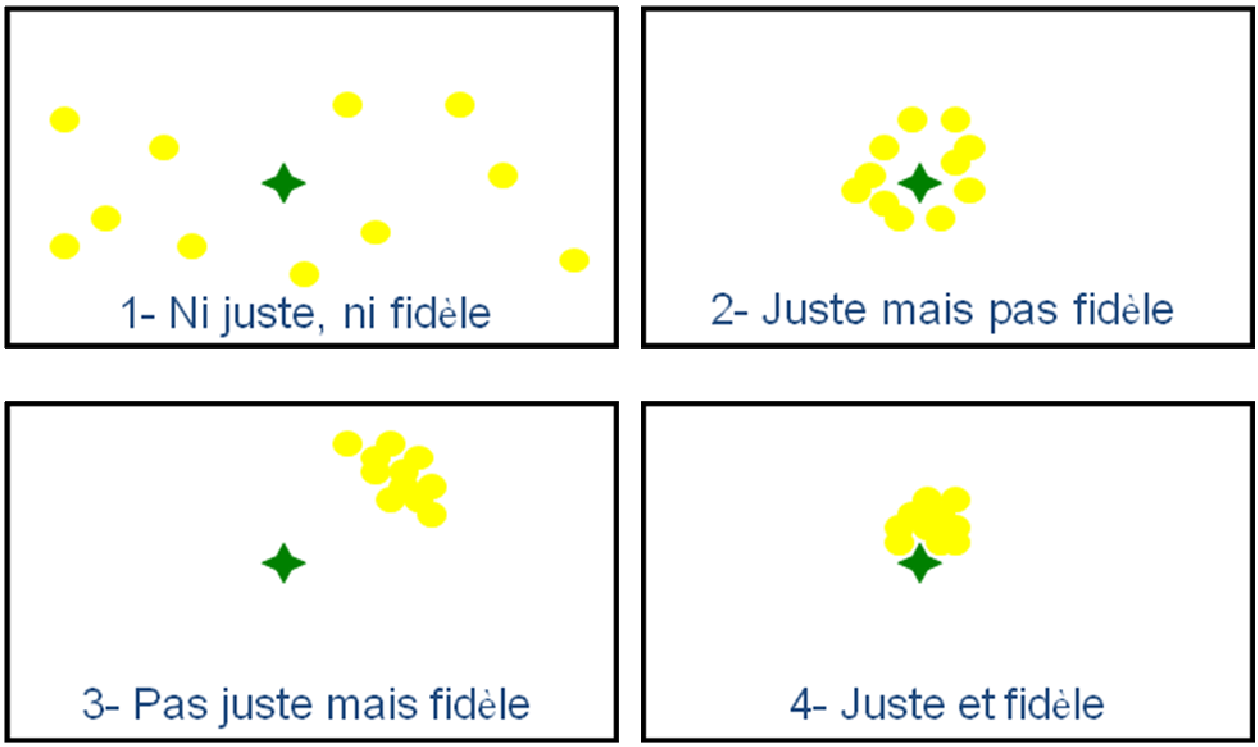
- *Chrome et Metformine*

Sous forme organique (chrome trivalent : Cr3+), le chrome joue un rôle important comme activateur essentiel des récepteurs à insuline. Un apport en chrome ne semble pas réduire les taux de glucose en euglycémie (taux normaux de sucre sanguin), mais pourrait les réduire en hyperglycémie. Comme la Metformine est un médicament qui ne provoque pas d’hypoglycémie, l’ajout de chrome ne peut que favoriser un meilleur équilibre glycémique,

pour ceux qui souffraient du diabète de type 2 que ceux de type 1. (7)

II. La validation analytique de dosage de la Metformine par la méthode HPLC

II .1 Définition et objectif de la validation



La validation d'une méthode est la procédure par laquelle on prouve que le protocole est suffisamment exact et fiable pour avoir confiance dans les résultats fournis et ceci pour un usage déterminé. Donc, son principal objectif est de démontrer que chaque mesure réalisée sera assez proche de la valeur vraie ou dans les limites acceptables. Selon le besoin de l'analyse, ses critères sont fixés en fonction de la finalité de la procédure analytique.

