

Chapitre 2

Méthodes de dosage de la vitamine D

1. Dosage de la vitamine D par RP-HPLC

1.1. Principe de la méthode

Pour réaliser une séparation d'un mélange on le fait diluer dans un solvant approprié, puis on injecte un volume connu dans le système chromatographique à travers la boucle d'injection. Les composés du mélange sont transportés par la phase mobile dont laquelle ils sont solubles vers la colonne siège de la phase stationnaire. Sous l'influence des deux effets antagonistes : effet d'entraînement exercé par la phase mobile, effet de rétention exercé par la phase stationnaire, les constituants du mélange se déplacent à des vitesses différentes et sont séparés. Cette séparation est basée sur la différence d'affinité des composés du mélange vis à vis de la phase stationnaire, le constituant qui a plus d'affinité sera le plus retenu.

Au niveau de détecteur, chaque composé du mélange sortant de la colonne est détecté donnant un signal, ce dernier est enregistré par le système de traitement des données sous forme d'un pic. L'ensemble des pics forme un chromatogramme [19].

1.2. Description du système RP-HPLC utilisé



Figure 2.1: Système RP-HPLC du laboratoire de recherche « Spectrochimie et Pharmacologie Structurale ».

Le système se compose de :

➤ **Réservoirs de la phase mobile**

Les solvants utilisés comme phase mobile en chromatographie de partage sur phase stationnaire apolaire, doivent répondre aux certains exigences qui sont comme suit :

❖ Pureté

La phase mobile est un solvant ou mélange de solvants qui doit être de pureté analytique et filtré pour éliminer les particules solides qui risqueraient d'endommager la pompe ou de bloquer la colonne. Le filtre, en acier inoxydable d'une porosité de 2 μm , est placé à l'extrémité dans le réservoir à solvant.

❖ Compatibilité avec le système de détection

Il faut utiliser des solvants qui n'absorbent pas à la même longueur d'onde que l'analyte. Les limites de détection des solvants utilisés comme phase mobile dans l'étude de la vitamine D, sont très inférieures à 265 nm qui est la longueur d'onde maximale d'absorption de la vitamine D.

❖ Miscibilité des solvants

Si la phase mobile est constituée d'un mélange de solvants, ceux-ci doivent être complètement miscibles. En plus le soluté à séparer doit y être soluble.

➤ **Dégazeur DGU-14A, N°228-35359-9, Shimadzu**

Afin d'assurer une analyse stable à tout moment, la phase mobile devra être dégazée. La phase mobile passe à travers une tuyauterie spéciale faite de filme de résine.

Le dégazage est très réalisé par réduction de la pression entourant cette tuyauterie. Cet élément peut dégazer séparément, jusqu'à 4 lignes.

➤ **Unité de gradient FCV-10ALvp, Shimadzu, N°228-39500-91**

Elle permet de réduire au minimum le volume mort et le délai de gradient. Autant que possible, l'unité devrait être installée avant la pompe. L'unité de gradient basse pression peut commuter jusqu'à 4 phases mobiles.

➤ **Pompe LC-10ADvp, Shimadzu**

C'est une pompe d'échange à deux têtes ayant de petites chambres (10µL. par course). Cette pompe permet de déplacer la phase mobile avec deux pistons qui fonctionnent en alternance, et des clapets anti retour, qui sont synchronisés avec la commande de piston pour remplir et vider la phase mobile de chaque chambre. Elle doit être inerte à la corrosion des solvants utilisés, offrir un bon choix de débits et être conçue pour réduire les pulsations au minimum. Cette pompe peut livrer un débit constant de 0.001 à 9.999 mL par minute, avec des pressions allant de 10 à 392 bars. La gamme de température de fonctionnement est de 4 à 35°C.

➤ **Mixeur, N°228-28000-91**

Il s'agit d'un accessoire qui permet de mélanger efficacement la phase mobile dans la cas d'élution en mode gradient.

➤ **Injecteur**

Comme la pression dans le circuit pompe-colonne est très élevée, on utilise un moyen indirect pour introduire l'échantillon à l'entrée de la colonne. Celui-ci est d'abord introduit à l'aide d'une seringue dans un injecteur à boucle externe, cette boucle contient deux positions :

❖ Load (charger) :

On injecte toujours un volume supérieur à celui de la boucle, en prenant soin de ne pas introduire de bulles d'air dans la boucle. L'excès du liquide injecté est évacué par l'ouverture de vidange.

