

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE  
Union - Discipline - Travail

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR,  
DE LA RECHERCHE ET DE L'INNOVATION TECHNOLOGIQUE



U.F.R. SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

ANNEE 1997 - 1998

N° .....

## THESE

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

Par

BONY François Nicaise  
Interne des Hôpitaux  
C.E.S. d'Hématologie - Biologie

**Mise au point d'une méthode d'analyse  
de la vitamine B<sub>2</sub> ou Riboflavine par  
Chromatographie Liquide Haute Performance ;  
Application au dosage dans les farines à base de  
céréales.**



*Soutenue publiquement le 12 juin 1998*

### **COMPOSITION DU JURY :**

**Président** : Monsieur le Professeur **YAPO Abbé Etienne**  
**Directeur de thèse** : Monsieur le Professeur Agrégé **MALAN Kla Anglade.**  
**Asseseurs** : Monsieur le Professeur Agrégé **KOUADIO Kouakou Luc**  
Monsieur le Docteur **TEBI Ambroise**  
Madame le Docteur **KOUAME-AKE Michèle**

ADMINISTRATION ET LISTE DU  
PERSONNEL ENSEIGNANT DE  
L'U.F.R. DES SCIENCES  
PHARMACEUTIQUES ET  
BIOLOGIQUES

---

*Thèse - Diplôme d'état de Docteur en Pharmacie ; BONY F. Nicoise*

*Thème : Mise au point d'une méthode d'analyse de la vitamine B<sub>2</sub> ou Riboflavine par Chromatographie Liquide Haute Performance (C.L.H.P.).  
Application au dosage dans les farines à base de céréales.*

**HONORAIRES**

Directeurs Honoraires	: Professeur FOURASTE Isabelle Professeur RAMBAUD André
Doyen Honoraire	: Professeur BAMBA Moriféré

**ADMINISTRATION**

Doyen	: Professeur YAPO Abbé Etienne
Sous-Directeur, Chargé de la pédagogie	: Professeur agrégé KOUADIO Kouakou Luc
Sous-Directeur, Chargé de la Recherche	: Professeur YOLOU Séri Fernand
Secrétaire Principal	: M <sup>me</sup> BARRY Hadja
Secrétaire Principal Adjoint	: Monsieur OUATTARA Julien
Comptable	: Monsieur SEKA
Conservateur	: Monsieur KOUASSI Koffi

**PERSONNEL ENSEIGNANT PERMANENT****PROFESSEURS TITULAIRES**

MM	BAMBA Moriféré	: Pharmacie Galénique
	BEFORT Jean Jacques	: Biologie cellulaire et moléculaire
M <sup>me</sup>	KONE BAMBA Djénéba	: Matière médicale
MM	KONE Moussa	: Parasitologie
	OUATTARA Lassina	: Chimie Thérapeutique et Chimie Organique
	YAPO Abbé Etienne	: Biochimie et Biologie moléculaire

**MAITRE DE CONFERENCES AGREGES**

MM	ATINDEHOU Eugène	: Chimie Analytique
	DANO Djédjé Sébastien	: Toxicologie
	KABLAN Brou Jérôme	: Pharmacologie
	KOUADIO Kouakou Luc	: Hydrologie et Santé Publique
	LOUKOU Yao Guillaume	: Microbiologie
	MALAN Kla Anglade	: Chimie Analytique
	MONNET Dagui	: Biochimie et Biologie moléculaire
	YOLOU Séri Ferdinand	: Chimie Générale.

**MAITRES DE CONFERENCES**

MM	BRUNEL Jean – Frédéric	: Biologie Végétale
	DIAFOUKA François	: Biochimie et Biologie de la Reproduction
	HURPY Richard	: Anatomie - Physiologie Histologie et biologie cellulaire.

**MAITRES ASSISTANTS**

MM	FOUNGBE Siéko	: Pharmacologie
	KONAN - WAIDHET Daniel	: Biochimie et Biologie moléculaire
	GUEU Kaman Pascal	: Physique, Biophysique

**ASSISTANTS**

M <sup>me</sup>	AKE Michèle épouse. KOUAME	: Chimie Analytique
M	ALLADOUM Nambelbaye	: Chimie Organique et Thérapeutique
M <sup>lle</sup>	BONETTO Rosa	: Biochimie
MM	COULIBALY Sabali	: Galénique
	DIARRA Arouna	: Toxicologie
M <sup>me</sup>	HAUHOUOT A.épse. ATTOUNGBRE:	Biochimie
MM	KOFFI Angely Armand	: Galénique
	KOUASSI Dinard	: Hématologie – Immunologie
	MENAN Eby Ignace	: Parasitologie
	NEBAVI N'Guessan G. F.	: Parasitologie
M <sup>me</sup>	SIRANSY N'Doua épouse. KOUAKOU:	Pharmacologie
M <sup>lle</sup>	SAWADOGO Gnénago Duni	: Hématologie
M	SIMAGA Dédéou	: Matière médicale
	TRAORE Falaye	: Chimie Analytique
	ZINZENDORF Nanga Yessé	: Microbiologie

**ASSISTANTS STAGIAIRES**

M <sup>me</sup>	AGBESSI M. T. épouse. KOUASSI	: Microbiologie
MM	AMICHIA Attoumou Magloire	: Pharmacologie
M <sup>lle</sup>	ANZOUA Kacou Lydie Gisèle	: Matière Médicale
MM	CLAON Jean Stéphane	: Santé Publique
M <sup>lle</sup>	EDJEME N'Guessan Angèle	: Biochimie
	KONAN Kouakou	: Biologie Générale
M	INWOLEY Kokou André	: Microbiologie
M <sup>lle</sup>	TIGORI Béatrice	: Toxicologie
M <sup>lle</sup>	VALLEE Sandrine	: Mathématiques - Biophysiques
MM	YAPO Achou Pascal	: Galénique
M <sup>me</sup>	KIKI Pulchérie épouse. BARRO	: Parasitologie

## **PROFESSEURS CERTIFIES**

MM	FABO Tadjila Gérard	: Licence d'Anglais
M <sup>lle</sup>	CISSE Aoua	: Licence d'Anglais

## **IN MEMORIAM**

Feu	COMOE Léopold	: Maître de conférences Agrégé (1988 - 1992)
-----	---------------	--

## **ENSEIGNANTS VACATAIRES**

MM	AHOUSI Ferdinand	: Secourisme (GSPM Indénié)
	AMICHIA Kouac	: Secourisme (GSPM Indénié)
M <sup>me</sup>	CORALLO Palme Antoinette	: Pharmacologie
M	DEMPAH Anoh Joseph	: Parasitologie Zoologie
M <sup>me</sup>	KEBE Monique	: Santé Publique
MM	KOUAKOU Hilaire	: Botanique et Cryptogamie
	KOUAO Aka	: Législation
	MENSAH Jonas	: Matière Médicale
	NEMLIN Gnopo	: Matière Médicale (CIRT)
	N'GUETTA Augustin	: Gestion (INSET)
	OUATTARA Soungalo	: Virologie
	TEBI Ambroise	: Diététique (INSP)
M <sup>me</sup>	BEFORT Nicole	: Biochimie
MM	KOFFI KOUAME Philippe	: Santé Publique
	KOUASSI Koffi	: Bibliographie - Recherches Scientifiques