Le protocole expérimental appliqué est basé sur une méthodologie commune inspirée de la stratégie des guidelines: ICH (International Conférence en Harmonisation) et celles de la SFSTP (Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques) pour garantir la qualité des résultats avec un risque connu prédéfini en fonction de la finalité de la méthode d'analyse à valider.

II .2 Les critères de la validation de la définition à la pratique

La validation d'une méthode analytique consiste à vérifier certains critères. Dans cette

partie, on va décrire, théoriquement et pratiquement, ces principaux critères:

- **Spécificité** : C'est la capacité à identifier puis à quantifier un analyte sans équivoque en présence de composé endogène de la matrice.
  - ***En pratique :*** On fait une identification spectrale et un temps de rétention des analytes (cela veut dire, on compare les spectres UV des molécules à une bibliothèque spectrale).
- **Sélectivité** : C'est l'aptitude d'une méthode à quantifier un analyte sans équivoque et à le séparer des produits de dégradation, des métabolites et des composées Co-administrés.
  - ***En pratique :*** Ce critère est fondé sur une démonstration, dans un blanc matrice (plasma, urine), de l'absence de réponse au temps de rétention de l'analyte par comparaison avec une solution pure de l'analyte.
- **Fidélité** : C'est l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon. Elle fournit des indications sur les erreurs liées au hasard, elle peut être évoluée à 3 niveaux :
  - **La répétabilité** : C'est l'analyse d'un même échantillon dans des conditions identiques : même laboratoire, même opérateur, même lots de réactifs, même équipement et pendant un court intervalle de temps.
    - ***En pratique :*** On prépare au moins trois gammes à partir de la même solution mère, et on calcule la moyenne, l'écart type et le coefficient de la variation de la série de mesures.
  - **La fidélité intermédiaire (intra-laboratoire)** : Concerne les mesures effectuées à l'intérieur d'un même laboratoire, quand un ou plusieurs facteurs sont changés (jour, opérateur, équipement…) pendant un intervalle de temps donné.
    - ***En pratique :*** On la pratique pendant trois différents jours dont le premier jour correspond à la détermination de la répétabilité.
  - **La reproductibilité (inter-laboratoire)** : C'est l'analyse d'un même échantillon par une même méthode mais dans un laboratoire différent.
- **Justesse (ou biais)** : Il s'agit de déterminer la justesse des valeurs obtenues par un rapport aux valeurs dites vraies.

- ***En pratique :*** On compare les moyennes obtenues par les quatres déterminations de chaque point de gamme avec les valeurs des références certifiées telle que des contrôles externes de qualité.
- **Linéarité** : c'est la capacité, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, à produire des résultats directement proportionnels à la concentration de l'analyte. Il s'agit le plus généralement d'une droite.
- ***En pratique :*** Une droite d'étalonnage est extrapolée à partir de chaque gamme représentant la concentration en fonction de rapport surface de pic de la molécule / surface du pic d'étalon interne. La pente, l'ordonné à l'origine et le coefficient de corrélation doivent être calculés pour chaque courbe.
- **Limite de détection de quantification (LDQ)** : C'est la plus petite concentration pouvant être mesurée avec à la fois une justesse acceptable (justesse > 80% ou biais < 20%).
- ***En pratique :*** Elle est déterminée par essais de répétabilité et de la fidélité intermédiaire sur des concentrations de plus en plus faible.
- **Robustesse** : C'est la capacité d'une méthode analytique à rendre des résultats valables en présence de modifications limitées des conditions expérimentales ou environnementales.
- **Stabilité** : Pour chaque analyte, on doit déterminer a priori le délai de péremption des solutions d'analyte, en fonction des spécifications du fabriquant ou de la connaissance de la molécule de référence.
- **Contamination entre échantillon** : Il est nécessaire d'étudier la contamination inter-échantillon. Pour cela, un échantillon de faible concentration est injecté à la suite d'un échantillon de forte concentration afin de mettre en évidence un éventuel « relargage » de l'analyte par la colonne chromatographique.
- **En pratique** : Après le rinçage de l'appareil; on analyse trois fois un échantillon de forte concentration en analyte (H1, H2, H3) et un échantillon de faible concentration (B1, B2, B3). Et on calcule la contamination en % = *100*(B1-B2)/H.*
  Avec : *H* la moyenne des trois analyses de l'échantillon de forte concentration
- **Rendement d'extraction "RE"**: Il est mesuré par le pourcentage de l'analyte retrouvé après prétraitement de la matrice par comparaison à la même concentration en solution pure.
- **En pratique** : RE (%) = 100*(surface du pic de la molécule après prétraitement) / (surface du pic de la molécule en solution).

