

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOU MAMMARI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



MEMOIRE

Présenté pour obtenir le Grade de

MASTER

Filière : Chimie

Spécialité : Chimie Pharmaceutique

Par

IDRIS IMANE

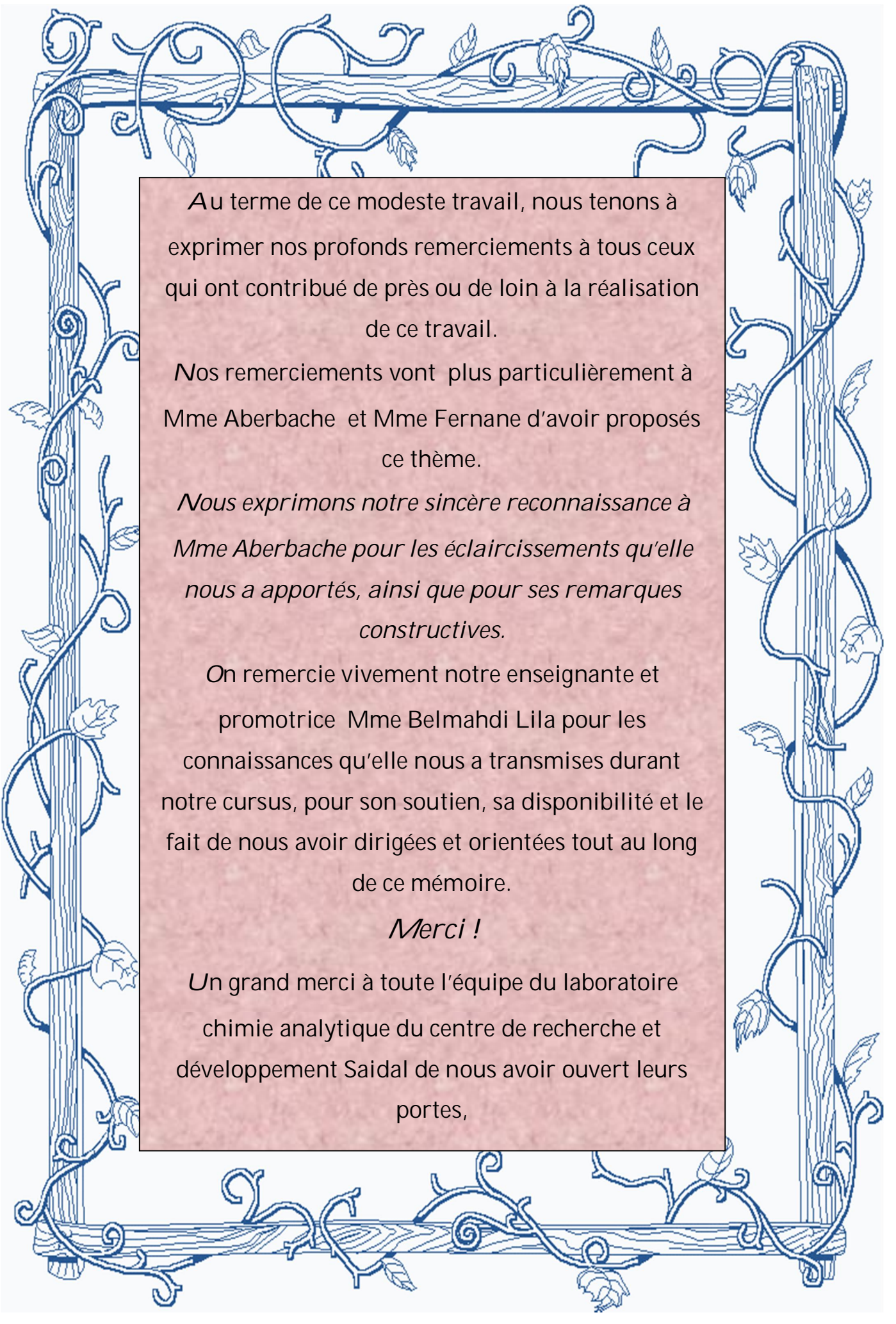
MADJENE LYDIA

Thème

DOSAGE D'UN SUCRE COMPOSÉ PAR UV VISIBLE
COMPARÉ A UNE METHODE CHROMATHOGRAPHIQUE

Soutenu le 18/09/2013, devant le jury composé de :

| | | | |
|-------------------|---------|--------------|---------------|
| Mme. FERNANE | Farida | MCA. - UMMTO | Présidente |
| Mme. BELMAHDI | Lila | MAA. -UMMTO | Promotrice |
| Melle. KHELIHAOUI | Saliha | CRD saidal | Co-Promotrice |
| Mr. SADOUDI | Rabah | MAA - UMMTO | Examineur |
| Mr. MAMOU | Marzouk | MAHU - UMMTO | Examineur |



Au terme de ce modeste travail, nous tenons à exprimer nos profonds remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

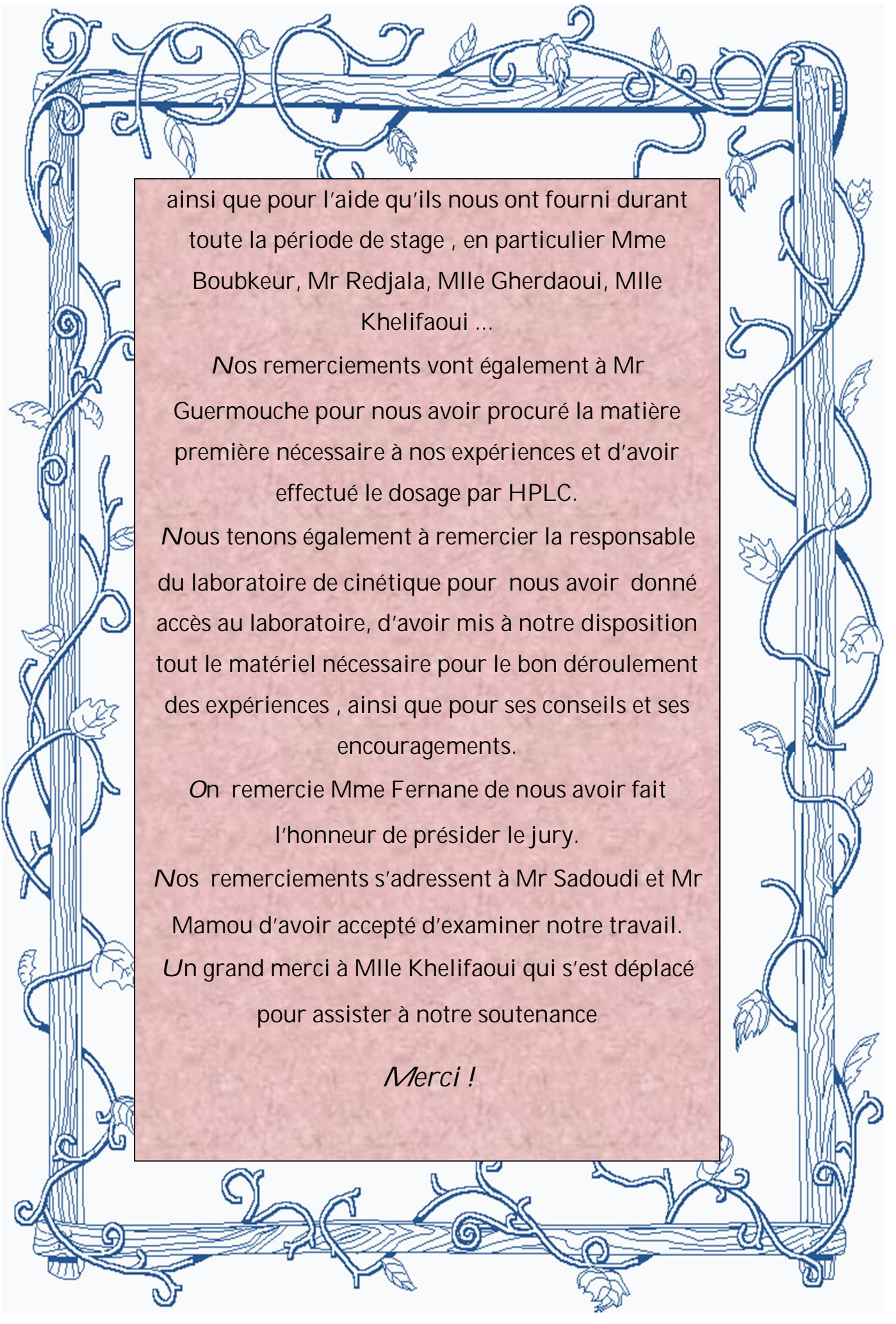
Nos remerciements vont plus particulièrement à Mme Aberbache et Mme Fernane d'avoir proposés ce thème.

Nous exprimons notre sincère reconnaissance à Mme Aberbache pour les éclaircissements qu'elle nous a apportés, ainsi que pour ses remarques constructives.

On remercie vivement notre enseignante et promotrice Mme Belmahdi Lila pour les connaissances qu'elle nous a transmises durant notre cursus, pour son soutien, sa disponibilité et le fait de nous avoir dirigées et orientées tout au long de ce mémoire.

Merci !

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire chimie analytique du centre de recherche et développement Saidal de nous avoir ouvert leurs portes,



ainsi que pour l'aide qu'ils nous ont fourni durant toute la période de stage , en particulier Mme Boubkeur, Mr Redjala, Mlle Gherdaoui, Mlle Khelifaoui ...

Nos remerciements vont également à Mr Guermouche pour nous avoir procuré la matière première nécessaire à nos expériences et d'avoir effectué le dosage par HPLC.

Nous tenons également à remercier la responsable du laboratoire de cinétique pour nous avoir donné accès au laboratoire, d'avoir mis à notre disposition tout le matériel nécessaire pour le bon déroulement des expériences , ainsi que pour ses conseils et ses encouragements.

On remercie Mme Fernane de nous avoir fait l'honneur de présider le jury.

Nos remerciements s'adressent à Mr Sadoudi et Mr Mamou d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Un grand merci à Mlle Khelifaoui qui s'est déplacé pour assister à notre soutenance

Merci !

Je dédie ce modeste travail

A mes très chers parents qui m'ont fourni au quotidien un soutien et une confiance sans faille et de ce fait, je ne saurais exprimer ma gratitude seulement par des mots.

Que dieu vous protège et vous garde pour nous.

A mes précieuses sœurs Warda et Yasmine, les mots ne peuvent résumer ma reconnaissance et mon amour à votre égard.

A tous mes amis avec lesquels j'ai partagé mes moments de joie et de bonheur. En particulier Chahinez, Thamila, Leila, Fariza. Merci pour votre présence, vos sourires et votre soutien.

A Sam sans qui ce travail n'aurait pas pu être réalisé.

A tous Mes enseignants tout au long de mes études.

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

A tous ceux qui m'aime, A tous ceux que j'aime.

À tous ceux qui ont cette pénible tâche de soulager les gens et diminuer leurs souffrances.

IDRIS IMANE

Je dédie ce modeste travail

*A celle qui m'a donné la vie, symbole de tendresse,
qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite,
à ma très chère mère*

*A mon père, école de mon enfance, qui a été mon
ombre durant toutes les années d'études, et qui a veillé
tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner
l'aide et à me protéger.*

Que dieu les gardes et les protèges.

A mes adorables sœurs Laetitia, Anais et Neila

A mon cher frère Sofiane.

A ma grand-mère, que dieu la garde.

*A mon institutrice qui a su me donner le goût des
sciences.*

*A tous mes professeurs, sans qui, je ne serai ce que je
suis aujourd'hui.*

A mes amies.

A tous ceux qui me sont chères.

A tous ceux qui m'aiment.

A tous ceux que j'aime.

MADJENE LYDIA

LISTE DES ABREVIATIONS

% : Pourcentage.

v: Fréquence (Hertz).

λ : Longueur d'onde (m).

C* : Carbone asymétrique.

C_{1,2,5}: Carbone numéro 1,2,5.

CPG : Chromatographie en phase gazeuse.

CPL : Chromatographie en phase liquide.

D : Dextrogyre.

h : Constante de Planck. $h=6,62 \times 10^{-34} \text{ m}^2 \text{ kg} / \text{s}$

HCl : Acide Chlorhydrique.

HILIC : Hydrophilic interaction liquid chromatography.

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance.

IPL: Ion pair chromatography.

IR : Infra rouge.

L : Lévoxyre.

nm : Nanomètre.

NPC : Chromatographie en phase normale.

pH : Potentiel hydrogène.

PM : Phase mobile.

PS : Phase stationnaire.

RI : Indice de réfraction.

RMN : Résonance magnétique nucléaire.

RP: Phase inverse.

SiO₂ : Silice.

UV: Ultra-Violet.

V : Visible.

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Diagramme de classification des glucides. | 2 |
| Figure 2 : Représentation de Fisher du glycéraldéhyde | 3 |
| Figure 3 : Formes furane et pyranne | 3 |
| Figure 4 : Cyclisation du Glucose | 4 |
| Figure 5 : Conformation chaise et bateau | 4 |
| Figure 6 : Représentation du lactulose. | 8 |
| Figure 7 : Isomérisation du lactose suivant la réaction de Lobry de Bruyne Ekenstein | 9 |
| Figure 8 : Isomérisation enzymatique du lactulose. | 9 |
| Figure 9 : Différentes techniques chromatographiques..... | 11 |
| Figure 10 : Schéma d'un appareil de HPLC. | 13 |
| Figure 11 : Colonne standard et précolonne d'HPLC. | 14 |
| Figure 12 : Domaine spectral du rayonnement électromagnétique..... | 17 |
| Figure 13 : Transitions électroniques dans l'ultraviolet et le visible. | 18 |
| Figure 14 : Spectrophotomètre simple à optique directe..... | 20 |
| Figure 15 : Spectrophotomètre double faisceau..... | 21 |
| Figure 16 : Schéma d'une cellule | 22 |
| Figure 17 : Additivité des absorbances | 23 |
| Figure 18 : Représentation de la molécule de résorcinol..... | 26 |
| Figure 19 : Balance analytique..... | 26 |
| Figure 20 : Spectrophotomètre UV Visible. | 27 |
| Figure 21 : Protocole expérimental pour le dosage du lactulose standard. | 30 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 22 : Protocole expérimental pour le dosage du lactulose échantillon | 31 |
| Figure 23 : Réactions proposées pour l'obtention d'un composé coloré à partir du lactulose. | 33 |
| Figure 24 : Spectre UV-Vis d'absorption du complexe lactulose résorcinol | 34 |
| Figure 25 : Optimisation de la concentration de résorcinol..... | 35 |
| Figure 26 : Optimisation du volume de résorcinol (0.05%). | 36 |
| Figure 27 : Optimisation du temps de chauffage. | 37 |
| Figure 28 : Complexe résorcinol/lactulose de la gamme étalon. | 38 |
| Figure 29 : Courbe d'étalonnage du standard (5-25 μ g/ml). | 40 |
| Figure 30 : Dosage gamme étalon et solutions échantillons..... | 42 |
| Figure 31 : Dosage par HPLC du lactulose en poudre. | 45 |
| Figure 32 : Dosage par HPLC du lactulose AGD | 46 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Propriétés du lactulose | 8 |
| Tableau 2 : Différentes techniques de séparation en HPLC | 12 |
| Tableau 3 : Travaux antérieurs..... | 24 |
| Tableau 4 : Absorbances de la gamme sur standard | 39 |
| Tableau 5 : Absorbances des échantillons | 41 |
| Tableau 6 : Pourcentages de recouvrement de l'échantillon | 44 |
| Tableau 7 : Informations du standard fournies par le chromatogramme..... | 45 |
| Tableau 8 : Informations du Lactulose AGD fournies par le chromatogramme..... | 46 |
| Tableau 9 : Récapitulatif des données : Lactulose en poudre et Lactulose AGD..... | 47 |

SOMMAIRE

| | |
|------------------------------------|---|
| <i>Introduction générale</i> | 1 |
|------------------------------------|---|

Partie Bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les sucres

| | | |
|-------|---|---|
| 1 | Classification | 2 |
| 2 | Les oses | 2 |
| 2.1 | Représentation des oses | 2 |
| 2.1.1 | Représentation en projection de Fisher | 3 |
| 2.1.2 | Structure cyclique des oses | 3 |
| 2.1.3 | Conformation de la forme cyclique : (chaise et bateau)..... | 4 |
| 2.2 | Nomenclature des oses | 5 |
| 2.3 | Isomérisation des oses | 5 |
| 2.4 | Propriétés des oses | 5 |
| 2.4.1 | Propriétés physiques | 5 |
| 2.4.2 | Propriétés chimiques | 5 |
| 3 | Les osides..... | 6 |
| 3.1 | Les holosides | 6 |
| 3.1.1 | Les disaccharides | 6 |
| 3.1.2 | Les oligosaccharides..... | 6 |
| 3.1.3 | Les polysaccharides..... | 6 |
| 3.2 | Les hétérosides | 7 |

Chapitre II : Lactulose

| | | |
|-----|--|----|
| 1 | Définition | 8 |
| 2 | Propriétés du lactulose | 8 |
| 3 | Production du lactulose | 9 |
| 3.1 | Production par voie chimique | 9 |
| 3.2 | Production par voie enzymatique | 9 |
| 4 | Effets physiologiques du lactulose | 10 |

| | | |
|---|----------------------------------|----|
| 5 | Indications thérapeutiques | 10 |
| 6 | Pharmacodynamie | 10 |
| 7 | Pharmacocinétique | 10 |
| 8 | Dégradation du lactulose | 10 |
| 9 | Détermination du lactulose | 10 |

Chapitre III : Différentes Méthodes D'analyse

I. Partie 1 : Méthodes chromatographiques

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Principe | 11 |
| 2 | Classification des techniques chromatographiques | 11 |
| 3 | La Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)..... | 12 |
| 3.1 | Avantages de l'HPLC | 12 |
| 3.2 | Techniques de séparations utilisées en HPLC. | 12 |
| 3.3 | Appareillage | 13 |
| 3.3.1 | Réservoirs de phases mobiles et dispositifs de traitement du solvant | 13 |
| 3.3.2 | Phase mobile | 13 |
| 3.3.3 | Les dispositifs de pompage | 13 |
| 3.3.4 | Systèmes d'injection de l'échantillon | 14 |
| 3.3.5 | Colonne de chromatographie liquide | 14 |
| 3.3.6 | Phase stationnaire | 15 |
| 3.3.7 | Les détecteurs | 15 |
| 3.4 | Applications de l'HPLC | 16 |
| 3.4.1 | Analyse quantitative | 16 |

Partie 2 : Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible

| | | |
|-----|--|----|
| 1 | Généralités..... | 17 |
| 1.1 | Domaine et longueur d'onde..... | 17 |
| 2.1 | Transitions électroniques | 18 |
| 2 | Appareillage | 19 |
| 2.1 | Source de rayonnement | 19 |
| 2.2 | Sélecteur de longueur d'onde (monochromateur) | 19 |
| 2.3 | Cellules | 19 |
| 2.4 | Système de mesure de l'intensité lumineuse (détecteur) | 20 |
| 2.5 | Dispositif d'affichage et de traitement du signal | 20 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3. | Catégorie de spectrophotomètre | 20 |
| 3.1 | Appareils à simple faisceau | 20 |
| 3.2 | Appareils à double faisceau | 21 |
| 4. | Application analytique | 21 |
| 4.1 | Analyse qualitative | 21 |
| 4.2 | Analyse quantitative | 22 |
| 4.2.1 | Application aux espèces non absorbantes | 23 |
| 4.2.2 | Analyse multi variables | 23 |

Partie Pratique

Chapitre IV : Matériels et méthodes

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | Matériels..... | 26 |
| 1.1 | Matières première et réactifs | 26 |
| 1.2 | Appareillages et équipements | 26 |
| 1.3 | Verreries | 27 |
| 2 | Méthodes | 28 |
| 2.1 | Dosage par UV Visible | 28 |
| 2.1.1 | Préparation des solutions | 28 |
| 2.1.2 | Optimisation de la méthode | 28 |
| 2.1.2.1 | Détermination d'une longueur d'onde d'absorption | 28 |
| 2.1.2.2 | Optimisation de la concentration de la solution de résorcinol | 28 |
| 2.1.2.3 | Optimisation du volume de résorcinol (0.05%) | 29 |
| 2.1.2.4 | Optimisation du temps de chauffage | 29 |
| 2.1.3 | Protocole expérimentale | 29 |
| 2.2 | Dosage par HPLC | 32 |
| 2.2.1 | Lactulose liquide | 32 |

Chapitre V : Resultats et Discussions

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Dosage du lactulose par UV Visible | 33 |
| 1.1 | Optimisation de la méthode | 34 |
| 1.1.1 | Détermination de la longueur d'onde d'absorption | 34 |
| 1.1.2 | Optimisation de la concentration de la solution de résorcinol..... | 35 |
| 1.1.3 | Optimisation du volume de résorcinol (0.05%) | 36 |
| 1.1.4 | Optimisation du temps de chauffage | 37 |
| 1.2 | Dosage du strandard | 38 |

| | | |
|-----|--|-----------|
| 1.3 | Dosage de l'échantillon : | 41 |
| 2 | Dosage par HPLC :..... | 45 |
| 2.1 | Témoin lactulose POUDRE 98.1% :..... | 45 |
| 2.2 | Dosage échantillon : lactulose AGD forme sirop | 46 |
| 3 | Discussion | 48 |
| 3.1 | Dosage par UV Visible | 48 |
| 3.2 | Dosage par HPLC | 48 |
| | CONCLUSION GENERALE | 49 |
| | Références bibliographiques | |
| | Glossaire | |
| | Annexes | |



INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERALE

Les glucides forment un groupe de composés très important, aussi bien dans l'agroalimentaire et la pharmacie que dans l'industrie du textile ou du papier.

Ils sont majoritairement utilisés dans l'industrie pharmaceutique autant qu'excipients, mais aussi pour leurs effets thérapeutiques autant que principe actifs.

Parmi les sucres ayant des propriétés curatives : Le lactulose, utilisé autant que laxatif osmotique pour le traitement de la constipation.

Le lactulose est soumis à des opérations de contrôles qualités telle que le dosage, identification des impuretés ... etc .Afin de garantir les normes exigées dans les pharmacopées. Différentes méthodes sont utilisées pour réaliser ces opérations.

