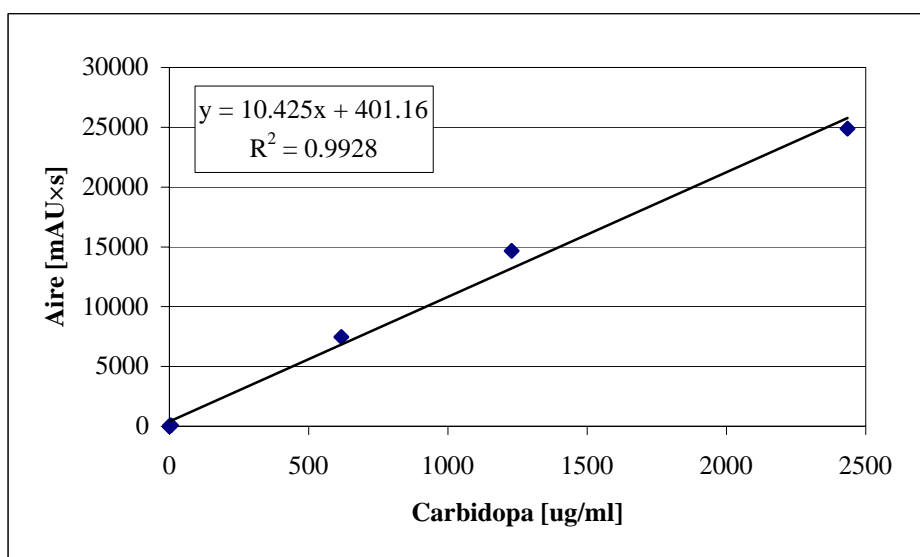


Calibration de la carbidopa

Carbidopa [ug/ml]	Aire [mAUxs]
618	7480
1229	14654
2434	24892
6.1	77
0.061	0.9
0.00060	0.3



Extraction sur résine Dowex

Résine [g]	Temps d'extraction [min]	Carbidopa déposé [mg]	Aire [mAU×s]	Volume [ml]	Aire ramené à 1 ml [mAU×s]	Carbidopa non retenue [ug]	Carbidopa extraite [%]	Hydrazine potentielle [ppm]
1	3	53	9361	3	28082	2746	94.7923	7373.8
1.5	1	53	2314	3	6943	574	98.9121	1540.3
1.5	2	53	37	3	110	8.8	99.9833	23.6
1.5	3	2.3	1.11	3	3.3	0.13	99.9941	8.3
1.5	3	53	12	3	36	2.9	99.9946	7.7
2	2	53	13	3	39	3.1	99.9941	8.4
2	2	53	211	3	632	50.3	99.9047	135.0
2	3	53	28	3	84	6.7	99.9873	18.0
2	3	53	47	3	140	11.2	99.9789	29.9
2	3	53	10	3	30	2.4	99.9955	6.4
2	3	53	1.2	3	3	0.14	99.9997	0.4
2.5	3	2.3	0.69	6	4.1	0.17	99.9927	10.3
3	1	26	4.4	2.5	11	0.44	99.9983	2.4
3	3	2.3	1.18	6	7.1	0.29	99.9876	17.6
3	3	26	1.3	2.5	3	0.13	99.9995	0.7
3	3	26	5.7	2.5	14	0.57	99.9978	3.1
3	3	53	0.0	3	0	0.00	100.0000	0.0
3	3	53	0.8	3	2	0.10	99.9998	0.3
3	3	53	3.8	3	11	0.46	99.9991	1.2
4	3	26	0.0	2.5	0	0.00	100.0000	0.0
4	7	26	4.3	2.5	11	0.43	99.9984	2.3
4.5	3	2.3	1.07	3	3.2	0.13	99.9943	8.0
5	3	26	0.0	2.5	0	0.00	100.0000	0.0
5	3	26	3.0	2.5	7	0.30	99.9989	2

Effet de l'azote et de l'air sur une solution standard 517 ng/ml, sans résine*Sans extraction sur résine*Solution standard, **barboté avec azote ou vortexé pendant 2 minutes**Lavé avec 2 × 2 ml H₂O + 1 ml de tampon pH 5.5 + 1 ml de benzaldéhyde, agité manuellement 2 min

2.0 ml heptane, manuellement 2 minutes

Dérivatisé directement

Essai	Phase organique (2 ml) [mAU×s]	Phase aqueuse (5 ml) [mAU×s]	Extraction l/l [%]
A	295	1.8	98
B	319	1.8	99
C	297	0.0	100
D	305	2.0	98
Moyenne [mAU×s]	304	1.4	99
Ecart-type [mAU×s]	11	0.9	1
Dév. std [%]	4	67.1	1

Dérivatisé après avoir laissé la solution barboter 2 minutes avec l'azote

Essai	Phase organique (2 ml) [mAU×s]	Phase aqueuse (5 ml) [mAU×s]	Extraction l/l [%]
A	300	0.0	100
B	260	0.0	100
C	292	0.0	100
D	305	0.0	100
Moyenne [mAU×s]	289	0.0	100
Ecart-type [mAU×s]	20	0.0	0
Dév. std [%]	7	0.0	0

Dérivatisé après avoir laissé la solution barboter 2 minutes avec l'air

Essai	Phase organique (2 ml) [mAU×s]	Phase aqueuse (5 ml) [mAU×s]	Extraction l/l [%]
A	297	0.0	100
B	295	0.0	100
C	319	0.6	100
D	286	0.0	100
Moyenne [mAU×s]	299	0.1	100
Ecart-type [mAU×s]	14	0.3	0
Dév. std [%]	5	200.0	0

Effet de l'azote et de l'air sur une solution standard 517 ng/ml, avec résine

3 g de résine + 2 ml H₂O + 1 ml de solution std, **barboté avec azote ou vortexé pendant 2 minutes**