Le rendement d'extraction est acceptable s'il est supérieur à 85%.(8,9).

III. La méthode de dosage par HPLC

III .1 Principe de fonctionnement

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique.

Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

Il est souvent difficile de trouver rapidement les conditions opératoires qui mèneront à une bonne séparation en raison des interactions du soluté avec la phase stationnaire et la phase mobile.

Il est par ailleurs préférable, avant d'entreprendre une analyse par la technique HPLC, d'avoir une idée a priori des éléments ou constituants que va révéler l'analyse pour pouvoir se focaliser sur une gamme de longueurs d'onde de largeur restreinte.

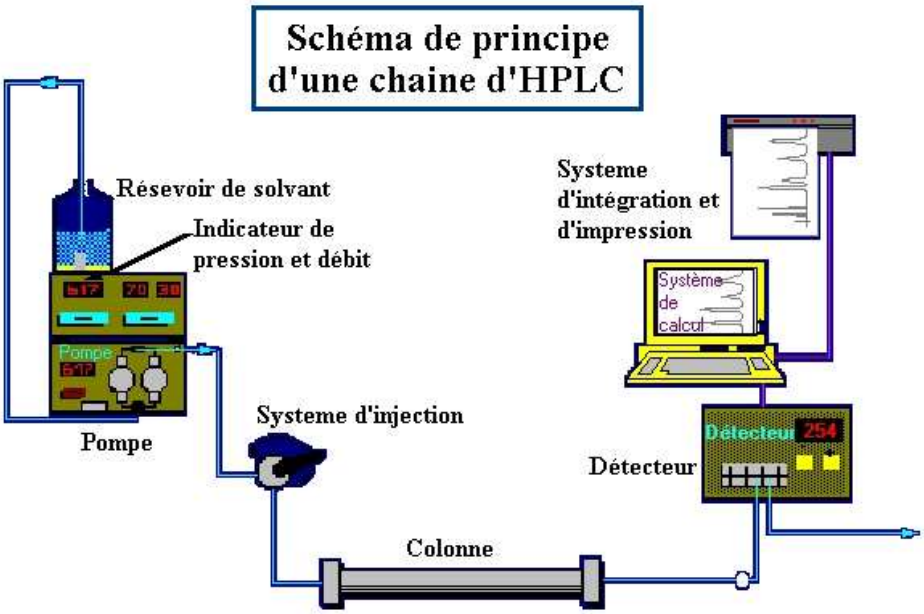


Figure 7: Schéma de principe d'une chaîne d'HPLC

III .2 Les composants d'une chaîne HPLC

❖ *Réservoir*

Le plus souvent, un *Erlenmeyer* tient lieu de réservoir pour l'éluant. On recommande cependant l'emploi d'un vase clos pour éviter l'évaporation, surtout si l'un des solvants est très volatil et lorsqu'il est nécessaire d'être en présence d'un gaz inerte.

❖ *Pompes*

Les pompes ont constitué, au moment de la mise au point de la technique, la principale cause de difficulté des utilisateurs. Le débit de liquide qu'elles refoulaient étant fréquemment irrégulier, il en résultait sur l'enregistrement, une ligne de base instable.

Les problèmes semblent être résolus, car certaines pompes fournissent désormais un débit constant jusqu'à des pressions de 240 bars; elles demeurent tout de même la partie la plus délicate de l'appareillage.

❖ *Injecteurs*

Le type d'injecteur le plus courant consiste en une vanne à boucle d'échantillonnage, on introduit d'abord l'échantillon dans une boucle de volume connu; après rotation de la vanne,

la phase mobile entraîne l'échantillon en tête de colonne.