La méthode préconisée par la pharmacopée, pour le dosage du lactulose, est la chromatographie liquide à haute performance, en raison de sa fiabilité, sa robustesse, sa reproductibilité et sa capacité à détecter des éléments difficilement détectables par d'autres méthodes ; cependant un problème économique oblige les industriels à chercher d'autres méthodes pouvant donner des résultats de même qualité et à moindre cout.

Dans cette perspective, notre travail au sein du laboratoire chimie analytique du Centre de Recherche et de Développement de Saidal El Harrach consiste à relever ce défi en effectuant une comparaison entre la méthode monographiée et une méthode de dosage par spectrophotométrie UV-Visible.

Le présent mémoire est divisé en deux parties : une synthèse bibliographique, dans laquelle on retrouve des généralités sur les sucres, sur le lactulose, et l'essentiel sur les techniques d'analyse.

Et une partie expérimentale dans laquelle nous avons décrit les différents protocoles expérimentaux et les résultats obtenus.



PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE



CHAPITRE I

Les glucides ou saccharides (du grec sakcharum, sucre) constituent un groupe de substances avec différentes structures et des propriétés physiques, chimiques et physiologiques variables, [1] Ce sont les composants clés de tous les organismes vivant y remplissant une vaste gamme de fonctions essentielles.[2]

1 Classification :

Selon leurs comportements en milieu faiblement acide et à chaud, leurs structures chimiques et leurs degrés de polymérisation, les glucides sont classés en 4 catégories (Monosaccharides ; Disaccharide ; Oligosaccharide ; Polysaccharide), répartis sur 2 groupes, résumé dans le diagramme suivant :

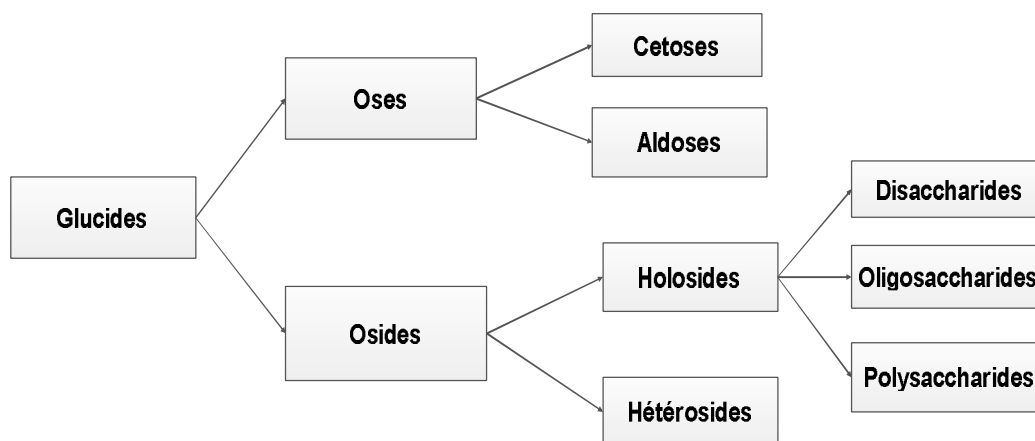


Figure 1 : Diagramme de classification des glucides.

2 Les oses :

Les oses (monosaccharides), sont des molécules de formule générale $C_n(H_2O)_n$, constitués d'un squelette carboné, porteur de « n » fonctions alcools et d'une fonction réductrice (aldéhydrique ou cétonique), ce qui permet de définir deux familles d'oses : les aldoses et les cétooses. Ils peuvent également être distingués en fonction du nombre de carbones qu'ils contiennent (triose, pentose...). [3]

Ce sont les unités structurales entrant dans la composition de glucides plus complexes les (osides). [4]

2.1 Représentation des oses :

La structure des oses peut être représentée de 2 façons, selon la formule structurale en chaîne linéaire (projection de Fisher) ou en Structure cyclique (projection de Haworth).[5]

2.1.1 Représentation en projection de Fisher :

La molécule est représentée dans un plan par projection en respectant les règles suivantes :

- Le groupe le plus oxydé est placé en haut ;
- Les atomes unis au C* par des liaisons horizontales sont en avant de la page ;
- Ceux qui sont unis par des liaisons verticales sont en arrière.[6]

La position de l'hydroxyle porté par l'avant dernier Carbone définit l'appartenance du sucre à une série D s'il est à droite de la chaîne carbonée, ou appartient à la série L s'il est placé à sa gauche.

Prenant le cas de l'ose le plus simple, le glycéraldéhyde qui est un aldotiose.

Il possède un seul carbone asymétrique. Selon la localisation du H et du OH sur le C₂, on peut distinguer deux stéréo-isomères possibles, le D-glycéraldéhyde et le L-glycéraldéhyde. (fig 2)

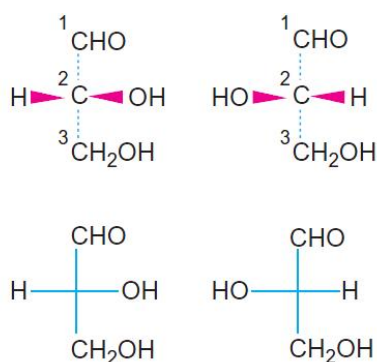


Figure 2 : Représentation de Fisher du glycéraldéhyde. [3]

2.1.2 Structure cyclique des oses :

La fonction aldéhydique ou cétonique d'un monosaccharide peut réagir avec une fonction alcool pour former un hémiacétal interne conférant à la molécule une structure cyclique.[6]

La cyclisation s'effectue entre le C₁ porteur de la fonction aldéhydique ou le C₂ porteur de la fonction cétonique et le C₅ porteur de la fonction hydroxyle, formant un cycle à six cotés appelé pyranose, dans le cas des aldohexoses, ou un cycle à 5 cotés (furanose) dans le cas des cétohexose. [8]



Figure 3 : Formes furane et pyranne. [3]

Les hémiacétals cycliques se forment très facilement et de nombreux glucides existent sous la forme d'un équilibre entre les formes ouvertes et cycliques. [2]

Pour illustrer ces deux formes cycliques la représentation de Haworth est adoptée où les radicaux tournés vers la droite dans la représentation linéaire sont en dessous du plan du cycle, et ceux tournés vers la gauche sont au-dessus. [9] Cette projection permet de créer un carbone asymétrique supplémentaire qui est le C₁ pour les aldoses et le C₂ pour les cétooses (carbone anomérique). Selon la position de l'hydrogène et de l'hydroxyle sur le carbone anomérique on distingue deux types d'anomères (α et β). Dans la configuration α, le groupement hydroxyle anomérique et le carbone C₆ sont situés de part et d'autre du plan du cycle alors que dans la configuration β ils sont du même côté. [8] (fig4)

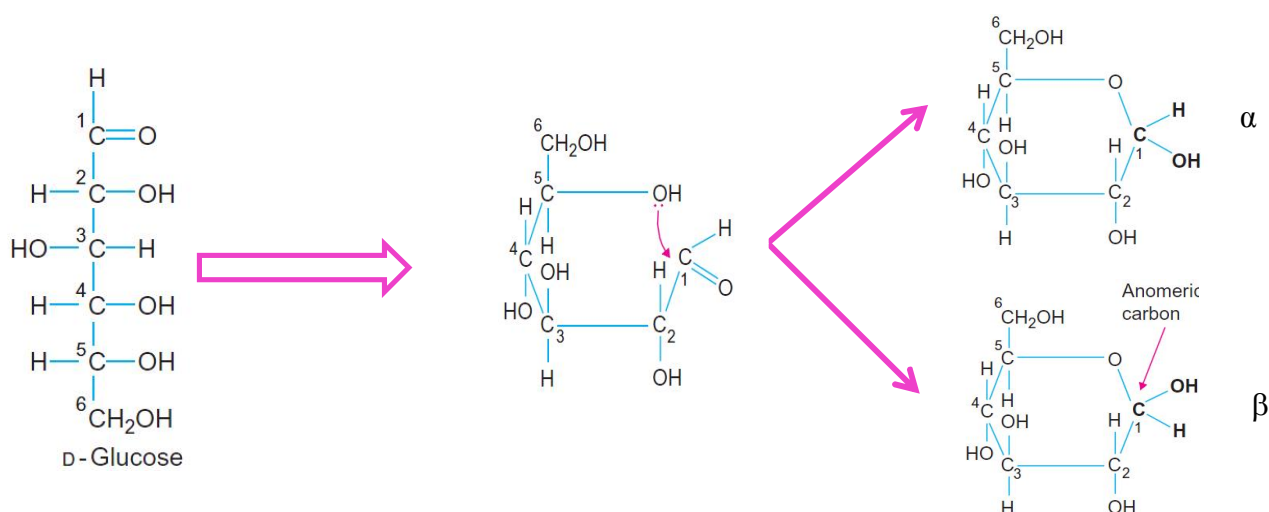


Figure 4 : Cyclisation du Glucose. [3]

2.1.3 Conformation de la forme cyclique : (chaise et bateau)

La forme pyranose à une forme très voisine de celle du cyclohexane, elle se présente sous 2 conformations possibles en raison des angles de valence de l'atome de carbone, une conformation chaise (plus stable) et une conformation bateau, [6], Cela permet aussi de justifier que la forme β est plus stable que la forme α. [7]

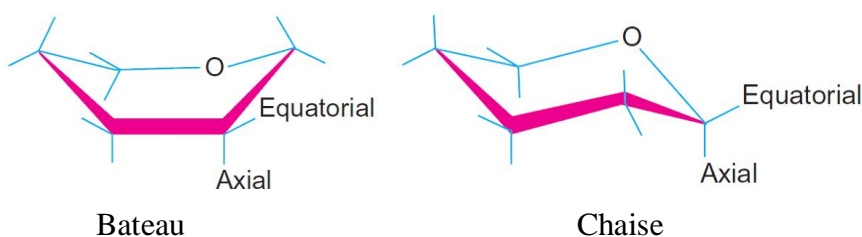


Figure 5 : Conformations chaise et bateau. [3]

2.2 Nomenclature des oses :

La nomenclature des oses s'effectuent en précisant la nature de l'anomère (α ou β), l'appartenance à la série D ou L, le pouvoir rotatoire suivi du nom de l'ose.

2.3 Isomérisation des oses :

Tous les oses à l'exception du dihydroxyacétone possèdent dans leurs structures un ou plusieurs carbones asymétriques C*, Ils peuvent ainsi avoir un ou plusieurs stéréo-isomères possibles[3], dont le nombre est égale à 2^n . [10]

Les deux formes D et L sont l'image l'une de l'autre dans le miroir, elles représentent un couple d'**énantiomères** dont les propriétés physiques et chimiques sont presque identiques. [11]

Les isomères qui diffèrent par des changements de configuration des groupements OH et H situés sur l'un des carbones sont des **epimères**. [5]

On appelle **anomère** deux sucres cycliques qui ne diffèrent que par la configuration du Carbone anomérique. [2]

2.4 Propriétés des oses :

2.4.1 Propriétés physiques :

- ❖ **Pouvoir rotatoire** : Le fait de posséder plusieurs carbones asymétriques leur confère un pouvoir rotatoire, dextrogyre pour les uns, lévogyre pour les autres qui s'exprime par les signes « + » ou « - » : D(+) glucose (dextrose) ou D(-) fructose (lévulose). [12]
- ❖ **Phénomène de mutarotation** : Les formes α et β d'un même ose sont en équilibre. Le passage d'une forme à l'autre nécessite l'ouverture du cycle. L'ensemble des réactions permettant de passer d'un anomère à l'autre s'appelle la mutarotation. [9]
- ❖ **Indice de réfraction** : Le RI varie avec la nature du composé, la température, la longueur d'onde, et la concentration du composé. En tenant constante les trois premières variables, la concentration peut être déterminée en mesurant le RI.[13]

2.4.2 Propriétés chimiques :

Les principales propriétés chimiques des monosaccharides peuvent se résumer de la manière suivante :

- ❖ Réducteurs par leur fonction carbonyle;
- ❖ Estérifiables par leurs fonctions alcooliques ;
- ❖ Alkylables par leur fonction semi-acétalique ; [12]
- ❖ Isomérisation en milieu alcalin ;

- ❖ Déshydratation en milieu acide fort et à chaud : L'action d'un acide concentré et à chaud, provoque le départ de plusieurs molécules d'eau en formant des dérivés hétérocycliques déshydrogénés (furfural et dérivés) différents selon la nature de l'ose, ces composés réagissent avec les phénols pour donner des composés colorés.
 - L' α naphтол, coloration rouge bordeaux avec les oses (réaction de Molish).
 - Le résorcinol, coloration rouge avec les cétooses (réaction de Selivanoff).
 - L'orcinol, coloration bleue violacée avec des pentoses (réaction de Bial). [9]

3 Les osides:

Les osides sont des molécules dont l'hydrolyse libère un ou plusieurs oses simples.[14]
Suivant les carbones impliqués dans la liaison osidique on distinguera des osides réducteurs et non réducteurs. [4]

- Les osides non réducteurs : La liaison osidique se fait entre les groupes réducteurs des oses.
- les osides réducteurs : La liaison osidique se fait entre le groupe réducteur d'un ose et une fonction alcool de l'autre laissant sur la molécule un groupe réducteurs. [4]

La classification des osides se fait suivant leurs constitutions.

3.1 Les holosides :

Libération d'oses simples après hydrolyse. Selon le nombre de molécules d'oses libérées lors de l'hydrolyse on distingue :

3.1.1 Les disaccharides:

Constitués par deux unités mono sacchariques liées entre elles par une liaison osidique (Saccharose, Lactose, Lactulose,...).

3.1.2 Les oligosaccharides:

Résultent de la combinaison entre 3-10 unités d'oses simples liées par des liaisons osidiques (Raffinose, Stachyose,...). [15]

3.1.3 Les polysaccharides:

Résultent de la condensation d'un grand nombre de molécules d'oses liées par des liaisons osidiques (Cellulose, Héparine,...).

3.2 Les hétérosides :

La fonction semi acétalique d'un ose peut réagir avec un composé qui n'est pas de nature glucidique, on obtient alors un hétéroside. La coupole non osidique est appelée aglycone (Aloïnes, Digoxine,...).

Les glucides trouvent une application dans l'industrie agroalimentaire ainsi que dans l'industrie pharmaceutique où ils sont majoritairement utilisés autant qu'excipients. Certains glucides sont utilisés autant que principe actif tel que le lactulose.



CHAPITRE II

CHAPITRE II : LACTULOSE

Le lactulose est un disaccharide utilisé dans l'industrie pharmaceutique autant que principe actif pour son effet thérapeutique dans la production de laxatifs, tels que DUPHALAC de SOLVAY pharma qui se présente sous forme de sachet buvable, EZILAX de EL KENDI et Lactulose AGD de SAIDAL qui se présentent sous forme de sirop.

1 Définition :

Le lactulose *4-O-β-D-galactopyranosyl-D-fructofuranose* est un disaccharide synthétique, isomère du lactose composé de deux sucres, le galactose et le fructose, liés par une liaison osidique β (1-4).[16]

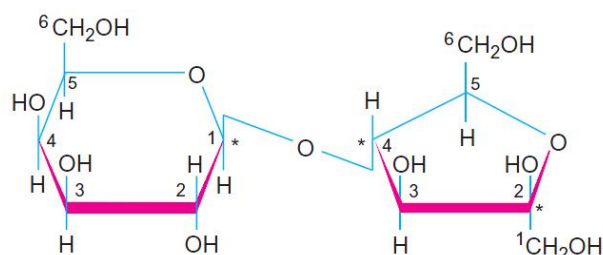


Figure 6 : Représentation du lactulose. [17]

2 Propriétés du lactulose :

Les propriétés du lactulose sous ses deux formes (poudre et liquide) sont citées dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Propriétés du lactulose [18]

| | Lactulose liquide | Lactulose en poudre (anhydre) |
|------------------------------|--|--|
| Nomenclature | 4-O-(β-D-galactopyranosyl)-D-arabinohex-2-ulofuranose | |
| Formule général | C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ | |
| Masse molaire (g/mol) | 342,3 | |
| Teneur (%) | 95,0 - 105,0 | 95,0 - 102,0 |
| Aspect | liquide limpide, visqueux, incolore à jaune-brun pâle, | poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche |
| Solubilité | miscible à l'eau | facilement soluble dans l'eau, |
| | Assez soluble dans le méthanol et pratiquement insoluble dans le toluène et l'éther. | |
| Température de fusion | 168 °C. | |

3 Production du lactulose:

Le lactulose peut être produit par l'isomérisation du lactose avec passage d'une forme aldose vers une forme cétones en employant un catalyseur chimique ou enzymatique.

3.1 Production par voie chimique :

La technologie de production du lactulose est principalement basée sur la réaction d'isomérisation du lactose dans des milieux alcalins. La réaction de Lobry de Bruyne Ekenstein propose un mécanisme pour cette transformation avec formation d'une forme intermédiaire énolique du lactose (epilactose), et la transformation du glucose de la molécule de lactose en fructose donnant une molécule de lactulose. [19]

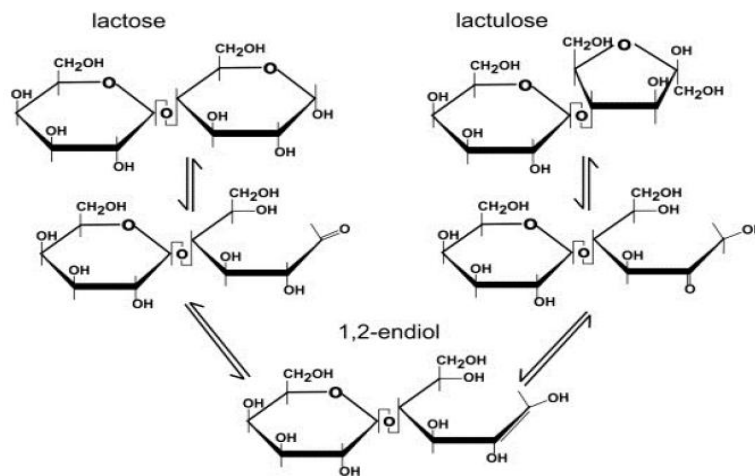


Figure 7: Isomérisation du lactose suivant la réaction de Lobry de Bruyne Ekenstein. [20]

3.2 Production par voie enzymatique :

Cette méthode est basée sur la synthèse enzymatique du lactulose en utilisant la β -galactosidase qui est un biocatalyseur bien connu pour la réaction de trans-galactosylation et pour la synthèse de dérivés à base de lactose comprenant des galacto-oligosaccharides β . [16]

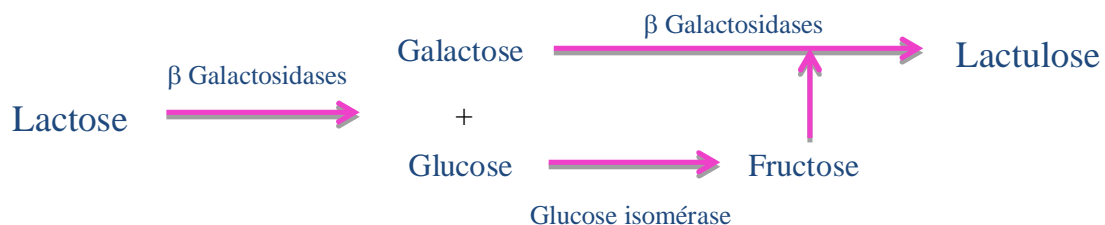


Figure 8 : Isomérisation enzymatique du lactulose.

Le lactulose est généralement obtenu sous forme de sirop en présence d'autres sucres tels que le lactose, l'epilactose, le fructose, et le galactose. le processus de fabrication des cristaux de

lactulose implique la purification du sirop par chromatographie suivi d'une cristallisation, séparation et de séchage. [21]

4 Effets physiologiques du lactulose :

La liaison β -glycosidique du lactulose n'est pas hydrolysée par les enzymes digestives des mammifères, ce qui permet au lactulose ingéré de passer dans l'estomac et l'intestin sans qu'il se dégrade. Il est métabolisé dans le côlon par quelques espèces de la flore microbienne qui montrent une activité semblable à celle de la β -galactosidase.

Ce métabolisme sélectif de lactulose change l'équilibre microbien et la composition biochimique du contenu caecal. [22]

5 Indications thérapeutiques:

Le lactulose est indiqué dans le traitement symptomatique de la constipation et également dans le traitement de l'encéphalopathie-hépatique. Il a aussi des propriétés prebiotique parce qu'il stimule la croissance des bactéries salutaires dans l'appareil gastro intestinal (bifidobacteria ; lactobacilles) et empêche l'existence de bactéries pathogènes (salmonelles), (16) changeant ainsi l'équilibre microbien vers une composition plus saine qui mène à un état de santé amélioré. [22]

6 Pharmacodynamie:

Le lactulose agit en augmentant l'hydratation et le volume du contenu colique par effet osmotique. Dans le côlon la transformation du lactulose en acides organiques abaissent le pH du contenu colique, entraînant ainsi la réduction de l'absorption de l'ammoniac. [23]

7 Pharmacocinétique :

Le lactulose traverse sans modification et sans résorption les parties hautes du tube digestif. Au niveau du côlon, sous l'effet de la flore saccharolytique locale, il est transformé en acides organiques (lactique et acétique), qui sont éliminés dans les selles. [23]

8 Dégradation du lactulose:

Le lactulose peut être dégradé en galactose et en fructose soit par hydrolyse :

- **Chimique:** Basée sur une hydrolyse acide, en présence d'acide fort (HCl ; H₂SO₄) à chaud. [24]
- **Enzymatique :** Basée sur l'utilisation de la β -galactosidase. [25]

9 Détermination du lactulose :

Plusieurs méthodes ont été développées pour la détermination du lactulose telle que La CPG, CCM, HPLC, électrophorèse par capillarité ... , En outre une analyse spectrophotométrique simple a été également développée pour la quantification du lactulose dans les préparations pharmaceutiques. [16]



CHAPITRE III

Plusieurs méthodes d'analyses peuvent être utilisées pour la détermination et / ou le dosage d'un médicament dans le cadre des opérations de contrôle qualité. Les méthodes les plus utilisées sont L'HPLC et la spectrophotométrie UV/ Vis.

I. Partie 1 : Méthodes chromatographiques

1 Principe :

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants présents dans des mélanges variés. Elle sert en analyse à des fins d'identification et de quantification.

