

## **Remerciements**

*Toute la gratitude et le merci à Dieu qui nous a aidé jusqu'à ce que ce travail arrive à son terme.*

*Au terme de ce travail, nous saisissons cette occasion pour exprimer nos vifs remerciements à toute personne ayant contribué, de près ou de loin, à sa réalisation.*

*Nous vaudrions tout d'abord remercier notre promoteur le **Dr ABERBACHE Nafissa** qui nous a encadré et guidé avec patience tout au long de la réalisation de ce travail. Ses conseils nous ont été bien utiles, notamment pour la rédaction de ce mémoire.*

*L'expression de notre haute reconnaissance à notre Co-promotrice **Dr KICHOU Noura** qui n'a épargné aucun effort pour mettre à notre disposition la documentation et les explications nécessaires.*

*Nous exprimons également notre gratitude aux membres du jury, qui nous ont honoré en acceptant de juger ce modeste travail :*

<b>M<sup>me</sup> DERMECHE</b>	<b>Leila</b>	<i>Présidente de jury</i>
<b>M<sup>me</sup> BEKDA</b>	<b>Hamida</b>	<i>Examinatrice</i>
<b>M<sup>me</sup> IGHIL AHRIZ</b>	<b>Karima</b>	<i>Examinatrice</i>

*Nous tenons à remercier chaleureusement Madame SEMAN Rabiaa ingénieur du laboratoire chimie pharmaceutique d'avoir mis à notre disponibilité tous les moyens nécessaires, et surtout pour son soutien moral.*

*Enfin nous tenons à remercier l'ensemble du corps enseignants du département  
Chimie*

## *Dédicaces*

*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 très chères sœurs : Karima et ses enfants, Thinhinane,*

*Rosa, Aicha, Razika*

*A Mes frères : Lyes ,Cherif, Esseddik, Ayoub*

*A mes meilleurs amis au monde: Hadjila, Fadhila, Samia, Rokia, Fatiha, Saloua, Salima, Yamina, Amel, Zazou, Dehia, Tina,*

*Hadjira, Lydia, Farida, Sonia, Abderazak,*

*Farid, Fatah Fofo, Hamida, celia*

*Je vous remercie pour votre patience et amour.*

*A ma binôme Yasmine, je te remercie pour tout*

*A toutes personnes m'ayant aidé de près ou de loin pour la réalisation de ce mémoire*

*Khaoula*

## *Dédicaces*

*A la lumière de ma vie qui me donne la force d'avancer ; ma mère.*

*A celui sans lequel je ne serai pas ce que je suis aujourd'hui ; mon père.*

*A mes très chères sœurs et leurs familles.*

*A toute ma famille.*

*A tous mes amis et mon binôme khaoula.*

*Enfin à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation  
de ce travail.*

*Merci.*

*Yasmine*

## Table de matières

Liste des abréviations

Glossaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction général.....01

### Partie bibliographique

**I. Généralités sur le lactulose.....03**

I.1. Définition .....03

I.2. Propriétés du lactulose .....03

I.3. Propriétés pharmacologie .....04

I.3.1. Propriétés pharmacocinétiques.....04

I.3.2. Propriétés pharmacodynamiques.....04

I.3.3. Données de sécurité préclinique.....05

I.4. Effets physiologiques du lactulose.....05

I.5. Indications thérapeutiques.....05

I.6. Posologie et précaution d'emploi .....05

I.7. Synthèse de lactulose.....06

I.7.1. Synthèse chimique .....06

I.7.2. Synthèse enzymatique .....06

**II. Méthodes de caractérisations du lactulose.....07**

II.1. Spectrophotométrie d'absorption UV/Visible.....07

II.1.1. Domaine spectral.....07

II.1.2. Principe.....08

II.1.3. Applications de la spectroscopie UV/Visible.....08

II.1.3.1. Analyse qualitative .....08

II.1.3.2. Analyse quantitative .....08

II.1.3.2.1. Lois de BEER et LAMBERT .....09

II.1.3.2.2. Validité de la loi de Beer-Lambert.....09

II.2. Dosage du lactulose par UV/Visible.....09

**III. Utilisation de plan d'expérience pour la synthèse chimique pharmaceutique.....11**

III.1. Définition.....11

III.2. Domaines d'application.....11

III.3. Avantages de plan d'expériences.....11

III.4. Inconvénients.....	12
III.5. Présentation de plan d'expériences.....	12
III.5.1. Notion d'espace expérimental.....	12
III.5.1.1. Facteurs.....	12
III.5.1.2. Réponses.....	13
III.5.1.3. Matrice d'expériences.....	13
III.5.2. Domaine expérimental.....	13
III.6. Objectifs de plan d'expériences.....	14
III.6.1. Criblage des facteurs.....	14
III.6.2. Etudes quantitatives des facteurs.....	14
III.6.3. Etudes quantitatives des réponses.....	14
III.6.4. Optimisation.....	14
III.7. Logiciels de plan d'expériences .....	14

## **Partie expérimentale**

### **Chapitre I : Matières, matériels et méthodes**

Objectif .....	15
I. Réactifs et matières premières utilisés .....	15
II. Matériel.....	16
III. Méthode .....	16
III.1. Présentation de l'étude .....	16
III.2. Synthèse du lactulose .....	16
III.2.1. Synthèse du lactulose à partir de lactose en utilisant le NaOH .....	16
III.2.2. Synthèse du lactulose à partir de lactose en utilisant le Ca(OH) <sub>2</sub> .....	18
III.3. Tests de caractérisation .....	20
III.3.1. Aspect .....	20
III.3.2. Densité.....	20
III.3.3. Mesure du pH .....	21
III.3.4. Test d'identification du lactulose.....	21
III.3.5. Dosage du lactulose par spectrophotomètre UV/Visible... ..	21
III.3.5.1. Préparation des solutions .....	21
III.3.5.1.1. Préparation de la solution du résorcinol (0,05%) .....	21
III.3.5.1.2. Préparation du blanc.....	22
III.3.5.1.3. Préparation de la solution standard et détermination du domaine de linéarité.....	22

III.4. Calcul des concentrations de lactulose.....	23
III.5. Calcul du rendement de la synthèse du lactulose.....	23
III.6. Analyse statistique.....	23

## **Chapitre II : Résultats et discussions**

I. Vérification de la fiabilité de la méthode du dosage (étalonnage).....	24
II. Synthèse du lactulose en utilisant le catalyseur NaOH .....	25
II.1 Aspect des solutions du lactulose.....	25
II.2. Identification des solutions du lactulose.....	25
II.3. Détermination du pH et de la densité des solutions du lactulose .....	26
II.4. Résultats de dosage des solutions du lactulose.....	26
III. Synthèse du lactulose en utilisant le catalyseur Ca(OH) <sub>2</sub> .....	28
III.1. Aspect des solutions du lactulose.....	28
III.2. Test d'identification des solutions du lactulose.....	29
III.3. Résultats de pH et de densité des solutions du lactulose .....	29
III.4. Dosage des solutions du lactulose.....	30
III.4.1. Rendement des solutions du lactulose.....	31
IV. Exploitation statistique des réponses par le Modde 6.....	32
IV.1. Évaluation de la qualité du modèle mathématique.....	32
IV.2. Étude des interactions facteurs-réponses.....	33
IV.2.1. Étude des interactions facteurs-réponses obtenues par la synthèse au NaOH.....	34
IV.2.2. Étude des interactions facteurs-réponses obtenues par la synthèse au Ca(OH) <sub>2</sub> .....	34
IV.3. Prédiction du système.....	35
IV.3.1. Prédiction du système sur la densité et le dosage .....	35
IV.3.2. Prédiction du système sur le dosage du lactulose.....	36
V. Choix du meilleur catalyseur pour la synthèse chimique du lactulose liquide.....	37
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>38</b>

### **Références bibliographiques**

### **Annexes**

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Structure chimique du lactulose .....	03
<b>Figure 2</b> : Isomérisation du lactose suivant la réaction de Lobry de Bruyne Ekenstein .....	06
<b>Figure 3</b> : Isomérisation enzymatique du lactulose.....	07
<b>Figure 4</b> : Présentation de plan d'expériences .....	12
<b>Figure 5</b> : Niveau bas du facteur est noté par -1 et le niveau haut par +1 .....	13
<b>Figure 6</b> : Domine expérimentale .....	13
<b>Figure 7</b> : Dilutions pour le dosage des essais de synthèse du lactulose par la méthode d'isomérisation par le NaOH.....	18
<b>Figure 8</b> : Dilutions pour le dosage des essais de synthèse du lactulose par la méthode d'isomérisation par le Ca(OH) <sub>2</sub> .....	20
<b>Figure 9</b> : Protocole expérimentale pour le dosage du lactulose standards .....	22
<b>Figure 10</b> : Courbe d'étalonnage du standard du lactulose.....	24
<b>Figure 11</b> : Aspect des solutions de synthèse du lactulose par NaOH.....	25
<b>Figure 12</b> : Résultats de test d'identification de lactulose synthétisé par NaOH.....	25
<b>Figure 13</b> : Concentrations des essais en lactulose (µg/ml) en fonction des concentrations initiales en lactose (µg/ml) obtenues par NaOH .....	28
<b>Figure 14</b> : Aspect des essais réalisés avec le Ca(OH) <sub>2</sub> .....	28
<b>Figure 15</b> : Test d'identification du lactulose à partir des solutions préparées par le Ca(OH) <sub>2</sub> .....	29
<b>Figure 16</b> : Concentrations des essais en lactulose (µg/ml) en fonction des concentrations initiales en lactose (µg/ml) obtenues par la méthode de Ca(OH) <sub>2</sub> .....	31
<b>Figure 17</b> : Rendements en lactulose des solutions obtenues par l'isomérisation de lactose par l'hydroxyde de calcium. ....	31
<b>Figure 18</b> : Représentation des coefficients d'ajustement du modèle pour NaOH et Ca(OH) <sub>2</sub> .....	32
<b>Figure 19</b> : Valeurs des coefficients d'effets et des interactions des facteurs pour le catalyseur NaOH .....	34
<b>Figure 20</b> : Valeurs des coefficients d'effets et des interactions des facteurs pour le catalyseur Ca(OH) <sub>2</sub> .....	35
<b>Figure 21</b> : Prédiction du système de densité par les méthodes NaOH et Ca(OH) <sub>2</sub> .....	36
<b>Figure 22</b> : Prédiction du système de dosage du lactulose par les méthodes NaOH et Ca(OH) <sub>2</sub> .....	36
<b>Figure 23</b> : Rendement de lactulose synthétisé par les deux catalyseurs NaOH et Ca(OH) <sub>2</sub> .....	37

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Propriétés du lactulose solide (MP) et liquide (PF).....	04
<b>Tableau 2</b> : Réactifs, produits et matières premières utilisés pour la synthèse chimique et contrôle qualité du lactulose .....	15
<b>Tableau 3</b> : Matériels utilisé pour la synthèse chimique et contrôle qualité du lactulose.....	16
<b>Tableau 4</b> : Niveaux des facteurs pour la synthèse du lactulose par NaOH .....	17
<b>Tableau 5</b> : Plan d'expérimentation en valeurs réelles par le catalyseur NaOH.....	17
<b>Tableau 6</b> : Niveaux des facteurs pour la synthèse du lactulose par Ca(OH) <sub>2</sub> .....	19
<b>Tableau 7</b> : Plan d'expérimentation en valeurs réelles par le catalyseur Ca(OH) <sub>2</sub> .....	19
<b>Tableau 8</b> : Valeurs du pH et de la densité des solutions du lactulose préparées par NaOH.....	26
<b>Tableau 9</b> : Valeurs des absorbances, concentrations et les rendements des solutions du lactulose préparées par NaOH.....	27
<b>Tableau 10</b> : Valeurs de pH et de densité des solutions du lactulose préparées par Ca(OH) <sub>2</sub> .....	29
<b>Tableau 11</b> : Absorbances, concentrations et rendements obtenues pour tous les essais par le Ca(OH) <sub>2</sub> .....	30

## Tableaux annexes

<b>Tableau 12</b> : Etude statistique de l'absorbance des solutions pour NaOH et Ca(OH) <sub>2</sub>	
<b>Tableau 13</b> : Etude statistique du pH des solutions pour NaOH et Ca(OH) <sub>2</sub>	
<b>Tableau 14</b> : Etude statistique des densités solutions pour NaOH et Ca(OH) <sub>2</sub>	

## Liste des abréviations

- Ca(OH)<sub>2</sub>** : Hydroxyde de calcium
- CCM** : Chromatographie sur couche mince
- CE** : Electrophorèse capillaire
- CPG** : Chromatographie en phase gazeuse
- d** : densité
- DO** : Densité optique (l'absorbance)
- Ech** : Echantillon
- EH** : Encéphalopathie hépatique
- Fig** : Figure
- HCl** : Acide chlorhydrique
- HPLC** : Chromatographie liquide à haute performance
- IR** : Infra rouge
- ISO** : International Standard Organisation
- m** : masse
- MP** : Matière première
- NH<sub>3</sub>** : Ammoniac
- PA** : Principe actif
- PF** : Produit fini
- pH** : Potentiel en hydrogène
- R** : Rendement
- RMN** : Résonance magnétique nucléaire
- UV/V** : Ultraviolet/Visible
- λ** : Longueur d'onde

## GLOSSAIRE

**Bifidobactérie:** est un genre d'action bactéries bifidobactériales anaérobies à gram positif.

Ce sont des bactéries présentes en grande quantité dans l'intestin qui ont le même rôle que les bifidus.

Ces bactéries sont constituées de bacilles de forme irrégulière, anaérobies stricts, présentant un test négatif pour la catalase, immobiles. Les bifidobactéries appartiennent à la famille des bactéries lactiques. Elles participent à la fermentation du lait dans le cadre de la fabrication de fromage et de préparation similaires aux yaourts. De plus, elles produisent de grandes quantités d'acide lactique, ce qui entraîne une baisse du Ph qui leur est favorable et qui inhiberait la croissance d'autres germes.

**Chromophores** : Ce sont des groupes d'atomes liés dans une molécule et qui sont responsables de pics d'absorption importants dans l'ultraviolet ou le visible.

**Encéphalopathie hépatique** : est un 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 précipitant en situation de dommage hépatique chronique) ou chronique et irréversible.

**Isomérisation** : En chimie organique, on parle d'isomérisation lorsque deux molécules possèdent la même formule brute mais ont des formules semi développées différentes. Ces molécules appelées isomères, ont des propriétés physiques, chimiques, et biologiques différentes.

**Lactobacilles** : sont des bactéries utilisées lors de la fabrication des yaourts et de certains fromages. Elles transforment le lactose en acide lactique ce qui permet, entre autre, de faire cailler le lait et donc de fabriquer ces fromages.

**Lactose** : sucre produit d'une manière naturelle par l'organisme des mammifères et qui se trouve dans leur lait. C'est un diholoside, c'est-à-dire un sucre complexe composé de l'association de deux sucres simples, le glucose et le galactose, reliés par une liaison osidique particulière, (d'où le nom officiel de  $\beta$ -D galactopyrannosyl(1→4)Dglucopyrannose).

**Laxatifs osmotiques** : sont des produits qui vont augmenter l'hydratation et donc le volume qu'occupent les aliments ingérés. Cette augmentation se fait par un phénomène d'osmose en attirant les liquides (l'eau) à l'intérieur du tube digestif et plus précisément le colon. Les laxatifs osmotiques sont donc indiqués pour lutter contre la constipation, ils sont

particulièrement efficaces lorsqu'ils sont pris le matin et qu'ils sont associés à une activité physique et à une alimentation riche en fibres.