- *Colonne*

Les colonnes devant recevoir la phase stationnaire sont généralement en acier inoxydable, celles d'usage général, servant à l'analyse qualitative, ont un diamètre intérieur de 4 mm et une longueur de 3 à 15 cm , les tubes capillaires employés pour relier la colonne au détecteur, doivent être le plus court possible afin de limiter les volumes morts et par conséquent ne pas altérer la qualité de la séparation , un fabricant a mis au point un dispositif permettant de réduire encore ce volume mort en employant une colonne de matière plastique soumise à une pression radiale.

- *Solvants*

Il est recommandé de toujours employer des solvants traités spécifiquement pour la **HPLC**; Ils doivent être dégazés et filtrés avant usage. Le dégazage est effectué au moment de la filtration sous vide ou par ultra sons; il assure une bonne reproductibilité et évite l'apparition d'une oscillation sur la ligne de base, malgré la haute qualité des solvants.

La filtration sur filtre spécial (0,4 µm) est recommandée pour empêcher l'obstruction éventuelle des orifices par les particules.

On ne doit pas utiliser des solvants « stabilisés » car les substances Stabilisatrices donneront un signal indésirable dans le détecteur.

Le choix du solvant constitue habituellement la partie la plus difficile de type de chromatographie.

Il est toujours préférable de faire quelques essais sur couches minces avant de se lancer

Dans le développement d'une méthode de séparation en HPLC. Il faut utiliser en priorité les

Mélanges suivants:

Méthanol-eau

Acétonitrile-eau

Tétrahydrofurane-eau

On fait d'abord les essais avec une forte proportion d'eau, puis on augmente progressivement La proportion en solvant organique jusqu'à obtention d'une bonne séparation.

Avec un mélange de solvants de composition constant, il n'est pas toujours possible d'obtenir Une bonne résolution et une durée d'analyse raisonnable.

Pour concilier les deux, on peut opérer par élution graduée, c'est à dire par augmentation graduelle du pourcentage de solvant ayant la force d'élution la plus élevée.

- *Phase stationnaire*

Les phases stationnaires en HPLC sont très variées: On peut travailler par échange d'ions ou par perméation sur gel d'où les nombreuses possibilités d'application de la méthode.

La silice est l'absorbant choisi lorsqu'on désire effectuer une chromatographie solide-liquide, elle s'applique bien aux composés organiques de masse inférieure à 2000 et à la séparation de composants renfermant des groupements fonctionnels différents, Par contre la séparation est difficile si les composés à dissocier sont peu polaires et elle requiert une grande quantité de solvant organique.

La chromatographie de partage est beaucoup plus usuelle, d'autant que le développement de phases stationnaires greffées peu polaires autorise l'emploi de phases mobiles aqueuses dans lesquelles le solvant organique est en faible proportion. Ces phases sont formées par silanisation des groupements hydroxyle de la silice, Dans ce cas la chromatographie est dite à polarité de phase inversée car plus le solvant est moins polaire (proportion élevée en eau), moins il entraîne les substances organiques peu polaires : Ces dernières sont davantage retenues par la phase stationnaire faiblement polaire.

- Si la phase stationnaire est polaire, les composés polaires seront plus retenus que les composés non polaires.
- Si la phase stationnaire est apolaire, les composés apolaires seront plus retenus que les composés polaires.

❖ *Détecteur*

Le détecteur UV-visible (celui que nous utilisons) mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne. On opère une longueur d'onde constante, celle-ci ayant été fixée par l'opérateur. La lampe Deutérium est utilisé pour des longueurs d'ondes variant de 190-350 nm et la lampe à vapeur de mercure est utilisé *à* la longueur d'onde non variable de 254 nm. Pour que ce type de détecteur soit utilisable, il faut que : le produit à détecter absorbe la lumière à une longueur **d'onde accessible à l'appareil,** et que son coefficient d'absorption soit suffisamment grand.

- la phase mobile n'absorbe pas la lumière à la longueur d'onde choisie par l'opérateur.

