

Année Universitaire : 2017-2018

Master Sciences et Techniques : CMBA
Chimie des Molécules Bio Actives



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Développement d'un nouveau protocole expérimental de contrôle des métaux lourds par la spectroscopie d'absorption atomique : application à un médicament en mode flamme et à un produit diététique en mode

Présenté par :

HAMID Fatima Ezzahra

Encadré par:

Pr. H. GRECHE

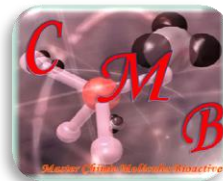
Dr. M. FARIS

Soutenu Le 12 juin 2018 devant le jury composé de:

- Pr. H. GRECHE : Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès - Encadrant
- Dr. M. FARIS : Chef de service de contrôle des produits de santé au LNCM - Encadrant
- Pr. EL.H. LAMCHARFI : Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès - Examinateur
- Pr. EL.H. ALILOU : Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès - Examinateur
- Pr. N. IDRISSE KANDRI : Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès - Examinateur

Stage effectué au : Laboratoire National de Contrôle des Médicaments - Direction du
Médicament et de la Pharmacie - RABAT-

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques



HAMID Fatima Ezzahra

Année Universitaire : 2017/2018

Titre : Développement d'un nouveau protocole expérimental de contrôle des métaux lourds par la spectrométrie d'absorption atomique : Application *au cas d'un médicament en mode flamme et d'un produit diététique en mode four*

Résumé

L'objectif du travail s'inscrit dans le cadre de la recherche scientifique pour la mise en place d'une méthode analytique de contrôle des médicaments et des produits de santé.

Dans ce mémoire on a travaillé sur un médicament antianémique, par la méthode spectroscopique d'absorption atomique en mode flamme, renfermant le complexe hydroxyde ferrique saccharose sous forme de solution injectable et qui contient le fer (III) en quantité bien dosée de 20 mg/ml. La deuxième matrice choisie est un complément alimentaire qui est un lait pour nourrisson avec une dose bien précise de 360µg/100g, pour lequel on a dosé le cuivre par la même technique en mode four.

Notre méthode développée au sein du LNCM concernant le médicament antianémique lors de la 1^{ère} étude a donné une valeur rapprochée à celle de la méthode fourni par le fabricant, dont le résultat trouvé est 20,03mg /ml de fer avec un écart type de 0,15 %. Pour la deuxième étude du cuivre la température du chauffage de la dissolution du lait à un effet sur les résultats du dosage, ou la température de 40°C à donner un résultat rapprochée de celle affichée sur l'étiquette du lait, avec une valeur trouvée de 249,01µg/100g de cuivre avec un écart type de 3,06 % .

Mots clés : Fer, Cuivre, Médicament, Complément alimentaire, Spectroscopie d'absorption atomique.

DEDICACE

Je dédie ce projet :

***A ma chère Mère,
A mon Cher Père,***

*Ma raison d'être, la latente qui éclaire mon chemin,
Je leur présente ma gratitude pour
Leur soutien, encouragements et sacrifices qui
M'ont toujours donné la force de poursuivre mes études.*

***A mon cher Frère,
A ma chère Sœur et son mari,
A mes nièces***

*Qui ont été toujours présentes à tout moment en apportant leur aide
précieuse, et qui m'ont chaleureusement encouragé et supporté tout au
long de mon parcours.*

Au Dr Mustapha Faris

*Qui malgré ses nombreuses occupations et responsabilités, a sacrifié
toute son énergie pour réaliser ce travail original. Que ce travail soit le
modeste témoignage de ma haute considération et mes profonds
respects.*

A mes chères Amis ...

*Pour leurs aides et supports dans les moments difficiles, et qui m'ont
toujours encouragé vers le succès.*

A tous ceux

*Qui ont cru en moi et qui me donnent l'envie d'aller en avant, je vous
remercie, votre encouragement et votre soutien me donnent la force de
continuer.*

REMERCIEMENTS

En préambule à ce mémoire Je remercie Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous
Aide et nous donne la patience et le courage durant ces
longues années d'étude.

Tout d'abord je remercie Madame Pr **MEDAH**, chef de Division du Laboratoire National de
Contrôle Des Médicaments de m'avoir accueilli au laboratoire.

Je tiens à remercier très chaleureusement mon encadrant de stage Docteur **Mustapha. Faris** chef du
Service de Contrôle des Produits de Santé au sein du Laboratoire National
de Contrôle des Médicaments, pour sa disponibilité, son inspiration créative, et son temps
qu'il a bien consacré tout au long de la réalisation de ce mémoire.
Ça me fait un grand plaisir de travailler avec vous.

Je tiens à remercier sincèrement mon encadrant pédagogique Professeur **H. GRECHE**, qui
m'a permis de bénéficier de son encadrement. Ainsi pour les conseils
qu'il m'a prodigué, la patience et la confiance qu'il m'a témoigné été déterminants dans
la réalisation de notre travail de recherche.

Mes remerciements s'étendent également à **tous nos Enseignants** à la Faculté des Sciences et
Techniques de Fès pour la richesse et la qualité de leur enseignement,
qui déploient de grands efforts pour assurer à leurs étudiants une formation actualisée,
durant les années des études.

Nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté
leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette formidable
année universitaire.

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	11
Chapitre I : PRESENTATION DU LABORATOIRE NATIONAL DE CONTROLE DES MEDICAMENTS	13
I. Introduction.....	14
II. Présentation à la Direction du médicament et de la pharmacie (DMP)	14
1. Division de la Pharmacie	14
2. Division du Laboratoire Nationale de Contrôle des Médicaments.....	15
a. Service physico-chimie	15
b. Service de contrôle de produits de santé	15
c. Service des essais biologiques	15
d. Service d'assurance qualité	16
III. Les principales missions du LNCM	16
a. Activités d'évaluation	16
b. Activités de contrôle.....	16
c. Les types de contrôle.....	16
IV. Accréditation du LNCM.....	17
V. Organisation de la DMP	18
VI. Conclusion	18
Chapitre II : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	19
I. Introduction.....	20
II. Généralité sur les produits de santé	20
1. Les compléments alimentaires	20
2. Généralités sur les médicaments	21
a. Définition	21
b. Composition de médicament	21
3. Contrôle de qualité des produits de santé et des médicaments.....	22
4. Les impuretés dans les produits pharmaceutiques.....	22
a. Impuretés organiques.....	22
b. Impuretés inorganiques	22
c. Solvants résiduels	23
III. Physiologie générale du fer et de cuivre dans l'organisme.....	23
1. Généralités sur le Fer	23

a.	Métabolisme de fer	25
b.	Définition de l'anémie	26
c.	Les besoins quotidiens.....	26
2.	Généralités sur le Cuivre.....	26
a.	Propriétés thérapeutiques	27
b.	Les besoins quotidiens en cuivre	27
c.	Rôles du cuivre dans l'organisme	27
IV.	Généralités sur le médicament et le complément alimentaire de vérification	27
1.	Complexe d'hydroxyde fer (III) saccharose injection	28
a.	Introduction.....	28
b.	Propriétés chimiques de la matière active	28
c.	Les caractéristiques de la matière active	28
d.	Considération thérapeutique	29
2.	Produit diététique : Lait pour nourrisson	29
V.	Technique Utilisée : La Spectroscopie d'Absorption Atomique	29
1.	Introduction	29
2.	Principe.....	30
3.	Appareillage	31
a.	Générateurs des radiations : (sources lumineuses)	32
b.	Introduction des échantillons.....	33
c.	Chambre d'absorption (Atomisation).....	34
d.	Monochromateur	37
e.	Détecteur.....	37
4.	Les Interférences et leurs corrections	38
a.	Interférences spectrales.....	38
b.	Interférences chimiques	39
c.	Interférences physiques	39
d.	Interférences d'ionisation	40
VI.	Conclusion.....	40
	Chapitre IV : RESULTATS EXPERIMENTAUX ET INTERPRETATIONS.....	41
I.	Introduction.....	42
II.	Etude 1 : Dosage en Mode Flamme.....	42
1.	Les Modes Expérimentaux	42
➤	Méthode1 : Méthode Externe.....	42
➤	Méthode 2: Méthode interne	44
2.	Résultats de l'Etape 1	46
➤	Méthode 1 : Méthode Externe	46

➤ Méthode 2 : Méthode Interne	48
3. Discussion et interprétation de l'Etude 1	49
III. Vérification du mode four du SAA avec le Plomb et le Chrome	50
1. Dosage du chrome.....	51
a. Réactifs et équipements.....	51
b. Préparation des solutions standards et tests	51
c. Résultats de la courbe d'étalonnage du chrome.....	52
2. Dosage du Plomb.....	53
a. Réactifs et équipements.....	53
b. Préparation des solutions standards et tests	54
c. Résultats de la courbe d'étalonnage du plomb.....	54
IV. Dosage du cuivre	56
1. Modes expérimentaux.....	56
A. Dosage par la méthode 1.....	57
B. Dosage par la méthode 2.....	58
C. Dosage par la méthode 3.....	59
2. Résultats des trois essais du dosage du cuivre.....	60
A. Méthode 1	60
B. Méthode 2	62
➤ Méthode 3	64
3. Discussions et interprétations de l'étude 2.....	67
V. Conclusion	68
CONCLUSION GENERALE	69

LISTE DES FIGURES

- Figure 1** : Organigramme de la Direction du Médicament et de la Pharmacie
- Figure 2** : Structure de la porphyrine
- Figure 3** : Structure de l'hème (hémoprotéine)
- Figure 4** : Représentation d'une hémoglobine A humaine montrant les quatre hèmes en vert, avec le cation de fer en orange
- Figure 5** : Circuit du métabolisme du fer
- Figure 6** : Interaction rayonnement matière
- Figure 7** : Schéma du principe du spectrophotomètre d'absorption atomique
- Figure 8** : Instrumentation de base de la SAA
- Figure 9** : Lampe à cathode creuse
- Figure 10** : illustration de l'atomisation
- Figure 11** : Ensemble d'atomisation de flamme équipé d'une chambre de pulvérisation et d'un brûleur à fente, L'encart montre l'assemblage du nébuliseur
- Figure 12** : Atomiseur électrothermique
- Figure 13** : Programme électrothermique pour un four graphite
- Figure 14** : Correction des interférences spectrales
- Figure 15** : Correction des interférences physiques et chimiques
- Figure 16** : Courbe d'étalonnage du fer dans le complexe hydroxyde ferrique saccharose (Méthode Externe)
- Figure 17** : Courbe d'étalonnage du fer dans le complexe hydroxyde ferrique saccharose (Méthode Interne)
- Figure 18** : Courbe d'étalonnage du Chrome
- Figure 19** : Ensembles des pics de la courbe d'étalonnage du chrome
- Figure 20** : Courbe d'étalonnage du Plomb
- Figure 21** : Ensembles des pics de la courbe d'étalonnage du plomb
- Figure 22** : Courbe d'étalonnage du cuivre dans le lait infantile (Méthode 1)
- Figure 23** : Ensemble des pics de la courbe d'étalonnage et du principe actif (Méthode 1)
- Figure 24** : Courbe d'étalonnage du cuivre dans le lait infantile (Méthode 2)
- Figure 25** : Ensemble des pics de la courbe d'étalonnage et du principe actif (Méthode 2)
- Figure 26** : Courbe d'étalonnage du cuivre dans le lait infantile de (la méthode 3)
- Figure 27** : Ensemble des pics de la courbe d'étalonnage et du principe actif (Méthode 3)

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	: Liste des vitamines et des sels minéraux dans la fabrication des compléments
Tableau 2	: Métaux à contrôler
Tableau 3	: Besoins quotidiens en fer selon l'âge
Tableau 4	: Les besoins quotidiens en cuivre
Tableau 5	: Description et composition du médicament
Tableau 6	: Quelques spécifications du produit fini du médicament
Tableau 7	: Les principales modifications du lait pour nourrisson selon
Tableau 8	: Méthodes d'introduction de l'échantillon dans le spectrométrie d'absorption atomique
Tableau 9	: Combustibles et oxydants utilisés pour la combustion de flamme
Tableau 10	: Conditions expérimentales d'analyses par la méthode externe
Tableau 11	: Préparation des solutions étalons pour la courbe d'étalonnage (Méthode 1)
Tableau 12	: Conditions expérimentales d'analyses par la méthode interne
Tableau 13	: Préparation des solutions étalons pour la courbe d'étalonnage (Méthode 2)
Tableau 14	: Résultats des absorbances (Méthode 1)
Tableau 15	: Absorbance du médicament méthode Externe
Tableau 16	: Résultats des absorbances (Méthode 2)
Tableau 17	: Absorbance du médicament méthode Interne
Tableau 18	: Résultats des deux méthodes de l'étude 1
Tableau 19	: Les critères d'acceptations
Tableau 20	: Conditions expérimentales d'analyses du plomb et du chrome
Tableau 21	: Préparation des solutions étalons pour la courbe d'étalonnage du chrome
Tableau 22	: Résultats des absorbances du chrome
Tableau 23	: Préparation des solutions étalons pour la courbe d'étalonnage du plomb
Tableau 24	: Résultats des absorbances du plomb
Tableau 25	: Conditions expérimentales d'analyses de l'étude 2
Tableau 26	: Préparation des solutions étalons pour la courbe d'étalonnage (Méthode 1)
Tableau 27	: Préparation des solutions étalons pour la courbe d'étalonnage (Méthode 2)
Tableau 28	: Préparation des solutions étalons pour la courbe d'étalonnage (Méthode 3)
Tableau 29	: Résultats des absorbances de la méthode 1
Tableau 30	: Absorbance du cuivre de la méthode 1
Tableau 31	: Résultats des absorbances de méthode 2

Tableau 32	: Absorbance du cuivre de la méthode 2
Tableau 33	: Résultats des absorbances de la méthode 3
Tableau 34	: Absorbance du cuivre de la méthode 3
Tableau 35	: Résultats des trois méthodes de l'étude 2
Tableau 36	: Les critères d'acceptations de l'étude 2

LISTE DES ABREVIATIONS

AMM	: Autorisation de Mise sur le Marché
ANSM	: Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé
DMP	: Direction du médicament et de la Pharmacie
DCI	: Dénomination Commune Internationale
EDQM	: Direction Européenne de la Qualité des Médicaments
IMANOR	: Institut Marocain de Normalisation
LNCM	: Laboratoire National de Contrôle des Médicaments
OMCL	: Laboratoires Officiels de Contrôle des Médicaments
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
PA	: Principe actif
PE	: Pharmacopée Européenne
ppm	: Partie par million (mg/L)
ppb	: Partie par billion (µg/L)
SAA	: Spectrométrie d'Absorption Atomique
USP	: Pharmacopée Américaine
UICPA	: Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée

INTRODUCTION GENERALE

Dans le cadre de mes études universitaires, ce stage de fin d'études d'une durée de quatre mois au sein du Laboratoire National de Contrôle des Médicaments m'a offert une réelle opportunité de développer un esprit d'analyse, de créativité, ce qui a été complémentaire à ma formation en Master « Chimie des Molécules Bioactives ».

L'industrie pharmaceutique est considérée comme l'une des industries les plus importantes et rentable dans le monde, qui a pour objectif de découvrir, de produire et de commercialiser des produits de santé et des médicaments à usage humain ou vétérinaire afin d'améliorer la santé humaine et d'assurer leur bien-être.

Le laboratoire Nationale de Contrôle des Médicaments (LNCM) est le seul organisme qui s'occupe de la qualité des produits de santé et des médicaments au Maroc. Il est chargé d'effectuer des contrôles de qualité des produits pharmaceutiques fabriqués localement ou importés, pour mettre à la disposition des patients des produits de santé fiables de bonne qualité conforme aux normes internationales.

Malgré tous ces efforts, le service de contrôle de produits de santé est encore en plein développement de nouvelles méthodes d'analyses, capables de répondre à un certain nombre de questions relatives à la qualité et à la sécurité d'usage des produits de santé. Tout en prenant en compte leur caractère complexe et diversifié ayant un spectre d'application assez large commençant par les produits cosmétiques, les compléments alimentaires, les produits diététiques, les articles de puéricultures et les dispositifs médicaux , etc...

Le Fer et le Cuivre sont deux éléments indispensables au corps humain et probablement les plus importants des oligo-éléments de l'organisme en raison de nombreuses fonctions qu'ils assurent, au niveau cellulaire (métabolisme, production d'énergie et synthèse d'ADN), que systémique (transport de l'oxygène).

Par ailleurs, une carence en Fer provoque une anémie qui se manifeste par une fatigue, et une baisse d'efficacité ce qui peut dans la plupart des cas être traité ou amélioré à l'aide des médicaments antianémiques ou des compléments alimentaires à base de Fer. Une carence importante en Fer, peut provoquer des palpitations, une détresse respiratoire et renforcer les effets de certaines intoxications.

La spectrométrie d'absorption atomique est connue depuis des années comme une des techniques d'analyse fiable, efficace et capable de doser des traces de métaux lourds avec une précision et une sensibilité de dosage de l'ordre du ppm et du ppb.

On y trouve aussi la spectrométrie ICP qui évolue davantage ces dernières années. Cette technique est utilisée dans différents domaines : Environnement, Agro-Alimentaire et dans différentes productions industrielles....

Dans notre cas on va s'intéresser au dosage dans le domaine pharmaceutique, surtout pour les médicaments et les produits de santé à base de Fer et de Cuivre. Ce travail sera repartit en deux parties :

- Le développement d'un nouveau protocole expérimentale par spectrométrie d'absorption atomique en mode flamme propre au LNCM capable de doser l'élément métallique Fe à titre d'exemple, un médicament sous forme de solution injectable à base de fer.
- Le développement d'un autre nouveau protocole expérimentale pour doser le cuivre dans un complément alimentaire -lait pour nourrisson- en utilisant le mode four graphite. Dans cette partie nous avons essayé de vérifier le test de conformité du spectromètre sur deux autres éléments chimiques le Pb et le Cr.

Chapitre I : PRESENTATION DU LABORATOIRE NATIONAL DE CONTROLE DES MEDICAMENTS

I. Introduction

Dans ce chapitre on élabore une vision globale sur le laboratoire d'accueil du stage, le Laboratoire Nationale de Contrôle des Médicaments qui est le seul laboratoire au Maroc qui contrôle la qualité des médicaments et des produits de santé destinés à la population marocaine. Ce laboratoire connu à l'échelle nationale et internationale a plusieurs accréditations et certifications et qui est dernièrement pré-qualifié par l'Organisation Mondiale de la Santé.

Dans ce qui suit nous avons élaboré une vision générale sur les missions principales de la direction du médicament et de la pharmacie, la division de la pharmacie et le Laboratoire Nationale de Contrôle des Médicaments et ses services.

II. Présentation de la Direction du médicament et de la pharmacie (DMP)

Le Laboratoire Nationale de Contrôle des Médicaments est créée initialement *en 1969 par Décret n°2172-373 du 24 Avril 1974* qui fixe ses prérogatives, portant création d'un Laboratoire Nationale de Contrôle des Médicaments avec des spécialités pharmaceutiques. Actuellement Le LNCM est rattaché comme division à la direction du médicament et de la pharmacie par *le décret n°2-94-285 le 21 novembre 1994* relatif aux attributions et à l'organisation du ministère de la santé publique.

Depuis sa création le LNCM connaît un essor par son inscription sur la liste des laboratoires officiels de l'Organisation Mondiale de la Santé, pour la zone européenne, il est reconnu aussi comme laboratoire Pré-qualifié par l'OMS, et membre observateur à la commission de la pharmacopée Européenne et américaine. Son accréditation selon **la norme ISO 17025** par la Direction Européenne de la Qualité du Médicament et des produits de santé (EQDM) depuis 2007 lui permet de jouir d'une notoriété régionale et internationale un positionnement parmi les laboratoires du réseau des OMCL du conseil de l'Europe.

La DMP est **composée** de deux divisions :

- ✓ Division de la pharmacie.
- ✓ Division du Laboratoire National de Contrôle des Médicaments (LNCM).

1. Division de la Pharmacie

Objectifs :

- ✓ Evaluation, octrois des autorisations de mise sur le marché des médicaments et des enregistrements des produits de santé (complément alimentaire, article de puériculture, dispositifs médicaux...)
- ✓ Fixer le cadre des prix des médicaments et des spécialités pharmaceutiques.
- ✓ Etablissement et mise à jour de la base de données des médicaments et des produits de santé mis sur le marché marocain etc... conformément à la réglementation en vigueur.

Assurer le suivi des relations de la division avec les autres entités (internes ou externes) du Ministère de la Santé et, en particulier, suivre le traitement du courrier de la division.

2. Division du Laboratoire Nationale de Contrôle des Médicaments

Le LNCM assure l'expertise analytique des médicaments et des produits de santé parvenus dans le cadre des demandes d'autorisations de mise sur le marché (médicaments) ou des demandes d'enregistrement (produits de santé), réclamations, inspections, essais inter-laboratoires et autres matière d'analyses.

Le LNCM est composé de quatre services :

-  Service physico-chimie
-  Service de contrôle de produits de santé
-  Service des essais biologiques
-  Service assurance qualité

a. Service physico-chimie

- Assure l'expertise analytique des spécialités pharmaceutiques (matières premières et produits finis).
- Forme une base scientifique des anomalies constatées.
- Formulation des résultats dans le cadre des autorisations de mise sur le marché AMM, réclamations, inspections, et essais inter laboratoires.

b. Service de contrôle de produits de santé

Ce service s'occupe de la réalisation d'un certain nombre de tests à caractère mécaniques sur les dispositifs médicaux et sur les autres produits de santé (produits cosmétiques, compléments alimentaires, dispositifs médicaux, articles de puéricultures), en plus de ça le service réalise :

- Des essais de dosage physico-chimiques des métaux lourds et de la matière inorganique sur les médicaments.
- Les activités sont focalisées davantage sur les essais post-Marketing.
- Réclamations et inspections de quelques autorisations de mise sur le marché des médicaments et de demandes d'enregistrement des produits de santé.
- Il représente le comité scientifique de la rédaction des normes marocaines sur les produits parapharmaceutiques et autres médico techniques par concertation avec l'IMANOR et les autres intervenants du secteur.

c. Service des essais biologiques

Au sein de service le contrôle est sur le plan biologique des médicaments et des spécialités pharmaceutiques, ces principales les activités sont :

- D'assurer les analyses analytiques et microbiologiques (essais de stérilité, tests endotoxines, de contaminations sur les médicaments et les produits de santé).
- Contrôle physico chimique des médicaments biologiques.

d. Service assurance qualité

Ce service assure la démarche de la réglementation :

- Il s'occupe de la réception et d'enregistrement des médicaments et des produits de santé parvenu au LNCM.
- Evaluation des dossiers des médicaments, répartition de ses produits sur les différents services techniques
- Envoi des lettres de conformité aux demandeurs de prestations analytiques.
- Ce service est composé de plusieurs unités : unité de réception, d'enregistrement, d'évaluation des dossiers, de réclamation, d'importation de médicament et d'audits.