**Pré-biotiques:** sont généralement des oligosaccharides ou des polysaccharides de courte chaîne constitué 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. Les pré-biotique doivent agir comme substrat sélectif d'une ou d'un nombre restreint de souches bactériennes bénéfique qui résident dans le côlon et en stimuler la croissance. Les bifidobactéries et les lactobacilles sont les microorganismes du micro biote intestinal (flore intestinale) les plus fréquemment ciblés.

# **Introduction générale**

Un pourcentage élevé de la population mondiale souffre des maladies gastro-intestinales de plusieurs types. Beaucoup d'entre elles sont causées par des bactéries pathogènes qui envahissent l'intestin humain [1].

L'un des médicaments commercialisé en Algérie pour le traitement symptomatique de la constipation est le lactulose. Ce produit est commercialisé sous forme de sirop et cette forme galénique nécessite des contrôles de routine telle que la détermination de la teneur en principe actif.

La méthode préconisée par la pharmacopée, pour le dosage du lactulose, est la chromatographie liquide à haute performance, en raison de sa fiabilité, sa reproductibilité et sa capacité à détecter des éléments difficilement détectables par d'autres méthodes; mais un problème économique oblige les industriels à chercher d'autres méthodes pouvant donner des résultats de même qualité et à moindre coût et parmi les méthodes qui y en répondent, la spectrophotométrie d'absorption moléculaire dans l'ultraviolet et le visible.

La production du lactulose est principalement basée sur la réaction d'isomérisation du lactose dans les milieux alcalins. Un grand nombre de catalyseurs chimiques (tels que l'hydroxyde de calcium, l'hydroxyde de sodium, des amines tertiaires, de l'aluminate, *etc.*) a été utilisé pour l'isomérisation du lactose en lactulose. Le catalyseur utilisé pour la synthèse du lactulose doit :

- avoir des caractéristiques attrayantes comme niveau maximum d'isomérisation avec une faible quantité de sous-produits,
- être sans danger pour l'environnement et non toxique,
- avoir un coût le plus bas possible, mais disponible.

L'objectif de notre travail est de synthétiser le lactulose par isomérisation du lactose en utilisant les deux catalyseurs : le NaOH et le Ca(OH)<sub>2</sub> qui sont les plus disponibles et ayant une bonne innocuité et qui donnent de meilleurs résultats en terme de rendement. En fin d'exploiter les résultats de dosage par spectrophotométrie UV/V.

Le logiciel Modde 6, a été utilisé pour déterminer les conditions optimales pour lesquelles le bon rendement de lactulose est atteint. L'influence des concentrations de lactose et de catalyseurs a été recherchée.

Tous les essais réalisés ont été reproduits trois fois, puis évalués statistiquement pour vérifier la fiabilité et la reproductibilité des résultats.

Notre plan de travail est subdivisé en deux parties : bibliographique et expérimentale.

La partie bibliographique regroupe les notions générales sur la synthèse du lactulose, les méthodes de caractérisation du lactulose et des notions générales sur la méthodologie de la recherche expérimentale.

Dans la partie expérimentale, nous exposerons les différentes méthodes et appareils utilisés pour la synthèse du lactulose, qui est le dosage par spectrophotométrie UV/V et nous terminons cette partie par l'interprétation des résultats obtenus.

Enfin, une conclusion générale mettra l'accent sur les résultats essentiels obtenus au cours de notre étude.

# **Partie bibliographique**

## I. Généralités sur le lactulose

Lactulose est un diholoside synthétique largement employé dans l'industrie pharmaceutique comme principe actif pour ses effets thérapeutiques dans la production de laxatifs et dans l'industrie alimentaire grâce à ses effets bénéfiques pour la santé humaine.

### I.1. Définition

Le lactulose (4-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl- $\beta$ -D-fructofuranose) est un disaccharide synthétique, isomère du lactose composé de deux sucres, le galactose et le fructose, liés par une liaison osidique  $\beta$  (1-4) [2].

Le lactulose est plus sucré et soluble que le lactose [3], c'est un pré-biotique typique qui possède un grand intérêt médical dans le traitement de l'encéphalopathie hépatique et la constipation chronique [4] et aussi possède un rôle important dans l'industrie laitière.

### I.2. Propriétés du lactulose

- Structure

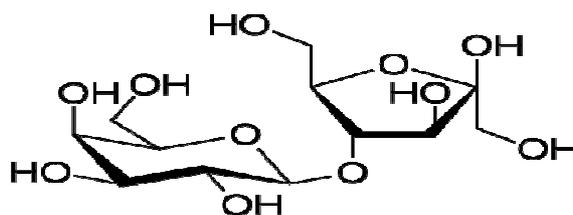


Figure 1 : Structure chimique du lactulose [5]

- Propriétés physiques et chimiques

Le lactulose existe sous forme solide (poudre) comme matière première (MP) et sous forme liquide comme produit fini (PF), les principales propriétés des deux formes sont résumées dans le tableau 1 ci-dessous.

**Tableau 1** : Propriétés du lactulose solide (MP) et liquide (PF) [6]

	Lactulose liquide	Lactulose en poudre
<b>Nomenclature</b>	4-O-β -D-galactopyranosyl-β-D-fructofuranose	
<b>Formule général</b>	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	
<b>Masse molaire</b>	342,3 g/mol	
<b>Teneur (%)</b>	95% - 105%	95 % - 102%
<b>Aspect</b>	liquide limpide, visqueux	poudre cristalline
	incolore à jaune-brun pâle,	Blanche
<b>Solubilité</b>	miscible à l'eau	soluble dans l'eau
	Soluble dans le méthanol et insoluble dans le toluène et l'éther.	
<b>Température de fusion</b>	168°C	

### I.3. Propriétés pharmacologie

#### I.3.1. Propriétés pharmacocinétiques

Le lactulose est faiblement absorbé après prise orale et atteint le colon inchangé. A ce niveau, il est métabolisé par la flore bactérienne du colon. La métabolisation est complétée jusqu'à des doses de 40 à 75 ml. A des dosages plus élevés, une partie peut être excrétée non modifiée.

#### I.3.2. Propriétés pharmacodynamiques

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 [7].

### **I.3.3. Données de sécurité préclinique**

Les résultats des études de toxicité aiguë, à moyen terme et chronique chez diverses espèces, indiquent que la substance possède une toxicité très faible. Les effets observés semblent être dus à l'effet de masse dans le tractus gastro-intestinal plutôt qu'à une activité toxique plus spécifique.

Dans les études de reproductivité et de tératologie chez les lapins, les rats et les souris, aucun effet indésirable n'a été constaté [8].

### **I.4. Effets physiologiques du lactulose**

La liaison  $\beta$ -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  $\beta$ -galactosidase. Ce métabolisme sélectif de lactulose change l'équilibre microbien et la composition biochimique du contenu caecal [9].

### **I.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 pré-biotique parce qu'il stimule la croissance des bactéries salutaires dans l'appareil gastro-intestinal (bifidobactérie ; lactobacilles) et empêche l'existence de bactéries pathogènes (salmonelles) [2] changeant ainsi l'équilibre microbien vers une composition plus saine qui mène à un état de santé améliorée [10].

### **I.6. Posologie et précaution d'emploi**

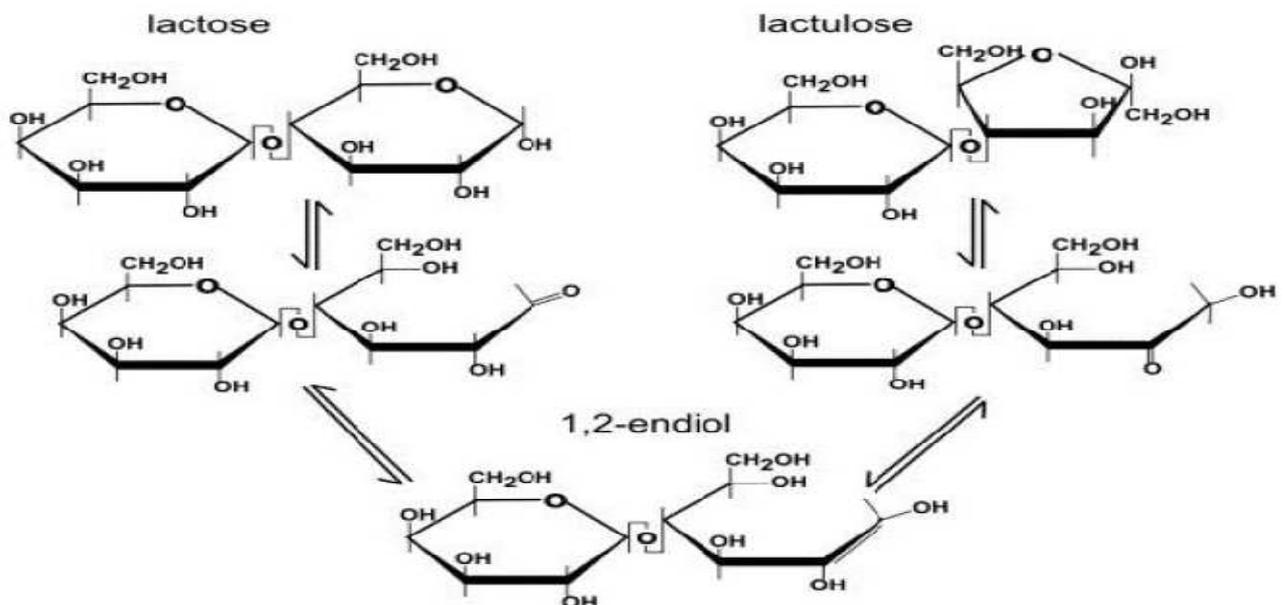
La solution de lactulose peut être administrée diluée ou non diluée. La dose doit être adaptée en fonction de la réponse clinique. Le lactulose peut être administré au moyen d'une dose quotidienne unique ou en deux doses fractionnées.

Le lactulose doit être administré avec prudence aux patients intolérants au lactose. La dose normalement utilisée en cas de constipation ne devrait pas poser problème chez les diabétiques [11], Chez les enfants, l'utilisation de laxatif doit être exceptionnelle et requiert une surveillance médicale.

## I.7. Synthèse de lactulose

### I. 7.1. Synthèse 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 [12].

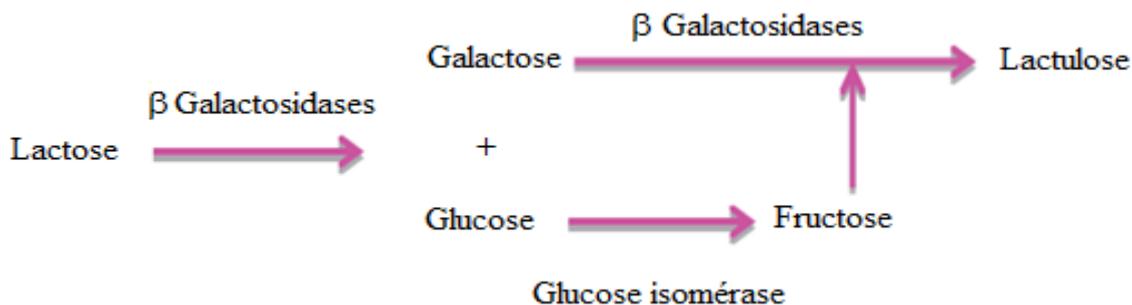


**Figure 2 :** Isomérisation du lactose suivant la réaction de Lobry de Bruyne Ekenstein[13]

### I.7.2. Synthèse enzymatique

Cette méthode est basée sur la synthèse enzymatique du lactulose en utilisant la  $\beta$ -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  $\beta$  [14].

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 [15].



**Figure 3 :** Isomérisation enzymatique du lactulose

## II. Méthodes de caractérisation du lactulose

Le lactulose est un disaccharide, constitué d'une molécule de fructose et d'une molécule de galactose. Plusieurs méthodes ont été développées pour la détermination du lactulose telle que la CPG (Chromatographie en phase gazeuse), RMN (Résonance magnétique nucléaire), HPLC (Chromatographie liquide à haute performance), ... en outre une analyse spectrophotométrique simple a été également développée pour la quantification du lactulose dans les préparations pharmaceutiques [16].

Le dosage du lactulose dans un sirop est décrit dans la pharmacopée, la méthode de référence est la chromatographie liquide à haute performance couplée au détecteur réfractométrique. Outre ses nombreux avantages de précision de sélectivité, cette méthode est d'un coût de revient non négligeable, des frais qui s'additionnent aux charges de fabrication du médicament. En effet le réfractomètre présente deux inconvénients : coût et non disponibilité en Algérie (disponible chez deux voir trois industries sur 127 industries existantes). Un besoin de disposer d'une technique d'un faible coût de revient et de mise en œuvre facile s'impose et parmi les méthodes qui y en répondent, la spectrophotométrie d'absorption moléculaire dans l'ultraviolet et le visible [17].

### II.1. Spectrophotométrie d'absorption UV/Visible

La spectroscopie d'absorption dans l'UV/V est une méthode très commune dans les laboratoires. Elle est basée sur la propriété des molécules d'absorber des radiations lumineuses de longueur d'onde déterminée.

#### II.1.1. Domaine spectral

Un soluté coloré ou chromophore absorbe la lumière visible (longueurs d'onde comprises entre 400 et 800 nm), on parle de spectrophotocolorimétrie ou plus

simplement de colorimétrie. Certaines solutions absorbent dans l'ultraviolet (longueurs d'onde inférieures à 380 nm), on parle alors de spectrophotométrie UV [18].

### **II.1.2. Principe**

La spectrophotométrie d'absorption moléculaire dans le domaine UV/V, est une technique courante de contrôle et d'analyse de composés chimiques.

Elle s'applique à des groupements d'atomes (ex : molécules, ions, polymères) qui absorbent le rayonnement électromagnétique dans le domaine UV/V appelées chromophore [17].

Une transition UV/V correspond à un saut d'un électron d'une orbitale moléculaire fondamentale occupée à une orbitale moléculaire excitée vacante. La matière absorbe alors un photon dont l'énergie correspond à la différence d'énergie entre ces niveaux fondamental et excité [19].

### **II.1.3. Applications de la spectroscopie UV/Visible**

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

#### **II.1.3.1. 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. Elle doit toujours être complétée par d'autres informations physiques d'origine spectrale (IR, RMN) ou chimiques comme les point de fusion, d'ébullition, réaction colorés [20].

#### **II.1.3.2. Analyse quantitative**

La spectroscopie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible est l'un des outils les plus utilisés en analyse quantitative. L'absorption du rayonnement UV/V par les molécules permet de mesurer leurs nombres dans le trajet du rayonnement. 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.

### II.1.3.2.1. Lois de BEER et LAMBERT

Soit une lumière monochromatique traversant une solution absorbante de concentration  $C$  contenue dans une cuve d'épaisseur  $l$ .

Une partie de ce rayonnement sera absorbée par l'échantillon et l'autre partie sera transmise. Lambert et Beer ont étudié les relations qui existent entre  $I_0$  et  $I$  : l'intensité d'une lumière monochromatique traversant un milieu où elle est absorbée décroît de façon exponentielle :

$$I = I_0 e^{-\varepsilon l C} \quad \text{Ou encore :} \quad A = \log \frac{I_0}{I} = \log \frac{1}{T} \quad \text{avec:} \quad T = I/I_0$$

$$\text{Et : } A = \varepsilon l C$$

$I_0$  : Intensité du rayonnement monochromatique incident

$I$  : Intensité après passage à travers la cuve contenant la solution (intensité transmise)

$C$  : Concentration molaire de l'entité absorbante dans la solution ( $\text{mol. L}^{-1}$ )

$\varepsilon$  : Coefficient d'absorption molaire de la substance en solution ( $\text{L/mol.cm}$ ) à  $\lambda$  considérée

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

$T$  : Transmittance

$A$  : Absorbance (ou D.O)

### II.1.3.2.2. Validité de la loi de Beer-Lambert

La loi de Beer-Lambert s'applique pour des radiations monochromatiques et sa validité est bonne lorsqu'on travaille avec des solutions suffisamment diluées pour ne pas modifier les propriétés des molécules (association, complexation ...)[18].