Lavé avec 2 × 2 ml H₂O + 1 ml de tampon pH 5.5 + 1 ml de benzaldéhyde, agité manuellement 2 min

2.0 ml heptane, manuellement 2 minutes

Standard 517.28 ng/ml

Barboté dans N₂

Essai	Phase organique (2 ml) [mAU×s]	Phase aqueuse (9 ml) [mAU×s]	Extraction I/I [%]
A	186	4.9	89
B	198	6.1	88
C	183	5.3	88
Moyenne [mAU×s]	189	5	89
Ecart-type [mAU×s]	8	1	1
Dév. std [%]	4	11	1

Vortexé

Essai	Phase organique (2 ml) [mAU×s]	Phase aqueuse (9 ml) [mAU×s]	Extraction I/I [%]
A	1539	2.0	99
B	142	0.6	98
C	9	1.0	67
Moyenne [mAU×s]	563	1	88
Ecart-type [mAU×s]	847	1	18
Dév. std [%]	150	57	21

Solution de carbidopa 1245.25 mg/ 25 ml HCl 2N

Barboté dans N₂

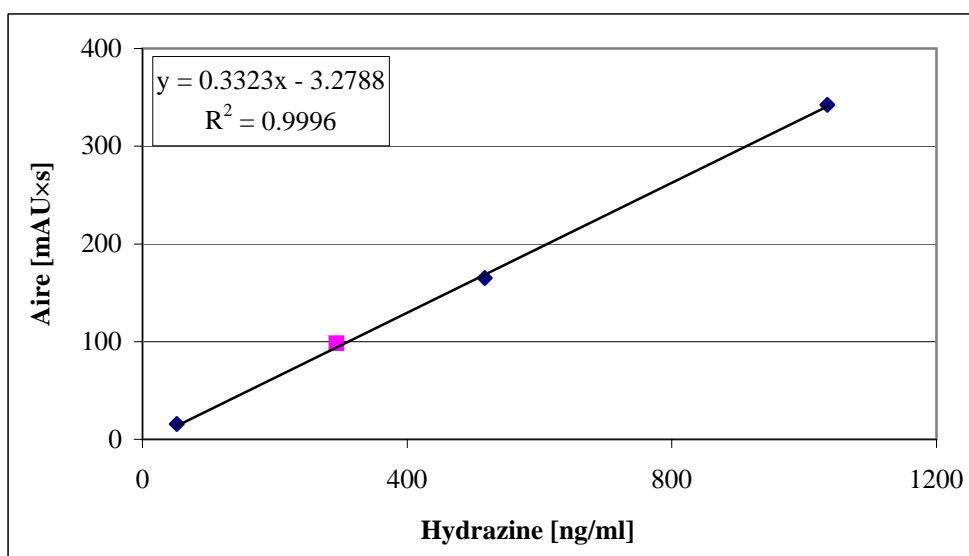
Essai	Phase organique (2 ml) [mAU×s]	Phase aqueuse (9 ml) [mAU×s]	Extraction I/I [%]
A	1138	171.6	60
B	1088	219.7	52
C	1149	91.9	74
Moyenne [mAU×s]	1125	161	62
Ecart-type [mAU×s]	33	65	11
Dév. std [%]	3	40	17

Vortexé

Essai	Phase organique (2 ml) [mAU×s]	Phase aqueuse (9 ml) [mAU×s]	Extraction I/I [%]
A	118	53.4	33
B	71	34.4	31
C	127	22.1	56
Moyenne [mAU×s]	105	37	40
Ecart-type [mAU×s]	30	16	14
Dév. std [%]	28	43	34

Linéarité sur résine Dowex*Standard sulfate d'hydrazine*

Standard [ng/ml]	Phase organique (2 ml) [mAU×s]	Phase aqueuse		Extraction l/l [%]
		[mAU×s]	[ml]	
517.38	165	7.5	8	85
51.74	16	0.6	8	86
1034.76	342	14.4	8	86
293.29	98	3.9	8	86



Résine Dowex : Répétabilité d'une solution standard et d'une solution de carbidopa*Solution standard 1173 ng/ml*

Essai	Phase organique [mAU×s]
1	499
2	469
3	459
4	485

Moyenne 478

Ecart-type 18

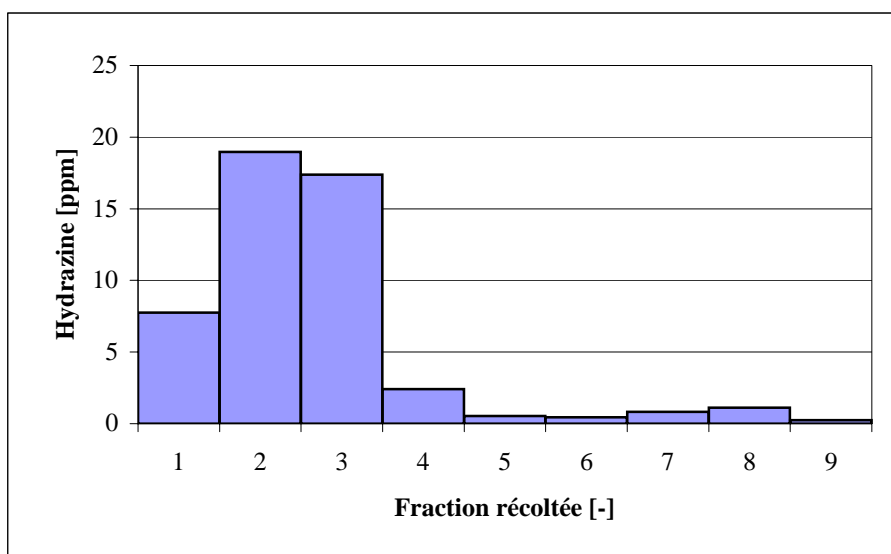
Dév.std rel [%] 4

Solution de carbidopa 50 mg/ml

Essai	Phase organique [mAU×s]	Hydrazine [ppm]
A	1138	69
B	1088	66
C	1149	70
Moyenne [mAU×s]	1125	68
Ecart-type [mAU×s]	33	2
Dév. std [%]	3	3