❖ Inject (injecter)

En tournant la valve vers cette position, seul le contenu de la boucle est dirigé en tête de colonne à travers la phase mobile. Dans cette position, on peut rincer les canaux des déviations de la vanne ; le solvant du lavage est évacué par une autre ouverture de vidange.

Cette méthode d'injection a l'avantage de donner des résultats très reproductibles d'une injection à l'autre.

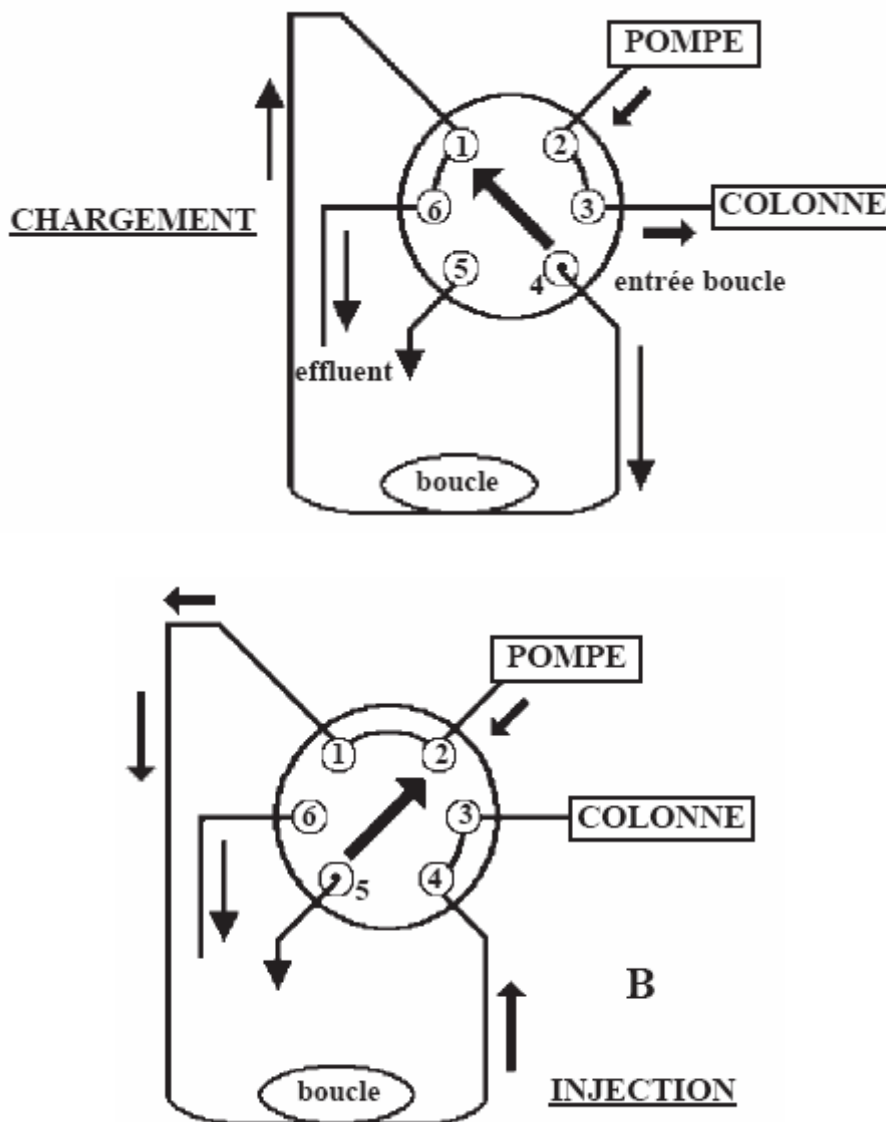


Figure 2.2 : Schéma simplifié d'une vanne à boucle externe et de son fonctionnement [21].

