



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES – FES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE



PROJET DE FIN D'ETUDES

Licence en Sciences & Techniques :

Sciences Biologiques appliquées et Santé

Validation statistique du dosage de L'Aspirine par spectrophotométrie Uv-Visible

Présenté par : (BRAHMI OTMANE)

Encadré par :

Pr Mr. KHABBAL Y. (CHU FES)

Pr. Mme SEFRIOUI S. (Professeur à La FST de Fès)

Soutenu le :17/06/2015

Devant le jury composé de :

Pr Mme SEFRIOUI S.

Pr Mme Sqalli H.

Pr Mr. KHABBAL Y.

Année Universitaire : 2014-2015

SOMMAIRE

Présentation du lieu de stage	1
INTRODUCTION.....	2
CHAPITRE 1 : GENERALITE SUR ASPIRINE.....	3
I- La Molécule.....	3
1. Forme chimique.....	3
2. Synthèse Chimique.....	3
II- Les effets de L'aspirine.....	4
1. Les effets bénéfiques.....	4
2. Les effets indésirables.....	4
III- Le mode d'action de l'aspirine.....	5
1. Introduction.....	5
2. Les eicosanoïdes.....	6
3. De l'inhibition des COX à l'effet thérapeutique.....	7
IV- Pharmacocinétique de l'aspirine	8
1. Absorption.....	8
2. Distribution.....	8
3. Métabolisme.....	8
4. Elimination.....	9
V- Utilisation thérapeutique de l'aspirine	10
1. Indication.....	10
2. Posologie.....	10
3. Contre-indications.....	10
4. Précautions d'emploi de l'aspirine.....	10

**CHAPITRE 2 :
SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION -----11**

I- Introduction-----11

1. Principe -----11
2. Domaine Uv- Visible-----11

II- Rappels Théoriques-----12

1. Loi de Beer Lambert-----12
2. Loi de la transmission et d'absorbance-----12

**CHAPITRE 3 : -----13
VALIDATION D'UNE METHODE D'ANALYSE**

I- Introduction-----13

II- Paramètres de Performance statistiques -----13

1. Sensibilité -----13
2. Linéarité-----13
3. Fidélité – répétabilité-----14
4. Limite de détection(LD) -----14
5. Limite de Quantification (LQ) -----14

CHAPITRE 4 : RAPPELS STATISTIQUES-----15

1. La moyenne -----15
2. Ecart type -----15
3. Coefficient de corrélation -----15
4. Coefficient de détermination-----15
5. Coefficient de variation -----16
6. Loi normale/ loi gaussienne/ loi de Laplace-Gauss -----16
7. Loi de Student -----16
8. Loi de dixon /Teste des valeurs aberrantes-----17

MATERIELS ET METHODES -----	18
I- Appareillage -----	18
II – Etude spectroscopique -----	19
III Dosage des salicylates -----	20
RESULTATS ET DISCUSSIONS -----	21
I- Résultats -----	21
II- Calcul des paramètres de performance -----	22
CONCLUSION -----	25
BIBLIOGRAPHIE -----	26

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Formule plane de d'acide acétylsalicylique ou aspirine.

Figure 2 : synthèse chimique de l'aspirine.

Figure 3 : Formule plane de l'acide arachidonique.

Figure 4 : Réaction catalysée par les cyclooxygénases COX 1 et COX 2.

Figure 5 : voie de biosynthèse des prostaglandines, des thromboxanes et de la prostacycline.

Figure 6 : Récapitulation Mode d'action de l'Aspirine

Figure 7 : Principe de spectroscopie Uv-Visible

Figure 8 : Domaine Uv-Visible

Figure 9 : Schéma d'une distribution normale

Figure 10 : spectrophotomètre UV-Visible Jasco V-530

Figure 11 : gamme d'étalon de l'acide acétylsalicylique

Figure 12 : Courbe de la linéarité de l'acide acétylsalicylique: la moyenne des densités optiques en fonction de la concentration

Présentation générale CHU HASSAN II-FES

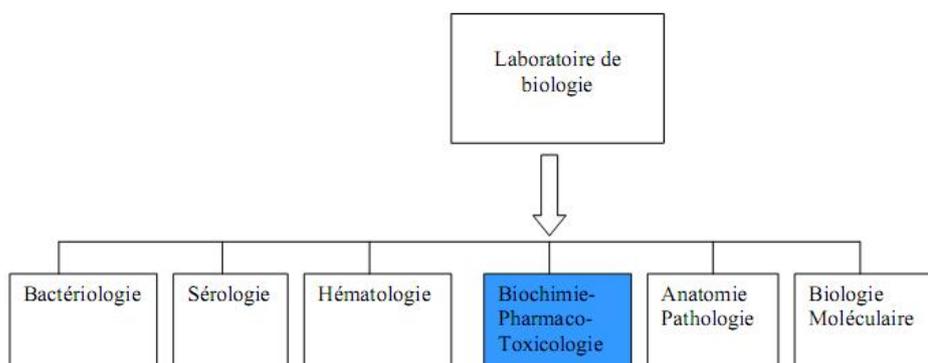
Le secteur de la santé connaît une nouvelle dynamique avec l'ouverture récente du CHU Hassan II à Fès. En effet, cet établissement public couvre les besoins d'une population estimée à plus de 3 millions d'habitants issus des régions de Fès Boulemane, Meknès-Tafilalet et Taza-Al Hoceima-Taounate. Ce centre est l'une des plus grandes infrastructures médicales réalisées au Maroc depuis l'indépendance dont Les missions sont :

-Dispenser des soins médicaux; -Conduire des travaux de recherche médicale dans le strict respect de l'intégrité physique et morale et de la dignité des malades; -Participer à l'enseignement clinique universitaire et postuniversitaire Médical et pharmaceutique ainsi qu'à la formation du personnel paramédical.

L'unité de biochimie, pharmacologie et toxicologie

L'unité de biochimie, pharmacologie et toxicologie fait partie du laboratoire central des analyses médicales. Elle vise à fournir à ses patients « services cliniques » des prestations en biochimie médicale de la plus haute qualité possible en respectant les offres que l'unité est en mesure de donner. Les résultats fournis doivent ainsi être justes, reproductibles et livrés à temps. Le chef du service des laboratoires s'engage à mettre en place et de maintenir un système qualité qui répond aux prescriptions de la norme ISO/CEI17025. Tout le personnel doit se conformer aux prescriptions du manuel des procédures du système qualité.

Le laboratoire



INTRODUCTION

L'aspirine ou acide acétylsalicylique ($\text{CH}_3\text{COOC}_6\text{H}_4\text{COOH}$) est un médicament utilisé comme : Analgésique/Antalgique (médicament qui prévient ou diminue la douleur) Antipyrétique (Médicaments destinés à abaisser la température corporelle ou diminuer la fièvre), anti-inflammatoire, contre la grippe, rhume, fièvre, migraine, et des diverses douleurs...

Cet ancien médicament extrait des fleurs de *Spiraea ulmaria* (Reine des prés) et aussi de l'écorce du saule reste le plus vendu dans le monde et se présente sous forme essentiellement de comprimés, sachets, Gélules ou injectable...

L'aspirine est un médicament si banal à nos yeux qu'il fait partie du langage courant. En effet, dès que quelqu'un se plaint de maux de tête, on lui dit : « prend une aspirine » sans vraiment savoir à quoi sert ce médicament et s'il n'y a pas de risque à l'utiliser. Les chercheurs ne cessent de lui découvrir de nouvelles propriétés, que ce soit sur son mode d'action ou sur ses bienfaits. Elle est capable de soigner une grippe, des douleurs, de la fièvre et bien d'autres maladies avec une certaine rapidité mais possède également de nombreuses contraintes.

BUT DU STAGE

Le dosage par spectrophotométrie est un dosage très utilisé dans la Pharmacopée et généralement dans l'industrie Pharmaceutique, c'est une méthode utilisée pour déterminer la concentration d'une espèce chimique en solution et pour mesure l'intensité d'absorption ou d'émission (spectrophotométrie) d'un rayonnement électromagnétique par les espèces à doser (Aspirine), et Les rayonnements les plus souvent utilisés sont les rayons ultraviolets (UV)

Mon stage de fin d'études réalisé au service de toxicologie du CHU Hassan II de Fès avait comme motivation et comme but l'utilisation d'une technique de dosage spectrophotométrique UV-Visible de l'acide acétylsalicylique Et sa validation par des tests de performances

CHAPITRE 1 :GENERALITE SUR ASPIRINE

I/La Molécule

1. Forme chimique

Aspirine vient du nom commercial qui désignait le premier médicament dont le principe actif était l'acide acétylsalicylique (Le nom chimique de cette molécule est l'acide 2-(acétyloxy) benzoïque (voir structure fig. 1).