Le principe de base repose sur les équilibres de concentration qui apparaissent lorsqu'un composé est mis en présence de deux phases, l'une stationnaire et l'autre mobile se déplaçant au contact de la première. (26)

Chaque soluté injecté sur la colonne est soumis à deux effets antagonistes un effet d'entraînement par la PM dans laquelle il est soluble et un effet de rétention par la PS avec laquelle il interagit (27). Si plusieurs composés sont présents ils se trouvent entraînés à des vitesses différentes provoquant leurs séparations. (26)

2 Classification des techniques chromatographiques :

Les techniques chromatographiques peuvent être réparties suivant plusieurs critères :

- En fonction de la nature des deux phases en présence ;
- Du procédé utilisé ;
- Du phénomène physico chimique. (26)

Les différentes techniques chromatographiques sont :

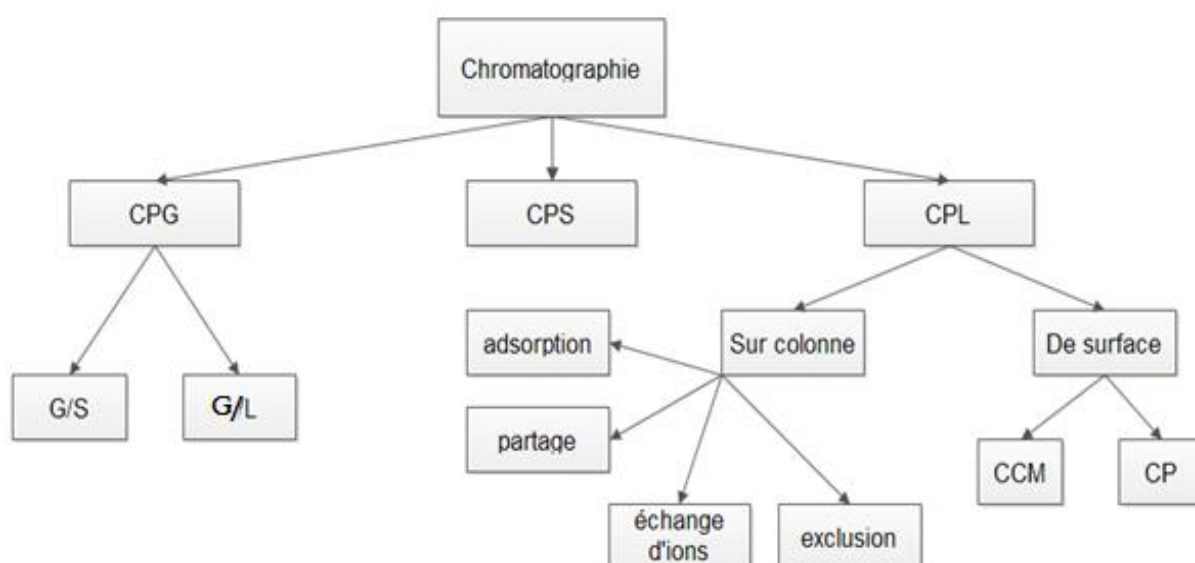


Figure 9 : Différentes techniques chromatographiques.

3 La Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC):

L'HPLC est une forme moderne de CPL, dont les performances se sont trouvées grandement améliorées par la miniaturisation et la mise au point de nouvelles PS, celles-ci formées de micro particules génèrent des colonnes garnies très compactes qui imposent l'emploi en tête de colonne de fortes pressions pour assurer un écoulement suffisant de la PM. (26)

L'HPLC peut être appliquée pour l'analyse de n'importe quel composé ayant une solubilité dans un liquide qui peut être utilisé comme PM. (28)

3.1 Avantages de l'HPLC :

- Rapidité (plusieurs analyses peuvent être accomplies en 30 min) ;
- Une grande variété de phase stationnaire ;
- Amélioration de la résolution ;
- Une plus grande sensibilité (différents détecteurs peuvent être utilisés) ;
- Récupération facile de l'échantillon (moins de volume d'éluant à retirer). (28)

3.2 Techniques de séparations utilisées en HPLC. :

Plusieurs techniques de séparation sont utilisées en HPLC, nous allons citer quelques-unes de ces techniques dans le tableau suivant : (29)

Tableau 2 : Différentes techniques de séparation en HPLC.

| Type | PS | PM | interaction | Exemple d'utilisation |
|----------------|--------------------------|----------------|--------------------|---|
| RP-HPLC | Non polaire | Polaire | Forces hydrophobes | Protéines végétale |
| IPL | Non polaire | Paire d'ion RP | Hydrophobes | Composés ioniques ou fortement polaires (glucides) |
| HILIC | polaire | Moins polaire | | Composés polaires peu acide ou basique (acides aminées, glucides, protéine) |
| NPC | polaire | Non polaire | | |
| Echange d'ions | Résine échangeurs d'ions | | | Espèces neutres en eux et ioniques Ions inorganiques, acides aminées |

3.3 Appareillage :

En raison des pressions élevées nécessaires pour assurer des débits raisonnables, l'appareillage requis est considérablement plus élaboré et coûteux que celui utilisé pour les autres types de chromatographies. (30)

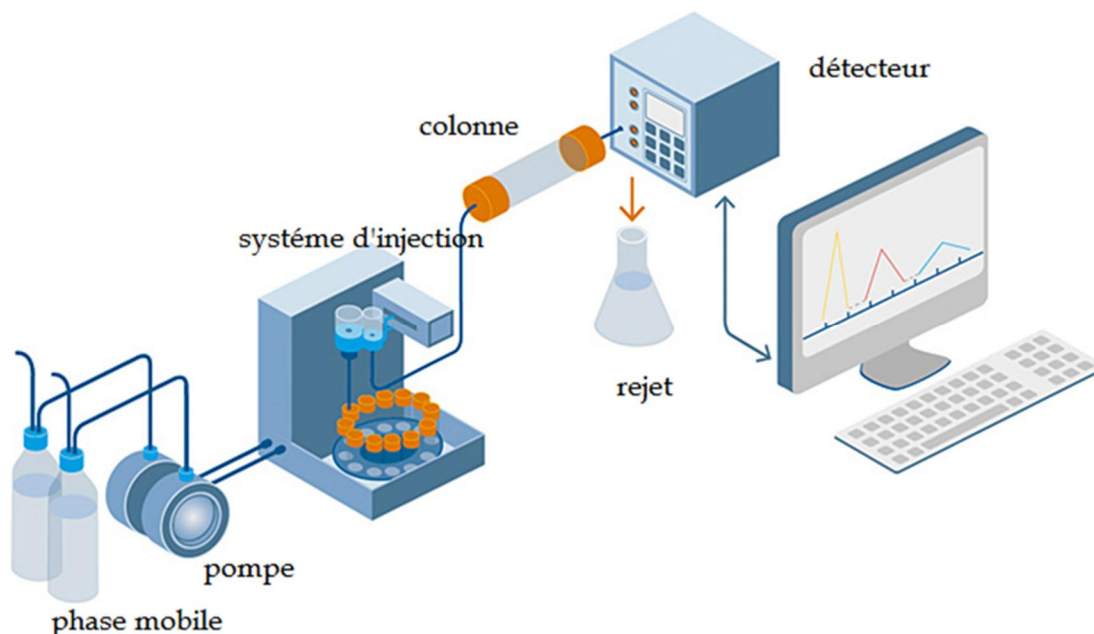


Figure 10 : Schéma d'un appareil de HPLC.

3.3.1 Réservoirs de phases mobiles et dispositifs de traitement du solvant :

Réservoirs en verre ou en acier inoxydable, contenant au moins 500 ml de solvant.

Des dispositifs qui permettent d'en éliminer les poussières et les gaz dissous sont souvent joints. (30)

L'éluion effectuée avec un seul solvant de composition constante est dite isocratique. Deux ou parfois plusieurs solvants de polarité différentes sont employés, lors des éluions avec programmation (Gradient d'éluion).

3.3.2 Phase mobile :

La nature de la PM est l'un des paramètres clef qui influence la rétention et la sélectivité. Les principales exigences pour un éluent en HPLC sont la viscosité, la pureté, la transparence dans l'UV, indice de réfraction, inertie. (26)

3.3.3 Les dispositifs de pompage :

Fournissent un écoulement constant et continu de la PM à travers le système. (31)

Les pompes requises doivent répondre à des exigences rigoureuses

- Obtention de pression allant jusqu'à 420 bars ;
- Absence de pulsation ;

- Débit compris entre 0.1 ml et 10 ml / min ;
- Contrôle du débit supérieur à 0.5 % ;
- Résistance à la corrosion quel que soit le solvant. (30)

On rencontre trois types de pompes, possédant chacune ses propres avantages et inconvénients :

- Pompes alternatives ;
- Seringue commandées par vis ;
- Pompes pneumatique ou pompe à pression constante. (26)

3.3.4 Systèmes d'injection de l'échantillon :

Permet l'introduction de l'échantillon dans le flot de la PM avant son introduction dans la colonne. (31)

L'injection d'un volume précis de l'échantillon en tête de colonne doit se faire en un temps bref afin de perturber le moins possible le régime de circulation de la PM qui doit être stable de la colonne au détecteur. On utilise pour ce faire une vanne haute pression à plusieurs voies, manuelle ou motorisée dans le cas des injecteurs automatique, placé juste avant la colonne. (26)

Les injecteurs modernes sont des échantillonneurs automatiques, ce qui permet une injection programmée de différents volumes d'échantillons. (31)

3.3.5 Colonne de chromatographie liquide :

Les colonnes HPLC sont habituellement en acier inoxydable. Des tubes en verre à paroi épaisse sont parfois utilisés dans le domaine des basses pressions (< 40 bars), (29) rempli avec la PS. La longueur et le diamètre peuvent être très variables. (26)

- Colonne analytique ;
- Colonne de garde ;
- Colonne thermostatées. (32)

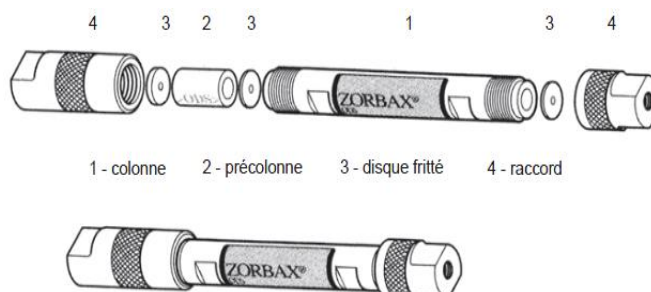


Figure 11 : Colonne standard et précolonne d'HPLC. (26)

3.3.6 Phase stationnaire :

Constituée de microparticules sphériques ou d'un solide poreux dont la surface au contact de la PM atteint plusieurs centaines de m^2 par grammes, favorisant ainsi les mécanismes de partition avec les différents solutés présents. (26)

3.3.7 Les détecteurs :

Un détecteur converti une propriété physique mesurable de l'échantillon dans la PM en un signal analytique. (33) Ce signal dépend de la concentration du composé mesuré, et est enregistré autant que fonction du temps.

Le choix du détecteur est souvent dicté par les propriétés chimiques des espèces en présence dans l'analyte. (34)

Le détecteur doit réunir un certain nombre de qualités :

- Donner pour chaque composé détecté une réponse proportionnelle à sa concentration instantanée ;
- Être sensible ;
- Avoir un bruit de fond de faible amplitude ;
- Être stable dans le temps ;
- Être éventuellement utilisable en gradient d'élution. (26)

Les modes de détection les plus courants reposent sur les propriétés optiques des composés : absorption, fluorescence et indice de réfraction.

Les différents détecteurs qui peuvent être observés en HPLC sont :

- ✓ Détecteurs spectrophotométriques: Détection basée sur la loi de Beer Lambert. Elle correspond à une détection sélective, (26) les limites de ce système sont les absorptions propres du solvant et du soluté. (35)
- ✓ Détecteurs de fluorescence : Détecteurs très sensibles et très sélectifs (35) , les composés fluorescents réémettent sous forme de radiation lumineuses une fraction plus ou moins grande du rayonnement auquel ils sont soumis. l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la concentration. de la substance. (26)
- ✓ Détecteurs réfractométriques : Mesurent en continue la différence d'indice de réfraction entre la PM et l'effluent de la colonne. Ces détecteurs sont considérés comme quasi universel. (26) De plus ils sont fiables et indépendant du débit. ils sont néanmoins très sensibles à la température, ne peuvent être utilisés qu'avec une élution isocratique et sont moins sensibles que la plupart

des autres détecteurs. (32) Ils sont largement utilisés dans le cas des analytes qui ne contiennent pas de groupement chromophores absorbant dans l'UV, telles que les carbohydrates et les lipides présents en grande concentration. (28)

- ✓ Détecteurs électrochimiques : Fonctionnement basée sur l'ampérométrie, la polarographie, la couloumétrie et la mesure de conductivité. (32)

3.4 Applications de l'HPLC:

Les applications sont innombrables. La méthode permet de séparer des composés de masse molaire variables, de natures chimiques différentes et même différents types d'isomères. L'HPLC est un très bon complément de la GC pour : (35)

- Les substances peu volatiles ;
- Les substances thermolabiles ;
- Substances ionisées.

Elle couvre tous les domaines d'applications :

- ✓ Analyse des résidus, des additifs ou des toxines (agroalimentaire) ;
- ✓ Recherche d'impuretés (pharmaceutique) ;
- ✓ Analyse quantitative et identification du principe actif (pharmaceutique).

3.4.1 Analyse quantitative :

Le développement considérable pris par la chromatographie en analyse quantitative est dû essentiellement à sa fiabilité et à sa précision.

La relation entre la masse injectée de l'analyte dans la colonne et l'aire du pic correspondant sur le chromatogramme conduit à une méthode comparative, utilisée dans beaucoup de protocoles normalisés de dosages. (26)

Principe : (26)

Pour calculer la concentration massique d'un composé responsable d'un pic sur le chromatogramme il faut réunir deux conditions :

- Disposer d'un échantillon authentique du composé que l'on veut doser, à usage de référence ;
- Disposer d'un moyen logiciel ou autre, pour connaître soit les hauteurs soit les aires des différents pics d'élution d'intérêt.

Toutes les méthodes de quantification en chromatographie sont donc des méthodes comparatives et non pas absolues.

Il existe plusieurs méthodes pour déterminer les concentrations : toutes sont basées sur la relation reliant l'air A_i du pic i élué à la masse m_i .

$$m_i = K_i A_i$$

On distingue 3 méthodes principales :

- La normalisation interne : Les aires des pics d'éluion sont comparées au cours d'une même injection.
- L'étalonnage externe : Sur deux chromatogrammes, L'aire du pic d'éluion de la substance de référence est comparée à celle du produit à analyser.
- L'étalonnage interne : Les aires des pics de la substance de référence et du produit à analyser sont comparées à la surface du pic d'éluion d'un produit témoin appelé étalon interne ajouté lors de l'analyse et de l'étalonnage.

II. Partie 2 : Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible

1 Généralités :

1.1 Domaine et longueur d'onde :

Les radiations UV/Visible constituent une petite partie du spectre électromagnétique dont l'énergie associée est définie par l'équation suivante. (36)

$$E = h\nu$$

h : constante de Planck $h = 6,62 \times 10^{-34} \text{ m}^2 \text{ kg} / \text{s}$

ν : Fréquence (s^{-1})

Le principe de la spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible repose sur l'absorption du rayonnement par les molécules dans le domaine allant de 190-800. (37)

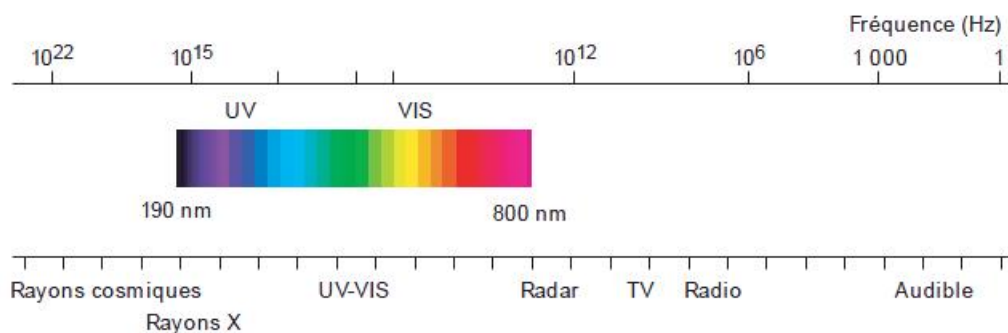


Figure 12 : Domaine spectral du rayonnement électromagnétique. (37)

L'absorption de la lumière dans le domaine spectral a pour origine l'interaction des photons de la source lumineuse avec les électrons des liaisons des espèces présentes dans l'échantillon observé. (26)

Selon la théorie quantique chaque particule élémentaire possède un ensemble unique d'états énergétiques. L'état dont le niveau énergétique est le plus bas est l'état fondamental. (30)

2.1 Transitions électroniques :

Lorsque un photon passe au voisinage d'une particule, il peut être absorbé si (et seulement si) l'énergie du photon est exactement égale à la différence d'énergie entre l'état fondamental et un état d'énergie plus élevé de la particule. (30) Le nombre de photons absorbés entraînent une diminution de l'intensité du rayonnement UV-Visible transmis par le milieu. (37)

Lorsque les molécules sont excitées par un rayonnement UV-Visible elles subissent trois types de transitions quantifiées : (30)

- Transition électronique ;
- Transition vibrationnelle ;
- Transition rotationnelle.

L'énergie potentielle totale de la molécule est généralement représentée comme la somme de ses énergies : électronique, vibrationnelle, rotationnelle. (36)

$$E_{\text{total}} = E_{\text{électronique}} + E_{\text{vibrationnelle}} + E_{\text{rotationnelle}}$$

$$E_{\text{électronique}} > E_{\text{vibrationnelle}} > E_{\text{rotationnelle}}$$

L'origine d'une transition électronique est le passage d'un électron sur une orbitale de niveau énergétique plus élevé que l'initial. (35)

Les transitions électroniques impliquées, sont représentées dans la figure suivante :

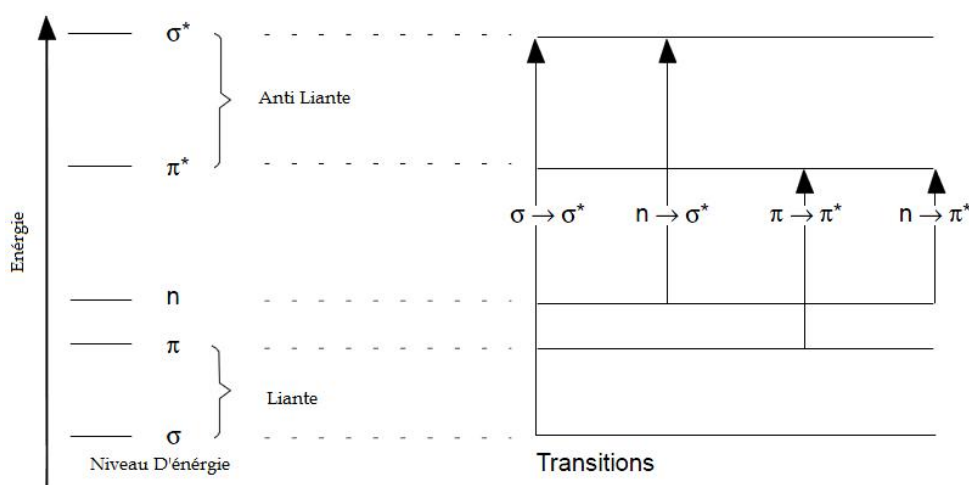


Figure 13 : Transitions électroniques dans l'ultraviolet et le visible.

Les liaisons non liantes « n » tendent à être d'énergie plus faible que les liaisons « π » qui sont à leurs tours plus faible que les liaisons « σ ».

Quand une radiation électromagnétique de bonne fréquence est absorbée, une transition se produit d'une des 3 orbitales à une orbitale vacante, généralement une orbitale anti liante.

Comme la plus part des transitions d'une orbitale liante ont une fréquence trop élevée pour être facilement mesurée, (38) les absorptions suivantes sont majoritairement observées.



2 Appareillage :

Un spectrophotomètre est constitué schématiquement de :

1. Une source lumineuse ;
2. Un sélecteur de longueur d'onde (monochromateur) ;
3. Une cellule de mesure ;
4. Système de mesure de l'intensité lumineuse (détecteur) ;
5. Dispositif d'affichage et de traitement du signal.

2.1 Source de rayonnement :

Les lampes produisent un rayonnement lumineux de spectre continu qui est filtré par un monochromateur. Les photons sont obtenus par décharges électriques dans un gaz. (35)

Les sources de rayonnement sont constituées généralement de deux lampes pour couvrir tout le domaine UV-Vis. (37)

- Une lampe à arc au deutérium sous moyenne pression pour la partie UV < 350nm ;
- Une lampe à incandescence avec un filament de tungstène et une enveloppe de verre de silice (quartz) pour la partie visible du spectre et au-delà. (26)

Dans certains cas une seule lampe peut être utilisée comme la lampe à xénon à haute pression dont le spectre couvre tout le domaine UV-Vis. (37)

2.2 Sélecteur de longueur d'onde (monochromateur) : (35)

Le rôle d'un monochromateur est de décomposer la lumière polychromatique fournie par la lampe en ses différents constituants et de sélectionner une bande spectrale très étroite de longueur d'onde donnée, ce qui nous permet d'avoir un rayonnement monochromatique. Celui-ci est constitué :

- D'une fente d'entrée ;
- D'un système de dispersion (prisme ou réseau concave ou holographique) ;
- D'une fente de sortie pour sélectionner la longueur d'onde.

2.3 Cellules : (35)

Les cellules d'analyse se présentent sous forme de parallélépipède à base carrée de 1 cm de trajet optique ayant deux faces opposées polies, elles contiennent de 1 à 3ml de solution.

Trois types de matériaux sont utilisés dans leurs fabrications :

- Diverses variétés de SiO_2 transparentes à partir de 200 nm ;(quartz).
- Des verres optiques (silicates, borosilicates) utilisables à partir de 320 nm ;
- Des matières plastiques variées pour les tubes et cuves à usage unique et utilisable à partir de 300 nm pour le plexiglas ou polystyrène.

2.4 Système de mesure de l'intensité lumineuse (détecteur) : (35)

Le détecteur convertit en un signal électrique l'intensité de la radiation lumineuse qui l'atteint. Il doit fournir une réponse linéaire sur une large gamme avec un faible bruit de fond et une sensibilité élevée, celle-ci dépend de la longueur d'onde.