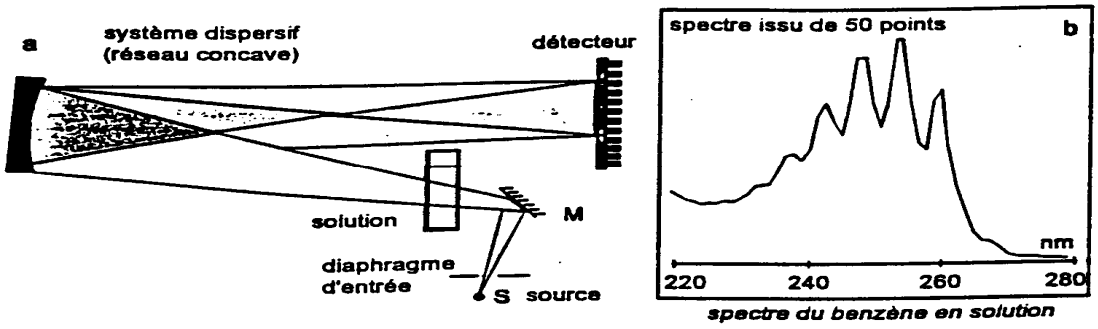


Figure 8: Schéma du Principe du détecteur UV

L'absorbance d'une solution est proportionnelle à sa concentration et à la longueur de l'échantillon comme indiqué ***la loi de Beer-Lambert***. La spectroscopie UV-visible peut donc être utilisée pour déterminer cette concentration. Cette détermination se fait dans la pratique soit à partir d'une courbe d'étalonnage qui donne l'absorbance en fonction de la concentration, soit quand le coefficient d'extinction molaire est connu. Sous le nom de facteur de réponse.

Un spectrophotomètre UV-visible peut être utilisé comme détecteur pour une HPLC. La présence d'un analyte donne une réponse que l'on peut supposer proportionnelle à la concentration. Pour des résultats précis, la réponse de l'instrument à l'analyte dans la solution inconnue doit être comparée à un étalon : c'est assez similaire à l'utilisation de courbe d'étalonnage. La réponse (la hauteur de pic) pour une concentration donnée est connue sous le nom de facteur de réponse.

La technique d'analyse est souvent utilisée dans un mode quantitatif pour déterminer la concentration d'une entité chimique en solution, en utilisant la ***Loi de Beer-Lambert*** :

$$A_\lambda = -\log 10 \frac{I}{I_0} = \varepsilon_\lambda .l.C$$

Avec :

ε_λ : Le coefficient d'extinction molaire à la longueur d'onde choisie ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) .

(I/I_0) : La transmittance de la solution (sans unité)

A_λ : L'absorbance ou densité optique à une longueur d'onde λ choisie.

C : La concentration de la solution (en $mol.L^{-1}$).

ℓ : elle correspond à l'épaisseur de la cuvette utilisée (en cm).

Cette équation est utile pour la chimie analytique. En effet, si **ℓ** et $\boldsymbol{\varepsilon_\lambda}$ sont connus, la concentration d'une substance peut être déduite d'une simple mesure d'absorbance à cette longueur d'onde.

La loi de Beer-Lambert est utile pour caractériser de nombreux composés, elle ne doit pas être considérée comme une relation universelle pour caractériser la concentration et l'absorption de toutes les substances. Une relation polynomiale du deuxième ordre entre le coefficient d'extinction et la concentration est parfois considérée pour les très grandes molécules complexes, par exemple les colorants organiques comme l'**orange de xylénol** ou le **rouge neutre.** (10, 11, 12,13)

III .3 Qualité de la séparation

La séparation entre les pics chromatographiques se base sur plusieurs critères:

- *La sélectivité (α)*

Elle est définit comme le rapport des temps de rétention réduits.

$$\alpha = \frac{t'_{rB}}{t'_{rA}}$$

Avec α est toujours supérieur à 1 ($t'_{rB} > t'_{rA}$).

- *La résolution (R)*

Elle quantifie la qualité de la séparation en caractérisant le fait qu'il y ait ou non un chevauchement entre 2 pics contigus.

$$R = 2\frac{(t'_{rB} - t'_{rA})}{(\omega_{0B} + \omega_{0A})}$$

R < 1 : mauvaise résolution

1 < R < 1,4 : résolution acceptable

1,4 < R < 1,6 : résolution optimale

R > 1,5 : résolution très bonne car le temps d'analyse est rallongé

Il est parfois utile d'exprimer cette résolution en fonction de la sélectivité et de l'efficacité entre les deux derniers pics étudiés

$$R = \frac{1}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{K'_B}{1 + K'_B} \times \sqrt{Nth}$$

La largeur d'un pic est caractérisée par l'efficacité de la séparation : plus le pic est fin plus la chromatographie est efficace. L'efficacité est mesurée par le nombre de plateaux théoriques *Nth* qui est définit comme suite:

$$Nth = 5{,}54 \times \left(\frac{t_r}{\delta}\right)^2$$

Où t_r est temps de rétention et δ la largeur du pic à mi-hauteur.