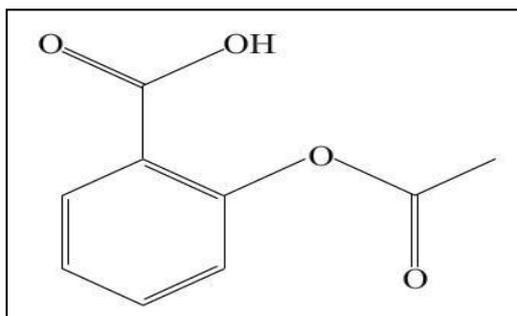


Figure 1. Formule plane de d'acide acétylsalicylique ou aspirine.

A: Acétyl (Dérivé de l'acide acétyle, celui du vinaigre)

SPIR: Pour Spirea, nom latin de la famille de la Reine des prés

RINE: Suffixe en chimie industrielle (pareil que la morphine, digitaline...)

2. Synthèse Chimique

L'aspirine (ou acide acétylsalicylique) est un ester synthétisé à partir de l'acide salicylique : l'hydrogène du groupe hydroxyle -O-H porté par le cycle benzénique est remplacé par un groupe acétyle -CO-CH₃ (voir fig. 2). L'estérification par l'acide acétique ne produit qu'un très faible rendement en ester, on emploie l'anhydride éthanoïque (ou acétique) en excès afin d'obtenir un rendement maximal. L'aspirine (ou acide acétylsalicylique) est un ester synthétisé à partir de l'acide salicylique (hémisynthèse) : l'hydrogène du groupe hydroxyle -O-H porté par le cycle benzénique est remplacé par un groupe acétyle -CO-CH₃ (voir fig. 2). L'estérification par l'acide acétique ne produit qu'un très faible rendement en ester, on emploie l'anhydride éthanoïque (ou acétique) en excès afin d'obtenir un rendement maximal.

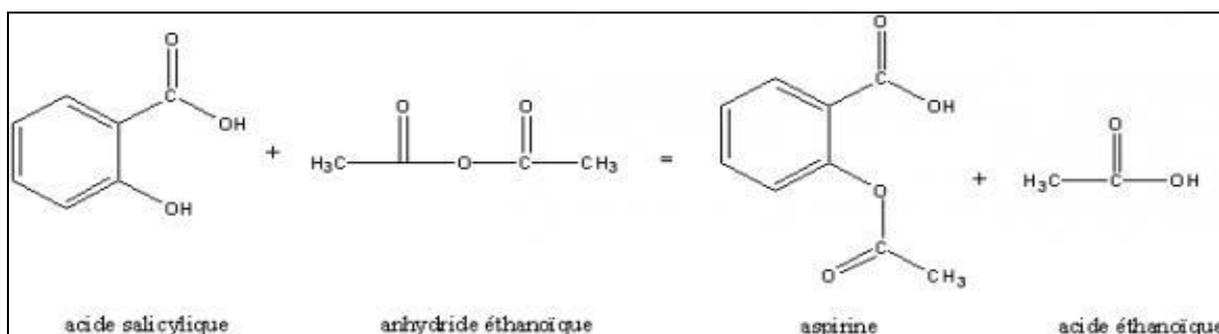


Figure 2. Synthèse chimique de l'aspirine.

II- LES EFFETS DE L'ASPIRINE

1. Les effets bénéfiques

L'aspirine est un médicament couramment utilisé en cas de douleur (action antalgique) qu'elle soit musculaire (action myalgique) ou articulaire (action arthralgique) et surtout en cas de fièvre (action antipyrétique)

Il est utilisé dans le traitement préventif à faible dose pour être efficace à réparer les problèmes circulatoires comme l'entorse (action anticoagulante) ainsi que des pathologies telles que les infarctus et des accidents cardiaques par fluidification du sang, et lutter contre les accidents vasculaires cérébraux en empêchant les plaquettes de sang de s'agglutiner entre elles et ainsi de former de dangereux caillots dans les vaisseaux, et certains problèmes liés à la grossesse, le cancer due aux tumeurs et métastases et le cancer de l'intestin et l'estomac.

L'aspirine à faible dose inhibe la sécrétion de l'acide urique au niveau du tubule distal (action uricorétenteur) et à doses moyennes ou fortes : l'aspirine inhibe la réabsorption de l'acide urique au niveau du tubule proximal, favorisant donc son élimination, et peut ainsi déclencher une crise de colique néphrétique par lithiase urique [1]

2. Les effets indésirables

L'aspirine présente des effets indésirables pour les cellules de l'oesophage, de l'estomac et du duodénum, elle peut entraîner des lésions du système gastro-intestinal : hémorragies digestives, ulcères gastriques voir perforation de la paroi.

L'aspirine peut également entraîner des problèmes hématologiques. En effet ses propriétés anticoagulantes, bénéfiques dans certaines situations, peuvent devenir dangereuses dans d'autres situations puisqu'une hémorragie aura plus de mal à s'arrêter.

Un autre effet secondaire, éventuellement sévère, est le risque allergique. Différentes manifestations allergiques peuvent survenir comportant des réactions cutanées comme de l'urticaire, mais aussi des réactions beaucoup plus dangereuses, voir mortelles, comme de l'asthme, des réactions anaphylactique (violente réaction allergique impliquant des IgE pouvant, au final, entraver la circulation sanguine), un oedème de Quincke (forme particulière d'urticaire caractérisé par un gonflement sous-cutané du visage et du cou, et surtout des muqueuses buccales et ORL pouvant réduire le diamètre des voies aériennes supérieures, voire les obstruer), ou un syndrome de Reye (maladie aigüe très grave caractérisée par des atteintes cérébrale et hépatique).

Enfin il peut y avoir des effets sur le système nerveux central (céphalées, problèmes auditifs) heureusement beaucoup moins graves que les effets précédents. [1]

III. Le mode d'action de l'aspirine

1. Introduction

L'aspirine a été utilisée sans que l'on sache comment la molécule agissait. La découverte de son mode d'action a été tardive et a été récompensée par [le prix Nobel de physiologie ou de médecine 1982](#) accordé au britannique Sir John Vane (les 2 autres colauréats, les suédois Sune Bergström et Bengt Samuelsson, ayant travaillé sur les cibles de l'aspirine).

L'aspirine est essentiellement un inhibiteur irréversible des COX, des enzymes faisant partie de la voie de biosynthèse de certains membres des eicosanoïdes (voir ci dessous), dont les prostaglandines. La COX 1 est une enzyme ubiquitaire produite par la plupart des tissus du corps humain alors que la COX 2 est très faiblement exprimée puisque son gène est inductible, c'est à dire qu'il n'est actif qu'en présence d'un signal déclencheur qui, pour la COX 2, correspond à une situation inflammatoire. [1]

2. Les eicosanoïdes

Les eicosanoïdes regroupent un ensemble de médiateurs lipidiques dérivés de l'acide arachidonique, un acide gras insaturé trouvé dans les membranes cellulaires. Le nom eicosanoïdes vient du mot grec "eicosa" qui veut dire 20, l'acide arachidonique étant à acide gras à 20 atomes de carbone (voir Fig 3).