➤ **Colonne de garde**

Une colonne de garde peut être placée entre le dispositif d'injection et la colonne analytique. Comme son nom l'indique, cette dernière est utilisée pour protéger la colonne analytique contre la perte d'efficacité, qui peut être provoquée par la présence de matière particulaire. Elle doit être remplie avec la même phase stationnaire que celle de la colonne analytique.

➤ Colonne analytique RP-HPLC

Elle est constituée par un tube en acier inoxydable rempli par une phase stationnaire, qui se compose de greffons organiques apolaire (octadécyle C18), fixés sur particules de silice. C'est une phase inverse, RP-HPLC (Reversed Phase – High performance Liquid Chromatography). La qualité de la séparation dépend de la géométrie de la colonne, de la granulométrie des particules qui constituent la phase stationnaire et de la quantité du remplissage. Cet élément représente le noyau du système chromatographique. Les caractéristiques de la colonne utilisée sont les suivants :

Longueur = 25 cm.

Diamètre interne = 4.6 mm.

Diamètre des particules = 5 μ m.

➤ Détecteur SPD-10Avp, Shimadzu

C'est un détecteur UV-Visible, dispersif à longueur d'onde variable, Il mesure l'absorbance pendant l'élution de l'échantillon de la colonne. Il offre deux modes de détection, détection à longueur d'onde fixe ou détection en mode duel, la source utilisée est une lampe de Deutérium, elle fournit la gamme de longueur d'onde 190 à 600 nm. La longueur de chemin optique de la cellule est 10 mm, et son volume est 8 μ L. La température de fonctionnement est 4 à 35°C.

➤ Système de traitement des données

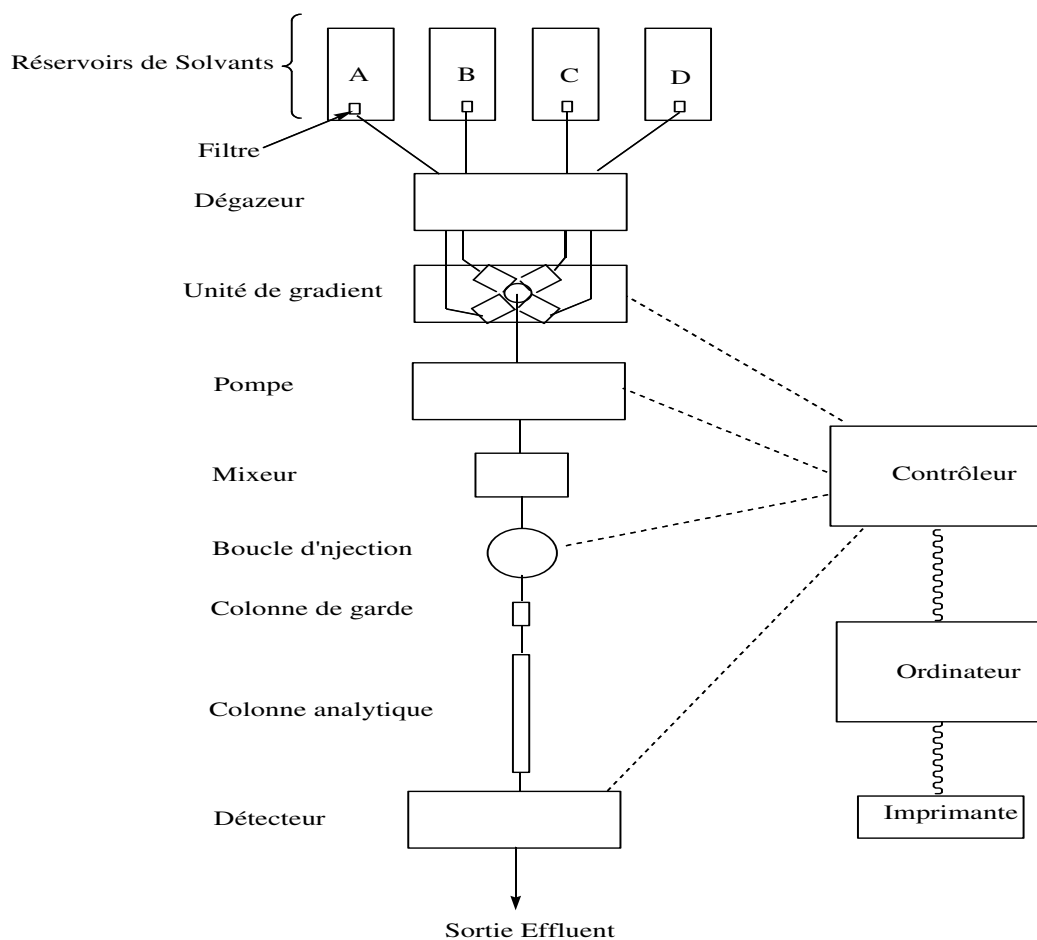
C'est un ordinateur menu du logiciel LC Solution. Celui-ci permet d'enregistrer et de visualiser le signal de sortie du détecteur du système HPLC. Les données traitées peuvent être imprimées. Le logiciel LC Solution offre deux types d'applications qui intègrent la plupart des fonctions pour l'analyse : analyse en temps réel et analyse en différé :