---

*Thèse - Diplôme d'état de Docteur en Pharmacie ; BONNY F. Nicaise*

*Thème : Mise au point d'une méthode d'analyse de la vitamine B<sub>2</sub> ou Riboflavine par Chromatographie Liquide Haute Performance (C.L.H.P.).  
Application au dosage dans les farines à base de céréales.*

**MISSIONNAIRES (1994-1995,  
1995 - 1996, 1996 - 1997)**

- M. BADIANE Mamadou : Professeur de Chimie Thérapeutique  
Faculté de Médecine et de  
Pharmacie de Dakar
- M BATAILLE Bernard : Maître de Conférences  
Faculté de Pharmacie de Montpellier I
- DIAINE Charles : Professeur de Mathématiques et de  
Biophysiques ; Faculté de Pharmacie de  
Lyon
- FAYE Boubakar : Professeur de Pharmacologie Faculté  
de Médecine et de Pharmacie de Dakar
- PELISSIER Yves : Maître de Conférences  
Faculté de Pharmacie de Montpellier I
- TOURE Pierre : Professeur de Pharmacie Galénique  
Faculté de Pharmacie de Caen

**PROFESSEURS**

- MM SANGARE Ahmadou : Hématologie (Médecine)  
SAMBO Mambo : Immunologie ( Médecine)

---

*Thèse - Diplôme d'état de Docteur en Pharmacie ; BONJ F. Nicaise*

*Thème : Mise au point d'une méthode d'analyse de la vitamine B<sub>2</sub> ou Riboflavine par Chromatographie Liquide Haute Performance (C.L.H.P.).  
Application au dosage dans les farines à base de céréales.*

**MAITRE DE CONFERENCES**

M	EDOH Vincent	: Bactériologie -Virologie (Médecine)
M <sup>me</sup>	FANTODJI Agathe	: Biologie - Animale (Sciences)
MM	KOUAKOU N'Zué Marcel	: Pathologie Médicale (Médecine )
	OYETOLA Samuël	: Chimie Minérale (Sciences)
	SANOGO Daouda	: Hématologie

**MAITRES ASSISTANTS**

MM

	OCHOU Abé Delphin	: Physiques ( Sciences)
	SAKO Aboubakar	:Physiques ( Sciences)
	TOURE Seiko Amadou	: Chimie Organique ( Sciences)
	GUISSO Atchélé	: Statistiques ( Sciences)

**ASSISTANTS ET ASSISTANTS CHEFS  
DE CLINIQUES**

M. FOFANA Siaka	: Informatique (Sciences)
-----------------	---------------------------



*Il y a un moment pour tout,  
et un temps pour chaque chose sous le ciel.  
Eclésiaste 3.1*

*Je dédie cette thèse...*



---

*Thèse - Diplôme d'état de Docteur en Pharmacie ; BONY F. Nicaise*  
*Thème : Mise au point d'une méthode d'analyse de la vitamine B<sub>2</sub> ou Riboflavine par Chromatographie Liquide Haute Performance (C.L.H.P.).*  
*Application au dosage dans les farines à base de céréales.*



### *A Mon Père BOMY Kotchi*

*Accepte ce travail en témoignage de ma reconnaissance et de mon amour filial.*

*Ce travail est pour moi le moyen de te remercier des conseils, des encouragements, que tu m'as toujours donnés et des sacrifices consentis pour moi.*

### *A Ma Mère MESSE Monique*

*Que ce travail soit pour toi une source de fierté et une récompense pour tous tes sacrifices.*

*Que ce travail soit pour moi un remerciement pour ton amour, ta tendresse et ta protection qui ne m'ont jamais fait défaut.*

### *A Mes Frères et Sœurs*

*Marcèle, Yves, Flavie et son fils, Mélaine, Elisée, Kevin, Patrick, Leonce et Fabrice.*

*Que ce travail soit pour vous un exemple et aussi un défi que je vous lance.*

### *A Mes Oncles et Tantes*

*Pour tout ce que vous avez fait pour moi.*



## *A Mes Cousins et Cousines*

*Je vous exhorte au travail.*

## *A Mes Amis (es)*

*Amin N'cho Christophe*

*Amon Yolande*

*Coulybali Aichata*

*Coulybali Mamadou*

*Dequie-segui Sylvia*

*Djedou Augustin*

*Houssou Christine*

*Kangha Laure*

*N'Douba Josephine*

*N'Dri Kouadio*

*Ochou Justine*

*Poby Giséle*

*Sakandé Jean*

*Sangaré Mahawa*

*Tam Aka-Marie*

*Traoré Aïssata*

*Yapi Faustin*

*Ceux et Celles que je n'ai pu citer.*

*Que notre amitié ne puisse jamais se ternir.*



*A la XII (14) promotion Daniel Kablan DUNCAN de la Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques*

*Bonne chance à tous.*

*A L'association des internes des hôpitaux d'Abidjan (A.I.H.A. )*

# REMERCIEMENTS

---

*Thèse - Diplôme d'état de Docteur en Pharmacie ; BONY F. Nicaise*

*Thème : Mise au point d'une méthode d'analyse de la vitamine B<sub>2</sub> ou Riboflavine par Chromatographie Liquide Haute Performance (C.L.H.P.).  
Application au dosage dans les farines à base de céréales.*

*Docteur AKE Michèle*

*Vos conseils, votre disponibilité ont été très précieux pour la réalisation de ce travail.*

*Docteur HAHOVOI ATTOUNGBRE M. L.*

*Pour votre aide et soutien.*

*Clémentine, Vincent, et tout le personnel du SYFED*

*Monsieur Kotchi Kanga J. C.*

*Monsieur Amon Georges*

*Au Personnel du département de Chimie Analytique, Bromatologie, toxicologie de l'U.F.R. des sciences Pharmaceutiques et biologiques*

*Au personnel de l'U.F.R. des sciences Pharmaceutiques et biologiques*

*Au personnel du laboratoire de l'Institut de Cardiologie d'Abidjan (I.C.A.)*

A NOS MAÎTRES IET JUGES

---

*Thèse - Diplôme d'état de Docteur en Pharmacie ; BONY F. Nicaise*

*Thème : Mise au point d'une méthode d'analyse de la vitamine B<sub>2</sub> ou Riboflavine par Chromatographie Liquide Haute Performance (C.L.H.P.).  
Application au dosage dans les farines à base de céréales.*

*A notre maître et président du jury  
Monsieur le Professeur YAPO Abbé Etienne*

- Professeur titulaire de Biochimie et Chef du département de Biochimie de l' U.F.R. des sciences Pharmaceutiques et biologiques ;
- Biologiste des hôpitaux, Chef des services de Biochimie et des urgences biologiques du Centre Hospitalier Universitaire de Cocody et de l'Institut Pasteur de Cocody ;
- Doyen de l' U.F.R. des sciences Pharmaceutiques et biologiques d'Abidjan ;
- Officier des Palmes Académiques ;
- Chevalier de l'Ordre National de Madagascar ;
- Officier dans l'Ordre de la Santé publique ;
- Officier de l'Ordre national du Bourkina Faso ;
- Commandeur dans l'Ordre de la Santé Publique de Côte d'Ivoire ;
- Directeur du C.E.S. de Biochimie Clinique de l'université d'Abidjan Cocody et du DEA sur la valorisation des médicaments traditionnels africains ;
- Président du Comité Technique Spécialisé ( C.T.S. ) de Médecine, Pharmacie, Odonto-Stomatologie et Médecine Vétérinaire du CAMES ( depuis 1990 ) ;
- Conseiller économique et social de la République de Côte d'Ivoire ( 1992 ) ;
- Membre de plusieurs associations et sociétés savantes nationales et internationales,
- Prix d'excellence Henri Konan BEDIÉ du meilleur doyen de l'Université National de Côte d'Ivoire, Edition 1994,