:

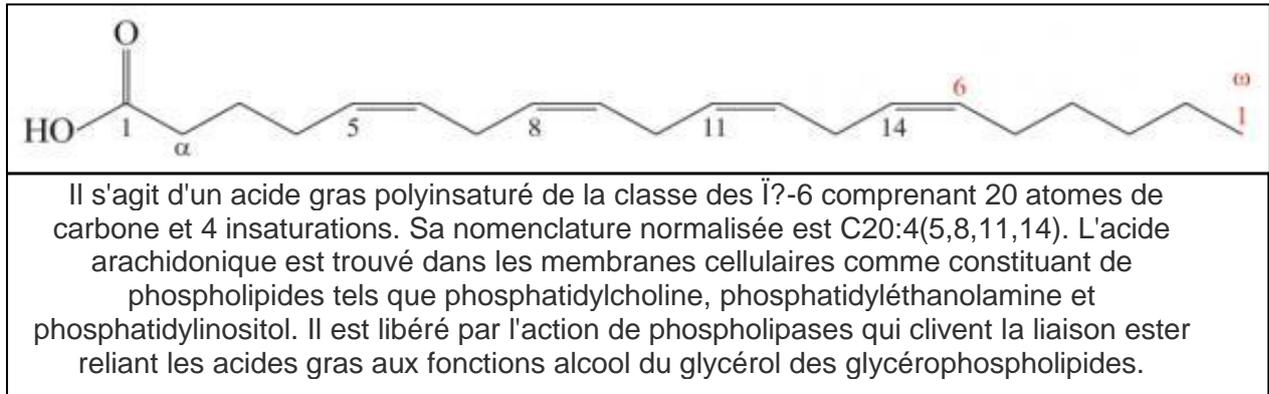


Figure 3. Formule plane de l'acide arachidonique

Les eicosanoïdes comprennent les prostaglandines, la prostacycline, les thromboxanes, les leucotriènes et les lipoxines. Ce sont tous des médiateurs intercellulaires locaux de type autocrine (la cellule qui produit le médiateur est également la cellule cible) ou paracrine (la cellule cible est proche de la cellule productrice). Pour leur synthèse, prostaglandines, thromboxanes et prostacycline font appel à des COX. Comme leur nom l'indique, la réaction catalysée par ces enzymes entraîne l'ajout d'atomes d'oxygène et la création d'un pentacycle carboné (voir Fig. 4).

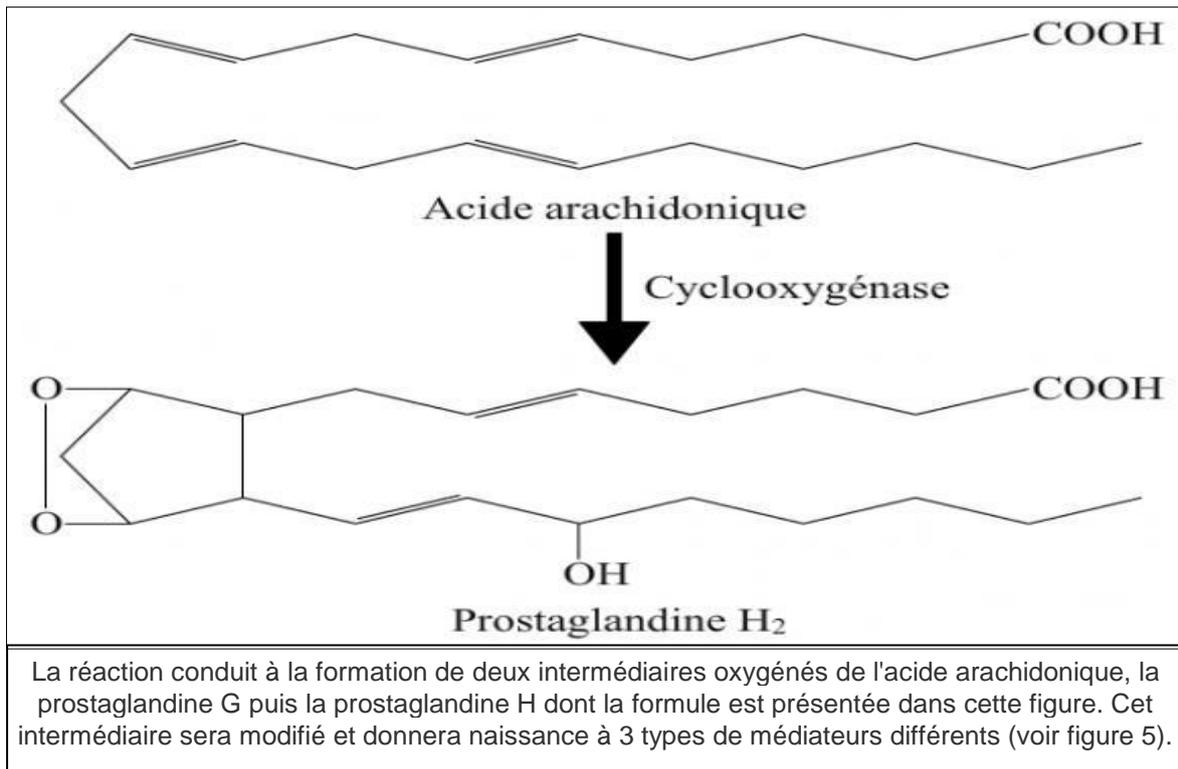
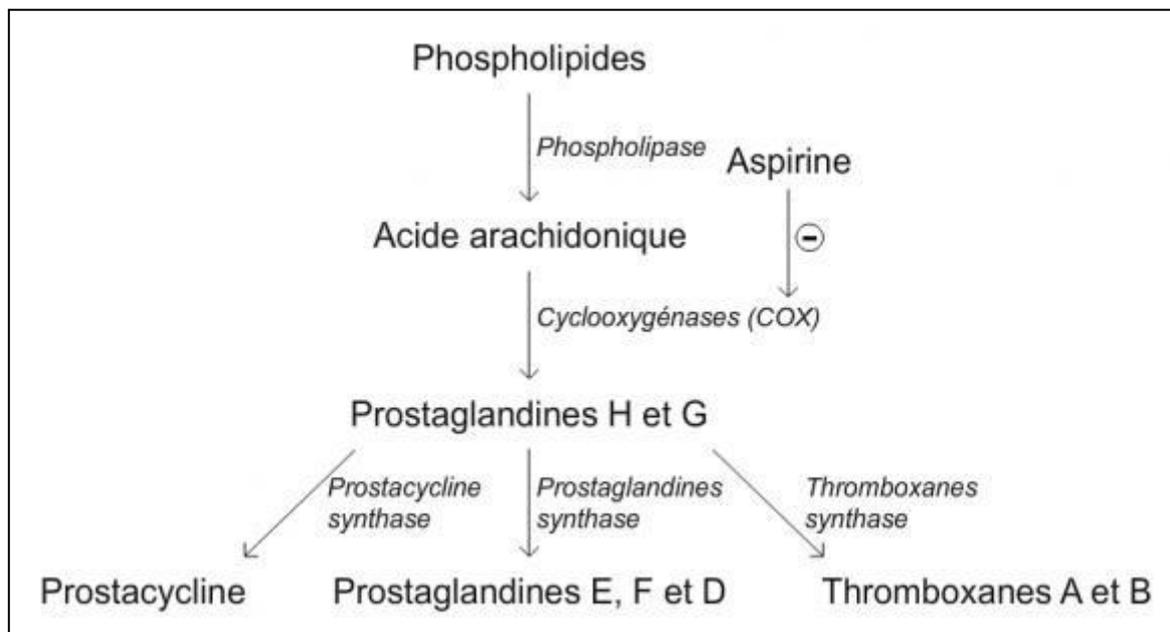


Figure 4. Réaction catalysée par les cyclooxygénases COX 1 et COX 2.



On constate que ces trois médiateurs ont des intermédiaires communs, les prostaglandines H et G. L'inhibition des COX, enzymes qui permettent la synthèse de ces intermédiaires, inhibe donc la production de tous ces médiateurs. Notons que l'effet antiinflammatoire des corticoïdes est obtenu par inhibition des phospholipases qui libèrent l'acide arachidonique. Les deux autres membres des eicosanoïdes, les leucotriènes et les lipoxines, dérivent aussi de l'acide arachidonique mais n'utilisent pas les COX pour leur biosynthèse.

Figure 5. voie de biosynthèse des prostaglandines, des thromboxanes et de la prostacycline.

Concernant les prostaglandines, leur nom dérive de l'histoire de leur découverte. En 1935, Ulf von Euler et M. Goldblatt ont découvert séparément que le liquide séminal et les vésicules séminales de nombreux animaux, dont l'homme, contenaient une substance capable de provoquer des contractions du muscle lisse utérin. On l'utilise d'ailleurs encore de nos jours en gynécologie-obstétrique (interruption de grossesse, accouchement). Persuadé que cette substance était produite par la prostate, von Euler (également découvreur, entre autre, de la substance P et de la noradrénaline, [prix Nobel de physiologie et de médecine en 1970](#)) la baptisa prostaglandine. Il sera ultérieurement montré que les prostaglandines trouvées dans le liquide séminal sont en fait produites par les vésicules séminales et non par la prostate. Cependant, de très nombreux autres tissus sont capables de produire des prostaglandines, ce qui explique en partie l'effet assez large de l'aspirine.