2.5 Dispositif d'affichage et de traitement du signal : (35)

Un dispositif électronique amplifie les signaux électriques du détecteur trop faible pour être mesurés directement, l'affichage se présente soit sous forme digitale, sous forme d'échelles pour la transmittance et l'absorbance ou sur écran d'ordinateur.

3. Catégorie de spectrophotomètre :

On peut classer les appareils en deux catégories :

- Les appareils à simple faisceau, eux-mêmes subdivisés en appareils à montage optique direct ou à montage optique inversé ;
- Les appareils à double faisceau, à montage optique direct. (37)

3.1 Appareils à simple faisceau :

❖ Spectrophotomètre mono faisceau à optique directe :

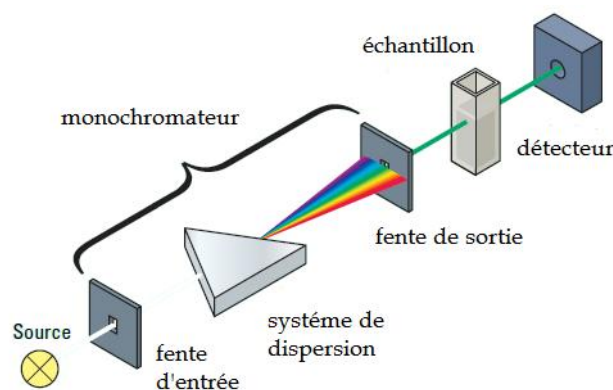


Figure 14 : Spectrophotomètre simple à optique directe.(37)

L'intensité du blanc et celle de l'échantillon sont mesurées consécutivement dans un intervalle de temps de quelques secondes à quelques minutes. Si l'intervalle est trop long, des variations d'intensité de la source lumineuse produisent des erreurs non négligeables sur les résultats. (37)

La lumière blanche polychromatique est décomposée dans le monochromateur (35) avant qu'elle n'atteigne l'échantillon, ce qui permet de stabiliser l'intensité de la source. (26)

❖ Spectrophotomètre mono faisceau à optique inverse de type multicanaux :

Une lumière blanche polychromatique traverse l'échantillon avant d'être dispersée à l'aide d'un prisme ou d'un réseau en ses différentes composantes. (35)

Ce type d'appareil est apparenté aux spectrographes dans la mesure où il permet l'observation instantanée de toute l'étendue du spectre par l'emploi d'un détecteur composé d'un alignement de photodiodes miniaturisée. Un tel détecteur réalise une exploration séquentielle très rapide, considéré comme quasi simultanée de toute une gamme spectrale en $1/10^6$ de seconde. (26)

3.2 Appareils à double faisceau :

Deux faisceaux sont formé par un miroir en forme de V, appelée diviseur de faisceau. Un faisceau traverse la solution de référence jusqu'à un photodétecteur, tandis que le second traverse l'échantillon jusqu'au second photodétecteur apparié au premier. Les deux signaux de sortie sont amplifiés et leur rapport est déterminé électroniquement et affiché par le dispositif de lecture. (32)

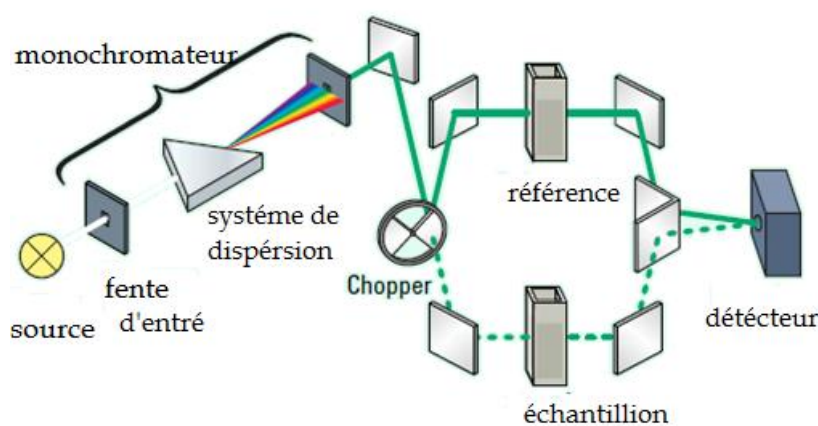


Figure 15 : Spectrophotomètre double faisceau. (37)

4. Application analytique :

La spectroscopie UV-Vis a toujours eu un double rôle dans l'analyse des composés organiques et inorganiques : (Analyse qualitative et Analyse quantitative).

4.1 Analyse qualitative :

La méthode détecte les groupements fonctionnels chromophores mais ne présente cependant pas de structure suffisamment fine pour permettre l'identification certaine d'un analyte. (30) Elle doit toujours être complétée par d'autres informations physiques d'origine spectral (IR, RMN, masse) ou chimiques comme les point de fusion, d'ébullition, réaction colorés. (35)

4.2 Analyse quantitative :

La spectroscopie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible est l'un des outils les plus utilisés en analyse quantitative. **(30)** L'absorption du rayonnement UV/visible par les molécules permet de mesurer leurs nombres dans le trajet du rayonnement. **(37)** Cette mesure se fait en utilisant des mélanges étalons de concentrations connues des molécules à doser. La quantité de rayonnement absorbée par ces étalons est déterminée par le spectrophotomètre.

A une longueur d'onde où la molécule absorbe, les mesures reposent sur la loi de BEER et LAMBERT qui relie dans certaines conditions l'absorption de la lumière à la concentration d'un composé en solution. **(26)**

Lois de BEER et LAMBERT :

$$I = I_0 e^{-\epsilon l C}$$

Ou encore :

$$A = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I}$$

$$T = I/I_0,$$

I_0 : Intensité du rayonnement monochromatique incident,

I : Intensité du rayonnement monochromatique transmis.

C : Concentration molaire de l'entité absorbante dans la solution (mol. L⁻¹)

ϵ : Coefficient d'absorption molaire de la substance en solution (L/mol·cm) à λ considérée.

l : Longueur du trajet optique (en cm), qui correspond à l'épaisseur de la cuve de mesure.

Transmittance T : La transmittance d'une solution est la fraction du rayonnement électromagnétique incident qui est transmis par un échantillon. **(30)**

Absorbance : L'absorbance augmente lorsque l'atténuation du faisceau augmente (la transmittance diminue). **(30)**

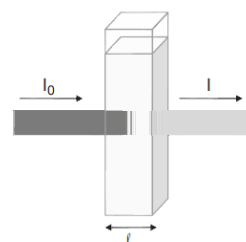


Figure 16 : Schéma d'une cellule.

$$A = -\log T$$

$$A = -\log T = -\log \frac{I}{I_0} = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon l c$$

Cette loi qui ne concerne que les fractions de la lumière absorbée n'est vérifiée que si l'ensemble des conditions suivantes sont respectées :

- La lumière utilisée est monochromatique ;
- Les concentrations doivent être faibles ;

- La solution ne doit être ni fluorescente ni hétérogène ;
- Le soluté ne doit pas donner lieu à des transformations photochimiques ;
- Le soluté ne doit pas donner d'associations variables avec le solvant. **(26)**

La loi de BEER LAMBERT est additive ce qui veut dire que lorsque plusieurs espèces absorbent à la même longueur d'onde, et qu'il n'y a pas d'interaction entre les espèces, l'absorbance mesurée va être égale à la somme des absorbances de chaque espèce.

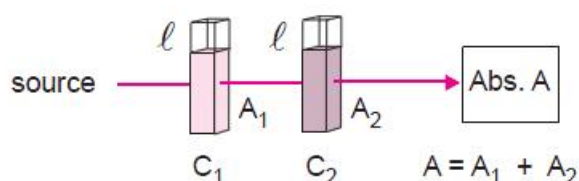


Figure 17 : Additivité des absorbances **(35)**

$$A = A_1 + A_2 = l (\epsilon_1 C_1 + \epsilon_2 C_2)$$

Cette équation est appliquée aux mélanges en utilisant les méthodes d'analyses multi-variables quand le nombre de constituants dépasse deux. **(26)**

4.2.1 Application aux espèces non absorbantes :

De nombreux analytes non absorbants peuvent être dosés par photométrie si on les fait réagir avec des réactifs chromophores pour former des produits absorbants dans l'ultraviolet et le visible, pour que le dosage soit quantitatif il faut que la réaction entre l'analyte et le réactif soit totale. **(30)**

4.2.2 Analyse multi variables :

L'approche d'une analyse multi-variables est basée sur la mesure à un nombre de longueurs d'onde égales au nombre de composés dans le mélange.

Les longueurs d'ondes choisies habituellement sont celles correspondant à un maximum d'absorbance de chaque composé.

L'absorbance du mélange à différentes longueurs d'ondes est la somme des absorbances de chaque composé à cette longueur d'onde, qui dépend du coefficient spécifique d'absorption et de la concentration de chaque composé. **(36)**



***PARTIE
PRATIQUE***

Le lactulose est un disaccharide, constitué d'une molécule de fructose et d'une molécule de galactose.

Plusieurs méthodes ont été rapportées pour la détermination du lactulose, principalement, des méthodes basées sur l'hydrolyse enzymatique, suivie d'une détermination spectrophotométrique, comme résumé dans le tableau qui suit :

Tableau 3 : Travaux antérieurs.

| N° | Année | Nature de l'échantillon | Substances analysées | Méthodes de traitement de l'échantillon | Méthodes d'analyses | Conditions opératoires | Références |
|----|-------|---------------------------------------|---|--|-------------------------------|--|------------|
| 1 | 1984 | Urine | lactulose | Hydrolyse enzymatique du lactulose avec du β galactosidase | Spectrophotométrie UV. | PH = 7.5 Spectrophotometer UV unicam SP8-400. $\lambda=340\text{nm}$. | (40) |
| 2 | 1991 | Lait et Produits laitiers chauffés | lactulose | Hydrolyse acide sous l'action du H_2SO_4 | Spectrophotométrie UV/V. | | (41) |
| 3 | 2000 | Lait | lactulose | Hydrolyse enzymatique avec du β galactosidase | Spectrophotométrie V. | Spectrophotomètre unicam 8625. $\lambda=570\text{nm}$. | (42) |
| 4 | 2003 | Echantillons alimentaires | Glucose Fructose Lactose | Oxydations avec du potassium ferricyanide | Spectrophotométrie vis | Spectrophotomètre (Shimadzu) $\lambda= 420\text{nm}$ Résultat analysée par des méthodes chemométrique | (43) |
| 5 | 2003 | Jus de fruit boissons non alcoolisées | Glucose Fructose Sucrose Lactose | Sodium tetraborate deca hydrate + eau + hydroxydes de sodium | Spectrophotométrie UV | PH= 9 Spectrophotomètre anthelie version 4.1.f $\lambda=268\text{nm}$ | (44) |
| 6 | 2004 | Lait | lactulose | Hydrolyse enzymatique avec β galactosidase | Spectrophotométrie V. | Spectrophotomètre UV/V varian DMS $\lambda= 570 \text{ nm}$ | (45) |
| 7 | 2004 | Lactulose commercial | lactulose | Hydrolyse acide avec du H_2SO_4 | Spectrophotométrie UV | Spectrophotomètre UV/V $\lambda=284 \text{ nm}$ H_2SO_4 (6N) | (46) |
| 8 | 2006 | Lactulose commercial | lactulose | Hydrolyse acide avec du HCl | Spectrophotométrie UV-visible | Spectrophotomètre UV/V $\lambda=480 \text{ nm}$ $\lambda=398 \text{ nm}$ | (24) |

La plus part de ces méthodes sont utilisées pour l'analyse du lactulose dans les produits de grande consommation.

Le but du présent travail est de mettre en pratique une méthode spectrophotométrique, simple et économique, pour la détermination du lactulose dans les préparations pharmaceutiques, qui est décrite et validée dans l'article 8 et de la comparer par la suite à la méthode monographiée dans la pharmacopée européenne.



CHAPITRE IV

1 Matériels

1.1 Matières première et réactifs :

- Lactulose commercial : Lactulose-AGD® à 66.7 %, fourni par AGD Pharm : c'est du lactulose liquide, qui, selon la pharmacopée européenne, est composé d'au moins 62g/l de lactulose, mais il peut contenir d'autres sucres tels que : le lactose, l'épilactose, le galactose et le tagatose.

Numéro de lot : 033 ;

Fabrication : 06/2011 ;

Péremption : 05/2014 ;

Fabriqué par Sidal Biotic usine Cherchel pour AGD Pharm.

- Principe actif :
Lactulose en poudre fourni gracieusement par monsieur GUERMOUCHE (fournisseur Freesinius Kabi).
- HCl 36.5-38 % SIGMA ALDRICH.
- Résorcinol 99% fourni par le laboratoire AGD Pharm.

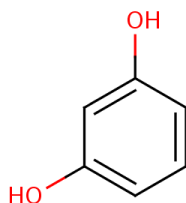


Figure 18 : Représentation de la molécule de résorcinol.

1.2 Appareillages et équipements :

- Hotte type Kotterman.
- Bain marie.
- Balance analytique type Denver Instrument.



Figure 19 : Balance analytique.

- Spectrophotomètre UV-Visible UV-120-01 Shimadzu.



Figure 20 : Spectrophotomètre UV Visible.

1.3 Verreries :

- Fioles jaugées: 50 ml ; 100 ml.
- Erlenmeyers.
- Pipettes jaugées: 4ml ; 5 ml ; 10 ml.
- Pro pipette.
- Béchers.

2 Méthodes :

2.1 Dosage par UV Visible :

2.1.1 Préparation des solutions :

➤ **Préparation de la solution de résorcinol (0.05%) :**

Dissoudre 0.05 g (50 mg) de résorcinol dans 100 ml de HCl concentré.

➤ **Solution standard :**

Dissoudre 0.5 g (500mg) de lactulose en poudre dans 100 ml d'eau distillée. Pour obtenir une solution de 5000 μ g/ml.

➤ **Solution échantillon :**

Préparer une solution échantillon de 250 μ g/ml en diluant le sirop (Lactulose AGD^o) dans de l'eau distillée.

➤ **Préparation du blanc :**

Mélanger 5 ml d'eau distillée avec 4 ml de la solution de résorcinol pour une lecture à 480 nm.

2.1.2 Optimisation de la méthode : [24]

2.1.2.1 Détermination de la longueur d'onde d'absorption :

La solution de résorcinol a été ajoutée à la solution standard puis chauffé dans un bain marie pendant 15 min.

La solution rouge-orangée obtenue a subi un balayage spectral entre 200 et 800nm, pour choisir la longueur d'onde pour laquelle on a l'absorption maximale.

2.1.2.2 Optimisation de la concentration de la solution de résorcinol:

- Préparer plusieurs solutions de résorcinol de concentrations variant entre (0.01-0.2 %) ;
- Ajouter 4 ml de ces solutions à 5 ml d'une solution de lactulose ;
- Chauffer dans un bain marie pendant 15 min.
- Effectuer une lecture d'absorbance à 480 nm et à 398 nm.

2.1.2.3 Optimisation du volume de résorcinol (0.05%):

- Mélanger des volumes différents (1-8 ml) de la solution de résorcinol (0.05%) avec 5 ml d'une solution de lactulose ;
- Chauffer dans un bain marie pendant 15 min ;
- Effectuer une lecture aux 2 longueurs d'onde 480 nm et 398 nm.

2.1.2.4 Optimisation du temps de chauffage :

Une solution témoin a été préparée en mélangeant (5ml, 250µg/ml) de lactulose avec la solution de résorcinol (0.05%, 8 ml pour 398 nm, et 4 ml pour 480 nm) puis chauffée dans un bain marie pendant une durée allant de 5 à 30min.

2.1.3 Protocole expérimental :

Les différentes étapes suivies pour le dosage de la gamme étalon et de la gamme échantillon sont illustrées par les digrammes représentés dans les 2 figures qui suivent :

Figure 21: Protocole expérimental pour le dosage du lactulose standard.

Figure 22: Protocole expérimental pour le dosage du lactulose échantillon.

CHAPITRE IV : MATÉRIELS ET MÉTHODES

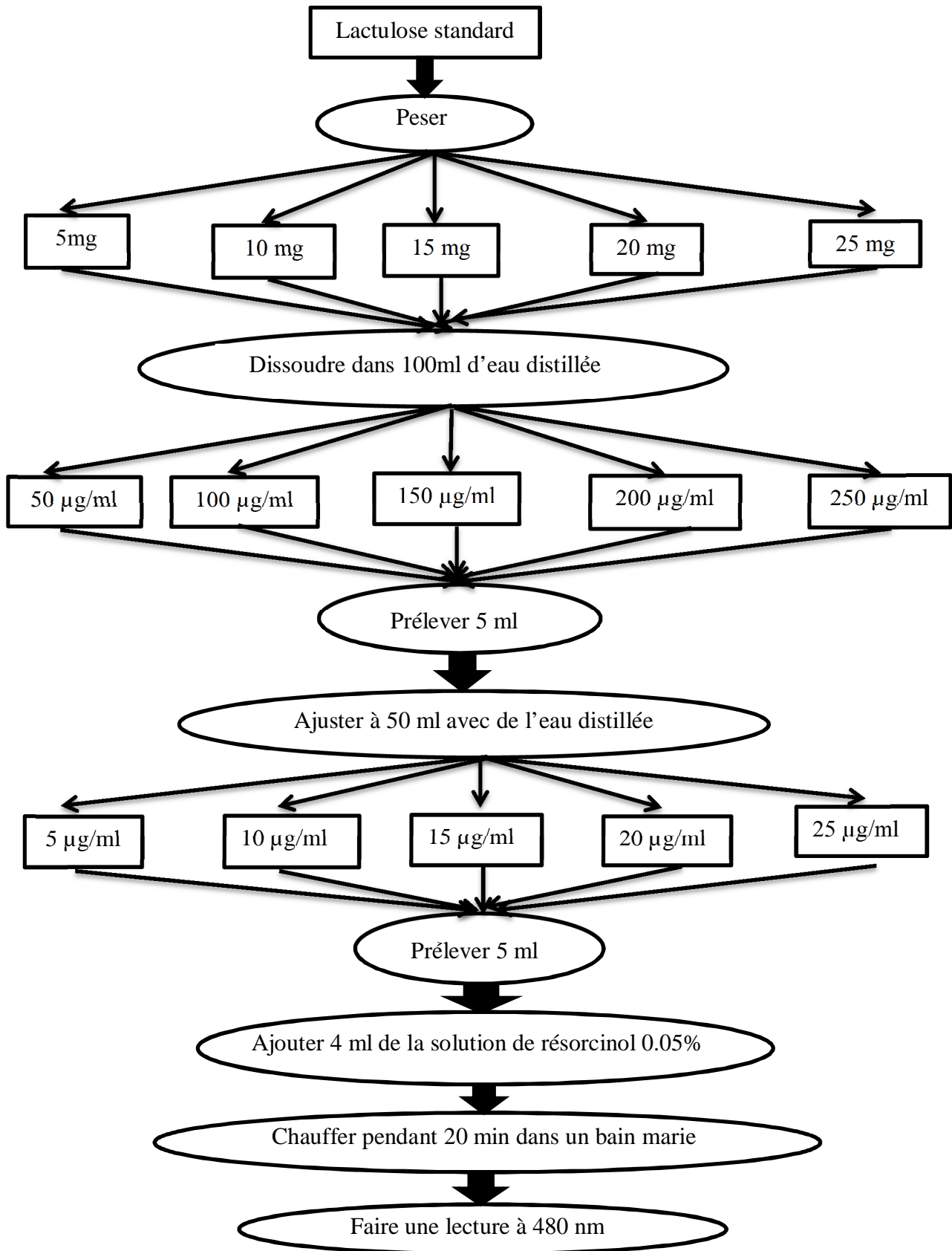


Figure 21 : Protocole expérimental pour le dosage du lactulose standard.

CHAPITRE IV : MATÉRIELS ET MÉTHODES

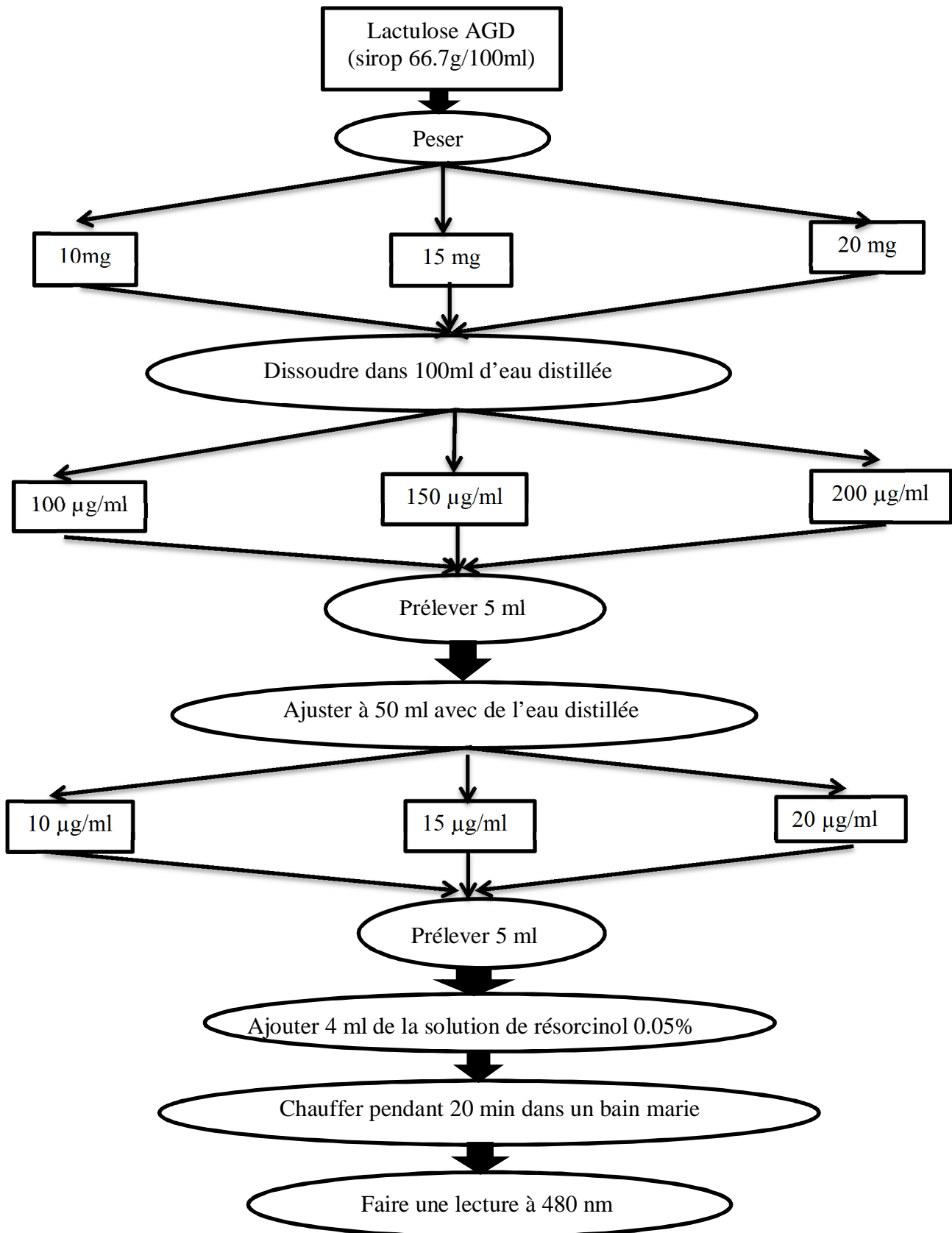


Figure 22 : Protocole expérimental pour le dosage du lactulose échantillon.