NB: *Nth* est très utilisé en HPLC. Pourtant il serait plus judicieux d'utiliser *Neff* (nombre de plateaux effectifs) puisqu'il dépend vraiment du temps passé dans la phase stationnaire.

$$Neff = 5{,}54 \times \left(\frac{tr - tm}{\delta}\right)^2$$

Expérimentalement *tm* est difficile à déterminer, donc on préfère toujours utiliser le *Nth*.

- *La hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT)*

Elle est définit comme suite:

$$HEPT = \frac{L}{N_{th}}$$

Avec *L* est la longueur de la colonne. (14)

Partie II : partie pratique

IV. Matériels et méthodes

IV.1 Matériels

a. Réactifs

Dans notre expérience, on a utilisé à part le réactif principal qui est le Metformine, d'autres réactifs secondaires en vue de valider les caractéristiques prescrites de ce médicament.

- Acétonitrile
- Tampon Phosphate
- Méthanol
- Sérum humain

b. Appareillage

Les différents matériels utilisés dans nos expériences pour le dosage de la Metformine sont les suivants :

- Micropipette et tube
- Congélateur
- HPLC-Shimadzu
- La centrifugeuse : permet de séparer des éléments cellulaires solides, d'élément liquide

c. L'appareil HPLC

L'appareil HPLC, comme décrite précédemment, est quasiment le même qu'on a utilisé dans notre laboratoire sauf des modifications notamment au niveau de l'injecteur qui est dans notre cas automatisé.

Figure 9: Appareillage de l'HPLC-Shimadzu

Les conditions chromatographiques utilisé par l'HPLC sont :

- Phase mobile (Mode isocratique) : mélange de 62.5% tampon phosphate potassium (12.5Mm ; PH=7.3) avec 37.5% acétonitrile.
- Phase stationnaire : le gel de silice, pré colonne C18, colonne C18 (250*4.6)
- Le débit = 1ml/min
- Température optimale : 40°C
- Analyse à λ =230 nm

IV.2 Mode opératoire

a. Préparation de la solution mère

On pèse 5 mg de médicament de Metformine et on ajoute 5 ml de méthanol, puis, on l'agite quelque seconde. La concentration finale de la solution mère est égale à 1mg/ml.

b. Préparation des solutions standard

La seconde phase après la préparation de la solution mère consiste à préparer des solutions filles (SF) de concentration 50 µg/ml : on prend 100µl de la solution mère et on rajoute 1900µl de H_2O provenant de l'HPLC.

Les solutions standard prisent de la manière suivante:

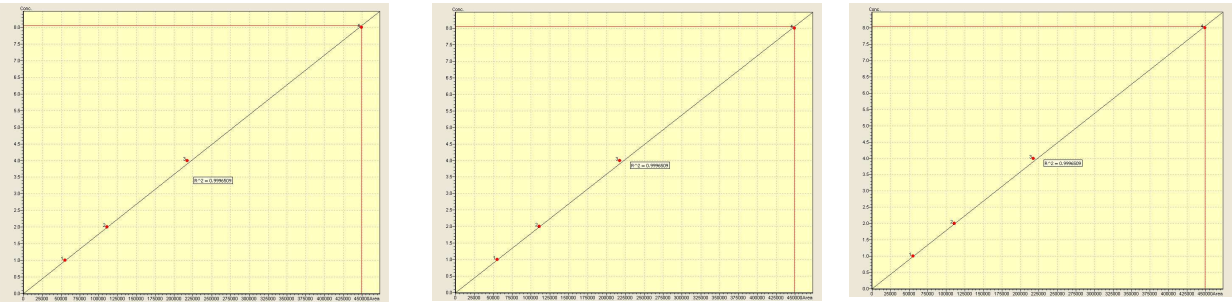
- **P8** : 160µl de SF + 840 µl de sérum
- **P4** : 500µl de P8 + 500µl de sérum
- **P2** : 500µl de P4 + 500 µl de sérum
- **P1** : 500 µl de P2 + 500µl de sérum.