III. Les principales missions du LNCM

Le Laboratoire National de Contrôle des Médicaments, assure depuis sa création, deux principales activités :

a. Activités d'évaluation

Il s'agit d'une évaluation des dossiers techniques de demande des autorisations de mise sur le marché des médicament à usage humain et également d'une évaluation des dossiers techniques de demande de renouvellement et des modifications majeurs et mineurs qui peuvent survenir avec des évolutions qui se font conformément aux directives internationales en matière de qualité, de sécurité et d'efficacité. Le LNCM assure aussi

- Le suivi des réclamations de défaut de qualité des médicaments.
- Le suivi de la qualité des matières premières actives.

b. Activités de contrôle

Le contrôle qualité des médicaments et des produits de santé effectué par le LNCM représente l'ensemble des techniques, d'analyses et de mesures prises pour s'assurer que ces produits sont de qualité requise pour l'usage auquel ils sont destinés, qui est effectué par les quatre services déjà cités.

c. Les types de contrôle

- 1. Contrôle pré-AMM :** Effectué dans le cadre des demandes d'autorisation de mise sur le marché.
- 2. Contrôle post-AMM :** Survient à l'issu d'une mission d'inspection et / ou d'enquête, effectué dans le cadre suivi du secteur pharmaceutique soumis au contrôle de l'inspection de la pharmacie, il peut concerner aussi bien les produits finis et les matières premières prélevées lors de ces missions.
- 3. Contrôle à la livraison :** concerne les médicaments et les dispositifs médicaux achetés par appel d'offre et livrés aux hôpitaux.
- 4. Contrôle des produits de réclamation :** Réaliser systématiquement en cas de réclamation ou de signalement reçu par la direction du Médicament et de la Pharmacie.

5. **Contrôle des produits d'homologation :** Il est réalisé sur les produits qui demandent une autorisation de mise sur le marché marocain d'un produit de santé (Dispositif médical, Article de puériculture, complément alimentaire, produit cosmétique).
6. **Contrôle de premier lot de fabrication locale :** Après l'obtention de l'AMM, le premier lot de fabrication est contrôlé pour s'assurer de la conformité aux spécifications du dossier d'AMM.

Le contrôle des médicaments et des produits de santé au Maroc s'effectue dans le respect des normes nationales et internationales, telles les pharmacopées (Européenne, Américaine, britannique, française...), Normes ICH, Norme ISO, Normes EN, Normes NM, Directives de l'OMS, Directives Européennes sur les produits de santé, également la réglementation et la législation marocaine en vigueur.

Egalement, le LNCM œuvre dans :

- La contribution aux travaux d'encadrement et de formation des pharmaciens et autres professionnels.
- La participation dans des travaux de la recherche scientifique.
- Le développement de nouvelles méthodes d'analyse.

IV. Accréditation du LNCM

Le contrôle de qualité des médicaments et des produits parapharmaceutiques est le pilier de la veille sanitaire dans le domaine de la pharmacie d'où s'est inscrit dans une politique de reconnaissance en terme de compétence via des organismes internationaux en la matière, à savoir nous citons l'accréditation conformément au référentiel ISO 17025 par le conseil de l'Europe. L'objectif majeur est de fournir des résultats analytiques fiables, incontestables et de renforcer le contrôle de la qualité des médicaments ce qui ouvre d'avantage la voie aux médicaments marocains sur les marchés européens.

L'objectif actuel est de maintenir le niveau de qualification aussi bien du personnel que des tests effectués. Le laboratoire a obtenu l'accréditation, par le réseau Européen des laboratoires nationaux de contrôle des médicaments en février 2007, pour l'ensemble des analyses effectuées.

- En 2017 vu l'engagement du laboratoire national de contrôle des médicaments (LNCM) et les activités de la DMP dans une démarche assurance qualité, ils ont été accrédité par le réseau Européen des laboratoires nationaux de contrôle des médicaments selon la norme internationale ISO 19001 version 2015.
- Finalement en 2018 un plan d'action a été établi et suivi par le comité assurance qualité, le LNCM est pré connu et pré qualifié par l'OMS.

V. Organisation de la DMP

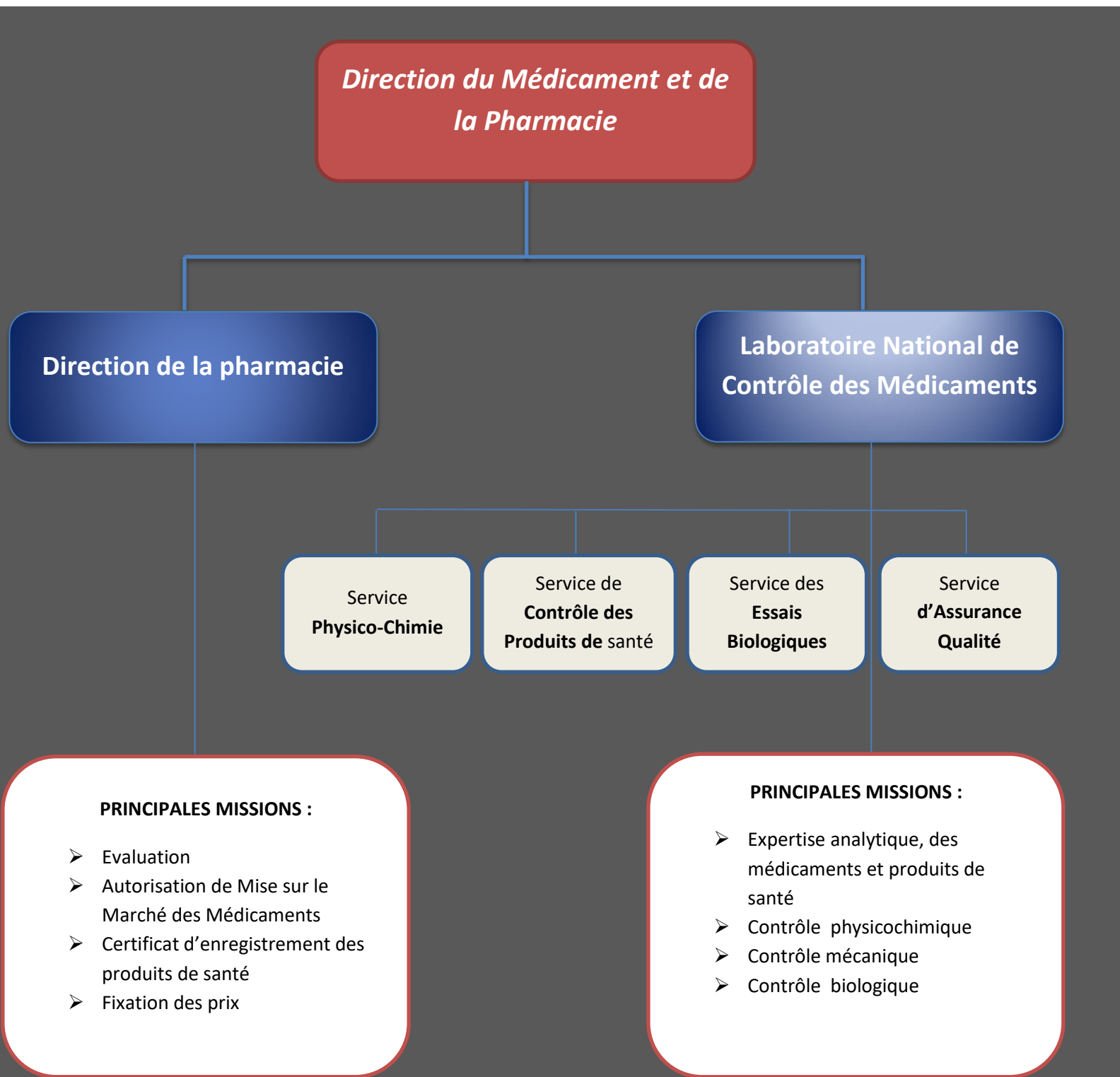


Figure 1 : Organigramme de la Direction de Médicament et de la Pharmacie

VI. Conclusion

Le Laboratoire National des Médicaments dispose des moyens humains et matériels suffisantes pour assurer la fonction qui lui est t attribuée en termes de contrôle qualité des médicaments et des produits de santé. A cet effet cette organisation reste toujours un établissement idéal pour le travail de recherche et pour l'acquisition de nouvelles compétences, techniques et connaissances.

Chapitre II : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Introduction

Les oligo-éléments sont des éléments minéraux purs nécessaire à l'organisme, en toute petite quantité, c'est pourquoi on les nomme également « éléments de traces ». Certains oligo-éléments ne peuvent être synthétisés par notre organisme, et doivent donc être puisés dans l'alimentation.

Ces oligo-éléments peuvent être analysés par différentes techniques d'analyses comme la Spectroscopie d'absorption atomique, et l'ICP ...

Dans ce chapitre nous allons développer une étude bibliographique sur : la spectroscopie d'absorption atomique et son appareillage, le dosage des métaux choisis à analyser le Fer et le Cuivre en détaillant leur rôle dans l'organisme vivant, et finalement on va citer les propriétés physicochimiques des médicaments de vérification le complexe hydroxyde ferrique saccharose et le lait pour nourrisson.

II. Généralité sur les produits de santé

La définition des produits de santé selon l'OMS, ce sont des produits qui participent à l'obtention ou au maintien d'un état de complet de bien-être physique, mental et social de l'être humain. Selon l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé (ANSM), il regroupe sous l'appellation produit de santé les catégories suivantes : [1]

- Médicaments,
- Produits cosmétiques,
- Produits diététiques,
- Dispositifs médicaux,
- Dispositifs médicaux de diagnostic in vitro,
- Articles de puéricultures,
- Autres produits et substances.

1. Les compléments alimentaires

Les compléments alimentaires sont des sources concentrées de nutriments, des « denrées alimentaires » qui constituent une source de substances ayant un effet nutritionnel ou physiologique seuls ou combinés, commercialisés sous forme de doses à savoir les formes de présentation telles que les gélules, comprimés, solutions, pilules, sachets de poudre, capsules, etc...

Ils contiennent des vitamines, des nutriments, des plantes. Ils s'adressent aux personnes pouvant présenter des carences nutritionnelles transitoires (régime particulier, grossesse, fatigue hivernale). [2]

Les compléments alimentaires ne doivent pas remplacer les apports qui doivent être comblés par l'alimentation, mais les compléter. De plus, il est conseillé de respecter consciencieusement la posologie car une sous-dose n'aura aucun effet et une surdose pourra entraîner des effets indésirables.

Dans notre étude on va s'intéresser aux compléments alimentaires sous forme de lait pour nourrisson ou on va doser l'élément métalliques : Le cuivre.

Le tableau suivant résume l'ensemble des vitamines et minéraux qu'on peut trouver dans les compléments alimentaires :

Vitamines		Minéraux	
Vitamine A		Calcium	Manganèse
Vitamine B1		Chlorure	Molybdène
Vitamine B2	Vitamine B12	Chrome	Phosphore
Vitamine B3	Vitamine C	Cuivre	Potassium
Vitamine B5	Vitamine D	Fer	Sélénium
Vitamine B6	Vitamine E	Flor	Sodium
Vitamine B8	Vitamine K	Iode	Zinc
Vitamine B9		Magnésium	

Tableau 1 : Liste des vitamines et sels minéraux dans la fabrication des compléments alimentaires [2]

2. Généralités sur les médicaments

a. Définition

« Toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal, ou pouvant leur être administrée en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique. » [3]

b. Composition de médicament

On distingue dans un médicament une partie responsable de ses effets sur l'organisme humain le principe actif (P.A), qui est la molécule support de l'activité pharmacologique, et le plus souvent une partie inactive, les excipients, qui permettent de mettre en forme le médicament. [4]

b.1.Principe actif

La substance active, ou le principe actif, d'un médicament est une des composants du médicament qui possède un effet thérapeutique. Cette substance est souvent en très faible proportion dans le médicament par rapport aux excipients. Cela peut être une substance pure chimiquement définie (abusivement qualifiée de « molécule ») ou un mélange de plusieurs substances chimiquement proches (isomères, par exemple) ou encore une substance définie par son mode d'obtention. [5]

Cette quantité de molécules a un effet pharmacologique, c'est-à-dire un effet soignant, qui a été prouvé cliniquement par plusieurs tests.

b.2.Excipient

Désigne toute substance autre que le principe actif dans un médicament, destinée à apporter une consistance, un goût, une couleur à un médicament, tout en évitant toute interaction avec le principe actif. Son addition est destinée à conférer une consistance donnée, ou d'autres caractéristiques physiques ou gustatives particulières, au produit final.

Un excipient n'est donc pas défini par une composition chimique particulière mais par son utilisation, qui découle de ses propriétés physico-chimiques qui le rendent aptes à remplir son rôle d'excipient. [5]

3. Contrôle qualité des produits de santé et des médicaments

En se référant aux pharmacopées, il se dégage que les caractéristiques les plus importantes pour établir la qualité d'un médicament sont : l'identité, la pureté, l'activité, l'uniformité, la biodisponibilité, et la péremption.

En ce qui concerne **l'identité** des constituants du médicament, le principe actif, l'excipient et l'adjuvant déclarés doivent être présents dans les produits. De même la forme pharmaceutique doit correspondre à ce qui est annoncé sur l'emballage. [6]

Quant à **la pureté**, en dehors des principes actifs, les excipients et les adjuvants, les médicaments ne doivent pas contenir de substances potentiellement toxiques. [6]

4. Les impuretés dans les produits pharmaceutiques

Les impuretés dans les produits pharmaceutiques proviennent essentiellement de la synthèse et/ou des matières de départ utilisées. En général, leur concentration est très faible, et par conséquent l'analyse des traces est nécessaire. [7]

Il existe de nombreux types d'impuretés. Celles-ci peuvent être classées en 3 grandes catégories :

- **Impuretés organiques**
- **Impuretés inorganiques**
- **Solvants résiduels.**

a. Impuretés organiques

Les impuretés organiques, autres que les solvants, sont principalement composées des « substances apparentées », constituées par les précurseurs de synthèse, les produits secondaires, les intermédiaires de synthèse ainsi que les produits de dégradation. Il existe également une catégorie de molécules qui, selon les cas, peut être considérée soit comme faisant partie du produit de synthèse, soit comme une impureté : les isomères. [8]

b. Impuretés inorganiques

Les impuretés inorganiques font référence aux éléments tels que les catalyseurs chimiques de réaction, source fréquente de métaux lourds, chlorures, sulfates, etc...

La présence potentielle de ces éléments est presque systématiquement vérifiés car ils sont très couramment utilisés au cours des synthèses et représentent un danger pour la santé publique.

Les métaux lourds représentent une catégorie d'impuretés qu'il est absolument indispensable de rechercher afin de vérifier la conformité de la substance contrôlée. L'essai des métaux lourds permet de rechercher les éléments suivants:

Plomb	Mercure	Ruthénium	Palladium	Antimoine
Cuivre	Cadmium	Or	Vanadium	Etain
Argent	Bismuth	Platine	Arsenic	Molybdène

Tableau 2 : Métaux à contrôler

Parmi ceux-ci, le plomb, élément le plus fréquemment rencontré, est utilisé comme mode d'expression des résultats de l'essai : « ppm de plomb ».

c. Solvants résiduels

Aux cours de la préparation les solvants résiduels servent à la recristallisation des produits et se répartissent en 3 classes :

- Classe 1 (Toxique) : Dichlorométhane, Benzène, Tétrachlorure de carbone, Trichloroéthane.
- Classe 2 (Toxique acceptable) : Toluène, méthanol, diméthylformamide, cyclohexane, dioxanne, pyridine, chloroforme, acétonitrile.
- Classes 3 (Les autres solvants) : éthanol ou d'autres solvants qui sont moins toxiques (éther).

Pour chaque classe de ces solvants il existe une norme européenne sur les méthodes de recherche. En cas d'utilisation de solvants de classe 1 ou 2 durant la dernière phase de synthèse d'un médicament, un essai de solvants résiduels doit être obligatoirement mis en place. C'est également le cas si un solvant est utilisé avant la dernière phase de synthèse, mais que son utilisation n'est pas suivie par une procédure validée d'élimination de ce solvant. Dans ces conditions, des traces de ces solvants peuvent subsister. L'essai « solvants résiduels » permet de vérifier les taux auxquels ces solvants sont présents. Les solvants organiques [9, 10, 11, 12] très lipophiles, présentent tous des affinités pour les organes riches en lipides. Les principales cibles de ces solvants organiques sont donc la peau, le système nerveux, le foie et les reins.

III. Physiologie générale du fer et du cuivre dans l'organisme

1. Généralités sur le Fer

Le **fer** (symbole Fe dans le tableau périodique des éléments) est un oligo-élément et fait partie des sels minéraux indispensables qu'on retrouve dans les aliments, c'est l'élément central de la molécule **d'hémoglobine** et des protéines héminiques, et il est de l'érythropoïèse physiologique. Une carence en fer est source d'anémie. Le fer est essentiel au transport de l'oxygène et à la formation des globules rouges dans le sang. Il existe sous deux formes, le fer ferreux (Fe^{2+}) contenu dans les aliments à origine animale qui est plus absorbé par l'organisme que le fer ferrique (Fe^{3+}) contenu dans les végétaux.

L'excès de fer favorise la production de radicaux libres à partir de l'oxygène, qui sont très dangereux pour la cellule. Les organismes vivants ont ainsi développé une série de protéines permettant d'assurer son transport, son stockage et sa fonction sous une forme non toxique.

L'organisme contient 30-40 mg /kg de fer, ce qui représente environ 4g chez un adulte. Ceux-ci se répartissent essentiellement dans **l'hémoglobine** (2,5 g), la ferritine (1 g) et d'autres protéines **hémiques** ou **non hémiques** (0,5g). [13]

- **L'hémoglobine : Complexe bio inorganique**

L'hémoglobine du sang est une métalloprotéine constituée d'un complexe du fer(II). Ce complexe permet aux globules rouges de transporter le dioxygène des poumons aux cellules du corps. La solubilité du dioxygène dans le sang est en effet insuffisante pour alimenter efficacement les cellules. Ce complexe est constitué d'un cation Fe(II) complexé par les quatre atomes d'azote d'une **porphyrine**.

Chacune des quatre chaînes est associée à un groupe prosthétique appelé hème et constitué d'un cation de fer complexé avec une porphyrine.

L'hémoglobine est donc une hémoprotéine.

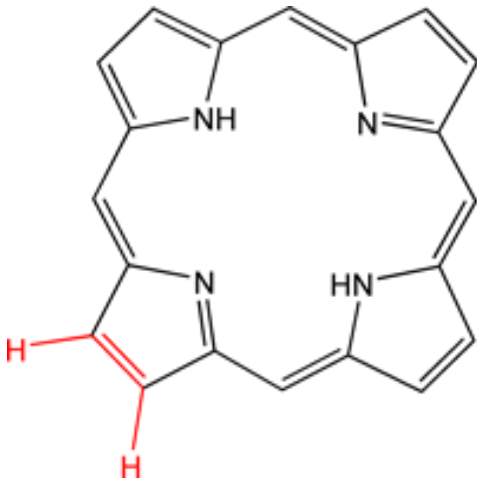


Figure 2 :Structure de la porphyrine

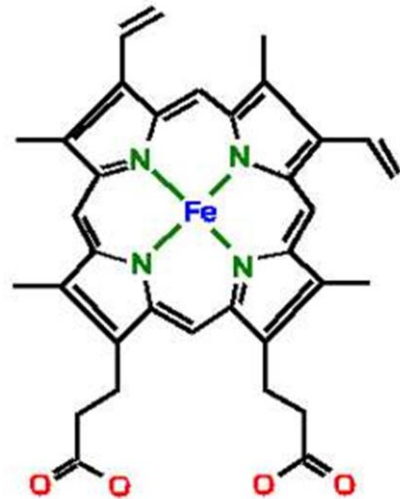


Figure 3: Structure de l'hème (hémoprotéine)

- **Hème : Sous-unités**

L'hémoglobine possède une structure quaternaire caractéristique de nombreuses protéines à sous-unités globulaires. La plupart de ses résidus d'acides aminés sont engagés dans des hélices α reliées entre elles par des segments non hélicoïdaux. Les sections hélicoïdales sont stabilisées par des liaisons hydrogène qui confèrent à la protéine sa structure tridimensionnelle caractéristique, appelée repliement globine car on le retrouve également dans d'autres globines à groupe prosthétique hémique.

Ce repliement caractéristique présente une cavité dans laquelle est étroitement insérée une molécule d'hème constituant le groupe prosthétique de la protéine. L'hémoglobine contient donc une molécule d'hème par sous-unité. [14]

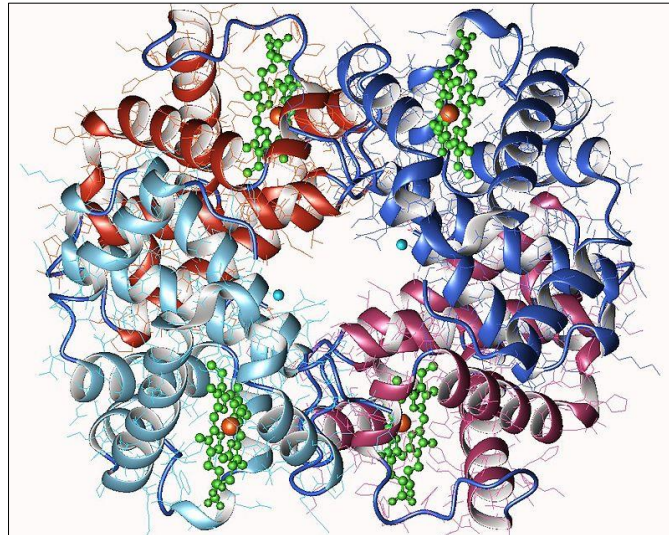


Figure 4 : Représentation d'une hémoglobine A humaine montrant les quatre hèmes en vert, avec le cation de fer en orange [15]

a. Métabolisme du fer

Le fer est un élément indispensable à la vie cellulaire, mais également toxique en cas d'excès. Son métabolisme est caractérisé par un recyclage permanent entre le système réticulo-endothélial et la moelle osseuse, principal tissu utilisateur du fer. La quantité totale de fer de l'organisme est extrêmement stable et résulte d'un équilibre entre les entrées et les sorties du métal. Deux tiers du fer **environ (70%) est incorporé à l'hémoglobine** présente dans les érythrocytes. Le compartiment de transport plasmatique est constitué du fer lié à la transferrine et représente environ 0,1 % du fer total de l'organisme. Le foie contient 10 à 20 % du fer (non héminique), principalement sous sa forme de stockage, la ferritine, un fer normalement facilement mobilisable en fonction des demandes de l'organisme. La myoglobine des muscles contient 3 à 4 % du fer total (forme héminique). Le reste est distribué dans les autres tissus [16].

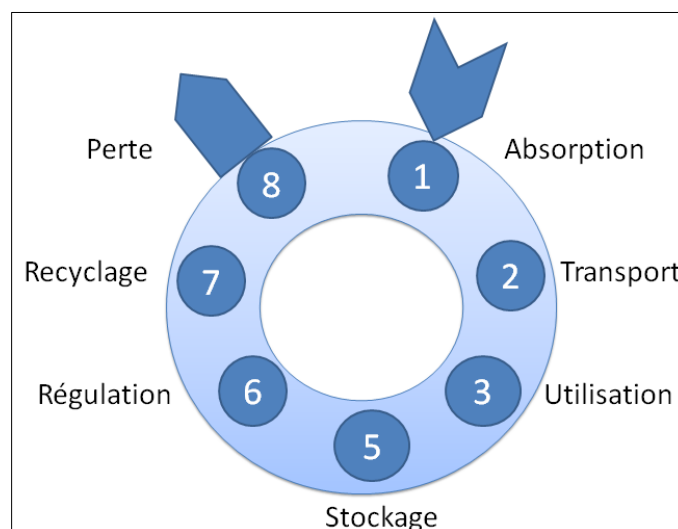


Figure 5 : Circuit du métabolisme du fer

Au total il existe 4 types cellulaires principaux qui déterminent le métabolisme du fer : [17]

- les **entérocytes**, cellules intestinales qui absorbent le fer.
- les **érythroblastes**, cellules-souches ou précurseurs des globules rouges, qui captent et transportent le fer utilisable.
- les **macrophages**, qui récupèrent et « recyclent » le fer des globules rouges en fin de vie.
- les **hépatocytes**, cellules du foie qui stockent le fer, et qui jouent un rôle de « gestion du stock ».

