



N° 1821/17

Année : 2015 – 2016

THESE

Présentée en vue de l'obtention du
**DIPLOME D'ETAT DE
DOCTEUR EN PHARMACIE**

Par

ATTE YAVO MAX QUENTIN

**DOSAGE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE
PERFORMANCE DE LA CAFEINE DANS LES BOISSONS
GAZEUSES A BASE DE KOLA.**

Soutenue publiquement le 13 mars 2017

COMPOSITION DU JURY :

Président	: Madame AKE MICHELE,	Professeur Titulaire
Directeur de thèse	: Monsieur GBASSI KOMENAN GILDAS,	Maître de conférences Agrégé
Assesseurs	: Monsieur SISSOUMA DRISSA	Professeur Titulaire
	Madame POLNEAU SANDRINE	Maître de conférences Agrégé

**ADMINISTRATION ET PERSONNEL
ENSEIGNANT DE L'UFR DES SCIENCES
PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES**

I- HONORARIAT

Directeurs/Doyens Honoraires :

Professeur RAMBAUD André
Professeur FOURASTE Isabelle
Professeur BAMBA Moriféré
Professeur YAPO Abbé †
Professeur MALAN Kla Anglade
Professeur KONE Moussa †

II- ADMINISTRATION

Directeur
Sous-Directeur Chargé de la Pédagogie
Sous-Directeur Chargé de la Recherche
Secrétaire Principal
Documentaliste
Lambert
Intendant
Responsable de la Scolarité

Professeur KONE Bamba
Professeur Ag INWOLEY Kokou André
Professeur Ag OGA Agbaya Serge
Madame NADO-AKPRO Marie Josette
Monsieur N'GNIMMIEN Koffi
Monsieur GAHE Alphonse
Madame DJEDJE Yolande

III- PERSONNEL ENSEIGNANT PERMANENT

1- PROFESSEURS TITULAIRES

Mme AKE Michèle	Chimie Analytique, Bromatologie
M ATINDEHOU Eugène	Chimie Analytique, Bromatologie
Mme ATTOUNGBRE HAUHOUOT M.	Biochimie et Biologie Moléculaire
M DANO Djédjé Sébastien	Toxicologie.
Mme KONE BAMBA Diéneba	Pharmacognosie
MM KOUADIO Kouakou Luc	Hydrologie, Santé Publique
M MALAN Kla Anglade	Chimie Analytique, contrôle qualité
M MENAN Eby Ignace	Parasitologie - Mycologie
M MONNET Dagui	Biochimie et Biologie Moléculaire

Mme SAWADOGO Duni

Hématologie

M YOLOU Séri Fernand

Chimie Générale

2- MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

M ABROGOUA Danho Pascal

Pharmacie Clinique

M AHIBOH Hugues

Biochimie et Biologie moléculaire

Mme AKE EDJEME N'guessan Angèle

Biochimie et Biologie moléculaire

M AMARI Antoine Serge G.

Législation

M BONY François Nicaise

Chimie Analytique

M DALLY Laba

Pharmacie Galénique

M DJOHAN Vincent

Parasitologie -Mycologie

M AMIN N'Cho Christophe

Chimie analytique

M DEMBELE Bamory

Immunologie

M GBASSI K. Gildas

Chimie Physique Générale

M INWOLEY Kokou André

Immunologie

M KOFFI Angely Armand

Pharmacie Galénique

Mme KOUAKOU-SIRANSY Gisèle

Pharmacologie

Mme POLNEAU VALLEE Sandrine

Mathématiques-Statistiques

Mme SACKOU KOUAKOU Julie

Santé Publique

Mme SANGARE TIGORI Béatrice

Toxicologie

M KOUASSI Dinard

Hématologie

M LOUKOU Yao Guillaume

Bactériologie-Virologie

M OGA Agbaya Stéphane

Santé publique et Economie de la santé

M OUASSA Timothée

Bactériologie-Virologie

M OUATTARA Mahama

Chimie thérapeutique, Chimie organique

M YAPI Ange Désiré

Chimie Organique, Chimie thérapeutique

M YAVO William

Parasitologie – Mycologie

M ZINZENDORF Nanga Yessé

Bactériologie-Virologie

3- MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE

M DIAFOUKA François

Biochimie et Biologie de la
ReproductionM

4- MAITRES ASSISTANTS

M ADJAMBRI Adia Eusebé

Hématologie

Mmes AFFI-ABOLI Mihessé Roseline

Immunologie

AKA-ANY-GRA Armelle Adjoua S.

Pharmacie Galénique

M ANGORA Kpongbo Etienne

Parasitologie - Mycologie

Mme BARRO KIKI Pulchérie

Parasitologie - Mycologie

M CLAON Jean Stéphane

Santé Publique

Mme DIAKITE Aissata

Toxicologie

Mme FOFIE N'Guessan Bra Yvette

Pharmacognosie

Mme IRIE N'GUESSAN Amenan

Pharmacologie

M KASSI Kondo Fulgence

Parasitologie-Mycologie

Mme KONATE Abibata

Parasitologie-Mycologie

Mme KOUASSI AGBESSI Thérèse

Bactériologie-Virologie

M MANDA Pierre

Toxicologie

Mme SANGARE Mahawa

Biologie Générale

Mme VANGA ABO Henriette

Parasitologie-Mycologie

M YAYO Sagou Eric

Biochimie et Biologie moléculaire

5-ASSISTANTS

M ADIKO Assi Aimé Cézaire

Immunologie

M ADJOUNGOUA Attoli Léopold

Pharmacognosie

M AMICHIA Attoumou Magloire

Pharmacologie

Mmes ALLOUKOU-BOKA Paule-Mireille

Législation

APETE Sandrine

Bactériologie-Virologie

AYE YAYO Mireille	Hématologie
Mme BEDIAKON NEE GOKPEYA Kemontingni Mariette	Santé Publique
M BROU Amani Germain	Chimie Analytique
M BROU N'Guessan Aimé	Pharmacie clinique
M CABLAN Mian N'Dedey Asher	Bactériologie-Virologie
M COULIBALY Songuigama	Chimie Thérapeutique
M DJADJI Ayoman Thierry Lenoir	Pharmacologie
M DJATCHI Richmond Anderson	Bactériologie-Virologie
Mmes DONOU NEE N'DRAMAN Aha Emma	Hématologie
DOTIA Tiepordan Agathe	Bactériologie-Virologie
M EFFO Kouakou Etienne	Pharmacologie
Mme HOUNSA Annita Emeline Epse Alla	Santé Publique
M KABRAN Tano Kouadio Mathieu	Immunologie
M KACOU Alain	Chimie Thérapeutique
M KAMENAN Boua Alexis Thierry	Pharmacologie
M KOFFI Kouamé	Santé publique
M KONAN Konan Jean Louis	Biochimie et Biologie moléculaire
Mme KONE Fatoumata	Biochimie et Biologie moléculaire
M KOUAKOU Sylvain Landry	Pharmacologie
M KOUAME Denis Rodrigue	Immunologie
M KOUAME Jérôme	Economie de la Santé
M KPAIBE Sawa Andre Philippe	Chimie Analytique
Mme KRIZO Gouhonnon Anne-Aymone	Bactériologie-Virologie
M LATHRO Joseph Serge	Bactériologie-Virologie
M N'GBE Jean Verdier	Toxicologie
M N'GUESSAN Alain	Pharmacie Galénique
Mmes N'GUESSAN NEE AMONKOU Anne Cinthia	Législation
N'GUESSAN-BLAO Amino Rebecca J.	Hématologie
M N'GUESSAN Déto Ursul Jean-Paul	Chimie Thérapeutique

Mme N'GUESSAN Kakwokpo Clémence	Pharmacie Galénique
Mmes OUAYOGODE-AKOUBET Aminata	Pharmacognosie
SIBLI-KOFFI Akissi Joëlle	Biochimie et Biologie moléculaire
SICA NEE DIAKITE Amelanh	Chimie Organique/ Thérapeutique
TANOH NEE BEDIA Akoua Valérie	Parasitologie-Mycologie
M TRE Eric Serge	Chimie Analytique
Mme TUO Awa	Pharmacie Galénique
Mme YAO ATTIA Akissi Régine	Santé publique
M YAPO Assi Vincent De Paul	Biologie Générale
Mme YAPO NEE YAO Carine Mireille	Biochimie

6- ATTACHES DE RECHERCHE

Mme ADIKO N'dri Marcelline	Pharmacognosie
M LIA Gnahoré José Arthur	Pharmacie Galénique

7- IN MEMORIUM

Feu KONE Moussa	Professeur Titulaire
Feu YAPO Abbé Etienne	Professeur Titulaire
Feu COMOIE Léopold	Maître de Conférences Agrégé
Feu GUEU Kaman	Maître Assistant
Feu ALLADOUM Nambelbaye	Assistant
Feu COULIBALY Sabali	Assistant
Feu TRAORE Moussa	Assistant
Feu YAPO Achou Pascal	Assistant

III- ENSEIGNANTS VACATAIRES

1- PROFESSEURS

M ASSAMOI Assamoi Paul	Biophysique
M DIAINE Charles	Biophysique

M OYETOLA Samuel

Chimie Minérale

M ZOUZOU Michel

Cryptogamie

2- MAITRES DE CONFERENCES

M KOUAKOU Tanoh Hilaire

Botanique et Cryptogamie

M SAKO Aboubakar

Physique (Mécanique des fluides)

Mme TURQUIN née DIAN Louise

Biologie Végétale

M YAO N'Dri Athanase

Pathologie Médicale

3- MAITRE-ASSISTANT

M KONKON N'Dri Gilles

Botanique, Cryptogamie

4- NON UNIVERSITAIRES

M AHOUSI Daniel Ferdinand

Secourisme

M DEMPANH Anoh Joseph

Zoologie

M GOUEPO Evariste

Techniques officinales

Mme KEI-BOGUINARD Isabelle

Gestion

M KOFFI ALEXIS

Anglais

M KOUA Amian

Hygiène

M KOUASSI Ambroise

Management

M N'GOZAN Marc

Secourisme

M KONAN Kouacou

Diététique

Mme PAYNE Marie

Santé Publique

**COMPOSITION DES LABORATOIRES ET
DEPARTEMENTS DE L'UFR DES
SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET
BIOLOGIQUES**

I- BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE

Professeur	LOUKOU Yao Guillaume	Maître de Conférences Agrégé Chef du département
Professeurs	ZINZENDORF Nanga Yessé OUASSA Timothée	Maître de Conférences Agrégé Maître de Conférences Agrégé
Docteurs	KOUASSI AGBESSI Thérèse CABLAN Mian N'Dédey A. DOTIA Tiepordan Agathe LATHRO Joseph Serge APETE Yah Sandrine KRIZO Gouhonnon A.A DJATCHI Richmond A.	Maître- assistante Assistant Assistante Assistant Assistante Assistante Assistant

II- BIOCHIMIE, BIOLOGIE MOLECULAIRE, BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION ET PATHOLOGIE MEDICALE

Professeur	MONNET Dagui	Professeur Titulaire Chef du Département
Professeurs	HAUHOUOT épouse ATTOUNGBRE M. L. AHIBOH Hugues AKE EDJEME N'Guessan Angèle DIAFOUKA François	Professeur Titulaire Maître de Conférences Agrégé Maître de Conférences Agrégé Maître de Conférences
Docteurs	YAYO Sagou Eric KONAN Konan Jean Louis KONE Fatoumata KOFFI Akissi Joelle épouse SIBLI YAPO NEE YAO Carine Mireille	Maître-assistant Assistant Assistante Assistante Assistante

III- BIOLOGIE GENERALE, HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Professeur	SAWADOGO Duni	Professeur Titulaire Chef du Département
------------	---------------	---

Professeurs	INWOLEY Kokou André	Maître de Conférences Agrégé
	KOUASSI Dinard	Maître de Conférences Agrégé
	DEMBELE Bamory	Maître de Conférences Agrégé
Docteurs	SANGARE Mahawa	Maître-assistante
	AFFI-ABOLI Mihessé Roseline	Maître-Assistante
	ADJAMBRI Adia Eusebé	Assistant
	AYE YAYO Mireille	Assistante
	KABRAN Tano K. Mathieu	Assistant
	KOUAME Denis Rodrigue	Assistant
	N'GUESSAN-BLAO R. S.	Assistante
	YAPO Assi Vincent De Paul	Assistant
	ADIKO Assi Aimé Césaire	Assistant
DONOU NEE N'DRAMAN Aha Emma	Assistante	

IV- CHIMIE ANALYTIQUE, CHIMIE MINERALE ET GENERALE, TECHNOLOGIE ALIMENTAIRE

Professeur	ATINDEHOU Eugène	Professeur Titulaire
		Chef du Département
Professeurs	MALAN Kla Anglade	Professeur Titulaire
	AKE Michèle Dominique	Professeur Titulaire
	YOLOU Séri Fernand	Professeur Titulaire
Professeurs	AMIN N'Cho Christophe	Maître de Conférences Agrégé
	GBASSI Komenan Gildas	Maître de Conférences Agrégé
	BONY Nicaise François	Maître de Conférences Agrégé
Docteurs	BROU Amani Germain	Assistant
	KPAIBE Sawa Andre Philippe	Assistant
	TRE Eric Serge	Assistant

V- CHIMIE ORGANIQUE ET CHIMIE THERAPEUTIQUE

Professeur	YAPI Ange Désiré	Maître de Conférences Agrégé Chef du Département
Professeur	OUATTARA Mahama	Maître de Conférences Agrégé
Docteur	KACOU Alain	Assistant
	N'GUESSAN Déto Ursul Jean-Paul	Assistant
	COULIBALY Songuigama	Assistant
	SICA NEE DIAKITE Amelanh	Assistante

VI- PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE, BIOLOGIE ANIMALE ET ZOOLOGIE

Professeur	MENAN Eby Ignace H.	Professeur Titulaire Chef du Département
Professeurs	YAVO William	Maître de Conférences Agrégé
	DJOHAN Vincent	Maître de Conférences Agrégé
Docteurs	BARRO KIKI Pulchérie	Maître-assistante
	KASSI Kondo Fulgence	Maître-assistant
	VANGA ABO Henriette	Maître-assistante
	ANGORA Kpongbo Etienne	Maître-assistant
	KONATE Abibatou	Maître-assistante
	TANOH NEE BEDIA Akoua Valérie	Assistante

VII- PHARMACIE GALENIQUE, BIOPHARMACIE, COSMETOLOGIE, GESTION ET LEGISLATION PHARMACEUTIQUE

Professeur	KOFFI Armand A.	Maître de Conférences Agrégé Chef du Département
Professeurs	AMARI Antoine Serge G.	Maître de Conférences Agrégé
	DALLY Laba Ismaël	Maître de Conférences Agrégé

Dosage par chromatographie liquide haute performance de la caféine contenue dans les boissons gazeuses à base de kola.