## II. 2. Dosage du lactulose par UV/Visible

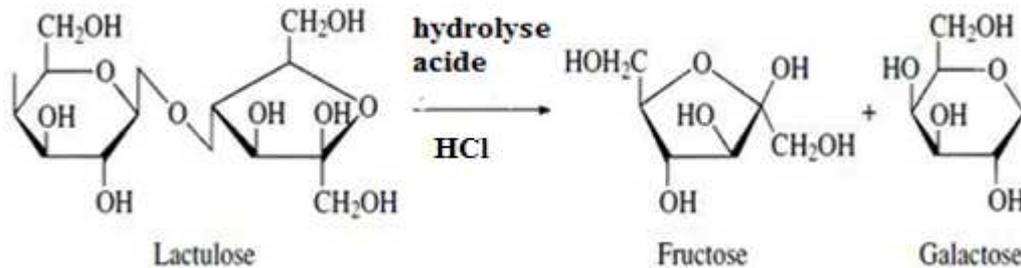
La méthode étudiée est basée sur le fait que les autres oses présents dans le lactulose liquide (glucose, galactose, tagatose) sont des aldohexoses, tandis que le fructose, le produit de l'hydrolyse du lactulose, est un cétohexose, et cette différence dans les groupements fonctionnels a été exploitée 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 l'UV/V [20].

La méthode proposée peut être divisée en 3 étapes :

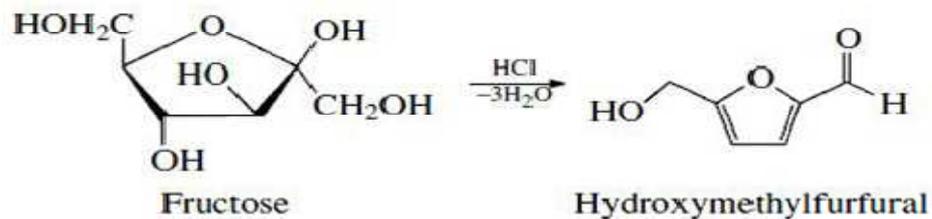
➤ Dans la première étape, l'acide chlorhydrique hydrolyse le lactulose en fructose et galactose.

### Étape 1



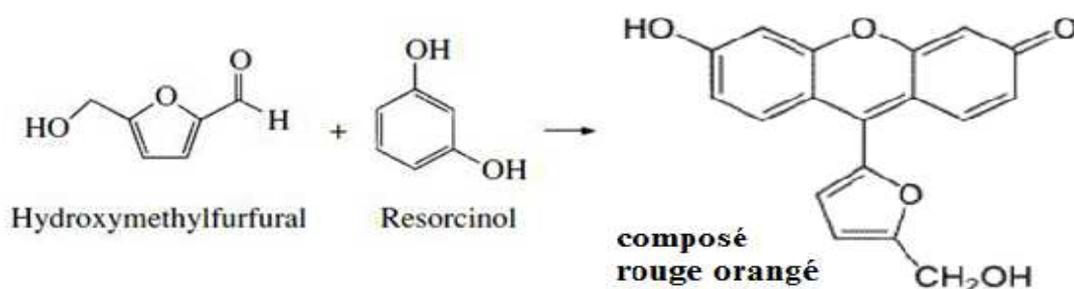
➤ Dans la deuxième étape, le fructose se dégrade en hydroxyméthylfurfural, parce que durant la réaction de déshydratation des hexoses par de l'acide concentré, les cétooses (fructose) sont transformés en hydroxyméthylfurfural plus rapidement que les aldoses (glucose, galactose, tagatose).

### Etape 2



➤ Dans la dernière étape, l'hydroxyméthylfurfural réagit avec le résorcinol donnant un composé de couleur rouge-oranger.

### Étape 3



### **III. Utilisation de plan d'expérience pour la synthèse chimique pharmaceutique**

Les plans d'expériences permettent d'organiser au mieux les essais qui accompagnent une recherche scientifique ou des études industrielles, ils sont présents dans les trois modules du référentiel : analyse, synthèse et formulation, ainsi qu'en mathématiques.

#### **III.1. Définition**

La méthodologie de la recherche expérimentale est une méthode pour planifier ou organiser les expériences scientifiques et industrielles dans le but de retirer l'information correspondante à l'objectif fixé préalablement [21,22]. Leur but est d'obtenir un maximum d'informations avec un minimum d'expérimentations par rapport à l'objectif que l'on s'est fixé.

Selon la [Norme ISO 3534-3]: les plans d'expériences constituent essentiellement une planification d'expériences afin d'obtenir des conclusions solides et adéquates de manière efficace et économique.

#### **III.2. Domaines d'application**

Les plans d'expériences sont utilisés dans les études industrielles en recherche et développement. Ils interviennent dans de nombreux domaines industriels. On peut notamment citer :

- industries chimiques, pétrochimiques et pharmaceutiques
- industrie agroalimentaire
- industries mécaniques et automobiles
- industries métallurgiques
- aux essais de laboratoire

#### **III.3. Avantages de plan d'expériences**

- diminuer le nombre des essais
- rechercher les facteurs influents
- détecter les interactions entre facteurs
- calculer des effets et des interactions
- détecter les optimaux
- la meilleure précision des résultats
- optimisation des résultats
- modélisation des résultats

### III.4. Inconvénients

- Les interactions entre les facteurs ne sont pas estimées
- Beaucoup d'expériences sont exigées quand le nombre des facteurs augmente
- Seulement une petite partie du domaine expérimental est examinée
- Les puissances optimums globales ne sont pas trouvées [23].

### III.5. Présentation de plan d'expériences

Le scientifique est souvent amené à comprendre comment réagit un système en fonction des facteurs susceptibles de le modifier. Pour visualiser cette évolution, il mesure une réponse et va ensuite essayer d'établir des relations de cause à effet entre les réponses et les facteurs.

La figure 4 suivante présente un plan d'expérience.

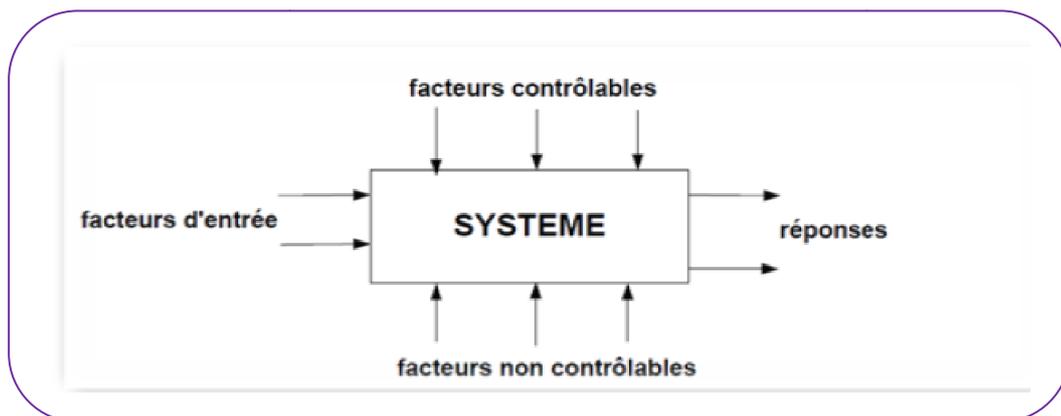


Figure 4 : Présentation de plan d'expériences

#### III.5.1. Notion d'espace expérimental

##### III.5.1.1. Facteurs

Ce sont les variables que l'on désire à étudier et qui sont supposées avoir une influence sur le système. Ils peuvent être quantitatifs ou qualitatifs, continues ou discrets. Contrôlables ou non contrôlables. Généralement, on prend en compte les facteurs caractérisés par une seule variable naturelle qualitative ou quantitative que l'on contrôle. Les facteurs sont limités par deux bornes, inférieure (bas) et supérieure (haut). On désigne le niveau bas par le signe (-1) et le niveau haut par le signe (+1) [24].

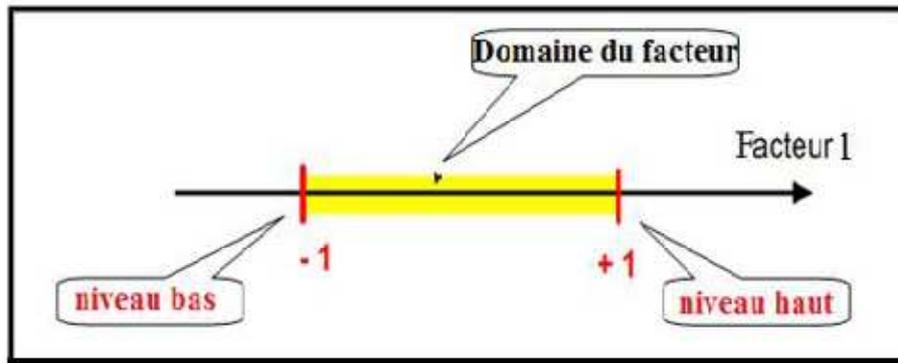


Figure 5 : Niveau bas du facteur est noté par -1 et le niveau haut par +1

### III.5.1.2. Réponses

Une réponse expérimentale est une manifestation mesurable que l'on observe lorsque l'on fait varier les facteurs étudiés. Un phénomène peut être éventuellement décrit par plusieurs réponses expérimentales [25].

### III.5.1.3. Matrice d'expériences

Matrice d'expérience est un tableau de n lignes et k colonnes, regroupant les conditions expérimentales d'un plan d'expériences. n et k correspondent respectivement au nombre d'expériences et au nombre des variables codées.

### III.5.2. Domaine expérimental : Limites de variation des facteurs

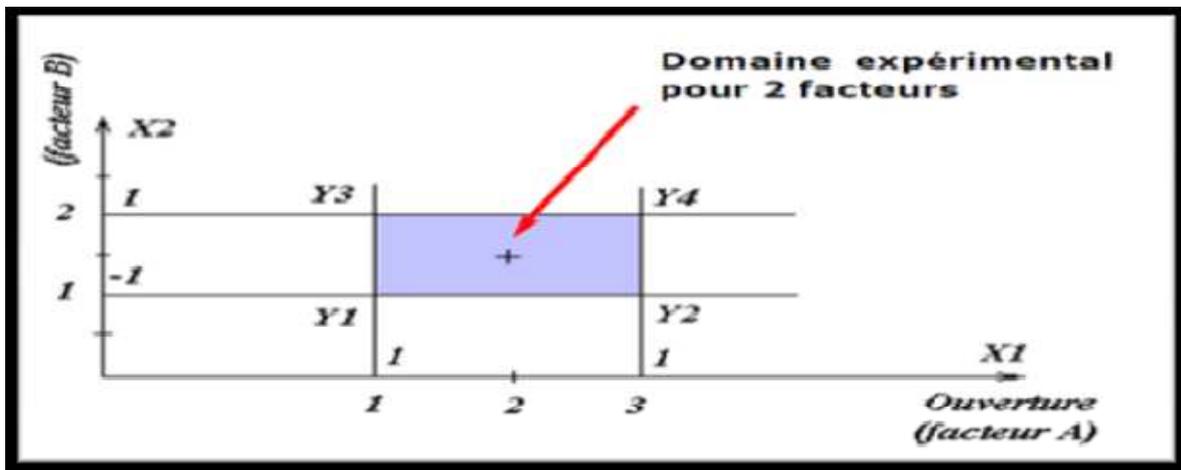


Figure 6: Domaine expérimentale

### **III.6. Objectifs de plan d'expériences**

#### **III.6.1. Criblage des facteurs**

Découvrir les facteurs les plus influents sur une réponse donnée en un minimum d'expériences.

#### **III.6.2. Etudes quantitatives des facteurs**

Quantification des influences principales et les interactions éventuelles.

#### **III.6.3. Etudes quantitatives des réponses**

Modélisation prévisionnelle du phénomène étudié.

#### **III.6.4. Optimisation**

Déterminer un ou plusieurs points de fonctionnement optimaux.

### **III.7. Logiciels de plan d'expériences**

Les logiciels des plans d'expériences possèdent des bibliothèques de plans classiques et ils permettent aussi de construire les plans particuliers. On peut réaliser le calcul des coefficients avec un tableur, mais cela nécessite de la programmation et du temps. Il est donc préférable d'utiliser un logiciel adapté qui effectue non seulement le calcul des coefficients mais aussi les calculs statistiques permettant d'évaluer la qualité du modèle mathématique. Les logiciels des plans d'expériences sont aussi programmés pour calculer des réponses dans tous les domaines d'étude, pour effectuer les analyses de variance, pour tracer des courbes d'isoreponses, pour construire les surfaces de réponses et pour déterminer les zones d'intérêt.

# **Partie expérimentale**

# Chapitre I

*Matières, matériels et méthodes*

## Objectif

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à la synthèse chimique du lactulose qui est un disaccharide utilisé dans l'industrie pharmaceutique comme laxatif (principe actif) et aussi dans le domaine agroalimentaire. Pour ce nous avons appliqué la méthodologie des plans d'expériences qui consiste à organiser la démarche expérimentale et l'analyse décisionnelle en utilisant des logiciels spécifiques, parmi ces nombreux logiciels, nous avons utilisé Modde 6.

L'utilisation et l'intérêt des plans d'expériences conduisent à établir un plan comportant le maximum de précisions dans les résultats avec un minimum d'expériences.

Le lactulose synthétisé chimiquement à partir du lactose monohydrate par isomérisation alcaline :

- ❖ Synthèse chimique en utilisant le NaOH (la plus utilisée mondialement) en faisant varier le taux de catalyseur et la concentration initiale du lactose
- ❖ Synthèse chimique en utilisant le Ca(OH)<sub>2</sub> en faisant varier le taux de catalyseur et la concentration initiale du lactose

### I. Réactifs et matières premières utilisés

Les réactifs et matières premières utilisés sont présentés dans le tableau 2.

**Tableau 2:** Réactifs, produits et matières premières utilisés pour la synthèse chimique et contrôle qualité du lactulose

Réactifs du contrôle qualité	Produits et matières utilisés pour la synthèse
<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Résorcinol 99% PS :               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lot : 0000202067</li> <li>• Fournisseur : PANREAC Sintesis</li> <li>• Provenance : SARL AGD Pharm</li> </ul> </li> <li>❖ L'acide chlorhydrique 37% (HCl)               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fournisseur : FLUKA</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Lactulose FK, cristallisé (utilisé comme étalon de référence) :               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lot : 27S106113</li> <li>• Fournisseur : fresenius KABI AUSTRIA GMBH- Italie</li> <li>• Provenance : EURL TSPPA</li> </ul> </li> <li>❖ Lactose monohydrate (utilisé comme substance d'origine pour la synthèse du lactulose) :               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lot : 12084</li> <li>• Fournisseur : Saidalpharmal</li> <li>• Provenance : EURL TSPPA</li> </ul> </li> <li>❖ L'hydroxyde de sodium (NaOH) : FLUKA</li> <li>❖ L'hydroxyde de calcium (Ca(OH)<sub>2</sub>) : FLUKA</li> </ul>

## II. Matériel

Le matériel utilisé est présenté dans le tableau 3.

**Tableau 3:** Matériels utilisés pour la synthèse chimique et contrôle qualité du lactulose

Matériels du contrôle qualité	Matériels utilisés pour la synthèse
<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Spectrophotomètre UV-Visible ZUZI</li> <li>❖ pH mètre HANNA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Hotte SORBONNE</li> <li>❖ Bain marie MEMMERT</li> <li>❖ pH mètre HANNA</li> <li>❖ Balance analytique</li> <li>❖ Agitateur magnétique</li> </ul>

## I. Méthode

### III.1. Présentation de l'étude

Durant toute l'étude, il est important de recenser les facteurs qui peuvent avoir éventuellement une influence sur le rendement de la synthèse du lactulose. Pour ne pas éliminer certains facteurs, nous avons utilisé une démarche expérimentale qui s'appelle la méthodologie de la recherche expérimentale. Nous avons utilisé le logiciel Modde 6 qui consiste à sélectionner et ordonner les essais afin d'identifier l'influence des interactions entre les facteurs à moindre coût.