Globalement, les prostaglandines sont impliquées dans la régulation des réactions inflammatoires consécutives à une agression (agression biologique comme une infection, agression chimique, agression physique comme une brûlure, ou agression mécanique comme un écrasement). Cette action s'accompagne également d'un abaissement du seuil de stimulation des récepteurs à la douleur.

3. De l'inhibition des COX à l'effet thérapeutique

L'action de l'aspirine passe par l'inhibition de la synthèse de ces différents médiateurs. En inhibant la production de prostaglandines, elle va limiter l'abaissement du seuil de la douleur, d'où son action antalgique, ainsi que les réactions inflammatoires, d'où son action antipyrétique. En effet, l'inflammation est un mécanisme complexe, et l'un des nombreux événements de cette réponse est une libération d'interleukine 1 (IL1) par les macrophages. Or, l'IL1 agit, entre autre, sur l'hypothalamus, le centre thermorégulateur du corps. Elle augmente la température de consigne via la production par l'hypothalamus de prostaglandine E. Cela entraîne une élévation de la température corporelle, autrement dit de la fièvre, par contraction involontaire des muscles et vasoconstriction périphérique (pour limiter la déperdition de chaleur). L'action antipyrétique de l'aspirine passe par l'inhibition de cette série d'évènements. Il est à noter que la prise d'aspirine en absence de fièvre (pour des maux de tête par exemple) n'entraîne pas d'hypothermie, ni un blocage de l'élévation physiologique de la température consécutive à une activité sportive.

Par ailleurs, à dose modérée d'aspirine, si l'inhibition de la COX 1 des plaquettes est durable (les plaquettes étant dépourvues de noyau comme les hématies, elles ne peuvent renouveler leurs enzymes), celle de la COX 1 des cellules endothéliales l'est beaucoup moins du fait d'une néosynthèse des enzymes dans ces dernières cellules. Il en résulte une diminution plus marquée des thromboxanes que de la prostacycline, de telle sorte que vasodilatation et action anticoagulante vont être favorisées. En revanche, à forte dose d'aspirine, l'inhibition de la COX 1 est durable pour les deux types cellulaires : l'inhibition de la production est efficace aussi bien pour les thromboxanes que pour la prostacycline. [2]

IV – PHARMACOCINETIQUE DE L'ASPIRINE

1. Absorption

Avec un $pK_a=3,5$, l'acide acétylsalicylique se trouve presque entièrement sous forme non ionisée, liposoluble, dans l'estomac ($pH=1$). Après ingestion, sa résorption gastrique est donc importante et rapide, par diffusion passive. Si on administre simultanément un agent alcalinisant (bicarbonate de sodium, par exemple), dans le but de diminuer l'effet irritant sur la muqueuse gastrique, en présence de HCl gastrique, il se transforme en NaCl et l'aspirine se retrouvera, au moins en partie, sous forme d'acide libre.

L'adjonction d'un alcalinisant ou d'une substance tampon à l'aspirine permet la mise en solution de l'aspirine avant de l'ingérer, améliore sa tolérance gastrique et facilite sa résorption au niveau de l'intestin grêle . Par voie rectale, l'absorption est lente et incomplète ; après injection parentérale, la concentration sanguine est rapidement élevée [2]

2. Distribution

La distribution est rapide dans la plupart des tissus et organes, l'aspirine pénètre dans le liquide synovial, traverse la barrière hématoencéphalique et placentaire. Elle se lie aux protéines plasmatiques dans une proportion importante (environ 50 à 80%).

Cette affinité lui permet de déplacer au moins partiellement d'autres substances déjà liées à ces mêmes protéines, par exemple les anticoagulants coumariniques (antivitamines K), le méthotrexate, l'insuline, la bilirubine (chez le nouveau né), les sulfamidés, la pénicilline. Leurs formes libres étant seules biologiquement actives, il peut en résulter une augmentation intempestive de leurs effets [2]

3. Métabolisme

L'aspirine peut connaître une hydrolyse enzymatique pour donner l'acide salicylique et l'acide acétique. L'oxydation partielle de l'acide salicylique donnera l'acide dihydroxybenzoïque (acide gentisique) (5%). On observe différents types de conjugaisons de l'acide salicylique:

- Avec le glyco-colle, la conjugaison donne l'acide salicylurique (50%),
- Avec l'acide glycuronique, par sa fonction phénol, on obtient phénoxyglycuronide (10 à 30%) ; et par sa fonction acide, on obtient acylglycuronide (jusqu'à 10%) [3]

4. Elimination

L'élimination est essentiellement urinaire. L'aspirine connaît une filtration glomérulaire passive, une sécrétion tubulaire active, et une réabsorption tubulaire passive de la forme liposoluble non ionisée. L'alcalinisation de l'urine augmente sa dissociation, elle diminue sa réabsorption et favorise son élimination. Cela est d'un grand intérêt dans le traitement de l'intoxication aiguë. Cette excrétion est relativement lente puisqu'en 24 heures, 50% seulement de la dose sont éliminés, et qu'au bout de 48 heures, il en reste encore des traces dans les urines. L'acide acétylsalicylique et ses métabolites perturbent le dosage dans l'urine de l'acide homovanillique, catabolite de la noradrénaline [4]

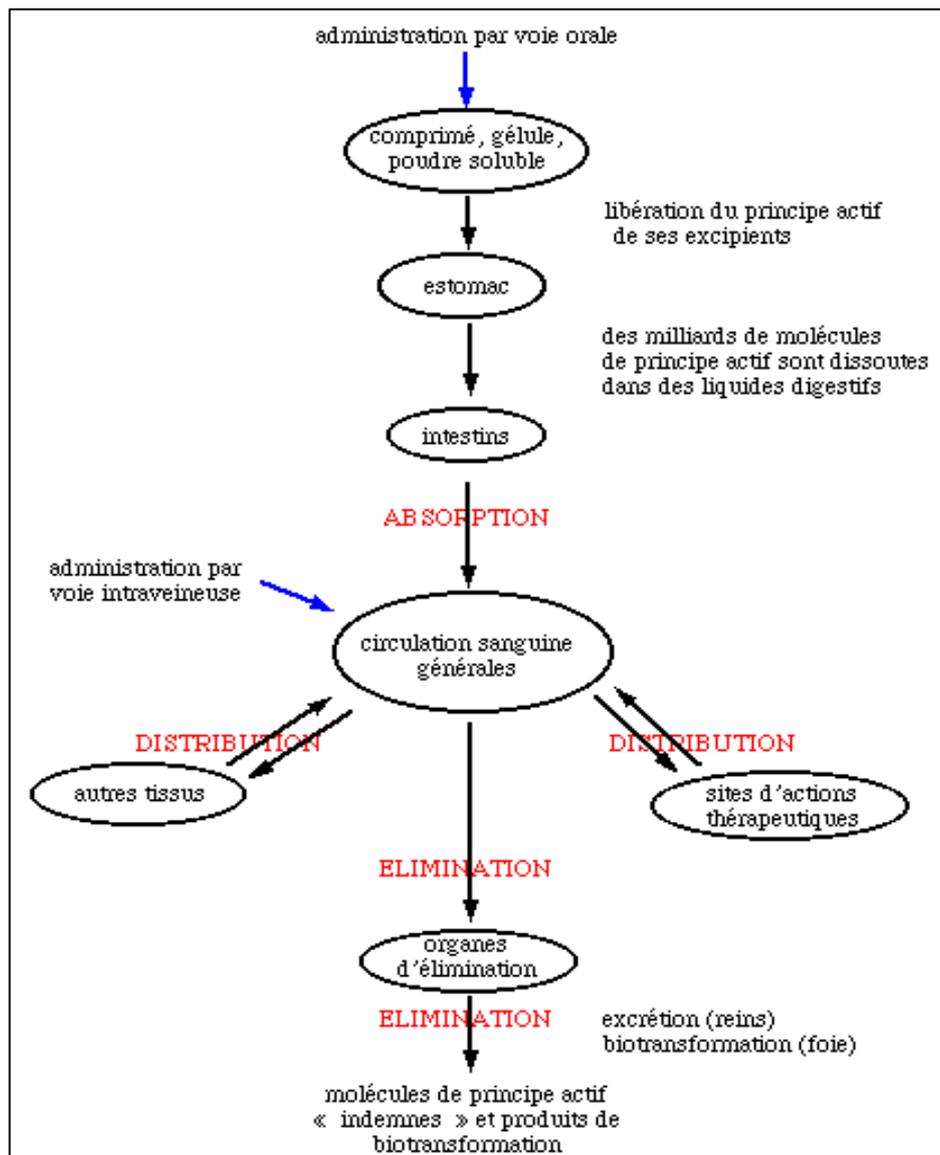


Figure 6 : Récapitulation Mode d'action de l'Aspirine

V- UTILISATION THERAPEUTIQUE DE L'ASPIRINE

1. Indication

L'aspirine est indiquée dans les cas des douleurs, des fièvres et des maladies inflammatoires. Elle peut aussi être indiquée dans le traitement des maladies veineuses causées par la coagulation sanguine [5]