Il est à noter que :

Pour les dons de sang : 1 poche de sang = 0.4 litre de sang = 200 mg de fer (1 L de sang contient 500 mg de fer) [18].

b. Définition de l'anémie

La carence en fer est aujourd'hui la maladie nutritionnelle la plus répandue dans le monde, tout spécialement en milieu tropical où elle touche les jeunes enfants surtout les femmes, en particulier lors de la grossesse du fait que le fœtus est capable d'extraire son besoin en fer dans une seule direction obligatoire de mères déficientes en fer. Elle est principalement liée au fait que, dans ces régions, l'alimentation locale contient des facteurs inhibiteurs de l'absorption intestinale du fer, de sorte que les quantités de fer absorbées disponibles pour les besoins métaboliques sont insuffisantes. A un stade avancé de la carence, la baisse de l'hémoglobine est cause d'anémie. [19-20]

c. Les besoins quotidiens

Le tableau 2 indique les besoins moyens en fer disponible pour l'organisme aux différents âges [21]. Ceux-ci sont particulièrement élevés chez les jeunes enfants et les femmes enceintes qui constituent de ce fait les deux principaux groupes à risque de carence.

	Besoins Moyens (mg/j)
Nourrissons	0,8
Enfants d'âge scolaire	0,6
Femmes non enceintes	1,5
Femmes enceintes	4,5
Homme adultes	1,0

Tableau 3 : Besoins quotidiens en fer selon l'âge [21].

2. Généralités sur le Cuivre

Le cuivre est un oligo-élément qui participe à de nombreuses réactions biochimiques dans les cellules. Il est indispensable à de nombreuses enzymes, à la synthèse de la mélanine (pigment colorant la peau et les cheveux) et à certains messagers chimiques du cerveau. Ce métal intervient notamment dans l'entretien des cartilages, des os utilisé en cas d'arthrose. Il est également essentiel dans la lutte contre les infections et le bon fonctionnement du cœur.

a. Propriétés thérapeutiques

Le cuivre est classé dans les oligo-éléments indispensable dans la catégorie des nutriments, il est essentiel à la vie sous toutes ses formes. Le rôle de cet oligo-élément est rattaché à d'autres nutriments tels que le zinc et le manganèse, le fer et le magnésium, il est localisé dans notre organisme principalement dans le foie, les muscles et les os.

b. Les besoins quotidiens en cuivre

Âge	Apport nutritionnel Recommandé (µg/ml)	Apport maximal tolérable (µg/Jour)
Enfant 1 à 3 ans	340	1000
Adolescent	890	8000
Adulte	900	10 000
Grossesse	1000	Entre 8000 et 10 000
Allaitement	13000	Entre 8000 et 10 000

Tableau 4 : Les besoins quotidiens du cuivre [25]

c. Rôles du cuivre dans l'organisme

- Le cuivre est essentiel à l'action de nombreuses enzymes. A ce titre, il intervient dans le métabolisme de plusieurs nutriments : glucides (sucres), lipides (graisses) et fer.
- Il contribue à la formation des globules rouges, aux défenses immunitaires, la minéralisation osseuse, la régulation des neurotransmetteurs, et à la production de mélanine (pigment qui protège la peau du soleil).
- Le cuivre a aussi un rôle antioxydant, cofacteur du superoxyde dismutase (une enzyme clé dans la défense contre les phénomènes excessifs d'oxydation). [25]

IV. Généralités sur le médicament et le complément alimentaire de vérification

Le traitement d'anémie repose sur l'administration de fer, utilisé en tant que médicament antianémique. L'apport du fer se présentait initialement sous différente forme, une supplémentation utilisée par des voies variées orale ou injectable, permet de restaurer plus rapidement les réserves en fer.

Aujourd'hui l'utilisation de fer par voie intraveineuse connaît un développement considérable résultant d'un besoin clinique croissant et de l'augmentation de l'utilisation des agents stimulant des globules rouge (l'érythropoïèse) depuis la fin du vingtième siècle [25].

1. Complexe d'hydroxyde fer (III) saccharose injection

a. Introduction

Ce médicament Injection est un **complexe de saccharose de fer III en solution**, il permet l'apport de fer par la voie intraveineuse. Il est utilisé pour l'**anémie ferriprive** en raison de la mauvaise absorption et la perte de sang chronique et d'autres conditions. Ce médicament contient du fer comme ingrédient actif, il agit en aidant les globules rouges à fournir de l'oxygène à tout le corps. Des informations détaillées relatives aux propriétés chimiques du complexe de saccharose de fer injection, sont énumérés ci-dessous.

b. Propriétés chimiques de la matière active

Nomenclature :

- **DCI** : Complexe fer-saccharose
- **Nom chimique** : Hydroxyde ferrique en complexe avec le saccharose.

c. Les caractéristiques de la matière active

- **Description** : Couleur marron, stérile, aqueux, complexe de polynucléaire fer III hydroxyde sucrose pour utilisation intraveineuse.
- **Elément actif** : Le Fer (Fe^{3+}) sous forme de complexe de saccharose de fer.
- **Eléments inactifs** : hydroxyde de sodium et l'eau pour l'injection
- **pH** : Entre 10,5 et 11,1 à 20 °C.

Composition	mg par ml	mg par 5 ml
Ingrédient actif		
• Complexe de saccharose de fer	20.00	100.00
Ingrédient inactif	Par ml	Par ml
• Hydroxyde de sodium		
• Eau pour injection	1.0	5.0

Tableau 5: Description et composition du médicament

Paramètres évalués	Spécifications
Sucrose	Entre 260 mg et 340 mg de sucrose par ml
Fer III	Entre 19 mg et 21mg de fer III par ml

Tableau 6 : Quelques spécifications du produit fini du médicament

d. Considération thérapeutique

Le fer est utilisé dans la prise en charge de :

- ✓ Anémies ferriprives.
- ✓ Anémies en cas d'insuffisance rénale chronique.
- ✓ Carences en fer.
- ✓ Stimulations de l'érythropoïèse avant prélèvement autologue.

2. Produit diététique : Lait pour nourrisson

Le lait maternel est sans conteste l'aliment le plus adapté aux besoins du nourrisson : aucun lait n'est si parfait à tous points de vue. Les laits 1^{ers} âge sont confectionnés à partir de lait de vache transformé pour se rapprocher au maximum de la composition du lait maternel. [25]

Donc les laits pour nourrisson sont créés sous forme de compléments qui contiennent toutes les vitamines minérales et toutes substances nécessaires pour l'accroissement normal de nourrisson, donc il doit y avoir des : protéines, sucres, graisses, minéraux, vitamines, oligoéléments et d'autres éléments ajoutés.

Le lait subit quelques transformations qui visent à imiter le lait maternel à base de lait de vache, le plus souvent pour avoir cette composition semblable, on effectue ces principales modifications comme : la réduction de la teneur en protéines avec équilibrage des différentes variétés de protéines la caséine et les globulines, diminution en sels minéraux, ajout du fer et certaines vitamines (vitamines K et D), remplacement des graisses animales par des graisses végétales.

Préparation du lait pour nourrisson		
1 ^{er} âge - 0 à 6 mois	2 ^{ème} âge - 6 à 12 mois	3 ^{ème} âge - 1 à 3 ans
Enrichi en vitamine K et D, avec peu de protéines.	Enrichi en Fer, AGE, vitamine D, ratio Ca/P (2/1).	Aliment lacté et enrichis en fer et en AG essentiels.

Tableau 7 : Les principales modifications du lait pour nourrisson selon l'âge [25]

V. Technique Utilisée : La Spectrométrie d'Absorption Atomique

1. Introduction

La spectrométrie d'absorption atomique (Atomic Absorption Spectrophotometry) (AAS) est une technique décrite pour la 1^{ère} fois par Walsh (1955), permet le dosage d'éléments chimiques fondée sur l'absorption de radiations en phase vapeur, Pour déterminer la concentration d'un élément dans un échantillon. Cette méthode qui est à l'heure actuelle acquiert une réputation dans le domaine de la chimie analytique comme une technique de routine permettant de doser une soixantaine d'éléments chimiques (Des métaux) à l'état de traces quelques mg/litre (ppm). La spectrométrie d'absorption atomique (SAA) constitue un outil privilégié d'analyse en sciences environnementales, Pharmaceutique, Métallurgie, Alimentaire ...

Les applications développées au sein de notre laboratoire permettent de doser, en mode flamme et au four graphite, plusieurs éléments chimiques tels que le Fer, Plomb, Argent, Cobalt, Manganèse, Sodium, Cadmium, Cuivre, Nickel, Zinc, Calcium, Chrome, Magnésium, Potassium ... Ces dosages ont supporté plusieurs études dans une variété de domaine surtout le domaine pharmaceutique.

2. Principe

L'absorption atomique est une méthode qui permet de doser essentiellement les métaux en solution. Cette méthode d'analyse élémentaire impose que la mesure soit faite à partir d'un analyte (élément à doser) transformé à l'état d'atomes libres. L'échantillon est porté à une température de 2000 à 3000 degrés Celsius pour que les combinaisons chimiques dans lesquelles les éléments sont engagés soient détruites. [26]

La spectrométrie d'absorption atomique est basée sur la théorie de la quantification de l'énergie de l'atome. Celui-ci voit son énergie varier au cours d'un passage d'un de ses électrons d'une orbite électronique à une autre :

$\Delta E = h\nu$ où h est la constante de Planck et ν est la fréquence du photon absorbé. Généralement seuls les électrons externes de l'atome sont concernés.

Dans le cas particulier de l'absorption atomique, on travaille sur des atomes libres à l'état fondamental ($W_i = 0$): ces atomes peuvent absorber des photons et passer ainsi à leurs différents états excités. Pour un atome, on peut donc faire de l'absorption sur les raies, ces derniers sont appelées raies de résonance.

On peut schématiser cette interaction matière-rayonnement par la figure suivante : [26]

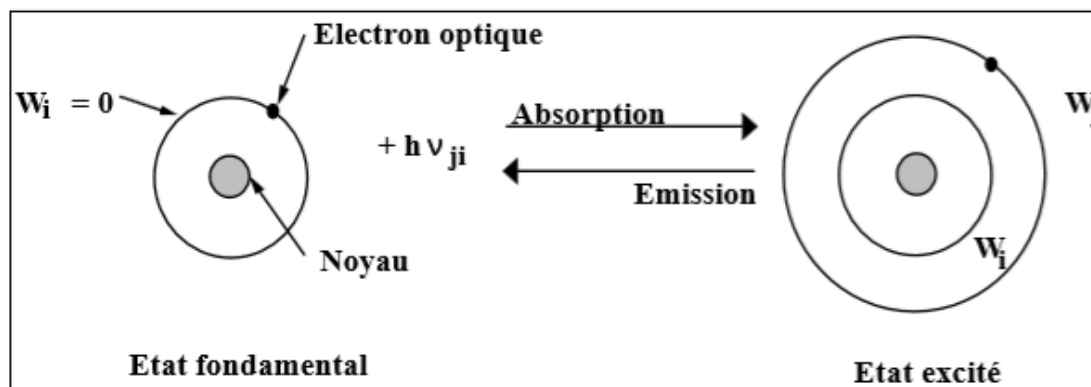


Figure 6 : Interaction rayonnement matière

Lors du procédé d'absorption atomique l'énergie fournie à l'atome provient d'une source lumineuse appelée lampe à cathode creuse. L'atome dans son état de base absorbe l'énergie lumineuse à une longueur d'onde spécifique et passe à un état d'excitation.

Les photons absorbés étant caractéristiques des éléments absorbants, et leur quantité étant proportionnelle au nombre d'atomes d'élément absorbant selon la loi de distribution de Boltzmann, l'absorption permet de mesurer les concentrations des éléments à doser. L'analyse par absorption atomique utilise la loi de Beer- Lambert. S'il y a plusieurs éléments à doser, on réalise cette manipulation pour chaque élément de l'échantillon en se plaçant à une longueur d'onde fixée. Il faut donc à chaque manipulation choisir une source adaptée pour éclairer l'élément que l'on cherche à exciter.

Le contact entre les atomes et la source lumineuse est assuré par la cellule d'absorption. La cellule d'absorption est en fait une flamme générée par la combustion d'acétylène en présence d'oxygène. L'échantillon à analyser est aspiré par l'appareil et transformé en aérosol. La flamme atomise ensuite les éléments contenus dans l'aérosol et les place en travers du faisceau de la lampe à cathode creuse.

Un potentiel électrique est appliqué entre l'anode et la cathode, ce qui a pour effet d'ioniser le gaz contenu dans la lampe. Ces atomes vont aussi entrer en collision avec les ions de gaz ce qui les fait passer à un état d'excitation. Ils retournent aussitôt à leur état de base ce qui produit l'énergie lumineuse désirée.

3. Appareillage

Les instruments de base pour la spectrométrie d'absorption atomique comportent quatre parties principales:

Le faisceau lumineux issu de la source (1) traverse la chambre d'absorption (flamme ou four) (2) dans laquelle l'élément se trouve porté à l'état atomique, avant d'être focalisé sur la fente d'entrée d'un monochromateur (3) qui sélectionne un intervalle très étroit de longueurs d'onde. Le trajet optique se termine sur la fenêtre d'entrée du détecteur (4) (Figure7). [26]

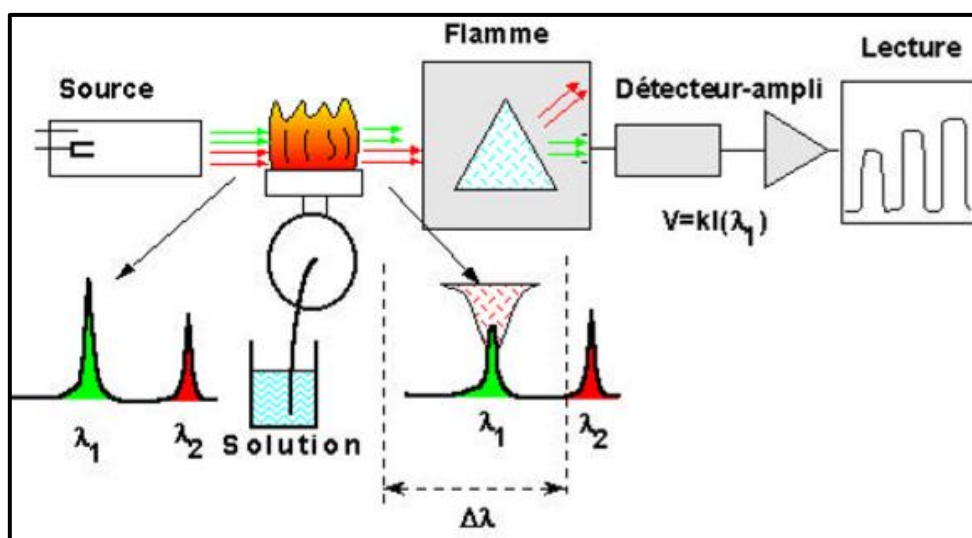


Figure 7 : Schéma de principe du spectrophotomètre d'absorption atomique

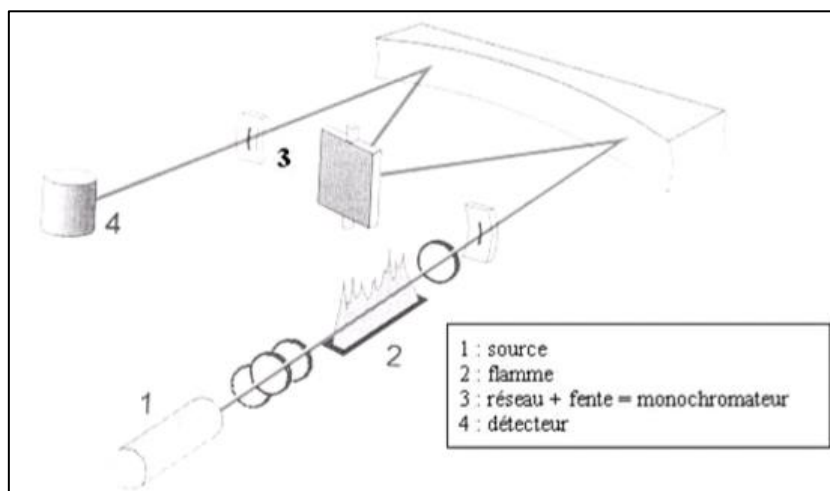


Figure 8 : Instrumentation de base de la SAA [27]

a. Générateurs des radiations : (sources lumineuses)

Elle consiste à émettre une radiation de résonance par l'élément même qu'on veut doser.

Ils devraient possiblement avoir une densité de rayonnement spectrale élevée (puissance radiante par surface, angle d'espace et unité de longueur d'onde) au centre de la ligne spectrale et la conductance optique (surface radiante multipliée par l'angle d'espace utilisable) doit être élevée. [28]

On utilise en spectrométrie deux types de sources:

a.1. La lampe cathode creuse

La lampe à cathode creuse est une source discontinue émettant des raies fines caractéristiques des atomes constituant la cathode. Généralement la cathode est mono élément, ce qui impose une lampe par élément à doser, bien que quelques lampes multiéléments (2 à 5) soient commercialisées, avec un risque de durée de vie raccourcie. La sélectivité de la lampe mono élément permet cependant de limiter les risques d'interférences spectrales. [26]

Les atomes ionisés du gaz de remplissage peuvent atteindre une énergie suffisante pour arracher les atomes du métal qui constitue la cathode. Si celle-ci est creuse, l'atmosphère atomique reste confinée à l'intérieur de la cavité et les atomes métalliques y subissent divers états d'excitation (chocs de seconde espèce), en émettant les radiations correspondantes.

L'anode : est généralement un simple fil de tungstène de quelques millimètres de diamètre soudé dans le verre de la lampe.

La cathode : un cylindre creux taillé dans le métal étudié et dont l'axe de révolution correspond à l'axe optique de l'appareil. Il est possible d'utiliser des cathodes en alliage ou constituées par un mélange de métaux frittés. Citons en particulier les cathodes « multiéléments » suivantes : Ca + Mg ; Fe + Cr + Ni + Co + Mn ; Na + K + Li ; Cu + Zn ; Zn + Ca. [29]

- **Gaz de remplissage.**

- Les seuls gaz utilisables sont les gaz rares. Il est évident qu'il faut disposer d'un corps qui ne réagisse pas avec le métal de la cathode ou de l'anode et dont le spectre soit aussi pauvre que possible. Les éléments employés sont essentiellement l'argon et le néon. [29]

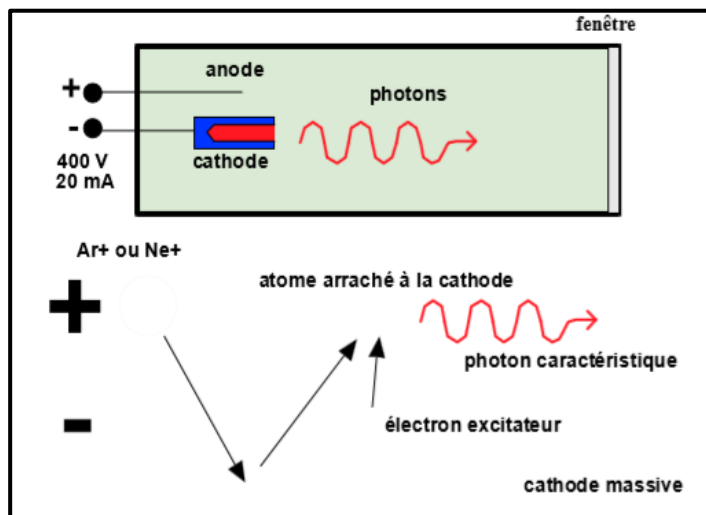
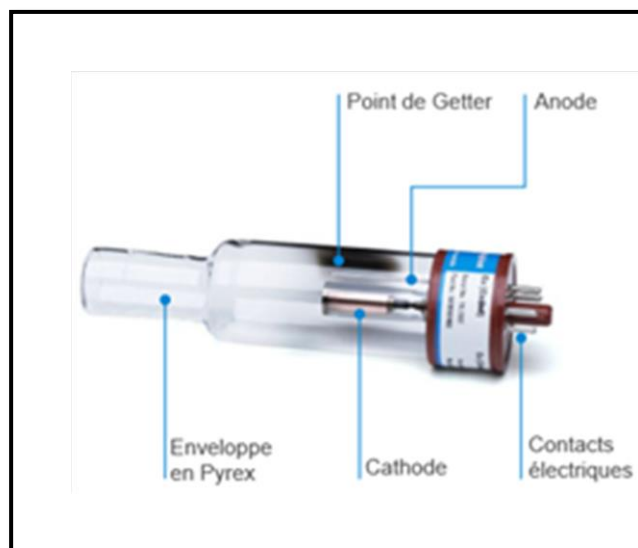


Figure 9 : Lampe à cathode creuse



a.2. Lampe à Décharge Electroique : (EDL)

La lampe EDL (Elerodeless Discharge Lamp) est utilisée pour des éléments comme l'aluminium, l'arsenic, le bismuth, le cadmium, le césium, le mercure, le phosphore ou le zinc.

Une petite quantité d'un de ces éléments, sous forme de sel, voire de combinaison avec un ou plusieurs autres éléments, est placée dans un bulbe de quartz contenant un gaz inerte. Le bulbe est placé dans un cylindre en céramique entouré par une bobine. Lorsque le courant passe dans la bobine, un champ se crée, ionise le gaz inerte et excite les atomes qui se trouvant à l'intérieur du bulbe, atomes qui émettent alors leur spectre caractéristique.

La lampe EDL donne parfois de meilleures performances et possède une durée de vie supérieure à celle de la lampe à cathode creuse. [26]

1.1. Autre source lumineuse : [29]

- Lampe à vapeur métallique.
- Lampe à excitation haute fréquence (sans électrode).

b. Introduction des échantillons

Si nous considérons le cas le plus général en absorption atomique, le matériau à analyser est une solution. La création, à partir de celle-ci, d'une vapeur atomique, capable d'absorber le rayonnement qui la traverse, se décompose en deux temps :

- **la nébulisation**, improprement appelée pulvérisation: c'est la dispersion en un fin brouillard du liquide à analyser.

- **L'atomisation** ou dissociation en atomes du composé chimique dissous. [29]

Nébuliseur pneumatique

Les échantillons destinés à une analyse sont introduits dans l'atomiseur par un nébuliseur, celui-ci aspire l'échantillon liquide à travers un capillaire par un flux de gaz à haute pression qui s'écoule autour de l'extrémité du tube. Ce mécanisme de transport du liquide est appelé aspiration. La vitesse très élevée du gaz provoque la rupture du liquide en fines gouttelettes de dimension variées, qui sont alors entraînées dans l'atomiseur. [30]

Le tableau montre les différents autres types d'introduction de l'échantillon en fonction de sa nature.