*Vous nous faites l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse, malgré vos multiples occupations.*

*Nous vous en sommes infiniment reconnaissant.*

*Que ce travail soit le gage de notre profond respect et admiration pour vos qualités pédagogiques indéniables.*

*A notre Maître et Directeur de thèse  
Monsieur le professeur agrégé MALAN Kla Anglade*

- Maître de conférence agrégé de Chimie Analytique de l'U.F.R. des sciences Pharmaceutiques et biologiques d'Abidjan ;*
- Directeur de la pharmacie et du médicament ;*
- Chef du laboratoire de nutrition de l'Institut National de Santé publique d'Abidjan ;*
- Directeur du D.E.S.S. de contrôle de qualité des médicaments et des produits agro-alimentaires,*
- Sous Directeur de l'U.F.R. des sciences Pharmaceutiques et biologiques d'Abidjan.*

*Nous tenons à vous remercier pour l'honneur que vous nous avez fait en nous confiant ce travail.*

*Votre disponibilité, votre cordialité et vos commentaires nous ont été d'un précieux concours.*

*Nous espérons vous avoir donné satisfaction.*

*Soyez assuré de notre respectueuse et profonde admiration.*

*A notre maître et juge*  
*Monsieur le professeur agrégé KOUADIO Kouakou Luc*

*- Professeur agrégé d'hydrologie et de santé publique à l' 'U.F.R. des sciences Pharmaceutiques et biologiques ;*

*- Chef de service du laboratoire d'analyse médicale et de contrôle des eaux de l'Institut National d'Hygiène publique*

*- Responsable du D.E.U. d'homoéopathie à l' 'U.F.R. des sciences Pharmaceutiques et biologiques ;*

*La spontanéité avec laquelle vous avez accepté de siéger au sein de ce jury, nous a profondément marqué.*

*Acceptez maître notre profonde gratitude.*

*A notre maître et juge  
Monsieur le Docteur **TEBI** Ambroise*

- *Docteur en Médecine*
- *Diplômé de Santé Publique*
- *Docteur ès sciences, Nutrition et Alimentation de la faculté de sciences de Nancy;*
- *Diplômé de nutrition et de diététique thérapeutique de la faculté de médecine de Nancy;*
- *Médecin chef du service de nutrition et de diabétologie de l'Institut National de Santé publique d'Abidjan,*

*Cher maître malgré vos nombreuses charges, vous n'avez pas hésité à siéger au sein de ce jury ;*

*Acceptez notre sincère reconnaissance pour la précieuse aide que vous nous apportez.*

*A notre maître et juge  
Madame le Docteur KOUAME AKE Michèle*

- Pharmacien , titulaire du DEA de chimie Analytique ;*
- Assistante de chimie analytique à l 'U.F.R. des sciences Pharmaceutiques et biologiques ;*
- Chef de la pharmacie et du laboratoire de nutrition de l'Institut National de Santé Publique d'Abidjan,*

*Cher maître vos commentaires et votre disponibilité ont été déterminants pour la réalisation de ce travail qui est le vôtre.*

*Je vous suis particulièrement reconnaissant.*

# SOMMAIRE

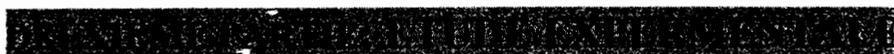
---

*Thèse - Diplôme d'état de Docteur en Pharmacie ; BONJ F. Nicaise*

*Thème : Mise au point d'une méthode d'analyse de la vitamine B<sub>2</sub> ou Riboflavine par Chromatographie Liquide Haute Performance (C.L.H.P.).  
Application au dosage dans les farines à base de céréales.*

<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>I RAPPELS SUR LA VITAMINE B<sub>2</sub></b> .....	3
<i><b>I-1 Généralités sur les vitamines</b></i> .....	3
I-1-1 Définition de la vitamine.....	3
I-1-2 Classification des vitamines.....	4
I-1-3 Vitamines du groupe B.....	4
<i><b>I-2 Vitamine B<sub>2</sub></b></i> .....	8
I-2-1 Historique.....	8
I-2-2 Structure chimique.....	8
I-2-3 Propriétés physico-chimiques.....	10
I-2-4 Sources naturelles et besoins nutritionnels.....	10
I-2-5 Métabolisme.....	13
I-2-6 Rôle physiologique.....	14
I-2-7 Pathologies liées à la vitamine B <sub>2</sub> .....	17
I-2-8 Explorations fonctionnelles du statut vitaminique.....	18
I-2-9 Aspects thérapeutiques.....	19

<b>II METHODES D'ANALYSE DE LA VITAMINE B<sub>2</sub></b> .....	22
<i>II-1 Méthodes d'extraction de la vitamine B<sub>2</sub> des aliments</i> .....	22
<i>II-2 Méthodes de dosage de la vitamine B<sub>2</sub> dans les aliments</i> .....	23
II-2-1 Méthodes spectrophotométriques dans l'ultraviolet – visible.....	24
II-2-2 Méthodes fluorimétriques.....	24
II-2-3 Méthodes microbiologiques.....	24
II-1-4 Chromatographie Liquide Haute Performance.....	25



<b>I MATERIEL ET METHODE</b> .....	35
<i>I-1 Matériel</i> .....	35
I-1-1 Echantillonnage.....	35
I-1-2 Verrerie et accessoires.....	36
I-1-3 Réactifs.....	37
I-1-4 Préparation des solutions.....	37
I-1-5 Appareillage.....	38

<b>I-2 Méthode</b> .....	40
I-2-1 Mise au point de la méthode d'analyse.....	40
I-2-2 Validation de la méthode d'analyse.....	56
<b>II RESULTATS ET DISCUSSION</b> .....	62
<b>II-1 Résultats</b> .....	62
II-1-1 Validation de la méthode d'analyse.....	62
II-1-2 Applications au dosage de la vitamine B <sub>2</sub> dans les farines à base de céréales.....	71
<b>II-2 Discussion</b> .....	72
II-2-1 Validation de la méthode d'analyse.....	75
II-2-2 Applications au dosage de la vitamine B <sub>2</sub> dans les farines à base de céréales.....	74
<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	76
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	78

# Introduction

*Thèse - Diplôme d'état de Docteur en Pharmacie ; BONY F. Nicole*

*Thème : Mise au point d'une méthode d'analyse de la vitamine B<sub>2</sub> ou Riboflavine par Chromatographie Liquide Haute Performance (C.L.H.P.).  
Application au dosage dans les farines à base de céréales.*

Le développement, la croissance et l'entretien de l'organisme humain nécessitent une alimentation saine et riche en éléments nutritifs tels que les lipides, les glucides, les protides, les oligo-éléments et les vitamines.

Ces éléments nutritifs présentent une très grande importance dans l'alimentation du nourrisson et de l'enfant qui sont des stades de croissance rapide de l'homme.

Cette alimentation, surtout au cours du sevrage des nourrissons est constituée le plus souvent par des céréales qui font partie des principaux aliments de base de la population ivoirienne.

La vitamine B<sub>2</sub> comme toutes les vitamines est un nutriment que l'organisme est incapable d'élaborer lui – même, et qui à des doses infinitésimales participent pour la plupart aux réactions de synthèse et de dégradation de différents substrats indispensables au développement, à l'entretien et au fonctionnement de l'organisme.