Cartouche Alltech IC-OH, variation du débit*Carbidopa 511-089M 10 mg/ml HCl pH = 0.89*2.0 ml de solution de carbidopa élués sur cartouches Alltech IC-OH, à **1 ml/min**Lavage avec 10 ml d'eau à **1 ml/min****Hydrazine calculée en fonction du standard p. 65 (1096.32 ng/ml -> 2307 mAU×s)**

Lavage n°	Phase organique (1 ml) [mAU×s]	Phase aqueuse (3 ml) [mAU×s]	Extraction l/l [%]	Hydrazine récupérée sur le total [%]	Hydrazine [ppm]
1	160	1.0	98.1	15.6	7.8
2	392	1.1	99.2	38.1	19.0
3	359	1.5	98.8	35.0	17.4
4	50	5.6	74.9	4.9	2.4
5	11	0.6	85.3	1.1	0.5
6	9	0.5	86.3	0.9	0.5
7	17	1.1	84.3	1.7	0.8
8	23	0.7	91.6	2.2	1.1
9	5	0.6	72.4	0.5	0.2
Total	1027				50
Total (1-3)	911				47



Carbidopa 511-089M 10 mg /ml HCl pH = 0.89

2.0 ml de solution de carbidopa élués sur cartouches Alltech IC-OH, à **0.6 ml/min**

Lavage avec 10 ml d'eau à **0.6 ml/min**

Hydrazine calculée en fonction du standard p. 65 (1096.32 ng/ml -> 2307 mAU×s)

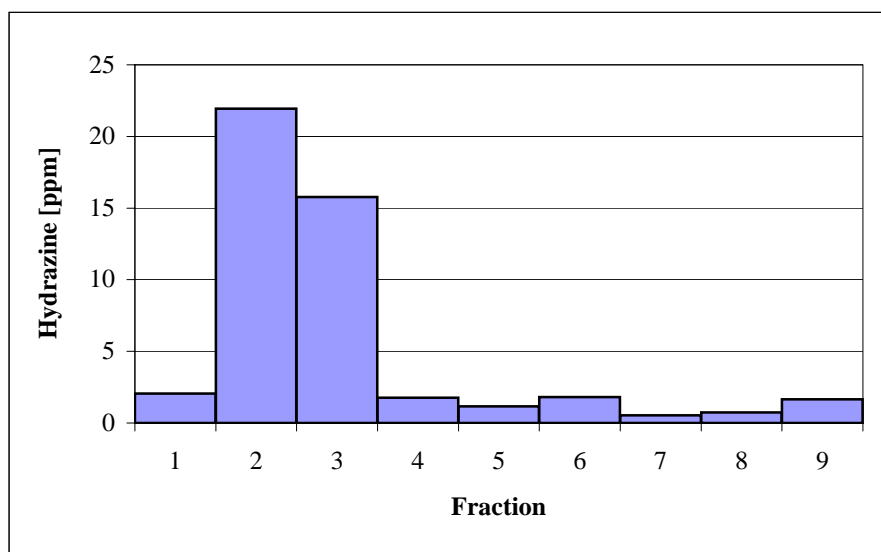
Lavage n°	Phase organique (1 ml) [mAU×s]	Phase aqueuse (3 ml) [mAU×s]	Extraction l/l [%]	Hydrazine récupérée sur le total [%]	Hydrazine [ppm]
1	42	10.0	58.7	4.3	2.1
2	453	36.7	80.4	46.2	21.9
3	326	9.0	92.3	33.3	15.8
4	36	5.2	70.1	3.7	1.8
5	24	2.8	74.4	2.5	1.2
6	37	1.8	87.3	3.8	1.8
7	11	0.9	80.5	1.1	0.5
8	15	1.3	80.1	1.6	0.7
9	34	1.5	88.6	3.5	1.7

Total 979

47

Total (1-3) 821

40

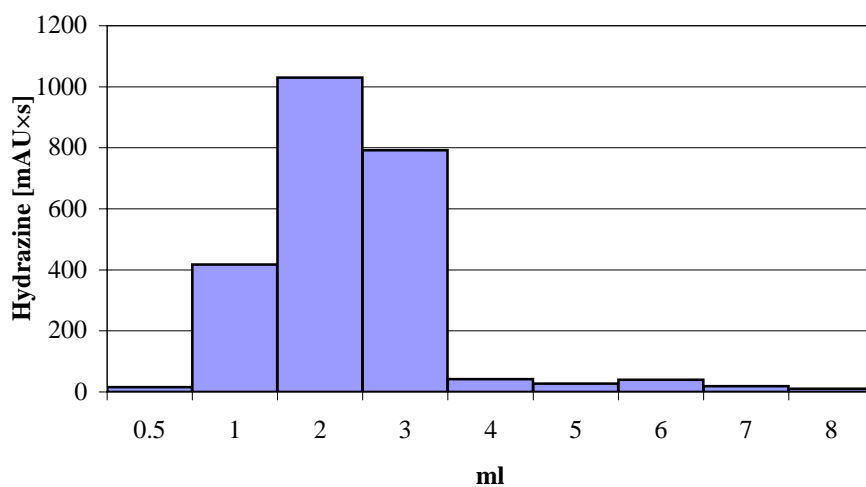


Cartouche Alltech IC-OH :standard 1185 ng/ml

2.0 ml de solution de solution standard élués sur cartouches Alltech IC-OH, à 0.6 ml/min