Docteurs	AKA-ANY Grah Armelle A.S.	Maitre-Assistante
	N'GUESSAN Alain	Assistant
	BOKA Paule Mireille épse A.	Assistante
	N'GUESSAN Kakwopko C.	Assistante
	TUO Awa Nakognon	Assistante
	N'GUESSAN NEE AMONKOU Anne C.	Assistante

VIII- PHARMACOGNOSIE, BOTANIQUE, BIOLOGIE VEGETALE, CRYPTOLOGAMIE,

Professeur	KONE BAMBA Diénéba	Professeur Titulaire
		Chef du Département
Docteurs	FOFIE N'Guessan Bra Yvette	Maître-Assistante
	ADJOUNGOUA Attoli Léopold	Assistant
	OUAYOGODE-AKOUBET Aminata	Assistante

**IX- PHARMACOLOGIE, PHARMACIE CLINIQUE ET THERAPEUTIQUE, ET
PHYSIOLOGIE HUMAINE**

Professeurs	KABLAN Brou Jérôme	Maître de Conférences Agrégé Chef du Département
	ABROGOUA Danho Pascal	Maître de Conférences Agrégé
	KOUAKOU SIRANSY N'doua G.	Maître de Conférences Agrégé
	IRIE N'GUESSAN Amenan G.	Maître de Conférences Agrégé
Docteurs	AMICHIA Attoumou M.	Assistant
	DJADJI Ayoman Thierry Lenoir	Assistant
	EFFO Kouakou Etienne	Assistant
	KAMENAN Boua Alexis	Assistant
	KOUAKOU Sylvain Landry	Assistant
	BROU N'GUESSAN Aime	Assistant

**X- PHYSIQUE, BIOPHYSIQUE, MATHEMATIQUES, STATISTIQUES ET
INFORMATIQUE**

Professeur	ATINDEHOU Eugène	Professeur Titulaire Chef de Département
	POLNEAU VALLEE Sandrine	Maître de Conférences Agrégé

XI- SANTE PUBLIQUE, HYDROLOGIE ET TOXICOLOGIE

Professeur	KOUADIO Kouakou Luc	Professeur Titulaire Chef du département
Professeurs	DANO Djédjé Sébastien	Professeur Titulaire
	OGA Agbaya Stéphane	Maître de Conférences Agrégé
	SANGARE Tigori B.	Maître de Conférences Agrégé
	SACKOU KOUAKOU J.	Maître de Conférences Agrégé

Dosage par chromatographie liquide haute performance de la caféine contenue dans les boissons gazeuses à base de kola.

Docteurs	CLAON Jean Stéphane	Maître-assistant
	MANDA Pierre	Maître-assistant
	DIAKITE Aissata	Maître-Assistante
	HOUNSA-ALLA Annita Emeline	Assistante
	YAO ATTIA Akissi Régine	Assistante
	N'GBE Jean Verdier	Assistant
	KOFFI Kouamé	Assistant
	BEDIKON NEE GOKPEYA Kemontingni	Assistante
	KOUAME Jérôme	Assistant

**A NOS MAITRES ET
JUGES**

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENTE DU JURY

Madame le Professeur AKE MICHELE

- *Docteur en pharmacie ;*
- *DESS en Nutrition, Diététique et Contrôle des Aliments Université Paris XI ;*
- *DEA option Sciences des aliments de l'université de Montpellier I, option sciences des aliments ;*
- *Doctorat de l'Université de Montpellier I, option Sciences des Aliments ;*
- *Professeur Titulaire en chimie analytique à l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques d'Abidjan ;*
- *Pharmacien chef de la pharmacie et du laboratoire de nutrition de l'INSP d'Abidjan ;*
- *Membre de la Société Ouest Africaine de Chimie ;*
- *Membre de l'Association of Official Analytical Chemists (AOAC) ;*
 - *Membre de la Société des Experts Chimistes de France.*

Cher Maître,

Vous n'avez pas hésité à accepter de juger cette thèse malgré vos occupations.

Votre simplicité et vos compétences suscitent la grande admiration et le profond respect que vous portent tous ceux qui vous approchent.

Veillez trouver ici l'expression de nos sincères remerciements pour votre contribution à la réussite de ce travail.

A NOTRE MAITRE ET DIRECTEUR DE THESE

Monsieur le Professeur GBASSI KOMENAN GILDAS

- *Professeur agrégé de Chimie Physique Générale à l'UFR des Science Pharmaceutiques et Biologiques de l'université Félix Houphouët-Boigny d'Abidjan ;*
- *Chef du service Contrôle des Aliments, Eaux, et Boissons au Laboratoire National de la Santé Publique (LNSP) ;*
- *Titulaire d'un Doctorat en Chimie de l'Université de Strasbourg (France) ;*
- *Titulaire d'un Master en Science du Médicament de l'Université de Strasbourg (France) ;*
- *Titulaire d'un DEA en Chimie Physique de l'Université Félix Houphouët-Boigny ;*
- *Titulaire d'un DESS en Contrôle de qualité de l'Université Félix Houphouët-Boigny d'Abidjan ;*
- *Titulaire d'un Doctorat en Pharmacie de l'Université Félix Houphouët-Boigny d'Abidjan ;*
- *Membre de la Société Ouest Africaine de Chimie (SOACHIM) ;*
- *Membre de la Société Pharmaceutique de Côte d'Ivoire (SOPHACI) ;*
- *Membre du Réseau des Chercheurs en Génie des Procédés de l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF);*
- *Membre du Groupe de Recherche sur la Bioencapsulation (BRG).*

Cher Maître,

Votre humilité, votre intégrité, votre goût du travail bien fait et votre haute valeur intellectuelle nous ont toujours fascinés, faisant de vous un modèle.

Votre disponibilité et votre sympathie à notre égard nous honorent et nous rendent encore plus fier d'être l'un de vos disciples.

Recevez ici l'expression de notre éternelle reconnaissance et de nos sincères remerciements.

A NOTRE MAITRE ET JUGE

Monsieur le Professeur SISSOUMA DRISSA

- *Professeur titulaire de Chimie organique UFR des sciences des structures de la Matière et Technologie (SSMT) ;*
- *Docteur d'Etat es-Sciences Physiques de l'Université de Cocody-Abidjan : option Chimie organique ;*
- *Doctorat de 3^{ème} cycle es-Sciences de l'Université de Cocody-Abidjan : option chimie organique ;*
- *Ancien Directeur du Laboratoire de Chimie Organique Structurale ;*
- *Membre du conseil scientifique de l'UFR SSMT ;*
- *Membre de la Société Ouest Africaine de Chimie (SOACHIM)*
- *Membre du Réseau des Substances Bioactives Ouest Africain (ReSBOA)*
- *Membre du Réseau de Recherche sur la sécurité alimentaire du CAMES ;*
- *Lauréat du Prix de la Recherche 2000.*

Cher Maître,

Vous représentez pour nous, par vos qualités et vos compétences un Maître admirable et honorable. Vous avez spontanément accepté de juger ce travail, nous vous remercions pour votre disponibilité. Nous vous prions de bien vouloir accepter l'expression de notre profond respect.

A NOTRE MAITRE ET JUGE

Madame le Professeur POLNEAU SANDRINE

- *Docteur d'état en Pharmacie (UFR SPB de L'université FHB)*
- *Maître de conférences Agrégée en Mathématiques Statistiques*
- *Maitrise de sciences biologiques et médicales (option biophysique générale, biophysique des radiations et imagerie, chronobiologie humaine) (Université Claude Bernard Lyon)*
- *DEA en génie biologique et médical (options: biomécanique, biomatériaux, rhéologie) (Université Claude Bernard Lyon)*
- *DU sur les méthodes statistiques de régression (université Victor Segalen, Bordeaux)*
- *Thèse d'université en Statistique et Santé (université René Descartes Paris 5).*
- *Membre de la Société Française de Statistique*
- *Membre de la Société Pharmaceutique de Côte d'Ivoire*

Cher Maître,

Toujours ouverte, disponible, accueillante et bonne conseillère, votre rigueur scientifique, nous impose une grande admiration et un profond respect.

Veillez trouver ici cher Maître, l'expression de notre infinie gratitude et surtout notre profonde admiration

Que Dieu vous bénisse

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
Première partie: GENERALITES	4
CHAPITRE I : LES BOISSONS GAZEUSES	5
I-1- Définitions.....	6
I-2- Différents types de boissons gazeuses	6
I-3- Compositions des boissons gazeuses	7
CHAPITRE II : LA CAFEINE	10
II-1- Origine et sources	11
II-2- Isolement et synthèse	13
II-3- Propriétés physico-chimiques.....	14
II-4- Consommation et doses limites recommandées	17
CHAPITRE III : LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE	20
III-1- Intérêt.....	21
III-2- Notions Fondamentales	22
III-2-1- Notions de phase stationnaire	22
III-2-2- Notion de temps de rétention.	22
III-2-3- Notion de pression	23
III-2-4- Notions de polarité et de polarisabilité	24
III-3- Principe et Appareillage	26
III-3-1- Principe	26
III-3-2- Description des modules de l'appareillage	26
Deuxième partie : ETUDE EXPERIMENTALE.....	30
CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES	31
I-1- Cadre de l'étude	32
I-2- Matériel	32
I-2-1- Echantillonnage	32
I-2-2- Verrerie et accessoires	33
I-2-3-Appareillage.....	33

I-2-4- Réactifs	35
I-3- Méthode.....	35
I-3-1 Mise au point de la méthode	35
I-3-1-1- Préparation des solutions.....	35
I-3-1-2 Extraction de la caféine	36
I-3-1-3- Dosage de la caféine dans l'échantillon	37
I-4- Protocole de Validation.....	38
I-5- Application aux boissons gazeuses à base de kola	40
CHAPITRE II : RESULTATS	41
II-1- Résultats de la validation de la méthode de dosage	42
II-1-1- Linéarité de la méthode	42
II-1-2- Précision de la méthode.....	44
II-1-2-1- Répétabilité de l'analyse chromatographique.....	44
II-1-2-2- Répétabilité de l'ensemble de la procédure	45
II-1-3- Exactitude de la méthode	46
II-1-4- Sensibilité de la méthode.....	47
II-2- Application au dosage de la caféine dans les boissons	48
CHAPITRE III : DISCUSSION.....	49
III-1- Validation de la méthode d'analyse chromatographique	50
III-2- Concentration de la caféine	53
RECOMMANDATIONS	55
CONCLUSION	58
REFERENCES	60
ANNEXES	65

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Teneur en caféine de différents produits végétaux	12
Tableau II : Caractéristiques physicochimiques de la caféine.	16
Tableau III : Limites recommandées de l’apport quotidien maximal en caféine chez la population en bonne santé	19
Tableau IV : Préparation de la gamme étalon.....	36
Tableau V : Etalonnage de la méthode de dosage.	42
Tableau VI : Répétabilité des solutions de référence de la gamme étalon	44
Tableau VII : Répétabilité de l’ensemble de la procédure de dosage de la marque CN1.....	45
Tableau VIII: Exactitude de la méthode	46
Tableau IX: Limite de détection et de quantification de la caféine.	47
Tableau X: Teneur en caféine dans les différentes canettes	48
Tableau XI : Moyenne des résultats des dosages comparés à la concentration limite indiquée par la FDA.....	53
Tableau XII : Teneur en caféine dans les établissements de vente de Coca-cola.	54

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Synthèse de la caféine à partir de l'Uracile	14
Figure 2 : Structure chimique (2D) et (3D) de la caféine	15
Figure 3 : Quantité de caféine absorbée en Kg par an et par habitant selon les données de l'OIC pour l'année 2010.....	17
Figure 4 : Apports en caféine des stimulants, des médicaments et des aliments	18
Figure 5 : Phase stationnaire d'une colonne	22
Figure 6 : Schéma du principe de fonctionnement d'une chromatographie liquide	27
Figure 7 : HPLC de marques Waters e2695.....	33
Figure 8 : Rotavapor HEIDOLPH.....	34
Figure 9 : Droite d'étalonnage de la caféine	43

LISTE DES ABREVIATIONS

AFSSA	: Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
ATC	: Anatomical Therapeutic Chemical
Cp	: Concentration pondérale
Cr	: Concentration réelle
CRIOC	: Centre de Recherche et d'Information des Organisations des Consommateurs
CV	: Coefficient de variation
d	: Densité
EFSA	: European Food Safety Authority
FAO	: Food and Agriculture Organization
FDA	: Food and Drug Administration
FSA	: Food Standards Agency
IUPAC	: International Union of Pure and Applied Chemistry
LD	: Limite de détection
LNSP	: Laboratoire National de la Santé Publique
LQ	: Limite de quantification
M	: Masse Molaire
min	: Minute
ml	: Millilitre
mmHg	: Millimètre de mercure
nm	: Nanomètre
r	: Coefficient de corrélation
r²	: Coefficient de détermination
UE	: Union européenne

INTRODUCTION

De nombreuses boissons mondialement connues ont vu le jour entre les mains de pharmaciens. Il s'agit notamment des boissons à base de kola, toutes inventées en grande partie par des pharmaciens à la fin du XIX^{ème} siècle [1]. Les kolas étaient, à leurs origines, des solutions vendues pour soigner ou soulager divers maux. Ils étaient considérés comme des « spécialités pharmaceutiques » [2].