Une bonne maîtrise de l'apport nutritionnel des vitamines et en particulier de la vitamine B<sub>2</sub>, nécessite à l'origine une connaissance de leur teneur dans les principaux aliments ; d'où la nécessité de mettre au point des méthodes d'analyse précises permettant de les identifier et de les doser.

Notre étude a donc pour objectif :

- De mettre au point une méthode d'analyse performante de la vitamine B<sub>2</sub>, adaptée au contrôle de routine ;
  
- D'appliquer cette méthode au dosage de la vitamine B<sub>2</sub> dans les farines à base de céréales destinées à l'alimentation des nourrissons.

Le travail qui sera donc réalisé s'articulera autour de deux parties :

- ❖ Une première partie sur l'étude bibliographique de la vitamine B<sub>2</sub>, et de ses méthodes d'analyse dans les aliments,
  
- ❖ Une deuxième partie sur notre étude expérimentale, traitant de la méthode d'analyse de la vitamine B<sub>2</sub> (sa mise au point, sa validation, et son application au dosage dans les farines à base de céréales ), des résultats et de la discussion.

**Première Partie :**

# *Etude Bibliographique*

*Thèse - Diplôme d'état de Docteur en Pharmacie ; BONY F. Nicaise*

*Thème : Mise au point d'une méthode d'analyse de la vitamine B<sub>2</sub> ou Riboflavine par Chromatographie Liquide Haute Performance (C.L.H.P.).  
Application au dosage dans les farines à base de céréales.*

## **I-1. GENERALITES SUR LES VITAMINES**

### **I-1-1. DEFINITION DE LA VITAMINE**

Le nom de *vitamine* a été donné par le Polonais CASIMIR FUNK en 1911 à une substance cristalline azotée hydrosoluble qu'il isola en 1910 de la cuticule de riz et qui avait la propriété de prévenir et de guérir rapidement le "*béribéri*" expérimental (21, 26).

Le nom de *vitamine* fut étendu après à l'ensemble des substances nutritives indispensables, dont l'organisme ne peut faire la synthèse et qu'il doit donc recevoir par l'alimentation (26).

RANDOIN et SIMONET ont défini les *vitamines* comme des principes que l'organisme animal est incapable d'élaborer lui-même et qui à des doses infinitésimales (de l'ordre du millième voire du dix millionième du poids de la ration quotidienne) sont indispensables au développement, à l'entretien, au fonctionnement des organes et dont l'absence dans l'alimentation détermine des troubles et des lésions caractéristiques (maladie par carence) (22).

### **I-1-2. CLASSIFICATION DES VITAMINES**

Les vitamines sont classiquement réparties en deux groupes selon leur solubilité (21, 26) :

❖ *les vitamines liposolubles :*

- vitamine A ou vitamine antixérophtalmique
- vitamine D ou vitamine antirachitique
- vitamine E ou vitamine de la fertilité
- vitamine K ou vitamine antihémorragique.

❖ *les vitamines hydrosolubles :*

- vitamine C ou vitamine antiscorbutique
- vitamines du groupe B

### **I-1-3. VITAMINES DU GROUPE B**

Le groupe B considéré à l'origine comme étant constitué d'une seule vitamine a été peu à peu divisé à partir des années 1920 en facteurs de plus en plus nombreux..

Les deux premiers facteurs furent les facteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub>, mais on a constaté que ce dernier constituait aussi un groupe de vitamines dès qu'on parvient à isoler la riboflavine (vitamine B<sub>2</sub>) (21).

Ainsi près de 15 facteurs faisant partie du groupe B ont été définis mais certains d'entre eux (B<sub>4</sub> ou adénine, B<sub>7</sub> ou choline, B<sub>10</sub> ou acide para-aminobenzoïque) ne font plus partie du fait que leur caractère vitaminique n'a pas été confirmé chez l'homme.

Cependant ceux dont le rôle avait été pressenti (B<sub>11</sub> ou carnitine, B<sub>13</sub> ou acide orotique, B<sub>14</sub> ou xanthoptérine, B<sub>15</sub> ou acide pangamique) sont en cours d'étude (21).

Des progrès continuent d'être réalisés dans l'évaluation des signes cliniques des carences isolées spécifiques à chaque vitamine, mais il existe toutefois une similitude dans les manifestations cliniques des carences des différentes vitamines du groupe B (21).

Dans la nature, les vitamines du groupe B sont retrouvées dans les aliments d'origine végétale (la cuticule des céréales, la levure de bière, les légumineuses et les légumes) et dans les aliments d'origine animale (lait, viande, foie, cervelle, jaune d'œuf) (21).

Les vitamines du groupe B représentent pour la plupart des coenzymes et des catalyseurs de nombreux systèmes enzymatiques.

Elles participent à de multiples réactions enzymatiques de dégradation ou de synthèse ( Figure 1 ) par l'intermédiaire desquelles les hydrates de carbone, les lipides, les protides et tous les éléments nutritifs absorbés provenant de l'alimentation vont être transformés pour fournir l'énergie indispensable au travail cellulaire, et constituer éventuellement des réserves énergétiques pour l'organisme (21).

Le groupe vitaminique B est constitué de la :

- vitamine B<sub>1</sub> ou thiamine ou aneurine: vitamine antibériberique ou antinévritique
- vitamine B<sub>2</sub> ou riboflavine
- vitamine B<sub>3</sub> (vitamine PP): vitamine anti-pellagreuse
- vitamine B<sub>5</sub> ou acide pantothénique
- vitamine B<sub>6</sub> ou pryridoxine
- vitamine B<sub>8</sub> ou biotine ou vitamine anti-séborrhéïque
- vitamine B<sub>9</sub> ou acide folique
- vitamine B<sub>12</sub> ou cobalamine.