2.2 Dosage par HPLC :

2.2.1 Lactulose liquide :

- Solution à examiner :
 - ✓ Mélangez 4,00 g de lactulose liquide avec 20 ml d'eau R ;
 - ✓ Ajoutez 25,0 ml d'acétonitrile R en chauffant légèrement ;
 - ✓ Complétez à 50,0 ml avec de l'eau R.
- Solution témoin (b) :
 - ✓ Dissolvez 2,00 g de lactulose SCR dans 20 ml d'eau R ;
 - ✓ Ajoutez 25,0 ml d'acétonitrile R en chauffant légèrement ;
 - ✓ Complétez à 50,0 ml avec de l'eau R.

Précolonne :

- Dimensions :
 - $l = 0,05 \text{ m}$,
 - $\varnothing = 4,6 \text{ mm}$,
- Phase stationnaire : gel de silice amino propylsilylé pour chromatographie R (3 μm),
- Température : $38 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Colonne:

- Dimensions :
 - $l = 0,15 \text{ m}$
 - $\varnothing = 4,6 \text{ mm}$,
- Phase stationnaire : gel de silice aminopropylsilylé pour chromatographie R (3 μm),
- Température : $38 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Phase mobile:

- ✓ Dissolvez 0,253 g de phosphate monosodique R dans 220 ml d'eau R ;
- ✓ Ajoutez 780 ml d'acétonitrile R.

Débit: 1,0ml/min.

Détection: Réfractomètre maintenu à température constante.

Injection: 20 μl de solution à examiner et solution témoin (b).



CHAPITRE V

1 Dosage du lactulose par UV Visible :

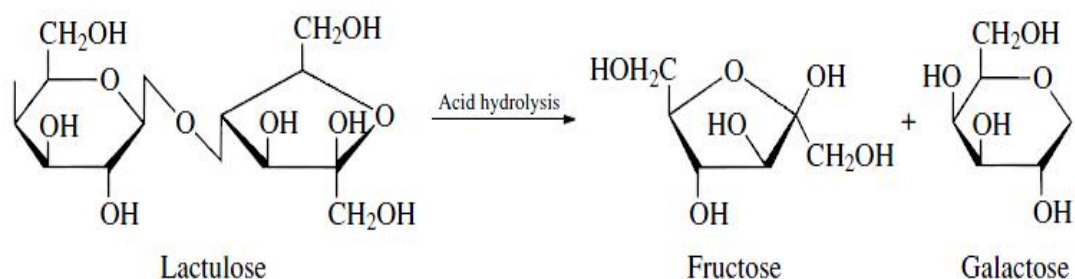
La méthode étudiée est basée sur le fait que les autres oses présents dans le lactulose liquide (glucose, galactose, tagatose) sont des aldohexoses, tandis que le fructose, le produit de l'hydrolyse du lactulose, est un cétohexose, et cette différence dans les groupements fonctionnels a été exploitée pour la détermination du lactulose dans les produits pharmaceutiques.

L'analyse du lactulose, qui est un sucre composé, a été donc possible suite à son hydrolyse acide en galactose et fructose, suivie d'une déshydratation et la réaction du produit de cette dernière avec le résorcinol pour donner un produit rouge- orangé qui absorbe dans le visible.

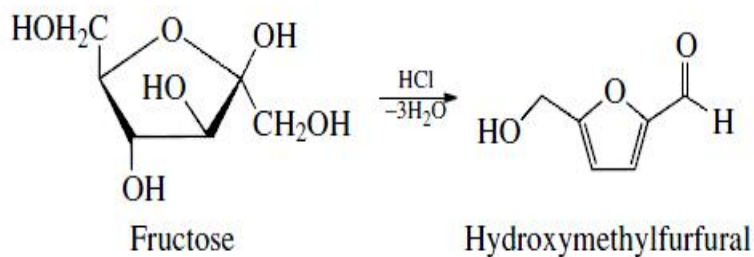
La méthode proposée peut être divisée en 3 étapes, comme le montre la figure 23:

- Dans la première étape, l'acide chlorhydrique hydrolyse le lactulose en fructose et galactose ;
- Dans la deuxième étape, le lactulose se dégrade en hydroxyméthylfurfural, parce que durant la réaction de déshydratation des hexoses par de l'acide concentré, les cétooses (fructose) sont transformés en hydroxyméthylfurfural plus rapidement que les aldoses (glucose, galactose, tagatose).
- Dans la dernière étape, l'hydroxyméthylfurfural réagit avec le résorcinol donnant un composé de couleur rouge-oranger.

Step-I



Step-II



Step-III

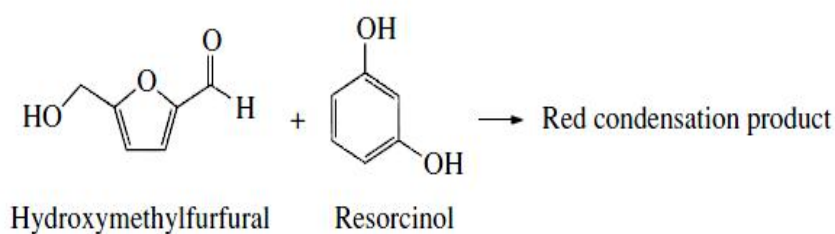


Figure 23 : Réactions proposées pour l'obtention d'un composé coloré à partir du lactulose. [24]

1.1 Optimisation de la méthode :

1.1.1 Détermination de la longueur d'onde d'absorption :

Le spectre d'absorption du produit coloré obtenu est représenté dans la figure 24 :

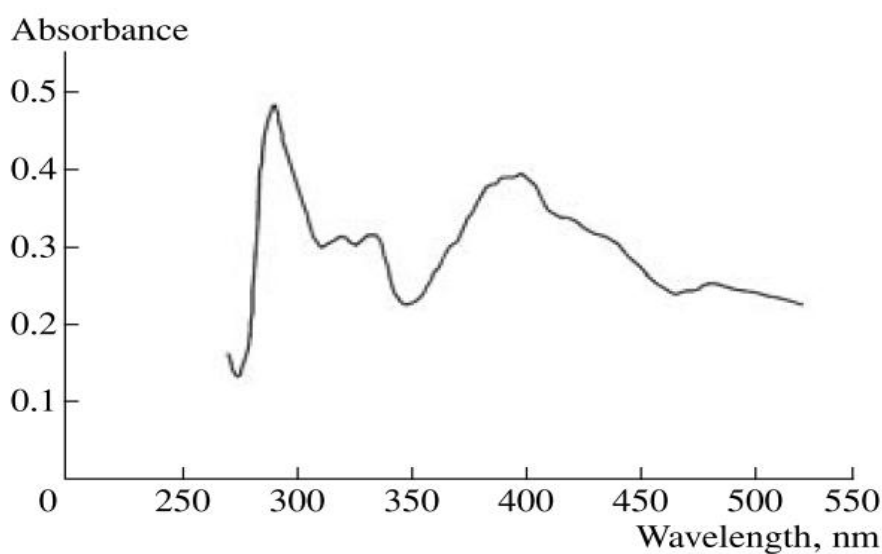


Figure 24 : Spectre UV-Vis d'absorption du complexe lactulose/résorcinol. [24]

CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSIONS

D'après le spectre d'absorbance du complexe lactulose /résorcinol, on observe un maximum d'absorbance au deux longueurs d'onde de 398nm et de 480 nm.

L'absorption à la longueur d'onde de 398 nm est supérieure à l'absorption donnée à 480 nm.

Ces deux longueurs d'onde seront utilisées pour optimiser la méthode.

1.1.2 Optimisation de la concentration de la solution de résorcinol:

Les absorbances obtenues sont représentées en fonction de la concentration de résorcinol dans la figure 25.

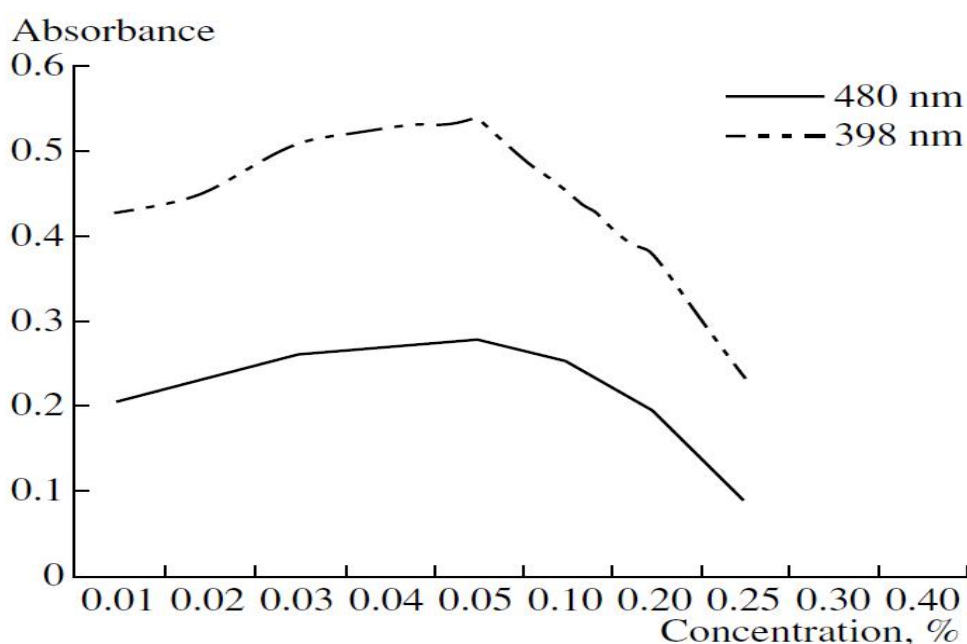


Figure 25 : Optimisation de la concentration de résorcinol. [24]

La représentation de l'absorbance des solutions contenant différentes concentrations de résorcinol est sous forme de courbe pour les deux longueurs d'ondes utilisées.

On remarque que les absorbances augmentent progressivement en fonction de la concentration de résorcinol de 0% jusqu'à une concentration de 0,05%, suivi d'une décroissance.

L'absorbance maximale observée est obtenue avec une solution de résorcinol de concentration 0,05 %.

CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSIONS

1.1.3 Optimisation du volume de résorcinol (0.05%) :

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 26.

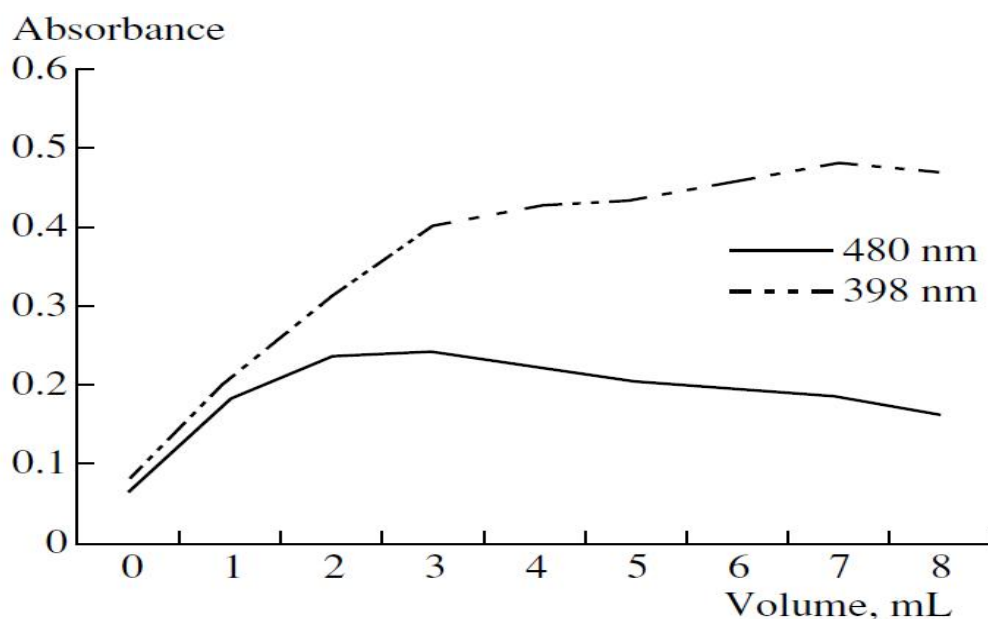


Figure 26 : Optimisation du volume de résorcinol (0.05%) à ajouter. [24]

Les absorbances du complexe lactulose/résorcinol en fonction du volume de résorcinol, à la longueur d'onde de 480 nm, croît d'une façon presque linéaire, dans l'intervalle allant de 0-2 ml, suivi d'une légère augmentation jusqu'à un volume de 4 ml, ou l'absorbance commence à décroître progressivement en fonction du volume.

Alors qu'à la longueur d'onde de 398nm, les absorbances des différentes solutions augmentent de façon continue en 2 phases : une élévation des absorbances rapide sous forme d'une droite dans l'intervalle 0-4ml, suivi d'une croissance progressive de 4 ml jusqu'à 8 ml.

L'absorbance maximale pour la longueur d'onde de 480 nm correspond à un volume de 4 ml, alors que pour la longueur d'onde de 398 nm, elle correspond à 8 ml.

1.1.4 Optimisation du temps de chauffage :

Les absorbances obtenues sont représentées dans la figure 27.

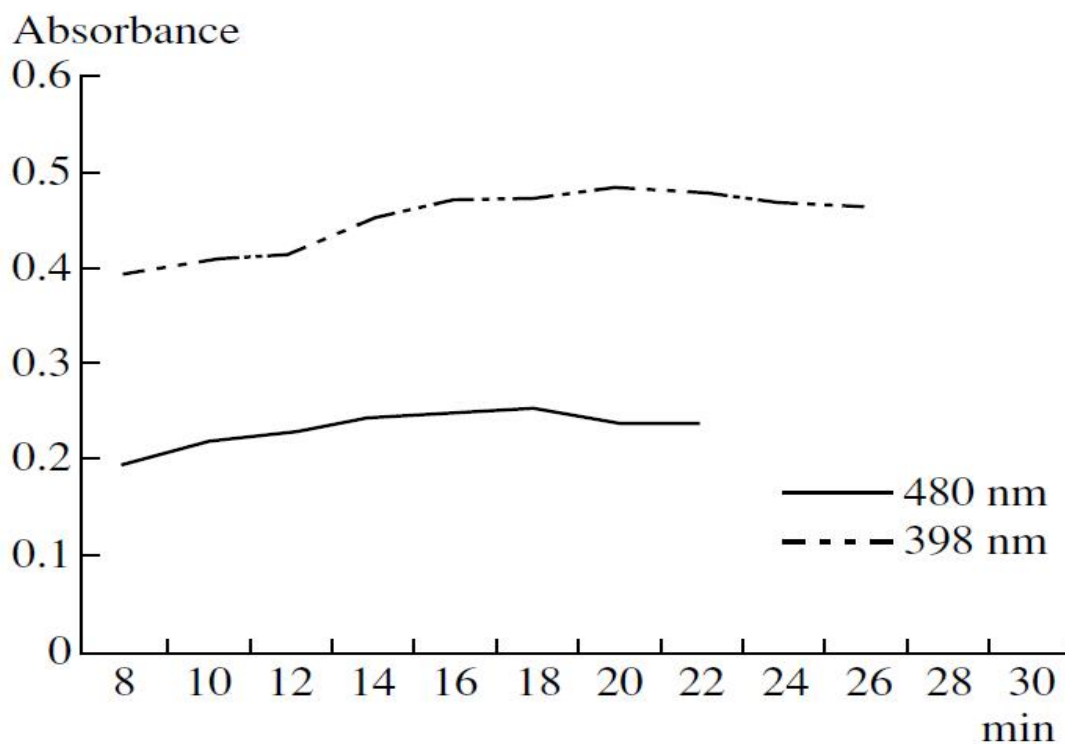


Figure 27 : Optimisation du temps de chauffage. [24]

Suivant le graphique on remarque que l'absorbance du complexe lactulose/résorcinol augmente très légèrement en fonction du temps de chauffage dans le cas des deux longueurs d'onde utilisées, jusqu'à $t = 20\text{min}$ suivi d'une légère décroissance.

L'absorbance maximale est atteinte à $t=20\text{min}$.

CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSIONS

Les différentes expériences réalisées ultérieurement permettent de définir les meilleures conditions pour la réalisation de l'expérience.

Celles-ci sont définies comment suit :

- ❖ Les 2 longueurs d'onde auxquels le complexe résorcinol/lactulose absorbe sont 398 nm et 480 nm ;
- ❖ On ajoute à la solution de lactulose ;
4 ml de résorcinol pour $\lambda=480\text{nm}$;
8 ml de résorcinol pour $\lambda=398\text{ nm}$;
- ❖ La solution de résorcinol à ajouter est de 0.05 % ; avec un temps de chauffage de 20 min.

1.2 Dosage du standard :

Les solutions étalons obtenues après addition du résorcinol sont présentées dans la figure qui suit :



Figure 28 : Complexe résorcinol/lactulose de la gamme étalon.

La couleur du complexe résorcinol /lactulose est obtenu après addition du résorcinol à la solution de lactulose suivi d'un chauffage de 20 min.

On observe une coloration orange plus marquée pour la solution de plus grande concentration (25 $\mu\text{g/ml}$) et une diminution progressive de la couleur jusqu'à une coloration orange très claire pour la solution la plus diluée (5 $\mu\text{g/ml}$).

CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSIONS

Les absorbances de la gamme étalon obtenues après lecture, par spectrophotomètre UV/V sont représentées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Absorbances de la gamme sur standard.

| Gamme µg/ml | Essais | Masses mg | Concentrations µg/ml | Absorbances |
|----------------|--------|--------------|-------------------------|--------------|
| 5 | 1 | 5.6 | 5.6 | 0.076 |
| | 2 | 4.9 | 4.9 | 0.073 |
| | 3 | 4.9 | 4.9 | 0.075 |
| 10 | 1 | 10.1 | 10.1 | 0.104 |
| | 2 | 9.9 | 9.9 | 0.105 |
| | 3 | 10.4 | 10.4 | 0.107 |
| 15 | 1 | 14.9 | 14.9 | 0.139 |
| | 2 | 14.9 | 14.9 | 0.135 |
| | 3 | 14.8 | 14.8 | 0.141 |
| 20 | 1 | 20 | 20 | 0.179 |
| | 2 | 19.9 | 19.9 | 0.18 |
| | 3 | 20 | 20 | 0.175 |
| 25 | 1 | 24.9 | 24.9 | 0.22 |
| | 2 | 25 | 25 | 0.216 |
| | 3 | 24.9 | 24.9 | 0.209 |

CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSIONS

A partir de ces données, une droite d'étalonnage a été réalisée et est représentée dans la figure 29.

Représentation graphique

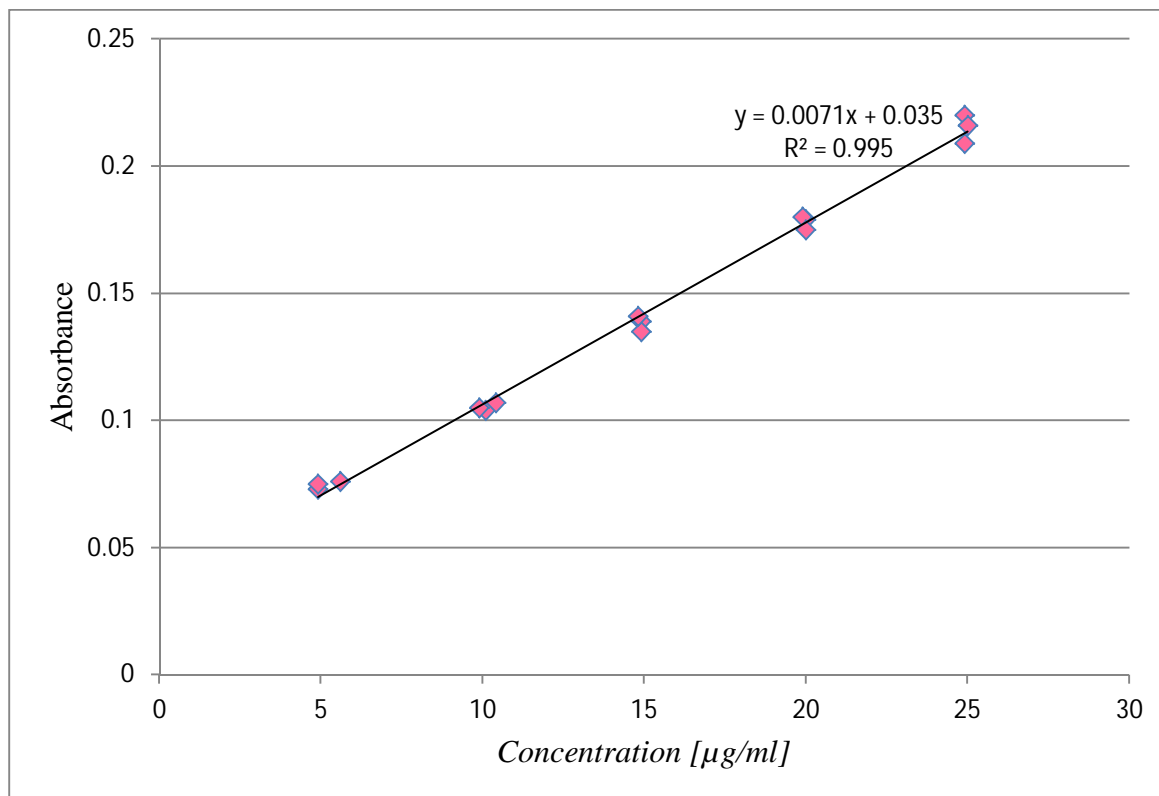


Figure 29 : Courbe d'étalonnage du standard (5-25µg/ml).