La matrice a été reproduite trois fois pour chaque essai afin de vérifier la répétabilité et la reproduction des résultats.

La méthode de synthèse utilisée est basée sur la synthèse chimique alcaline en utilisant deux catalyseurs : NaOH et CaOH<sub>2</sub>.

### III.2. Synthèse du lactulose

#### III.2.1. Synthèse du lactulose à partir de lactose en utilisant le NaOH

Nous avons réalisé plusieurs essais en faisant varier le taux initial du lactose (entre 5g à 30g) et le taux du catalyseur NaOH (entre 0,125g et 1,5g), les essais sont répétés trois fois ( $S_i \times 3$  et  $i$  est le numéro de la solution S).

Au cours de notre étude, nous avons fait varier les facteurs : la quantité du lactose (-1, 0,1) et quantité de NaOH (-1, 0,1) en utilisant le plan factoriel comme l'illustre le tableau 4.

**Tableau 4 :** Niveaux des facteurs pour la synthèse du lactulose par NaOH

Facteurs	Niveaux			Variables réelles			Variables codées		
Quantité du lactose (g)	5	17,5	30	-1	0	+1			
Quantité de NaOH (g)	0,125	0,8125	1,5	-1	0	+1			

Le tableau suivant montre les valeurs réelles et codées du plan d'expérimentation pour le catalyseur NaOH.

**Tableau 5 :** Plan d'expérimentation en valeurs réelles par le catalyseur NaOH

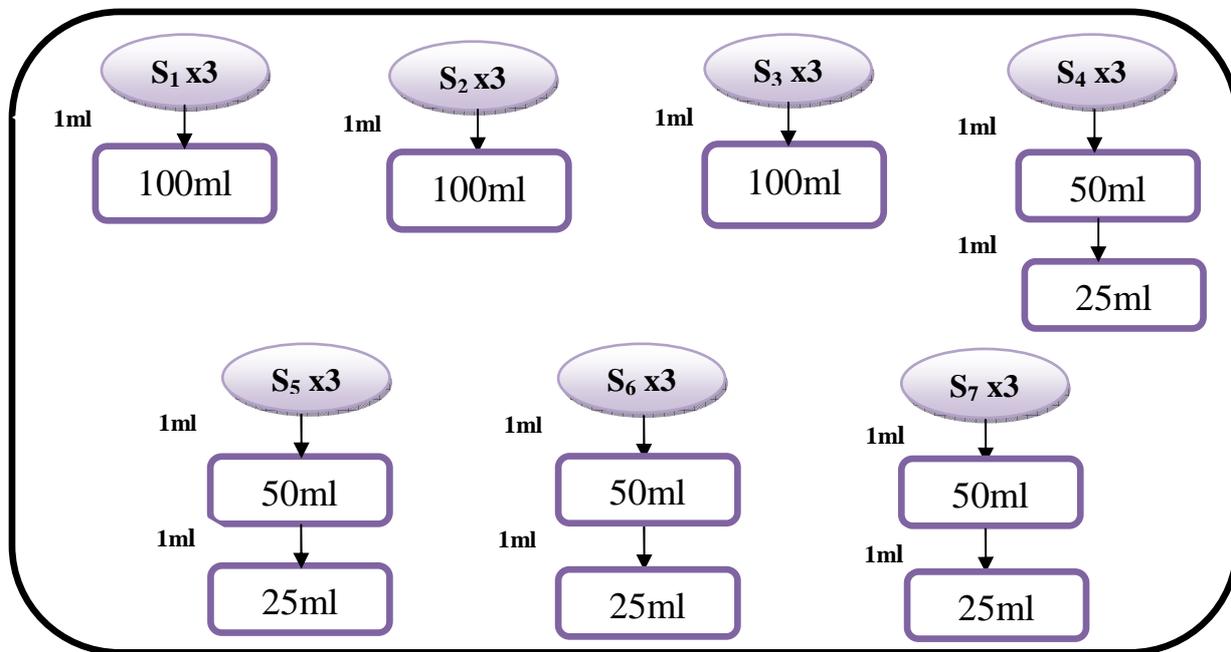
N°d'exp	1(S <sub>1</sub> )	2(S <sub>1</sub> )	3(S <sub>1</sub> )	4(S <sub>2</sub> )	5(S <sub>2</sub> )	6(S <sub>2</sub> )	7(S <sub>3</sub> )
Quantité de lactose (g)	5	5	5	5	5	5	5
Quantité de NaOH (g)	0,125	0,125	0,125	0,8125	0,8125	0,8125	1,5
N°d'exp	8(S <sub>3</sub> )	9(S <sub>3</sub> )	10(S <sub>4</sub> )	11(S <sub>4</sub> )	12(S <sub>4</sub> )	13(S <sub>5</sub> )	14(S <sub>5</sub> )
Quantité de lactose (g)	5	5	17,5	17,5	17,5	30	30
Quantité de NaOH (g)	1,5	1,5	0,8125	0,8125	0,8125	0,125	0,125
N°d'exp	15(S <sub>5</sub> )	16(S <sub>6</sub> )	17(S <sub>6</sub> )	18(S <sub>6</sub> )	19(S <sub>7</sub> )	20(S <sub>7</sub> )	21(S <sub>7</sub> )
Quantité de lactose (g)	30	30	30	30	30	30	30
Quantité de NaOH (g)	0,125	0,8125	0,8125	0,8125	1,5	1,5	1,5

Le protocole de synthèse suivi est donné par une explication du premier exemple avec le NaOH :

- Peser 5g de lactose et 0,125g du NaOH ;
- Verser les masses dans une fiole de 100ml, remplir avec l'eau distillée jusqu'au trait de jauge ;
- Chauffer pendant 20min à 70°C dans le bain marie ;
- Arrêter la réaction en plongeant le produit dans un bain de glace ;
- Neutraliser avec une solution d'acide chlorhydrique ;
- Contrôler le sirop obtenu :
  - test d'identification du lactulose ;
  - Mesure du pH ;
  - Mesure la densité ;

- le dosage par la spectrophotométrie UV/V, les dilutions sont expliquées dans le schéma ci-après.

Les autres essais ont été mené avec le NaOH dans les mêmes conditions de température et du temps, mais en faisant varier le facteur de dilution.



**Figure 7 :** Dilutions pour le dosage des essais de synthèse du lactulose par la méthode d'isomérisation par le NaOH.

### III.2.2. Synthèse du lactulose à partir de lactose en utilisant le Ca(OH)<sub>2</sub>

Pour la méthode de synthèse du lactulose par isomérisation du lactose par Ca(OH)<sub>2</sub>, nous avons opté pour un autre catalyseur un peu plus cher que le NaOH, nous avons réalisé plusieurs essais en faisant varier le taux initial du lactose (entre 10g à 30g) et le taux du catalyseur Ca(OH)<sub>2</sub> (entre 0,06g et 0,7g). Les essais sont répétés trois fois. (S<sub>1</sub> x 3 et i est le numéro de la solution S).

Au cours de notre étude, nous avons fait varier les facteurs comme la quantité du lactose (-1, 0,1) et la quantité de Ca(OH)<sub>2</sub> (-1, 0,1) en utilisant le plan factoriel comme l'illustre le tableau 6.

**Tableau 6 :** Niveaux des facteurs pour la synthèse du lactulose par  $\text{Ca(OH)}_2$ 

Facteurs \ Niveaux	Variables réelles			Variables codées		
	10	20	30	-1	0	+1
Quantité du lactose (g)	10	20	30	-1	0	+1
Quantité de $\text{Ca(OH)}_2$ (g)	0,06	0,38	0,7	-1	0	+1

Le tableau suivant montre les valeurs réelles et codées du plan d'expérimentation pour le catalyseur  $\text{Ca(OH)}_2$ .

**Tableau 7:** Plan d'expérimentation en valeurs réelles par le catalyseur  $\text{Ca(OH)}_2$ 

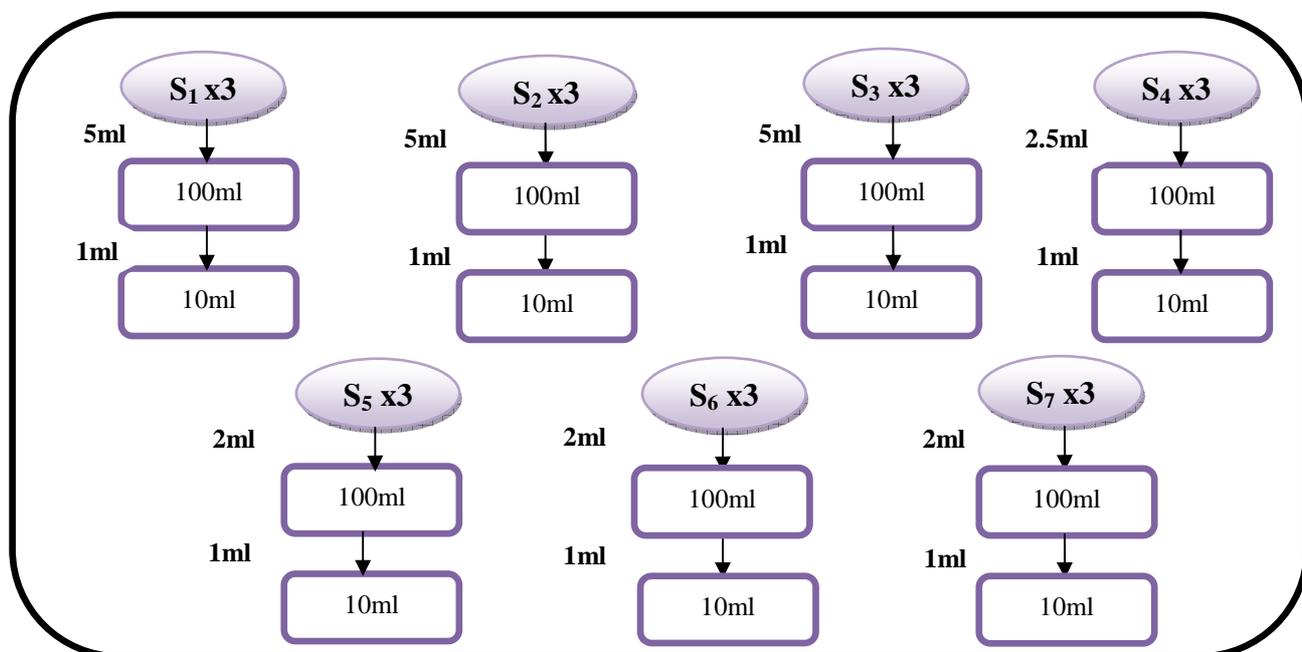
N°d'exp	1(S <sub>1</sub> )	2(S <sub>1</sub> )	3(S <sub>1</sub> )	4(S <sub>2</sub> )	5(S <sub>2</sub> )	6(S <sub>2</sub> )	7(S <sub>3</sub> )
Quantité de lactose (g)	10	10	10	10	10	10	10
Quantité de $\text{Ca(OH)}_2$ (g)	0,06	0,06	0,06	0,38	0,38	0,38	0,7
N°d'exp	8(S <sub>3</sub> )	9(S <sub>3</sub> )	10(S <sub>4</sub> )	11(S <sub>4</sub> )	12(S <sub>4</sub> )	13(S <sub>5</sub> )	14(S <sub>5</sub> )
Quantité de lactose (g)	10	10	20	20	20	30	30
Quantité de $\text{Ca(OH)}_2$ (g)	0,7	0,7	0,38	0,38	0,38	0,06	0,06
N°d'exp	15(S <sub>5</sub> )	16(S <sub>6</sub> )	17(S <sub>6</sub> )	18(S <sub>6</sub> )	19(S <sub>7</sub> )	20(S <sub>7</sub> )	21(S <sub>7</sub> )
Quantité de lactose (g)	30	30	30	30	30	30	30
Quantité de $\text{Ca(OH)}_2$ (g)	0,06	0,38	0,38	0,38	0,7	0,7	0,7

Le protocole de synthèse suivi est donné par une explication du premier exemple avec le  $\text{Ca(OH)}_2$  :

- Peser 10g de lactose et 0,06 g du  $\text{Ca(OH)}_2$  ;
- Verser les masses dans une fiole de 100 ml, remplir avec l'eau distillée jusqu'au trait de jauge ;
- Chauffer pendant 20min à 70°C dans le bain marie ;
- Après isomérisation, refroidir dans un bain de glace ;
- Neutraliser avec la solution saturée d'acide chlorhydrique ;
- Contrôler le sirop obtenu :
  - test d'identification du lactulose par la méthode colorimétrique
  - Mesure du pH
  - Mesure la densité à l'aide d'un pycnomètre

- le dosage par la spectrophotométrie UV/V à une longueur  $\lambda = 480 \text{ nm}$ , les dilutions sont expliquées dans le schéma ci- après.

Faire de même pour les six autres essais, en maintenant les mêmes conditions opératoires (température et pH constant) mais en faisant varier le facteur de dilution.



**Figure 8 :** Dilutions pour le dosage des essais de synthèse du lactulose par la méthode d'isomérisation par le  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ .

### III.3. Tests de caractérisation

Les solutions de lactulose obtenues ont été soumises aux contrôles usuels appliqués sur les formes liquides telles que les sirops. Les protocoles des contrôles effectués sur les sirops de lactulose obtenu sont décrits comme suit:

#### III.3.1. Aspect

Le contrôle de l'aspect se fait par une appréciation visuelle de la couleur et l'absence de particules en suspensions.

#### III.3.2. Densité

Le calcul la densité se fait par la formule suivante :

- Peser un pycnomètre de volume connu  $V_{\text{pic}}$  vide ( $m_1$ ) ;
- Peser le même pycnomètre rempli de la solution étudiée ( $m_2$ ).

$$d = \frac{(m_2 - m_1)}{V_{\text{pic}}}$$

### III.3.3. Mesure du pH

Commencer par l'étalonnage du pH mètre puis plonger l'électrode dans la solution à étudier, une fois refroidi et lire la valeur qui s'affiche.

### III.3.4. Test d'identification du lactulose

Le but du test d'identification est de s'assurer la présence du lactulose dans nos solutions. Le protocole suivis pour l'identification du lactulose est décrit dans la pharmacopée européenne.

Les principales étapes sont :

A 0,25 g de lactulose liquide, ajoutez 5 ml d'eau et 5 ml d'ammoniaque. Chauffez dans un bain-marie à 80 °C pendant 10 min. Il se développe une coloration rouge.

Spécifications selon la pharmacopée: la présence du lactulose est caractérisée par la coloration rouge du mélange après chauffage.

### III.3.5. Dosage du lactulose par spectrophotomètre UV/Visible

La spectrophotométrie d'absorption dans l'UV et le visible est une méthode physique d'analyse non destructive très couramment utilisée dans les laboratoires d'analyses. D'une manière générale, elle apporte peu d'informations structurales mais elle a en revanche beaucoup d'applications dans l'analyse quantitative.

Les étapes du dosage sont comme suit :

- Préparer une gamme étalon et tester la linéarité et spécificité
- préparer la solution témoin (standard) qui servira comme solution de référence
- Procéder à des dilutions des solutions ;
- Prélever 5 ml de chacune des solutions ;
- Ajouter 4ml de résorcinol-HCl ;
- Chauffer à 70°C pendant 18 min ;
- Refroidir à l'aire libre puis dans une eau froide à 20°C ;

Doser par la spectrophotométrie UV/V à une longueur d'onde  $\lambda = 480$  nm

#### III.3.5. 1. Préparation des solutions

##### III.3.5.1.1. Préparation de la solution du résorcinol (0,05%)

- Peser 0,05g du résorcinol ;
- Dissoudre dans 100ml du HCl concentré (37%).