❖ Analyse en temps réel (LC Real time analysis) :

Elle nécessite la mise en marche du système, et le contrôle en mode software grâce au logiciel LC Solution.

❖ Analyse en différé (Post-run analysis) :

L'analyse est effectuée sans que le système soit relié. Cette option permet d'éditer des dossiers de méthodes ou des fichiers séquentiels pendant l'acquisition des données.



- Cheminement de la Phase mobile
- Contrôle du système
- ~~~~~ Aquisition et Traitement des données

Figure 2.3 : Diagramme du système HPLC utilisé [21].

1.3. Mise en marche du système HPLC

- Vérifier les solvants
- Mettre sous tension les compartiments du système dans l'ordre suivant :
 - ✓ Dégazeur.
 - ✓ Pompe.
 - ✓ Détecteur.
 - ✓ Contrôleur.
- Mettre en marche le PC pour connecter le système et passer au contrôle software à l'aide du logiciel LC Solution.
- Ouvrir la méthode d'analyse ou en crée une, en entrant les paramètres suivants :
 - ✓ Mode d'élution et débit.
 - ✓ Proportion des solvants dans le cas du mode gradient.
 - ✓ Temps d'analyse (temps d'acquisition).
 - ✓ Longueur d'onde et atténuation.
 - ✓ Enregistrement de la méthode.
- Mettre en marche la pompe.
- Purger le circuit si nécessaire.
- Vérifier la stabilité de la ligne de base.
- Analyse par simple injection (Utilisée dans les tests préliminaires et d'optimisation).
 - ✓ Charger l'échantillon dans la boucle d'injection.
 - ✓ Ouvrir la fenêtre de dialogue « single run » en introduisant les données sur la nature de l'échantillon (inconnue ou étalon...).
 - ✓ Injecter l'échantillon.
- Analyse par lot (utilisée dans le cas des injections répétées, permet de commander les injections automatiquement).
 - ✓ Utiliser l'option « batch processing » (traitement par lot) et la fenêtre du dialogue Wizard pour commander les étapes suivantes.
 - ✓ Entrer les données nécessaires (nature de l'échantillon...).
 - ✓ Fermer la fenêtre de dialogue et exécuter le lot.

2. Analyse quantitative par Chromatographie Liquide Haute Performance RP-HPLC

2.1. Principe

L'analyse quantitative en chromatographie à phase liquide est essentiellement une méthode comparative, elle est basée sur la relation reliant l'aire (A_i) ou la hauteur (H_i) du pic de l'analyse à sa concentration. Cette relation est établie par le détecteur qui mesure les variations des signaux selon les équations suivantes :

$$C_i = K_i \cdot A_i$$

$$C_i = K_i \cdot H_i$$

Avec

K_i : coefficient de réponse du détecteur.