Lavage avec 6 ml d'eau à 0.6 ml/min

Lavage n°	Volume total récupéré [ml]	Phase organique [mAUxs]	Phase aqueuse (3 ml) [mAUxs]	Extraction I/I [%]	Hydrazine récupérée sur le total [%]	Hydrazine récupérée sur les 3 premiers millilitres [%]
1	0.5	15	0.9	85.5	1	1
2	1	417	3.9	97.3	17	19
3	2	1030	3.3	99.1	43	46
4	3	792	3.2	98.8	17	35
5	4	42	1.6	89.9	1	2
6	5	27	0.9	91.1	1	-
7	6	39	1.0	93.3	1	-
8	7	19	0.9	87.5	0	-
9	8	10	2.0	63.0	0	-
Total	11	2392		Recovery	79.8	
Total (1-5)	3	2254			75.2	

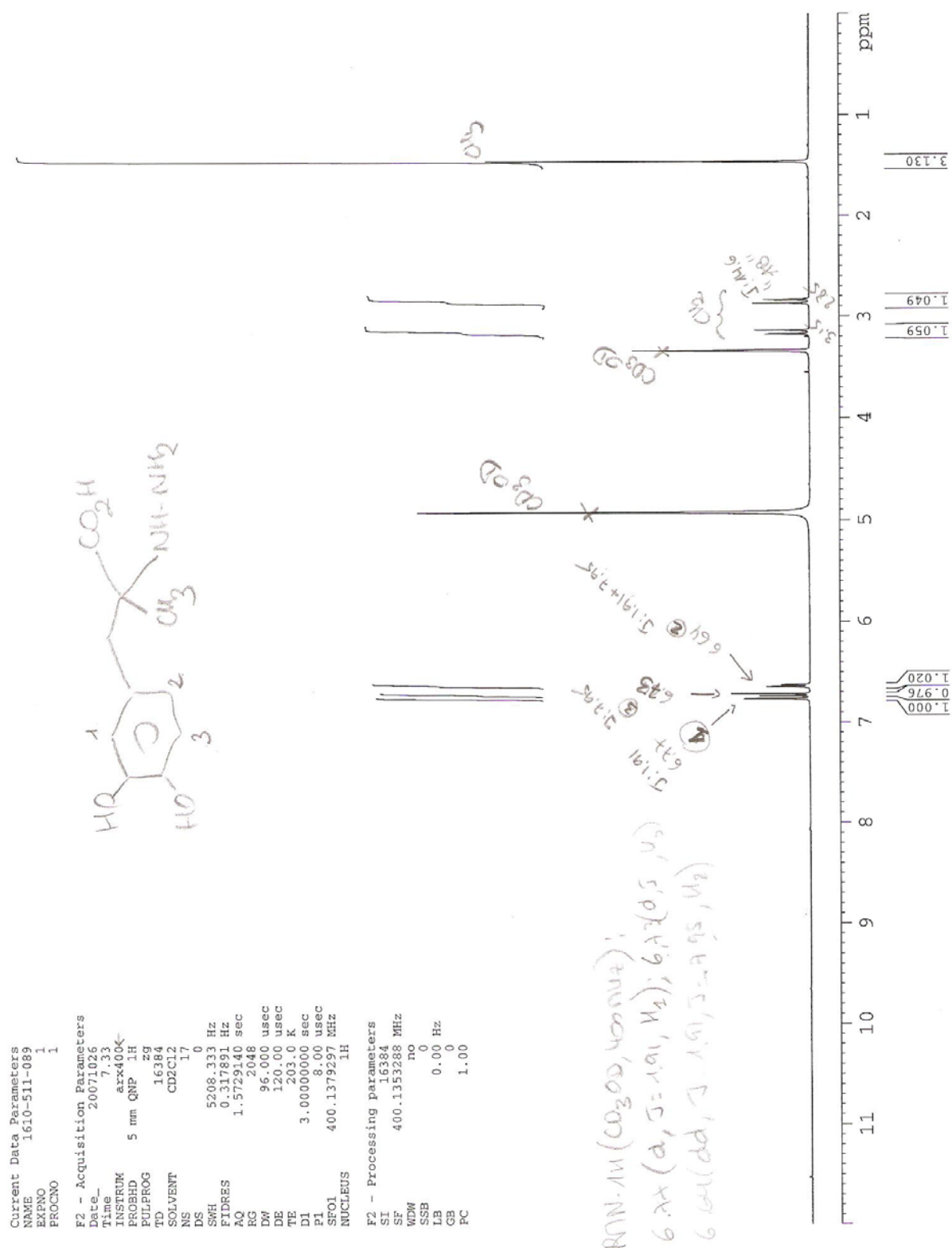
**Standard sans passage sur résine**

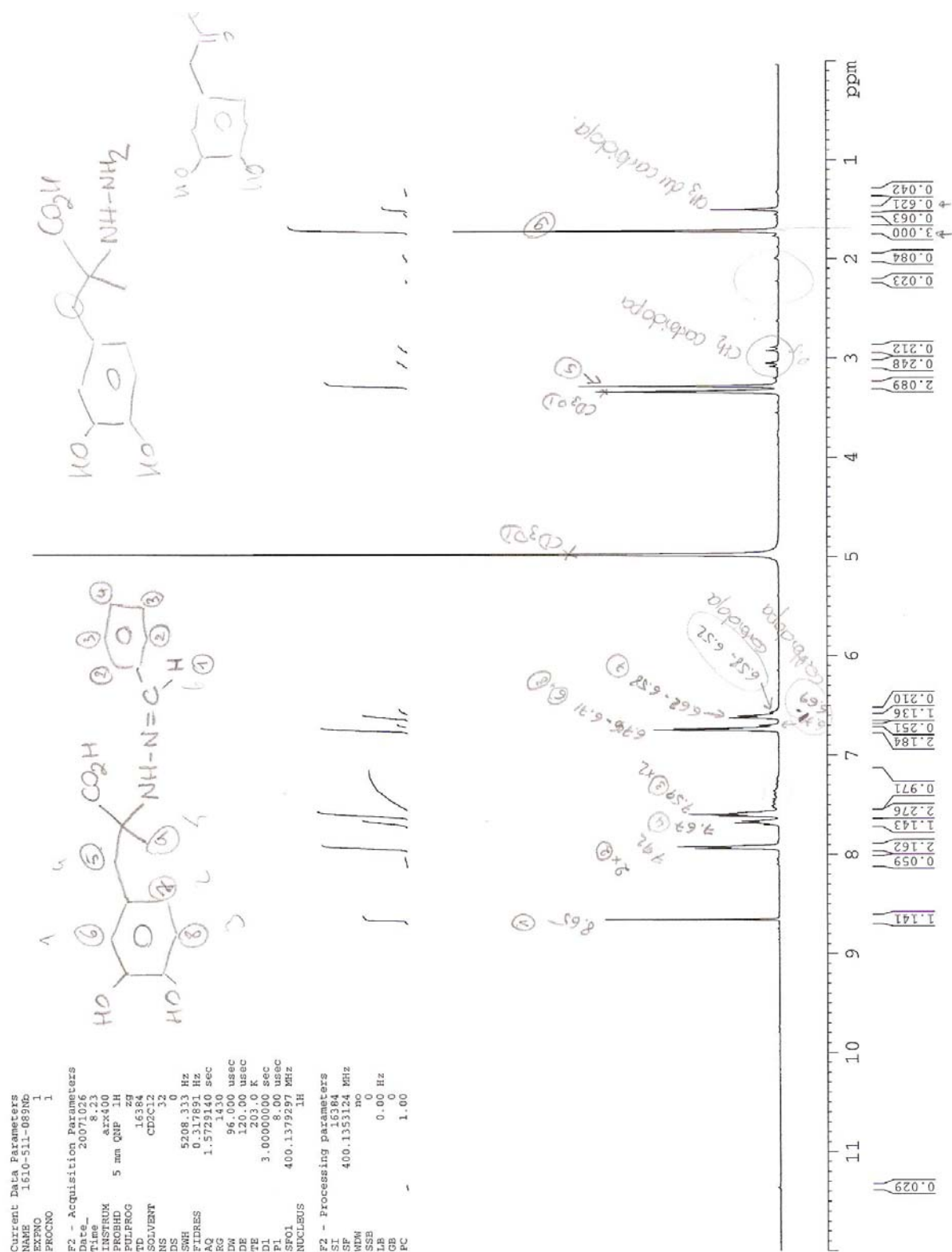
1.0 ml dérivatisé avec 1 ml solution de benzaldéhyde + 1 ml tampon pH 5.5

Extrait avec 1.0 ml d'heptane

Phase organiq **1500** mAUxs

Phase aqueuse 3.3 mAUxs

Spectre RMN ^1H de la carbidopa

Spectre RMN ^1H de la carbidopa dérivatisée

Dérivatisation de l'hydrazine à de pH différents*Standard 517.28 ng/ml*

3 g de résine + 2 ml H₂O + 1 ml de solution standard ou carbidopa, barboté dans N₂ pendant 2 minutes
 Lavé avec 2 × 2 ml H₂O + 1 ml de **tampon ou HCl 2 N** + 1 ml de benzaldéhyde, agité manuellement 2 min
 2.0 ml heptane, manuellement 2 minutes

*Standard 517.38 ng/ml***HCl 2 N (pH =0.8)**