Méthode	Type d'échantillon
Nébulisation pneumatique	Solution ou boue
Nébulisation par ultrasons	Solution
Vaporisation électrothermique	Solide, liquide, solution
Production d'hydrure	Solution de certains éléments volatils
Insertion directe	Solide, poudre
Ablation laser	Solide métal
Erosion par décharge lumineuse	Solide conducteur

Tableau 8 : Méthodes d'introduction de l'échantillon dans le spectromètre d'absorption atomique. [30]

c. Chambre d'absorption (Atomisation)

Le processus de conversion d'un analyte sous forme solide, liquide ou en solution en un atome gazeux libre est appelé atomisation. Dans la plupart des cas, l'échantillon contenant l'analyte subit une forme de préparation d'échantillon qui laisse l'analyte dans une solution organique ou aqueuse. Deux méthodes générales d'atomisation sont utilisées: l'atomisation à la flamme et l'atomisation électrothermique. [31]

Le schéma montre les différentes étapes qui ont lieu durant l'atomisation, Lors de la traversée de la flamme, l'échantillon M va subir une succession de transformations :

- Solution : MA liquide (composé)
- Nébulisation : MA liquide (composé)
- Désolvatation : MA solide
(A = solution anionique)
- Vaporisation : MA gaz
- Atomisation : M⁰
- Excitation : M^{*}
- Ionisation : M⁺

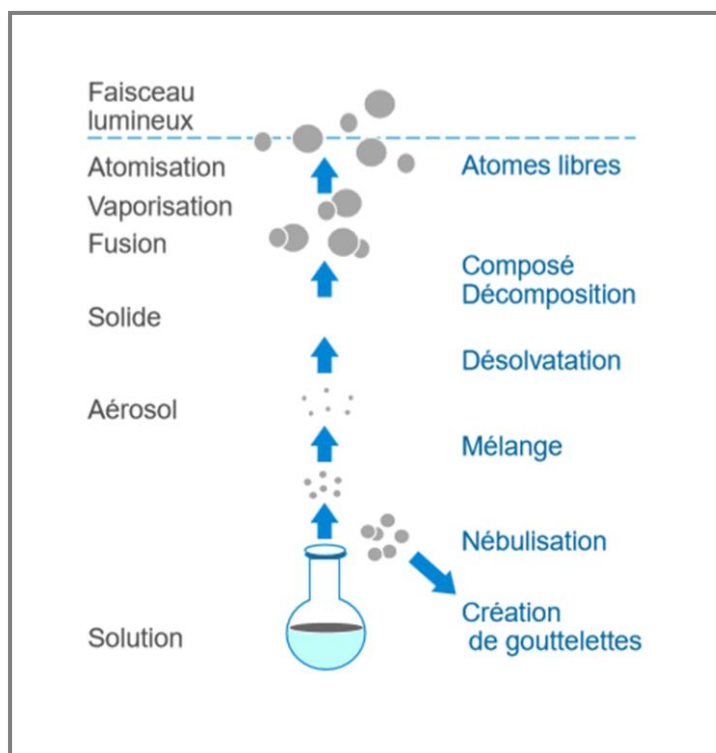


Figure 10 : illustration de l'atomisation

c.1. Atomiseur de flamme :

Dans l'atomisation à la flamme, l'échantillon est d'abord converti en un brouillard fin constitué de petites gouttelettes de solution. Le brouillard d'aérosol se mélange aux gaz de combustion dans la chambre de pulvérisation avant de passer au brûleur où l'énergie thermique de la flamme dissout le brouillard d'aérosol en un aérosol sec de petites particules solides. [31]

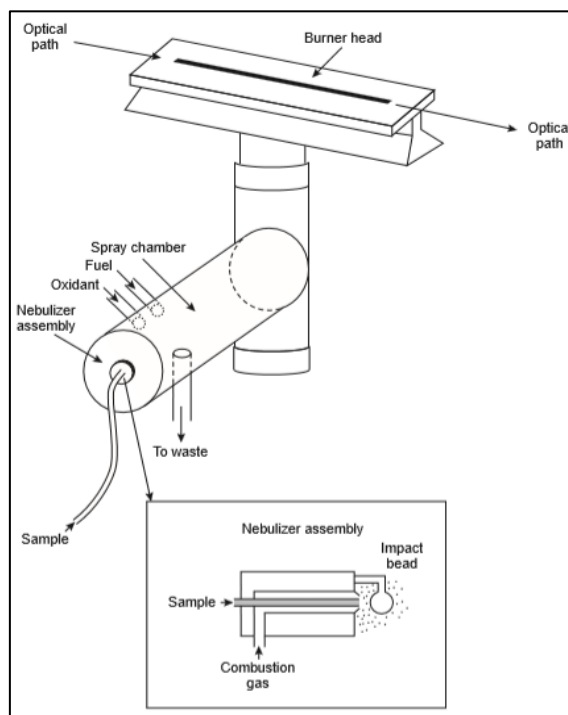


Figure 11 : Ensemble d'atomisation de flamme équipé d'une chambre de pulvérisation et d'un brûleur à fente. L'encart montre l'assemblage du nébuliseur.

Par la suite, l'énergie thermique volatilise les particules, produisant une vapeur constituée d'espèces moléculaires, d'espèces ioniques et d'atomes libres. L'énergie thermique dans l'atomisation de flamme est fournie par la combustion d'un mélange combustible-oxydant.

Les flammes air-acétylène et oxyde nitreux-acétylène sont les plus utilisées. Normalement, le combustible et l'oxydant sont mélangés dans un rapport approximativement stœchiométriques. Cependant, un mélange riche en carburant peut être souhaitable pour les atomes qui sont facilement oxydés.

Les carburants et les oxydants courants et leurs plages de température normales sont énumérés au tableau suivant : [31]

Combustible	oxydants	Température (°C)
Gaz naturel	Air	1700-1900
Hydrogène	Air	2000-2100
Acétylène	Air	2100-2400
Acétylène	Péroxide d'azote	2600-2800
Acétylène	Oxygène	3050-3150

Tableau 9 : Combustibles et oxydants utilisés pour la combustion de flamme

c.2. Atomiseur électrothermique : (four graphite)

Ce dispositif d'atomisation se compose généralement d'un four à tube de graphite à alimentation électrique.

L'ensemble de l'échantillon est atomisé dans un four à tube de graphite, et la vapeur atomique est retenue sur le parcours optique pendant en certain temps, ce qui permet d'améliorer la limite de détection.

Les échantillons, liquides ou solides, sont introduits directement dans le four à tube de graphite qui est chauffé en une série d'étapes programmées pour dessécher l'échantillon, éliminer par pyrolyse des principaux composants de la matrice, puis atomiser la totalité de l'élément à analyser. Le nettoyage du four s'effectue par programmation d'une température finale supérieure à la température d'atomisation. La circulation d'un gaz inerte lors de l'étape de pyrolyse dans le four à tube de graphite permet d'améliorer les performances à l'atomisation. [32]

Le four en graphite, est constitué d'un tube de graphite cylindrique d'environ 1 à 3 cm de longueur et de 3 à 8 mm de diamètre (figure12).

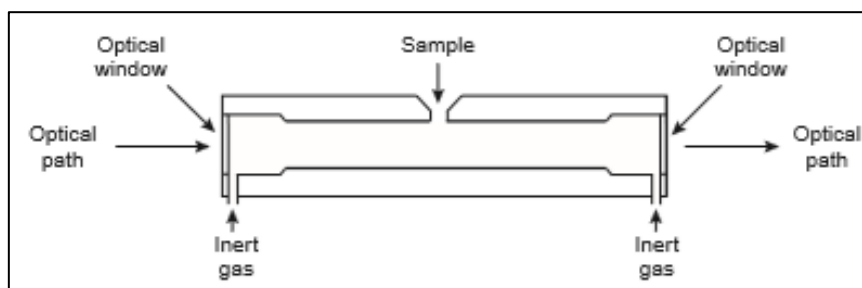


Figure 12: Atomiseur électrothermique

Des échantillons entre 5 et 50 μL sont injectés dans le tube de graphite à travers un trou de petit diamètre situé au sommet du tube.

L'atomisation est réalisée en trois étapes :

Dans la **première étape**, l'échantillon est **séché** en utilisant un courant qui lève la température du tube de graphite à environ 110°C . La désolvatation laisse l'échantillon sous forme de résidu solide.

Dans la **deuxième étape**, la température est augmentée à $350\text{-}1200^{\circ}\text{C}$. À ces températures, toute matière organique dans l'échantillon est **convertie** en CO_2 et H_2O , et les matières inorganiques volatiles sont vaporisées. Ces gaz sont éliminés par le flux de gaz inerte.

Au **stade final**, l'échantillon est **atomisé** en augmentant rapidement la température à $2000\text{-}3000^{\circ}\text{C}$. Le résultat est un pic d'absorbance transitoire dont la hauteur ou la surface est proportionnelle à la quantité absolue d'analyte injectée dans le tube de graphite.

Les trois étapes sont terminées en environ 45-90s, la plus grande partie de ce temps étant utilisée pour sécher et incinérer l'échantillon. [31]

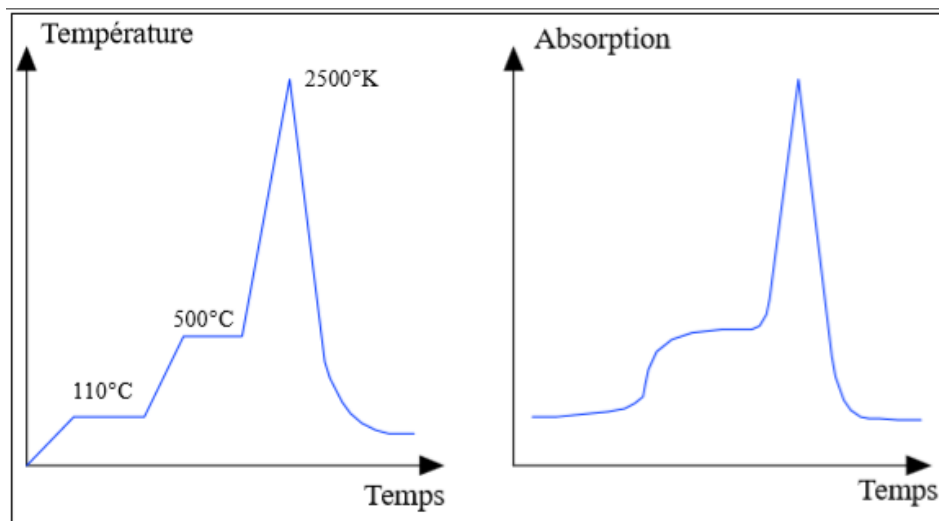


Figure 13 : Programme électrothermique pour un four graphite. [31]

L'atomiseur électrothermique offre plusieurs caractéristiques intéressantes par rapport à la flamme :

- ✓ Une faible quantité d'analyte de l'ordre de $(10^{-6} \text{ à } 10^{-8} \text{ g})$ est nécessaire.
- ✓ Les phases solides peuvent être analysées directement, très souvent, sans prétraitement.
- ✓ Le niveau de bruit de fond est très bas.
- ✓ Augmentation de la sensibilité car la production d'atomes analytes libres est plus importante que dans la flamme. [33]

c.3. Générateur d'hydrures à vapeur froide

La vapeur atomique peut aussi être générée à l'extérieur du spectromètre. Tel est notamment le cas lorsqu'il est fait appel à la méthode dite de vapeur froide pour le mercure ou à la génération d'hydrures pour des éléments tels que l'arsenic, l'antimoine, le bismuth, le sélénium, et l'étain.

En ce qui concerne le mercure, les atomes sont générés par réduction chimique avec du chlorure stanneux ou du borohydrure de sodium et la vapeur atomique est entraînée par un courant de gaz inerte dans une cellule chauffée, à l'intérieur de laquelle ils sont dissociés en atomes. [32]

d. Monochromateur

Le faisceau incident (source émise) est un spectre de raies qui contient : les raies de l'élément à doser et les raies du gaz de remplissage, les raies d'éventuelles impuretés ainsi que les raies de l'atomiseur (flamme) par conséquent, c'est une lumière polychromatique. Le rôle du monochromateur consiste à éliminer toute la lumière, quelle que soit son origine, ayant une longueur d'onde différente de celle à laquelle on travaille pour avoir un faisceau monochromatique. [26]

e. Détecteur

Dans les méthodes physiques d'analyse, l'appareil utilisé fournit un résultat qui sera le plus souvent un signal électrique représentatif de la grandeur à mesurer : le détecteur est donc un "transformateur" qui fournit un courant ou une tension à partir d'une caractéristique physico-chimique.

Le faisceau arrive ensuite sur le détecteur. Ce dernier mesure les intensités lumineuses nécessaires au calcul des absorbances.

Il est relié à un amplificateur et un dispositif d'acquisition. On détermine :

$$\text{Absorbance spécifique} = \text{Absorbance totale} - \text{Absorbance non spécifique}$$

L'absorption spécifique est due à l'élément à doser (sur une raie). L'absorption non spécifique est due à l'absorption continue de la matrice.

Des mesures permettent la correction des absorptions non spécifiques. [27]

En spectrophotométrie d'absorption, la grandeur physique observée est le flux lumineux reçu par un détecteur de photons. Il existe trois types de détecteurs:

- Les détecteurs thermiques
- Les détecteurs pyroélectriques
- Le photomultiplicateur. [28]

La plupart des spectromètres modernes utilisent comme détecteur un photomultiplicateur relié à un étage d'amplification. [34]

4. Les Interférences et leurs corrections

Un élément est dosé par absorption de sa raie la plus intense. Cependant, plusieurs facteurs peuvent affecter la position des raies donc conduire à des dosages inexacts.

Les interférences perturbant l'analyse sont de quatre types :

- ✓ **Spectrale**
- ✓ **Chimique**
- ✓ **Physique**
- ✓ **Ionisation**

a. Interférences spectrales (= absorptions non spécifiques)

Ces phénomènes ont leur siège dans la source d'atomisation et affectent la mesure spectrale d'absorbance de l'analyte :

- par superposition de raies : raie de l'élément à doser et raie appartenant à un autre élément.
- par superposition d'absorbances provenant de molécules.
- par la diffusion de la lumière incidente sur des particules solides ou liquides présentes dans l'atomiseur.

Elles se traduisent souvent par une translation de la droite d'étalonnage établie en milieu complexe, par rapport à celle obtenue en milieu simple (interférences additives). [30]

✓ Correction des interférences spectrales

Le rôle des correcteurs est de mesurer automatiquement les absorbances non spécifiques dues aux interférents en tout genre afin de les soustraire de l'absorbance. Lors des réglages préliminaires de l'appareil (c.à.d. en l'absence d'échantillon), il faut ajuster $\log I_0/I = 0$, si on veut obtenir une mesure correcte.

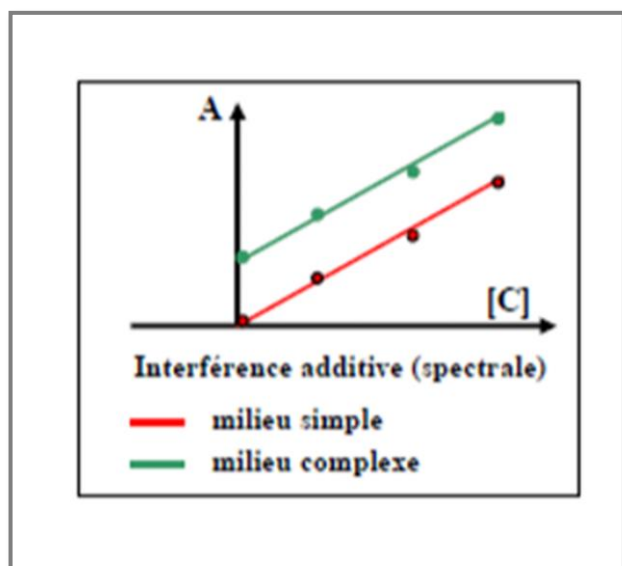


Figure 14 : Correction des interférences spectrales

b. Interférences chimiques

Elles sont dues au fait que certains sels métalliques sont difficiles à atomiser, ou qu'ils forment des oxydes réfractaires dans la flamme. L'anion qui accompagne le cation que l'on dose joue un rôle important dans ce cadre.

Exemple : Le CaCl_2 est plus facile à atomiser, donc plus facile à doser que du Ca sous forme de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$: phosphate tricalcique. Donc, on n'utilise jamais l'acide phosphorique comme acide pour redissoudre les échantillons après minéralisation, car il forme des phosphates difficiles à atomiser. [27]

✓ Correction des interférences chimiques

Il faudra faire l'étalonnage et les dosages sous la même forme saline ; par exemple, si on dose du Ca dans CaCl_2 , on prendra CaCl_2 pour faire la gamme d'étalonnage. [27]

c. Interférences physiques

Elles sont généralement liées aux propriétés physiques des solutions étudiées (changement de viscosité entre les étalons et les échantillons). Si la solution dans laquelle on veut doser un métal donné renferme un ou plusieurs autres ions en concentration importante, quand on va provoquer la nébulisation de la solution dans une flamme, ces autres sels métalliques s'insolubilisent.

- ✚ Il y a formation de petites particules qui vont physiquement provoquer des perturbations, car ils dispersent la lumière. Cet effet provoque la diffusion de la lumière par des particules qui s'insolubilisent dans la flamme. [35]

✓ Correction des interférences physiques

On effectue une mesure à la longueur d'onde de la raie de résonance. (Figure 15)

1. On a l'absorption atomique, et la diffusion de la lumière par les particules.

- On se place à une longueur d'onde complètement différente de la raie de résonance :
 2. Le métal n'absorbe plus. Mais il y a toujours la diffusion de la lumière par les particules qui s'insolubilisent.
- On fait la différence des 2 mesures: d'où l'absorption du métal que l'on veut doser.

Les interférences chimiques et physiques entraînent un changement de pente de la droite par rapport à la droite d'étalonnage établie en milieu simple.

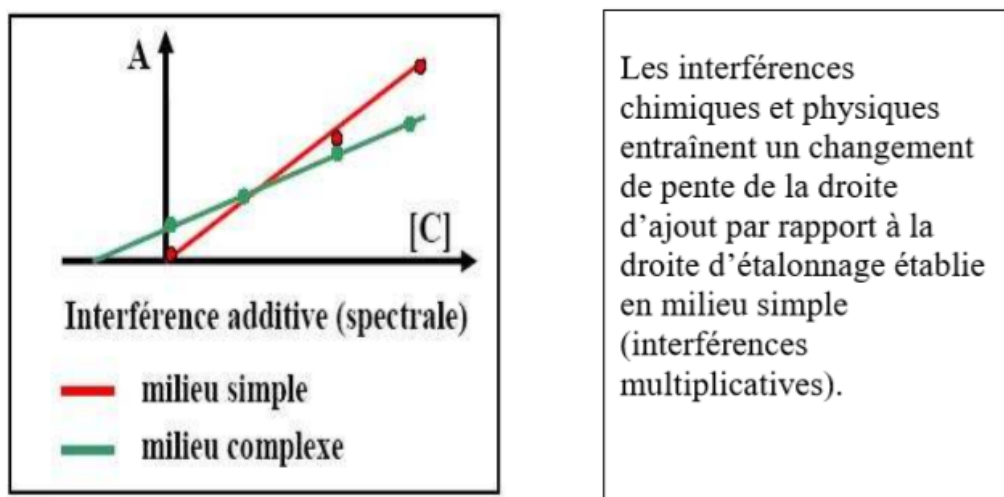


Figure 15 : Correction des interférences physiques et chimiques

d. Interférences d'ionisation

Les interférences d'ionisation se rencontrent lorsque l'analyte est un élément facilement ionisable, car tout atome qui s'ionise ne peut plus être dosé. On choisit donc des conditions de température qui permettent d'éviter l'ionisation. Cependant, on ne peut pas toujours l'éviter : la présence d'un autre élément plus facilement ionisable modifie l'équilibre d'ionisation de l'analyte. Il peut être ajouté sciemment afin de diminuer l'ionisation de l'analyte (effet tampon) et donc accroître l'absorbance. [27]

✓ Correction des interférences d'ionisation

-Si on veut doser les alcalino-terreux (ex : Ca), pour éviter l'ionisation, on ajoute dans la solution à doser des éléments qui s'ionisent d'avantage (ex : un alcalin)

3. Le Ca est protégé.

- Pour doser les alcalins, il existe un élément qui s'ionise plus facilement qu'eux : un sel de tantale.

4. Il y a protection de l'alcalin, car ce sel supporte l'ionisation. [27]

VI. Conclusion

Il ressort de cette étude bibliographique le rôle de du Fer et du Cuivre dans l'organisme vivant, et des médicaments et produits de santé à corriger le manque de ces éléments, ainsi l'efficacité de la spectroscopie d'absorption atomique comme technique fiable à l'échelle internationale en termes d'analyse des oligo-éléments.

En se basant sur toutes ces terminologies relatives au sujet de mémoire on va entamer dans le chapitre suivant les résultats et interprétations des dosages du Cuivre et du Fer.

Chapitre IV : RESULTATS EXPERIMENTAUX ET INTERPRETATIONS

Développement et mise en place des méthodes spécifiques pour le dosage du Fer et cuivre dans un médicament un et complément alimentaire commercialisés Sur le Marché Marocain

I. Introduction

Les méthodes de contrôle techniques et analytiques des métaux lourds jouent un rôle important dans l'assurance qualité et la sécurité d'usage des médicaments et des produits de santé.

Notre démarche est basée sur l'utilisation de la spectrométrie d'absorption atomique, comme technique analytique de détermination de la concentration du composé actif, en développant de nouvelles méthodes internes au LNCM pour comparer les concentrations déclarées par les fabricants aux concentrations déterminées par le LNCM.

Au cours de cette démarche, nous avons suivi la méthodologie suivante : choisir les solutions stock à partir des standards de référence de l'élément à doser, choisir et préparer les diluants compatibles, puis préparer les solutions standards de référence conformément aux pharmacopées en vigueur pour tracer la courbe d'étalonnage. Et pour finir proposer la méthode adéquate pour préparer l'échantillon, médicament ou complément alimentaire à doser. Toute cette démarche nécessite d'amples efforts pour mettre en place tels protocoles.

La dernière partie de cette étude consiste à établir les conditions expérimentales de notre spectrophotomètre d'absorption atomique, équipé d'une lampe à cathode creuse du métal à doser, puis réaliser l'analyse des échantillons en mode flamme et en mode four.

Dans ce chapitre nous nous intéressons à deux études :

- **Etude 1 :** Dosage du fer dans le complexe d'hydroxyde ferrique saccharose par deux méthodes :
 - Externes (du fabricant).
 - Internes (du LNCM).
- **Etude 2 :** Dosage du cuivre dans un lait pour nourrisson en mode four de la spectroscopie d'absorption atomique, par une autre méthode développée au LNCM.

II. Etude 1 : Dosage en Mode Flamme

1. Les Modes Expérimentaux

- **Méthode1 : Méthode Externe (du Fabricant)**

A. Réactifs et équipements :

- Spectromètre d'absorption atomique, équipé d'un logiciel d'acquisition de données
- Cylindre de gaz acétylène
- Lampe a cathode creuse de fer
- Alimentation en air comprimé
- Standard 1 : standard de référence à base du Fer utilisé pour le Fabricant
- Eau purifiée
- Standard 2 : standard utilisé par le fabricant pour préparer le diluant
- Acide hydrochlorique

B. Conditions expérimentales:

Spectromètre	
L'élément	Fer
Longueur d'onde	248.3 nm
Largeur de fente	
Courant	Valeurs optimales développées par le fabricant lors de la validation du processus de fabrication
Temps d'analyse	
Temps de retard	
Flamme	
Flux d'air (oxydant)	
Flux d'acétylène	

Tableau 10 : Conditions expérimentales d'analyses par la méthode externe

C. Préparation des solutions standards et tests (d'échantillon) :

• Solution mère de fer (stock solution – standard 1)

On a transféré une quantité en mg telle qu'elle est indiquée dans le dossier du fabricant du standard1, qu'on a pesés avec précision. Après on a effectué une dilution avec de l'eau purifiée jusqu'au volume dans une fiole à 1000 ml pour obtenir une concentration de fer de la solution mère d'étalonnage préconisée par le fabricant.

• Préparation du diluant (Standard 2)

Conformément au dossier du fabricant, on dissout une quantité bien déterminée en mg du standard 2 avec de l'eau purifiée, on agite pour dissoudre puis on rajoute un volume déterminé de l'acide chlorhydrique dans une fiole de 1000 ml, puis on complète avec de l'eau jusqu'au volume.

- **Préparation de la solution étalon de fer pour la courbe d'étalonnage**

Dans une fiole de 50 ml on transfère 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, et 10 ml de la solution stock de fer (solution mère). Après on dilue chaque fiole avec le diluant déjà préparé à base du standard 2 jusqu'au volume et on mélange pour obtenir des préparations standards suivantes :

Volume de solution stock de fer en (ml)	2	4	6	8	10
Diluant à base du standard 2 (ml)	50	50	50	50	50
Concentration des étalons en (µg/ml)	2	4	6	8	10

Tableau 11 : Préparation des solutions étalons pour la courbe d'étalonnage (Méthode Externe)

D. Préparation de la solution test :

-On pipete un volume bien déterminé préconisé par le dossier technique de notre médicament : Le complexe hydroxyde ferrique saccharose qui est sous forme de solution injectable à base de fer est transféré dans une fiole de 100 ml.