La stabilité des conditions d'analyse laisse le coefficient constant, ce qui donne linéarité entre la variation des paramètres et les différentes concentrations de l'analyte. Cette linéarité est la base des différentes méthodes qui permettent la détermination de la concentration d'un échantillon inconnu. Parmi ces méthodes, la méthode d'étalonnage qui est la plus utilisée en CPL. Son principe est de tracer une courbe représentant la variation de signal (aire ou hauteur) en fonction de la quantité d'analyte.

Cette courbe est traduite par l'équation :

$$y = a \cdot x + b$$

a : pente de la droite.

b : ordonné à l'origine.

2.2. L'étalonnage externe

Consiste à réaliser l'injection d'un volume reproductible et identique des solutions étalons, préparées avec des concentrations bien précises à partir du l'étalon de pureté connu. Les valeurs des aires des pics correspondants à chaque concentration sont représentées sur une droite d'étalonnage d'équation de type :

$$A_r = f(C_r)$$

Si cette droite est linéaire, son équation peut être écrite comme suit :

$$A_{\text{ét}} = a \cdot C_{\text{ét}} + b$$

Où :

$A_{\text{ét}}$: Aire du pic de l'étalon pur.

$C_{\text{ét}}$: Concentration de l'étalon pur.

a : pente de la droite.

b : ordonnée à l'origine.

Pour déterminer la concentration de l'analyte dans un échantillon inconnu, il suffit d'injecter le même volume de celui-ci après traitement, et dans les mêmes conditions. La concentration $C_{\text{éch}}$ est calculée à partir de l'aire de pic obtenu ($A_{\text{éch}}$) par deux manières :

- ✓ Soit par l'équation de la droite suivante la relation : $C_{\text{éch}} = \frac{A_{\text{éch}} - b}{a}$
- ✓ Soit par projection de la valeur d'aire sur la droite en utilisant un logiciel approprié.

La précision des résultats dépend :

- ✓ Des pesées de la substance de référence et de l'échantillon.
- ✓ Des dilutions
- ✓ De la reproductibilité du volume de l'injection.

L'avantage de la méthode est que le volume de l'injection n'a pas une grande importance à condition qu'il demeure constant lors de l'étalonnage et l'analyse dans des conditions chromatographiques strictement invariantes.

2.3. L'étalonnage interne

Consiste à ajouter une espèce appelée étalon interne aux solutions étalons et à l'échantillon. Ces solutions sont préparées à partir de la substance de référence, auxquelles on a ajouté une quantité connue constante de l'étalon interne. On injecte ces mélanges dans le système chromatographique, on construit la courbe d'étalonnage en portant en ordonnée le rapport d'aire de l'analyte $A_{ét}$ sur celui de l'étalon interne A_{int} , et en abscisse le rapport des concentrations de l'analyte $C_{ét}$ et l'étalon interne C_{int} . Cette courbe est introduite par l'équation :