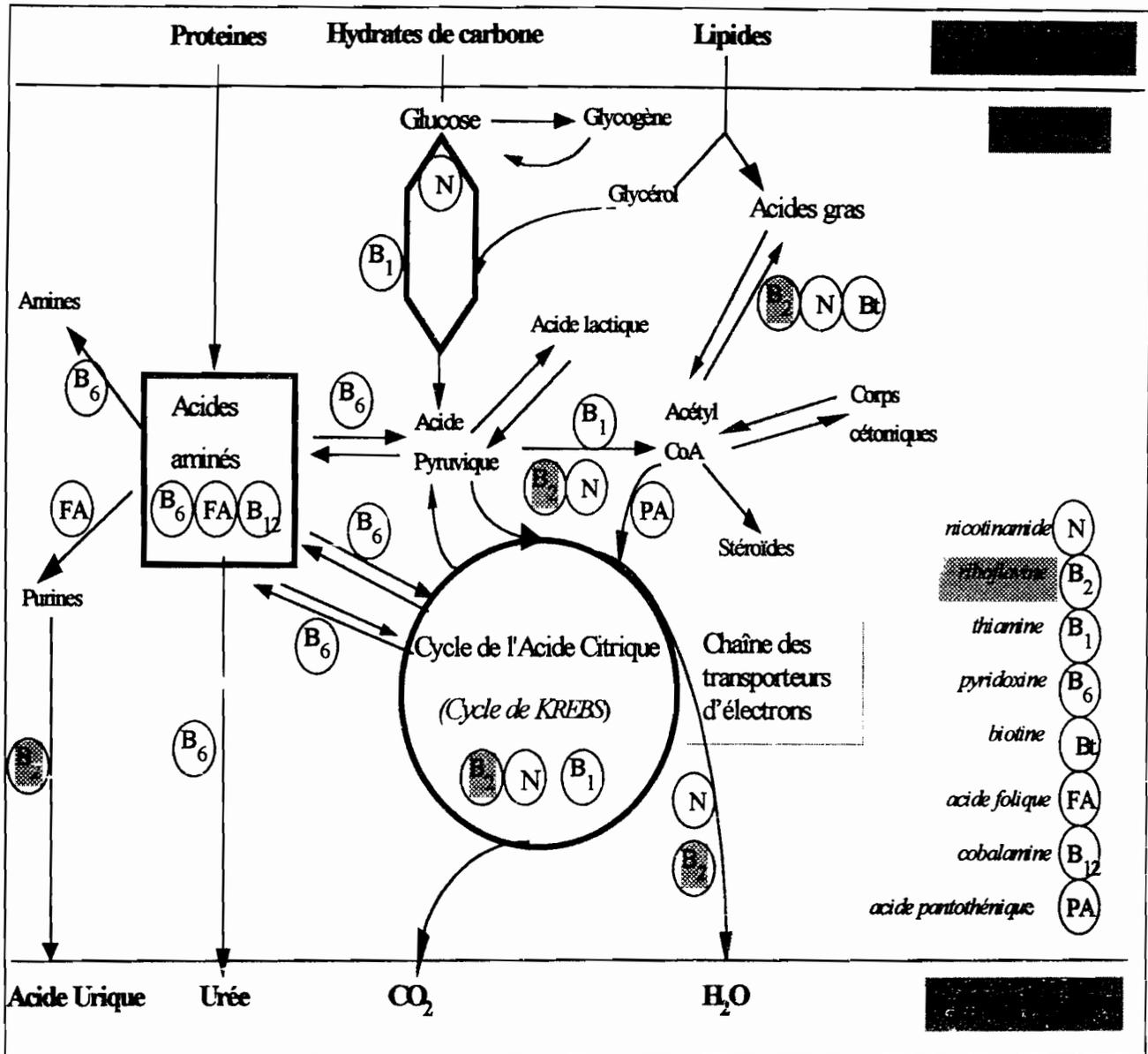


Figure 1 : Principales fonctions des vitamines du groupe B au niveau du métabolisme cellulaire ( 21 )

## **I-2. LA VITAMINE B<sub>2</sub>**

### **I-2-1. HISTORIQUE**

Au départ la vitamine B<sub>2</sub>, ou Riboflavine, ou Lactoflavine avait été confondue avec les autres vitamines du groupe B; elle en fut progressivement séparée grâce à de nombreux travaux entrepris dans le domaine de l'expérimentation animale (21).

Dès 1920, EMMET avait constaté qu'après destruction du facteur anti-névritique par la chaleur, il persistait dans les extraits de levure un facteur de croissance thermostable dont on montra un peu plus tard l'identité avec un pigment jaune isolé du lait par ZLYTH dès 1879; d'où le nom de lactoflavine (21, 26).

En 1938, SEBRELL et SYDENSTRICKER rapportèrent les premières observations d'ariboflavinose (21, 26).

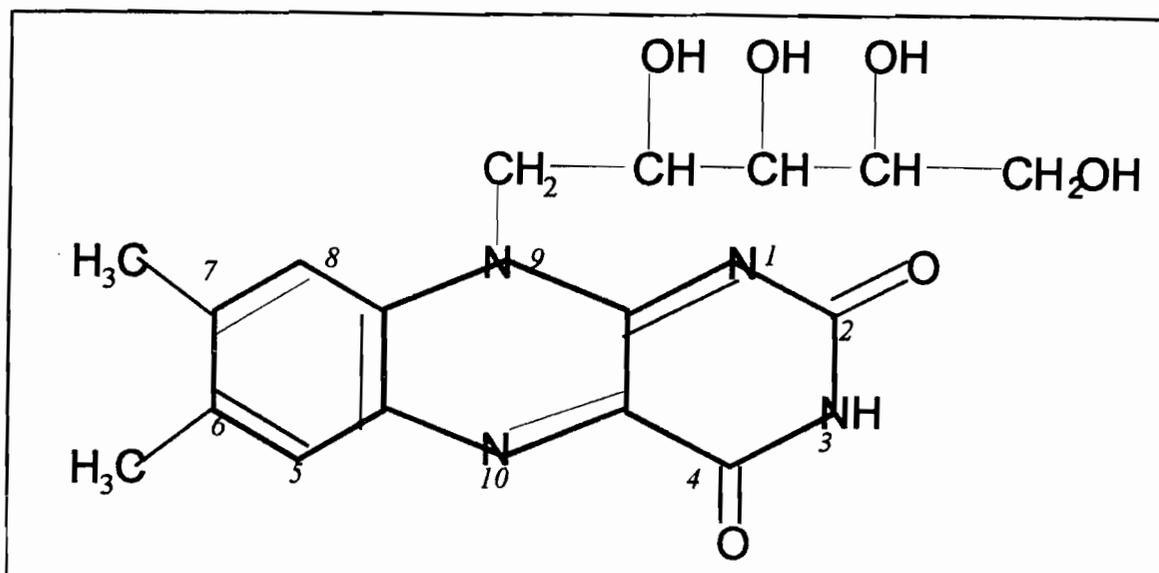
### **I-2-2. STRUCTURE CHIMIQUE**

La vitamine B<sub>2</sub> résulte de la combinaison d'une flavine, un corps hétéro-cyclique azoté à trois noyaux hexagonaux ( l'iso-alloxazine ), avec un sucre à 5 carbones ( le ribose ) d'où le nom de riboflavine (21, 26).

#### **❖ Formule brute**

Riboflavine:  $C_{17}H_{20}O_6N_4$

Poids moléculaire (PM): 376

❖ *Formule développée (figure 2)*

**Figure 2 :** Vitamine B<sub>2</sub> ou Riboflavine : *dimethyl -6 , 7 (d- ribithyl) -9 Isoalloxasine ( 26 )*

La vitamine B<sub>2</sub> est le précurseur de 2 coenzymes (Flavine Adénine Dinucléotide: FAD et Flavine Mononucléotide: FMN) qui jouent un rôle majeur dans de nombreuses réactions d'oxydo-réduction de l'organisme, impliquées dans le métabolisme intermédiaire (26).

Le FMN est formé à partir de la riboflavine par l'addition en position 5' d'un groupement phosphate provenant de l'Adénosine Triphosphate (ATP), et le FAD à partir du FMN par combinaison à une molécule d'AMP, elle même issue d'une deuxième molécule d'ATP.

### **I-2-3. PROPRIETES PHYSICO - CHIMIQUES**

La riboflavine est une substance cristalline qui se présente sous forme de fines aiguilles de couleur jaune orange. Elle est stable à la chaleur et ne s'oxyde pas à l'air atmosphérique (2; 21; 26).

La riboflavine est modérément soluble dans l'eau, à l'inverse de ses deux formes nucléotidiques FAD et FMN. Elle est moins soluble dans l'alcool et insoluble dans l'éther, le chloroforme et les solvants organiques (26).

La riboflavine est stable en solution acide, mais très instable en solution alcaline et surtout quand elle est exposée, même quelques minutes, à la lumière ultraviolette qui entraîne sa décomposition irréversible en son antagoniste la lumiflavine (2; 21; 26).