Ces boissons gazeuses à base de kola ont gardé, même au XXI^{ème} siècle, des applications thérapeutiques.

L'un des composants essentiels de ces boissons fait l'objet d'une attention particulière, il s'agit de la caféine. La caféine à l'état naturel ou sous forme d'additif est présente dans un nombre croissant de produits dont le thé, le café, le chocolat, les médicaments et les boissons gazeuses à base de kola [3].

Alcaloïde de la famille des méthylxanthines, la caféine est connue comme un stimulant du système nerveux central, par son action antagoniste de l'adénosine [3]. Elle est naturellement présente dans les feuilles, les graines et/ou les fruits d'au moins 63 espèces de plantes du monde entier dont le café, le kola et le cacao [3]. Toutefois, la caféine n'a pas toujours été bien acceptée dans les sociétés. Elle a été ainsi interdite par les musulmans de stricte observance puis par le Pape Clément VIII [4].

En 1911, la caféine a été l'objet d'une des premières menaces de santé publique documentée. En effet, le 13 mars 1911, le gouvernement américain intenta un procès à Coca-Cola afin d'obliger la compagnie à retirer la caféine de ses formules, usant d'arguments tels que l'excès de Coca-Cola dans une école de jeunes filles avait entraîné des « caprices nocturnes ». Bien que le juge rendit un verdict en faveur de Coca-Cola, deux lois furent introduites à la chambre des représentants en 1912 pour amender le "Pure Food and Drug Act", en ajoutant la

caféine à la liste des substances nuisibles créant une dépendance. Cette information liée à la dépendance devait être mentionnée sur l'étiquette de tout produit contenant de la caféine [5].

La présence remarquée de la caféine dans nos vies et la croissance des marques de produits dans nos rayons, soulèvent la question de la quantité de caféine jugée excessive pour le consommateur. En 2003, à la suite d'une étude, "Santé Canada" recommandait aux adultes en bonne santé de ne pas prendre plus de 400 mg de caféine par jour [3].

L'objectif général de notre travail est de vérifier la conformité des boissons gazeuses à base de kola du point de vue des doses de caféine recommandées par canette.

Pour atteindre cet objectif général, il a fallu :

- Valider un protocole de dosage de la caféine dans des échantillons par chromatographie liquide.
- Déterminer la quantité de caféine contenue dans les boissons gazeuses à base de kola.
- Comparer les quantités obtenues avec les normes recommandées par la FDA.

La première partie bibliographique de notre travail, est consacrée aux généralités sur les boissons gazeuses, la caféine et la chromatographie liquide.

La deuxième partie, expérimentale, aborde la méthodologie de dosage de la caféine, présente les résultats et la discussion qui en résulte, et se termine par une conclusion précédée des recommandations.

Première partie: GENERALITES

CHAPITRE I : LES BOISSONS GAZEUSES

I-1- Définitions

La dénomination boisson gazeuse englobe tout produit obtenu par mélange, avant conditionnement, de sirop et d'eau potable, laquelle est généralement une eau potable gazéifiée. Ces boissons sont colorées ou non, sucrées, limpides, aromatisées et éventuellement acidulées [6].

Une autre définition fut donnée par Jacobs [7] comme étant des boissons généralement sucrées, parfumées, acidulées, quelques fois artificiellement chargées avec du CO₂ et ne contenant pas d'alcool.

I-2- Différents types de boissons gazeuses [7]

La décision interministérielle Française N° 50301 du 22/10/1986 définit les différents types de boissons gazeuses comme suit:

- Le soda est une boisson gazéifiée, sucrée, additionnée d'arômes de fruit, d'aromates de végétaux ou de jus de fruits et éventuellement acidulée au moyen d'acide citrique, malique, lactique ou de citrate de sodium.
- La limonade est une boisson gazéifiée, sucrée, limpide et incolore additionnée de matières aromatiques ou sapides provenant du citron et éventuellement d'autres hespéridés, acidulées dans les mêmes conditions que précédemment.
- Le kola est une boisson qui se différencie des sodas par l'addition de kola, de caramel, de caféine et d'acide phosphorique.
- Le bitter est une variété de soda dont l'amertume est due à l'addition d'extrait d'agrume.
- Le tonic est une variété de soda pouvant être trouble ou limpide et dont l'amertume est due à des extraits amers.

I-3- Compositions des boissons gazeuses

➤ L'eau [8]

L'eau est l'ingrédient principal des boissons gazeuses. L'eau utilisée peut être de l'eau minérale naturelle, de l'eau de source ou encore de l'eau potable du réseau de distribution. Les boissons gazeuses contiennent au minimum 85 % d'eau, et plus de 99 % dans le cas des boissons sans sucres.

➤ Les sucres [8]

Les boissons gazeuses peuvent contenir des sucres, naturellement présents via les jus de fruits, ou ajoutés. Les sucres sont utilisés pour leur rôle édulcorant, mais ont également des fonctions technologiques dans les boissons en agissant comme stabilisant par exemple. Sur le plan quantitatif, les boissons gazeuses sucrées doivent contenir en moyenne 10 g de sucres pour 100 ml, ce qui est équivalent à la teneur en sucres des jus de fruits. Cette teneur peut varier légèrement selon le type de boisson gazeuse.

Les sucres étant quasiment la source unique d'énergie dans les boissons gazeuses, ces boissons contiennent en moyenne 40 kcal pour 100 ml.

➤ Les édulcorants intenses [9]

Les édulcorants intenses sont des additifs au fort pouvoir sucrant en comparaison à celui du saccharose. Ils peuvent alors être utilisés en remplacement des sucres dans les boissons gazeuses, afin de diminuer leur valeur calorique. Dans les boissons gazeuses, la totalité des sucres peut être remplacée par des édulcorants intenses, ce qui n'est pas toujours faisable dans les autres catégories de produits, pour des raisons technologiques notamment.

Ainsi, il est possible de proposer des boissons gazeuses dont la teneur en sucres est diminuée de 100 %, donc qui sont sans sucres et sans calorie.

Il existe une liste positive, fixée réglementairement au niveau européen, des édulcorants intenses qui peuvent être utilisés dans les boissons rafraîchissantes sans alcool [9]. Leur composition et leurs propriétés technologiques sont très variables mais ils ont tous en commun de posséder un pouvoir sucrant supérieur à celui du saccharose. Les édulcorants intenses sont souvent utilisés en combinaison dans les boissons, afin de bénéficier de leur effets synergiques, en termes de pouvoir sucrant, de goût, ou encore de stabilité.

➤ **L'acide phosphorique [10]**

L'acide phosphorique (E338) est un additif acidifiant autorisé dans de nombreux produits, associé à une quantité maximale. Il a été évalué à un niveau international, avec fixation d'une dose journalière admissible de 70 mg/kg de poids corporel.

Suite à certaines polémiques, l'AFSA a réexaminé l'apport maximal tolérable de phosphore et a conclu qu'il n'y avait pas de corrélation significative entre la consommation de phosphore (dont l'acide phosphorique) et les effets indésirables dont cet additif pouvait être accusé (notamment perturbation dans l'équilibre du calcium dans l'organisme ou risque d'atteinte rénale).

➤ **Les arômes [11]**

Les arômes sont des ingrédients alimentaires non consommés en l'état, ajoutés en faibles quantités aux boissons dans le but de leur conférer un goût et/ou une odeur spécifique.

La réglementation [12] distingue deux types d'arômes :

- les arômes naturels, issus de la nature, et obtenus à partir de matières d'origine végétale, animale ou microbiologique, prises en l'état ou après leur transformation par un procédé traditionnel, ou par des procédés physiques, enzymatiques ou microbiologiques appropriés ;
- les autres arômes non naturels.

CHAPITRE II : LA CAFEINE

II-1- Origine et sources

Le café fait son apparition en 1880 en Côte d'Ivoire en même temps que le cacao. Introduit à Elima, sur les bords de la lagune Aby, par un négociant de la Rochelle du nom de Verdier, sa production annuelle ne prend son essor véritable qu'à partir de 1930 pour atteindre les 18.000 tonnes [13].

Cependant, la première référence au café dans la littérature apparaît dans les écrits du médecin Perse Al-Razi, datés du IXe siècle. A cette époque, les grains de café n'étaient disponibles que dans leur région d'origine, l'Ethiopie. Une légende populaire attribue sa découverte à un gardien de chèvre nommé Kaldi, qui observa que ses chèvres devenaient euphoriques et restaient éveillées la nuit après avoir brouté des caféiers.

Vers la fin du XVIe siècle, l'utilisation du café était rapportée par un européen habitant l'Egypte et c'est à cette époque que son usage se généralisa au Moyen-Orient. L'apparition du café comme boisson en Europe, où il fut d'abord connu en tant que « vin arabe » date du XVIIe siècle. Durant cette période, des maisons de cafés ont été créés, les premières maisons de café ont ouvert à Londres en 1652, sur la rue St Michael's Alley.

En France, la première « maison de café » a ouvert en 1671 à Marseille, ville portuaire dotée de liaisons régulières avec l'Orient, puis le phénomène s'étend rapidement à Paris où on compte en 1723, selon le « Dictionnaire du commerce », 380 maisons de cafés ouvertes à la causerie. Les maisons de cafés sont rapidement devenues populaires dans l'ensemble de l'Europe de l'Ouest et jouèrent un rôle important dans les relations sociales [14].

La caféine contenue dans le café est un alcaloïde naturellement présent dans les feuilles, les graines et/ou les fruits d’au moins 63 espèces de plantes du monde entier. Les sources les plus connues de caféine sont les graines de café, les fèves de cacao, la noix de kola et les feuilles de thé. Le maté et le guarana sont d’autres sources de caféine, moins couramment utilisées, employées parfois dans les préparations à base de thé.

Deux des synonymes de la caféine à savoir la matéine et la guaranine sont d’ailleurs dérivés du nom de ces plantes [15].

Tableau I: Teneur en caféine de différents produits végétaux [15]

Produit végétal	% de caféine en poids sec
Fève de cacao <i>Theobroma cacao</i>	0,1 à 0,4
Feuille de maté <i>Ilex paraguariensis</i>	0,3 à 1,7
Graine d’arabica <i>Coffea arabica</i>	1,1
Noix de kola <i>Cola acuminata</i>	1 à 3,5
Graine de robusta <i>Coffea arabica</i>	2,2
Graine de guarana <i>Paullinia cupana</i>	2 à 4,5
Feuille de thé <i>Camellia sinensis</i>	2,5 à 5

II-2- Isolement et synthèse

En 1819, le chimiste allemand Friedrich Ferdinand Runge a isolé pour la première fois de la caféine relativement pure. Il la nomma « kaffein » en tant que composant chimique du café, qui en français devint caféine [16].

La caféine est décrite en 1821 par Pierre Joseph Pelletier et Pierre Jean Robiquet. En 1827, Oudry a isolé la théine du thé dont Gerardus Mulder et Jobat ont montré, en 1838, qu'il s'agissait de la même substance que la caféine [16].

La structure de la caféine a été élucidée vers la fin du XIXe siècle par Hermann Emil Fischer qui a été également le premier à en réussir la synthèse totale [17].

Fischer sera d'ailleurs récompensé par le Prix Nobel de chimie en 1902 en partie pour ce travail. Le caractère aromatique de la caféine est dû au fait que les atomes d'azote y sont essentiellement plans (Hybridation sp^2 et sp^3). La caféine n'est généralement pas synthétisée car elle est déjà disponible en grande quantité en tant que sous-produit de la décaféination [17].