$$\frac{A_{ét}}{A_{int}} = f \left(\frac{C_{ét}}{C_{int}} \right)$$

Si cette droite est linéaire, son équation peut être comme suit :

$$\frac{A_{ét}}{A_{int}} = a \cdot \frac{C_{ét}}{C_{int}} + b$$

Où :

A_{int} : Aire du pic de l'étalon interne.

C_{int} : Concentration de l'étalon interne.

a : pente de la droite

b : ordonnée à l'origine.

Pour avoir la concentration de l'analyte dans l'échantillon inconnu, on ajoute une quantité connue de l'étalon interne lors de traitement de cet échantillon, puis on réalise une injection d'un volume reproductible dans les mêmes conditions de l'étalonnage. La concentration $C_{éch}$ est déterminée à partir des deux aires obtenues ($A_{éch}$ et $A_{int(éch)}$) suivant la relation :

$$C_{éch} = \frac{\left(A_{éch} / A_{int(éch)} \right) - b}{a} \times C_{int(éch)}$$

Où :

$A_{\text{int(éch)}}$: Aire du pic de l'étalon interne ajouté à l'échantillon.

$C_{\text{int(éch)}}$: Concentration de l'étalon interne ajouté à l'échantillon.

Cette méthode est dépend uniquement de la précision des pesées. Contrairement à la méthode par étalonnage externe ; elle ne dépend pas ni de précision des dilutions ni de volume injecté, elle permet de s'affranchir de l'erreur commise sur ce volume.

En revanche, c'est une méthode laborieuse qui oblige à rechercher un étalon interne dont l'élution est compatible avec l'analyse envisagée, ce qui exige :

- Qu'il soit d'une pureté connue et chimiquement inerte avec les solutés et la phase mobile.
- Qu'il ait un temps de rétention différent de tous les constituants de l'échantillon, mais le plus proche possible de la substance à déterminer.
- Que son coefficient de réponse pour le détecteur soit du même ordre de grandeur que celui du produit à déterminer.
- Qu'il ne soit pas présent comme impureté dans l'échantillon.
- Qu'il soit ajouté à une concentration qui donne une aire de pic sensiblement équivalent à celle du produit à déterminer

2.4. Détermination du degré de pureté de cholécalciférol (D3)

L'analyse quantitative d'une substance repose sur l'utilisation de cette dernière en grande pureté comme étalon, elle est fournie par des laboratoires spécialisés avec un degré de pureté de l'ordre $\geq 97\%$, mais ce degré est influencé par les conditions de commercialisation et de stockage donc il est nécessaire de vérifier. Le test est effectué par la chromatographie à phase liquide. Le degré de pureté de chaque substance sera utilisé dans le calcul des concentrations de leurs solutions. Ce facteur est déterminé selon l'équation suivante :