-Avec une autre pipette on rajoute un volume en ml bien déterminé d'acide chlorhydrique, et on mélange jusqu'à ce que la solution ait une coloration jaune. Après avoir laissé la solution se reposer à une température ambiante, on dilue notre solution test avec notre diluant déjà préparé jusqu'au volume et on mélange.

-Finalement on pipete un volume de cette solution et on transfère dans une fiole de 100 ml, après on dilue avec notre diluant déjà préparé jusqu'au volume et on mélange pour obtenir notre solution test.

➤ **Méthode 2: Méthode interne (du LNCM)**

A. Réactif d'équipement :

- Spectromètre d'absorption atomique, équipé d'un logiciel d'acquisition de données
- Cylindre de gaz acétylène
- Lampe à cathode creuse de fer
- Alimentation en air comprimé
- Standard 1 : standard de référence à base de fer interne au LNCM
- Eau purifiée (Bidistillée)
- Standard 2 : Standard mère pour préparation du diluant
- Acide hydrochlorique

B. Conditions expérimentales:

Spectromètre	
L'élément	Fer
Longueur d'onde	248.4 nm
Largeur de fente	Valeurs optimales préconisées par le LNCM
Type de signal	
Courant	
Temps d'analyse	
Temps de retard	
Flamme	
Flux d'air (oxydant)	
Flux d'acétylène	

Tableau 12 : Conditions expérimentales d'analyses par la méthode interne

C. Préparation des solutions standards, étalons et tests :

• Solution standard de fer (stock solution)

La solution stock de fer est une solution commerciale à base de fer à une concentration bien déterminé en ppm.

• Préparation du diluant

On met de l'eau dans une fiole de 1000ml puis on ajoute une quantité du standard 2, on agite le mélange puis on complète avec de l'eau purifiée (eau bidistillée) jusqu'au volume, pour arriver à un pourcentage préconisé.

• Préparation des étalons pour la courbe d'étalonnage

On prépare une solution d'étalonnage à base de fer diluée à 10 µg/mL noté S^0 considérée comme nouvelle solution stock d'étalonnage qu'on complète avec le diluant déjà préparé.

Dans une fiole de 50 ml on transfère 10, 20, 30, 40 mL de la solution stock fer, puis on rajoute notre diluant préparé, on agite et on complète jusqu'au volume pour obtenir nos solutions étalons avec les concentrations suivantes :

Volume de solution stock S^0 de fer en (ml)	10	20	30	40	S^0 Initialement préparé à 10 ppm
Diluant en (ml)	40	30	20	10	
Concentration des étalons en (µg/ml)	2	4	6	8	

Tableau 13 : Préparation des solutions étalons pour la courbe d'étalonnage (Méthode Interne)

D. Préparation de la solution test

- On transfère un volume du médicament complexe hydroxyde ferrique saccharose qui est à base de fer dans une fiole de 100ml.
- Puis on rajoute un volume d'acide chlorhydrique sur notre échantillon on mélange jusqu'à avoir une coloration jaune de l'échantillon puis on complète jusqu'au volume avec notre diluant d'acide nitrique déjà préparé.
- Puis on pipète avec une nouvelle pipette un volume de cette solution préparée qu'on transfère dans une fiole de 100ml, puis on complète jusqu'au volume avec notre diluant déjà préparé.

2. Résultats de l'Etape 1

➤ Méthode 1 : Méthode Externe(du fabricant)

○ Procédure :

Pour analyser les échantillons par la spectrométrie d'absorption atomique en mode flamme, il faut vérifier que le logiciel assure toutes les étapes de performance de l'équipement sont requises. On a aspiré les solutions étalons pour mesurer les absorbances à 248,3 nm en commençant par les dilutions à faibles concentrations. On a répété la mesure trois fois pour s'assurer de la répétabilité de l'équipement :

Concentration des solutions d'étalonnage	Absorbance Individuelle des (3 essais)	Absorbance Moyenne	Ecart type
$C_1 = 2 \text{ ppm}$	0,049 0,048 0,048	0,049	0,02 %
$C_2 = 4 \text{ ppm}$	0,094 0,093 0,094	0,094	0,03 %
$C_3 = 6 \text{ ppm}$	0,138 0,138 0,136	0,137	0,08 %
$C_4 = 8 \text{ ppm}$	0,177 0,176 0,177	0,176	0,06 %
$C_5 = 10 \text{ ppm}$	0,216 0,213 0,215	0,215	0,15 %

Tableau 14 : Résultats des absorbances (Méthode Externe)

La courbe d'étalonnage est obtenue en traçant les absorbances par rapport aux concentrations des solutions étalons. Le test n'est valide que si le coefficient de corrélation de la courbe d'étalonnage est supérieur à 0,995 selon les normes en vigueur des pharmacopées :

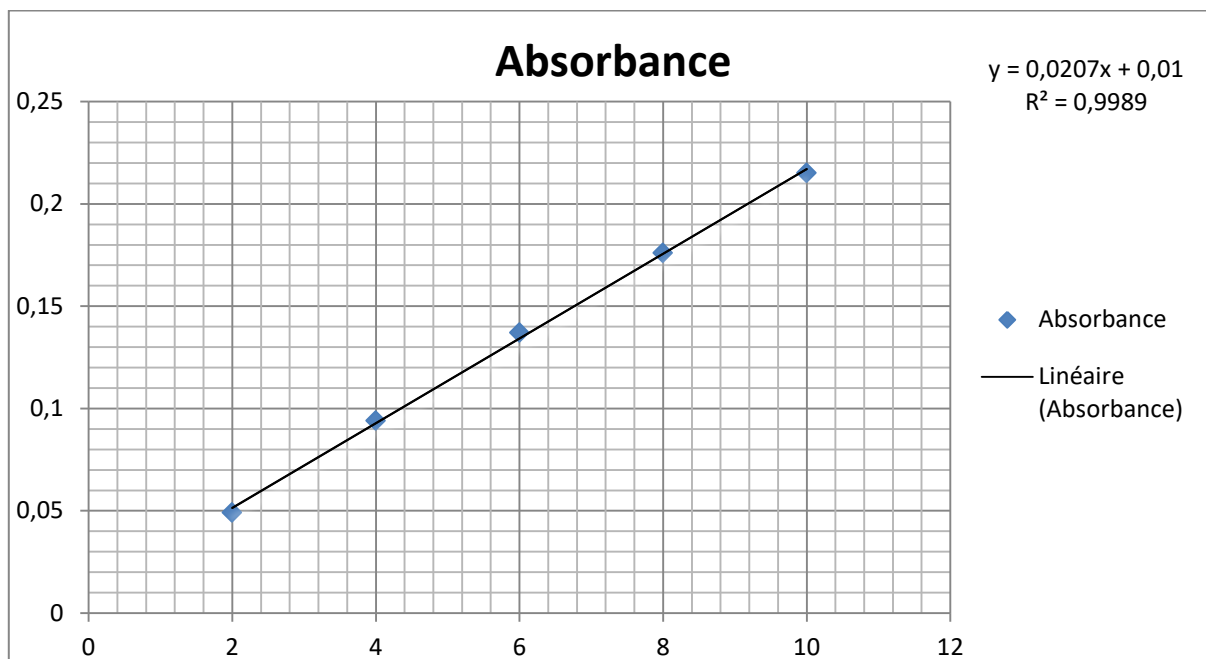


Figure 16 : Courbe d'étalonnage du fer dans le complexe hydroxyde ferrique saccharose (Méthode Externe)

✚ Résultats de dosage de l'échantillon du médicament

Valeur des absorbances	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Absorbance Moyenne	Ecart type
	0,175	0,175	0,176	0,176	0,07 %

Tableau 15 : Absorbance du médicament méthode Externe

On a exploité les résultats des absorbances équivalentes aux concentrations pour tracer la courbe d'étalonnage (figure16), avec laquelle on va calculer la concentration du fer en mg/mL du complexe hydroxyde ferrique saccharose à partir de la pente de la courbe en utilisant la relation suivante :

$$\text{Conc du fer (mg /mL)} = \frac{A \times F}{S \times 1000}$$

A = Absorbance

F = Facteur de dilution

S = La pente

- Les critères d'acceptation du fer sont entre 19 mg et 21 mg par mL de fer cela veut dire avec une limite de $\pm 5\%$ de la valeur déclarée, entre une valeur de (95,0 % et 105,0 %).
- *Après avoir effectué le calcul de la concentration finale de fer de notre médicament par la méthode externe on a trouvé une concentration dans les normes qui est égale à : 19,93 mg/mL de fer.*

➤ **Méthode 2 : Méthode Interne**

Procédure :

De la même façon que la première méthode on a travaillé en mode flamme du spectrophotomètre d'absorption atomique en mesurant les absorbances à 248,3 nm en commençant par les dilutions à des faibles concentrations. On a répété la mesure trois fois pour avoir des résultats fiables et pour s'assurer de la répétabilité :

Concentration des solutions d'étalonnage	Absorbance Individuelle de (3 essais)	Absorbance Moyenne	Ecart type
C ₁ = 2 ppm	0,042 0,040 0,040	0,040	0,09 %
C ₂ = 4 ppm	0,075 0,075 0,075	0,075	0,02 %
C ₃ = 6 ppm	0,105 0,103 0,104	0,104	0,08 %
C ₄ = 8 ppm	0,135 0,134 0,134	0,134	0,04 %
C ₅ = 10 ppm	0,169 0,169 0,172	0,170	0,16 %

Tableau 16 : Résultats des absorbances (Méthode Interne)

La courbe d'étalonnage est obtenue en traçant les absorbances par rapport aux concentrations des solutions étalons. Le test n'est valide que si le coefficient de corrélation de la courbe d'étalonnage est supérieur à 0,995 selon les pharmacopées en vigueur.

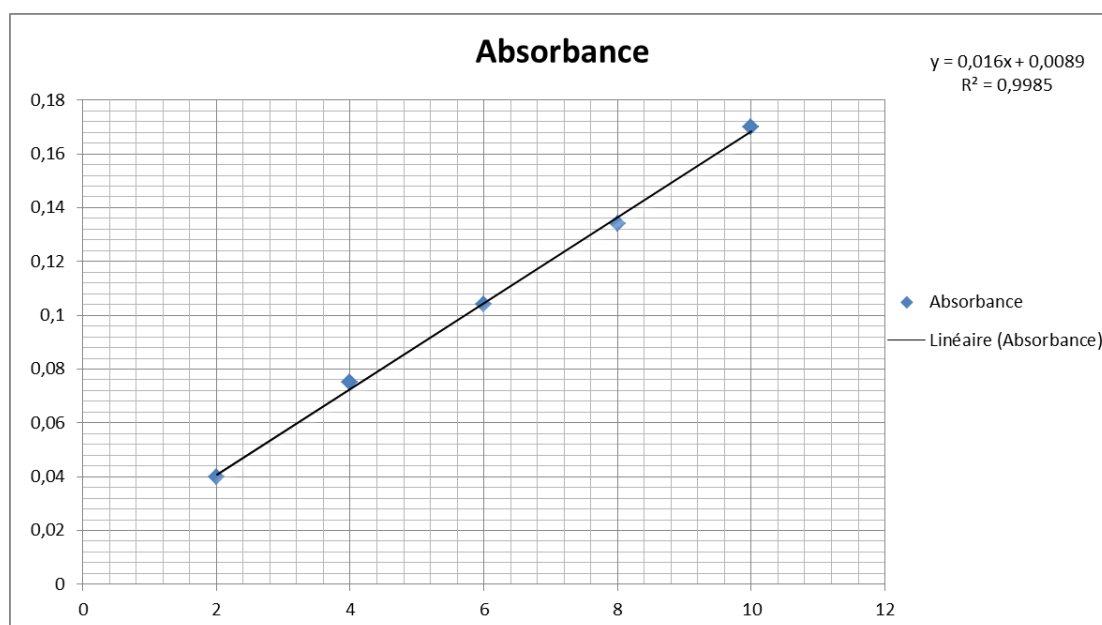


Figure 17 : Courbe d'étalonnage du fer dans le complexe hydroxyde ferrique saccharose (Méthode Interne)

Résultats de dosage de l'échantillon du médicament

Valeur des absorbances	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Absorbance Moyenne	Ecart type
	0,133	0,133	0,134	0,133	0,04 %

Tableau 17 : Absorbance du médicament méthode Interne

Après avoir tracé la courbe d'étalonnage du fer (figure17), celle-ci doit avoir un facteur de corrélation au minimum avec une valeur de 0,995 comme conformité du système. Ce qui est le cas de notre étude. A partir de cette courbe d'étalonnage, nous déduisons la concentration du Fer dans notre médicament du complexe hydroxyde ferrique saccharose aisément à partir de la relation suivante :

$$\text{Conc du fer (mg /mL)} = \frac{A \times F}{S \times 1000}$$

A = Absorbance

F = Facteur de dilution

S = La pente

- Les critères d'acceptation du fer pour le fabricant sont entre 19 mg/ml et 21 mg /mL de fer cela veut dire avec une limite des résultats de dosage de $\pm 5\%$ de la valeur déclaré, entre une valeur de (95,0 % et 105,0 %).
- ***Après avoir calculé de la concentration finale du fer de notre médicament par la méthode interne on a trouvé une concentration parfaitement dans les normes qui est égale à : 20,03 mg/mL de fer.***

3. Discussion et interprétation de l'Etude 1

Après avoir traité les résultats des courbes d'étalonnages obtenus par l'appareil, on a pu calculer les concentrations du fer dans le médicament par la méthode interne et externe :

Comparaison des deux Méthodes	Méthode Externe (Fabricant)	Méthode Interne (LNCM)
Coefficient de corrélation	$0,9971 \geq 0,995$	$0,9986 \geq 0,995$
Concentration calculé en mg/mL de Fer	$19 \leq \mathbf{19,93} \leq 21$	$19 \leq \mathbf{20,03} \leq 20$

Tableau 18 : Résultats des deux méthodes de l'étude 1

- Dans ce médicament ou le principe actif est : le complexe hydroxyde ferrique saccharose, la valeur déclarée du fer est 20 mg/mL de fer.
- Or, Les critères d'acceptation du fer déclarés par le fabricant doivent être entre 19 mg/mL et 21 mg/mL de fer. Cela veut dire avec une limite de $\pm 5\%$ de la valeur déclarée, donc entre (95,0 % et 105,0 %).
- D'après cette analyse il apparait que notre méthode et celle du fabricant sont toutes deux conformes. En effet, les deux coefficients de corrélation sont supérieurs à la norme exigée qui est 0,995 et les valeurs mesurées du dosage sont compris entre 19mg/mL et 21mg/mL.
- En traitant par la méthode externe du fabriquant on a trouvé après calculs 19,93 mg/ml de fer et 20,03 mg/mL par la méthode interne du LNCM, ce qui fait que notre méthode est légèrement meilleure que celle du fabricant du faite que notre coefficient de corrélation est supérieur à celui obtenu par la méthode du fabricant et que l'écart entre la valeur mesurée par notre méthode par rapport à la valeur déclarée est de 0,15% inférieur à celle par la méthode du fabricant qui est à 0,35%.

Dans ce tableau on va résumer les intervalles d'acceptation par chaque méthode :

	Méthode Externe	Méthode Interne	Les critères d'acceptations
Intervalles	99,65 %	100,15 %	95,00 % et 105,00 %
La limite d'erreur	- 0,35 %	+ 0,15 %	$\pm 5\%$

Tableau 19 : Les critères d'acceptations

D'après ce récapitulatif on peut conclure qu'on a obtenu une marge d'erreur plus petite, et un dosage proche à 100% à l'aide de la méthode interne par rapport à l'externe. De là on peut déduire que notre méthode a était plus robuste est efficace pour le dosage du fer dans ce type de principe actif antianémique.

III. Vérification du mode four du SAA avec le Plomb et le Chrome

Sachant que la majeure partie des travaux antérieurs utilisent le mode flamme pour le dosage des métaux lourds. Dans cette étude nous avons anticipé la réflexion et de poser la question si on peut aussi retrouver les mêmes résultats avec le four graphite sur les métaux lourds.

Ce qui nous a poussé d'abord de vérifier la conformité du système de notre (équipement spectromètre) avec des éléments chimiques tels que le Pb et Cr qui ont donné des résultats plus que satisfaisants avec les exigences tolérées par les normes internationales et les pharmacopées.

Conditions expérimentales pour le chrome et le plomb :

Spectromètre		
L'élément	Chrome	Plomb
Longueur d'onde	357,9 nm	283,3 nm
Largeur de fente	Valeurs optimales préconisées par le LNCM	
Type de signal		
Courant		
Temps d'analyse		
Temps de retard		
Four		

Tableau 20 : Conditions expérimentales d'analyses du plomb et du chrome

1. Dosage du chrome

a. Réactifs et équipements

1. Spectrophotomètre d'absorption atomique, équipé d'un logiciel d'acquisition de données.
2. Cylindre de gaz d'argon
3. Lampe a cathode creuse de chrome
4. Alimentation en air comprimé
5. Standard 1 : standard de référence à base de chrome interne au laboratoire
6. Eau purifiée (Bidistillée)
7. Standard 2 : Standard mère pour préparation du diluant

b. Préparation des solutions standards et tests

• Solution standard du chrome (stock solution)

La solution standard de chrome est une solution commerciale de chrome à une concentration bien déterminée en ppm.

• Préparation du diluant

On transfère de l'eau dans une fiole de 1000ml puis on ajoute une quantité du standard 2, on agite le mélange puis on complète avec de l'eau purifiée (eau bidistillée) jusqu'au volume, pour arriver à un pourcentage préconisé.

c) Préparation des étalons pour la courbe d'étalonnage

- Dans une fiole de 100 ml on transfère quelques μl de la solution stock de chrome puis on complète avec notre diluant jusqu'au volume. Après on effectue quelque dilution pour tomber sur une solution avec une concentration de 20 ppb.

- Le four effectue des dilutions automatique illustrées dans le tableau ci-dessous pour obtenir des solutions étalons avec les concentrations suivantes 5,0 ; 10,0 ; 15,0 et 20,0 $\mu\text{g/L}$ de de chrome.

Solution stock de chrome en ppb	0	5	10	15	Concentration du Cr déjà préparé de 20 ppb
Volume du diluant	20	15	10	5	
Concentrations des solutions étalons $\mu\text{g/L}$ de chrome	0	5	10	15	

Tableau 21 : Préparation des solutions étalons pour la courbe d'étalonnage du chrome

c. Résultats de la courbe d'étalonnage du chrome

Pour analyser l'échantillon du chrome par le spectromètre d'absorption atomique en mode four, on a mesuré à une absorbances de 357,9 nm et on a vérifié l'ensemble de tests de performance de l'équipement à l'aide du logiciel.

Ce qui nous permet d'effectuer l'analyse en bonnes conditions. Le four aspire les solutions et effectue des dilutions automatiques pour atteindre les concentrations désirées en $\mu\text{g/L}$ en commençant par les dilutions à faibles concentrations.

On a répété la mesure trois fois pour avoir des résultats fiables :

Concentration des solutions d'étalonnage	Absorbance Individuelle (3 essais)	Absorbance Moyenne	Ecart type
$C_0 = 0$ ppb (Blanc)	0,002 0,001 0,001	0,001	0,23 %
$C_1 = 5$ ppb	0,102 0,099 0,108	0,103	0,47 %
$C_2 = 10$ ppb	0,223 0,241 0,256	0,240	1,65 %
$C_3 = 15$ ppb	0,336 0,353 0,360	0,350	1,26 %
$C_4 = 20$ ppb	0,472 0,478 0,495	0,482	1,17 %

Tableau 22 : Résultats des absorbances du chrome

On a tracé la courbe d'étalonnage (figure 18) en traçant les absorbances par rapport aux concentrations des solutions étalons. Le test n'est valide que si le coefficient de corrélation de la

courbe d'étalonnage est supérieur à 0,995 selon les normes en vigueur des pharmacopées, et pour cette deuxième méthode on a trouvé encore un coefficient de corrélation supérieur aux exigences qui est égale à 0,999106.

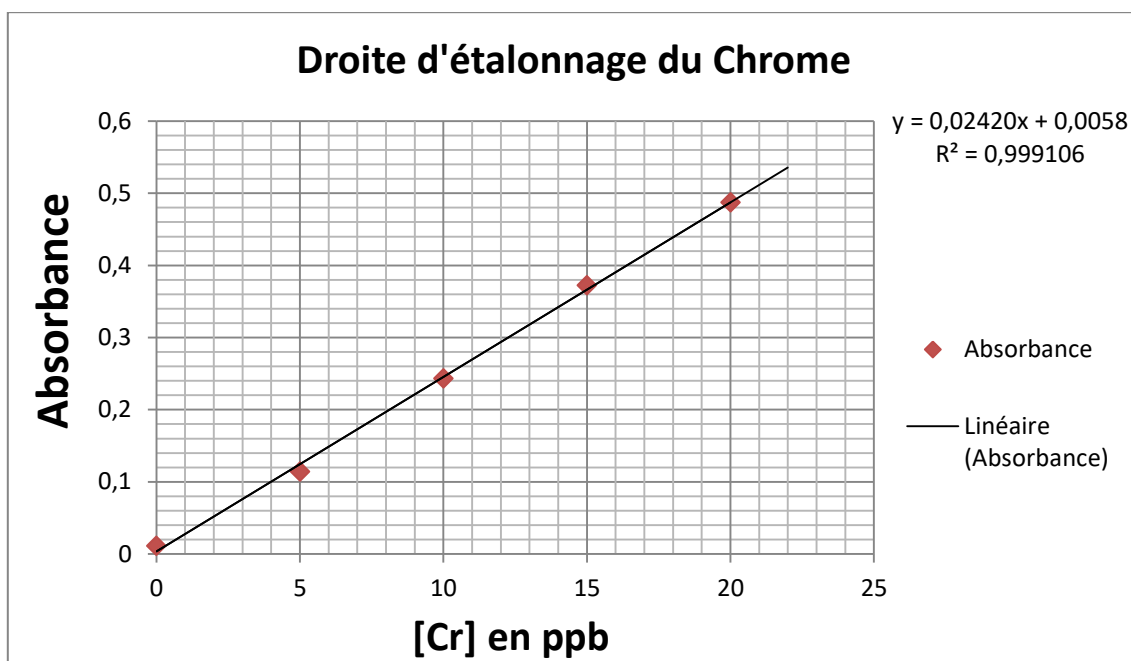


Figure 18 : courbe d'étalonnage du chrome

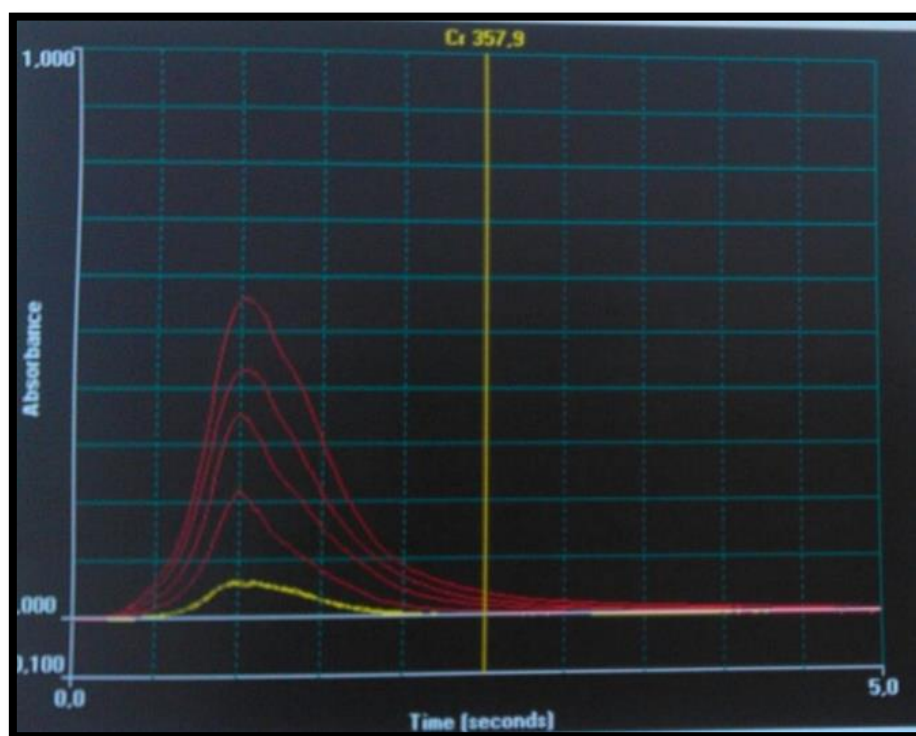


Figure 19 : Ensembles des pics de la courbe d'étalonnage du chrome

2. Dosage du Plomb

a. Réactifs et équipements

- Spectrophotomètre d'absorption atomique, équipé d'un logiciel d'acquisition de données.