On peut cependant la synthétiser à partir de l'uracile en plusieurs étapes [18] :

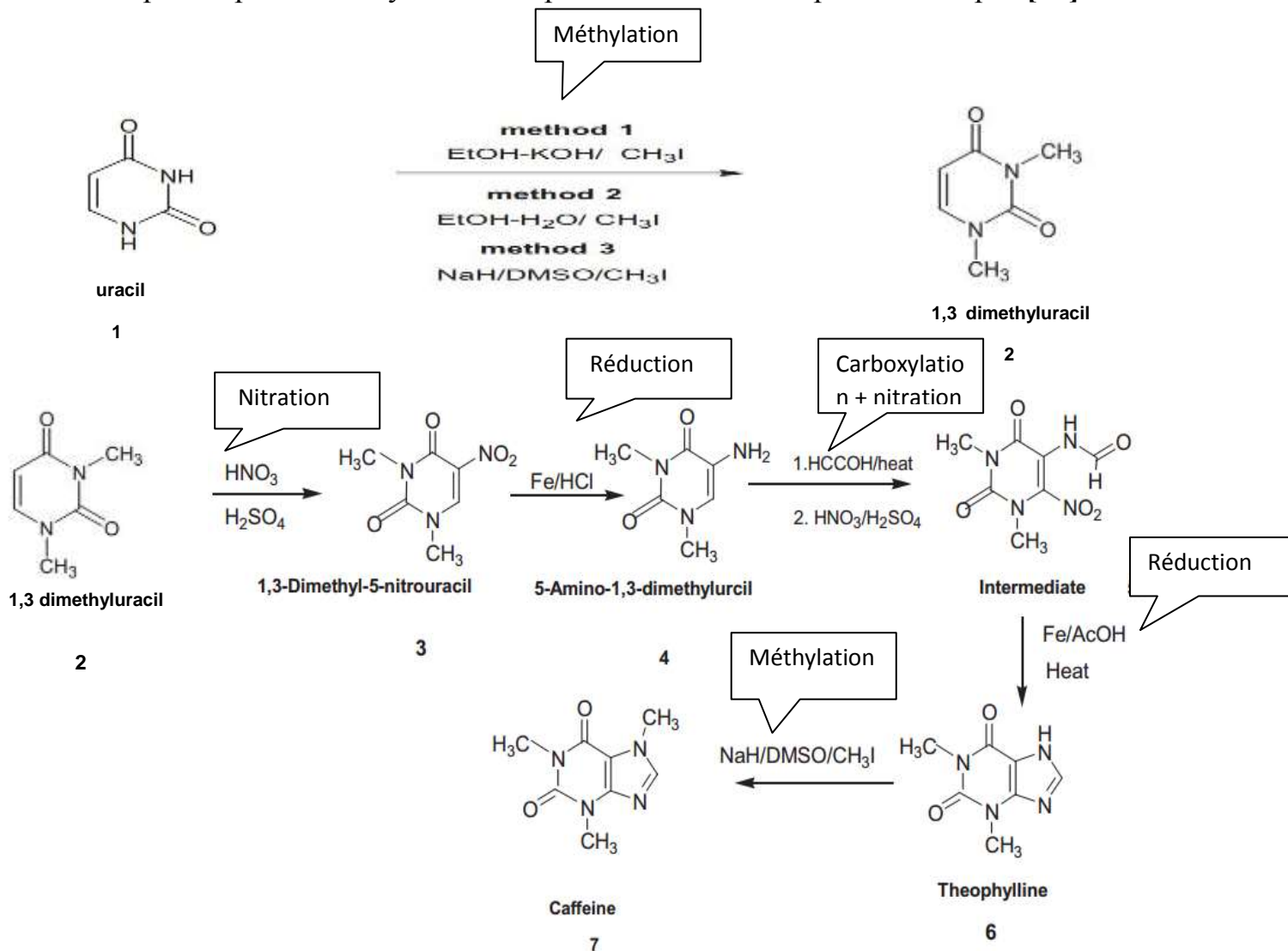


Figure 1 : Synthèse de la caféine à partir de l'Uracile

II- 3- Propriétés physico-chimiques

La caféine (C₈H₁₀N₄O₂, ou 1,3,7-triméthylxanthine ou encore 1,3,7- triméthyl-1H-purine-2,6-dione) est une molécule de la famille des méthylxanthines, qui comprend également la théophylline et la théobromine. Sous sa forme pure, c'est une poudre blanche d'un goût extrêmement amer. La caféine est modérément soluble dans l'eau et les solvants organiques.

A haute température, la solubilité de la caféine dans l'eau augmente. La caféine, stable dans les milieux relativement acide et basique, est une base faible et peut réagir avec des acides pour donner des sels.

Cependant dans une solution aqueuse normale, elle n'est pas ionisée. Dissoute, elle peut être présente sous forme de dimères et de polymères. La caféine est une substance absorbant dans l'UV avec un maximum à la longueur d'onde de 272 nm [19].

La structure chimique de la caféine et ses propriétés physicochimiques sont présentées à la figure 2 et dans le tableau II.



Figure 2 : Structure chimique (2D) et (3D) de la caféine [18].

Tableau II : Caractéristiques physicochimiques de la caféine [19].

Nom IUPAC	1,3,7-triméthyl-1H-Purine-2,6(3H,7H)-dione
Synonymes	1,3,7-triméthylxanthine Théine Guaranine Matéine Méthylthéobromine méthylthéophylline
Code ATC	N06BC01
Banque de Produits	DB00201
Caractères organoleptiques	Sans odeur, poudre cristalline blanche, saveur amère
Propriétés chimiques	
Formule brute	$C_8H_{10}N_4O_2$
Masse molaire	194,1906 ± 0,0085g/mol
pka	-0,13 à 1,22
Moment dipolaire	3,64D
Propriétés physiques	
Température de fusion	227 à 228°C (anhydre) 234 à 236,5°C (monohydratée)
Température d'ébullition	178°C
Solubilité	21,7 g/L (eau 25°C) 1g/22 ml (alcool à 60°C) 1g/50 ml (acétone) 1g/5,5 ml (chloroforme)
Masse volumique	1,23g/cm ³ à 18°C
T° d'auto-inflammation	550°C
Ecotoxicologies	
DL50	192 mg/kg Rat (voie orale) 127 mg/kg Souris (voie orale) 62 mg/kg Souris (IV) 142 mg/kg Souris (SC)

II-4- Consommation et doses limites recommandées

La consommation mondiale de la caféine a été estimée à 120.000 tonnes par an, ce qui en fait la substance psychoactive la plus répandue et la plus consommée au monde. Ce chiffre équivaut à une consommation de boisson caféinée par jour par habitant de la planète. En Amérique du Nord, 90% des adultes consomment de la caféine quotidiennement. Les pays où l'on consomme le plus de caféine par habitant sont indiqués dans l'histogramme ci-dessous [20].

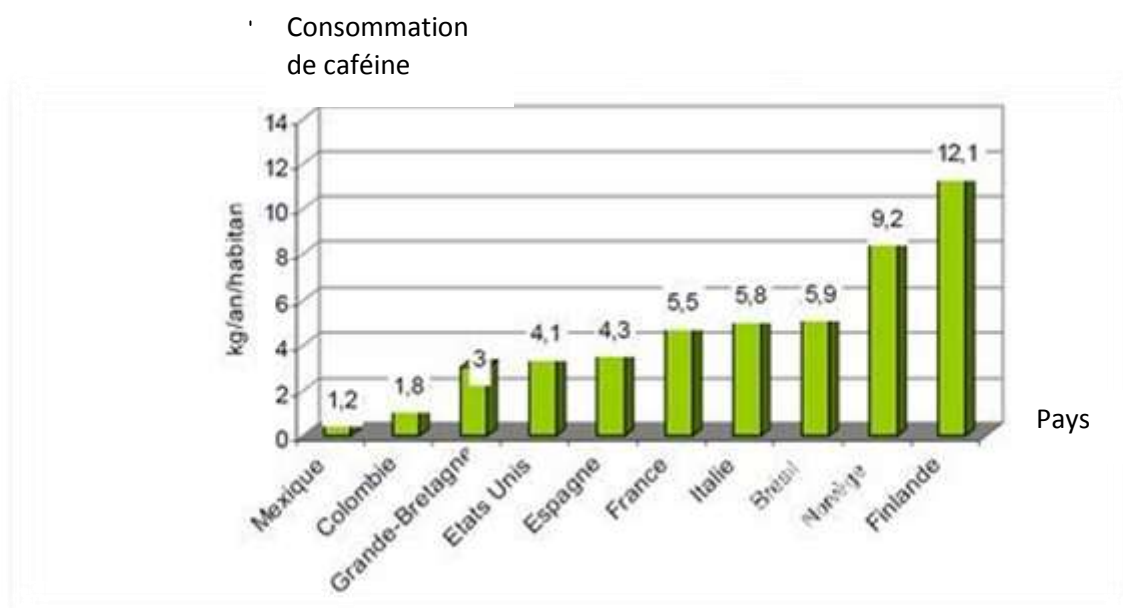


Figure 3 : Quantité de caféine absorbée en Kg par an et par habitant selon les données de l'OIC pour l'année 2010 [21]

Ce diagramme en bâton a été obtenu à partir des principales sources de caféine à savoir le café et le thé. Notons qu'une troisième source de caféine, particulièrement importante et en constante augmentation n'est pas représentée dans ce graphique, il s'agit des boissons gazeuses. L'apport de caféine du cacao ne dépasse pas 15 mg/jour/habitant pour le Danemark, premier consommateur, et est absent dans le graphique [22].

L'Argentine et le Paraguay sont les deux principaux consommateurs de maté, soit un apport en caféine de 100 et 50 mg/jour/ habitant (respectivement), non représenté ici [22].

Le diagramme ci-dessous (figure 4) montre la quantité de caféine contenue dans quelques sources de caféine à savoir les stimulants, les médicaments et les aliments dont les boissons gazeuses.

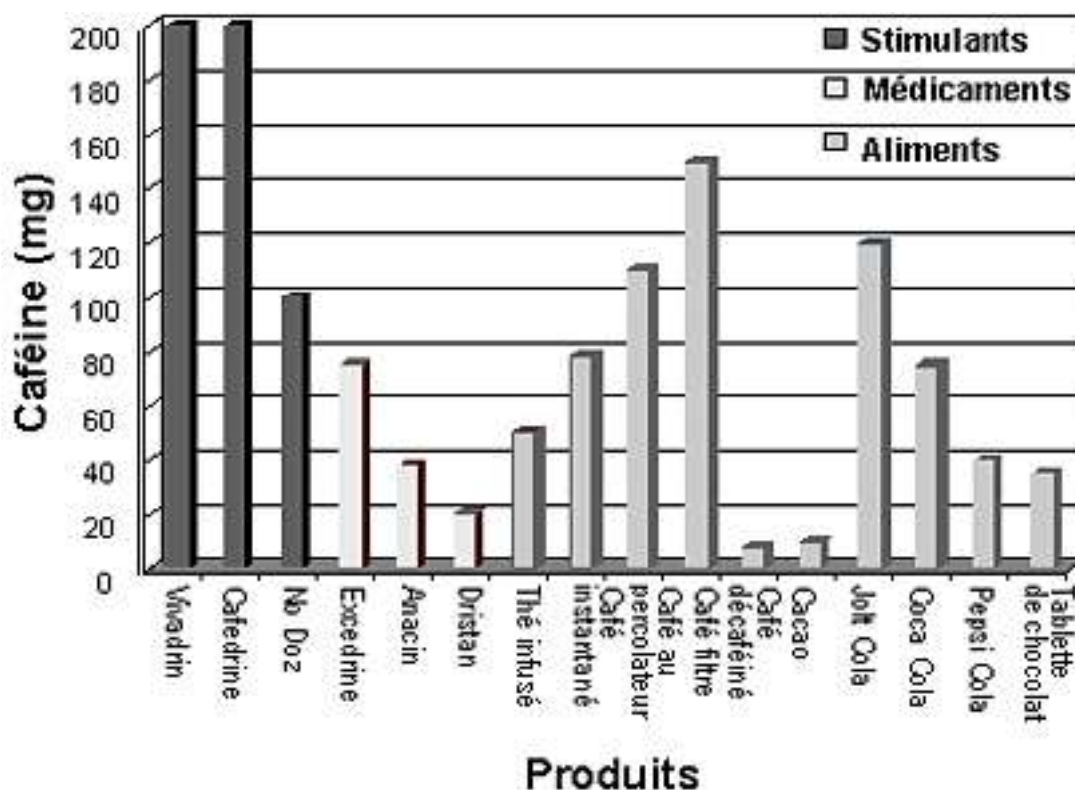


Figure 4 : Apports en caféine des stimulants, des médicaments et des aliments [22]

Le tableau III donne une idée des doses limites recommandées :

Tableau III : Limites recommandées de l'apport quotidien maximal en caféine chez la population en bonne santé [23].

Population	Apport quotidien maximal de caféine recommandé	Equivalent en boissons gazeuses à base de cola.
Adultes et Adolescents âgés de 13 ans et plus (en bonne santé)	400 mg	8 canettes de 330 ml d'une boisson gazeuse contenant 50 mg de caféine.
Femmes enceintes et mères allaitante.	300 mg	6 canettes de 330 ml d'une boisson gazeuse contenant 50 mg de caféine.
Enfants de 10 à 12 ans	85 mg maximum	2 canettes de 330 ml d'une boisson contenant 50 mg de caféine
Enfants de 7 à 9 ans	62,5 mg maximum	1 canette et demie de 330 ml d'une boisson gazeuse contenant 50 mg de caféine.
Enfants de 4 à 6 ans	45 mg maximum	1 canette de 330 ml d'une boisson gazeuse contenant 50 mg de caféine.

CHAPITRE III : LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

III-1- Intérêt

La chromatographie liquide permet la séparation et/ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification.

On peut citer plusieurs exemples de chromatographie liquide telles que :

- La chromatographie sur couche mince
- La chromatographie sur papier
- La chromatographie sur colonne en occurrence l'HPLC

La chromatographie liquide haute performance(HPLC) permet de réaliser des analyses qui ne sont pas possibles avec les techniques sur couche mince ou en phase gazeuse [24].

Il existe également d'autres méthodes de dosage de la caféine à savoir la spectrophotométrie, la chromatographie en phase gazeuse etc.....