### III.3.5.1.2. Préparation du blanc

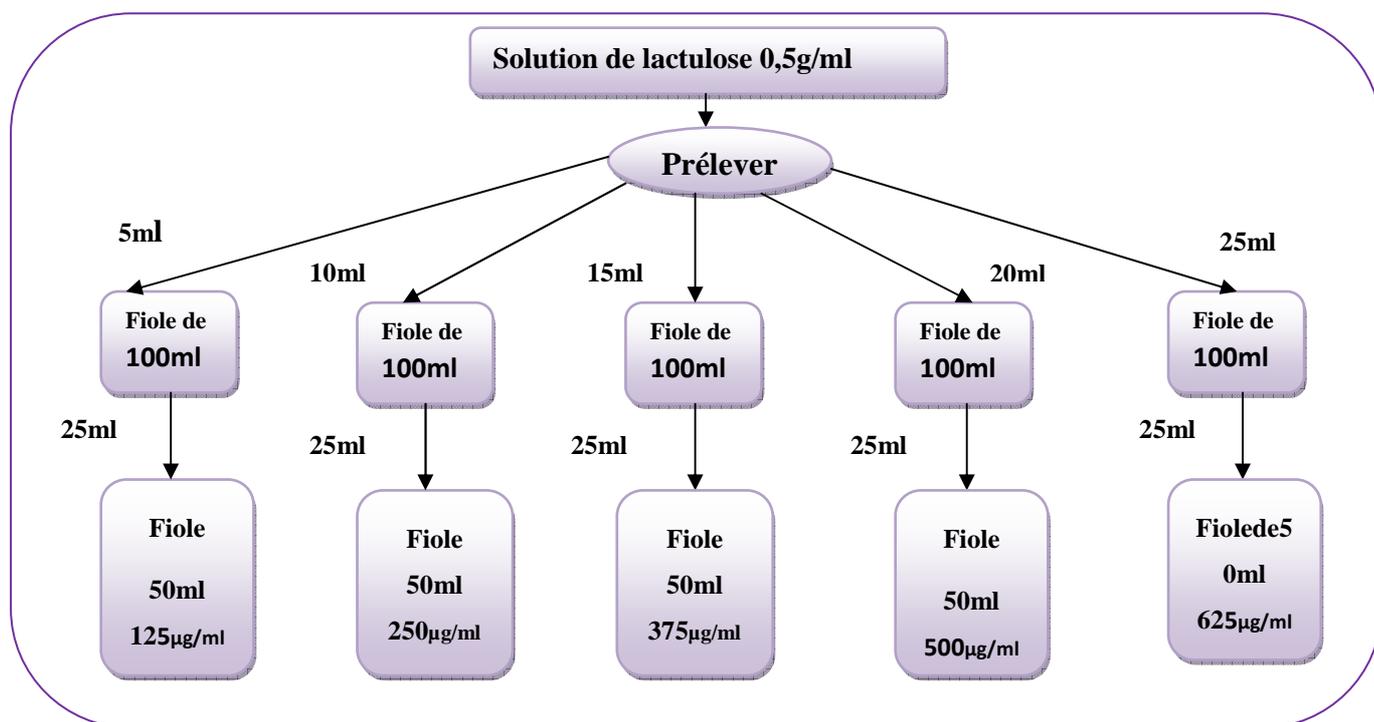
Mélanger 5 ml d'eau distillée avec 4 ml de la solution de résorcinol pour une lecture à 480 nm.

### III.3.5.1.3. Préparation de la solution standard et détermination du domaine de linéarité

#### A. Détermination du domaine de linéarité

- ✓ Dissoudre 0,5 g de lactulose en poudre dans 100 ml d'eau distillée ;
- ✓ Préparer à partir de la solution mère 5 solutions de différentes concentrations : 125, 250, 375, 500 et 625 µg/ml comme décrits dans la figure 1 ;
- ✓ Prélever 5 ml de chacune des cinq solutions ;
- ✓ Ajouter 4ml de résorcinol-HCl (37%) ;
- ✓ Chauffer à 70°C pendant 18 min ;
- ✓ Refroidir à l'air libre puis dans l'eau froide à 20°C ;
- ✓ Doser par la spectroscopie UV/V à une longueur  $\lambda = 480$  nm ;

Les dilutions effectuées pour le dosage sont portées dans la figure 9 suivante:



**Figure 9** : Protocole expérimentale pour le dosage du lactulose standards

Les résultats de la courbe d'étalonnage dans l'intervalle de linéarité (125-625µg/ml) sont présentés dans la partie résultats et discussions.

## B. Préparation de la solution standard

La concentration du standard sélectionnée pour le dosage des solutions est : 375 µg/ml.

### III.4. Calcul des concentrations de lactulose

A partir des DO obtenues (standard et échantillons), nous avons procédé au calcul des concentrations en lactulose pour chaque essai, en utilisant les équations suivantes :

$$C_1 = (DO_{ech}/DO_{et}) \times (PE_{et}/PE_{ech})$$

.....(1) Concentration échantillon en µg/ml

$$C_2 = (C_1 / 10^6) \times 100$$

Concentration échantillon en g/100ml

Concentration initiale en lactose  $C_0$  g/100ml

**DO** : l'absorbance du standard.

**DO<sub>ech</sub>**: l'absorbance de l'échantillon.

**C<sub>0</sub>** : la concentration initiale de l'échantillon (g/100ml).

**C<sub>1</sub>** : la concentration de lactulose avant dilution.

**PE<sub>ech</sub>** : prise d'essai échantillon dont les dilutions effectuées sont en fonction de la méthode.

**PE<sub>et</sub>** : prise essai étalon, dont on a pris la valeur 375 µg/ml pour une DO de 0,632.

### III.5. Calcul du rendement de la synthèse du lactulose

Le rendement est calculé par la formule suivante

$$R \% = (C_2 / C_0) \times 100$$

### III.6. Analyse statistique

Afin d'effectuer des analyses statistiques sur l'ensemble des paramètres étudiés (densité, pH et rendement) et sur les deux modes de synthèses (en présence de NaOH ou Ca(OH)<sub>2</sub>), nous avons adopté deux études :

➤ L'exploitation statistique des réponses par le Modde 6 (exprimée par le paramètre **reproductibilité**) sera détaillées dans la partie résultats et discussions.

➤ Analyse statistique et élémentaire (moyenne, écart type et la variance), réalisée par **EXCEL** version 2007 et les résultats seront portés dans la partie Annexe.

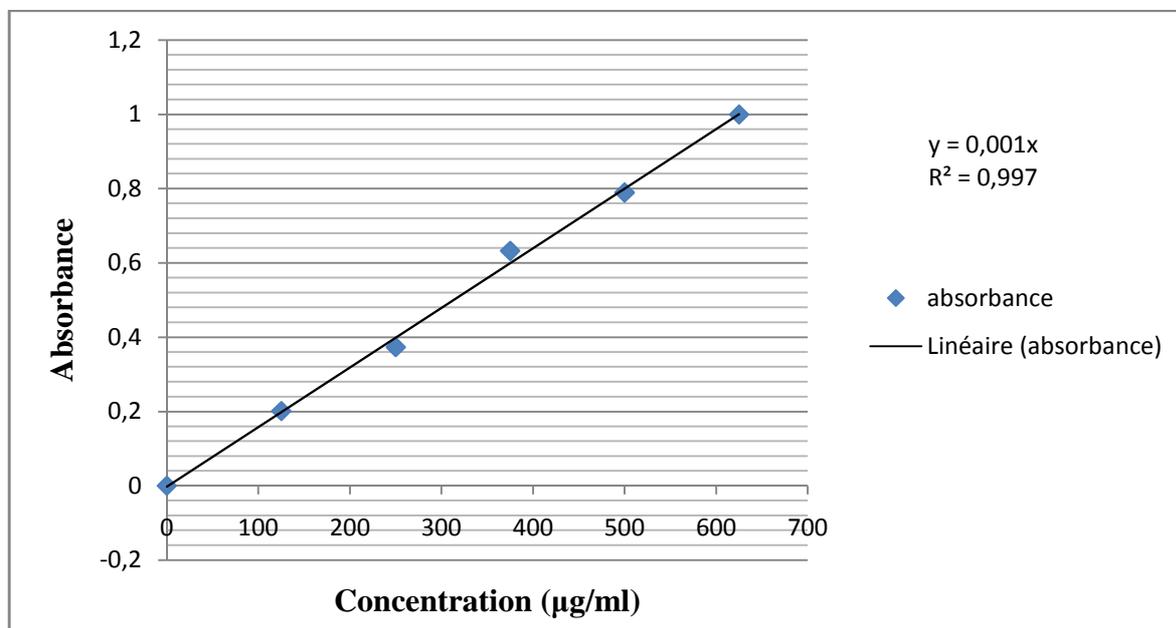
# Chapitre II

*Résultats et discussions*

### I. Vérification de la fiabilité de la méthode du dosage (étalonnage)

#### ❖ Courbe d'étalonnage

Le dosage du lactulose (P.A) par le spectrophotomètre UV/V nous a permis de réaliser une courbe d'étalonnage.



**Figure 10** : Courbe d'étalonnage du standard du lactulose

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

La forme :  $y = a x \dots\dots(1)$  Avec  $a$ : Pente de la droite

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

$$Y=0,001X$$

$\dots\dots(2)$

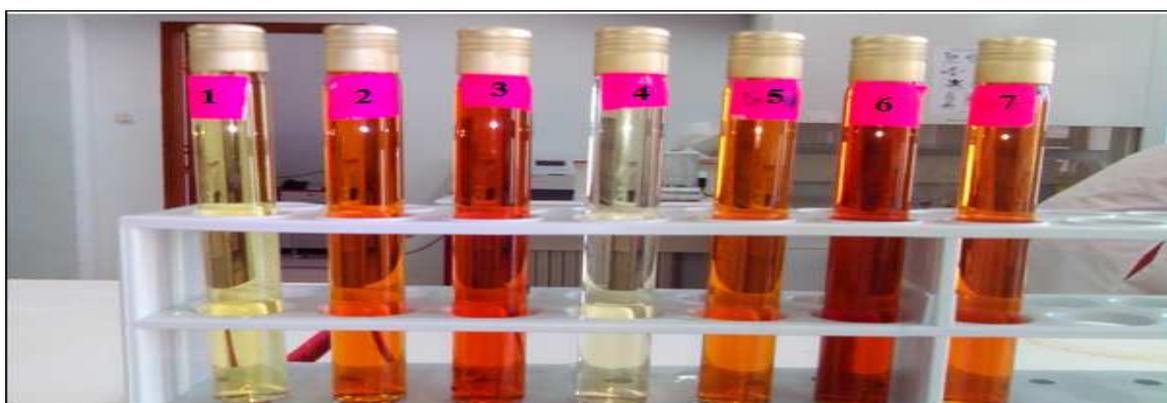
Avec un coefficient de corrélation :  $R^2=0,997$

Nous avons un coefficient de corrélation proche de 1, ce qui nous permet de s'engager dans l'exploitation de la méthode par spectrophotométrie UV/V.

## II. Synthèse du lactulose en utilisant le catalyseur NaOH

### II.1 Aspect des solutions du lactulose

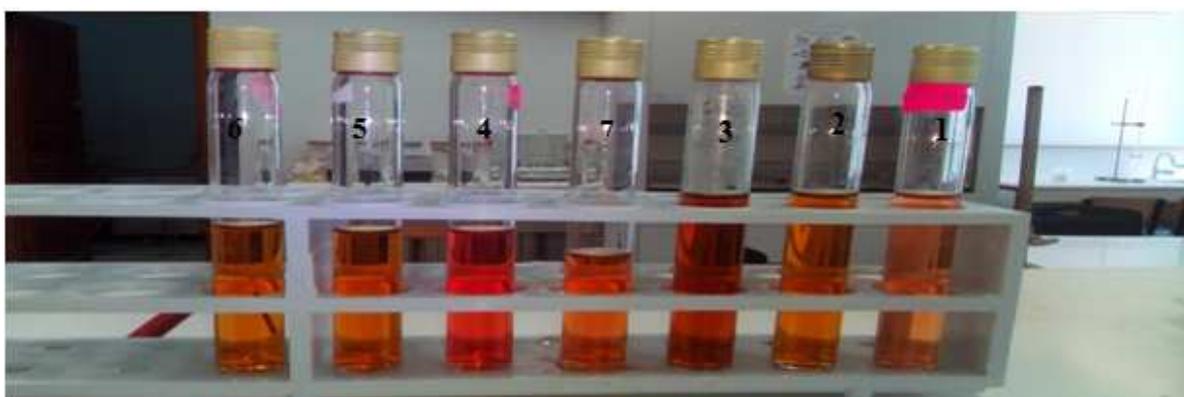
Après isomérisation, nous avons neutralisé les solutions avec l'acide chlorhydrique. La figure 11 présente l'aspect des solutions de synthèse du lactulose par NaOH. Toutes les solutions obtenues sont limpides et colorées. La coloration varie du jaune au rouge brun en fonction de la concentration initiale en lactose. Plus la concentration en lactose augmente, plus le résultat de synthèse donne des solutions avec des couleurs plus foncées.



**Figure 11** : Aspect des solutions de synthèse du lactulose par NaOH

### II.2. Identification des solutions du lactulose

Nous avons effectué le test d'identification sur tous les essais, et nous avons obtenu une coloration rouge comme exigée par la pharmacopée européenne. La coloration rouge résultant du test d'identification est une caractéristique du lactulose et sa qualité diffère selon l'intensité de la couleur. Le résultat du test d'identification est illustré dans la figure 12.



**Figure 12**: Résultats de test d'identification de lactulose synthétisé par NaOH

### II.3. Détermination du pH et de la densité des solutions du lactulose

Les résultats de densité et de pH des solutions qui ont été mesurés après neutralisation avec HCl, sont regroupés dans le tableau suivant :

**Tableau 8 :** Valeurs du pH et de la densité des solutions du lactulose préparées par NaOH

<b>Solution N°</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
<b>pH</b>	<b>7,35</b>	<b>7,24</b>	<b>6,97</b>	<b>7,17</b>	<b>6,93</b>	<b>7,01</b>	<b>6,95</b>
<b>Densité</b>	<b>1,0186</b>	<b>1,0203</b>	<b>1,0209</b>	<b>1,0260</b>	<b>1,0245</b>	<b>1,0259</b>	<b>1,0310</b>
<b>Solution N°</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
<b>pH</b>	<b>6,90</b>	<b>7,04</b>	<b>7,22</b>	<b>6,99</b>	<b>7,31</b>	<b>7,21</b>	<b>7,06</b>
<b>Densité</b>	<b>1,0299</b>	<b>1,0289</b>	<b>1,0667</b>	<b>1,0608</b>	<b>1,0736</b>	<b>1,1164</b>	<b>1,1127</b>
<b>Solution N°</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>21</b>
<b>pH</b>	<b>6,89</b>	<b>7,07</b>	<b>7,08</b>	<b>7,16</b>	<b>7,19</b>	<b>7,02</b>	<b>7,12</b>
<b>Densité</b>	<b>1,1059</b>	<b>1,1131</b>	<b>1,1128</b>	<b>1,1138</b>	<b>1,1187</b>	<b>1,1159</b>	<b>1,1158</b>

- Les valeurs du pH après neutralisation avec HCl sont toutes au voisinage d'un pH neutre, ce qui est recommandé dans la littérature [1].
- La mesure de densité pour les essais réalisés avec le catalyseur NaOH montre une augmentation progressive relative au pourcentage de lactose initial. On conclut que plus la quantité du lactulose augmente, plus la densité augmente.