- Cylindre de gaz d'argon
- Lampe à cathode creuse de plomb
- Alimentation en air comprimé
- Standard 1 : standard de référence à base de plomb interne au laboratoire
- Eau purifiée (Bidistillée)
- Standard 2 : Standard mère pour préparation du diluant

b. Préparation des solutions standards et tests

• Solution standard du plomb (stock solution)

La solution standard de plomb est une solution commerciale de plomb à une concentration bien déterminée en ppm.

• Préparation du diluant

On transfère de l'eau dans une fiole de 1000ml puis on ajoute une quantité du standard 2, on agite le mélange puis on complète avec de l'eau purifiée (eau bidistillée) jusqu'au volume, pour arriver à un pourcentage préconisé.

• Préparation des étalons pour la courbe d'étalonnage

- Dans une fiole de 100 ml on transfère quelque μl de la solution stock de plomb puis on complète avec notre diluant jusqu'au volume. Après on effectue quelque dilution pour tomber sur une solution avec une concentration de 20 ppb.

- Le four effectue les dilutions automatique illustrés dans le tableau ci-dessous pour obtenir des solutions étalons avec concentrations suivantes 5,0 ; 10,0 ; 15,0 et 20,0 $\mu\text{g/L}$ de de plomb.

Solution stock de plomb en ppb	0	5	10	15	Concentration du Pb déjà préparé de 20 ppb
Volume du diluant	20	15	10	5	
Concentrations des solutions étalons $\mu\text{g/L}$ de plomb	0	5	10	15	

Tableau 23 : Préparation des solutions étalons pour la courbe d'étalonnage du plomb

c. Résultats de la courbe d'étalonnage du plomb

Pour analyser l'échantillon du plomb par le spectromètre d'absorption atomique en mode four, on a mesuré à une absorbances de 283,3 nm et on a vérifié l'ensemble des tests de performance de l'équipement à l'aide du logiciel.

Ce qui nous permet d'effectuer l'analyse en bonnes conditions. Le four aspire les solutions et effectue des dilutions automatiques pour atteindre les concentrations désirées en $\mu\text{g/L}$ en commençant par les dilutions à faibles concentrations.

Pour avoir des résultats fiables on a répété la mesure trois fois:

Concentration des solutions d'étalonnage	Absorbance Individuelle (3 essais)	Absorbance Moyenne	Ecart type
$C_1 = 5 \text{ ppb}$	0,064 0,096 0,093	0,064	0,38 %
$C_2 = 10 \text{ ppb}$	0,132 0,132 0,132	0,132	0,03 %
$C_3 = 15 \text{ ppb}$	0,195 0,198 0,198	0,197	0,18 %
$C_4 = 20 \text{ ppb}$	0,259 0,261 0,261	0,260	0,11 %

Tableau 24 : Résultats des absorbances du plomb

Le traçage de la courbe d'étalonnage est effectué en traçant les absorbances par rapport aux concentrations des solutions étalons. Le test n'est valide que si le coefficient de corrélation de la courbe d'étalonnage est supérieur à 0,995 selon les normes en vigueur des pharmacopées, et pour cette deuxième méthode on a trouvé encore un coefficient de corrélation supérieur aux exigences qui est égale à 0,999956.

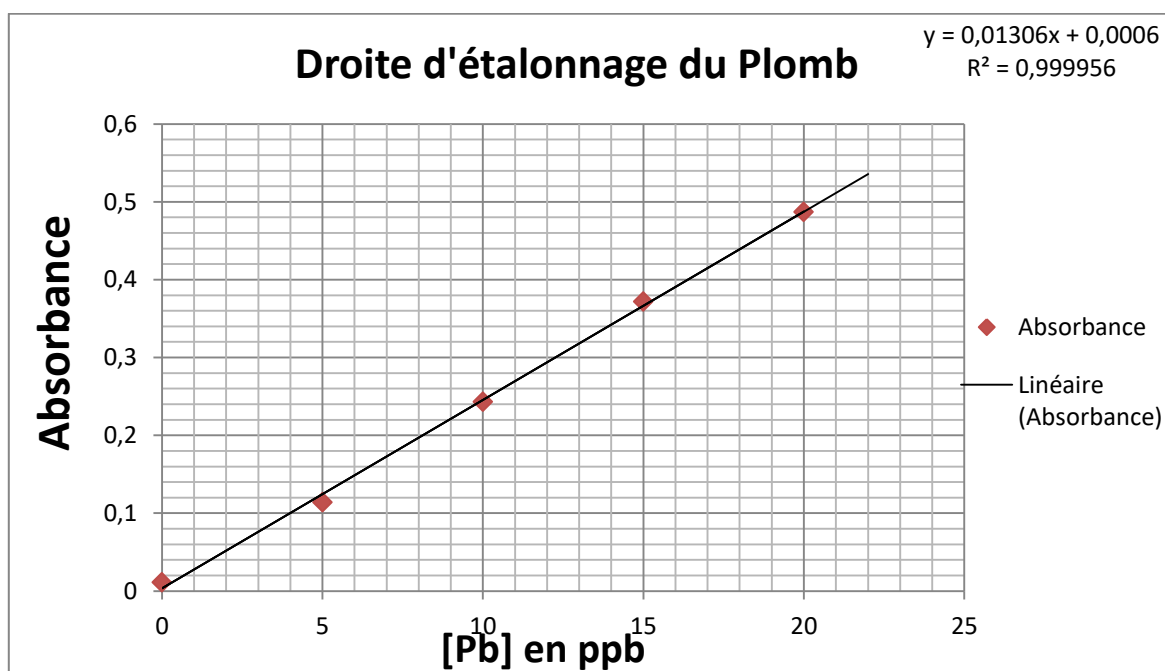


Figure 20 : Courbe d'étalonnage du Plomb

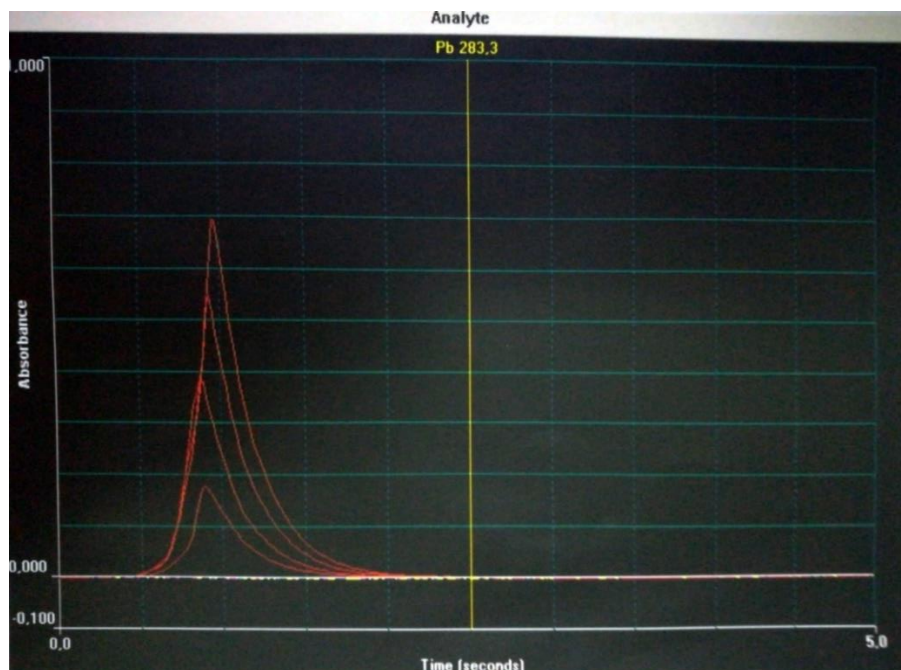


Figure 21 : Ensembles des pics de la courbe d'étalonnage du plomb

IV. Dosage du cuivre

Dans cette 2^{ème} partie de l'étude 2 on va essayer de tester un nouveau protocole en variant les conditions expérimentales pour doser le cuivre sur un lait pour nourrisson 2^{ème} âge, en absence de tout protocole validé par un fabriquant.

1. Modes expérimentaux

+ Conditions expérimentales pour les trois essais

Spectromètre	
L'élément	Cuivre
Longueur d'onde	324,8 nm
Largeur de fente	Valeurs optimales préconisées par le LNCM
Type de signal	
Courant	
Temps d'analyse	
Temps de retard	
Four	

Tableau 25 : Conditions expérimentales d'analyses de l'étude 2

+ Programmation du four :

Toutes ces valeurs sont optimisées par le LNCM, et qui sont en unité de temps

- Température de séchage
- Température de décomposition
- Température d'atomisation
- Température de lavage
- La mesure de l'absorbance est effectuée à une longueur de 324.8nm

A. Dosage par la méthode 1

a) Réactifs et équipements

- Spectrophotomètre d'absorption atomique, équipé d'un logiciel d'acquisition de données
- Cylindre de gaz d'argon
- Lampe à cathode creuse de cuivre
- Alimentation en air comprimé
- Standard 1 : standard de référence à base de Cuivre interne
- Eau purifiée (Bidistillée)
- Standard 2 : Standard mère pour préparation du diluant
- Acide hydrochlorique

b) Préparation des solutions standards et tests

• Solution standard du cuivre (stock solution)

La solution standard de cuivre est une solution commerciale de cuivre à une concentration bien déterminée en ppm.

• Préparation du diluant

On transfère de l'eau dans une fiole de 1000ml puis on ajoute une quantité du standard 2, on agite le mélange puis on complète avec de l'eau purifiée (eau bidistillée) jusqu'au volume, pour arriver à un pourcentage préconisé.

c) Préparation des étalons pour la courbe d'étalonnage

- Dans une fiole de 100 ml on transfère quelques μl de la solution stock de cuivre puis on complète avec notre diluant jusqu'au volume. Après on effectue quelques dilutions pour tomber sur une solution avec une concentration de 20 ppb.

- Le four effectue des dilutions automatiques illustrées dans le tableau ci-dessous pour obtenir des solutions étalons avec concentrations suivantes 5,0 ; 10,0 ; 15,0 et 20,0 $\mu\text{g/L}$ de cuivre.

Solution stock de cuivre en ppb	0	5	10	15	Concentration du Cr déjà préparé de 20 ppb
Volume du diluant	20	15	10	5	
Concentrations des solutions étalons $\mu\text{g/L}$ de cuivre	0	5	10	15	

Tableau 26 : Préparation des solutions étalons pour la courbe d'étalonnage (Méthode 1)

• Préparation de la solution test

On pèse une quantité de notre complément alimentaire (le lait pour nourrisson), et on ajoute une quantité d'HCl sur notre échantillon dans une fiole de 100 ml, puis on effectue une agitation manuelle après on complète avec notre diluant jusqu'au volume.

On observe qu'il y'a une solubilité incomplète du lait puis on a agité pendant 10 min par ultrasons, jusqu'à l'obtention d'une solution homogène.

B. Dosage par la méthode 2

a) Réactifs et équipements

- Spectrophotomètre d'absorption atomique, équipé d'un logiciel d'acquisition de données
- Cylindre de gaz d'argon
- Lampe à cathode creuse de cuivre
- Alimentation en air comprimé
- Standard 1 : standard de référence à base de Cuivre interne
- Eau purifiée (Bidistillée)
- Standard 2 : Standard mère pour préparation du diluant
- Acide hydrochlorique
- Plaque chauffante

b) Préparation des solutions standards et tests

• Solution standard du cuivre (stock solution)

La solution standard de cuivre est une solution commerciale de cuivre à une concentration bien déterminée en ppm.

• Préparation du diluant

On transfère de l'eau dans une fiole de 1000ml puis on ajoute une quantité du standard 2, on agite le mélange puis on complète avec de l'eau purifiée (eau bidistillée) jusqu'au volume, pour arriver à un pourcentage préconisé.

• Préparation des étalons pour la courbe d'étalonnage

- Dans une fiole de 100 ml on transfère quelques μL de la solution stock de cuivre puis on complète avec notre diluant jusqu'au volume. Après on effectue quelques dilutions pour tomber sur une solution avec une concentration de 20 ppb.

- Le four effectue des dilutions automatiques illustrés dans le tableau ci-dessous pour obtenir des solutions étalons avec concentrations suivantes 5,0 ; 10,0 ; 15,0 et 20,0 $\mu\text{g/L}$ de cuivre.

Solution stock de cuivre en ppb	0	5	10	15	20
Volume du diluant	20	15	10	5	0
Concentrations des solutions étalons $\mu\text{g/L}$ de cuivre	0	5	10	15	20

Tableau 27 : Préparation des solutions étalons pour la courbe d'étalonnage (Méthode 2)

c) Préparation de la solution test

- Dans une fiole de 100 ml on pèse une masse calculée du lait qui est notre échantillon test du cuivre, on ajoute une quantité d'acide HCl, puis on agite bien.
- Avec une plaque chauffante on chauffe pendant quelques minutes, jusqu'au changement complet de couleur, après on complète avec notre diluant jusqu'au volume.
- On n'effectue pas de dilution car notre solution préparée est déjà dans l'intervalle des solutions étalons (ppb).

C. Dosage par la méthode 3

a) Réactifs et équipements

- Spectrophotomètre d'absorption atomique, équipé d'un logiciel d'acquisition de données
- Cylindre de gaz d'argon
- Lampe à cathode creuse de cuivre
- Alimentation en air comprimé
- Standard 1 : standard de référence à base de Cuivre interne
- Eau purifiée (Bidistillée)
- Standard 2 : Standard mère pour préparation du diluant
- Acide hydrochlorique
- Plaque chauffante

b) Préparation des solutions standards et tests

- **Solution standard du cuivre (stock solution)**

La solution standard de cuivre est une solution commerciale de cuivre à une concentration bien déterminée en ppm.

- **Préparation du diluant**

On transfère de l'eau dans une fiole de 1000ml puis on ajoute une quantité du standard 2, on agite le mélange puis on complète avec de l'eau purifiée (eau bidistillée) jusqu'au volume, pour arriver à un pourcentage préconisé.

- **Préparation des étalons pour la courbe d'étalonnage**

- Dans une fiole de 100 ml on transfère quelques μl de la solution stock de cuivre puis on complète avec notre diluant jusqu'au volume. Après on effectue quelques dilutions pour tomber sur une solution avec une concentration de 20 ppb.
- Le four effectue les dilutions automatique illustrer dans le tableau ci-dessous pour obtenir des solutions étalons avec concentrations suivantes 5,0 ; 10,0 ; 15,0 et 20,0 $\mu\text{g/L}$ de cuivre.

Solution stock de cuivre en ppb	0	5	10	15	20
Volume du diluant	20	15	10	5	0
Concentrations des solutions étalons $\mu\text{g/L}$ de cuivre	0	5	10	15	20

Tableau 28 : Préparation des solutions étalons pour la courbe d'étalonnage (Méthode 3)

c) Préparation de la solution test

- On pèse une masse calculée du lait à tester dans une fiole de 100 ml, on ajoute une quantité précise d'acide HCl, puis on agite légèrement.
- Avec une plaque chauffante on chauffe pendant quelques minutes, à une température précisée entre 40°C et 45°C jusqu'au changement de couleur en rose claire, rose foncé et puis en mauve. Après on arrête le chauffage et on pipette quelques mL de cette solution qu'on dilue à 100 ml à l'aide du diluant préparé précédemment.

2. Résultats des trois essais du dosage du cuivre

A. Méthode 1

Pour analyser l'échantillon du cuivre par le spectromètre d'absorption atomique en mode four, on a mesuré à une absorbance de 324,8 nm et on a vérifié l'ensemble de tests de performance de l'équipement à l'aide du logiciel.

Ce qui nous permet d'effectuer l'analyse en bonnes conditions. Le four aspire les solutions et effectue des dilutions automatiques pour atteindre les concentrations désirées en $\mu\text{g/L}$ en commençant par les dilutions à faibles concentrations.

On a répété la mesure trois fois pour avoir des résultats fiables :

Concentration des solutions d'étalonnage	C = 0 ppb (Mesure du Blanc)	C ₁ = 5 ppb	C ₂ = 10 ppb	C ₃ = 15 ppb	C ₄ = 20 ppb
Absorbance Individuelle des (3 essais)	0,002 0,001 0,001	0,090 0,097 0,092	0,178 0,187 0,188	0,284 0,287 0,293	0,381 0,385 0,378
Absorbance Moyenne	0,001	0,075	0,184	0,288	0,381
Ecart type	0,07 %	0,38 %	0,54 %	0,45 %	0,31 %

Tableau 29 : Résultats des absorbances de la méthode 1

On a tracé la courbe d'étalonnage suivante à l'aide des absorbances par rapport aux concentrations des solutions étalons. Le test n'est valide que si le coefficient de corrélation de la courbe d'étalonnage est supérieur à 0,995 selon les normes en vigueur de la pharmacopée, au cours de cette méthode on a trouvé un coefficient de corrélation supérieur aux exigences qui est égale à 0,999789.

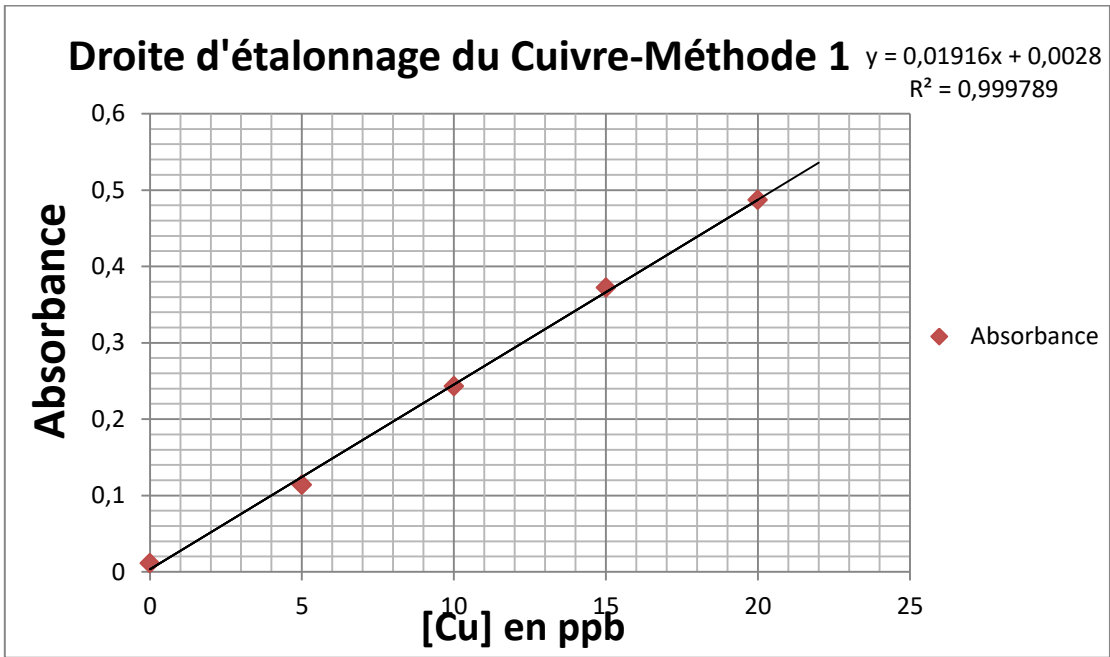


Figure 22 : Courbe d'étalonnage du cuivre dans le lait infantile (Méthode 1)

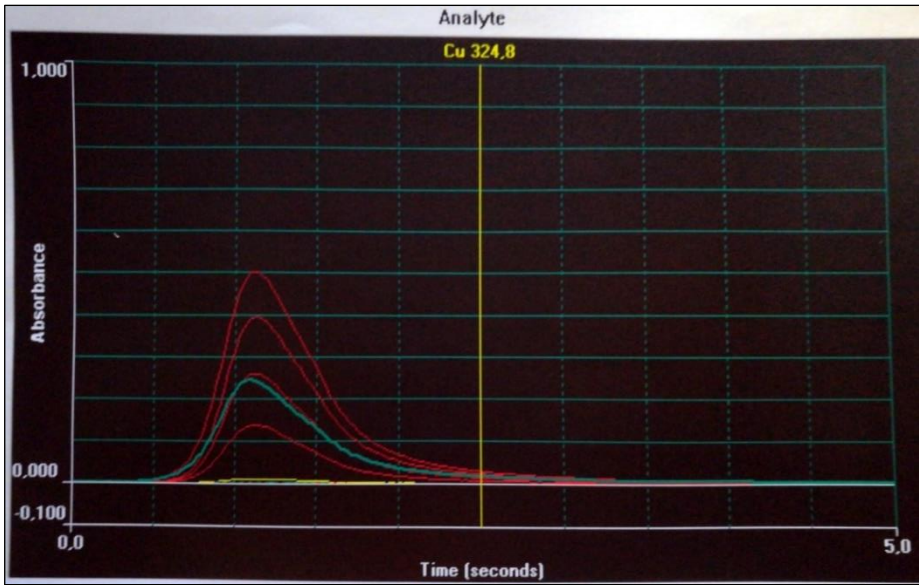


Figure 23 : Ensemble des pics de la courbe d'étalonnage et du principe actif (Méthode 1)

 Résultats de dosage de l'échantillon du lait

Valeur des absorbances	Analyse 1	Analyse 2	Analyse 3	Absorbance Moyenne	Ecart type
	0,199	0,191	0,191	0,193	0,44 %

Tableau 30 : Absorbance du cuivre de la méthode 1

Après avoir tracé la courbe d'étalonnage du cuivre (figure 22), cette dernière doit avoir un facteur de corrélation au minimum d'une valeur de 0,995 comme conformité du système. Ce qui est le cas de notre étude. A partir de cette courbe d'étalonnage, nous déduisons la concentration du cuivre dans notre complément alimentaire du lait aisément à partir de la relation suivante :

$$\text{Conc du fer } (\mu\text{g /L}) = \frac{A \times F}{S}$$

A = Absorbance

F = Facteur de dilution

S = La pente

- **Après avoir effectué les calculs et les transformations de la concentration finale par 100g du cuivre de notre lait par le protocole de la méthode 1 on a trouvé une concentration qui est égale à : 440,76 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de cuivre.**

B. Méthode 2

Pour analyser l'échantillon du cuivre par le spectromètre d'absorption atomique en mode four, on a mesuré à une absorbances de 324,8 nm et on a vérifié l'ensemble de tests de performance de l'équipement à l'aide du logiciel.