La figure 29 représente les absorbances des solutions étalons en fonction des différentes concentrations.

La courbe est sous forme d'une droite qui ne passe pas par l'origine dont l'équation est sous la forme :

$$y = b x + a$$

Avec b : Pente de la droite.
 a : Ordonnée à l'origine.

l'équation de la droite $A = f([C])$ est :

$$Y=0.0071X+0.035$$

Avec un coefficient de corrélation : $r^2=0.995$

CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSIONS

1.3 Dosage de l'échantillon :

Les absorbances de l'échantillon obtenues après lecture par spectrophotomètre UV/V sont représentées dans le tableau qui suit :

Tableau 5 : Absorbances des échantillons.

| Gamme µg/ml | Essais | Masses mg | Concentrations µg/ml | Absorbances |
|----------------|--------|--------------|-------------------------|--------------|
| 10 | 1 | 10.4 | 10.4 | 0.109 |
| | 2 | 10.1 | 10.1 | 0.108 |
| | 3 | 9.8 | 9.8 | 0.107 |
| 15 | 1 | 14.8 | 14.8 | 0.138 |
| | 2 | 15 | 15 | 0.142 |
| | 3 | 14.9 | 14.9 | 0.145 |
| 20 | 1 | 19.6 | 19.6 | 0.175 |
| | 2 | 19.9 | 19.9 | 0.173 |
| | 3 | 20.1 | 20.1 | 0.18 |

Représentation graphique :

Les absorbances des solutions échantillons en fonction de leurs concentrations sont représentées dans la courbe d'étalonnage du lactulose en poudre.

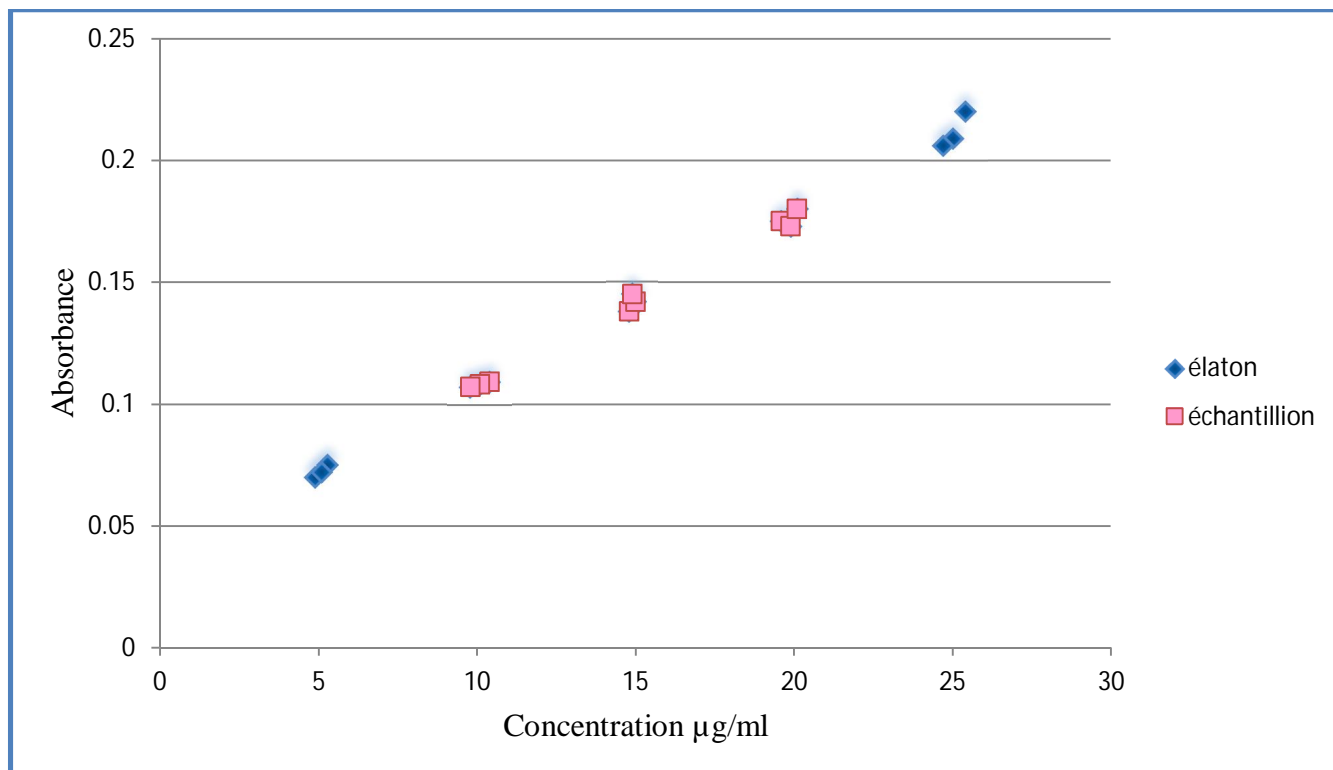


Figure 30 : Dosage gamme étalon et solutions échantillons.

En analysant la droite, on voit bien que les points obtenus pour l'échantillon sont superposés sur ceux de l'étalon, on peut donc conclure que les résultats du dosage de l'échantillon sont équivalents à ceux de l'étalon.

Pourcentage de recouvrement :

Exemple de calcul du pourcentage de recouvrement :

Pour le 1^{er} cas :

| Concentration µg/ml | Absorbance |
|------------------------|------------|
| 10.40 | 0.109 |

CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSIONS

On calcule la concentration a partir de l'absorbance en utilisant l'équation de la courbe d'étalonnage

$$Y=0.0071X+0.035$$

Avec Y : Absorbance de la solution

X : Concentration de la solution

Pour déterminer les concentrations des solutions on utilise l'équation suivante :

$$X=\frac{Y-0.035}{0.0071}$$

AN :

$$X=10.42\mu\text{g/ml}$$

$$10.4 \longrightarrow 100\%$$

$$10.42 \longrightarrow x \%$$

$$x = \frac{10.42*100}{10.4} = \mathbf{100.22 \%}$$

Le pourcentage de recouvrement pour le 1^{er} cas est de 100.22 %.

Les mêmes opérations sont effectuées pour les différentes solutions échantillons. Les pourcentages de recouvrement des solutions échantillons sont représentés dans le tableau 6.

CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSIONS

Tableau 6: Pourcentages de recouvrement de l'échantillon

| Gamme µg/ml | Concentrations µg/ml | Absorbances | Concentrations Calculées µg/ml | % de recouvrement |
|----------------|-------------------------|-------------|--------------------------------------|----------------------|
| 10 | 10.40 | 0.109 | 10.42 | 100.22 |
| | 10.10 | 0.108 | 10.28 | 101.80 |
| | 9.80 | 0.107 | 10.14 | 103.48 |
| 15 | 14.80 | 0.138 | 14.51 | 98.02 |
| | 15.00 | 0.142 | 15.07 | 100.47 |
| | 14.90 | 0.145 | 15.49 | 103.98 |
| 20 | 19.60 | 0.175 | 19.72 | 100.60 |
| | 19.90 | 0.173 | 19.44 | 97.67 |
| | 20.10 | 0.18 | 20.42 | 101.60 |

2 Dosage par HPLC :

2.1 Témoin lactulose POUDRE 98.1% :

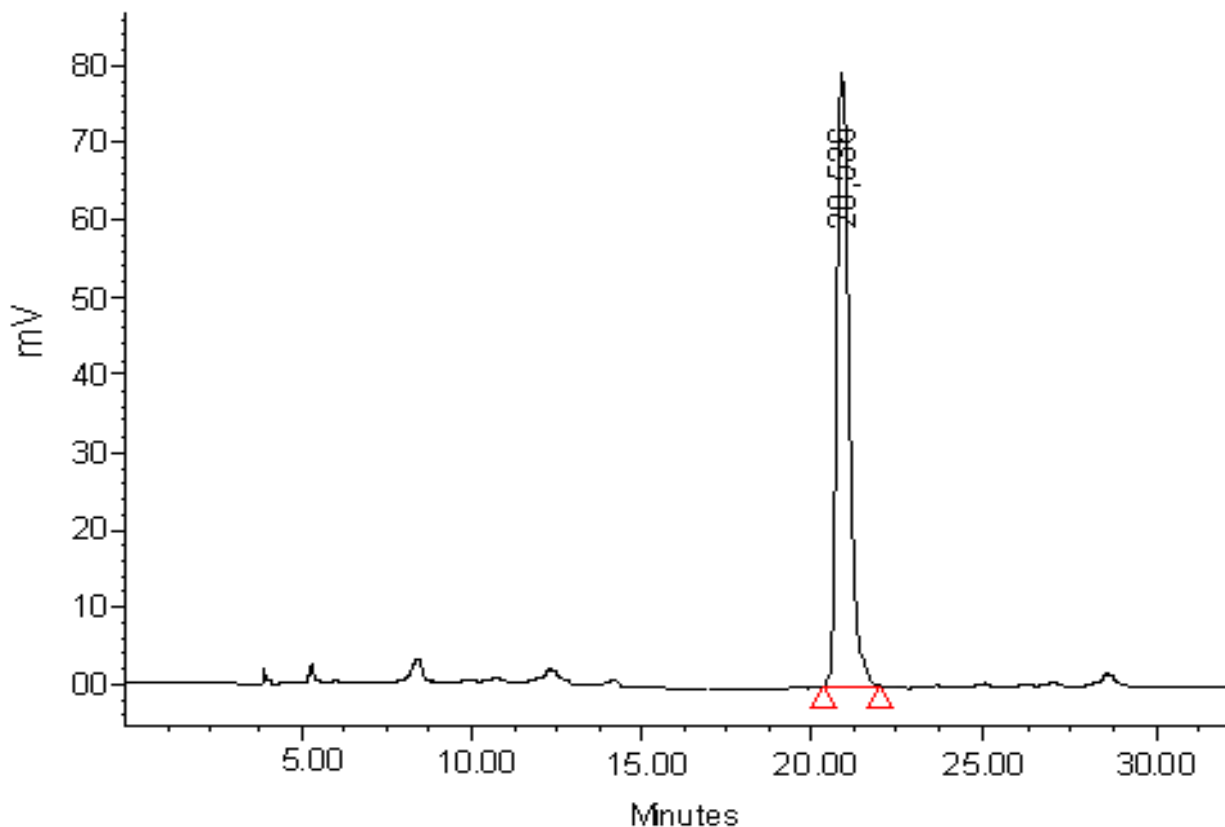


Figure 31 : Dosage par HPLC du lactulose en poudre.

Le chromatogramme donné par le dosage du lactulose en poudre nous fournit les informations représentées dans le tableau 7.

Tableau 7 : Informations du standard fournies par le chromatogramme

| | Temps de rétention (min) | Surface |
|---------------------|--------------------------|-----------------------|
| Lactulose en poudre | 20.536 | 3.96988 ^{E7} |

2.2 Dosage échantillon : lactulose AGD forme sirop

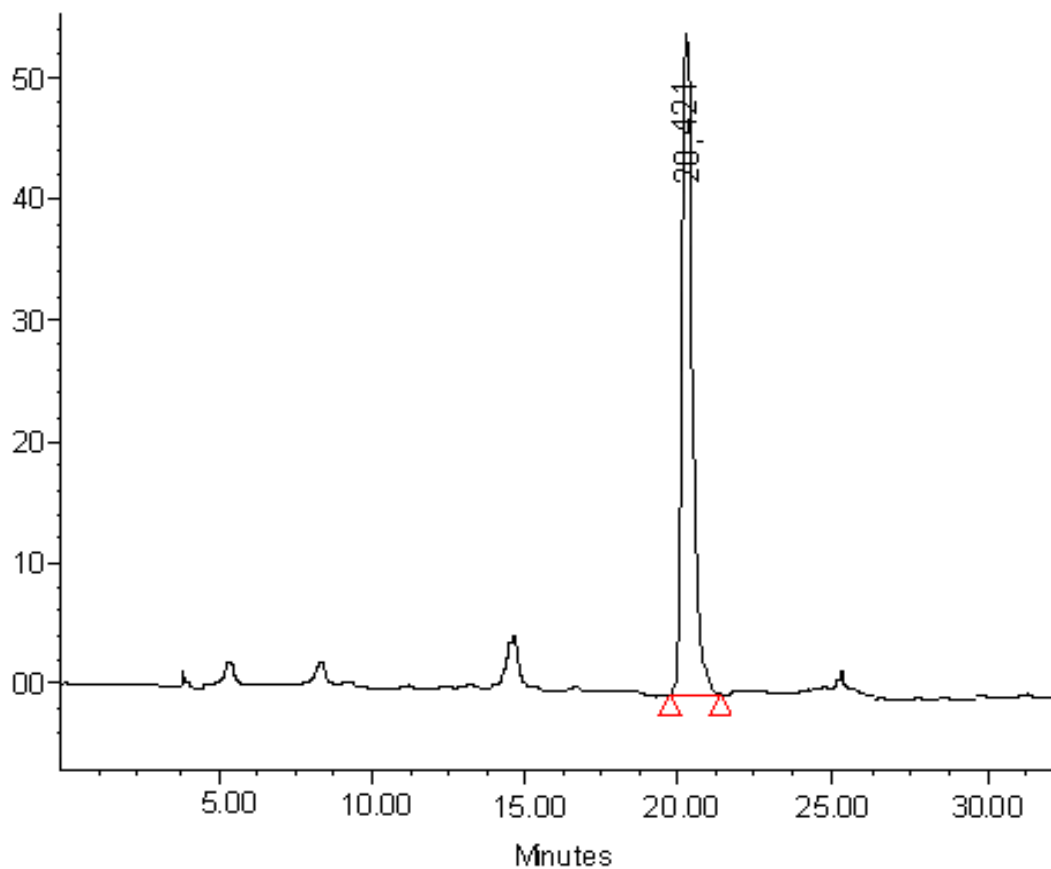


Figure 32 : Dosage par HPLC du lactulose AGD.

Le chromatogramme donné par le dosage du lactulose AGD nous fournit les informations représentées dans le tableau 8.

Tableau 8 : Informations du Lactulose AGD fournies par le chromatogramme.

| | Temps de rétention (min) | Surface |
|---------------|--------------------------|-----------------------|
| Lactulose AGD | 20.421 | 2.87022 ^{E7} |

CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSIONS

Tableau 9 : Récapitulatif des données : Lactulose en poudre et Lactulose AGD.

| | Temps de rétention | Surface m ² | Résultat en % |
|---------------------|--------------------|------------------------|---------------|
| Lactulose en poudre | 20.536 | 3.96988 ^{E7} | |
| Lactulose AGD | 20.421 | 2.87022 ^{E7} | 72.3 |

La surface de l'aire sous le pic de la solution de Lactulose AGD représente 72.3 % de la surface de l'aire sous le pic de la solution de lactulose en poudre.

La surface d'aire sous le pic du lactulose en poudre représente 98.1 % de lactulose et non pas 100% ;

$$\begin{array}{l} 3.96988^{E7} \longrightarrow 98.1\% \\ 2.87022^{E7} \longrightarrow x\% \end{array}$$

$$x\% = 70.92\%$$

Le lactulose AGD dosé contient 70.92 % de lactulose.

3 Discussion :

3.1 Dosage par UV Visible :

D'après les absorbances obtenues des solutions de la gamme étalon et des solutions échantillon nous avons calculé les pourcentages de recouvrement mentionnés dans le tableau 6.

On remarque que ces pourcentages de recouvrement varient entre 97.67 % et 103.98%.

En se référant à la pharmacopée européenne, la teneur en lactulose contenue dans une solution de lactulose liquide doit être comprise entre 95% et 105% de la quantité indiquée sur l'étiquette.

Les pourcentages de recouvrements obtenus après dosage par spectrophotométrie UV Visible sont compris dans l'intervalle indiqué par la pharmacopée.

On peut ainsi conclure que les résultats obtenus sont conformes.

3.2 Dosage par HPLC :

La quantité de lactulose indiquée sur l'étiquette est de 66.7%, et celle obtenue après dosage par HPLC est de 70.92 %.

Sachant que la marge préconisée lors des opérations de dosage est de ± 5 %, avec un intervalle d'acceptation allant de 63.36 et 70.03%.

La teneur en lactulose déterminée par HPLC n'appartient pas à l'intervalle d'acceptation définie. Ceci est peut-être dû à ce que la teneur en lactulose dans le standard n'est pas de 98,1% ou à une question de conditions de conservation.



CONCLUSION

CONCLUSION GENERALE

Les industries pharmaceutiques procèdent à des opérations de contrôle qualité sur la matière première, le produit intermédiaire et le produit fini. Tel que la détermination de l'identité, de la pureté, et de la teneur, afin d'assurer la conformité du produit.

Les opérations de contrôle qualité correspondent en moyenne à 30 % du temps de cycle de production du médicament, de ce fait les industries ont pour objectifs de réduire les délais, de maîtriser des coûts avec un accroissement de la technicité et de la diversité des contrôles.

Pour remplacer la méthode de dosage du lactulose utilisée par le laboratoire pharmaceutique AGD pharma qui est la chromatographie liquide à haute performance nous avons effectué une comparaison entre cette méthode est une méthode de dosage par spectrophotométrie UV/ Visible.

Après avoir étudié divers article proposant différentes méthodes de dosage par spectrophotométrie UV/Visible, nous avons opté pour une hydrolyse acide avec du HCl, une méthode simple à réaliser en comparaison avec les autres méthodes.

À l'issue de l'étude réalisée dans ce travail et d'après les résultats obtenus on peut conclure que :

- En comparaison avec la méthode chromatographique, un dosage par UV/Visible constitue un gain de temps malgré la nécessité d'une réaction de prétraitement préalable au dosage afin d'obtenir un composé coloré absorbant dans le domaine du visible ;
- La méthode de dosage par spectrophotométrie UV/Visible, nécessite des réactifs disponibles et peu coûteux comparé aux réactifs nécessaires pour un dosage par HPLC.

Ainsi on peut conclure que la méthode de dosage d'une solution de lactulose par spectrophotométrie fournit des résultats satisfaisants, cependant une validation de la méthode au niveau du laboratoire est obligatoire pour pouvoir remplacer la méthode actuellement utilisée.



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] **Paulos, C.S Tyliano.** *Carbohydrates*. encyclopedia of human nutrition ,2013, pp. 265-271.
- [2] **Bruice Paula Yurkanis.** *Chimie Organique*, 2010.
- [3] **Bhagavan N. V , Chung-Eun Ha.** *Simple carbohydrate*. Essentials of medical biochemistry with chemical cases ,2011, pp. 65-74.
- [4] **Hames, Davis B, Hopper N. M , Houghton J .D.** *Essentielle de Biochimie*. Berti, 2000.
- [5] **Murray Robert K.** *Biochimie de Harper*. De Boeck , 2011.
- [6] **Mossard.** *Biochimie et Biologie Moléculaire*. De Boeck , 2010 .
- [7] **Mathieu Marie-José , Fonteneau Jean Marie.** *Le manuel porphyre du préparateur en pharmacie*, 2008.
- [8] **Campbell P .N, Smith A. D.** *Biochimie Illustrée* . Maloine, 2006.
- [9] **Kruh Jacques.** *Biochimie Etude Médicales et Biologiques , I Biologie Cellulaire et Moléculaire*, 1978.
- [10] **Harper H A.** *Précis de Biochimie*, 1982 .
- [11] **Weil, Jacques Henry.** *Biochimie Générale* .Dunod, 2005.
- [12] **MONTREUIL Jean** .*Analyse des glucides et des...* . Dossier Techniques de l'Ingénieur,1997.
- [13] **BeMiller, James N** *Carbohydrate Analysis*.. 2010, Food Analysis , pp. 147-177.
- [14] **Jaques H.** *Biochimie Générale* . Dunod , 2005.
- [15] **Katoch R.** *Carbohydrate estimation*.. Analytical techniques in biochemistry and molecular biology ,2011, pp. 67-76.
- [16] **Parmijt S. Panesar, Shweta Kumari.** *Lactulose : production, purification and potential applications*.. Biotechnologie advances ,2011, pp. 940-948.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [17] **Bhagavan N.V, Chung-Eun Ha.** *Simple Carbohydrates.* Essentials of Medical Biochemistry, 2011, pp. 65-74.
- [18] *Pharmacopé Européene 6.0 .*
- [19] **Aider Mohammed et Halleux Damien .** *Isomerization of lactose and lactulose production: review.* pp. 356-364.
- [20] **Vidal, Marc Gimenez.** *Isomérisation du lactose en lactulose par électro-activation.* Québec , 2013.
- [21] **Nabuo Seki, Hitoshi saito.** *Lactose as a source of lactulose and other functional lactose derivative.* International Dairy Journal ,2012, pp. 110-115.
- [22] **Schmster-Wolff-Brihing.R .** *Production and physiological action of the disaccharide lactulose.* International Dairy journal ,2010, pp. 731-741.
- [23] *Dictionnaire Vidal .*
- [24] **Mir Azam Khan, Zafar Iqbal , Mohammad Rasul Jan , Jasmin Shah.** *A spectrophotometric method for quantitative determination of lactulose in pharmaceutical preparation.* Journal of analytical chemistry. ,61,. 1, 2006, , Vol. 61, pp. 32-36.
- [25] **Jan De Block, Merches. M.** *Evaluation of two methods for determination in milk.* International Dairy Journal ,1996, pp. 217-222.
- [26] **Rouessac Francis et Rouessac Annick.** *Analyse Chimique Méthodes et techniques instrumentales modernes.* Dunod, 2004.
- [27] **Caude Marcel et Jardy Alain.** *Chromatographie en phase liquide Théorie et méthodes de séparation.* Dossier Techniques de l'Ingénieur, 1994, pp. 1-48.
- [28] **Reuhs Bradley L et Rounds Mary Ann.** *High Performance Liquide Chromatography.* Food Analysis ,2010, pp. 499-512.
- [29] **Moldoveanu Serban C et David Victor.** *Basic Information about HPLC .* Essentials in Modern HPLC séparation, 2013, pp. 1-51.
- [30] **Skoog, West et Holler.** *Chimie Analytique.* De Boek, 1997.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [31] **Kazakevich Yuri et Lobrutto Rosario.** *HPLC for pharmaceutical scientists.*
- [32] **Nieman, Skoog et Holler.** *Principe d'analyse instrumentale.* De Boeck, 2003.
- [33] **Asshauer Jürgen et Dllner Helmut.** *Quantitative Analysis in HPLC, practice of High Performance Liquid Chromatography,* 1986, pp.65-108.
- [34] **Lewis N.G.** *High Performance Liquid Chromatography HPLC. Methods in Lignin Chemistry,* 1992, pp. 549-567.
- [35] **Burgot Gwenola et Burgot Jean Louis.** *Methodes instrumentales d'analyses chimique et application .* Lavoisier.
- [36] **Owen Tony.** *Fundamentals of modern UV-visible spectroscopy.* primer.
- [37] **Benedetto Dominique et Breuil Philippe.** *Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible .* Dossier Techniqued de l'ingénieur ,2007, pp. 1-20.
- [38] **Görög S., Rbnyei M. et Herbnyi B.** *The changing role of ultraviolet spectroscopy in drug analysis.* Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 1989, pp.1527-1533.
- [39] **Rosset R, Claude M, Jardy A.** *Chromatographie en phase liquide et supercritique .* Masson, 1991.
- [40] **Ronald H. Behrens et al.** *A simple enzymatic method for the assay of urinary lactulose.* clinica chimica acta, 1984, 137, 361-367 .
- [41] **Adhikari AK et al.** *A rapid spectrophotometric method for quantitative determination of lactulose in heated milk and milk products,* 1991, 71, 555-564.
- [42] **Amine A.** *A new enzymatic spectrophotometric assay for the determination of lactulose in milk .* clinica chimica acta ,2000.
- [43] **Yongnian Ni et al .** *A kinetic spectrophotometric method for the determination of ternary mixtures of reducing sugars with the aid of artificial neural networks and multivariate calibration.* Analytica Chimica Acta. 480, 2003, pp. 53–65.
- [44] **Roig B et Thomas O.** *Rapid estimation of global sugars by UV photodegradation and UV spectrophotometry.* Analytica Chimica Acta . 477 , 2003, pp. 325–329 .