### II.4. Résultats de dosage des solutions du lactulose

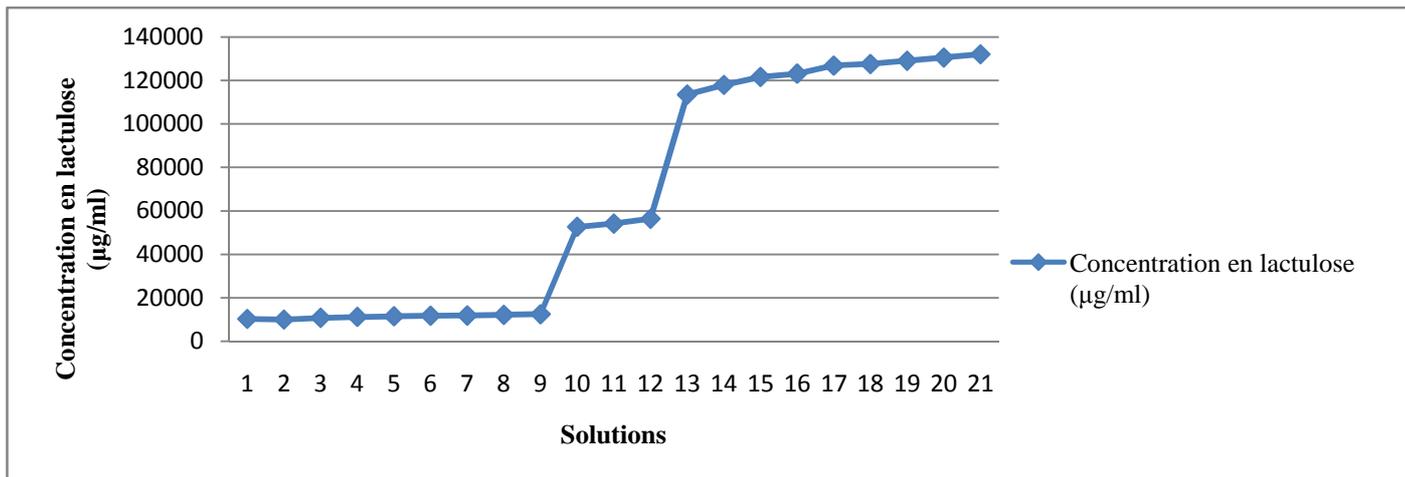
Les résultats du dosage du lactulose par la méthode spectroscopique UV/V sont présentés dans le tableau 9.

A partir de ces valeurs, nous passons ensuite au calcul de la concentration à l'aide de l'équation citée précédemment (1). Les concentrations calculées et les rendements de synthèse en utilisant NaOH sont portés dans le même tableau :

**Tableau 9** : Valeurs des absorbances, concentrations et les rendements des solutions du lactulose préparées par NaOH

N° d'exp	Absorbance	C <sub>0</sub> en lactose (µg/ml)	Concentration en lactulose (µg/ml)	Rendement %
1	0,174	50000	10324,36	20,64
2	0,169	50000	10027,68	20,05
3	0,182	50000	10799,05	21,59
4	0,189	50000	11214,39	22,42
5	0,194	50000	11511,08	23,03
6	0,198	50000	11748,41	23,49
7	0,200	50000	11867,08	23,73
8	0,205	50000	12163,76	24,32
9	0,210	50000	12460,44	24,92
10	0,071	175000	52660,20	30,09
11	0,073	175000	54143,59	30,93
12	0,076	175000	56368,67	32,21
13	0,153	300000	113479,03	37,82
14	0,159	300000	117929,19	39,3
15	0,164	300000	121637,65	40,54
16	0,166	300000	123121,04	41,04
17	0,171	300000	126829,50	42,27
18	0,172	300000	127571,20	42,52
19	0,174	300000	129054,58	43,03
20	0,176	300000	130537,97	43,51
21	0,178	300000	132021,36	44,00

- Les résultats de dosage et de la détermination du rendement de synthèse du lactulose pour les essais réalisés avec le catalyseur NaOH montrent une augmentation progressive relative au pourcentage de lactose initial,
- On conclut que plus la quantité du lactose augmente, plus le rendement de synthèse augmente.
- La représentation graphique de la figure 13, ci-dessous, des résultats illustre bien la relation entre la concentration en lactulose obtenu en fonction de lactose initial.



**Figure 13 :** Concentrations des essais en lactulose (µg/ml) en fonction des concentrations initiales en lactose (µg/ml) obtenues par NaOH

### III. Synthèse du lactulose en utilisant le catalyseur Ca(OH)<sub>2</sub>

#### III.1. Aspect des solutions du lactulose

Les couleurs des solutions varient avec la variation de la concentration en lactose initiale. Nous remarquons que toutes les solutions sont limpides et colorées. L'intensité de la couleur augmente avec l'augmentation de la quantité du lactose initiale, comme nous pouvons le constater dans la figure 14.



**Figure 14 :** Aspect des essais réalisés avec le Ca(OH)<sub>2</sub>

### III.2. Test d'identification des solutions du lactulose

Le test d'identification a été effectué comme décrit précédemment pour les autres essais, la présentation des résultats est illustrée dans la figure 15.



**Figure15 :** Test d'identification du lactulose à partir des solutions préparées par le  $\text{Ca}(\text{OH})_2$

La couleur rouge indique la présence du lactulose dans les essais. L'intensité de la couleur varie selon la concentration en lactulose.

### III.3. Résultats de pH et de densité des solutions du lactulose

Les résultats de densité et de pH des solutions ont été mesurés après neutralisation avec HCl, sont regroupés dans le tableau suivant :

**Tableau 10 :** Valeurs de pH et de densité des solutions du lactulose préparées par  $\text{Ca}(\text{OH})_2$

<b>N°d'exp</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
<b>pH</b>	7,33	7,23	6,91	7,52	7,27	7,41	7,17
<b>Densité</b>	1,0366	1,0365	1,0349	1,0387	1,0374	1,0374	1,0453
<b>N°d'exp</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
<b>pH</b>	7,39	7,26	7,29	6,93	7,09	6,95	6,82
<b>Densité</b>	1,0394	1,0408	1,0689	1,0775	1,0760	1,1068	1,1094
<b>N°d'exp</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>21</b>
<b>pH</b>	7,02	7,04	6,98	6,93	7,32	6,99	7,13
<b>Densité</b>	1,1073	1,1093	1,1074	1,1124	1,1013	1,1014	1,1117

- Le pH des solutions a été mesuré après neutralisation avec HCl est dans les limites de spécifications recommandées, étant donné que ce paramètre est dépendant du manipulateur lors de l'ajustement du pH.

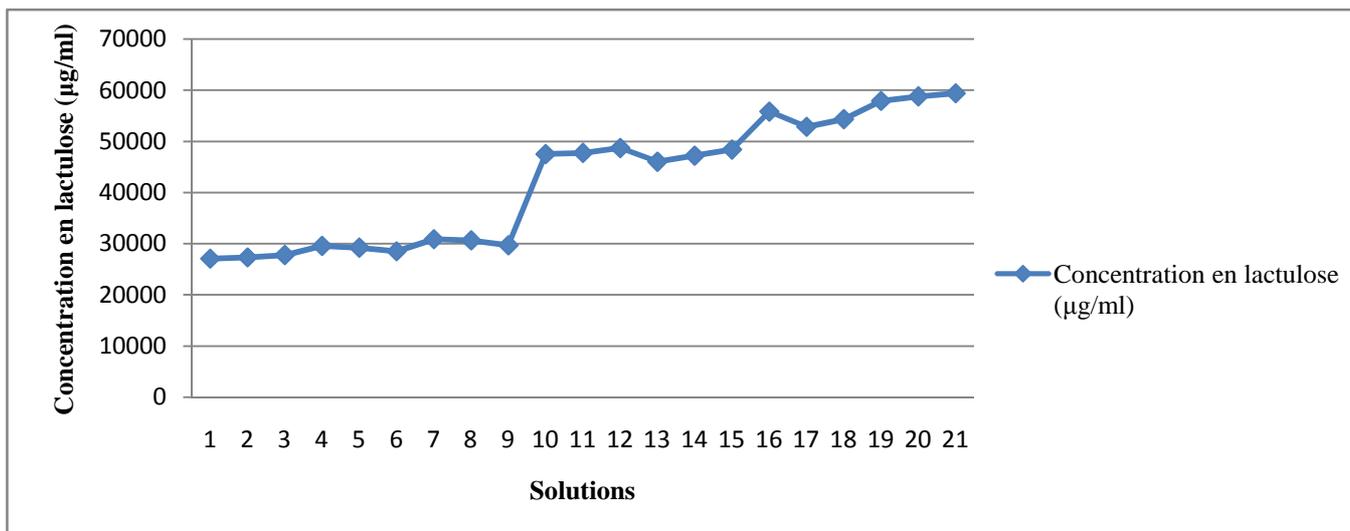
#### III.4. Dosage des solutions du lactulose

Le tableau 11 représente les valeurs des absorbances, les résultats des concentrations et des rendements en lactulose obtenues pour tous les essais par  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ .

**Tableau 11** : Absorbances, concentrations et rendements obtenues pour tous les essais par le  $\text{Ca}(\text{OH})_2$

N° d'exp	Absorbance	C <sub>0</sub> en lactose (µg/ml)	Concentration en lactulose (µg/ml)	Rendement %
1	0,228	100000	27056,96	27,05
2	0,230	100000	27294,30	27,29
3	0,234	100000	27768,98	27,76
4	0,249	100000	29549,05	29,54
5	0,246	100000	29193,03	29,19
6	0,240	100000	28481,01	28,48
7	0,260	100000	30854,43	30,85
8	0,258	100000	30617,08	30,61
9	0,250	100000	29667,72	29,66
10	0,200	200000	47468,35	23,73
11	0,201	200000	47705,69	23,85
12	0,205	200000	48655,06	24,32
13	0,155	300000	45984,96	15,32
14	0,159	300000	47171,67	15,72
15	0,163	300000	48358,38	16,11
16	0,188	300000	55775,31	18,59
17	0,178	300000	52808,54	17,6
18	0,183	300000	54291,93	18,09
19	0,195	300000	57852,05	19,28
20	0,198	300000	58742,08	19,58
21	0,200	300000	59335,44	19,77

La représentation graphique de la figure 16, ci-dessous illustre la relation entre la concentration en lactulose obtenu en fonction de lactose initial.

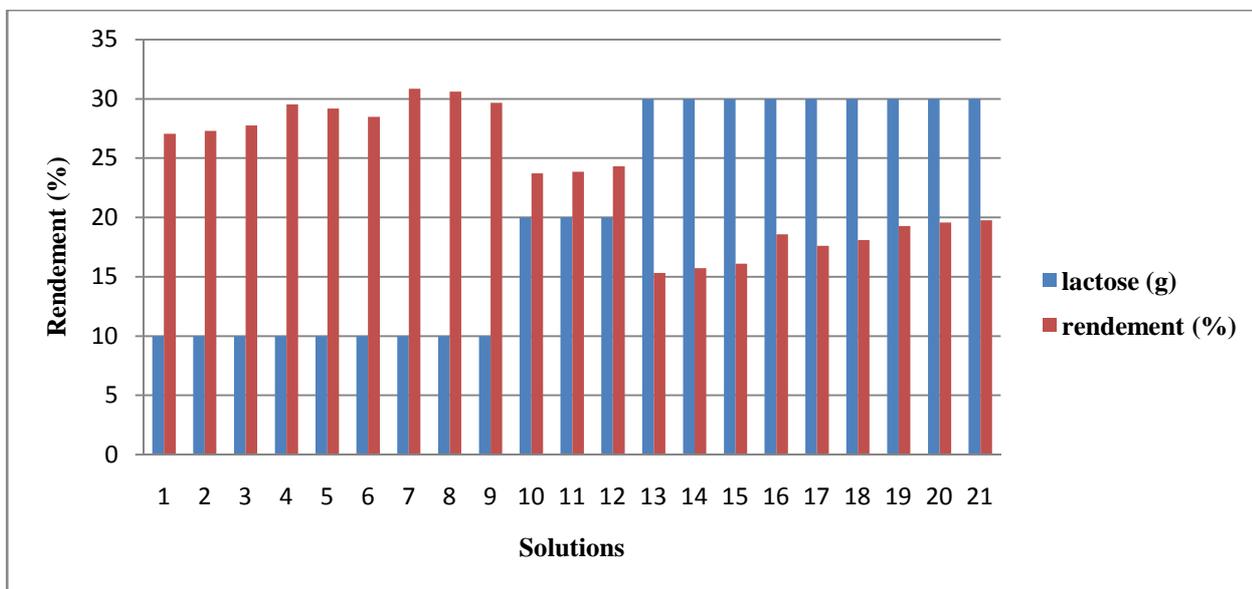


**Figure 16 :** Concentrations des essais en lactulose (µg/ml) en fonction des concentrations initiales en lactose (µg/ml) obtenues par la méthode de Ca(OH)<sub>2</sub>.

Les résultats de dosage du lactulose pour les essais réalisés avec le catalyseur Ca(OH)<sub>2</sub> montrent une augmentation progressive relative au pourcentage de lactose initial.

### III.4.1. Rendement des solutions du lactulose

Les rendements obtenus dans la synthèse du lactulose par Ca(OH)<sub>2</sub> sont représentés sous forme d'un histogramme en fonction de la quantité initiale de lactose.



**Figure 17 :** Rendements en lactulose des solutions obtenues par l'isomérisation de lactose par l'hydroxyde de calcium.

Le rendement en lactulose obtenu par  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  varie entre 15,32 et 30,85%

- Les rendements entre 27,05 et 30,85% correspondent aux essais dont les concentrations initiales en lactose sont 100000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ .
- Les rendements sont faibles pour des concentrations de lactose initial égales à 200000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  et 300000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Le maximum du rendement du lactulose par les deux méthodes est de 44% et 30,85% correspondants respectivement aux essais avec le catalyseur hydroxyde de sodium et hydroxyde de calcium

#### IV. Exploitation statistique des réponses par le Modde 6

Il s'agit d'un outil informatique qui permet de déterminer de manière automatique et rapide, l'optimum d'un certain processus, permettant d'obtenir des produits respectant un certain nombre de critères de qualité. Pour cela nous avons utilisé logiciel Modde 6.

##### IV.1. Évaluation de la qualité du modèle mathématique

Dans la présente étude, l'analyse de régression a été basée sur l'évaluation de deux paramètres :  $R^2$  (coefficient de détermination multiple) et  $Q^2$  (la capacité de modèle de prédire la réponse). La qualité du modèle mathématique obtenu peut être évaluée par des tests statistiques qui sont donnés directement par le programme Modde 6.