### **I-2-4. SOURCES NATURELLES ET BESIENS NUTRITIONNELS**

#### **I-2-3-1. Sources naturelles**

La vitamine B<sub>2</sub> est l'une des vitamines les plus répandues dans la nature et la plupart des plantes et des cellules animales en contiennent (26).

Dans le lait, au moins 80% de la riboflavine est sous forme libre, mais dans la plupart des autres sources alimentaires, elle est conjuguée aux protéines (26).

Sous sa forme estérifiée, on la trouve dans les enveloppes des graines et les germes des céréales, dans les légumes, et dans les muscles des animaux (surtout le rein et le foie), dans les poissons ainsi que dans le lait et les oeufs.

La riboflavine est relativement thermostable. La pasteurisation et les cuissons ménagères habituelles n'en diminuent que fort peu la teneur. Par contre elle est photo - sensible (2).

**Tableau I : Sources naturelles de Riboflavine (10, 11, 21)**

Lévre	boulangerie	2.5 - 3	
	sèche	3 - 5	
Céréales	Blé	grain	0.1 - 0.8
		farine	0.1 - 0.2
	Maïs	grain	0.06 - 0.17
		farine	0.02 - 0.11
	Mil	grain	0.08 - 0.17
		farine	0.08 - 0.2
Riz	grain	0.03 - 0.08	
Sorgho	grain	0.05 - 0.24	
	farine	0.06 - 0.22	
Légumes	Epinards	0.2 - 0.4	
	graines de Soja	0.1 - 0.4	
	Haricots	0.1 - 0.2	
	Piments	0.1	
	Tomates	0.04	
Arachide		0.16	
Fruits	Abricots	0.1 - 0.15	
	Ananas	0.02 - 0.05	
	Avocat	0.1 - 0.2	
	Banane douce	0.03 - 0.18	
	Citron	0.01 - 0.03	
	Mangue	0.04 - 0.06	
	Orange	0.02 - 0.07	
	Papaye	0.03 - 0.05	
	prunes, poires	0.05 - 0.1	
Foie	bœuf, mouton, porc	1.7 - 3.2	
Cœur	bœuf	0.9	
Muscle	bœuf, veau, mouton, porc	0.1 - 0.4	
Lait	de femme, en moyenne	0.04	
	de vache, en moyenne	0.157	
Œuf	blanc, jaune	0.3	
	en poudre	1.2	
Poisson	hareng, sardine, maquereau	0.3 - 0.6	
	laitance	0.4-0.7 et plus	
Fromage		0.3 - 0.7	

Thèse - Diplôme d'état de Docteur en Pharmacie ; BONY F. Nicaise

Thème : Mise au point d'une méthode d'analyse de la vitamine B<sub>2</sub> ou Riboflavine par Chromatographie Liquide Haute Performance (C.L.H.P.).  
Application au dosage dans les farines à base de céréales.

### I-2-3-2. Besoins nutritionnels

Les besoins quotidiens en riboflavine sont variables en fonction de l'âge, du poids corporel, de l'intensité du métabolisme, du niveau d'activité physique et de la composition de la ration alimentaire, en particulier de la richesse de celle-ci en protéines (2).

Elle est de 0,3 mg/1000 KCal; cependant afin d'avoir une marge de sécurité, on recommande une dose légèrement supérieure : 0,5 mg/ 1000 Kcal.

Les besoins sont augmentés lors de la grossesse et la lactation.

**Tableau II : Besoins en riboflavine (en mg/j) (21, 30 )**

Nourrissons (6 à 12 mois).....	0,6
Enfants de 1 à 3 ans .....	0,8
Enfants de 4 à 9 ans .....	1
Enfants de 10 à 12 ans .....	1,4
Adolescents, hommes adultes .....	1,8
Adolescents, femmes adultes .....	1,5
Grossesse, allaitement .....	1,8

Chez les nourrissons, les apports recommandés sont de 0.4 à 0.6mg/j

Dans de nombreuses espèces animales, la riboflavine est synthétisée par les bactéries intestinales mais chez l'homme, l'entérosynthèse est insuffisante pour assurer les besoins (21).

## **I-2-5. METABOLISME**

### **I-2-5-1. Absorption**

L'absorption s'effectue à la partie haute du tractus gastro-intestinal selon un mécanisme encore mal connu chez l'homme (26).

La phosphorylation de la riboflavine en FMN s'effectue dans la muqueuse intestinale mais on ignore si cette phosphorylation est réellement nécessaire à l'absorption elle-même. Les capacités intestinales d'absorption de la riboflavine et des dérivés ne sont pas illimitées (26).

### **I-3-5-2. Transport plasmatique**

Après absorption, une fraction importante de riboflavine et surtout de FMN est liée aux protéines plasmatiques et principalement à l'albumine pour être transportée jusqu'au foie par la veine porte (26).

### **I-2-5-3. Diffusion**

Dans le sang et les tissus, on trouve 70 à 90 % de la riboflavine sous forme de FAD, 5 à 30 % sous forme de FMN et seulement 0,5 à 2 % sous forme de riboflavine.

On trouve la riboflavine dans le plasma et aussi dans les cellules sanguines (érythrocytes, leucocytes), mais les concentrations sont plus élevées dans le foie, le syncytium cardiaque, les muscles striés et dans le cristallin (26).

#### I-3-5-4. Excrétion

Chez l'homme, l'excrétion de riboflavine se fait à la fois dans les urines et dans les selles, principalement sous forme libre.

L'apport protéique influence l'excrétion qui apparaît d'autant plus faible que l'apport protéique est plus élevé.

La riboflavine est sécrétée par la glande mammaire et se retrouve dans le lait maternel (26).

### **I-2-6 ROLE PHYSIOLOGIQUE**

Dans l'organisme, le FMN et le FAD issues de la vitamine B<sub>2</sub> sont les groupements prosthétiques de nombreuses enzymes.

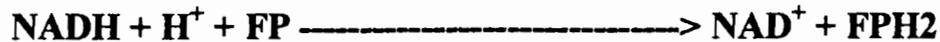
Sous le nom de flavoprotéine (FP), ces enzymes jouent un rôle important dans la synthèse et la dégradation des différents substrats et notamment dans les réactions enzymatiques qui produisent l'énergie nécessaire aux besoins cellulaires (21).

#### I-2-6-1. Rôle de la vitamine B<sub>2</sub> dans la chaîne respiratoire

La chaîne respiratoire ou chaîne des transporteurs d'hydrogène ou d'électrons aboutit à la formation d'une molécule d'eau avec production d'énergie stockée sous la forme de molécules d'ATP (21).

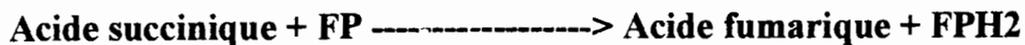
Les flavoprotéines forment le chaînon entre les dipyridine-nucléotides (NAD) et les cytochromes, le transfert à ces derniers se faisant sans doute par l'intermédiaire de l'ubiquinone.

La première réaction à laquelle participent les flavoprotéines est l'oxydation du NAD réduit, soit:



La flavoprotéine joue ainsi le rôle d'une NAD déshydrogénase dont le groupement prosthétique est la riboflavine sous forme de FMN ou sous forme de FAD.

La vitamine B<sub>2</sub> est également le groupement prosthétique d'une succinyl-déshydrogénase qui catalise l'oxydation de l'acide succinique en acide fumarique avec FP à FAD selon la formule:



C'est un des temps essentiels du cycle de Krebs (21).