2. Posologie

- Chez l'enfant, il ne faut pas dépasser 50 mg/kg/jour.
- Chez l'adulte ce sera 1 comprimé à 1000 mg par prise, sans dépasser 3 comprimés à 1000 mg par jour (3 g/jour).
- Les prises seront espacées d'au moins 4 heures

3. Contre-indications

L'aspirine est contre-indiquée chez des sujets ayant déjà été traités par des médicaments anticoagulants. Elle est aussi contre-indiquée en cas de crises de goutte et de syndromes hémorragiques. En plus, il est strictement contre-indiqué de prendre l'aspirine lors des antécédents d'intolérance de type anaphylactique à ce médicament ou d'autres analgésiques anti-inflammatoires. Et enfin, l'aspirine est contre indiquée chez la femme enceinte au troisième trimestre [6]

4. Précautions d'emploi de l'aspirine

L'aspirine est à prendre avec précaution en cas des antécédents d'ulcère gastrique, duodéal ou d'hémorragie digestive. Il faut aussi faire attention lors de la prise de l'aspirine en cas de l'insuffisance rénale, l'asthme et le dispositif intra-utérin. En cas de grossesse un traitement bref au cours des deux premiers trimestres ne paraît pas poser de problème. En revanche, pendant le troisième trimestre de la grossesse, toute prise d'aspirine est absolument contre-indiquée car elle favorise les complications hémorragiques, et allonge le temps de travail

Pendant l'allaitement la prise répétée est déconseillée en raison du risque toxique chez le nouveau-né car des concentrations élevées peuvent se trouver dans le lait maternel .

Dans les cas d'une ingestion connue de salicylates, il est important de suivre les concentrations sériques aux 4 heures jusqu'à ce qu'elles décroissent et que le patient ne démontre aucun signe d'intoxication aux salicylates. [7]

CHAPITRE 2 : SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION DANS L'UV-VISIBLE

I/ INTRODUCTION

1. Principe

Le principe est simple : on cherche à savoir quelle est l'absorbance à chaque valeur de la longueur d'onde. On utilise donc un système de type monochromateur pour fixer la longueur d'onde et un photomultiplicateur vient enregistrer l'absorbance correspondante. Il suffit de faire varier la longueur d'onde sur une plage adéquate pour obtenir un spectre.

Une source de lumière est rendue monochromatique à travers un système dispersant (prisme) ; Le faisceau est dédoublé. Un faisceau traverse la cuve et l'autre sert de référence (passe à travers une cuve de solvant). Un photomultiplicateur enregistre le spectre de transmission $T = I / I_0$ puis traite l'information de façon à donner l'absorption. Le spectre est ensuite affiché et traité par un ordinateur qui détermine les différentes longueurs d'onde d'absorption maximale ainsi que les absorptions correspondantes. (Figure 7)

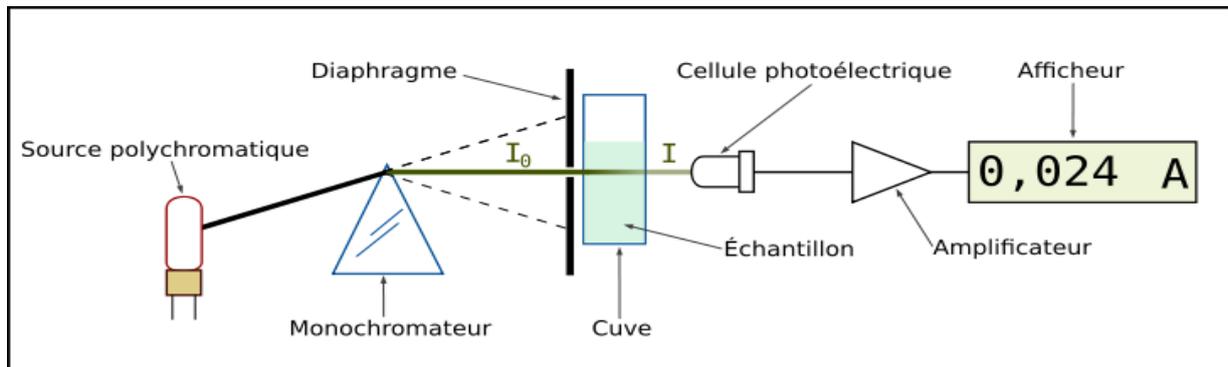


Figure 7. Principe de spectroscopie Uv-Visible

2. Domaine Uv- Visible

Le domaine du spectro ultraviolet utilisable en analyse s'entend de 185 à 400 nm, alors que celui du spectro visible s'entend de 400 à 800 nm (Figure 8).

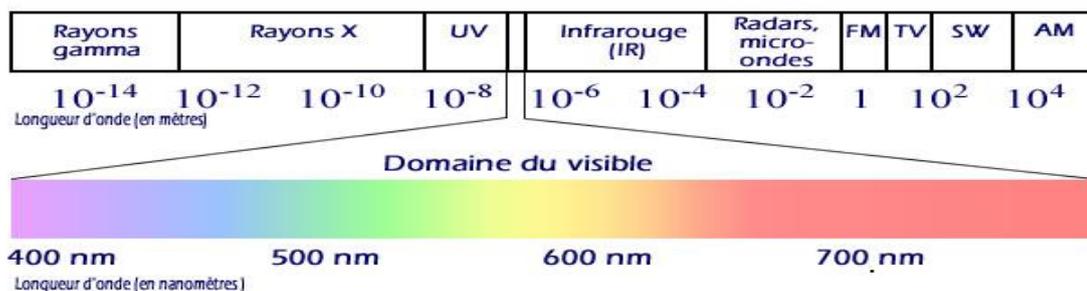


Figure 8. Domaine Uv-Visible

II/RAPPELS THEORIQUES

1. Loi de Beer Lambert

La technique de spectrophotométrie permet de réaliser des dosages grâce à **la loi de Beer-Lambert** qui montre une relation de proportionnalité entre l'absorbance et la concentration, aussi bien qu'une étude structurale des complexes par l'étude des spectres d'absorption.

La loi de Beer-Lambert est une relation donnant la variation de l'intensité lumineuse en fonction de la distance parcourue dans un milieu transparent (généralement une solution mais peut aussi se faire sur des lames de verre). Cette loi dit que si un faisceau de photon d'intensité initiale I_0 traverse une cuve de longueur l (généralement 1 cm) contenant une solution de concentration C mol.L⁻¹, l'intensité I une fois la cuve traversée aura comme valeur :

$$I = I_0 \cdot \exp(-klc)$$

k est appelé le coefficient molaire d'absorption.

L'intensité lumineuse n'est pas toujours l'information la plus intéressante à traiter, c'est pourquoi on définit la transmission (T)

2. Loi La transmission et d'absorbance.

$$T = I / I_0$$

T : est souvent exprimé en pourcentage.

On rencontre aussi l'absorbance, unité utilisée en spectrophotométrie UV-visible, définie par :

$$A = \log(I_0 / I) = -\log T$$

Soit Finalement L'absorbance peut donc s'écrire sous la forme :

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

ϵ : coefficient d'absorption en L.mol⁻¹.cm⁻¹.

l : longueur du trajet optique dans le liquide=largeur de la cuve=1 cm.