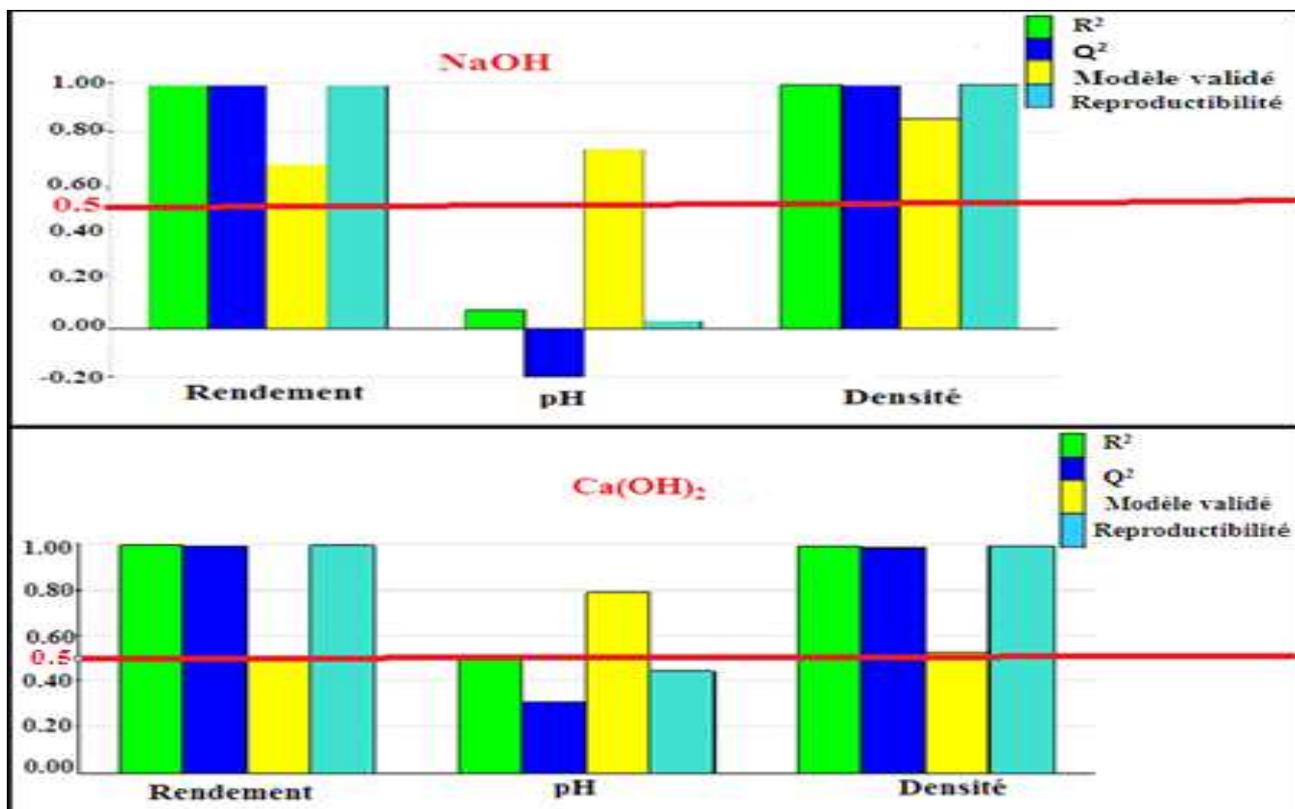


Figure 18 : Représentation des coefficients d'ajustement du modèle pour NaOH et  $\text{Ca}(\text{OH})_2$

D'après les résultats obtenus dans la figure 18, nous concluons ce qui suit:

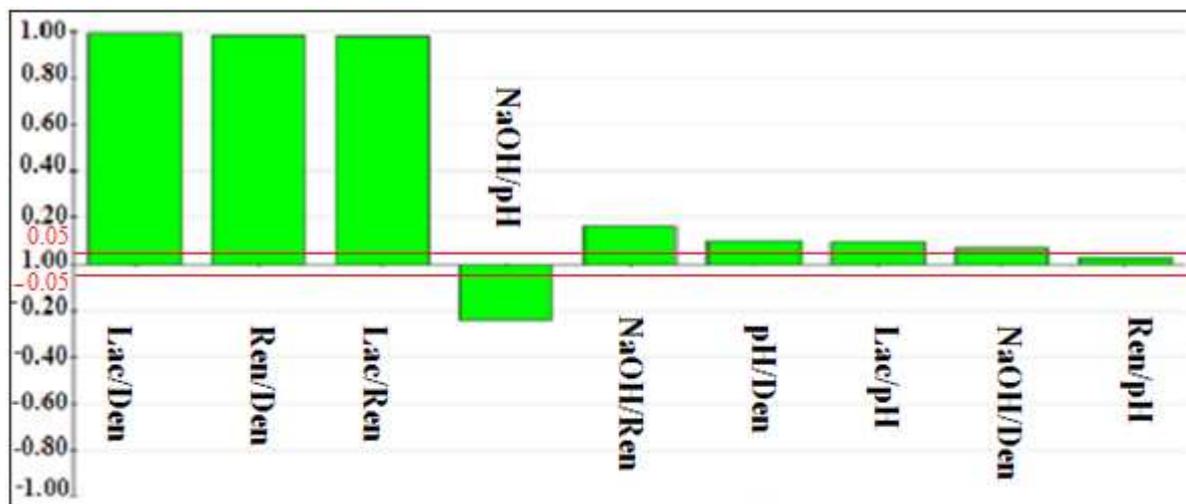
- La reproductibilité (représentée en bleu), qui est un paramètre reflétant la variance (voir détail en annexe) entre les valeurs des essais reproduits. Cette dernière est parfaite pour les réponses de densité et le rendement (valable pour 100% des essais) et mauvaise pour le pH
  - La validité du modèle choisi (représenté en jaune) est acceptable pour l'ensemble des réponses (la densité, le pH et le rendement). Les valeurs trouvées sont supérieures à 0,25. Ce qui signifie que l'erreur du modèle est dans la même gamme que l'erreur pure.
  - Facteur de corrélation «  $R^2$  » (représenté en vert) permet une bonne prédiction des réponses de densité et du rendement pour les 100% des essais, contrairement au pH, dont ce dernier ne peut pas prédire les réponses pour des valeurs des facteurs en dehors du modèle
  - Rapport «  $Q^2$  » (représenté en bleu foncé) : le modèle choisi est très mauvais pour pH mais il est bien ajusté aux données expérimentales pour la densité et le rendement en lactulose. A noter que, la réponse du pH est dépendante du formateur, contrairement aux autres réponses (densité et rendement).
- De ce fait, nous concluons que le modèle mathématique est bien ajusté pour la densité et le rendement du lactulose mais il est mauvais pour le pH. Ceci étant, cette donnée mathématique est corrigée par les données techniques qui justifient que le pH est un paramètre indépendant du modèle mais plutôt dépendant de la formulation. De plus, tous les résultats du pH sont inclus dans l'intervalle de tolérance.

#### IV.2. Étude des interactions facteurs-réponses

Nous avons exploité le logiciel Modde 6 qui nous a présenté toutes les interactions significatives d'ordre statistique. Les figures (19 et 20) ci-dessous, illustrent les coefficients des effets et interactions des facteurs.

#### IV.2.1. Étude des interactions facteurs-réponses obtenues par la synthèse au NaOH

La figure 19 ci-dessous, illustre les coefficients des effets et interaction des facteurs pour le catalyseur NaOH



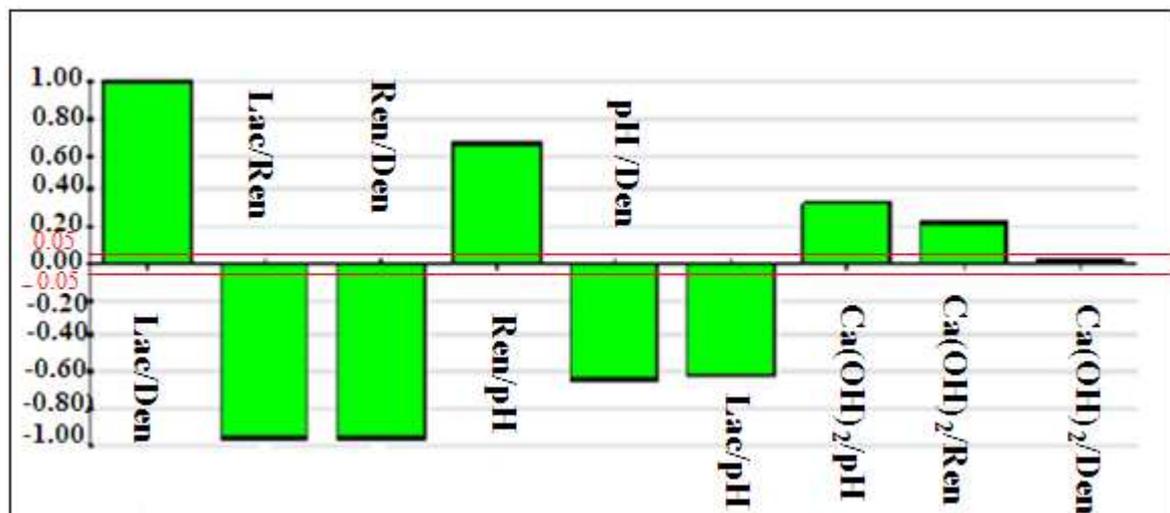
**Figure 19 :** Valeurs des coefficients d'effets et des interactions des facteurs pour le catalyseur NaOH

A partir de la figure 19 relative à l'expression des valeurs des coefficients d'effets et des interactions des facteurs, nous constatons que :

- Les interactions lactose / densité, rendement/densité et lactose/rendement donnent un effet positif qui atteint 100% dans tous les essais. Ce qui nous permet de constater qu'il y a une relation proportionnelle entre les variations de masses de lactose initial et la densité ainsi que le rendement des solutions du lactulose après synthèse avec NaOH.
- Par ailleurs, sur plan technique, les interactions rendement de lactulose/pH, densité/pH et lactose/pH et NaOH/pH sont négligeables car le pH est indépendant de la formulation. pH dépend du manipulateur qui fait l'ajustement du pH à la fin de chaque préparation. De plus, toutes les valeurs du pH sont dans les limites tolérées (6,5 -7,5).
- Cependant, les interactions NaOH/Rendement, NaOH/Densité donnent un effet positif mais très faible, donc insignifiant, c'est-à-dire, la concentration du catalyseur NaOH n'a pas d'impact sur le rendement et densité.

#### IV.2.2. Étude des interactions facteurs-réponses obtenues par la synthèse au $\text{Ca}(\text{OH})_2$

La figure 20 ci-dessous, illustre les coefficients des effets et interactions des facteurs pour le catalyseur  $\text{Ca}(\text{OH})_2$



**Figure 20 :** Valeurs des coefficients d'effets et des interactions des facteurs pour le catalyseur  $\text{Ca(OH)}_2$

Nous constatons que :

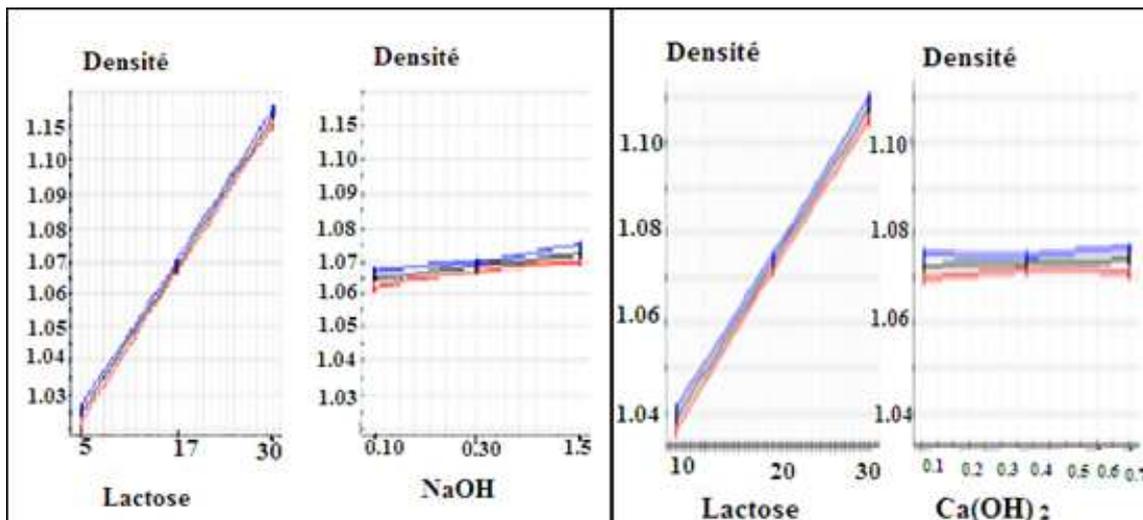
- la quantité de lactose a un effet positif sur la densité. La densité augmente avec l'augmentation de quantité de lactose. Cette interaction est vraie dans 100% des essais.
- Les interactions lactose / rendement et rendement /densité ont un effet négatif pour les 100% des essais. Cela veut dire que, le rendement est inversement proportionnel à la quantité de lactose initial et la densité est inversement proportionnelle au rendement.
- Les interactions rendement de lactulose/pH, densité/pH et Lactose/pH et  $\text{Ca(OH)}_2$ /pH sont à négliger car le pH est une réponse indépendante de la formulation. Elle dépend du manipulateur qui fait l'ajustement du pH à la fin de chaque préparation.
- Enfin l'interaction  $\text{Ca(OH)}_2$ /densité est très faible, donc négligeable

### IV. 3. Prédiction du système

Etant le paramètre pH insignifiant, nous avons analysé les deux autres paramètres restants : densité et dosage sur le lactose et le catalyseur. Les présentations graphiques présentées, ci-dessous (21 et 22), illustrent cet impact.

#### IV.3.1. Prédiction du système sur la densité et le dosage

Les présentations graphiques présentées, ci-dessous 21 pour les catalyseurs NaOH et  $\text{Ca(OH)}_2$ , illustrent l'impact.



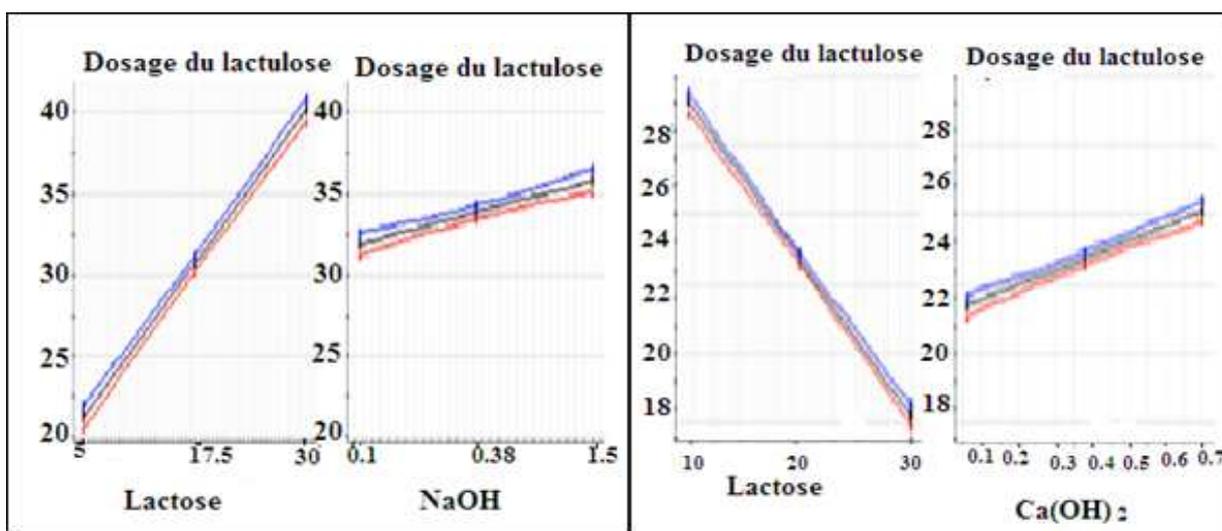
**Figure 21 :** Prédiction du système de densité par les méthodes NaOH et Ca(OH)<sub>2</sub>

A partir des graphes de prédiction, nous constatons que plus la quantité de lactose augmente, plus la densité augmente, la relation étant proportionnelle entre le taux du lactose initial et la densité de la solution du lactulose.

Contrairement à la concentration en catalyseur NaOH et Ca(OH)<sub>2</sub>; la densité reste inchangée, donc la concentration en catalyseur NaOH et Ca(OH)<sub>2</sub> n'a pas d'impact sur la densité.