Essai	Phase organique (2 ml) [mAU×s]	Phase aqueuse (9 ml) [mAU×s]	Extraction l/l [%]
A	192	0	100
B	143	0	100
C	180	0	100
Moyenne [mAU×s]	172	0	100
Ecart-type [mAU×s]	26	0	0
rsd [%]	15	0	0

Tampon pH 2.0

Essai	Phase organique (2 ml) [mAU×s]	Phase aqueuse (9 ml) [mAU×s]	Extraction l/l [%]
A	199	5.3	89
B	201	4.9	90
C	226	4.6	92
Moyenne [mAU×s]	209	5	90
Ecart-type [mAU×s]	15	0	1
rsd [%]	7	7	1

Tampon pH 3.5

Essai	Phase organique (2 ml) [mAU×s]	Phase aqueuse (9 ml) [mAU×s]	Extraction l/l [%]
A	211	5.0	90
B	209	4.8	91
C	197	4.7	90
Moyenne [mAU×s]	206	5	90
Ecart-type [mAU×s]	7	0	0
rsd [%]	4	4	0

Tampon pH 5.5

Essai	Phase organique (2 ml) [mAU×s]	Phase aqueuse (9 ml) [mAU×s]	Extraction l/l [%]
A	186	4.9	89
B	198	6.1	88
C	183	5.3	88
Moyenne [mAU×s]	189	5	89
Ecart-type [mAU×s]	8	1	1
rsd [%]	4	11	1

Optimisation du temps de dérivation

Standard 517.28 ng/ml

6 ml H₂O + 1 ml de solution tampon pH 5.5 + 1.0 ml de solution standard

Dérivatisé à des temps différents avec 1 ml de benzaldéhyde 30 g/L, agitation manuelle

Extrait 2 minutes avec 2.0 ml d'heptane, agitation manuelle

1 minute

Essai	Phase organique (2 ml) [mAU×s]	Phase aqueuse (9 ml) [mAU×s]	Extraction l/l [%]
A	296	1.2	98
B	305	0.5	99
C	295	1.1	98
Moyenne [mAU×s]	299	1	99
Ecart-type [mAU×s]	5	0	1
Dév. std [%]	2	42	1