A l'origine, la chromatographie liquide se faisait sur des colonnes en verre. Le liquide traversait la phase stationnaire par gravité ou sous faible pression, puis pour augmenter le débit, des manipulations ont été réalisées sous pression plus forte. C'est ce que l'on a appelé la chromatographie liquide haute pression (CLHP ou HPLC) [24]. Très rapidement le "P" de pression est devenu le "P" de performance lorsque l'on a optimisé la technique (diminution de la taille de particules de la phase stationnaire, régularité de cette phase...).

III-2- Notions Fondamentales

III-2-1- Notions de phase stationnaire

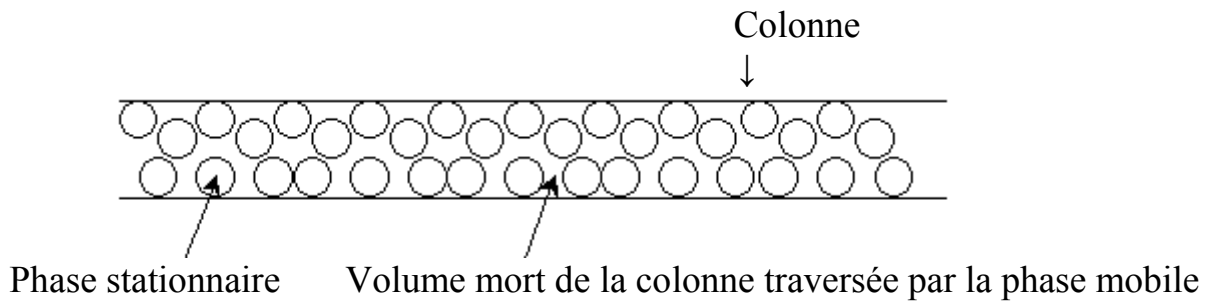
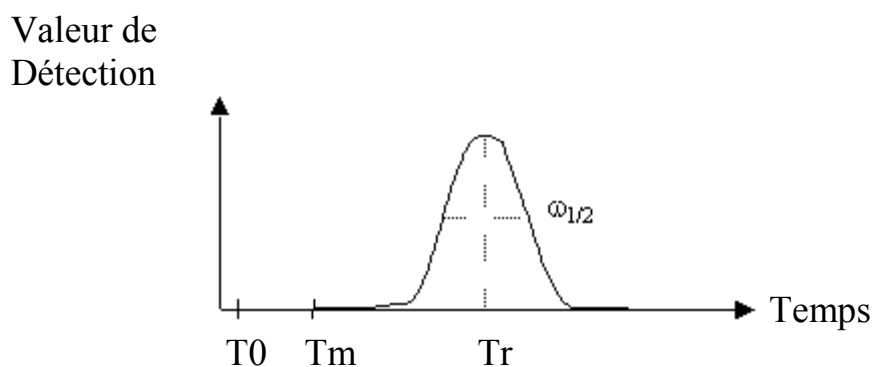


Figure 5 : phase stationnaire d'une colonne

La phase stationnaire est un support plus ou moins poreux recouvert d'un gel (liquide greffé) qui a les propriétés désirées pour retenir les molécules de solutés.

La phase mobile ou éluant est un liquide qui entraîne les solutés à travers la colonne.

III-2-2- Notion de temps de rétention [24].



- T0 est le temps du début de l'injection

- T_m : temps mort ; c'est le temps mis par un composé non retenu par la phase stationnaire pour traverser la colonne (temps passé dans la phase mobile).
- T_r : temps de rétention ; c'est le temps mis par un soluté pour traverser la colonne (le temps passé dans la phase stationnaire et dans le volume mort de la colonne). Ce temps est caractéristique d'un soluté dans des conditions d'analyse donnée. La surface du pic est fonction de la quantité du constituant dont il est la trace.

On pourra définir le temps de rétention réduit T'_r qui est le temps passé par un soluté dans la phase stationnaire, soit :

$$T'_r = T_r - T_m$$

III-2-3- Notion de pression

Les particules de phase stationnaire sont sphériques. Si l'on divise leur diamètre par 10, on diminue leur surface d'un facteur 100 et leur volume d'un facteur 1000. On peut donc placer dans la colonne 1000 fois plus de particules et donc augmenter de 10 fois la surface en contact avec la phase mobile. La résistance à l'écoulement de la phase mobile sera donc augmentée.

En conséquence, pour maintenir un débit constant dans la colonne, il faut augmenter la pression. En CLHP, on travaille à des pressions comprises entre 20 et 150 bars [24].

III-2-4- Notions de polarité et de polarisabilité

La polarité d'une molécule est une notion intrinsèque. Certaines molécules étant dissymétriques, les électrons ne sont pas uniformément répartis autour d'elles. De ce fait, il existe un moment dipolaire permanent qui crée un champ électrique local. Ces molécules sont dites polarisées [24].

Sur certaines molécules isolées qui ne possèdent pas de moment dipolaire permanent, un champ électrique peut créer un champ dipolaire induit en modifiant la position relative des atomes. Ces molécules sont dites polarisables [24].

Il existe des échelles de polarité. On utilise la notion de polarité comme une donnée comparative entre molécules. On dit que tel composé est plus polaire ou moins polaire qu'un autre. De même, on dit que la phase mobile et la phase stationnaire sont polaires, peu polaires ou apolaires.

Pour qu'il y ait séparation chromatographique de composés, il faut que leurs molécules interagissent de manières différentes avec au moins une des phases (stationnaire et mobile). Ces phases doivent avoir des polarités différentes.

On peut appliquer la règle "qui se ressemble s'assemble" à l'ensemble soluté - phase stationnaire.

- Si la phase stationnaire est polaire, les composés polaires seront plus retenus que les composés non polaires.
- Si la phase stationnaire est apolaire, les composés apolaires seront plus retenus que les composés polaires.

A l'origine, les colonnes étaient remplies de silice (phase stationnaire polaire). La silice doit sa polarité aux groupements silanols Si-OH qui sont polaires. Pour que la séparation soit efficace, la phase mobile doit alors être peu polaire.

L'ensemble "phase stationnaire polaire et phase mobile peu polaire" forme la chromatographie à polarité de phase normale [24].

Par la suite, les particules de silice (support) ont été enrobées de paraffine en C 18 pour faire une phase apolaire. Dans ce cas, pour que la séparation soit efficace, la phase mobile est polaire (généralement à base d'eau). L'ensemble "phase stationnaire apolaire et phase mobile polaire" forme la chromatographie à polarité de phase inversée [24].

Aujourd'hui, les phases stationnaires sont greffées chimiquement pour la plupart sur de la silice sphérique et calibrée.

Dans la pratique, chaque séparation nécessite une polarité de la phase mobile qui lui est propre. Chaque solvant ayant une polarité donnée, on ajuste la polarité globale de la phase mobile en mélangeant plusieurs solvants miscibles. A cette composition de phase mobile correspond une force éluante qui caractérise le pouvoir d'entraîner les solutés.

Il faut ajuster la force éluante en fonction des solutés à séparer. Pour cela, on peut utiliser un solvant pur ou un mélange de solvants de façon constante : on dit alors travailler en mode isocratique.

Dans certains cas, il est utile de faire varier la force éluante au cours de l'analyse. Si le mélange de différents solvants varie au cours de la séparation, on réalise alors un gradient d'élution, car la meilleure force éluante pour le début de l'analyse n'est pas forcément adaptée pour une bonne séparation des solutés sortant en fin de chromatogramme.

Ces 2 modes sont utilisés pour des analyses en chromatographie à polarité de phase normale ou inversé [24].

III-3- Principe et Appareillage de l'HPLC

III-3-1- Principe

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est injecté dans le chromatographe. Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire contenu dans un tube appelé colonne.

La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

En sortie de colonne, grâce à un détecteur approprié, les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme [24].

III-3-2- Description des modules de l'appareillage

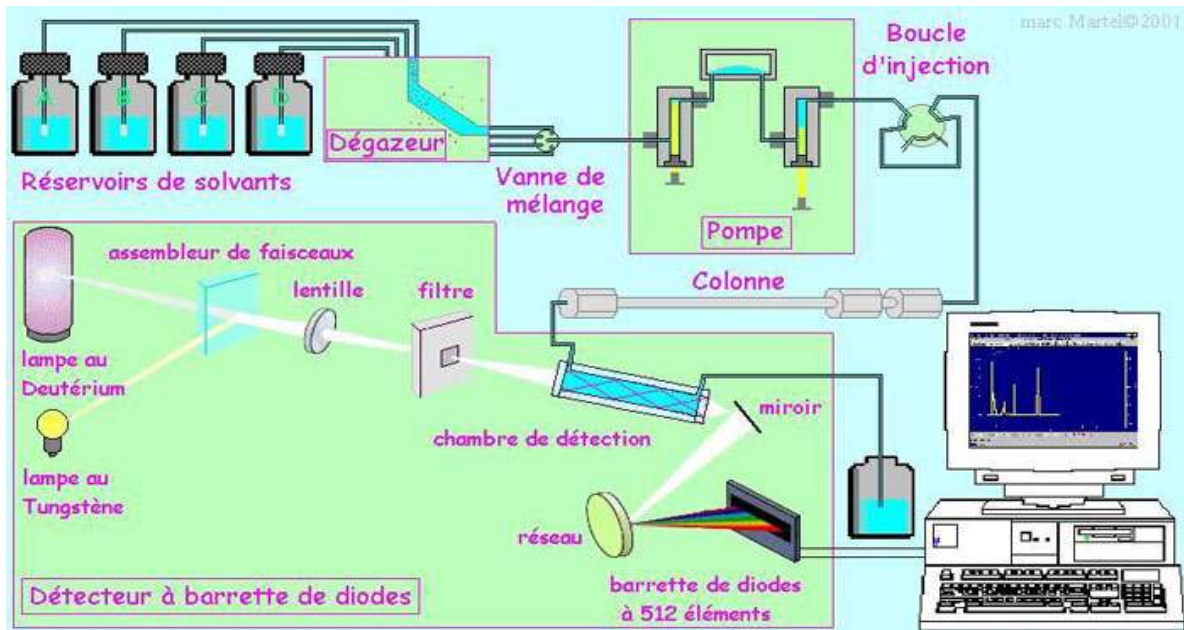


Figure 6 : Schéma du principe de fonctionnement d'une chromatographie liquide [25] .

- **Réservoir de solvants (phase mobile)**

Le plus souvent ce réservoir est une bouteille en verre dans laquelle plonge un tube avec une extrémité filtrante en téflon.

- **Dégazeur**

S'il est nécessaire le dégazage peut se faire par agitation de façon manuelle ou à l'aide d'un dispositif approprié.

- **Pompe**

Elle délivre en continu la phase mobile. Elle est définie par la pression qu'elle permet d'atteindre dans la colonne, son débit, et la stabilité du flux. Actuellement les paramètres d'une pompe sont :

- * débit : 0,01 à 10 mL/min
- * stabilité < 1% (<0,2% pour des chromatographies d'exclusion diffusion)
- * pression maximale < 350 bars

- **Injecteur**

Le type d'injecteur le plus couramment utilisé comporte une vanne à boucle d'une capacité fixe (10, 20, 50 μL ...). Cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne.

Elle possède 2 positions. La première permet le remplissage de la boucle d'injection de volume fixe (load), la seconde permet la mise en circulation de l'échantillon dans le système chromatographique (inject).

Le remplissage de la boucle d'injection se fait à l'aide d'une seringue.

- **Colonne**

Les colonnes en inox ont généralement un diamètre interne de 4,6 mm. La longueur est de 5,10, 15, ou 25 cm. La granulométrie est de 3, 5, ou 10 μm . Le diamètre interne d'une colonne est usuellement de 4 ou 4,6 mm.

- **Détecteur**

Le détecteur suit en continu l'apparition des solutés. Pour détecter, on utilise différents phénomènes physico-chimiques. Le signal obtenu est enregistré en fonction du temps. Généralement, on compare le signal obtenu pour la phase mobile et le soluté à celui de la phase mobile seule.

Le détecteur le plus utilisé en CLHP est un spectrophotomètre d'absorption UV-visible (190-800 nm).

Il existe d'autres détecteurs :

- réfractomètre différentiel
- UV à barrette de diodes

- électrochimique
- fluorimétrique...

Ainsi que différents types de couplage :

- Chromatographie liquide / Spectrométrie infrarouge
- Chromatographie liquide / Spectrométrie de masse

- **Intégrateur**

Une intégration consiste à mesurer la surface sous un pic.

La détection d'un pic chromatographique par l'intégrateur dépend de 2 paramètres:

* la largeur attendue des pics

* le seuil d'intégration (sensibilité)

- La largeur de pic est à peu près prévisible en fonction de la technique d'analyse et des conditions opératoires. Elle détermine la fréquence du signal. Le pic est alors découpé en tranches.
- Le seuil d'intégration est la valeur du signal à partir de laquelle le calculateur repère un début de pic.

Deuxième partie :
ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES

I-1- Cadre de l'étude

Notre étude a été initiée par le Département de Chimie Analytique-Bromatologie, Chimie Générale et Minérale de l'Unité de Formation et de Recherche (UFR) des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Félix Houphouët Boigny de Cocody-Abidjan.

Les manipulations ont été réalisées au Laboratoire National de la Santé Publique (LNSP) de Côte d'Ivoire.

I-2- Matériel

I-2-1- Echantillonnage

Dans le cadre de cette étude, ont été retenues sept (7) marques de boissons gazeuses à bases de caféine, de format en canettes, commercialisées dans le circuit officiel.

Les formats en canettes ont été choisis car on avait plus de marques par rapport aux autres formats.