## I-2-6-2. Autres propriétés enzymatiques de la vitamine B<sub>2</sub>

### I-2-6-2-1 Métabolisme des acides gras

L'oxydation des acides gras, mis en circulation dans l'organisme après hydrolyse des graisses, débute par le rattachement de leur radical acide à l'atome de soufre du co-enzyme A pour former ainsi un acyl-coenzyme A qui représente la forme "active" des acides gras (21).

Sous forme de FAD, les flavoprotéines contiennent le groupement prosthétique des acyl-coenzyme A déshydrogénases. L'action de ces enzymes est à l'origine d'une série de réactions enzymatiques qui se terminent par la bêta-oxydation des acides gras.

Sous forme de FMN, la vitamine B<sub>2</sub> est un groupement prosthétique d'une déhydro-acyl réductase, et elle participe par ce biais à la synthèse des acides gras à longue chaîne à partir de l'acide acétique.

Cette participation de la vitamine B<sub>2</sub> au métabolisme des acides gras explique l'augmentation des besoins en vitamine B<sub>2</sub> lorsque le régime alimentaire est riche en matières grasses.

#### I-2-6-2-2 Métabolisme des purines

Par l'intermédiaire de la xanthine-oxydase dont elle est également le groupement prosthétique, la FAD participe à l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique qui est chez l'homme le produit final du métabolisme des purines (21).

#### I-2-6-2-3 Métabolisme des acides aminés

Les acides aminés subissent une dégradation en deux temps dont le premier consiste à les transformer en corps oxydables participant aux différentes réactions du cycle tricarboxylique de Krebs (21).

La désamination oxydative permet de débarrasser les acides aminés de leur groupement amine. L'acide aminé est d'abord déshydrogéné par l'intermédiaire d'un accepteur d'hydrogène (une flavoprotéine) ayant la vitamine B<sub>2</sub> comme groupement prosthétique.

Ainsi transformé, l'acide aminé est hydrolysé en libérant l'aminoniac et un acide cétonique qui peut rejoindre le cycle tricarboxylique de Krebs.

## **I-2-7. PATHOLOGIES LIEES A LA VITAMINE B<sub>2</sub>**

### **I-2-7-1. Carence en vitamine B<sub>2</sub>**

#### **I-2-7-1-1 Causes de carence**

En dehors de circonstances particulières comme la famine, la ration alimentaire de l'adulte fournit habituellement la vitamine B<sub>2</sub> en quantités suffisantes pour satisfaire les besoins des individus présentant une activité normale (21).

Une carence peut toutefois se manifester chez certains sujets soumis à un régime déséquilibré comportant une forte teneur en hydrates de carbone, en lipides et une carence relative en protéines, et en cas d'alcoolisme chronique (21).

Une carence d'apport peut également être observée chez les nourrissons nourris au lait artificiel pauvre en vitamine B<sub>2</sub> (21, 31).

#### **I-2-7-1-2 Symptômes de la carence**

Chez l'homme, les symptômes de la carence en vitamine B<sub>2</sub> sont habituellement frustrés, non spécifiques et intriqués le plus souvent à des signes d'autres déficits vitaminiques ou carence en protéines (21, 26).

❖ Les *lésions cutané-muqueuses* sont classiques. Sur les lèvres, lisses, brillantes et sèches de couleur anormalement rouge se forme des lésions suintantes et croûteuses (chéilite) tandis que les commissures présentent des fissures (perlèche).

La stomatite se manifeste sous la forme d'une langue pourpre ou langue "rouge magenta" avec atrophie lisse des papilles. On observe parfois également une hyperpigmentation au niveau du scrotum ou de la vulve.

❖ Les *lésions cutanées* se présentent sous la forme d'une dermatite séborrhéique de la face prédominant aux ailes du nez ou éventuellement sur les lobes des oreilles ou la queue des sourcils.

❖ Les *symptômes oculaires* sont classiques. Ils se manifestent par une photophobie ou un larmolement mais surtout par une hypervascularisation de la conjonctive, qui envahit la cornée. On peut observer également des opacifications de la cornée.

#### I-2-7-2. Hypervitaminose B<sub>2</sub>

Il n'existe aucune manifestation d'hypervitaminose B<sub>2</sub> aiguë ou chronique (21).

#### I-2-8. EXPLORATIONS FONCTIONNELLES DU STATUT VITAMINIQUE

L'exploration fonctionnelle peut se faire par (26) :

❖ le dosage plasmatique direct de la vitamine B<sub>2</sub> libre par diverses méthodes fluorimétriques ou microbiologiques. Aussi le dosage érythrocytaire de la vitamine B<sub>2</sub> elle-même ou de son cofacteur FAD;

❖ les dosages urinaires de base ou dans différentes conditions de surcharge;

- ❖ la détermination de l'activité glutathion réductase érythrocytaire avec ou sans stimulation par le FAD;
- ❖ l'étude des acides organiques du plasma et des urines.

On peut réaliser un test thérapeutique basé sur la disparition des symptômes cliniques et biologiques sous administration orale de 5 à 10 mg de vitamine B<sub>2</sub>.

## **I-2-9. ASPECTS THERAPEUTIQUES**

### **I-2-9-1. Indications thérapeutiques**

La vitamine B<sub>2</sub> est indiquée lorsqu'il existe des signes de carence chez les malades soumis à un régime alimentaire déséquilibré, ayant été traités par antibiothérapie ou ayant subi une intervention chirurgicale type gastrectomie (21).

Cependant la vitamine B<sub>2</sub> présente encore d'autres indications intéressantes dont certains sont plus en rapport avec ses propriétés pharmacodynamiques qu'avec son action anticarentielle :

- ❖ maladie du nourrisson et de l'enfant : augmentation insuffisante de poids, retard de croissance ;
- ❖ maladies de la peau et des muqueuses : chéilite, perlèche, glossite, stomatite, séborrhée faciale, dermatite du scrotum, prurigo, acné rosacée;
- ❖ affections oculaires : héméralopie, photophobie, kératite;
- ❖ affection du tube digestif : stéatorhée, sprue, entérite chronique, maladie coeliaque;

- ❖ crampe musculaire de toute origine, migraine (21).

### I-2-9-2. Effets indésirables

Il n'existe pas d'effets indésirables notables: coloration jaune des urines , douleur au point d'injection.

Il n'existe pas de risques de surdosage (21, 26).

### I-2-9-3. Posologie

La posologie moyenne de la vitamine B<sub>2</sub> est de 20 à 40 mg/j. Elle peut être administrée per os ou par voie parentérale.

Lorsqu'il s'agit de trouble nutritionnel, il est préférable de l'associer aux autres vitamines du complexe B, vitamine B<sub>1</sub> et B<sub>6</sub> en particulier la Béflavine\* Roche (21, 26).

