

TP 04 : Dosage d'un principe actif dans un médicament par chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Objectifs :

L'objectif est de réaliser le dosage de principes actifs dans des comprimés de différents dosages.

- Panadol extra : 500 mg de Paracétamol / 65 mg caféine (comprimé)
- Doliprane (Laboratoire SANOFI) : 1000 mg de paracétamol/comprimé



1. Définitions :

La Chromatographie Liquide Haute Performance :

L'HPLC (ou chromatographie en phase liquide haute performance) est une technique d'analyse séparative, basée sur la migration différentielle des composés dans une colonne supportant les hautes pressions. Elle permet l'identification, la séparation et le dosage de composés chimiques dans un mélange.

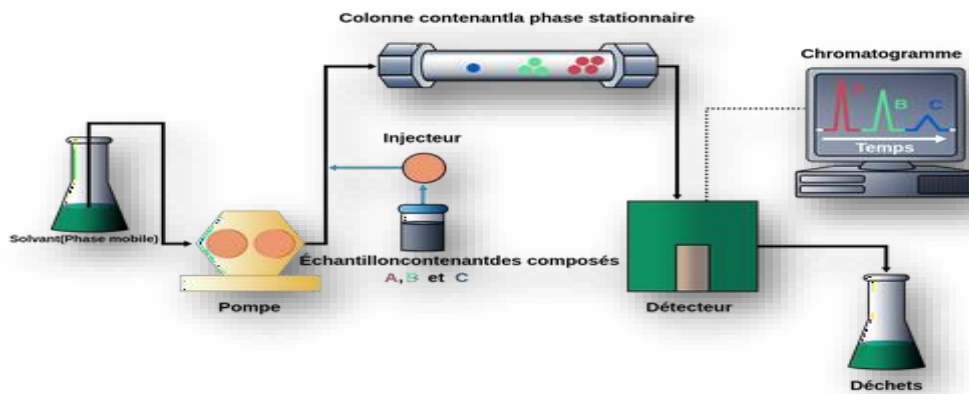
Les interactions responsables de la rétention et de l'éluion des composés ont lieu entre :

- L'échantillon à analyser
- La phase mobile : Φ_M
- La phase stationnaire : Φ_s

- ✚ La phase mobile ou éluant : est un liquide qui entraîne les solutés à travers la colonne.
- ✚ La phase stationnaire : est un support plus ou moins poreux recouvert d'un gel de silice greffé par une phase apolaire (C18) qui a les propriétés désirées pour retenir les molécules de solutés.

➤ **Principe de Chromatographie Liquide Haute Performance :**

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans la colonne chromatographique. La phase mobile, poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés se répartissent en fonction de leur affinité relative entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne, grâce à un détecteur approprié, les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés constitue le chromatogramme.



➤ **Les équipements de Chromatographie Liquide Haute Performance :**

✓ Réservoir de la phase mobile (solvant) :

Elle contient la phase mobile (éluant) en quantité suffisante.

✓ Pompe :

Elle délivre en continu la phase mobile. Elle est définie par la pression qu'elle permet d'atteindre dans la colonne, son débit, et la stabilité du flux.

✓ Injecteur :

C'est un injecteur à boucles d'échantillonnage. Il existe des boucles de différents volumes, nous utiliserons une boucle de 20µL. Le choix du volume de la boucle se fait en fonction de la taille de la colonne et de la concentration supposée des produits à analyser. Le système de la boucle d'injection permet d'avoir un volume injecté constant, ce qui est important pour l'analyse quantitative.

✓ Colonne :

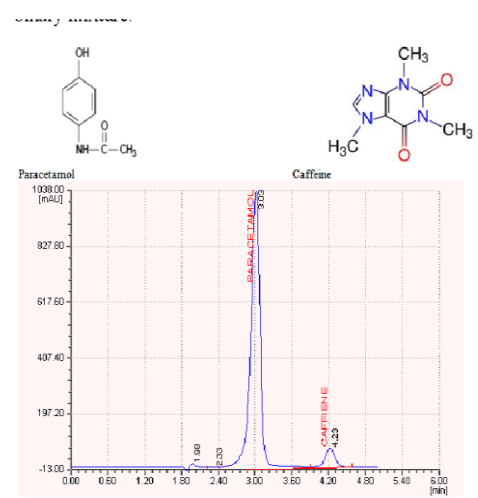
Elle est un tube construit dans un matériau le plus possible inerte aux produits chimiques, souvent en inox ou en verre. Sa section est constante, de diamètre compris entre 4 et 20 mm pour des longueurs généralement de 15 à 30 cm.

✓ Déteurur :

Un des détecteurs les plus utilisés est le détecteur UV-visible (utilisé dans ce TP) : il mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne.

✓ Système d'intégration :

Dans ce système, les données sont collectées par l'intermédiaire soit d'une intégration ou d'une station d'acquisition. Le signal transmis par le détecteur sera traduit sous forme d'un chromatogramme.



Conditions expérimentales suivies en HPLC :

Tableau 01: Conditions expérimentales suivies en HPLC

| | |
|---|--|
| Colonne (Phase stationnaire-chromatographie en phase inverse) | Gel de silice, C18 (250 mm×4,6mm, 5µm) |
| Débit | 1 mL/min |
| Température | 40°C |
| Longueur d'onde | 254 nm (Paracétamol et Caféine) |
| Volume d'injection | 10 µL |
| Phase mobile (mode isocratique) | Eau : 60 % Méthanol : 40 % Acide acétique : 0,1 % (v/v) ajouté à la phase aqueuse |
| Temps d'acquisition | 8 min |

➤ **Préparation de la solution standard :**

Introduire dans une fiole jaugée de 100 mL : 65 mg de caféine et 500 mg de paracétamol.

Dissoudre ces principes actifs dans la phase mobile qui est utilisée comme diluant, dans un bain à ultrasons jusqu'à dissolution complète.

➤ **Préparation des solutions essais :**

Peser 10 comprimés afin de déterminer la masse moyenne, puis les réduire en poudre à l'aide d'un mortier.

Peser une quantité de poudre contenant l'équivalent de 500 mg dans une fiole de 100 mL.

Dissoudre cette poudre dans l'éluant. Mettre dans un bain à ultrasons. Filtrer la solution.

Questions

1. **Calculer la masse de chaque principe actif dans un comprimé à partir des résultats expérimentaux.**
2. **Quelle molécule est la plus retenue par la phase stationnaire ? Justifier en se basant sur la polarité des composés et la nature de la colonne.**
3. **Quel est le mécanisme de séparation en HPLC (partage, adsorption...) ? Expliquer le rôle des interactions entre soluté, phase mobile et phase stationnaire.**
4. **Donner l'ordre d'élution attendu du Paracétamol et de la caféine**
 - en mode inverse
 - en mode normal

Justifier votre réponse en fonction de la polarité des molécules et des phases.

5. **Comment appelle-t-on la méthode chromatographique utilisée dans ce TP ?**
6. **Dans quels types d'analyses utilise-t-on la HPLC en phase inverse ? Donner au moins deux exemples concrets.**
7. **Pourquoi la HPLC est-elle largement utilisée dans l'analyse des médicaments ? Donner au moins trois avantages.**