Ces boissons en canettes proviennent de différents fabricants. Chaque marque a été représentée par un échantillon de trois (3) canettes issues de lots différents, soit un total de 21 canettes.

Les échantillons ont été codifiés de la façon suivante : (échantillons CL (Coca-cola life) CN (Coca-cola normal) ; PN (Pepsi normal) ; PL (Pepsi light) ; CZ (coca-cola zéro) ; PM (Pepsi max) ; PNx (Pepsi Next)).

I-2-2- Verrerie et accessoires

- Ampoules à décanter de 500 ml
- Fioles jaugées de 20 ml
- Erlenmeyers de 250 ml
- Ballons de 500 ml à fond rond
- Bêchers de 600 ml

I-2-3-Appareillage

- Un CLHP avec :
 - Une Pompe dont le débit a été réglée à 0,5 ml/min
 - Un Injecteur à boucle de 20 μ L équipé d'un filtre 0,45 μ m.
 - Une phase stationnaire de silice greffée en C18 (15 cm de longueur et 0,4 cm de diamètre) avec pré colonne de protection ;
 - Un Détecteur à barrette d'iode PDA 2998 réglé à 272 nm
 - Un Ordinateur de bureau équipé du logiciel Empower 3.



Figure 7 : HPLC de marques Waters e2695

➤ Un Rotavapor (HELDOLPH 2)

Caractéristique de l'appareil :

Modèle: Hei-vap value HB/G1 (Heildolph)

Description: condensateur de verre en diagonal

Alimentation : Electrique

Température : 20 à 180 °C



Figure 8 : Rotavapor HEIDOLPH

➤ Une balance de précision (SHIMADZU AUX 320)

I-2-4- Réactifs

- Méthanol grade CLHP et eau déminéralisée pour préparer la phase mobile.
- Solution étalon de caféine à 0,2 g/L dans du méthanol (grade CLHP).
- Sodium hydrogène-carbonate (0,1M NaHCO₃) et carbonate de Sodium (0,1M Na₂CO₃).
- Sulfate de magnésium anhydre.
- Dichlorométhane.

I-3- Méthode

I-3-1 Mise au point de la méthode

I-3-1-1- Préparation des solutions

- Préparation de la solution tampon

Peser 8,401g de carbonate de sodium hydrogéné (NaHCO₃) à dissoudre dans un litre d'eau puis 10,6 g de carbonate de sodium (Na₂CO₃) à dissoudre également dans un litre d'eau.

Prélever exactement 10 ml de Na₂CO₃ et 90 ml de NaHCO₃ pour constituer la solution tampon de pH environs 9

- Préparation de la phase mobile

La phase mobile est constituée du mélange Méthanol/Eau : 70/30 (V/V)

- Préparation de la gamme étalon

A partir de la solution étalon de caféine, à 0,2 g/l, on prépare une série de neuf solutions diluées dans des fioles jaugées de 20 ml numérotées de 1 à 9 selon le tableau ci-dessous. On injecte chacune des solutions préparées dans le CLHP.

Tableau IV: Préparation de la gamme étalon

Numéro de la fiole	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Solution étalon prélevée (µl)	40	60	80	100	120	140	160	180	200
Volume final après ajout d'eau (ml)	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Concentration en caféine (mg/L)	0,4	0,6	0,8	1	1,2	1,4	1,6	1,8	2

Les surfaces des pics obtenues à partir de chaque injection de concentration connue permettent de tracer la courbe d'étalonnage à partir de laquelle l'on détermine les paramètres de régressions linéaires.

Il s'agit d'une droite d'équation $y = aX + b$ avec :

y = Surface du pic

X = Concentration connue de caféine

a = Coefficient directeur et b = Ordonnée à l'origine

La concentration de caféine de nos échantillons sera déduite à partir de cette équation. On aura donc :

$$X = (Y - b) / a$$

I-3-1-2 Extraction de la caféine

Dans un bécher de 600 ml, introduire 250 ml de l'échantillon et ajouter une solution saturée de carbonate de sodium. Agiter vigoureusement. Ajouter 50 ml de dichlorométhane et maintenir l'agitation pendant au moins 5 minutes. Transférer le contenu du bécher dans une ampoule à décanter de 500 ml. Laisser

décanter et recueillir la phase organique dans un erlenmeyer de 500 ml propre et sec. Réaliser une deuxième extraction avec à nouveau 50 ml de dichlorométhane. Recueillir la phase organique dans le même erlenmeyer. Filtrer la phase organique et éliminer les traces d'eau à l'aide du sulfate de magnésium anhydre déposé sur un papier filtre. Évaporer le dichlorométhane à l'évaporateur rotatif. Dissoudre le résidu sec de caféine dans une petite quantité de l'éluant (mélange Méthanol/Eau : 70/30 (V/V)) et compléter le volume à 20,0 ml avec le même éluant dans une fiole jaugée. Cette solution correspond à l'extrait.

I-3-1-3- Dosage de la caféine dans l'échantillon

Dans une fiole jaugée de 20 ml, introduire 30 µL de l'extrait précédent et compléter à 20 ml avec l'éluant. 10µl de la solution obtenue (extrait dilué) est injectée dans le CLHP.

Calcul des facteurs de dilution :

- Ici nous avons prélevé 30 µl de notre extrait puis nous avons ajusté à 20 ml pour obtenir un extrait dilué. Le facteur de dilution (F1) pour obtenir la concentration de caféine dans l'extrait de départ est de :

$$20 \text{ ml}/30 \text{ µl} \quad \leftrightarrow \quad 20 \text{ ml}/0,03 \text{ ml} = 666,67$$

- Pour obtenir l'extrait, nous avons repris notre résidu sec avec 1 ml de notre éluant puis complété à 20 ml dans une fiole jaugée de 20 ml. Le facteur de dilution (F2) pour obtenir la concentration de caféine dans nos 250 ml d'échantillon de départ est de : 20
- 250 ml ont été utilisés pour l'extraction sur les 330 ml de volume que contient chaque canette. Le facteur de correspondance (F3) pour obtenir la concentration de caféine dans chaque canette est de : $330/250 = 1,32$

La quantité de caféine (Q) pour chacune des canettes analysée sera donc :

$$Q = X \times F1 \times F2 \times F3 \leftrightarrow Q = X \times 666,67 \times 20 \times 1,32$$

X = Concentration de caféine de l'extrait dilué obtenue à partir de la droite d'étalonnage (mg/L).

I-4- Protocole de Validation

La norme ISO/IEC 17025 définit la validation comme étant l'ensemble des opérations nécessaires pour prouver que le protocole est suffisamment exacte et fiable pour avoir confiance dans les résultats fournis et ceci pour un usage déterminé.

Généralement, la validation complète d'une méthode quantitative doit couvrir les critères suivants :

- Linéarité
- Fidélité ou précision (reproductibilité et répétabilité)
- Exactitude
- Sensibilité : limite de détection et de quantification

➤ La linéarité

C'est la capacité dans un intervalle donné d'obtenir des résultats de dosage directement proportionnels à la concentration ou à la quantité d'analyte dans l'échantillon.

C'est une relation linéaire signal – concentration.

Pour l'étude de la linéarité de la caféine, nous avons préparé une solution standard de la substance de référence de caféine à 0,2 g/L.

A partir de cette solution mère, neuf (9) solutions filles ont été préparées pour des concentrations comprises entre 0,4 et 2 µg/ml.

La droite d'étalonnage à partir des dilutions obtenues a été déterminée avec les paramètres suivants :

- Coefficient de corrélation r
- Coefficient de détermination r²
- Equation de la droite de régression $y = aX + b$

➤ La précision

Elle traduit l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un échantillon homogène dans les conditions précises. Elle comprend la répétabilité et la reproductibilité.

La répétabilité exprime la fidélité sous des conditions identiques : même analyse, même équipement, même réactif, et dans des conditions aussi stables que possible sur un intervalle de temps court.

○ Répétabilité des solutions de référence

Les solutions de référence diluées de caféine ont été analysées (n=6) puis les coefficients de variation des surfaces ont été calculés.

$$CV = 100 \cdot \sigma / X$$

σ = écart type X = moyenne

○ Répétabilité de la procédure d'analyse

Un échantillon de l'une des marques retenues pour l'étude est soumis à la procédure d'extraction à six reprises (n=6). Chaque extrait est analysé dans les mêmes conditions.

Le coefficient de variation (CV) des surfaces obtenues est calculé.

➤ L'exactitude

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre une valeur exacte ou acceptée et la valeur obtenue en appliquant la procédure d'analyse un certain nombre de fois.

A une quantité d'échantillon, on ajoute différentes concentrations de solutions de référence. Ces échantillons sont analysés et les pourcentages de récupération sont calculés.

➤ Les limites de détection LD et de quantification LQ

La limite de détection correspond à la plus petite concentration de substance pouvant être mise en évidence dans un échantillon sans pouvoir être quantifiée. La limite de quantification correspond à la plus faible concentration détectable.

I-5- Application aux boissons gazeuses à base de kola

On effectue deux fois l'extraction de la caféine sur chacun des échantillons de marque de boissons gazeuses à base de kola.

Le dosage par chromatographie liquide haute performance est effectué pour les échantillons de chaque marque.

La moyenne des concentrations obtenues est calculée, cette moyenne expérimentale est comparée à la concentration de caféine recommandée pour les boissons gazeuses à base de kola.

CHAPITRE II : RESULTATS

II-1- Résultats de la validation de la méthode de dosage

II-1-1- La linéarité de la méthode

Le domaine de linéarité de la caféine est compris entre 0,4 µg/ml et 2 µg/ml.

Le tableau IV et la figure 9 en sont l'illustration

Tableau IV : Linéarité de la méthode de dosage.

Concentration pondérale (µg/ml)	Surfaces
0,4	20.624,608
0,6	31.633,153
0,8	42.155,913
1,0	53.380,920
1,2	65.374,077
1,4	76.020,057
1,6	86.618,330
1,8	97.808,197
2,0	109.581,737

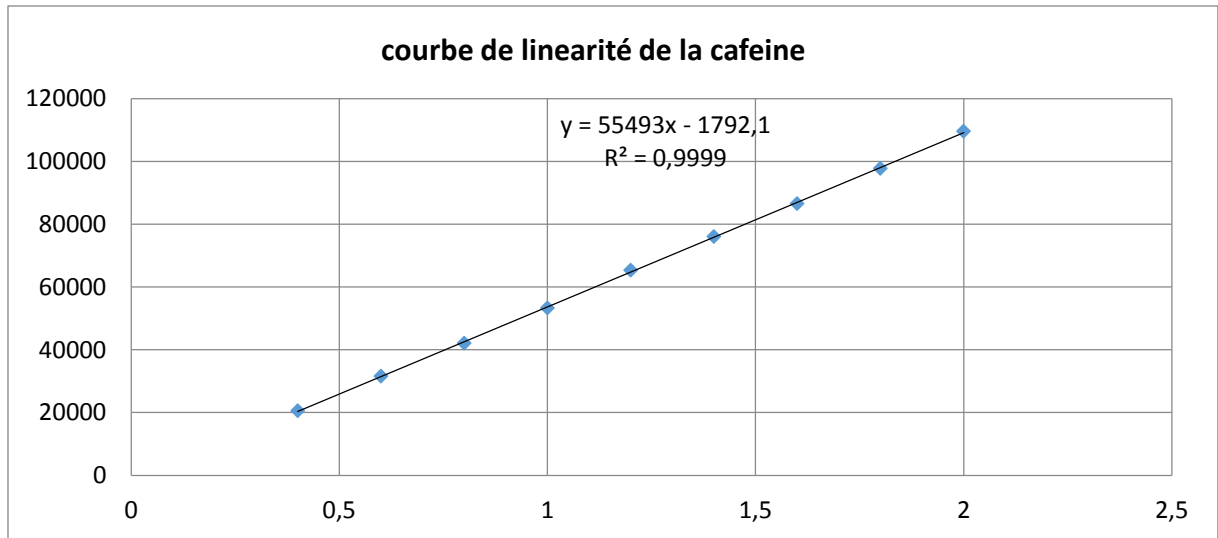


Figure 9 : Droite d'étalonnage de la caféine

Les caractéristiques de la droite de régression sont les suivantes :

Coefficient de détermination : $r^2 = 0,9999$

Equation de la droite de régression : $Y = 55493X - 1792,1$

X = concentration en µg/ml et Y = surface du pic

Le coefficient de détermination est très proche de 1.

II-1-2- Précision de la méthode

II-1-2-1- Répétabilité de l'analyse chromatographique

Tableau VI : Répétabilité des solutions de référence de la gamme étalon

Concentration pondérale (µg /ml)	0,4	1,0	1,6
Surface	20.315	53.503	87.439
	20.353	53.208	87.205
	20.349	53.373	86.750
	20.023	53.364	86.730
	19.964	53.318	87.206
	20.119	53.300	87.039
Moyenne	20.187,060	53.344,263	87.061,603
Ecart-type	174,202	97,637	7,793
Coefficient de variation (CV) (%)	0,9	0,2	0,1

II-1-2-2- Répétabilité de l'ensemble de la procédure

Tableau VII : Répétabilité de l'ensemble de la procédure de dosage de la marque CN1

Essais	Surfaces
Essai 1	62.764,614
Essai 2	67.309,144
Essai 3	69.748,433
Essai 4	68.585,067
Essai 5	65.609,777
Essai 6	69.899,686
Moyenne	67.319,4535
Ecart type	2.750,60
Coefficient de variation (%)	4,08

La répétabilité des solutions de référence a donné des coefficients de variation inférieurs à 2%. Celle de l'ensemble de la procédure a donné un coefficient de variation inférieure à 5%, ce qui est généralement admis dans le domaine de l'analyse quantitative [29].