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [45] **Emanuele Marconi et al.** *Heat-treated milk differentiation by a sensitive lactulose assay.* Food Chemistry, 2004, 84, pp. 447–450.
- [46] **Mir Azam Khan et al.** *Spectrophotometric Determination of Lactulose in Pharmaceutical Preparations Using Acid Hydrolysis.* American Laboratory, 2004.



GLOSSAIRE

Aloïnes : L'aloïne, aussi connue sous le nom de barbaloïne, est un composé amer de couleur jaune-marron. Il est présent dans l'exsudat d'au moins 68 espèces d'aloès .

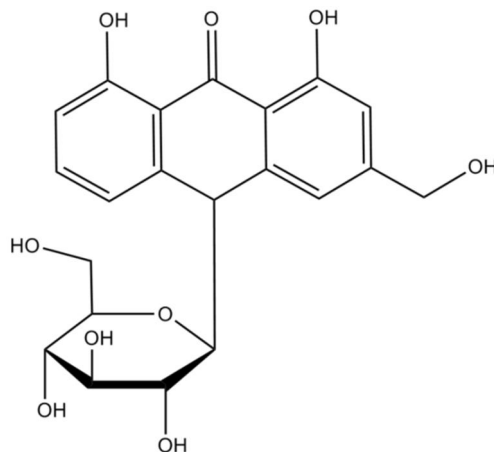


Figure I : Molécules d'aloïnes

Ampérométrie : Méthode électrochimique d'analyse utilisant la détermination du courant d'électrolyse qui, fonction de la concentration des corps électro actifs et du potentiel, permet, dans des conditions déterminées et après étalonnage, de déduire la concentration des corps électrolysés.

Antagoniste : Adjectif qualifiant tout ce qui est opposé : ce peut être un système, une substance dont l'action est opposée à celle d'une autre.

Bruit de fond : En traitement du signal, on appelle bruit de fond toute composante non désirée affectant la sortie d'un dispositif indépendamment du signal présent à son entrée.

Caecal : Qui a rapport au cæcum. Partie initiale du gros intestin, portant l'appendice vermiculaire.

Carbone asymétrique : Carbone lié à quatre atomes ou groupes différents.

Catalyseur : Substance qui augmente la vitesse d'une réaction chimique sans paraître participer à cette réaction.

Cellulose : Glucide macromoléculaire qui constitue la paroi des cellules végétales.

GLOSSAIRE

Colonne de garde : Colonne courte de protection placée en amont de la colonne analytique afin d'en augmenter la durée de vie, par élimination non seulement des poussières et des impuretés contenues dans les solvants, mais aussi des espèces chimiques qui se lient de manière irréversible à la phase stationnaire.

Conformation : Forme tridimensionnelle d'une molécule à un instant donné, qui peut changer par suite de rotation autour des liaisons σ .

Conformère : Différentes conformations d'une molécule obtenues par rotation d'un ou de plusieurs liaisons simples, les conformères ne sont pas des isomères.

Coulométrie : Mesure de la quantité d'électricité nécessaire à l'oxydation ou à la réduction électrochimique totale du corps à doser.

Digoxines : Glycoside cardiotonique extrait de la feuille de digitale laineuse. Il fait partie de la classe des digitaliques. On l'utilise dans le traitement de diverses affections du cœur dont l'insuffisance cardiaque. Il renforce la contraction cardiaque, ralentit et régularise les mouvements du cœur.

Eluant : Solvant frais utilisé pour l'élution, la remise en solution d'un corps adsorbé.

Encéphalopathie hépatique : Syndrome neuropsychiatrique complexe caractérisé par des modifications de l'état de conscience et du comportement, des changements de personnalité, des signes neurologiques et des changements à l'électroencéphalogramme(EEG). Il peut être aigu et réversible (insuffisance hépatique aiguë, facteurs précipitants en situation de dommage hépatique chronique) ou chronique et irréversible.

Énantiomère : Molécules qui sont des images miroirs non superposables.

Epimérisation : Réaction durant laquelle un Carbone perd un proton et change de configuration lorsqu'il se protone de nouveau.

Fréquence ν : Vitesse d'une onde divisée par sa longueur d'onde (hertz).

Flore microbienne : Population de micro-organismes dans les organes ou les tissus.

Glyceraldéhyde : Le glyceraldéhyde, également appelée glycérose, est un ose à trois atomes de carbone (triose), de formule brute $C_3H_6O_3$. C'est un aldose car son

GLOSSAIRE

groupement carbonyle est en extrémité de chaîne carbonée (aldéhyde). C'est le plus petit aldose, et donc le plus simple (il n'existe pas d'ose à deux atomes de carbone).

Son isomère cétose est la dihydroxyacétone.

Hydrate : Molécule dont un des Carbones portent deux groupes OH.

Hémiacétal : Produit de l'addition d'un équivalent d'alcool à un aldéhyde.

Hémicétal : Produit de l'addition d'un équivalent d'alcool à une cétone.

Héparine : L'héparine est une molécule qui fait partie des glycosaminoglycanes (GAG). Les oses constitutifs sont: la glucosamine et des acides uroniques. C'est un mélange de différents polymères essentiellement constituées d'unités disaccharidiques trisulfatées:

L'acide L-iduronique-2-O-sulfate D-glucosamine-N-sulfate, 6-O-sulfate.

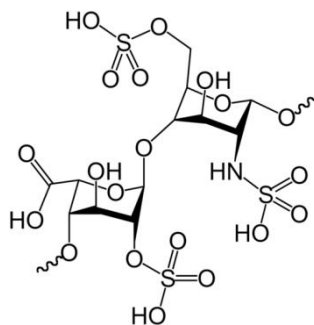


Figure II : Molécule d'héparine

C'est une substance ayant des propriétés anticoagulantes extrêmement puissantes. Elle est fréquemment utilisée pour son action sur la thrombose.

Hermann Emil Fischer : (9 octobre 1852 - 15 juillet 1919) est un chimiste allemand, lauréat du prix Nobel de chimie de 1902 « en reconnaissance des services extraordinaires qu'il a rendus par ses travaux sur la synthèse des hydrates de carbone et des purines.

Inertie : L'état de quelque chose ou quelqu'un qui n'agit pas.

Isocratique : Une élution isocratique est une élution au cours de laquelle la composition de la phase mobile n'est pas modifiée au cours du temps.

GLOSSAIRE

Isomérisation : On parle d'isomérisation lorsque deux molécules possèdent la même formule brute mais ont des formules semi-développées ou des formules développées différentes. Ces molécules, appelées isomères, ont des propriétés physiques, chimiques et biologiques différentes.

Isomérisation : Transformation d'un corps chimique en un isomère.

Longueur d'onde λ : Distance entre n'importe quel point d'une onde et le point correspondant dans l'onde suivante.

Molécules non polaire : Molécule ne comportant aucun atome chargé ou partiellement chargé.

Mutarotation : Variation lente de la rotation optique jusqu'à une valeur d'équilibre.

Orbital : Volume d'espace autour d'un noyau ou à la présence d'un électron est la plus probable.

Orbital atomique : Orbital associé à un atome.

Lampe à incandescence : La lampe à incandescence est un dispositif qui produit de la lumière par échauffement jusqu'à incandescence d'un filament conducteur parcouru par un courant électrique. L'enveloppe de verre (l'ampoule) permet d'isoler le filament du dioxygène de l'air, au contact duquel il serait détruit par oxydation.

Micro particule : Une microparticule est une particule dont la taille est comprise entre 0,1 et 100 μm .

Miscibles : Deux liquides sont dits miscibles quand ils se mélangent totalement l'un dans l'autre.

Orbitale anti liante : Une orbitale anti liante désigne un type de liaison chimique qui s'oppose à la stabilité de la molécule. Cela survient lorsque les phases d'électron des orbitales atomiques à l'origine d'une orbitale moléculaire sont de signe opposé, c'est-à-dire que ces orbitales atomiques sont en opposition de phase : si des électrons occupent de telles orbitales antiliantes, ils se repoussent et tendent à dissocier la molécule.

Photodiodes : Une photodiode est un composant semi-conducteur ayant la capacité de détecter un rayonnement du domaine optique et de le transformer en signal électrique.

GLOSSAIRE

Photon : Grain de rayonnement électromagnétique correspondant à un quantum.

Physiologique : Qui concerne le fonctionnement de l'ensemble ou de parties du corps.

Plexiglas : Le polyméthacrylate de méthyle est un thermoplastique transparent dont le monomère est le méthacrylate de méthyle (MAM). Ce polymère est plus connu sous son premier nom commercial de Plexiglas (nom déposé).

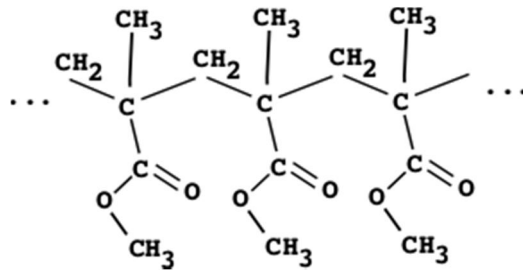


Figure III : Représentation de la molécule de plexiglas.

Polarographie : La polarographie est une forme particulière de la voltampérométrie qui utilise comme électrode de travail une électrode à gouttes tombantes de mercure.

Polymérisation : Combinaison chimique d'une molécule avec elle-même pour former une macromolécule.

Polystyrène : Le polystyrène (sigle PS) est le polymère de formule $-(\text{CH}_2-\text{CH}(\text{Ph}))_n-$, obtenu par polymérisation du monomère styrène $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{Ph}$.

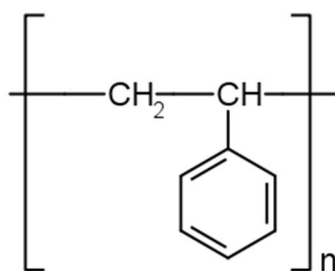


Figure IV : Molécule du polystyrène

Prisme : Solide transparent de géométrie appropriée qui disperse par réfraction un rayonnement polychromatique en ses différentes longueurs d'onde.

GLOSSAIRE

Projection de Fischer : La projection de Fischer est associée au nom d'Hermann Emil Fischer qui utilisa ce type de représentation dans ses études pionnières en chimie des sucres.

Projection de Haworth : La projection de Haworth est un moyen pratique de représenter la structure cyclique des oses (monosaccharides) avec une simple perspective tridimensionnelle. Le nom de cette projection vient de son créateur le chimiste anglais Walter Norman Haworth. Sir Walter Norman Haworth (le 19 mars 1883 à Chorley, Royaume-Uni - le 19 mars 1950 à Birmingham, Royaume-Uni) est un chimiste britannique, connu surtout pour son travail sur la vitamine C.

Prebiotiques : Les prébiotiques sont généralement des oligosaccharides ou des polysaccharides à courte chaîne constitués approximativement de deux à vingt unités de sucre. Ils échappent à la digestion dans l'intestin grêle et sont des substrats potentiels pour l'hydrolyse et la fermentation par les bactéries intestinales.

Quantum : Quantité unitaire d'énergie dans la théorie quantique.

Quartz : Le quartz est une espèce minérale du groupe des silicates, sous-groupe des tectosilicates composé de dioxyde de silicium de formule SiO_2 (silice), avec des traces d'Al, Li, B, Fe, Mg, Ca, Ti, Rb, Na, OH. Il se présente soit sous la forme de grands cristaux incolores, colorés ou fumés, soit sous la forme de cristaux microscopiques d'aspect translucide.

Raffinose : Le raffinose est un triholoside (oligoside) composé d'une unité de galactose, d'une unité de glucose et une unité fructose .

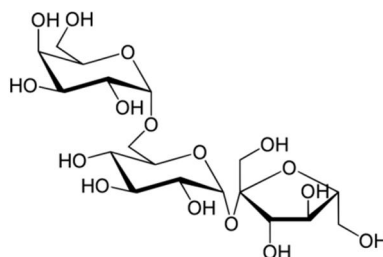


Figure V : Molécule de raffinose

Réseaux holographique : Surface optique sur laquelle a été inscrit un grand nombre de traits parallèles et équidistants servant à diffracter tout faisceau de rayons incidents et fonctionnant en réflexion.

GLOSSAIRE

Résorption : Retour dans la circulation d'un liquide extravasé.

Rétention : Accumulation d'un liquide ou d'une substance qui devrait être évacuée.

Saccharolytique : Qui est capable d'hydrolyser les sucres.

Saccharose : Holoside composé d'une molécule de glucose et d'une molécule de fructose

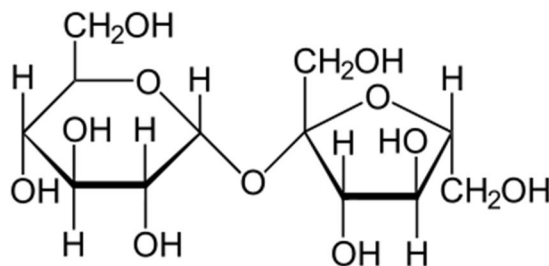


Figure VI : Molécule de saccharose

Stachyose : Oligoside (tetra-saccharide) constitué de deux unités D-galactose et un saccharose liés séquentiellement.

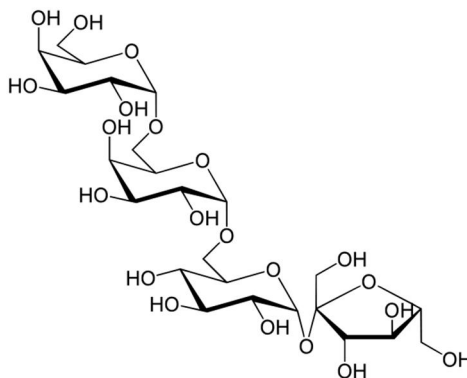


Figure VII : Molécule de stachyose.

Sensibilité : La sensibilité du détecteur est l'intensité du signal délivré par unité de concentration ou de masse d'une substance dans la phase mobile entrant dans le détecteur. Le facteur de réponse relatif d'un détecteur, communément appelé *facteur de réponse*, exprime la sensibilité de ce détecteur pour une substance donnée, par rapport à une substance de référence. Le *facteur de correction* est l'inverse du facteur de réponse.

GLOSSAIRE

Silice : Nom usuel du dioxyde de silicium SiO_2 .

Spectrographe : Instrument optique équipé d'un élément dispersant tel qu'un réseau ou un prisme qui permettent l'enregistrement photographique des spectres.

Stéréo-isomérisation : Se dit d'isomères dont les atomes sont liés les uns aux autres de la même façon, mais qui diffèrent par la disposition de leurs atomes dans l'espace.

Transitions électronique : Saut d'un électron d'une orbitale à une autre.

Tungstène : Le tungstène pur est un métal dur de couleur allant du gris acier au blanc étain , Sous sa forme pure, il est principalement utilisé dans des applications électriques (filaments d'ampoule), mais sous forme de composés ou d'alliages il possède de nombreuses applications, comme la réalisation d'outils nécessitant une grande dureté (forets, poudres abrasives...).

Verres optiques : On appelle verre optique un verre de qualité adaptée à la réalisation de systèmes optiques tels que les lentilles optiques, les prismes ou les miroirs . Outre les paramètres optiques et mécaniques, les verres optiques se caractérisent par leur pureté et leur qualité, nécessaires du fait de leur utilisation dans des instruments de précision. Les défauts sont quantifiés et classés selon des normes internationales : bulles, inclusions, rayures, défauts d'indice, coloration, etc.

Viscosité : Définie comme la résistance à l'écoulement uniforme et sans turbulence se produisant dans la masse d'une matière. La viscosité dynamique correspond à la contrainte de cisaillement qui accompagne l'existence d'un gradient de vitesse d'écoulement dans la matière.



ANNEXES

Annexe 1 : Les sirops

Les sirops sont des préparations aqueuses caractérisées par leurs saveurs sucrées et leurs consistances visqueuses. Ils peuvent contenir du saccharose, à concentration au moins égale à 45 pour cent *m/m*. La saveur sucrée peut également leur être conférée par d'autres polyols ou édulcorants. Ils contiennent généralement des aromatisants ou autres agents de sapidité. Chaque dose d'une préparation multi dose est administrée à l'aide d'un dispositif permettant de mesurer la quantité prescrite. Ce dispositif est généralement une cuillère ou un godet, pour les volumes de 5 ml ou multiples de 5 ml.

Annexe 2 : Laxatifs

La constipation est définie par un ralentissement du transit (< 3 selles par semaine) associé une déshydratation excessive des selles.

Les laxatifs provoquent l'accélération du transit intestinal et l'évacuation des selles

Tableau I : Classification des laxatifs

| Classification | Remarques |
|--|---|
| Laxatifs de lest <i>Psyllium graines, sterculia</i> | Sont des mucilages ou des fibres de sons de blé et d'orge non digérées, ils hydratent le bol fécal ce qui stimule le péristaltisme. |
| Laxatifs lubrifiant <i>Paraffine</i> | Huile minérale ou non absorbée au niveau intestinal : retarde l'absorption d'eau |
| Laxatifs osmotiques <i>Lactulose</i> <i>Lactitol</i> <i>Sorbitol</i> | Sucres non résorbables au niveau intestinal, Ce sont des particules solubles, mais non absorbées, qui en raison de leurs propriétés Osmotiques maintiennent l'eau dans l'intestin, augmentant l'hydratation du bol fécal, on les utilise a dose progressivement croissante. |
| Les laxatifs stimulant <i>Séné, bourdaine, aloès</i> | Sont des dérivés trouvés dans diverses plantes Augmente le péristaltisme et les sécrétions intestinales d'eau |
| Les laxatifs par voie rectal <i>Suppositoire ou micro lavement</i> | Provoque une évacuation rapide recto-sigmoïde par voie reflexe |

Annexe 3 : Pouvoir rotatoire

On dit qu'une substance est optiquement active ou douée d'un pouvoir rotatoire lorsqu'elle fait dévier le plan de polarisation de la lumière d'un angle α .

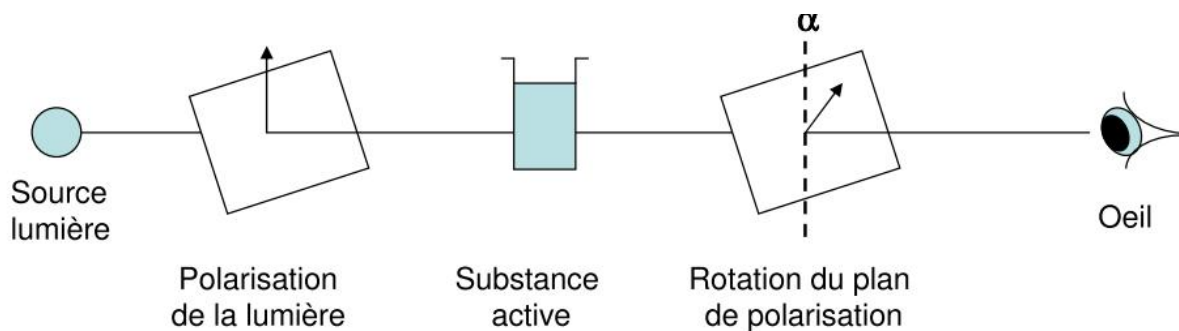


Figure VIII : Pouvoir rotatoire

Ce pouvoir rotatoire est lié à la présence d'un ou plusieurs carbones asymétriques au sein de la molécule.

On distingue deux types de substances optiquement actives :

- Celles qui font dévier le plan de polarisation d'un angles α vers la droite (l'angle mesuré est positif) et la substance est dite dextrogyre
- Celles qui font dévier le plan de polarisation d'un angles α vers la gauche (l'angle mesuré est négatif) et la substance est dite lévogyre

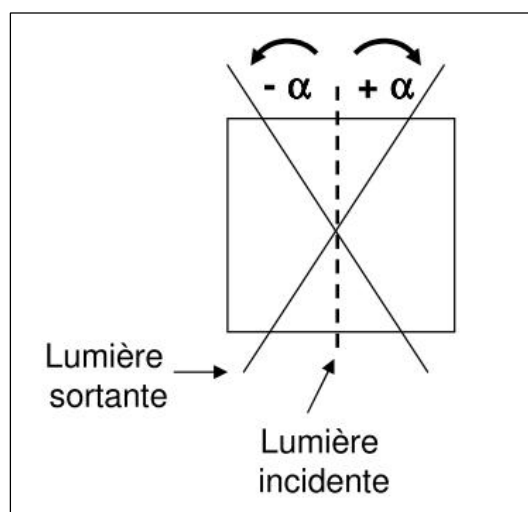


Figure IX : Angle de déviation du pouvoir rotatoire.