L'extraction est réalisée à l'aide du solvant Acétonitrile: On prend 500µl d'Acétonitrile et on rajoute 500µl de l'échantillon prise de chaque point séparément. Après l'agitation par un vortex, on sépare les deux phases en fonction de leur densité par un Centrifugeuse. Finalement, on maintient uniquement 50µl de la phase correspondante au faible densité qui est le surnagent.

IV.3 Validation de la technique analytique

Essai de linéarité

À partir de la même solution mère, on prépare et on analyse 3 gammes d'étalonnage. Les résultats obtenus sont interprétés dans les graphes suivants :



a- 1ère gamme d'étalonnage b- 2éme gamme d'étalonnage c- 3éme gamme d'étalonnage

Figure 10 : La représentation des trois gammes d'étalonnage exprimant la concentration en fonction de l'aire de pic

Tableau 2 : Résultats du test de linéarité de la Metformine

	Courbe de linéarité	Coefficient de corrélation (R)
1ère gamme d'étalonnage	$y = 1{,}7927.10^{-5}x + 0$	0,9998255
2éme gamme d'étalonnage	$y = 1{,}78333.10^{-5}x + 0$	0,9998998
3éme gamme d'étalonnage	$y = 1{,}78208.10^{-5}x + 0$	0,9999048

Essais de répétabilité

L'analyse est faite sur trois gammes d'étalonnages différentes. Chaque gamme présente quatre concentrations étudiées d'une manière répétitive. Pour cela, nous avons calculé la moyenne (m) et l'écart type (σ) afin de calculer le coefficient de variation (C.V) selon la formule suivante :

$$C.V = \left(\sigma / m\right) \times 100$$

Tableau 3 : Résultats du test de répétabilité de la Metformine

	C (mg/ml) / M_i	1	2	4	8,1
Metformine	M1	55452,5	111446,1	220115,8	451304,2
	M2	54790,9	111372,3	219695,8	451193,2
	M3	55032,9	111157,4	217390	449208,9
	m	55092,1	111325,267	219067,2	450568,767
	σ	334,749339	149,986744	1467,60004	1178,98612
	C.V	0,60761768	0,13472839	0,66993144	0,26166619

Référence certifiée : C.V entre 0,1 et 0,8

Avec :

M_i : l'aire de pic

C_i : la concentration

m : la moyenne

σ : écart type

D'après ces résultats on constate que le C.V appartiennent au domaine de Référence certifiée donc la répetabilité est bien validée.

Essais de fidélité intermédiaire

On la pratique pendant trois différents jours dont le premier jour correspond à la détermination de la répetabilité.

Tableau 4 : Résultats du test de fidélité intermédiaire de la Metformine

	C (mg/ml) / M_i	1	2	4	8,1
Metformine	M1	55457,5	111416,1	220120,8	451300
	M2	54793	111370,4	219698,1	451193,2
	M3	55033,7	111155,8	217391	449200,3
	m	55094,7333	111314,1	219070	450564,5
	σ	336,428095	336,4281	336,4281	336,4281
	C.V	0,61063567	0,302233	0,153571	0,074668

Référence certifiée : C.V entre 0,1 et 0,8

D'après ces résultats on constate que le C.V appartiennent au domaine de Référence certifiée donc la fidélité intermédiaire est bien validée.

La sélectivité

La démonstration est effectuée en comparant le Blanc avec un échantillon qui contient le Metformine en vue de voir leurs temps de rétentions de chacun. Les graphes suivants illustre les résultats obtenus.

Figure 11: Spectre chromatographique du Blanc

Figure 12: Spectre chromatographique d'un échantillon de Metformine

A partir des figures 12 et 13, on peut observer que les temps de rétentions du Blanc et d'un échantillon de Metformine ne s'interférent pas. Donc, la spécificité est bien validée

La spécificité

On fait une identification spectrale et un temps de rétention des analytes (cela veut dire, on compare les spectres UV des molécules à une bibliothèque spectrale).