II-1-3- Exactitude de la méthode

Tableau VIII: Exactitude de la méthode

Quantité ajoutée (μL)	Surface attendue (avec ajout)	Surface obtenue (sans ajout)	Pourcentage de recouvrement (%)
100	53.610,688	53.062,495	101,0
140	75.052,267	73.279,391	102,4
180	100.363,815	94.889,664	105,8
Pourcentage moyen de recouvrement (%)			103,1

Le pourcentage moyen de recouvrement exprimant l'exactitude de la méthode est de 103,1%.

II-1-4- Sensibilité de la méthode

La limite de détection a été déterminée en réalisant des dilutions successives de la solution mère de référence.

Tableau IX : Limite de détection et de quantification de la caféine.

Concentration pondérale ($\mu\text{g/ml}$)	Surface
0,25	13.621
0,20	11.061
0,15	11.030
0,10	5.206
0,05	5.114
0,025

La limite de détection est de 0,025 $\mu\text{g/ml}$ et la limite de quantification est de 0,05 $\mu\text{g/ml}$.

II-2- Application au dosage de la caféine dans les boissons

Tableau X : Teneur en caféine dans les différentes boissons en canettes

échantillons	Quantité (mg)	Moyenne et écart type (mg)	Quantités recommandées (mg) [26]
CL1	14,26	12,4 ± 1,7	27
CL2	12,72		
CL3	10,14		
CN1	20,80	21,2 ± 0,3	35
CN2	21,16		
CN3	21,64		
PN1	22,32	21,9 ± 0,3	38
PN2	21,81		
PN3	21,54		
PL1	23,28	26,0 ± 2,1	35
PL2	28,56		
PL3	26,26		
CZ1	23,04	20,6 ± 2,1	35
CZ2	20,60		
CZ3	18,02		
PM1	26,58	25,0 ± 1,9	69
PM2	24,57		
PM3	23,78		
PNx1	11,28	10,1 ± 0,9
PNx2	9,03		
PNx3	10,08		

CL : Coca Life ; CN : Coca Normal ; CZ : Coca Zéro

PN: Pepsi Normal; PL: Pepsi Light; PNx: Pepsi Next; PM: Pepsi Max

CHAPITRE IV : DISCUSSION

III-1- Validation de la méthode d'analyse chromatographique

Guidé par les travaux de [27], nous avons réalisé la validation du dosage de la caféine dans les boissons gazeuses à base de kola après une adaptation de la méthode.

Pour expérimenter cette validation, nous avons extrait la caféine de ces boissons avec du dichlorométhane et procédé à un dosage par chromatographie liquide haute performance.

La caféine, de par sa structure moléculaire (figure 2), est une molécule polaire capable de former des liaisons hydrogènes. Elle est donc soluble dans tout solvant polaire comme le dichlorométhane ou l'eau, mais très peu soluble dans les solvants non polaires comme l'éther.

Bien que la caféine soit soluble dans l'eau (la principale composante des cafés et des boissons gazeuses), sa structure moléculaire lui confère une plus grande affinité pour les solvants comme le dichlorométhane ou le chloroforme [28].

Le dichlorométhane et le chloroforme sont des choix judicieux pour extraire la caféine. Puisque la température d'ébullition du dichlorométhane est autour de 39,6°C et que la caféine reste solide jusqu'à 238°C, il est possible de séparer le dichlorométhane de la caféine en le faisant évaporer avec un montage de distillation fractionnée.

Le dosage s'est réalisé par chromatographie liquide haute performance.

La phase mobile était composée d'un mélange méthanol/eau (70/30 V/V).

Notre choix a porté sur le méthanol car il est d'un coût accessible pour les laboratoires et permet de dissoudre très rapidement la caféine.

La phase stationnaire utilisée était une colonne de silice greffée en C18 (15 cm de longueur et 0,4 cm de diamètre) avec une précolonne de protection.

La précolonne, de nature identique à la colonne évite le colmatage de celle-ci.

La caféine absorbe entre 240 et 340 nm, ce qui signifie qu'elle absorbe dans l'ultraviolet seulement. D'où l'utilisation pour son dosage d'un détecteur à barrette d'iode réglé à 272 nm, longueur d'onde d'absorption de la caféine.

Nous avons donc effectué une gamme d'étalonnage avec la caféine pure (caféine de référence) et tracer la droite d'étalonnage qui met en relation la concentration de caféine et la surface du pic obtenu.

Il s'agit d'une droite ascendante qui ne passe pas par l'origine de la forme $y = aX + b$ (b différent de zéro).

Elle nous a permis de déterminer la concentration des boissons.

Concernant les critères de validation de la méthode :

- La linéarité de la méthode

Nous avons obtenu une droite d'étalonnage à partir de concentrations de caféine allant de 0,4 µg/ml à 2 µg/ml avec des points qui se situent très près de la droite.

Le coefficient de détermination r^2 étant égal à 0,9999 donc très proche de 1, ceci montre qu'il existe une relation de proportionnalité entre tous les points.

Les valeurs de ces paramètres attestent d'une bonne linéarité de la méthode et que cette droite obtenue nous permet de déterminer les différentes concentrations de caféine de nos boissons.

- La précision de la méthode

La méthode proposée a une répétabilité satisfaisante car les coefficients de variation sont conformes aux normes en vigueur [29].

Ainsi, pour des solutions de référence de la caféine, la répétabilité des solutions donne respectivement des coefficients de variation de 0,9% ; 0,2% et 0,1% ; Ces résultats sont satisfaisants car la norme exige un coefficient de variation inférieure à 2% [29].

La reproductibilité de la procédure pour six essais respectifs d'un même échantillon donne un coefficient de variation de 4,08% conforme aux normes car est en dessous du 5% d'erreur généralement toléré en analyse quantitative [29]. Cela montre que notre dosage est précis.

- L'exactitude de la méthode

Le pourcentage de recouvrement moyen de la méthode est de 103,1%. Pourcentage conforme à la norme car comprise entre 95 – 105%. Valeur généralement recommandée en analyse quantitative [29].

Notre méthode est donc exacte.

- La sensibilité de la méthode

La méthode de dosage proposée donne une limite de quantification de 0,05 µg/ml et une limite de détection de 0,025 µg/ml.

Comme le montre les résultats de la validation, la méthode est précise, fiable et rapide. Les résultats des critères de validation justifient l'application de cette méthode au dosage quantitatif de la caféine dans les boissons gazeuses à base de kola.

III-2- Concentration de la caféine

Les quantités de caféine des différentes canettes obtenues à l'issue des analyses sont présentées dans le tableau XI.

Tableau XI : Quantités de caféine obtenues dans les différents types de boisson.

Echantillons	Conditionnement (ml)	Quantités de caféine (mg)
CL	330	12,4 ± 1,7
CN	330	21,2 ± 0,3
PN	330	21,9 ± 0,3
PL	330	26,0 ± 2,2
CZ	330	20,6 ± 2,1
PM	330	25,0 ± 1,2
PNx	330	10,1 ± 0,9

La FDA (Food and Drug Administration) a inclus la caféine dans la liste des substances nuisibles, en limitant la concentration maximale de caféine dans les formes canettes à 65 mg [30].

Nous remarquons dans ce tableau des concentrations toutes inférieures à la valeur recommandée par la FDA. Nos échantillons respectent donc les valeurs indiquées par la FDA.

Aussi, les faibles concentrations observées au niveau des échantillons PNx et CL pourraient s'expliquer par la mauvaise séparation de la phase aqueuse d'avec la phase organique due à une décantation très difficile que nous avons observée au cours des manipulations. Ce problème pourrait être résolu en utilisant un autre solvant pour l'extraction.

Les concentrations de caféine des échantillons CN et PN dans notre étude étaient respectivement 21,2 mg et 21,89 mg tandis que dans l'étude de Rachel R et al [31] sur le même type de boissons, elles étaient de 29,5 mg pour CN et 31,7 pour PN.

Nous remarquons ainsi une différence du taux de caféine pour les échantillons de même marque mais fabriqués dans différents pays. Ce qui nous fait dire que les quantités de caféine incorporée dans ces boissons ici en Côte d'Ivoire sont différentes de celles des autres pays tel que les Etats-Unis, l'Angleterre et la France.

Le tableau XII en est une illustration. Les données présentées sont issus des travaux de [31] qui montrent une variabilité du taux de caféine au niveau de différents établissements de vente de sodas.

Tableau XII : Teneur en caféine du Coca-cola dans différents établissements de vente.

Teneur en caféine dans les fontaines de Coca-Cola		
Etablissements	Portion (ml)	Quantité de caféine (mg/portion)
Burger King	480	41,5
Wendy's	480	41,5
Mc Donald's	480	44,0
Chick-fil A	480	48,4
Fast Track	480	45,5
Steak N Shake	480	43,5
Atlanta Bread Company	480	40,9
Checkers	480	46,9
Citgo Food Mart	480	48,4

Pour des volumes de 480 ml, les teneurs en caféine varient de 41,5 mg à 48,4 mg. Si on rapporte ce volume aux conditionnements retrouvés en Côte d'Ivoire (330 ml), on obtient des teneurs variant de 28,5 à 33,28 mg. Ces valeurs restent plus importantes que les quantités retrouvées dans notre étude.

RECOMMANDATIONS

Au terme de notre étude, nous faisons les recommandations suivantes :

➤ **AUX AUTORITES ADMINISTRATIVES**

- Renforcer les capacités techniques des structures en charge du contrôle de la qualité des aliments,
- Interdire la publicité incitant et encourageant une consommation exagérée,
- Harmoniser la réglementation relative aux sodas à base de kola.

➤ **AUX INDUSTRIES DE FABRICATION**

- Privilégier un étiquetage cohérent indiquant de façon claire et visible la quantité exacte de caféine contenue dans les différentes boissons,
- Indiquer la mention « consommer avec modération chez les enfants de moins de 12 ans et chez les femmes enceintes ».

➤ **A LA POPULATION**

- Consommer avec modération les sodas contenant la caféine même si ceux-ci sont sans alcool.

CONCLUSION

L'objectif général de notre travail était de vérifier la conformité des boissons gazeuses à base de kola du point de vue des doses recommandées par canette.

Pour atteindre cet objectif général, nous avons procédé à la validation d'un protocole de dosage de la caféine en solution par chromatographie liquide haute performance ainsi qu'à la détermination de la quantité de caféine contenue dans des boissons gazeuses à base de kola.

Notre étude a concerné les boissons en canettes provenant de différents fabricants.

Pour chaque marque de boisson, trois (3) canettes issues de lots différents, soit un total de 21 canettes ont été achetées.

Des analyses ont été effectuées sur ces canettes, notamment le dosage de la caféine. Des critères de validation de la méthode ont été déterminés :

- La linéarité ;
- La répétabilité-reproductibilité ;
- L'exactitude ;
- La limite de détection (LD) ;
- La limite de quantification (LQ).

Il en ressort que la méthode de dosage de la caféine dans les boissons gazeuses par chromatographie liquide est une méthode fiable et rapide avec des critères de validations satisfaisantes.

La méthode peut donc être utilisée pour le contrôle des boissons gazeuses importées sur le territoire ivoirien.

De plus, tous les résultats obtenus ont montré une concentration de caféine qui respecte les normes indiquées par la FDA donc sans danger pour le consommateur.

Cependant, ces boissons gazeuses contiennent d'autres substances telles que le sucre, l'acide phosphorique et l'aspartame qui pourraient être nocives pour le consommateur en cas de consommation exagérée.

Il est donc important de prendre les mesures qui s'imposent pour la préservation de la santé de la population.

REFERENCES

[1] Le pharmacien Pemberton et le Coca-Cola, Revue d'histoire de la pharmacie, Année 1979, Volume 67, Numéro 241, pp. 110-111

[2] [www.cocacoland.e-monsites.com/pages/les débuts du coca-cola en pharmacie](http://www.cocacoland.e-monsites.com/pages/les_débuts_du_coca-cola_en_pharmacie). [Visité en Décembre 2016]

[3] **santé canada**. votre santé et vous: la caféine. santé canada. [En ligne] 2007. visité le 15 mai 2015. www.hc-sc.gc.ca

[4] **Durfour, P S**. Traité nouveaux et curieux du café, du thé et du chocolat. la haye : Adrian Moetjens, 1693. 151.7.

[5] **Charles, H M**. blank drink: a native american tea. Athens : University of Georgia Press, 1979. 175p.

[6] **M'benhadji S. (2015)**

dspace.univtlemcen.dz/bitstream/112/7439/1/BENHADJI [Visité en février 2016]

[7] **Bourgeois, C M; Mescle J F; Zucca J**. Aspect microbiologique de la qualité des aliments. lavoisier : tec.lavoisier 1, 1996. pp. 416-418

[8] Les boissons rafraîchissantes sans alcool : définition, composition et place dans les apports nutritionnels. www.sciencesdirect.com. [Visité en Décembre 2016].

[9] Directive 94/35/CE du Parlement européen et du Conseil du 30 juin 1994 concernant les édulcorants destinés à être employés dans les denrées alimentaires. ec.europa.eu/food/fs/sfp/addit_flavor/flav10_fr.pdf. [visité en Décembre 2016]

[10] www.agriculture.gouv.fr/la-reglementation-sur-les-sodas. [Visité en Décembre 2016].