Ce qui nous permet d'effectuer l'analyse en bonnes conditions. Le four aspire les solutions et effectue des dilutions automatiques pour atteindre les concentrations désirées en $\mu\text{g}/\text{L}$ en commençant par les dilutions à faibles concentrations.

On a répété la mesure trois fois pour avoir des résultats fiables :

Concentration des solutions d'étalonnage	Absorbance Individuelle (3 essais)	Absorbance Moyenne	Ecart type
$C_0 = 0$ ppb (Blanc)	0,011 0,011 0,011	0,011	0,03 %
$C_1 = 5$ ppb	0,111 0,108 0,122	0,114	0,72 %
$C_2 = 10$ ppb	0,249 0,239 0,240	0,243	0,56 %
$C_3 = 15$ ppb	0,371 0,367 0,380	0,372	0,64 %
$C_4 = 20$ ppb	0,485 0,490 0,487	0,487	0,28 %

Tableau 31 : Résultats des absorbances de méthode 2

On a tracé la courbe d'étalonnage à l'aide des absorbances par rapport aux concentrations des solutions étalons. Le test n'est valide que si le coefficient de corrélation de la courbe d'étalonnage est supérieur à 0,995 selon les normes en vigueur des pharmacopées, et pour cette deuxième méthode on a trouvé encore un coefficient de corrélation supérieur aux exigences qui est égale à 0,999692.

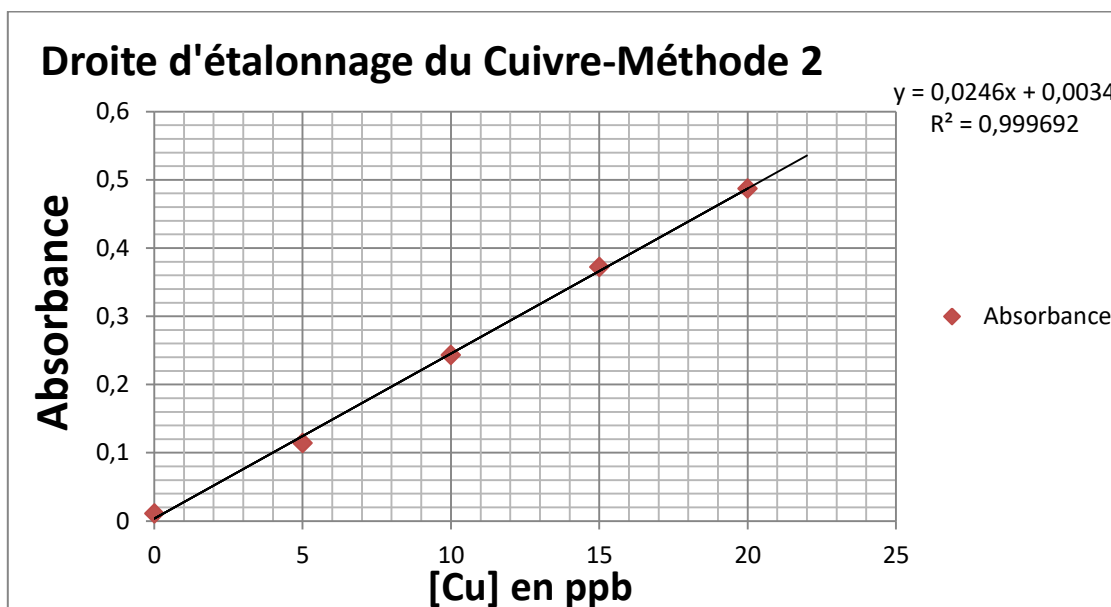


Figure 24 : Courbe d'étalonnage du cuivre dans le lait infantile (Méthode 2)

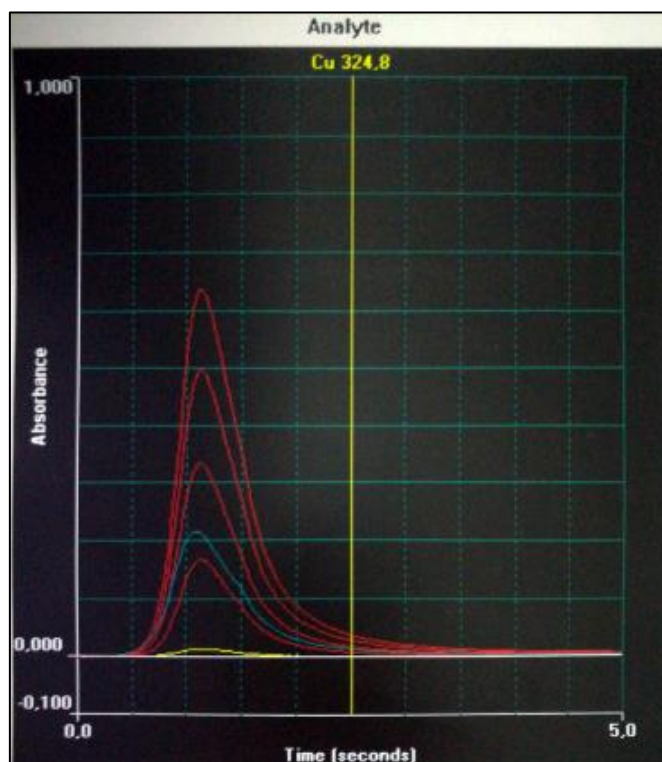


Figure 25 : Ensemble des pics de la courbe d'étalonnage et du principe actif (Méthode 2)

 Résultats de dosage de l'échantillon du lait

Valeur des absorbances	Analyse 1	Analyse 2	Analyse 3	Absorbance Moyenne	Ecart type
	0,171	0,169	0,171	0,170	0,14 %

Tableau 32 : Absorbance du cuivre de la méthode 2

Après avoir tracé la courbe d'étalonnage du cuivre, celle-ci doit avoir un facteur de corrélation au minimum avec une valeur de 0,995 comme conformité du système. Ce qui est le cas de notre étude. A partir de cette courbe d'étalonnage (figure 24), nous déduisons la concentration du cuivre dans notre complément alimentaire du lait aisément à partir de la relation suivante :

$$\text{Conc du fer } (\mu\text{g /L}) = \frac{A \times F}{S}$$

A = Absorbance

F = Facteur de dilution

S = La pente

- ***Après avoir effectué les calculs et les transformations de la concentration finale par 100g du cuivre de notre lait par le protocole de la méthode 2 on a trouvé une concentration qui est égale à : 261,02 µg/100g de cuivre.***

➤ **Méthode 3**

Pour analyser l'échantillon du cuivre par le spectromètre d'absorption atomique en mode four, on a mesuré à une absorbances de 324,3 nm.

Le four aspire les solutions et effectue des dilutions automatiques pour arriver aux concentrations désirées en µg/L en commençant par les dilutions à faible concentration.

Pour la courbe d'étalonnage on a travaillé sur la même courbe pour les méthodes 2 et 3, en effectuant trois répétitions comme précédemment pour avoir des résultats fiables, et on a obtenu les absorbances suivantes :

Concentration des solutions d'étalonnage	Absorbance Individuelle (3 essais)	Absorbance Moyenne	Ecart type
$C_0 = 0$ ppb	0,011 0,011 0,011	0,011	0,03 %
$C_1 = 5$ ppb	0,111 0,108 0,122	0,114	0,72 %
$C_2 = 10$ ppb	0,249 0,239 0,240	0,243	0,56 %
$C_3 = 15$ ppb	0,371 0,367 0,380	0,372	0,64 %
$C_4 = 20$ ppb	0,485 0,490 0,487	0,487	0,28 %

Tableau 33 : Résultats des absorbances de la méthode 3

On a tracé la courbe d'étalonnage en traçant les absorbances par rapport aux concentrations des solutions étalons. Le test n'est valide que si le coefficient de corrélation de la courbe d'étalonnage est supérieur à 0,995 selon les normes en vigueur des pharmacopées, et pour cette deuxième méthode on a trouvé encore un coefficient de corrélation supérieur aux exigences qui est égale à 0,999692.

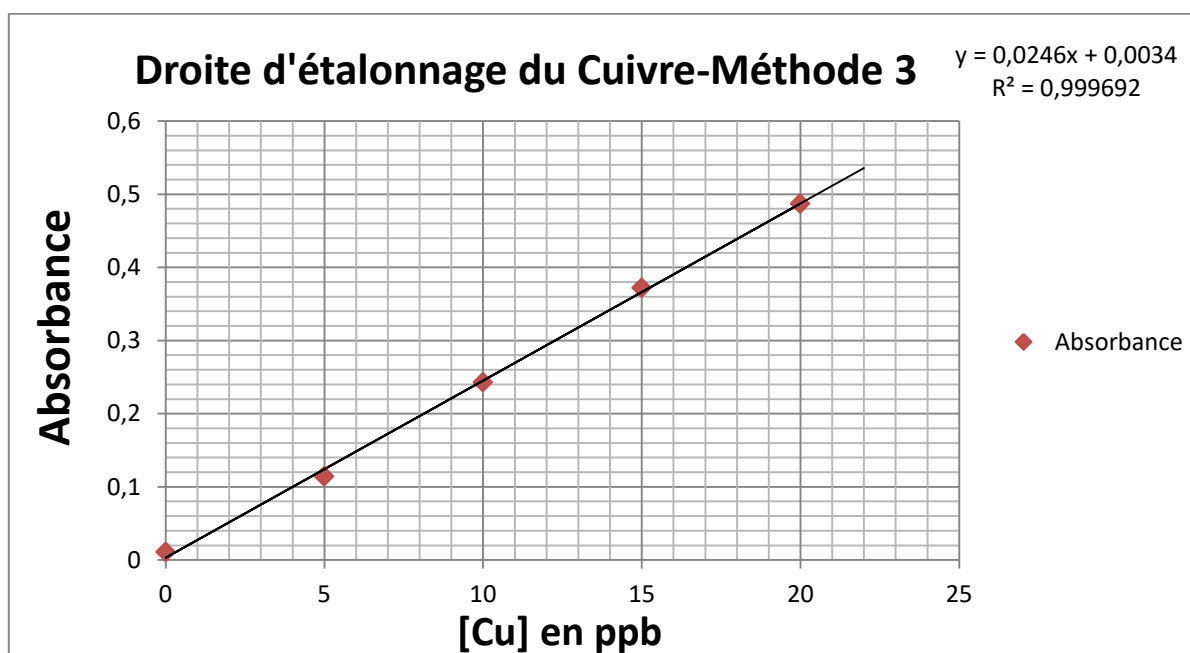


Figure 26 : Courbe d'étalonnage du cuivre dans le lait infantile par la (Méthode 3)

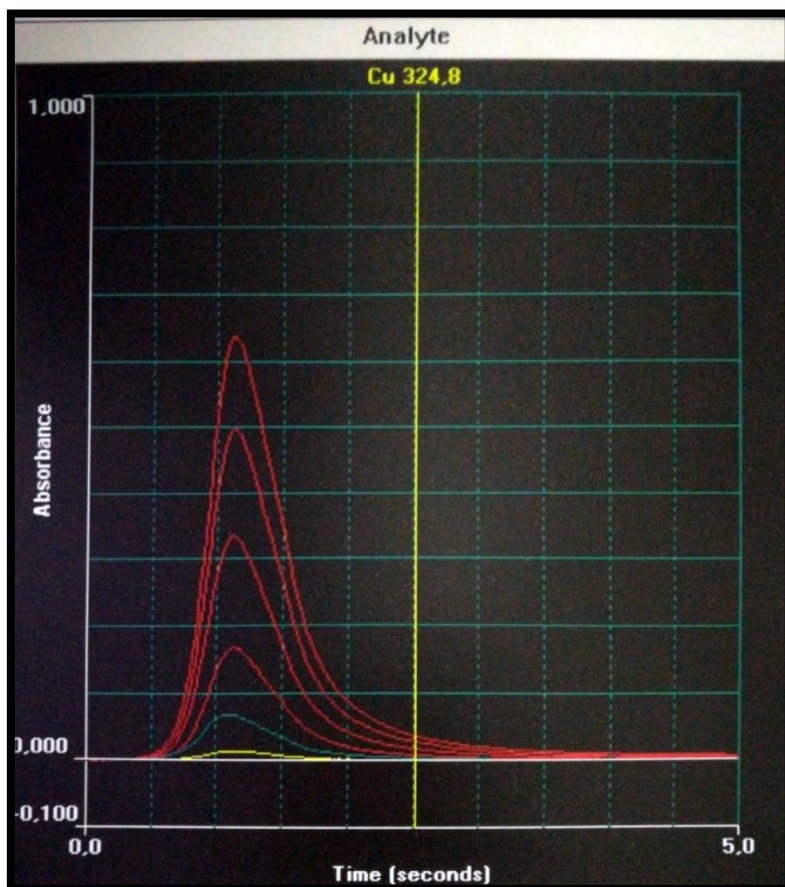


Figure 27 : Ensemble des pics de la courbe d'étalonnage et du principe actif (Méthode 3)

✚ Résultats de dosage de l'échantillon du lait

Valeur des absorbances	Analyse 1	Analyse 2	Analyse 3	Absorbance Moyenne	Ecart type
	0,043	0,043	0,046	0,044	0,16 %

Tableau 34 : Absorbance du cuivre de la méthode 3

On va calculer la concentration du cuivre dans notre complément alimentaire du lait en $\mu\text{g/L}$ du lait à partir des courbes d'étalonnage (figure 26), en utilisant la relation suivante, sachant que chaque méthode a son facteur de dilution :

$$\text{Conc du fer } (\mu\text{g /L}) = \frac{A \times F}{S}$$

A = Absorbance

F = Facteur de dilution

S = La pente

- Après avoir effectué les calculs et les transformations de la concentration finale par 100g du cuivre de notre lait par le protocole de la méthode 3 on a trouvé une concentration qui est égale à : 349,01 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de cuivre.

3. Discussions et interprétations de l'étude 2

Après avoir traité les résultats des courbes d'étalonnages sur l'appareil de l'absorption atomique qu'on avait programmé sur le mode four, on a pu calculer les concentrations du cuivre selon les 3 protocoles différents qu'on a proposé en cherchant le protocole le plus convenable a ce dosage et on a trouvé trois résultats variés sur les tests effectués sur notre échantillon du lait :

<i>Comparaison des trois Méthodes</i>	Méthode 1	Méthode 2	Méthode 3
Coefficient de corrélation	0,999789	0,999692	0,999692
Concentration calculée en $\mu\text{g}/100\text{g}$ de Cuivre	440,76	261,02	349,01

Tableau 35 : Résultats des trois méthodes de l'étude 2

- Le complément alimentaire (lait infantile) sous forme de poudre a fait l'objet de notre étude, sur lequel on a essayé de doser la quantité du cuivre, pour la comparer avec la valeur déclarée par le fabricant qui est 360 μg de cuivre par 100g.
- Les critères d'acceptation de la quantité de cuivre doivent être pour le dosage du cuivre entre 342 μg et 378 μg par 100 gramme de cuivre cela veut dire avec une limite de $\pm 5\%$ de la valeur déclarée, donc nos calcul doivent être entre (95,0 % et 105,0 %).
- En traitant l'échantillon par la méthode 3, on a trouvé après calculs 349,01 μg de cuivre par 100 gramme, c'est une valeur très proche de la valeur déclarée par le fabricant dans le complément alimentaire (Lait) qui est 360 $\mu\text{g}/100\text{g}$, ce qui montre que le dosage en mode four par la troisième méthode est la plus exact.
- Cette étude montre trois résultats différents pour le dosage du cuivre, ce qui s'explique par l'importance primordiale de l'optimisation du protocole de préparation pour avoir la valeur la plus probable.
- La particularité dans notre 3^{ème} protocole était liée à la précision dans le chauffage. Cette maîtrise de préparation nous a permis de suivre soigneusement le virage de coloration de l'échantillon. Ce qui pourrait aussi s'interpréter pour le faite de ne pas endommager l'échantillon comme ce qui était probablement le cas du protocole numéro 2. Un autre avantage s'ajoute au protocole 3 par rapport au protocole 1 qui est probablement la bonne dissolution du cuivre dans l'échantillon test, ce qui n'était pas le cas avec protocole 1.

Dans le tableau ci-dessous résume les intervalles d'acceptation pour chaque méthode de l'étude 2 :

	Méthode 1	Méthode 2	Méthode 3	Les critères d'acceptations
Intervalles	122,43 %	72,50 %	96,94 %	95,00 % et 105,00 %
La limite d'erreur	+ 22,43 %	- 27,5 %	-3,06 %	± 5 %
Interprétations	Sur Dosage = Non Conforme	Sous Dosage = Non Conforme	Conforme	

Tableau 36 : Les critères d'acceptations de l'étude 2

- D'après ce récapitulatif on peut conclure qu'on a obtenu 3 résultats : la méthode 1 était en surdosage, la méthode 2 est en sous dosage par contre, la méthode 3 est dans les normes avec une marge d'erreur la plus petite possible 3,06% par rapport aux autres protocoles, et un pourcentage de dosage de 96,94 % qui le plus proche de 100% par rapport aux autres essais.
- De là on peut déduire que notre méthode développée par notre propre réflexion était plus efficace et la plus exact pour le dosage du cuivre dans sur ce type lait infantile.

V. Conclusion

Les résultats trouvés étaient conformes par rapport aux résultats déclarés dans le médicament et le complément alimentaire, ce qui justifie davantage la sensibilité et l'efficacité de la spectrométrie d'absorption atomique comme technique de pointe pour la détection des éléments traces métalliques dans les médicaments et les produits de santé .

CONCLUSION GENERALE

Durant cette période de stage, on a pu réaliser un travail purement de recherche ou on a essayé de développer de nouvelles méthodes ou protocoles d'analyse pour le dosage des métaux dans un médicament antianémique et un complément alimentaire sous forme de lait infantile par la technique spectrométrie d'absorption atomique en variant les modes de dosage entre le mode flamme et le mode four.

Cette technique de spectrométrie d'absorption atomique a été vraiment robuste pour un dosage plus précis des métaux dans les produits de santé (médicaments et compléments alimentaires) surtout en mode four qui donne des résultats de traces de l'ordre du ppb.

Lors du présent travail on a rencontré des problèmes techniques qui ont fait appel à des interventions à plusieurs reprises par des spécialistes en maintenance et en qualification des équipements au LNCM pour pouvoir continuer notre travail de recherche et pouvoir clôturer cette question assez importante concernant le développement de nouvelles méthodes pour le contrôle des médicaments et des produits de santé.

Perspectives

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la recherche scientifique, mené par le LNCM pour développer, élargir et améliorer des compétences en termes de contrôle des médicaments et des produits de santé, surtout que cette thématique est encore en phase brionaire à l'échelle nationale et internationale.

Ca d'une part et d'autre part, le présent travail est une initiation au développement de nouvelles méthodes du fer dans un médicament et du cuivre dans le lait pour nourrisson. Il reste encore à consolider ce travail en le complétant par une étude de validation.

Nos perspectives sont le développement, la mise en place et l'élargissement du champ d'application sur d'autres :

- Formes galéniques de médicament (gélules, comprimés, sirop...)
- Produits de santé et compléments alimentaires de différentes formes...
- Plantes médicinales...

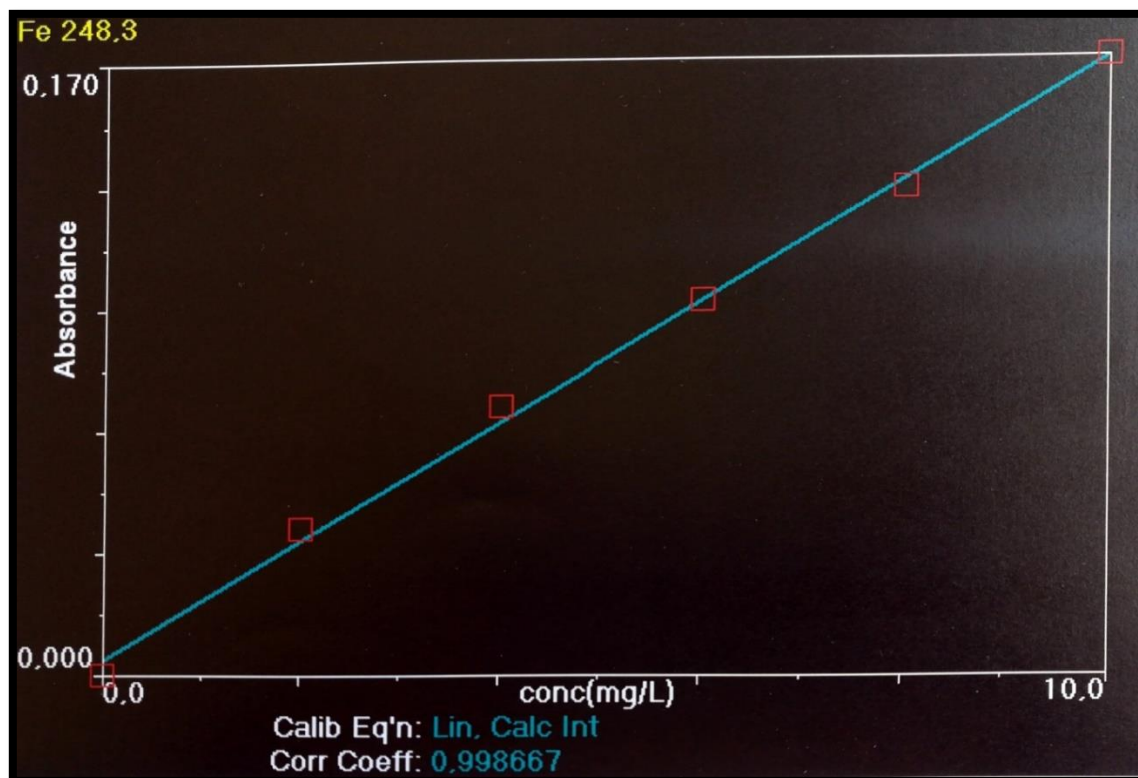
BIBLIOGRAPHIE

1. <http://blogensante.fr/2013/09/27/definir-la-notion-de-produit-de-sante/>
2. <https://www.passeportsante.net/fr/Nutrition/PalmaresNutriments/Fiche.aspx?doc=complements-alimentaires>
3. Code de la santé publique – Article L5111f-1 –Legifrance
4. D. FOURRIER-REGLAT Karin LATRY, D. Jacques DANGOUMAU, D.Nicholas MOORE, D.Mathieu MOLIMARD. Pharmacologie Générale, EDITION 2006 page : 1517.
5. DE BEER D, GUITWIRTH. S et STENGERS.I, (2011) ,Brevet , santé publique et accès aux médicaments essentiels ,EDITION Emile Bruylant, France, 662.p.
6. Encyclopédie médical pratique copyright c 1994 ;1995, 1996, 1997 the Learning Company Inc.TLC-Edusoft.
7. https://www.metrohm.com/fr-fr/industries/pharmaceutique-impurete%C3%A9s/table_pharma-standards/
8. KIRKACHARIAN S. Chiralité et médicaments. 16 p. [En ligne]. Disponible sur <http://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/mesures-analyses-th1/qualite-etsecurite-au-laboratoire-ti620/chiralite-et-medicaments-p3340/> (Page consultée le 28 février 2011)
9. Institut National de Recherche et de Sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles. Dossier web : Les hydrocarbures halogénés. (Mise à jour le 25/08/2006).
10. Institut National de Recherche et de Sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles. Dossier web : Les hydrocarbures aromatiques. (Mise à jour le 25/08/2006). [En ligne]. Disponible sur <http://www.inrs.fr>. (Page consultée le 27 mars 2011).
11. Institut National de Recherche et de Sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles. Fiche solvants ED 4220 : Les solvants. 6 p.
12. Institut National de Recherche et de Sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles. Fiche solvants ED4223 : Les hydrocarbures halogénés. 8 p.
13. MINI-REVUE , Métabolisme de fer, Hématologie 2002, nOspéciaJ: 7-7 7