1.5 minute

Essai	Phase organique (2 ml) [mAU×s]	Phase aqueuse (9 ml) [mAU×s]	Extraction l/l [%]
A	297	1.4	98
B	298	0.4	99
C	291	1.1	98
Moyenne [mAU×s]	295	1	99
Ecart-type [mAU×s]	3	1	1
Dév. std [%]	1	50	1

2 minutes

Essai	Phase organique (2 ml) [mAU×s]	Phase aqueuse (9 ml) [mAU×s]	Extraction l/l [%]
A	295	1.0	99
B	302	1.5	98
C	312	0.9	99
Moyenne [mAU×s]	303	1	98
Ecart-type [mAU×s]	9	0	0
Dév. std [%]	3	28	0

2.5 minutes

Essai	Phase organique (2 ml) [mAU×s]	Phase aqueuse (9 ml) [mAU×s]	Extraction l/l [%]
A	301	0.5	99
B	304	1.5	98
C	294	1.1	98
Moyenne [mAU×s]	299	1	98
Ecart-type [mAU×s]	5	1	1
Dév. std [%]	2	53	1

Résumé

Dérivati-sation [min]	Phase organique [mAU×s]	Ecart-type [mAU×s]	Dév. std [%]	Moyenne [mAU×s]	Ecart-type [mAU×s]	Dév. std [%]
1	299	0.6	0.2	299	3.3	1.1
1.5	295	0.7	0.3			
2	303	0.4	0.1			
2.5	299	0.8	0.3			

Optimisation du temps d'extraction

Standard 517.28 ng/ml

6 ml H₂O + 1 ml de solution tampon pH 5.5 + 1.0 ml de solution standard

Dérivatisé 2 minutes avec 1 ml de benzaldéhyde 30 g/L, agitation manuelle

Extrait à des temps différents avec 2.0 ml d'heptane, agitation manuelle

1 minute

Essai	Phase organique (2 ml) [mAU×s]	Phase aqueuse (9 ml) [mAU×s]	Extraction I/I [%]
A	267	2.7	96
B	282	2.3	96
C	279	2.0	97
Moyenne [mAU×s]	276	2	96
Ecart-type [mAU×s]	8	0	1
Dév. std [%]	3	15	1

1.5 minute

Essai	Phase organique (2 ml) [mAU×s]	Phase aqueuse (9 ml) [mAU×s]	Extraction I/I [%]
A	380	1.2	99
B	292	0.0	100
C	495	2.1	98
Moyenne [mAU×s]	389	1	99
Ecart-type [mAU×s]	102	1	1
Dév. std [%]	26	97	1

2 minutes

Essai	Phase organique (2 ml) [mAU×s]	Phase aqueuse (9 ml) [mAU×s]	Extraction I/I [%]
A	295	1.0	99
(2 ème injection)	296	0.5	99
B	302	1.5	98
C	312	0.9	99
Moyenne [mAU×s]	303	1	98
Ecart-type [mAU×s]	9	0	0
Dév. std [%]	3	28	0

2.5 minutes

Essai	Phase organique (2 ml) [mAU×s]	Phase aqueuse (9 ml) [mAU×s]	Extraction I/I [%]
A	298	1.2	98
B	303	1.0	99
C	305	1.1	98
Moyenne [mAU×s]	302	1	98
Ecart-type [mAU×s]	4	0	0
Dév. std [%]	1	11	0

Résumé

Extraction [min]	Extraction I/I [%]	Ecart-type [mAU×s]	Dév. std [%]	Moyenne [mAU×s]	Ecart-type [mAU×s]	Dév. std [%]
1	96.4	0.6	0.6	98	1.1	1.2
1.5	98.9	1.0	1.0			
2	98.4	0.4	0.5			
2.5	98.4	0.2	0.2			

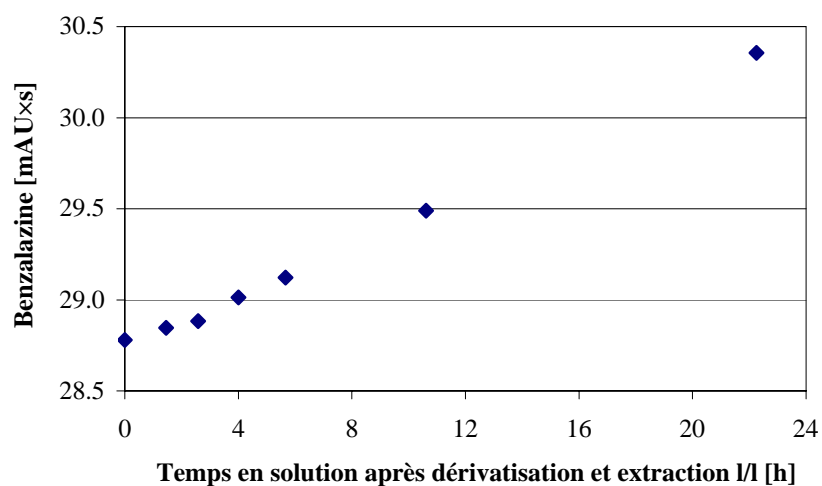
Stabilité de la benzalazine

Solution de carbidopa 701/104 ^247.98 mg / 5 ml HCl

2.0 ml de solution de solution standard élués sur cartouches Alltech IC-OH, à 0.6 ml/min