On définit le pouvoir rotatoire spécifique par la loi de Biot :

$$[\alpha_D^{20}] = \frac{1000 \alpha}{c \cdot l}$$

α : angle de rotation en degré lu à $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$,

l : longueur en décimètres du tube polarimétrique

c : concentration de la solution en g/ml

Le *pouvoir rotatoire spécifique* d'un liquide est défini par l'angle de rotation α exprimé en degrés ($^\circ$), du plan de polarisation à la longueur d'onde de la raie D du sodium ($\lambda = 589,3 \text{ nm}$) mesuré à 20°C dans la substance liquide à examiner, rapporté à une épaisseur de couche de 1 dm et divisé par la masse volumique exprimée en grammes par centimètre cube.

Annexe 4 : Indice de réfraction

Lorsqu'un rayon lumineux passe d'un milieu m , dans un autre milieu M de densité optique différente, il change de vitesse et, sauf s'il pénètre perpendiculairement à la surface de contact entre les deux milieux, il change également de direction.

L'angle que forme le rayon incident i_m avec la perpendiculaire à la surface du milieu M s'appelle l'angle d'incidence, tandis que l'angle correspondant dans le second milieu est l'angle de réfraction r_M .

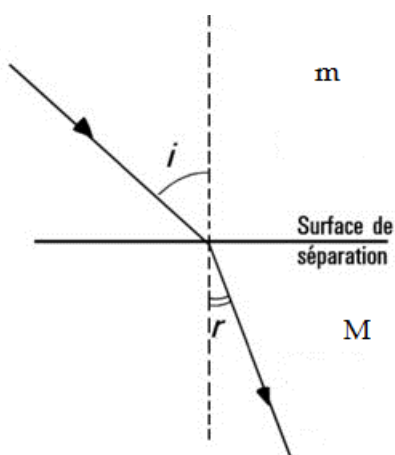


Figure X : Réfraction de la lumière.

L'indice de réfraction de M par rapport au milieu m , est égal au rapport $\frac{\sin i_m}{\sin r_M}$.

ANNEXES

L'indice de réfraction d'un milieu rapporté à l'air est égal au rapport du sinus de l'angle d'incidence d'un rayon lumineux dans l'air au sinus de l'angle de réfraction du rayon réfracté dans le milieu considéré.

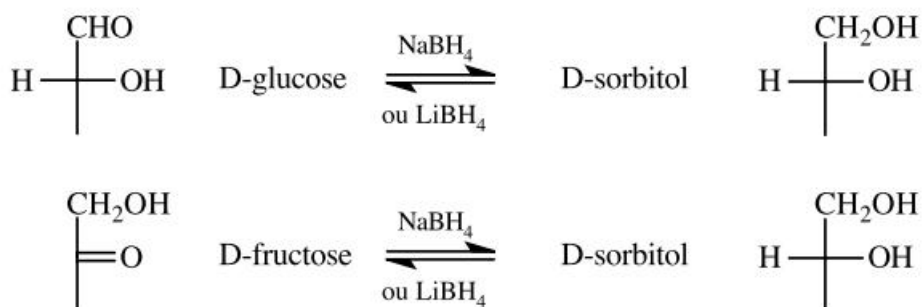
Sauf indication contraire, l'indice de réfraction est déterminé à $20 \pm 0,5$ °C et rapporté à la raie D du sodium ($\lambda = 589,3$ nm) ; le symbole est alors : n_D^{20}

Les réfractomètres courants déterminent l'angle limite. Dans ces appareils, la partie essentielle est un prisme d'indice de réfraction connu, en contact avec le liquide à examiner.

Annexes 5 : Propriété chimique des sucres

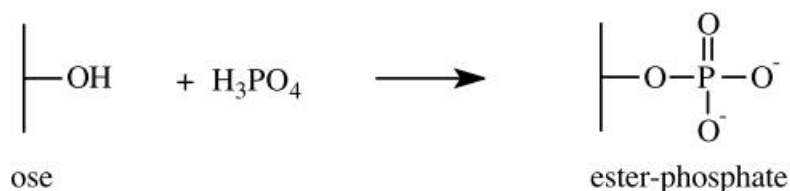
➤ Réaction de réduction :

Les réductions chimiques par un borohydrure alcalin (LiBH_4) transforment les aldéhydes et cétones en alcools.



➤ Réaction d'estérification :

Grâce à leurs fonctions alcools ils forment des esters avec des acides



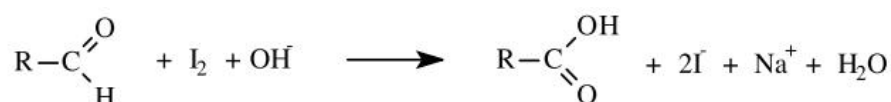
➤ **Réaction d'alkylation :**

En présence d'agents alcalins (soude, oxyde d'argent, diméthylformamide) et de sulfate ou d'iodure de méthyle, les hydroxyles libres des oses sont remplacés par des groupements méthoxy (OCH₃).

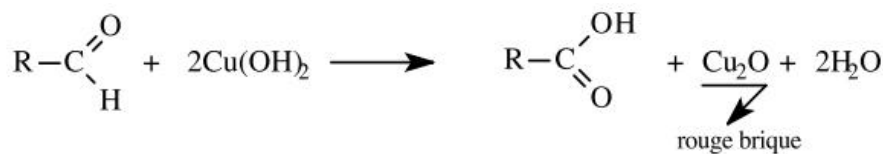
➤ **Réaction d'oxydation**

Les aldoses et, dans une moindre mesure les cétooses, sont oxydables en acides.

L'iode en milieu alcalin oxyde le glucose en acide gluconique.

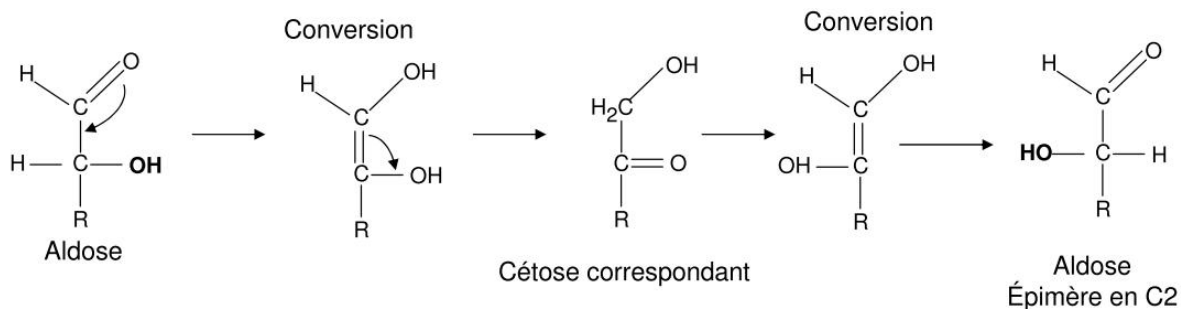


Réaction avec la liqueur de Fehling en milieu basique

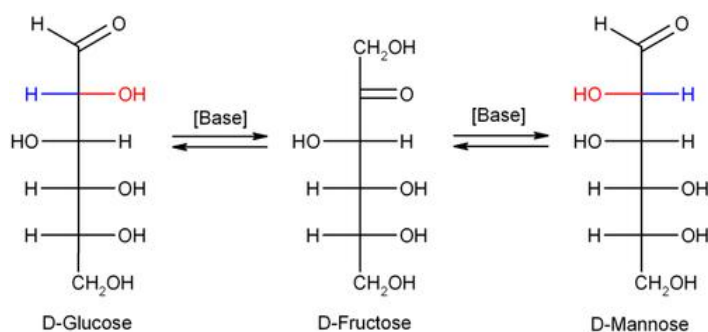


➤ **Isomérisation en milieu alcalin**

En milieu faiblement alcalin, il peut se produire une isomérisation entre C₁ et C₂ : isomérisation aldose/cétoose, ainsi que des épimérisation, qui passent par une forme intermédiaire éne-diol instable.



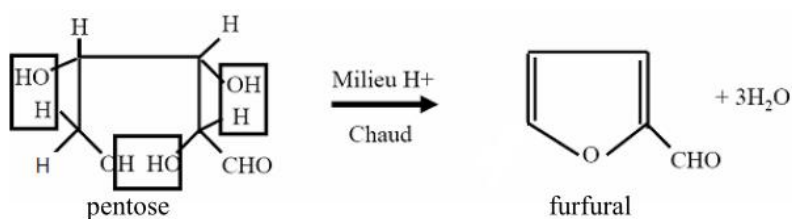
On peut par exemple obtenir une isomérisation fructose/glucose /mannose



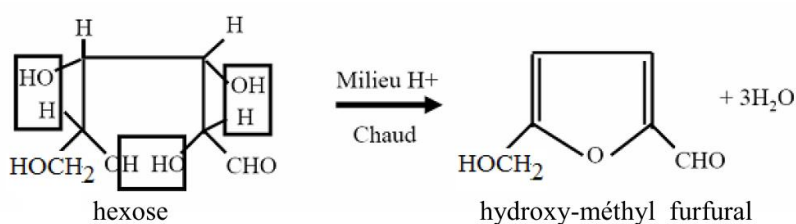
➤ **Déshydratation en milieu acide fort :**

Sous l'action d'un acide concentré et à chaud, les aldoses et les cétooses donnent naissance au furfural (dans le cas des pentoses) et au dérivé hydroxy méthyle de furfural dans le cas des hexoses.

Cas des pentoses :



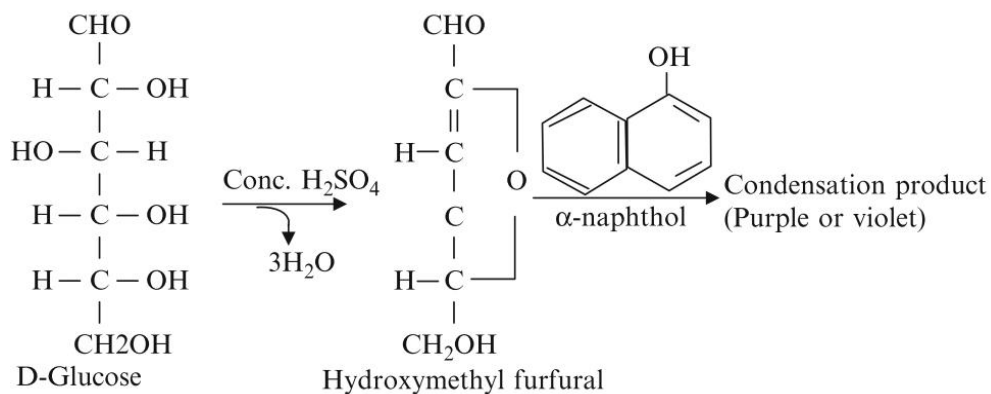
Cas des hexoses :



Les furfural et ses dérivés peuvent se condenser avec divers phénols (naphtol , orcinol , ...) qui permettent soit de caractériser , soit de doser les oses .

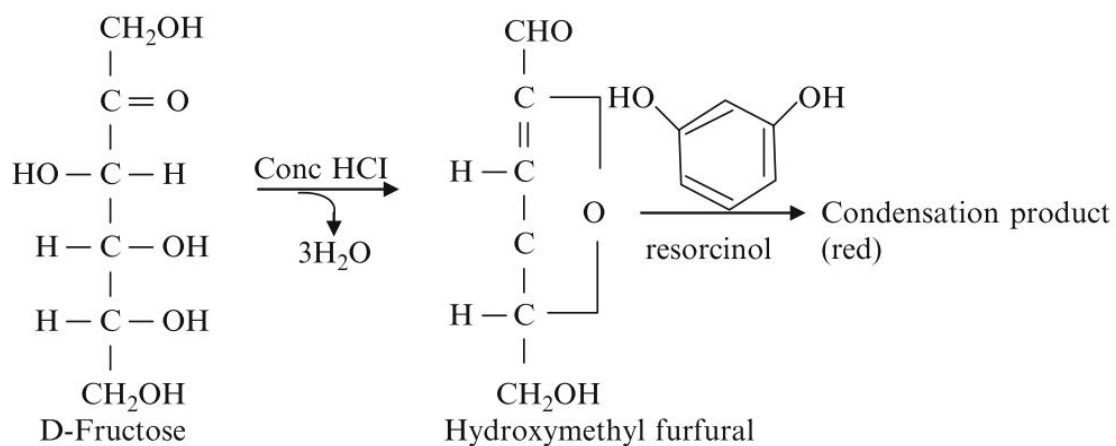
Réaction de Molish :

Coloration rouge bordeaux des oses en présence d'α naphthol



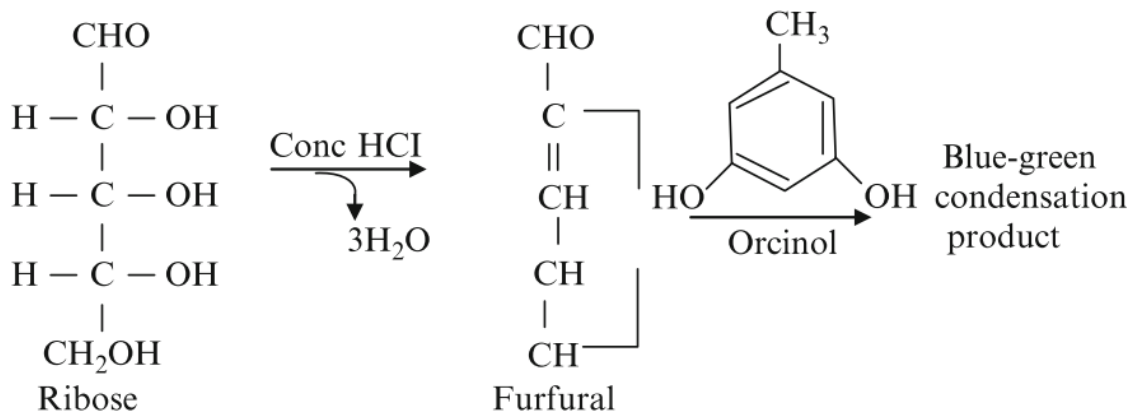
Réaction de Selivanoff :

Coloration rouge avec les cétooses en présence de résorcinol



Réaction de Bial :

Coloration bleue violacée avec des pentoses en présence d'orcinol



Annexes 4 : Classification des méthodes chromatographique

Classification suivant les deux phases mise en présence :

- Chromatographie en phase gazeuse (CPG) :

Caractérisé par une phase stationnaire contenue dans une colonne et un gaz vecteur, comme phase mobile, qui traverse cette phase stationnaire. Elle est applicable aux substances, ou dérivés de substances, qui se volatilisent dans les conditions de température utilisées.

La CPG est fondée sur les mécanismes *d'adsorption, de distribution de masse ou d'exclusion*. (18)

- Chromatographie en phase supercritique (CPS) :

La chromatographie en phase supercritique est un hybride des chromatographies gazeuses et liquide qui combine quelques-unes de leurs caractéristiques les plus intéressantes. (30)

Dont la phase mobile est un fluide porté à l'état supercritique ou subcritique. La phase stationnaire, contenue dans une colonne, peut être constituée de particules solides de granulométrie fine (silice ou graphite poreux par exemple), ou être chimiquement modifiée comme les phases utilisées en chromatographie liquide, ou pour les colonnes capillaires, être constituée d'un film liquide réticulé recouvrant uniformément les parois de la colonne.

La CPS est fondée sur des mécanismes *d'adsorption ou de distribution de masse*. (18)

- *Chromatographie en phase liquide (CPL):*

Caractérisée par une phase stationnaire contenue dans une colonne et une phase mobile liquide qui traverse, par percolation, cette phase stationnaire.

La CPL est principalement fondé sur les mécanismes *d'adsorption, de distribution de masse, d'échange d'ions, d'exclusion ou d'interaction stéréochimique*. (18)

- *La chromatographie planaire :*

Comprend la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie sur papier (CP) et l'électrochromatographie. Chacune de ces méthodes utilise une couche plane, relativement mince d'un matériau rigide ou déposé sur une surface de verre, de plastique ou de métal. La phase mobile se déplace à travers la phase stationnaire par capillarité, parfois aussi par gravité ou encore sous l'action d'une tension électrique. (30)

Classification selon le phénomène physico chimique mis en jeu

- *Chromatographie d'adsorption :*

La phase stationnaire est un solide adsorbant (CLS) généralement un gel de silice sur lequel les molécules adhèrent par un phénomène d'adsorption (physisorption, chimisorption) qui est due à des forces de cohésion notamment aux forces de Van Der Waals et aux interactions polaires et la séparation est fondée sur les différences d'interactions spécifique des solutés avec les sites actifs du solide. (35) (39)

- *La chromatographie de partage :*

Le phénomène repose sur le fait qu'en principe deux corps différents ne se partagent pas de façon identique entre deux phases, elle met en œuvre des gels de silice greffées de molécules variées ou de polymères (gels) la séparation est fondée sur les différences de solvation des solutés par la phase liquide qui imprègne les greffons ou le polymère. (35) (39)

- *Chromatographie d'échange d'ions :*

La phase stationnaire est un solide généralement poreux qui a des propriétés particulières que l'on appelle « un échangeur d'ions » les ions qui assurent l'électro neutralité de la

structure sont mobiles et échangeables avec ceux de la phase mobiles en contact avec l'échangeur. (39)

La chromatographie de paires d'ions :

On forme des paires d'ions entre les constituants ionisés du mélange à séparer et un contre ion convenable. L'association est due à des interactions électrostatiques auxquelles s'ajoutent des effets hydrophobes résultant du réarrangement des molécules d'eau autour des ions. La formation de paires d'ions permet la séparation d'ions ou d'entités ionisables qui en formant une entité neutre ou paires d'ions deviennent extractibles en milieu organique peu polaire. (35) (39)

La chromatographie d'échange de ligands :

La phase stationnaire contient une espèce fixée irréversiblement capable de former des complexes avec les solutés à séparer. (39)

La chromatographie par transfert de charge :

La phase stationnaire comporte un motif accepteur ou donneur d'électrons et peut ainsi former un complexe donneur accepteur d'électrons avec des solutés ayant des propriétés antagonistes au siennes. (39)

La chromatographie d'exclusion stérique : (péméation ou filtration sur gel)

La phase fixe est un solide poreux (gel ou réseau macromoléculaire) dont la dimension des pores est voisine des dimensions de certaines des molécules à séparer celles qui sont trop grosses pour pénétrer dans les pores sont exclues de la phase stationnaire et sont éluées d'abord. Alors que celle de plus faibles poids moléculaire peuvent diffuser librement dans la phase stationnaire. (35) (39)

Annexes 5 : Liste des phases stationnaires et phases mobiles

De nombreux types de phases stationnaires sont utilisés en CL, notamment :

- De la silice, de l'alumine ou du graphite poreux, utilisés en chromatographie en polarité de phase normale, où la séparation repose sur une adsorption différentielle et/ou une distribution de masse,
- Des résines ou polymères à groupements acides ou basiques, utilisés en chromatographie à échange d'ions, où la séparation repose sur la compétition entre les ions à séparer et ceux de la phase mobile,
- De la silice ou des polymères poreux, utilisés en chromatographie d'exclusion, où la séparation repose sur les différences de volume entre molécules, ce qui correspond à une exclusion stérique,
- Divers supports chimiquement modifiés, préparés à partir de polymères, de silice ou de graphite poreux, utilisés en CL en polarité de phase inversée, où la séparation repose principalement sur le partage des molécules entre la phase mobile et la phase stationnaire,
- Des phases stationnaires chimiquement modifiées spéciales, telles que des dérivés de la cellulose ou de l'amylose, des protéines ou des peptides, des cyclodextrines, etc., pour la séparation des énantiomères

La nature de la phase greffée est un paramètre déterminant pour les propriétés de séparation du système chromatographique.

Les phases greffées les plus couramment utilisées sont les

Suivantes :

| | | |
|-------------|---|-------------------------------|
| octyl | = Si-[CH ₂] ₇ -CH ₃ | C ₈ |
| octadécyl | = Si-[CH ₂] ₁₇ -CH ₃ | C ₁₈ |
| phényl | = Si-[CH ₂] _n -C ₆ H ₅ | C ₆ H ₅ |
| cyanopropyl | = Si-[CH ₂] ₃ -CN | CN |
| aminopropyl | = Si-[CH ₂] ₃ -NH ₂ | NH ₂ |
| diol | = Si-[CH ₂] ₃ -O-CH(OH)-CH ₂ -OH | |

Figure XI : Différentes phases greffées.

ANNEXES

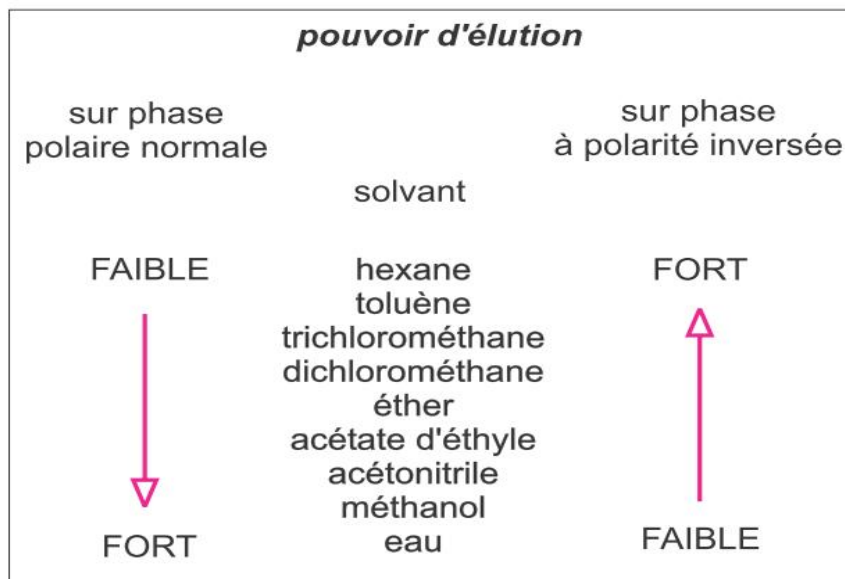


Figure XII : Phases mobiles classés selon leurs polarités.