[11] - www.europa.eu/rapid/press-release_MEMO-12-723_fr.doc. [Visité en Décembre 2016].

[12] Règlement (CE) 1334/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif aux arômes et à certains ingrédients alimentaires possédant des propriétés aromatisantes qui sont destinés à être utilisés dans et sur les denrées alimentaires. http://europa.eu/legislation_summaries/consumers/product_labelling_and_packaging/sa0006_fr.htm. [Visité en Décembre 2016].

[13] **Mabille , J et Touzard, P.** Mémorial de la Côte d'Ivoire: les fondements de la nation ivoirienne. Abidjan : Edition Ami Abidjan, 1987. p. 193. Vol. III.

[14] **Benjamin, L T; Rogers A M; Rosenbaum A.** Coca-cola, caffeine and mental deficiency: Harry Hollingsworth an the chatanooga trial of 1911. s.l. : Journal of the history behavioral sciences, 1991. pp. 42-45. Vol. 27.

[15] **Frary , C D; Johnson, R; Wang, M Q.** Food sources and intakes of caffeine in the diets of persons in the United States. s.l. : JADA, 2005. pp. 110-113. Vol. 105.

[16] **Sénéchal, R; Laprise, M.** Internal report sciences. s.l. : Cégep St Félicien, 2012. Vol. 3.

[17] **Geoffrey, B.** What's your poison caffeine. s.l. : Australian Broadcasting Corporation, 1997. pp. 120-130. Vol. 99.

[18] Synthèse de la caféine à partir de l'uracil. www.daviddbrs.blogspot.com . [visité en Décembre 2016].

[19] **Richard, L.** Coffee: the demon drink. s.l. : New scintists, n°2518, 2005.

[20] Coffee-webstore. [En ligne] 2010. www.coffee-webstore.com. [visité en janvier 2016].

[21] <http://www.coffee-webstore.com/blog/le-chiffre-du-mois-55-1976>. [Visité en Décembre 2016].

[22] **Santé canada.** les boissons énergisantes. Santé canada. [En ligne] 2010. www.hc-sc.gc.ca. [Visité en février 2016].

[23] **Liguori, A; Hughes, J R.** Absorption and subjective effects of caffeine from coffee, cola and capsule. s.l. : Pharmacol biochem behav. pp. 721-726. Vol. 58. 3.

[24] Rouen, Academy de Biotechnologie, Biologie et Physiopathologie humaine. [En ligne] 2014. www.chem.shu.edu/hplc/index.html. [visité en octobre 2015].

[25] Principe de fonctionnement d'une chromatographe en phase liquide haute performance. <http://atechimie.univ-lille1.fr/Techniques/CLHP/Principe-fonctionnement>. [Visité en Décembre 2016].

[26] **CSPI.** concentration en caféine dans les boissons. [En ligne] 2015. www.cspinet.org/new/cafchart.html. [Visité en juin 2016].

[27] Rachel, E; John, J; Julian, M. Détermination simultanée de la caféine et de la vitamine B6 dans les boissons énergisantes par CLHP. San antonio : Université du monde incarné. 78209.

[28] Dosage de la caféine - labolycee.org/2003/2003-11-NelleCaledonie-Spe-Cafeine.doc

[29] Caporal J.G; Nivet J-M; Algranti P; Guilloteau M; Histe M; Lallier M; N’Guyen-Huu J-J; Russoto R. STP Pharma Pratiques 2 (1992) 250.

[30] Food and drug administration. Food and drug administration proposed rule. caffeine in nonalcoholic carbonated beverages. 20 may 1987, Vol. 52, 97.

[31] Rachel R; McCusker L; Bruce A; Goldberger; Edward J.

Caffeine content of energy drinks, carbonated sodas, and other beverages. journal of analytical toxicology, Vol 30, March 2006

ANNEXES

Dosage par chromatographie liquide haute performance de la caféine contenue dans les boissons gazeuses à base de kola.



PEPSI LIGHT (PL)



PEPSI NEXT (PNx)



PEPSI NORMAL (PN)



PEPSI MAX (PM)



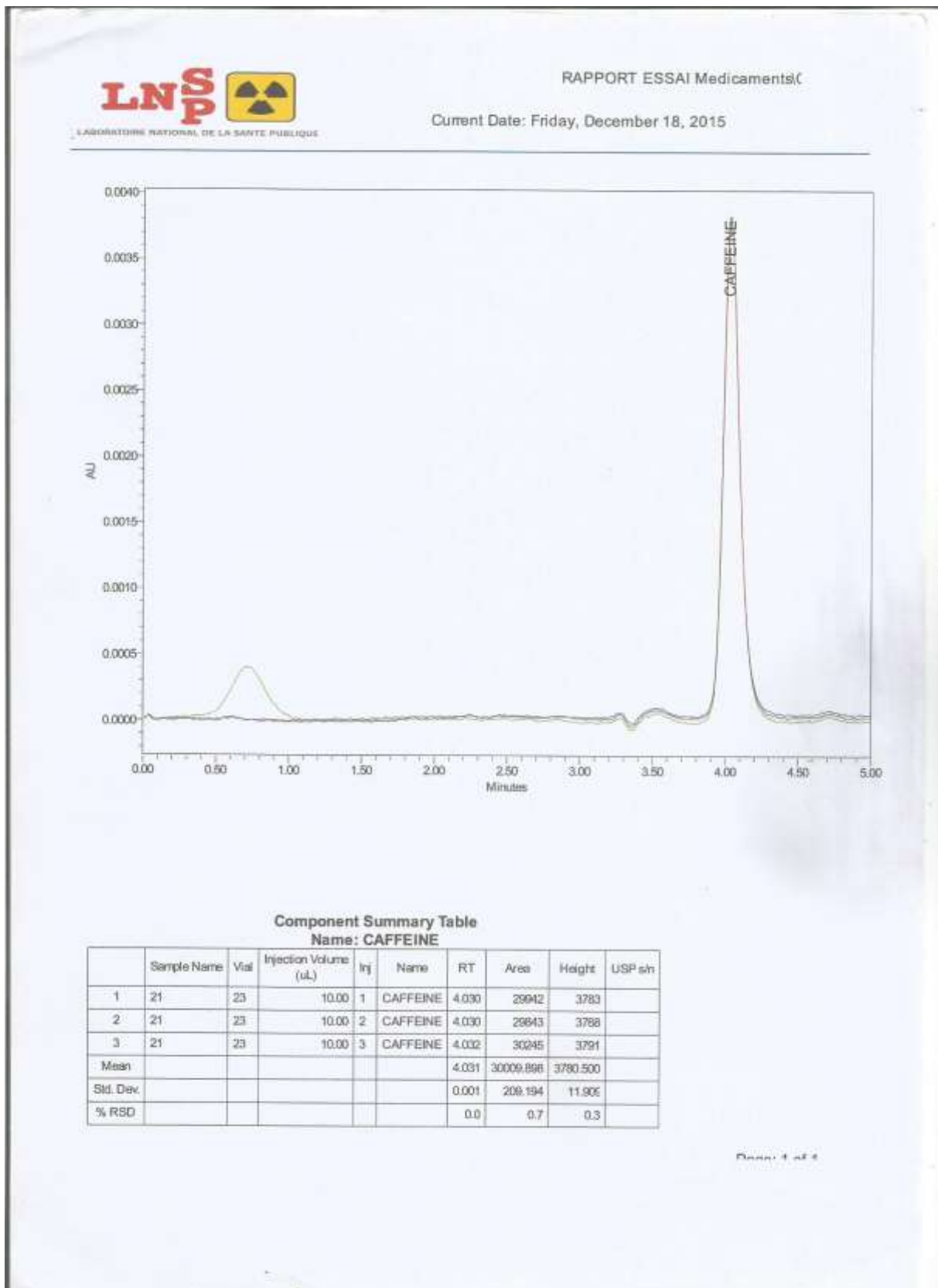
COCA-COLA LIFE (CL)

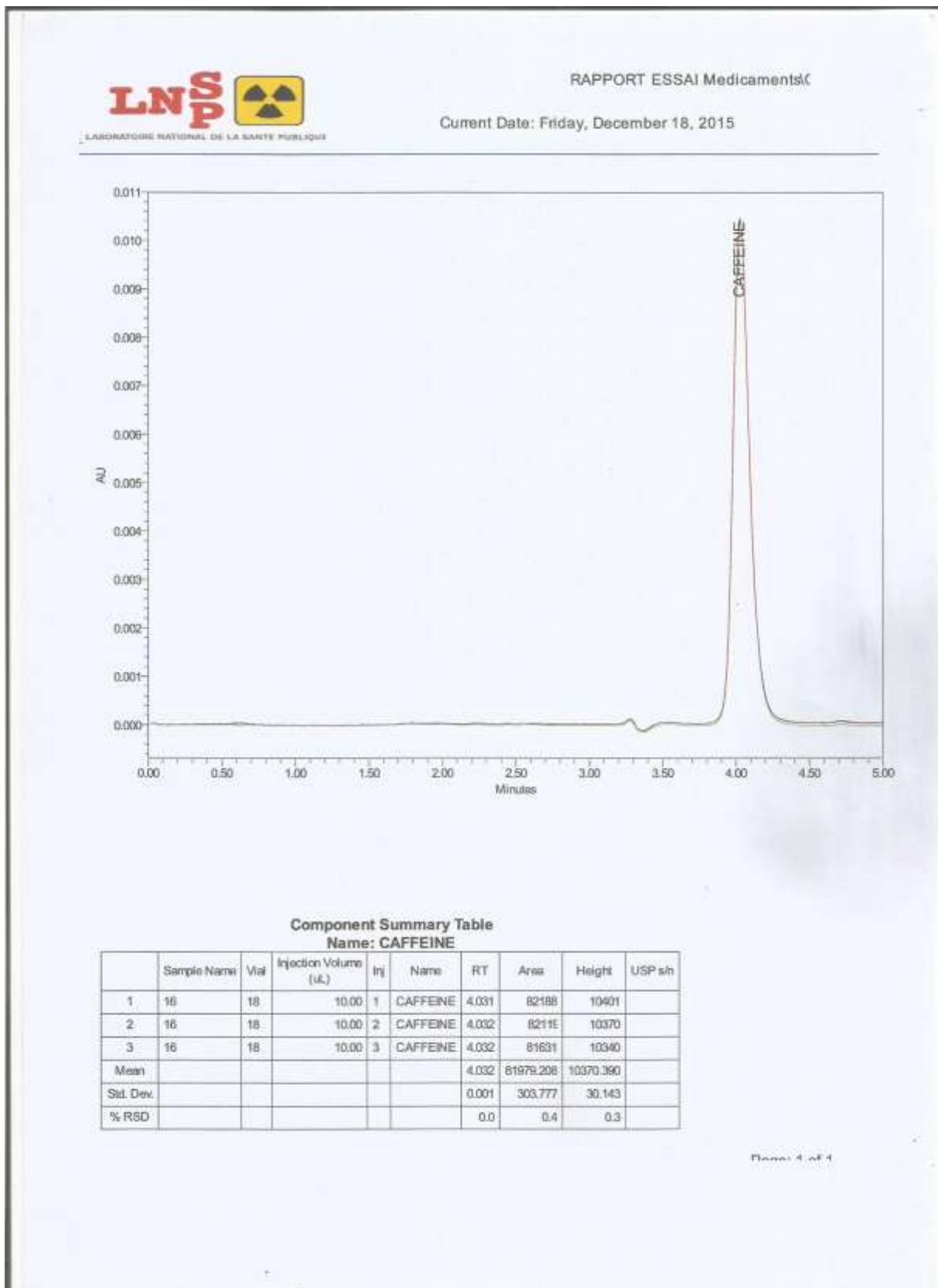


COCA-COLA NORMAL (CN)



COCA-COLA ZERO (CZ)





RESUME

INTRODUCTION

La présence remarquée de la caféine dans nos vies et la croissance des marques de produits dans nos rayons, soulève la question de la quantité de caféine jugée excessive pour le consommateur.

L'objectif général de notre travail a été de vérifier la conformité des boissons gazeuses à base de kola du point de vue des doses de caféine recommandées par canette.

Pour atteindre cet objectif général, il nous a fallu d'une part valider un protocole de dosage de la caféine en solution par chromatographie liquide haute performance, et déterminer la quantité de caféine contenue dans les boissons gazeuses à base de kola d'autre part.

METHODES

A partir d'une solution étalon de caféine à 0,2g/L, la gamme étalon a été préparée et la courbe d'étalonnage déterminée.

La caféine a été extraite à l'aide du dichlorométhane dans une ampoule à décanter. Le solvant a été évaporé à l'évaporateur rotatif.

La concentration de caféine dans chaque échantillon a été déterminée en tenant compte des facteurs de dilutions. La validation du protocole de dosage par CLHP s'est faite sur les critères de linéarité, de fidélité, d'exactitude et de sensibilité de la méthode.

RESULTATS

Les résultats des critères de validations ont justifié l'application de la méthode au dosage quantitatif de la caféine dans les boissons gazeuses à base de kola. Toutes les concentrations obtenues (entre 10,13 et 26,02 mg) étaient conformes à la concentration maximale fixée par la FDA qui est de 65 mg [30].

CONCLUSION

Il ressort de cette étude que la méthode de dosage de la caféine dans les boissons gazeuses par chromatographie liquide est une méthode fiable et rapide avec des critères de validations satisfaisantes.

La méthode peut donc être utilisée pour le contrôle des boissons gazeuses importées sur le territoire ivoirien.

Mots clés : Boisson gazeuse, kola, caféine, CLHP