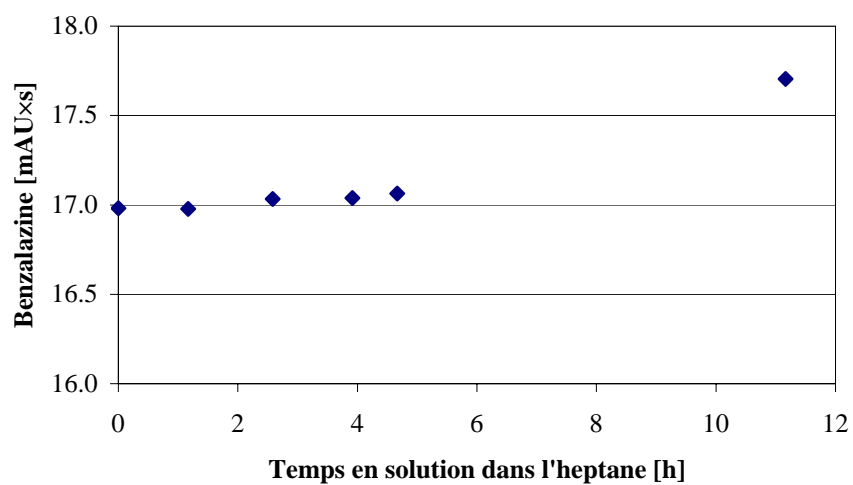
Lavage avec 6 ml d'eau à 0.6 ml/min

Temps [min]	Benzalazine dans la phase organique		
	[mAU×s]	[mg/ml]	[ppm]
0	1396	1427	28.8
1	1399	1431	28.8
3	1401	1433	28.9
4	1407	1439	29.0
6	1413	1444	29.1
11	1430	1463	29.5
22	1471	1506	30.4



Solution de benzalazine à 3.455 ug/ml

Temps [min]	Benzalazine dans la phase organique		
	[mAU×s]	[mg/ml]	[ppm]
0	829	842	17.0
1	829	842	17.0
3	832	845	17.0
4	832	845	17.0
5	833	846	17.1
11	863	878	17.7



Cartouche Alltech IC-OH : Répétabilité*Standard sulfate d'hydrazine 1038.21 ng/ml*

2.0 ml de solution de solution standard élués sur cartouches Alltech IC-OH, à 0.6 ml/min

Lavage avec 6 ml d'eau à 0.6 ml/min

Extraction n°	Phase organique [mAU×s]	Phase aqueuse (4.5 ml) [mAU×s]	Extraction I/I [%]
A	951	7.9	98.2
B	960	11.5	97.4
C	893	10.8	97.3
D	952	9.1	97.9
E	934	11.2	97.4

Moyenne [mAU×s] 938**Ecart-type [mAU×s]** 26.6**STD [%]** 2.8*Solution de carbidopa 706-115*

2.0 ml de solution de solution standard élués sur cartouches Alltech IC-OH, à 0.6 ml/min

Lavage avec 6 ml d'eau à 0.6 ml/min

Lot n°	Carbidopa [mg/ml]	Phase organique [mAU×s]	Phase aqueuse (4.5 ml) [mAU×s]	Extraction I/I [%]	Hydrazine	
					[ng/ml]	[ppm]
706-115	32.2	101	0.7	98.4	77	2.4
	33.9	113	1.3	97.5	89	2.6
	33.7	108	1.4	97.2	84	2.5
	33.2	105	1.8	96.4	81	2.4
	32.6	117	1.7	96.9	93	2.8

Moyenne [mAU×s] 2.6**Ecart-type [mAU×s]** 0.19**STD [%]** 7.2

Extraction n°	Benzalazine [mAU×s]	Hydrazine [ppm]
A	951	2.4
B	960	2.6
C	893	2.5
D	952	2.4
E	934	2.8

Moyenne [mAU×s] 938 2.5**Ecart-type [mAU×s]** 27 0.19**STD [%]** 2.8 7.5**t($\alpha=0.05$, n=5)** 2.8**IC à 95 %** 33.1 0.23

Cartouche Alltech IC-OH : Répétabilité intermédiaire**Série 1**

Carbidopa [mg/ml]	A(PO) [mAU×s]	A(PO)/[carbi]	A(PO)/moyenne ×100
32.2	101.5	3.1	95.7
33.9	113.1	3.3	101.4
33.7	108.1	3.2	97.5
33.2	105.4	3.2	96.6
32.6	116.7	3.6	108.9

Moyenne 3.3 100.0 %
 Ecart type 5.4 %
 rsd 29.4 %

Série 2

Carbidopa [mg/ml]	A(PO) [mAU×s]	A(PO)/[carbi]	A(PO)/moyenne ×100
32.4	134161.0	4136.2	108.6
33.7	136770.0	4061.1	106.7
32.8	115118.0	3506.9	92.1
32.7	117361.0	3588.1	94.2
32.7	122492.0	3745.2	98.4

Moyenne 3807.5 100.0 %
 Ecart type 7.4 %
 rsd 54.3 %

Série 3

Carbidopa [mg/ml]	A(PO) [mAU×s]	A(PO)/[carbi]	A(PO)/moyenne ×100
32.1	98.7	3.1	86.4
32.3	107.8	3.3	93.8
32.6	92.3	2.8	79.8
32.1	141.5	4.4	124.2
31.8	130.9	4.1	115.8