$$d = \frac{A_x}{\sum_i^n A_i}$$

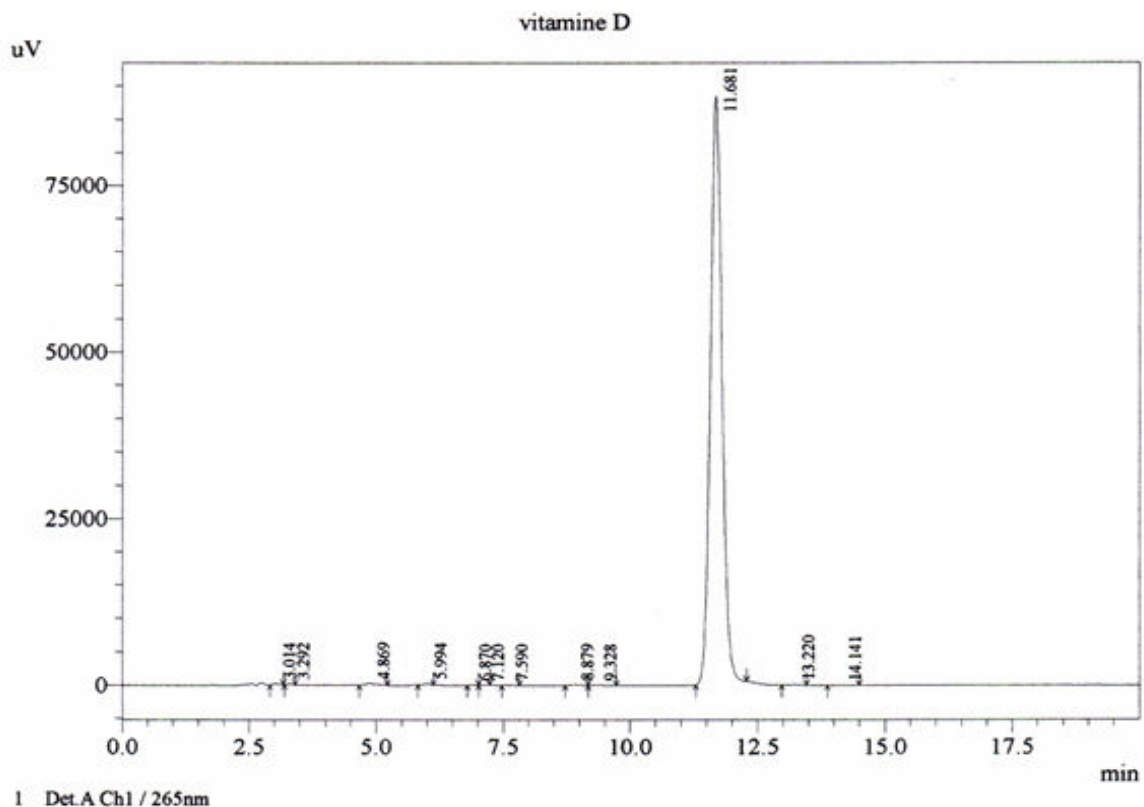
Où :

d : Degré de pureté.

A_x : Air du pic de la substance à analyser.

A_i : Air des pics de i substances détectés.

Le cholécalciférol (D3) est obtenu de la pharmacie, fabriquée par le laboratoire HauptPharma Livron. Le produit est commercialisé sous forme des ampoules injectable de 200000 UI. Pour préparer des solutions stocks on fait diluer le contenu dans 10 ml d'éthanol pur puis prélever 0.2ml et compléter à 10 ml d'éthanol. On mesure l'absorbance de cette solution par le spectrophotomètre UV-Visible. Le degré de pureté est déterminé par l'injection d'une solution concentrée. Le chromatogramme de l'étalon obtenu est comme suit :



PeakTable

SPD-10Avp Ch1 265nm

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|-------|-----------|---------|--------|---------|----------|
| 1 | 3.014 | 1450 | 180 | 0.104 | 0.201 |
| 2 | 3.292 | 1007 | 189 | 0.072 | 0.211 |
| 3 | 4.869 | 4464 | 327 | 0.320 | 0.365 |
| 4 | 5.994 | 1655 | 221 | 0.119 | 0.246 |
| 5 | 6.870 | 296 | 44 | 0.021 | 0.049 |
| 6 | 7.120 | 347 | 49 | 0.025 | 0.055 |
| 7 | 7.590 | 532 | 58 | 0.038 | 0.065 |
| 8 | 8.879 | 1614 | 119 | 0.116 | 0.133 |
| 9 | 9.328 | 652 | 42 | 0.047 | 0.047 |
| 10 | 11.681 | 1381682 | 88212 | 99.016 | 98.508 |
| 11 | 13.220 | 1441 | 89 | 0.103 | 0.099 |
| 12 | 14.141 | 278 | 18 | 0.020 | 0.021 |
| Total | | 1395419 | 89548 | 100.000 | 100.000 |

Figure 2.4: Chromatogramme obtenu par injection d'une solution de cholécalférol (D3).

2.5. Identification du pic de cholécalférol dans l'échantillon de plasma

L'identification est réalisée par HPLC, le principe est basé sur la comparaison de temps de rétention du pic de l'analyte dans l'échantillon de plasma avec celui de l'étalon pur.

➤ Procédure

- Traiter 50µl d'un plasma, avec 200 µl de mélange C₂H₅OH/CH₃COOC₂H₅ (1 : 1), puis on injecte un volume de 100µl dans le système chromatographique dans les conditions suivantes :
- Mode d'élution : gradient linéaire.
- Phase mobile : (70%CH₃OH ; 30%CH₃CN).
- Débit 1.5 ml/mn
- Détection : à $\lambda = 265$ nm, atténuation à 0.005 AUFS.
- Temps d'acquisition : 10 mn.
- La température de la salle est de 29°C.

Le chromatogramme suivant représente la comparaison des pics obtenus :

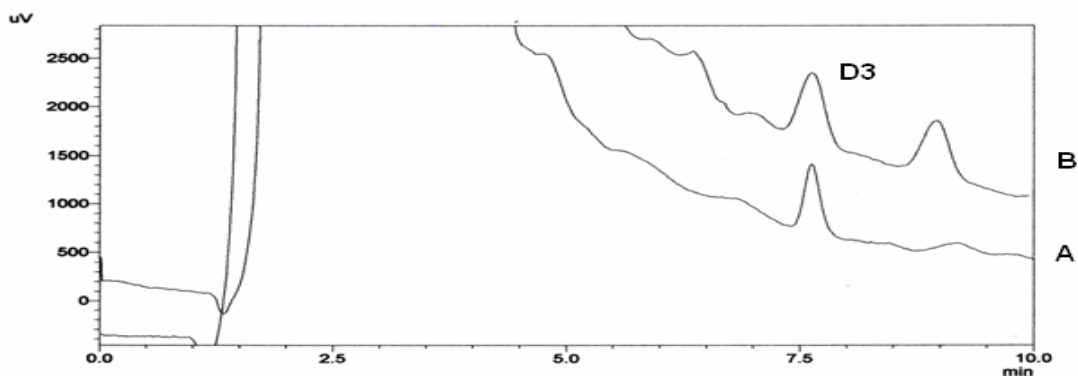


Figure 2.5 : Identification du pic de cholécalférol (D3).

A : étalon pur. **B :** Echantillon de plasma traité.