C : Concentration du composé étudié en mol.L⁻¹.

Au cours de ce travail, nous avons tenté de validé le dosage de l'Aspirine par spectrophotométrie UV-Visible.

CHAPITRE 3 : VALIDATION D'UNE METHODE DE DOSAGE D'UN PRINCIP ACTIF

I- Introduction

Le but de la validation d'une méthode d'analyse est de démontrer qu'elle correspond à l'usage pour lequel elle est prévue par un Ensemble d'opérations nécessaires pour prouver que le protocole est suffisamment exacte et fiable pour avoir confiance dans les résultats fournis et ceci pour un usage pharmaceutique déterminé afin de mieux connaître les caractéristiques d'un médicament.

Les critères de fiabilité de cette technique sont :

- Sensibilité
- Linéarité
- La répétabilité
- Limite de détection
- Limite de quantification

II- Paramètres de Performance statistiques d'une méthode de mesure basée sur la courbe d'étalonnage

1. Sensibilité

La sensibilité est l'aptitude de la méthode à détecter de petites variations de concentration. Elle se définit comme étant la pente de la courbe d'étalonnage :

$$a = \frac{Y_1 - Y_2}{X_1 - X_2}$$

2. Linéarité

La linéarité d'une méthode d'analyse est sa capacité, à l'intérieur d'un certain intervalle, d'obtenir des résultats de mesure directement proportionnels à la concentration (quantité) en substance de l'échantillon analysé.

L'étude de la linéarité revient à une étude de régression. La méthode de la régression consiste à étudier à travers la gamme d'étalonnage. La relation concentration / réponse est exprimée par une courbe d'étalonnage dont l'équation est :

$$y = ax + b$$

3. Fidélité - répétabilité

La répétabilité est l'étroitesse de l'accord entre les résultats d'analyse indépendants entre eux obtenus avec la méthode considérée sur un même échantillon, dans le même laboratoire, avec le même opérateur utilisant le même matériel, dans un court intervalle de temps.

L'essai de répétabilité consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon pour le même analyte dans des conditions identiques : même opérateur, même lots de réactifs, même instrument, même calibrateur. En pratique, cet essai sera réalisé au cours d'une même série. L'exploitation des résultats consiste à calculer la moyenne (X), l'écart-type (s) et le coefficient de variation (CV) des valeurs expérimentales. Le CV représentera la répétabilité de la méthode en %.

Le coefficient de variation donne l'homogénéité des données, si le coefficient de variation est inférieur à 15%, on considère que les données sont homogènes et inversement, si le coefficient de variation est supérieur à 15%, on dit que les données sont hétérogènes.

4. Limite de détection (LD)

C'est la plus faible concentration de l'analyte détectée, mais pas nécessairement à doser, à l'aide d'une méthode spécifique dans des conditions expérimentales imposées.

Elle représente la plus faible concentration de l'analyte qu'il est possible de détecter, mais pas nécessairement de doser, à l'aide d'une méthode spécifique, dans les conditions expérimentale imposées. Cette limite est généralement exprimée sous forme de concentration (par exemple en microgramme par litre).

$$LD = 3,3 \times \frac{\sigma}{S}$$

σ : La moyenne des écarts-types.

S : La pente de la droite d'étalonnage.

5. Limite de Quantification (LQ)

C'est la concentration minimale qui peut être quantifiée à l'aide d'une méthode d'analyse avec une fiabilité définie.

Il s'agit de la concentration minimale qui peut être quantifiée à l'aide d'une méthode d'analyse avec une fiabilité définie.

$$LQ = 10 \times \frac{\sigma}{S}$$

CHAPITRE 4 : RAPPELS STATISTIQUES

Avant de détailler le chapitre concernant les résultats, il est nécessaire de présenter la définition de quelques termes importants en statistiques.

1. La moyenne

Dans le cas où une population sur un échantillon est répétée un certain nombre de fois : La moyenne est la somme des grandeurs mesurées divisée par le nombre d'individus. La moyenne d'une grandeur x est notée : \bar{X}

$$\bar{X} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{n} = \frac{\sum x_i}{n}$$

\bar{X} : Moyenne arithmétique

x_i : Valeurs des observations de la variable X .

n : nombre d'observations.

2. Ecart type

L'écart type mesure la dispersion d'une série de valeurs autour de leur moyenne. C'est la racine carrée de la variance. Il est noté S .

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}$$

3. Coefficient de corrélation

Quotient de la covariance de deux caractères par le produit de leurs écarts-types : c'est étudier l'intensité de la liaison qui peut exister entre ces variables, étudier leur ressemblance. Plus le coefficient de corrélation se rapproche de 1 ou de -1, plus les variables sont corrélées, c'est à dire, ont des similitudes.

$$r = \frac{(cov(x;y))}{(\sigma x \cdot \sigma y)}$$

4. Coefficient de détermination

C'est un indicateur de juger la qualité d'une régression linéaire, ayant pour valeur comprise entre 0 et 1

$$r^2 = \left(\frac{(cov(x;y))}{(\sigma x \cdot \sigma y)} \right)^2$$

5. Coefficient de variation

Le coefficient de variation indique la dispersion relative qui est un nombre sans unité qui permet de comparer deux variables statistiques de natures différentes. il se calcule comme rapport entre l'écart type et la moyenne, représenté en %

$$CV = \frac{s}{\bar{X}} \times 100$$

6. Loi normale/ loi gaussienne/ loi de Laplace-Gauss

La loi normale, notée $N(m, s)$, est caractérisée par sa moyenne m et son écart-type s (ou sa variance s^2). Elle est telle que : L'espérance correspond au mode de la loi normale, la variance correspond au carré de l'écart-type, deux indices de dispersion de la distribution.

Comme on le voit sur le graphe de cette distribution se présente sous forme de cloche : la loi normale est symétrique autour de son espérance. (figure 9)

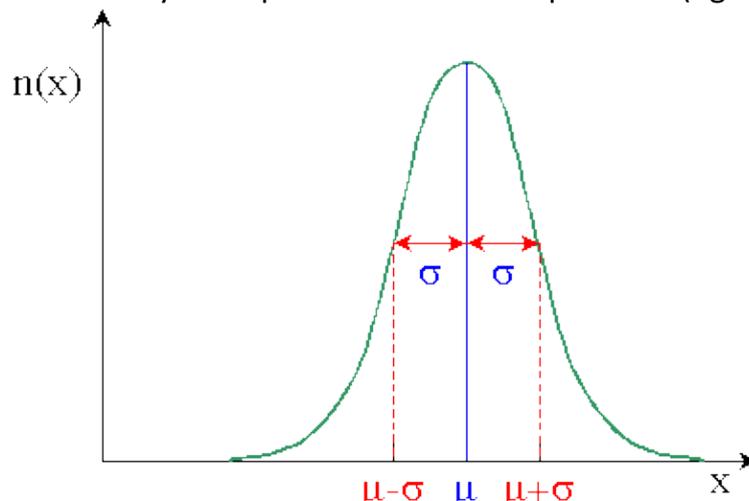


Figure 9 : Schéma d'une distribution normale

μ est la moyenne (notée aussi m).

σ est l'écart type

$N(x)$ est le nombre d'individus pour lesquels la grandeur analysée a la valeur x .

Si X suit une loi normale de paramètre μ et σ^2 , alors :

- L'espérance mathématique de X est : $E(X)=\mu$.
- La variance de X est $Var(X)=\sigma^2$ (25).

7. Loi de Student

La loi de Student est une loi de probabilité, faisant intervenir le quotient entre une variable suivant une loi normale centrée réduite et la racine carrée d'une variable distribuée suivant la loi du χ^2 .

8. Loi de dixon /Teste des valeurs aberrantes

On entend par valeur aberrante dans une distribution quantitative, une valeur qui s'écarte du reste des autres observations.

Le test de DIXON consiste à comparer la distance entre les points les plus éloignés du modèle et les points immédiatement plus voisins à l'étendue totale des résidus.

Deux alternatives existent :

-La valeur aberrante est le résultat de gros écarts par rapport au mode opératoire habituel, ou provient d'erreurs de calcul ou d'enregistrement. Dans ce cas il faut rejeter l'observation comme ne faisant pas partie de la population, ou la remplacer par la valeur corrigée.

-La valeur aberrante est due à une erreur aléatoire. Dans un tel cas, il convient de conserver la mesure comme faisant partie intégrante de la distribution statistique.