Moyenne 3.6 100.0 %
 Ecart type 19.2 %
 rsd 366.8 %

Test de Cochran

Somme des variances 450.5 %

$\alpha = 0.1$ g table 0.8335 g calculé 0.8142

Moyenne 100.0
 Moyenne des variances 150.2
 Ecart-type 11.3
 rsd 11.3

Cartouche Alltech IC-OH : Exactitude

Solution de carbidopa 710-116

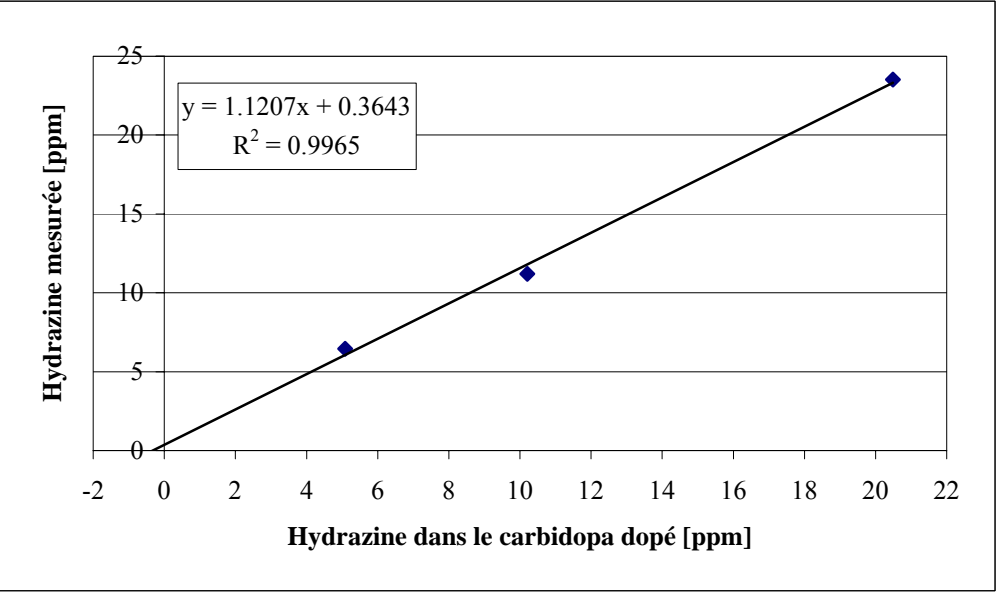
2.0 ml de solution de solution standard élués sur cartouches Alltech IC-OH, à 0.6 ml/min
Lavage avec 6 ml d'eau à 0.6 ml/min

Théorique selon la pesée et la droite de calibration

Carbidopa		Dopage		Total
[mg/ml]	pm d'hydrazine	[ng/ml]	[ppm]	
33.2	5.1	6802	20	26
33.3	5.1	3401	10	15
33.4	5.1	1700	5	10

Mesuré

Phase organique [mAU×s]	Phase aqueuse (4.5 ml) [mAU×s]	Extraction I/I [%]	Hydrazine		Dopage [ppm]	Rapport mesuré/ théorique [-]
			[ng/ml]	[ppm]		
940	9.9	97.7	952	28.7	24	111.8
551	8.7	96.6	545	16.4	11	106.6
400	4.4	97.6	388	11.6	6	113.4

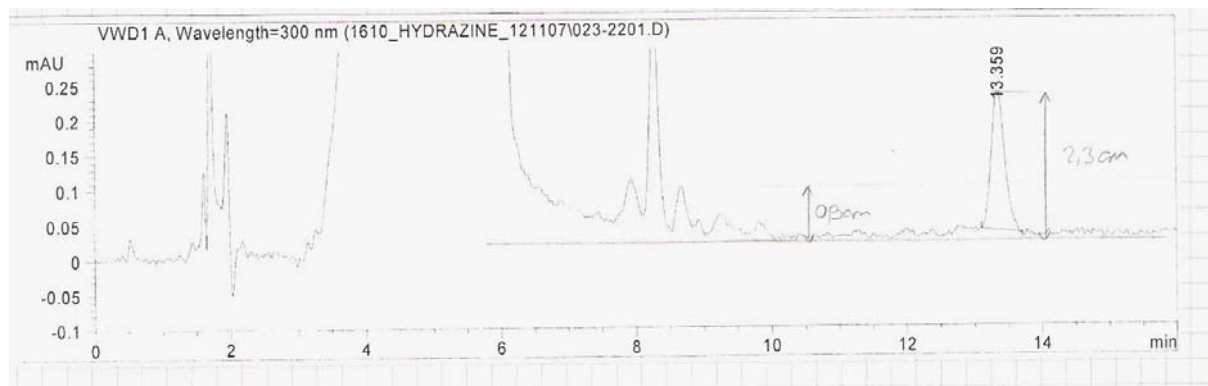


Xa	Xt	Recouvrement	Xd	Norme
26	29	112	13	<20
15	16	107	7.4	<20
10	12	113	14	<20

Moyenne des recouvrement 110.6 %
Ecart type 3.6 %
 $t(\alpha, n-1) = t(0.05, 2)$ 4.3 %
Intervalle de confiance à 95 110.6 % ± 8.9 %

Limite de détection

La limite de détection a été déterminée d'après le chromatogramme suivant :



Cartouche Alltech IC-OH : Limite de quantification*Standard sulfate d'hydrazine 2.5 ng/ml*

2.0 ml de solution de solution standard élués sur cartouches Alltech IC-OH, à 0.6 ml/min

Lavage avec 6 ml d'eau à 0.6 ml/min

Injection n°	Phase organique [mAUxs]
1	5.0
2	5.8
3	5.3
4	5.1
5	5.1
6	5.2
7	5.2
Moyenne [mAUxs]	5.3
Ecart-type [mAUxs]	0.3
STD [%]	5.2

Cartouche Alltech IC-OH : Calibration*Standard sulfate d'hydrazine 2.108 mg/ml*

2.0 ml de solution de solution standard élués sur cartouches Alltech IC-OH, à 0.6 ml/min

Jeté le 0.4 premier ml, lavé avec 1 ml d'eau à 0.6 ml/min

Hydrazine [ng/ml]	Conc. par rapport à une solution de 50 mg/ml carbidopa [ppm]	Phase organique (2 ml) [mAU×s]	Phase aqueuse (4.5 ml) [mAU×s]	Extraction I/I [%]
5.19	0.1	13	0.0	100.0
259.55	5	246	3.2	97.2
519.1	10	539	4.1	98.3
1038.21	20	1097	11.4	97.7
1557.31	30	1548	10.2	98.5
2076.42	40	1924	20.0	97.7
2595.52	50	2546	24.3	97.9