**IV.3.2. Prédiction du système sur le dosage du lactulose**

Les présentations graphiques de dosage du lactulose présentées, ci-dessous 22 pour les catalyseurs NaOH et Ca(OH)<sub>2</sub>



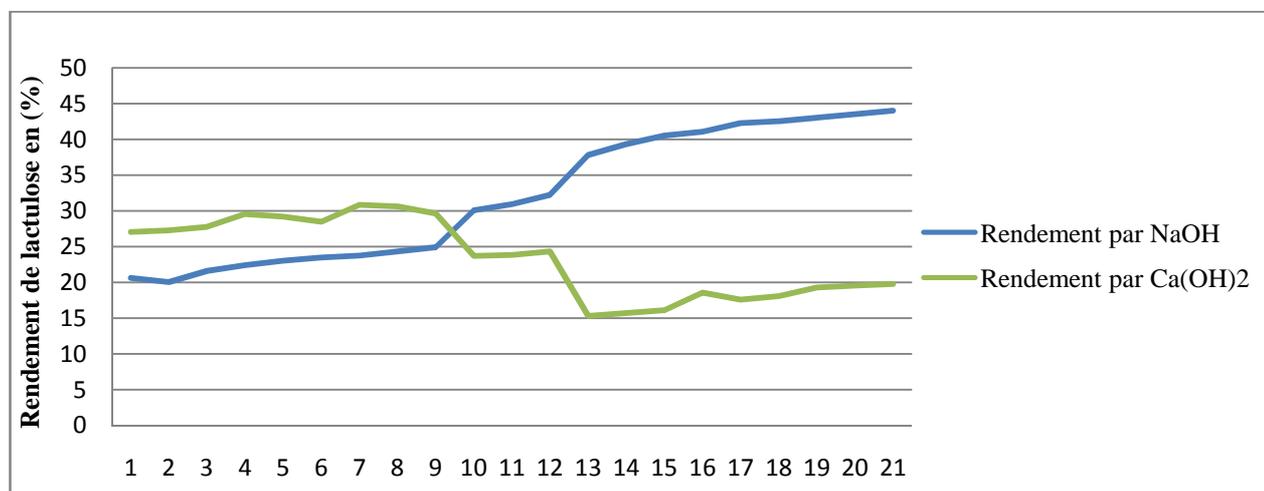
**Figure 22 :** prédiction du système de dosage du lactulose par les méthodes NaOH et Ca(OH)<sub>2</sub>

A partir des graphes de prédiction de synthèse du lactulose par NaOH et  $\text{Ca(OH)}_2$ , nous constatons que :

- Plus le lactose augmente, plus le dosage du lactulose et la concentration en catalyseur (NaOH) augmente,
- Le dosage de lactulose augmente pour les faibles quantités de lactose
- La concentration du catalyseur NaOH ou  $\text{Ca(OH)}_2$  n'ont pas d'impact sur le taux du lactulose obtenu après synthèse.

### V. Choix du meilleur catalyseur pour la synthèse chimique du lactulose liquide

Les résultats de rendement en lactulose obtenu par les deux catalyseurs sont illustrés dans la figure suivant



**Figure 23 :** Rendement de lactulose synthétisé par les deux catalyseurs NaOH et  $\text{Ca(OH)}_2$

Les courbes illustrés nous permettent de montrer que les rendements obtenus en synthèse de lactulose à partir de lactose par le catalyseur NaOH sont meilleurs que ceux obtenus par le catalyseur de  $\text{Ca(OH)}_2$ .

Nous constatons également que le taux du catalyseur NaOH n'a pas d'impact sur le rendement du lactulose obtenu, contrairement au  $\text{Ca(OH)}_2$  qui joue un rôle directe sur le taux en lactulose.

# **Conclusion générale**

L'objectif de notre travail est de synthétiser le lactulose à partir du lactose par une méthode chimique alcaline en utilisant deux catalyseurs à titre de comparaison NaOH et  $\text{Ca(OH)}_2$ .

Le dosage du lactose a été effectué par une méthode spectrophotométrique dans l'UV/V.

Nous avons pour cela utilisé le plan d'expérience dont l'objectif est d'optimiser les niveaux de facteurs étudiés, cette méthodologie nous a permis une meilleure planification et l'obtention d'un maximum d'informations pour un minimum d'expériences. Les essais ont été reproduits trois fois afin d'évaluer le paramètre de reproductibilité des résultats.

La caractérisation de chaque expérience par la mesure de la densité, le pH et l'absorbance, par cette méthodologie ont été effectuées à l'aide du logiciel Modde 6.

Le maximum du rendement du lactulose par les deux méthodes est de 44% et 30,85% correspondants respectivement aux essais avec le catalyseur hydroxyde de sodium et hydroxyde de calcium

Après avoir réalisé plusieurs essais, nous avons choisi l'hydroxyde de sodium, qui a donné un bon rendement plus que celui obtenu à présence d'hydroxyde de calcium

A la lumière des résultats obtenus dans ce projet de master, il est possible de conclure que non seulement ce projet a permis clairement de prouver la faisabilité technique du concept d'isomérisation du lactose en lactulose, mais également nous avons contribué à l'avancement des connaissances dans le domaine de la synthèse des matières premières pharmaceutiques.

Les perspectives du projet étant d'élargir la gamme du lactose initial à plus de 30% (30-100%) pour la synthèse avec le catalyseur NaOH, contrairement au catalyseur  $\text{Ca(OH)}_2$  dont la gamme de travail doit être entre 1 et 10 % au maximum.

# **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques

- [1] Adjioua. R, Ait braham. M. 2016. Synthèse chimique du lactulose par isomérisation du lactose. Faculté des sciences. Université Mouloud Mammeri. Tizi Ouzou.
- [2] Seki. N, Saito. H. 2012. Lactose as a source of lactulose and other functional lactose derivatives, 22, 110-115.
- [3] Kim.Y, Park. C, Oh. D. 2006. Lactulose production from lactose and fructose by a thermostable  $\beta$ -galactosidase from *sulfolobussolfactaris*. 39, 903-908.
- [4] Zokaee. F, Kaghazchi. T, Zare. A, Soleimani. M. 2002. Isomerization of lactose to lactulose-study and comparison of three catalytic systems. *Process Biochemistry*, 37(6), 629-635.
- [5] Liu. H, Zhang. S, Yu. A, Qu. L, Zhao.Y, Huang. H, Li. J. 2004. Studies on Interstitial permeability of cirrhotic patients by analysis lactulose and maniitolurine with HPLC/ RID/ MS. *Bioorganic and Mdicinal Chimestry Letters*, 14, 2339-2344.
- [6] Dendene. K, Guihard. L, Nicolas. S, et Bariou. B. 1994. Kinetics of lactose isomerisation to lactulose in an alkaline medium. *Journal of Chemical Technology et Biotechnology*, 61(1), 37-42.
- [7] Nguyen. T T. 2015. Contribution à l'utilisation du lactulose comme additif fonctionnel dans la fabrication de pain riche en son de blé. Université Laval. Canada.
- [8] Schumann. C. 2002. Medical, nutritional and technological properties of lactulose. An update. *European Journal of Nutrition*, 41, 17-25.
- [9] Parmijt. S, Panesar. S K. 2011. Lactulose : production, purification and potential Applications. *Biotechnologieadvences* , 940-948.
- [10] Schmster-Wolff-Brihing. R. 2010. Production and physiological action of the disaccharide lactulose. *International Dairy Journal*, 731-74.
- [11] Andrexs. GR. 1984. Distinctif pasteurisé, UHF et laits stérilises par leur contenu lactulose. *DairyTechnol*, 37,92-95.
- [12] Aider. M, Halleux. D. 2007. Isomerization of lactose and laculose Production: review. 356-364.
- [13] Vidal. M G. 2013. Isomérisation du lactose en lactulose par électro-activation. Québec.

- [14] Panesar. P S, Panesar. R, Singh. R S, Kennedy. J F, Kumar. H. 2006. Microbial production, immobilization and applications of  $\beta$ -D-galactosidase. *Journal of Chemical Technology et Biotechnology*, 81, 530-543.
- [15] Nabuo. S, HItoshisaito. 2013. Lactose as a source of lactulose and other functional lactosederivative. *International Dairy Journal*, 110-115.
- [16] Zhang. Z, Wang. H, Yang. R, Jiang. X. 2010. A novel spectrophotometric method for quantitative determination of lactulose in food industries. *Int J Food Sci Technol*, 45, 258– 64.
- [17] Cherifi. C, Ould mahamed. A. 2014. Mise au point et validation d'une méthode de dosage du lactulose dans un produit fini sirop par spectrophotométrie UV/Visible. *Faculté des sciences. Université Mouloud Mammeri. Tizi Ouzou.*
- [18] Guedira. F. Um5a\_fsr/ Filière SMC/ S4/ Module 14/ Cours de Spectroscopie/ Chapitre III.
- [19] Zaydoun. S. Um5a\_fsr / Licence Sciences de la Matière Chimie / Cours de Méthodes spectroscopiques d'analyse.
- [20] Idris. I, Madjene. L. 2013. Dosage d'un sucre composé par UV visible comparé à une méthode chromatographique. *Faculté des sciences. Université Mouloud Mammeri. Tizi Ouzou.*
- [21] Pierre. C. 2005. Les plans d'expériences partie 1: Principes généraux, *Revue: Contrôles-Essais- Mesures*, 69-72.
- [22] Pierre. D. 2008. Le plan d'expérience évolue. *Revue Modulad*, N° 38.
- [23] Sin. Y M, Cho. K W, Lee. T H. 1998. *Biotechnol*, 20, 91–94.
- [24] Goupy .J. 2006. Les plans d'expérience. *Revue Modulard*, N°34.
- [25] Driesbeke. J J, Fine. J, Saporta. G. 1997. *Plans d'expériences: applications à l'entreprise.* Editions Technip.

# **Annexes**

## Etude statistique de la variance pour la synthèse de lactulose

Le résultat d'étude statistique des solutions du lactulose par les catalyseur NaOH et Ca(OH)<sub>2</sub> est illustré dans les tableaux 12, 13 et 14.

### ➤ Etude statistique de la variance des absorbances

Le tableau suivant montre l'étude statistique de l'absorbance des solutions pour NaOH et Ca(OH)<sub>2</sub>

**Tableau 12:** Etude statistique de l'absorbance des solutions synthétisé par NaOH et Ca(OH)<sub>2</sub>

Etude statistique de NaOH						Etude statistique de Ca(OH) <sub>2</sub>					
Absorbance			Moyenne	Ecart type	Variance	Absorbance			Moyenne	Ecart type	Variance
1	2	3				1	2	3			
0,174	0,169	0,182	0,175	0,0065574	3,747107728	0,228	0,23	0,234	0,23066667	0,00305505	1,32444384
4	5	6				4	5	6			
0,189	0,194	0,198	0,19366667	0,0045092	2,328356155	0,249	0,246	0,24	0,245	0,00458258	1,87043906
7	8	9				7	8	9			
0,2	0,205	0,21	0,205	0,005	2,43902439	0,26	0,258	0,25	0,256	0,0052915	2,06699321
10	11	12				10	11	12			
0,153	0,159	0,164	0,15866667	0,0055076	3,471157908	0,155	0,159	0,163	0,159	0,004	2,51572327
13	14	15				13	14	15			
0,166	0,171	0,172	0,16966667	0,0032146	1,894626869	0,188	0,178	0,183	0,183	0,005	2,73224044
16	17	18				16	17	18			
0,174	0,176	0,178	0,176	0,002	1,136363636	0,195	0,198	0,2	0,19766667	0,00251661	1,27315926
19	20	21				19	20	21			
0,071	0,073	0,076	0,07333333	0,0025166	3,431742925	0,2	0,201	0,205	0,202	0,00264575	1,30977788

D'après les résultats donnés par de tableaux 12, nous avons remarqué que les données de variances de l'absorbance sont inférieures à 5% donc les résultats sont dites reproductibles ce qui veut dire que les résultats sont indiquent une très bonne qualité descriptive du modèle.

### ➤ Etude statistique de la variance des pH

L'étude statistique du pH des solutions illustre dans le tableau suivant pour les catalyseurs NaOH et Ca(OH)<sub>2</sub>

**Tableau 13:** Etude statistique du pH des solutions pour NaOH et Ca(OH)<sub>2</sub>

Etude statistique de NaOH						Etude statistique de Ca(OH) <sub>2</sub>					
pH			Moyenne	Ecart type	Variance	pH			Moyenne	Ecart type	Variance
1	2	3				1	2	3			
7,35	7,24	6,97	7,1866667	0,1955335	2,720781	7,33	7,23	6,91	7,1566667	0,2193931	3,0655767
4	5	6				4	5	6			
7,17	6,93	7,01	7,0366667	0,122202	1,7366464	7,52	7,27	7,41	7,4	0,1252996	1,6932384
7	8	9				7	8	9			
6,95	6,9	7,04	6,9633333	0,070946	1,018851	7,17	7,39	7,26	7,2733333	0,1106044	1,5206838
10	11	12				10	11	12			
7,21	7,06	6,89	7,0533333	0,1601041	2,2699074	6,95	6,82	7,02	6,93	0,1014889	1,4644865
13	14	15				13	14	15			
7,07	7,08	7,16	7,1033333	0,0493288	0,6944462	7,04	6,98	6,93	6,9833333	0,0550757	0,7886736
16	17	18				16	17	18			
7,19	7,02	7,12	7,11	0,08544	1,2016883	7,32	6,99	7,13	7,1466667	0,1656301	2,3175855
19	20	21				19	20	21			
7,22	6,99	7,31	7,1733333	0,1650253	2,3005379	7,29	6,93	7,09	7,1033333	0,18037	2,5392303

D'après les résultats donnés par les tableaux 13, nous avons remarqué que les données de variances de PH sont inférieures à 5% donc les résultats sont dites reproductibles ce qui veut dire que les résultats sont très bonne qualité descriptive du modèle, ce qui confirme la validité du modèle.

### ➤ Etude statistique de la variance des densités

L'étude statistique des densités des solutions représenté dans le tableau suivant pour les deux catalyseurs NaOH et Ca(OH)<sub>2</sub>

**Tableau 14:** Etude statistique des densités solutions pour NaOH et Ca(OH)<sub>2</sub>

Etude statistique de NaOH						Etude statistique de Ca(OH) <sub>2</sub>					
Densité			Moyenne	Ecart type	Variance	Densité			Moyenne	Ecart type	Variance
1	2	3				1	2	3			
1,0186	1,0203	1,0209	1,0199333	0,001193	0,1169719	1,0366	1,0365	1,0349	1,036	0,0009539	0,0920791
4	5	6				4	5	6			
1,026	1,0245	1,0259	1,0254667	0,0008386	0,0817822	1,0387	1,0374	1,0374	1,0378333	0,0007506	0,0723194
7	8	9				7	8	9			
1,031	1,0299	1,0289	1,0299333	0,0010504	0,1019869	1,0453	1,0394	1,0408	1,0418333	0,0030827	0,2958964
10	11	12				10	11	12			
1,1164	1,1127	1,1059	1,1116667	0,0053257	0,4790756	1,1068	1,1094	1,1073	1,1078333	0,0013796	0,1245326
13	14	15				13	14	15			
1,1131	1,1128	1,1138	1,1132333	0,0005132	0,0460964	1,1093	1,1074	1,1124	1,1097	0,0025239	0,2274386
16	17	18				16	17	18			
1,1187	1,1159	1,1158	1,1168	0,0016462	0,147404	1,1013	1,1014	1,1117	1,1048	0,0059758	0,5408929
19	20	21				19	20	21			
1,0667	1,0608	1,0736	1,0670333	0,0064065	0,6004037	1,0689	1,0775	1,076	1,0741333	0,0045938	0,4276784

D'après les résultats donnés par de tableaux 14, nous avons remarqué que les données de variances de densité sont inférieurs à 5% donc les résultats sont dites reproductibles ce qui veut dire que les résultats sont très bonne qualité descriptive du modèle.