Il s'applique pour l'échantillon de taille $n \leq 30$, il ne nécessite pas le calcul de l'écart-type de la série dans la validation dont le nombre de l'effectif : $n = 6$. Son principe est de classer la distribution observée par valeurs croissantes : $Y_1 \leq Y_2 \leq Y_3 \leq \dots \leq Y_{n-1} \leq Y_n$.

En fonction du nombre d'observation dont on dispose on calcule les rapports suivant:

$$3 \leq n \leq 7 \quad r_{10} = \frac{Y_n - Y_{n-1}}{Y_n - Y_1}$$

$$8 \leq n \leq 10 \quad r_{11} = \frac{Y_n - Y_{n-1}}{Y_n - Y_2}$$

$$11 \leq n \leq 13 \quad r_{21} = \frac{Y_n - Y_{n-2}}{Y_n - Y_2}$$

$$14 \leq n \leq 30 \quad r_{22} = \frac{Y_n - Y_{n-2}}{Y_n - Y_3}$$

On visualise alors dans la table de Dixon qui donne les valeurs critiques de ces rapport au niveau de risque 5% .La règle à adopter est la suivante : si la valeur du rapport est inférieure à la valeur critique, on dit que le point n'est pas aberrant.

MATERIELS ET METHODES

I- Appareillage

Dans cette étude, nous avons utilisé les appareils suivant :

- spectrophotomètre UV-Visible Jasco V-530 (figure 10)



Figure 10 : spectrophotomètre UV-Visible Jasco V-530

- agitateur
- Tubes à Vortex.
- Micropipette, •Entonnoirs
- Ampoules à décanter
- Verres à pied de 100ml
- Béchers de 100 ml
- Micropipette de 1 ml
- Cuve photométrique OS (verre) de 10 mm diamètre

Réactifs

* Réactif de Trinder (réactif I):

chlorure mercurique40g
Eau distillée.....850 ml
Chauffer pour dissoudre. Après refroidissements, ajouter :
Nitrate ferrique (NO₃)₃ Fe, 9H₂O.....40g
HCl 1N120 ml
Ce réactif est stable indéfiniment

*Solution aqueuse étalon de salicylate de sodium (réactif II):

– Salicylate de sodium.....580mg
– Eau distillée.....250 ml
– Chloroforme.....1 ml

la concentration de cette solution en acide salicylique est de 2g/l.
Elle se conserve plusieurs mois à +4°C au réfrigérateur.

II – Etude spectroscopique

Le spectrophotomètre mesure l'absorbance (A) d'une solution pour une longueur d'onde donnée. Elle varie en fonction de la concentration en suivant **la loi de Beer-Lambert: $A = k \times C$** . Cette formule indique une relation linéaire entre l'absorbance et la concentration ce qui implique que la courbe d'étalonnage est une droite et peut donc être tracée avec un nombre limité de points.

Après la préparation des 2 réactifs, on prépare une gamme d'étalon pour doser l'acide acétylsalicylique.

La solution étalon de salicylate de sodium est diluée au 1/5 dans l'eau distillée (Réactif III)



Figure 11 : gamme d'étalon de l'acide acétylsalicylique

On Prépare comme suit une gamme étalon:

	Tube 1 (Témoin)	Tube 2	Tube 3	Tube 4	Tube 5	Tube 6
Réactif III	00	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Eau distillée	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0
Réactif I	5	5	5	5	5	5
[C] acide acétylsalicylique en mg/l	12.32	60.33	80.17	93.12	120	153.05

Agiter;
Attendre 5 min;
Centrifuger;
Attendre 20 min;
Lire les DO au spectrophotomètre à 530 nm.
Déduire la courbe d'étalonnage.

Dosage des salicylates

A partir de la courbe d'étalonnage : on a recueilli le sang sur héparine puis on a opéré sur le plasma ou le sang total.

Ensuite dans un tube à centrifuger on introduit

- Plasma ou sang total.....1 ml
- Réactif de Trinder5 ml
- Agiter;
- Attendre 5 min;
- Centrifuger;
- Attendre 20 min;
- Centrifuger;
- Prélever le liquide surnageant;
- Lire au spectrophotomètre à 530 nm ;
- Déduire d'après la courbe d'étalonnage la concentration en mg/l de votre échantillon.

A partir de la méthode des trois points.

Dans des tubes à centrifuger de 10 ml, placer:

	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Eau distillée	2ml	1ml	-
Plasma ou urines (éventuellement diluée)	-	1ml	1ml
Solution étalon	-	-	1ml
Réactif Trinder	5ml	5ml	5ml

- Agiter;
- Attendre 5 min;
- Centrifuger;
- Attendre 20 min;
- Prélever le liquide surnageant;
- Mesurer rapidement les Do au spectrophotomètre à 530 nm (Zéro de Do à faire sur le tube N°1)

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I- Résultats

Sachant que la concentration en mg d'acide acétylsalicylique/l est:
(153.05* DO2)/ (DO3-DO2) (DO: Densité optique)

Les résultats de la validation sont obtenus à l'aide de l'EXCEL, en se basant sur les tableaux suivants :

Concentration étalons mg/l		Absorbance				Moyenne
		Rép1	Rép2	Rép 3	Rép4	
Solution mère	153.05	2.162	2.548	2.464	2.46	2.454
Dilution 1/2	76.52	1.424	1.352	1.483	1.544	1.451
Dilution 1/4	38.26	0.781	0.71	0.933	0.813	0.809
Dilution 1/8	19.13	0.465	0.465	0.525	0.547	0.501
Dilution 1/16	9.56	0.241	0.26	0.332	0.345	0.295
Dilution 1/32	4.78	0.147	0.121	0.26	0.248	0.194

A partir de ce tableau, on a pu tracer le graphe (Figure 12) qui représente la moyenne des densités optique en fonction de la concentration de l'acide acétylsalicylique

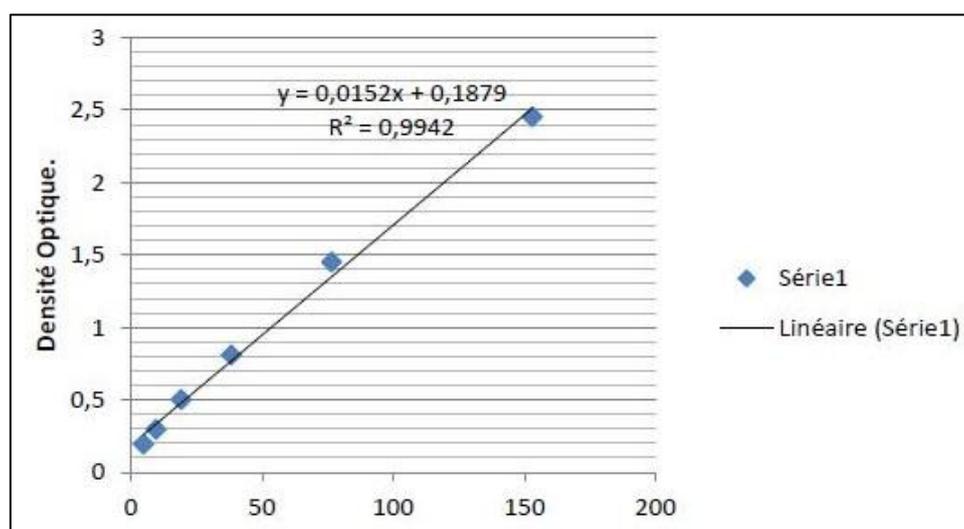


Figure 12 : Courbe de la linéarité de l'acide acétylsalicylique: la moyenne des densités optiques en fonction de la concentration

II Calcul des paramètres de performance

1- Sensibilité

D'après la courbe (figure 12) obtenue à partir de la gamme d'étalon

On a : $y = ax+b$ $y = 0,0152+0,1879$ Donc : $a = 0,0152$

A partir de l'équation que nous avons trouvé dans la partie résultat :

$y = 0,0152+0,1879$ nous indique que la pente $a = 0,0152$, ça veut dire quand x (concentration) augmente de 1, y (absorbance) augmente de $a = (0,0152)$.

2- Linéarité :

On effectue un étalonnage basé sur 6 concentrations $n = 6$, chaque étalon donne lieu à 4 mesures de l'absorbance $K=4$ (Figure 12).