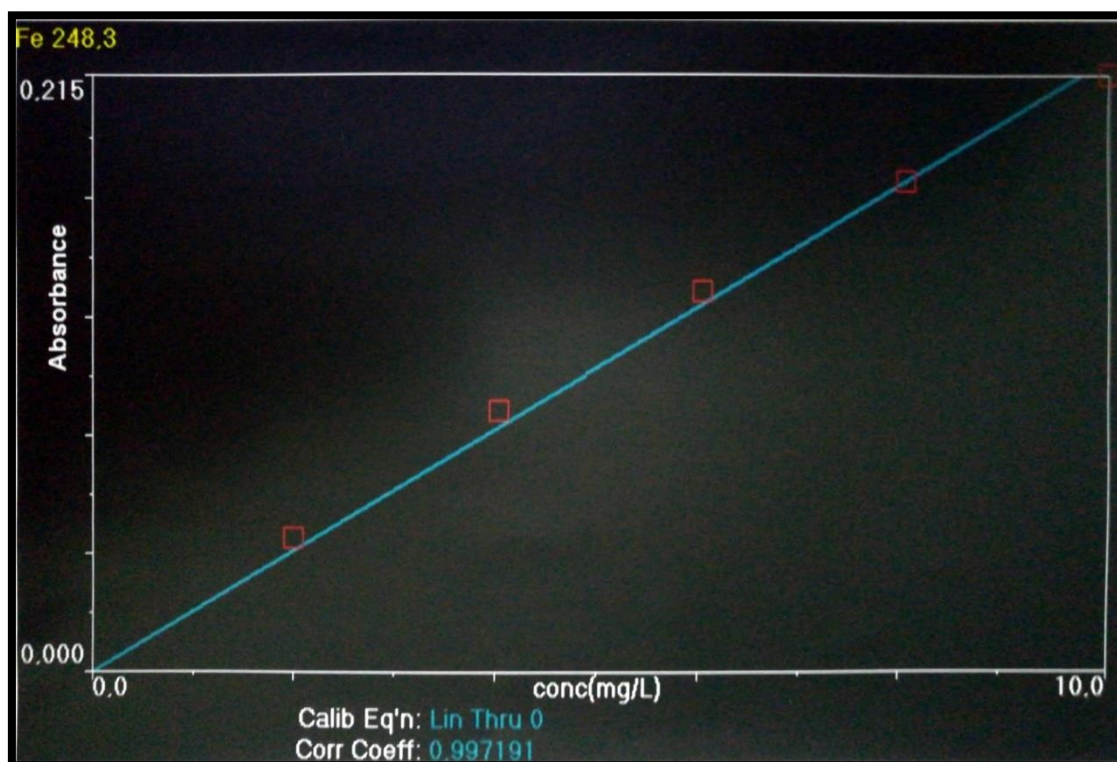
14. Ross C. Hardison, « A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria », Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 93, no 12, 11 juin 1996, p. 5675-5679.
15. G.Fermi, M.F. Perutz et B. Shaanan, « The crystal structure of human deoxyhaemoglobin at 1.74 Å resolution », Journal of Molecular Biology, vol. 175, no 2, 15 mai 1984, p. 159-174
16. Andrews NC, Schmidt PJ. Iron homeostasis. Annu Rev Physiol 2007;69:69-85.
17. Robert E. Fleming, « Iron Overload in Human Disease », The New England Journal of Medicine, vol. 366, no 4, 26 janvier 2012, p. 348-352.
18. <http://www.hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/globules-rouges-et-leur-pathologie/43-metabolisme-du-fer-chez-lhomme>.
19. UNITED NATIONS ACC/SCN - Third report on the world nutrition situation. Geneva, 1997.
20. Organisation mondiale de la santé. Évaluer l'état du fer des populations. Rapport d'une consultation technique conjointe OMS / CDC sur l'évaluation de l'état du fer au niveau de la population. Genève: Editions de l'OMS; 2007.
21. Besoins en vitamine A, fer, acide folique et vitamine B12. Rapport d'une consultation mixte FAO / OMS. Collection FAO : alimentation et nutrition, 1989, n°23, Rome, 107 p.
22. Concentrations en hémoglobine permettant de diagnostiquer l'anémie et d'en évaluer la sévérité » [archive] [PDF], sur OMS (consulté le 14 octobre 2015).
23. Schrier SL, Auerbach M. Treatment of the adult with iron deficiency anemia (à jour au 25 mars 2013). UpToDate 2013. Site Internet : www.uptodate.com (Date de consultation : août 2013).
24. Paquet I. Formation continue – Pour une santé de fer – La nutrition active pour prévenir et traiter l'anémie par déficience en fer. L'actualité pharmaceutique 2011 ; 19 (2) : 1-4. Site Internet : www.Profession Sante.ca.
25. A. Martin et al. Apports nutritionnels conseillés pour la population française. Ed Lavoisier, Tec & Doc. 2001.
26. Méthodes spectroscopiques d'analyse et de caractérisation, spectroscopie d'absorption atomique, Axe " Génie des Procédés", centre SPIN, Ecole des Mines de Saint-Etienne
27. A. ELHAJJI /Techniques Spectroscopiques/Chapitre I/ Filière SMC/E2:Um5a_fsr

28. Jose Â A. C. Broekaert.2002. Analytical Atomic Spectrometry with Flames and Plasmas. Germany. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA ISBNs: 3-527-30146-1 (Hardback); 3-527-60062-0. 152 p
29. Maurice PINTA, 1971. Spectrométrie d'absorption atomique, Applications à l'analyse chimique, Tome I. ÉDITEURS 120, Boulevard Saint-Germain, Paris VIe. 87-102 p
30. SKOOG, HOLLER, NIEMAN. Principe d'analyse instrumentale, fifth edition. Edition de Boeck université. Paris, 2003. 938p. ISBN: 2-7445-0112-3.
31. Harvey, David, 1956– Modern analytical chemistry / David Harvey. — 1st ed. includes bibliographical references and index. ISBN 0–07–237547–7, 1. Chemistry, Analytic. I. Title,QD75.2.H374 , 2000 543—dc21 ,412-414 p
32. PHARMACOPEE EUROPEENNE 9.0, méthodes analytiques, spectrométrie d'absorption atomique, 41p
33. PRADYT, Patnaik .Dean's Analytical Chemistry Handbook (McGraw-Hill Handbooks). Second Edition. 1114 p. 2004. ISBN: 0071410600.
34. AUDIGIE, CL.DUPONT, G.ZONZAIN,F. principe des méthodes d'analyse biochimique tome 2. 3eme Edition, Doin editeur, France, 1992. ISBN : 2-7040-0684-9.174p.
35. <http://rapports-physique.over-blog.com/article-33313710.html>

ANNEXES

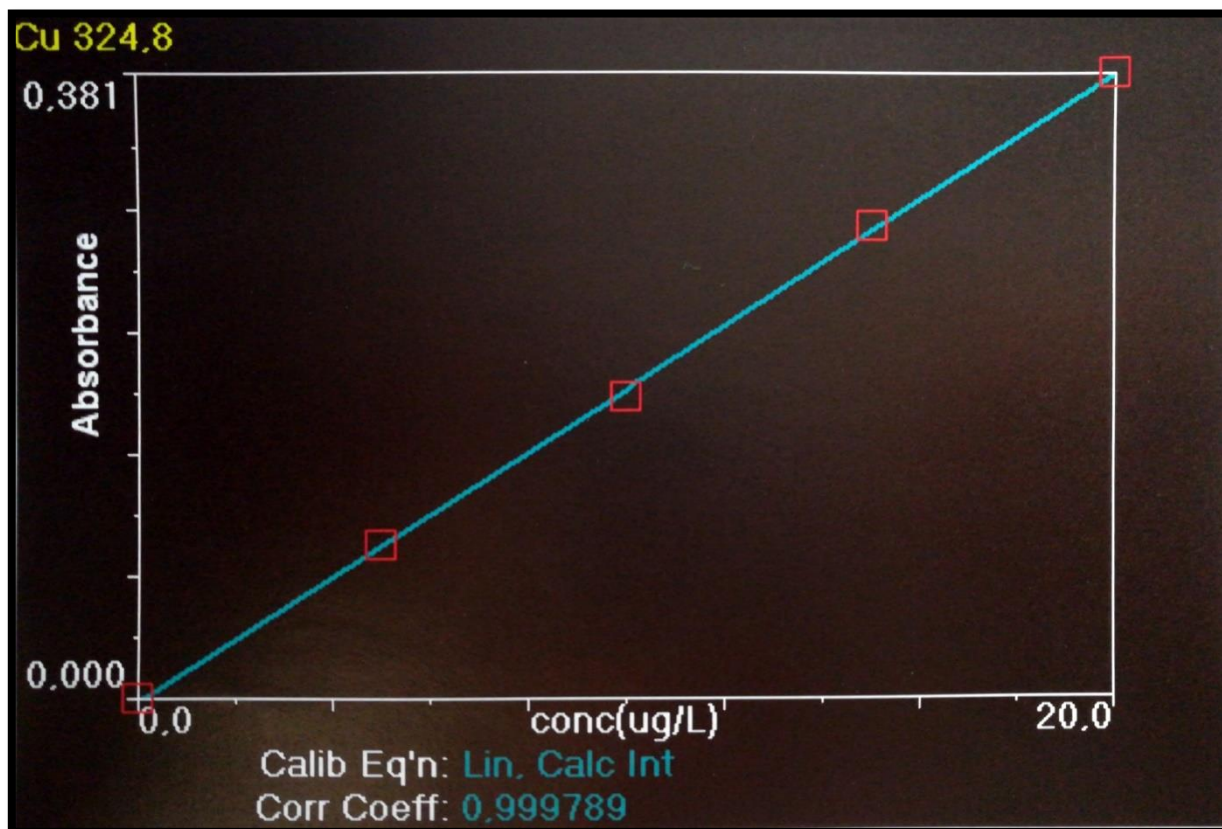


Courbe d'étalonnage originale du fer : Méthode Interne (LNCM)

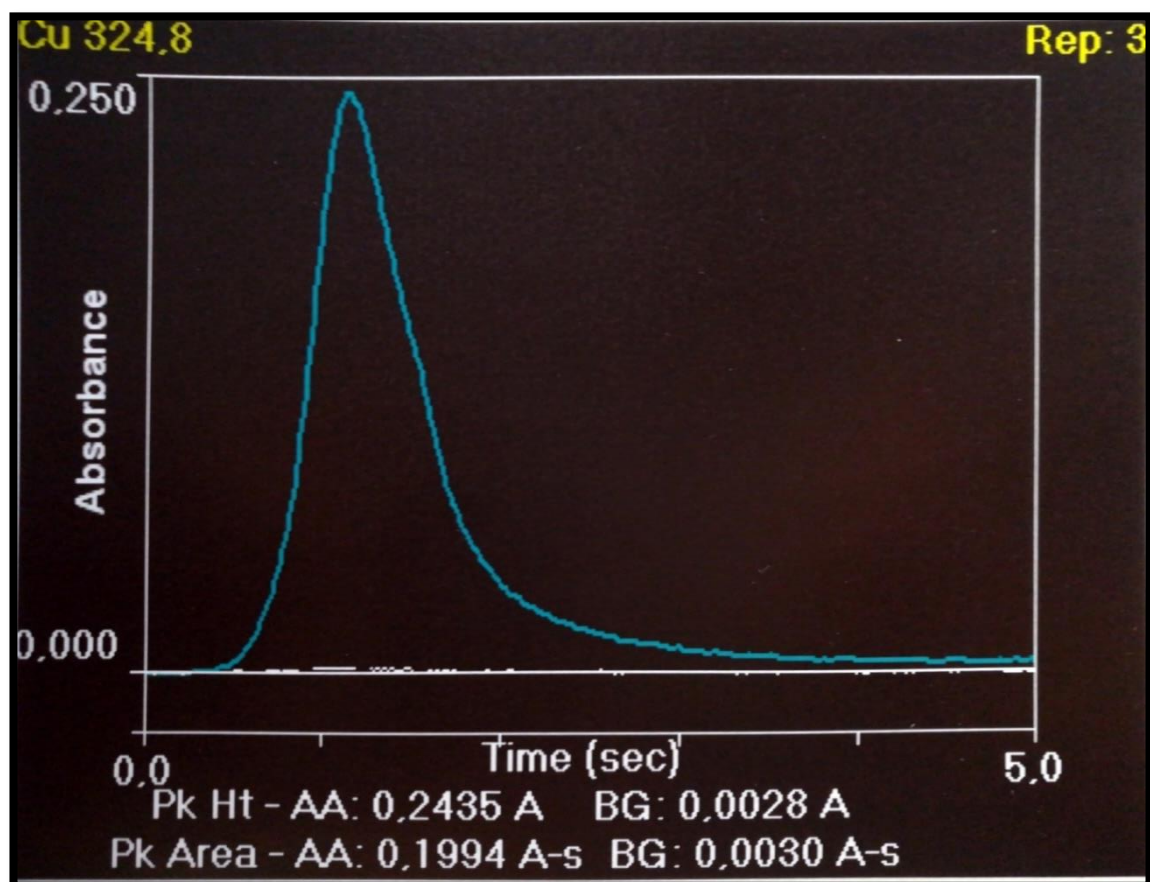


Courbe

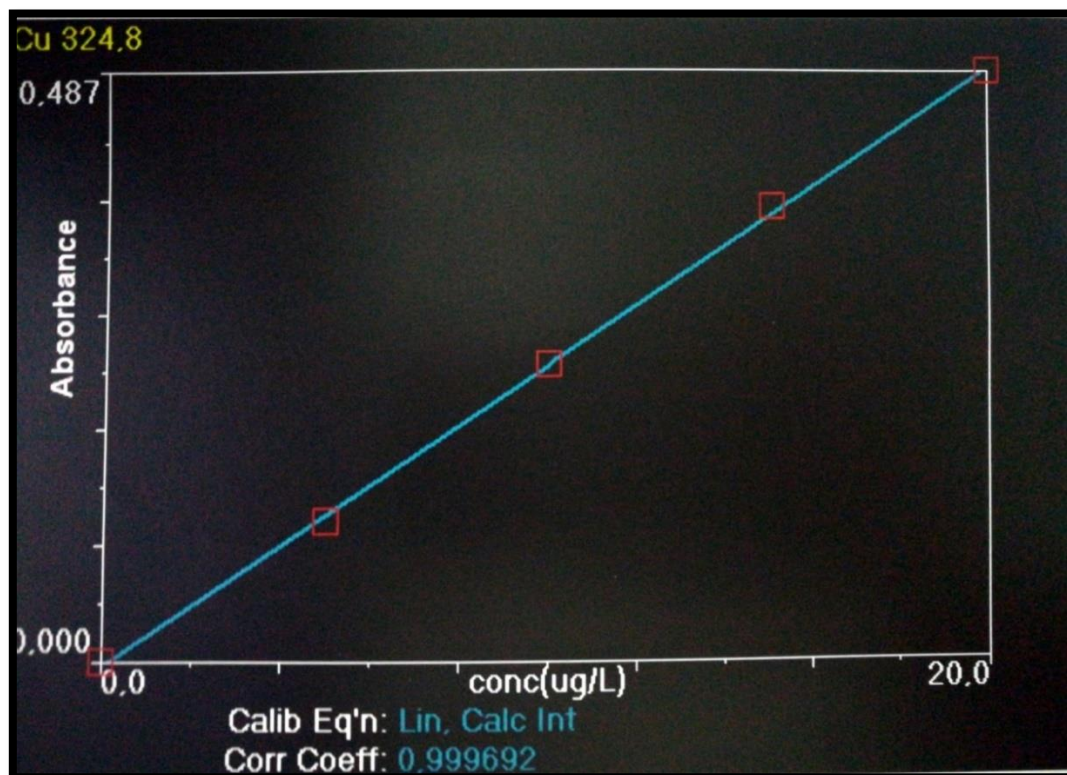
d'étalonnage originale du Fer : Méthode Externe (Fabricant)



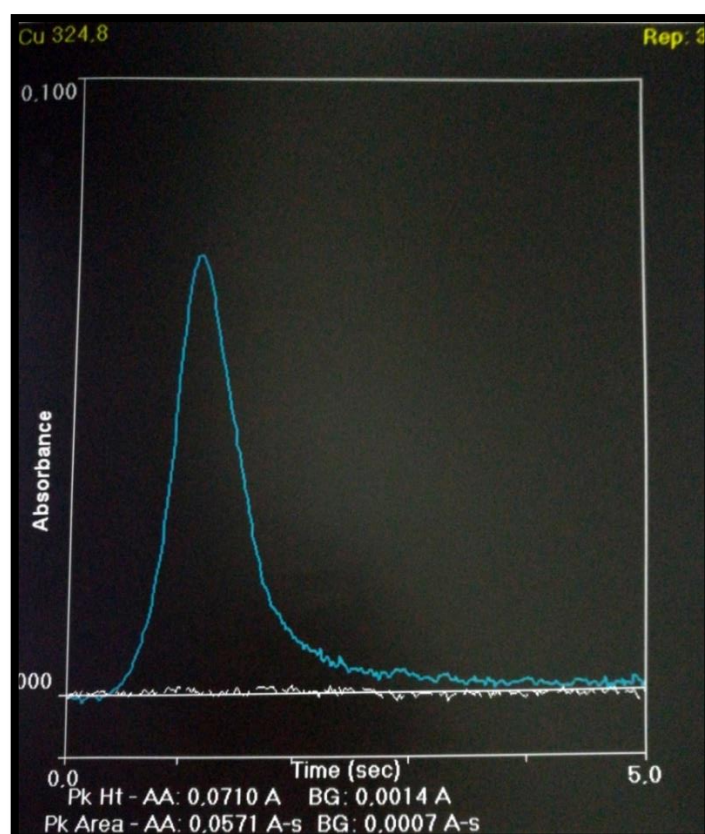
Courbe d'étalonnage originale du cuivre (Méthode 1) (LNCM)



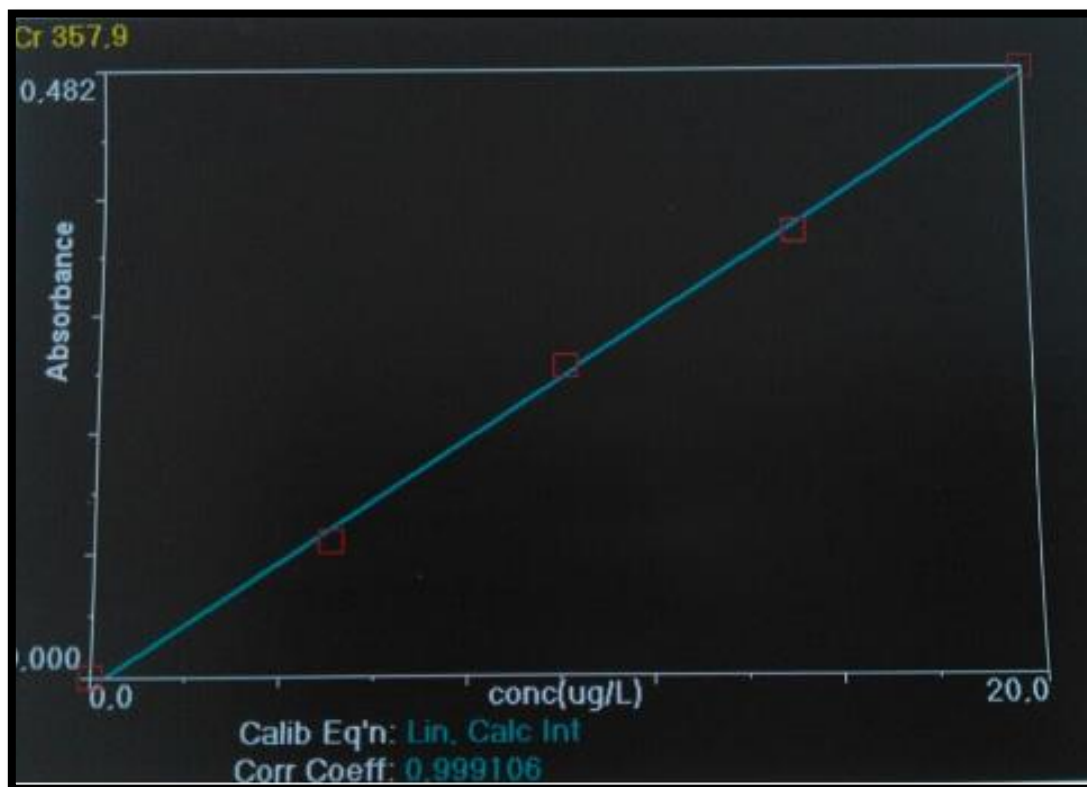
Principe actif du cuivre de la méthode 1 (LNCM)



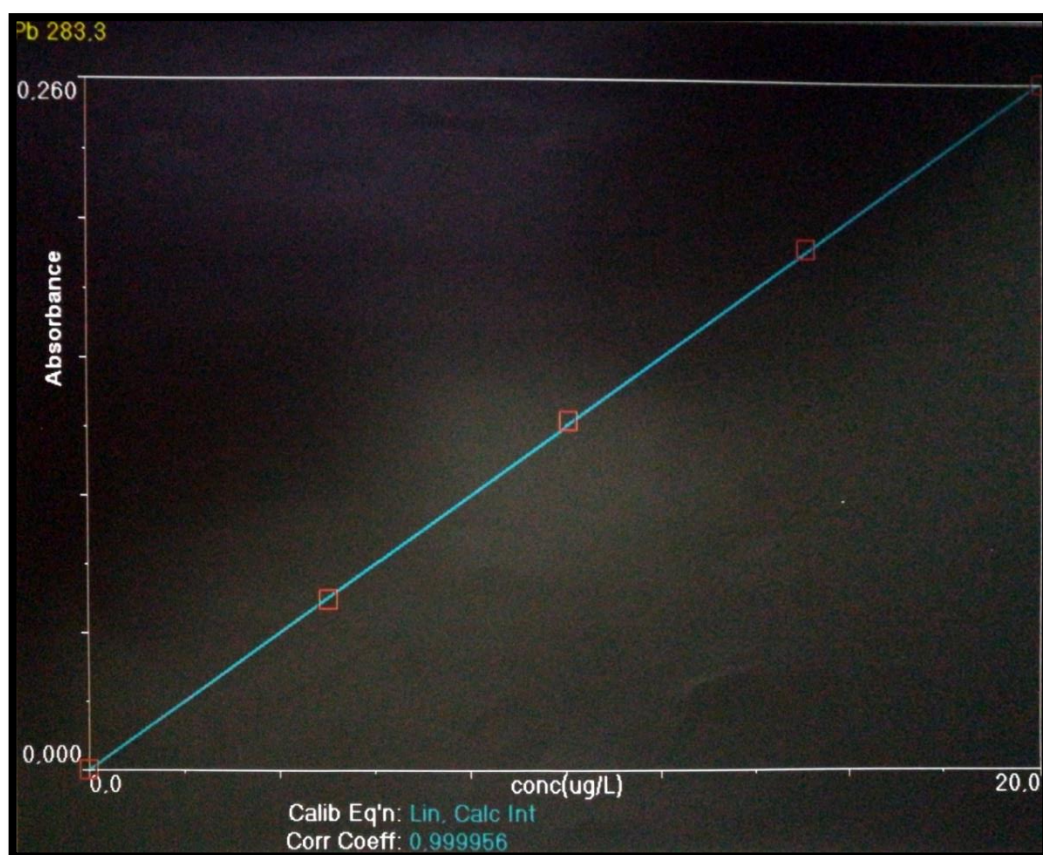
Courbe d'étalonnage originale du cuivre de la (Méthode 2 et 3) (LNCM)



Principe actif du cuivre méthode 3 (LNCM)



Courbe d'étalonnage du Chrome



Courbe d'étalonnage du Plomb