La figure 12 montre que le temps de rétention de metformine est : 5 ,42min et dans la bibliothèque spectrale la metformine sorte avec un temps de rétention égale a 5,44 min cela veut dire que la critère de spécificité est bien validé

V. Discussion

La chromatographie liquide haute performance est une technique largement utilisée pour le dosage du médicament de la metformine qui est bien séparée dans les conditions opératoires déjà décrites .Leur temps de rétention est : 5.42min

Au cours de cette étape d'optimisation de la méthode on a utilisé pour la phase mobile deux proportions équimolaire de solvant de la phase mobile (tampon phosphate et acétonitrile) mais on a obtenu des pic qui ne sont pas bien séparés c'est pour cela on a varié le pourcentage du solvant de la phase mobile (mélange de 62.5% tampon phosphate potassium ; PH=7.3 avec 37.5% acétonitrile) on a obtenu des pic qui sont bien sélective avec une bonne résolution.

On a utilisé comme phase stationnaire : le gel de silice qui est polaire, et une phase mobile apolaire cela signifie que le genre de la phase qu'on a utilisé est de type normale, le débit = 1ml/min, et la température optimale est égale a 40°C, la longueur d'onde optimale et maximum qui permet l'absorption de l'échantillon est égale 230 nm.

VI. Conclusion

En guise de conclusion, la technique d'analyse par chromatographie liquide à haute performance présentée dans ce modeste mémoire est convenable pour le dosage du médicament de la Metformine.

En effet les conditions chromatographiques et la méthode d'extraction adaptée

permettent une bonne séparation de médicament avec un temps d'analyse relativement court.

Par ailleurs, la technique est sélective vis-à-vis la substance endogène, ainsi les résultats de la validation montrent une bonne linéarité, fidélité intermédiaire, spécificité et répetabilité de la technique de dosage du médicament étudié. En effet, la procédure bio-analytique de dosage proposée est acceptable et correspond à l'usage pour lequel le suivi thérapeutique pharmacologique est prévisible, ceci témoigne l'aspect pratique et efficace de la technique.

VII. Références

(1) Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA, 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes [archive], N Engl J Med, 2008;359:1577–1589

(2) Lord JM, Flight IH, Norman RJ, Metformin in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis [archive], BMJ, 2003;327:951-953

(3) Legro RS, Barnhart HX, Schlaff WD, et als. Clomiphene, metformin, or both for infertility in the polycystic ovary syndrome [archive], N Engl J Med, 2007;356:551-566

(4) Polycystic Ovary Syndrome Writing Committee, American Association of Clinical Endocrinologists position statement on metabolic and cardiovascular consequences of polycystic ovary syndrome [archive], Endocr Pract 2005;11:126-134

(5) Memmott M, Mercado JR, Maier CR et als, Metformin prevents tobacco carcinogen–induced lung tumorigenesis [archive], Cancer Prev Res, 2010;3:1066-1076

(6) De Jager J, Kooy A, Lehert P et als. Long term treatment with metformin in patients with type 2 diabetes and risk of vitamin B-12 deficiency: randomised placebo controlled trial [archive], BMJ, 2010;340:c2181

(7) Wile DJ, et al. Association of metformin, elevated homocysteine, and methylmalonic acid levels and clinically worsened diabetic peripheral neuropathy. Diabetes Care 2010;33:156-61

(8) Recommendations de l'ICH: Validation of Analytical Procedures: text and methodology [Q2 (R1)], 1994-1996 Publié par l'ICH (International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use)

(9) Recommendations du NIST: NIST Guidelines for Evaluating and Expressing Uncertainty of NIST Measurement Results (NIST technical note 1297, 1994 edition) Document interne au National Institute of Standards and Technology

(10) K. Anton & C. Berger, Supercritical Fluid Chromatography with Packed Columns, Chromatographic Science Series, vol. 75, Marcel Dekker, New York, 1998

(11) L. S. Ettre, « The Centenary of the Invention of Chromatography », in Journal of Chromatographic Science, pp. 225-226, vol. 41, 2003

(12) K. M. Gooding & F. E. Regnier, HPLC of Biological Macromolecules, Chromatographic Science Series, vol. 51, Marcel Dekker, New York, 1990

(13) J. de Graeve, F. Berthou & M. Prost, Méthodes chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse, Masson, Paris, 1986