Pour s'assurer de la linéarité nous avons appliqué le test de Dixon.

Application du test de Dixon sur ces résultats :

Puisqu'on a réalisé quatre mesures ($3 \leq n \leq 7$), on calcule les valeurs de r_{10} pour les comparer à la valeur critique donnée par la table de Dixon à un degré de signification ($\alpha=0,05$).

Dans notre cas $n=6$ niveaux de concentration :

Pour le premier niveau de concentration (153.05 mg/l) les absorbances obtenues :

$$2,162 \leq 2,464 \leq 2,548 \leq 2,640 \quad r_{10} = \frac{2.640 - 2.548}{2.640 - 2.162} = 0.192$$

Pour le deuxième niveau de concentration (76.52 mg/l) les absorbances obtenus

$$1,352 \leq 1,424 \leq 1,483 \leq 1,544 \quad r_{10} = \frac{1.544 - 1.483}{1.544 - 1.523} = 0.317$$

Pour le deuxième niveau de concentration (38.26 mg/l) les absorbances obtenus

$$0,710 \leq 0,781 \leq 0,813 \leq 0,933 \quad r_{10} = \frac{0.933 - 0.813}{0.933 - 0.710} = 0.538$$

Pour le deuxième niveau de concentration (19.13 mg/l) les absorbances obtenus

$$0,465 \leq 0,525 \leq 0,547 \quad r_{10} = \frac{0.933 - 0.813}{0.933 - 0.710} = 0.268$$

Pour le deuxième niveau de concentration (9.56 mg/l) les absorbances obtenus

$$0,241 \leq 0,260 \leq 0,332 \leq 0,345 \quad r_{10} = \frac{0.260 - 0.248}{0.260 - 0.121} = 0.125$$

Pour le deuxième niveau de concentration (4.78 mg/l) les absorbances obtenus

$$0,121 \leq 0,147 \leq 0,248 \leq 0,260 \quad r_{10} = \frac{0.260 - 0.248}{0.260 - 0.121} = 0.086$$

D'après la table de DIXON : $r_{crit}=0,56$ avec $\alpha=5\%$ et $n=6$.

Pour les six niveaux de concentration, on remarque que r_{crit} est sup à r_{10}
Le test de Dixon atteste qu'aucun extrême n'est aberrant.

La linéarité de la méthode est obtenue entre 153,05 et 4,78 mg/l. La courbe d'étalonnage représente une droite qui montre que les deux variables (concentration et absorbance) sont proportionnelles.

Le test de Dixon nous a permis d'apprécier la linéarité de la courbe.

La réalisation de ce test à donné que notre courbe ne contient aucun point aberrant.

3- Répétabilité

La répétabilité consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon pour le même analyte dans des conditions identiques. L'exploitation de ces résultats consiste à calculer la moyenne (X), l'écart-type (s) et le coefficient de variation(CV) représentés par le Tableau suivant :

Concentration étalons mg/l		Absorbance				Moyenne	Ecart type	Coefficient de variation
		Rép1	Rép2	Rép 3	Rép4			
Solution mère	153.05	2.162	2.548	2.464	2.46	2.454	0.207	8.455
Dilution 1/2	76.52	1.424	1.352	1.483	1.544	1.451	0.082	5.656
Dilution 1/4	38.26	0.781	0.71	0.933	0.813	0.809	0.093	11.498
Dilution 1/8	19.13	0.465	0.465	0.525	0.547	0.501	0.042	8.384
Dilution 1/16	9.56	0.241	0.26	0.332	0.345	0.295	0.052	17.544
Dilution 1/32	4.78	0.147	0.121	0.26	0.248	0.194	0.070	36.217

La répétabilité faite sur la même solution de L'acide acétylsalicylique dans des conditions identiques .Les coefficients de variation obtenus entre 8,445 et 36,217. Puisque la valeur du coefficient de variation est supérieure à 15 %, on considère que les données sont hétérogènes.

4-Limite de détection :

Pour calculer de la limite de détection on applique cette formule : $LD = 3,3 \times \frac{\sigma}{S}$

Avec : $\sigma = \frac{0.207+0.082+0.093+0.042+0.052+0.070}{6} = 0.091$ et $S = 0.015$

Soit Donc $LD = 3,3 \times \frac{\sigma}{S} = 3,3 \times \frac{0.091}{0.015} = 20.02 \mu\text{g}$

Nous pouvons conclure que $LD = 20,02\mu\text{g}$ c'est la plus faible concentration de L'acide acétylsalicylique qu'il est possible de détecter, mais pas nécessairement de doser, à l'aide d'une méthode spécifique.

5- Limite de quantification

Pour calculer de la limite quantification on applique cette formule : $LQ = 10 \times \frac{\sigma}{S}$

Soit Donc $LQ = 10 \times \frac{\sigma}{S} = 10 \times \frac{0.091}{0.015} = 59.86 \mu\text{g}$

Nous pouvons conclure que $LQ = 59,86\mu\text{g}$ c'est la concentration minimale de L'acide acétylsalicylique qui peut être quantifiée à l'aide d'une méthode d'analyse avec une fiabilité définie.

6- coefficient de détermination

A partir du graphe nous avons déduit : $r^2 = 0.9942$

$r^2 = 0,9942$ ce qui signifie que 99,42% de la variation totale de y peut être expliquée par la relation linéaire entre x (concentrations) et y (absorbance), le reste qui s'évalue à 0,58% de la variation totale, demeure inexplicable

Autrement dit si la ligne est confondue aux points tels qu'ils sont tracés l'explication de la variance serait donc plausible. Au contraire si la ligne est loin d'être confondue avec les dits points, l'explication serait alors ambiguë.

7- Coefficient de corrélation

Nous avons appliqué la formule suivante :

$$r = \sqrt{\text{coefficient de détermination}} = \sqrt{0.9942} = 0.9970$$

Nous avons trouvé un coefficient de corrélation égal à 0,9970 comme étant une valeur positive ce qui signifie que x et y évoluent dans la même sens, autrement dit, une augmentation de x (concentrations) entrainerait simultanément une augmentation de y (absorbance).

CONCLUSION

Dans le but de raccourcir la durée et d'améliorer l'efficacité des traitements de certaines maladies et de réduire leurs coûts, le laboratoire du CHU de Fès ne cesse de chercher de nouvelles techniques et d'améliorer celles préexistantes. C'est dans ce sens que ce travail s'est porté sur la technique du dosage de l'acide acétylsalicylique afin de l'enrichir.

L'apport de ce travail consistait à valider la technique du dosage de l'acide acétylsalicylique par spectrophotométrie Uv-Visible. Ce dosage à pour but de rendre le traitement plus efficace en diminuant de la gravité des effets indésirables de ces médicaments et aussi pour une meilleure adaptation de la dose administrée.

BIBLIOGRAPHIE

1. Lechat et al, 1982 Centre Belge d'information pharmacothérapeutique Répertoire commenté des médicaments. Bruxelles
2. Rang et Dale, 1991 Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data Analysis: Concepts and Applications
3. Cohen, 1997 Overview of in vitro cell culture technologies and pharmacotoxicological applications
4. Ngabonziza, 2003 Goldblatt M.W.(1935). Properties of human seminal plasma. (texte integral en anglais au format PDF)
5. Von Euler US (1935). "Über die spezifische blutdrucksenkende Substanz des menschlichen Prostata- und Samenblasensekrets". (texte integral en allemand au format PDF).
6. RANG H. P. et DALE M. M. (1991). *Pharmacology, 2th Edition*. Churchill Livingstone, London
7. SADO P. A. (1990). *Pharmacie clinique générale*. Edition MEDSI/MC RAW-HILL

WEBOGRAPHIE

<http://culturesciences.chimie.ens.fr/content/laspirine-825>

http://www.memoireonline.com/12/09/2945/m_Investigation-sur-lusage-abusif-du-paracetamol-et-de-laspirine-au-Rwanda-cas-de-la-ville-de-B16.html

https://fr.wikipedia.org/wiki/Acide_ac%C3%A9tylsalicylique

<http://www.ac-nancy-metz.fr/pres-etab/varoq/aspirine/aspi2.htm>

http://fr.wikipedia.org/wiki/Acide_ac%C3%A9tylsalicylique

<http://www.linternaute.com/science/biologie/comment/06/aspirine/aspirine.shtml>