**Tableau III : Généralités sur la vitamine B<sub>2</sub> ou Riboflavine ( 30 )**

	Présence dans les aliments (Principales sources)	Stabilité	Unités biologiques courantes	Rôle	Apport nutritionnel conseillé (Noyaux quotidiens pour un sujet en bonne santé)	Carence (ou hypervitaminose)	Hypervitaminose et intoxication de l'espèce
<b>B<sub>2</sub></b> <b>RIBOFLAVINE</b> Dénommations de principes actifs (92) Isomérisés 1033-1034	<b>Produits animaux :</b> - Abats (Foie, reins, cœur) - (Eufs - Poissons - lait - Fromages  <b>Produits végétaux</b> - Céréales - Légumes	<b>Sensible :</b> - A la lumière - Aux rayons U.V - Aux solutions alcalines  <b>Stable en présence :</b> - de la chaleur - des oxydants	mg de riboflavine pure	- Essentielle au métabolisme des glucides, lipides, protides (coenzyme de multiples réactions)  - Action générale sur les tissus et les organes maintien en bon état des muqueuses)  - Favorise la croissance  - Rôle dans les phénomènes de la vision	- Nourrissons (6 à 12 mois) 0,6mg - Enfants de 1 à 3 ans : 0,8 mg - Enfants de 4 à 9 ans : 1,4 mg - Enfants de 10 à 12 ans : 1,4 mg - Adolescents, hommes, adultes : 1,8 mg - Adolescents, femmes, adultes 1,5 mg - Grossesse, allaitement : 1,8 mg	- Lésions de la peau et des muqueuses (lèvres, langue...)  - Symptômes oculaires	- Pas d'observation chez l'homme de manifestations d'hypervitaminose  - Très bonne tolérance

Les techniques générales de dosage des vitamines et en particulier de la vitamine B<sub>2</sub> ou riboflavine peuvent être utilisées aussi bien pour les milieux biologiques, les produits pharmaceutiques et les tissus animaux ou végétaux.

Les principes généraux d'analyse sont les mêmes, mais les méthodes d'extraction diffèrent en fonction du type de produits.

## **II-1. METHODES D'EXTRACTION DE LA VITAMINE B<sub>2</sub> DES ALIMENTS**

La littérature indique de nombreuses procédures d'extraction des vitamines du groupe B (surtout B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>) de divers aliments. Le choix de la procédure d'extraction tient compte de la stabilité des vitamines (17, 29, 33).

Parmi les différentes techniques d'extraction, celle utilisant une hydrolyse acide associée à une hydrolyse enzymatique avec des enzymes amylolytiques et phosphorolytiques et/ou enzymes protéolytiques est largement employée (17, 27, 29, 33).

L'hydrolyse acide est généralement utilisée pour dénaturer les protéines et l'amidon présent dans l'aliment, désactiver les systèmes enzymatiques et stabiliser les vitamines libérées des sels stables et des systèmes enzymatiques (15; 34).

L'hydrolyse enzymatique avec des enzymes, telles que la clarase, la takadiastase, la papaïne, la phosphatase, Pajanine, permet de détruire les molécules apparentées, dans le cas des vitamines B, la forme coenzyme et les esters (15, 16, 33, 34).

Pour améliorer l'efficacité de l'extraction de la vitamine B<sub>2</sub>, de nombreux auteurs associent à l'hydrolyse acide et enzymatique une purification de l'extrait par une déprotéinisation avec l'acide trichloroacétique (1, 8, 12, 16).

## **II-2. METHODES DE DOSAGE DE LA VITAMINE B<sub>2</sub> DANS LES ALIMENTS**

Plusieurs méthodes ont été proposées pour le dosage des vitamines du groupe B dans les aliments.

Il s'agit le plus souvent de méthodes spectrophotométriques, spectrofluorimétriques, chromatographiques et microbiologiques (17, 20, 33).

Mais on note aussi des méthodes polarographiques (20), électrophorétiques (18;20), gravimétriques et radiométriques (15).

Les méthodes spectrophotométriques et spectrofluorimétriques les plus souvent utilisées donnent à l'heure actuelle des résultats moins fiables et conviennent mieux pour le dosage dans les milieux biologiques (33).

Les méthodes microbiologiques et chromatographiques sont les plus utilisées et à l'heure actuelle les méthodes chromatographiques, en particulier la chromatographie liquide haute performance devient une méthode de choix pour le dosage des vitamines (33).

### **II-2-1. METHODES SPECTROPHOTOMETRIQUES DANS L'ULTRAVIOLET - VISIBLE**

La spectrophotométrie dans l'ultraviolet - visible s'applique au produit renfermant des groupements chromophores (C=C, C=O, N=O, N=C, noyau aromatique et noyau hétérocyclique).

La vitamine B<sub>2</sub> qui renferme dans sa formule développée (figure 2 ) des groupements chromophores possède en solution acide chlorhydrique des maxima d'absorption dans l'ultraviolet - visible à 266nm, 375nm et 440nm (23).

### **II-2-2. METHODES FLUORIMETRIQUES**

La méthode fluorimétrique est basée sur la transformation de la vitamine B<sub>2</sub> en un composé fluorescent en présence d'un mélange de pyridine, acide acétique, eau distillée v/v/v (10 : 1 : 40).

On mesure la fluorescence avec un filtre primaire à 400-420nm et un filtre secondaire à 550-570nm (33).

### **II-2-3 METHODES MICROBIOLOGIQUES**

Les méthodes microbiologiques de dosage des vitamines repose sur le fait que certains micro-organismes exigeants comme les *Lactobacillus*, sont incapables de synthétiser certaines substances "facteurs de croissance" comme la plus part des vitamines (23).

Le dosage microbiologique est basé sur la mesure du développement dans un milieu de culture donné, des micro-organismes exigeants au facteur de croissance vitaminique.

La mesure du développement microbien en relation étroite et directe avec la quantité de vitamine présente dans le milieu de culture est faite par acidimétrie (23).

#### **II-2-4. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (C.L.H.P.)**

Les techniques chromatographiques dont l'origine remonte à 1903 à la suite des travaux du Botaniste russe TSWETT sont universellement employées au laboratoire et dans l'industrie, aussi bien pour l'analyse proprement dite que pour la préparation et la purification de constituants.

Les progrès récents ne portant que sur une amélioration de la rapidité et la spécificité des techniques ont abouti à la mise au point de la chromatographie liquide haute performance (CLHP) (23).

##### **II-2-4-1. Principe**

La *chromatographie* est une méthode d'analyse immédiate qui permet la séparation des constituants d'un mélange par leur migration différentielle sous l'influence du déplacement d'un fluide (phase mobile) sur un milieu poreux doué de propriétés d'adsorption, de partage, d'affinité, de filtration ou d'échange (phase stationnaire).

La *Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)* est une technique de Chromatographie Liquide sur colonne utilisant des phases stationnaires de fine granulométrie (améliorant la résolution) et des pompes capables de distribuer la phase mobile sous pression élevée sur la colonne (augmentant les vitesses d'élution et réduisant les temps d'analyse) (24, 32).

#### II-2-4-2. Grandeurs fondamentales et données théoriques

Une bonne qualité de l'analyse chromatographique est obtenue si (23) :

- ❖ Les constituants à séparer ont des affinités différentes pour la phase stationnaire ;
- ❖ Les pics d'élution sont bien séparés, symétriques et gaussiens ;
- ❖ L'analyse est rapide.

##### II-2-4-2-1. Coefficient de distribution entre deux phases

Dans toute méthode chromatographique, les séparations sont fondées sur la différence de distribution des espèces entre deux phases non miscibles (phase stationnaire et phase mobile).

Pour un système chromatographique donné, on caractérise la distribution de chaque soluté par le coefficient de distribution (ou coefficient de partage) (K) définie par la relation (23, 24, 32) :

$$K = \frac{C_S}{C_M}$$

-  $C_S$  et  $C_M$  désignent respectivement les concentrations du soluté à l'équilibre dans les phases stationnaire et mobile.

II-2-4-2-2. Grandeur de rétention et d'affinité du soluté pour la phase stationnaire (23, 24, 32)

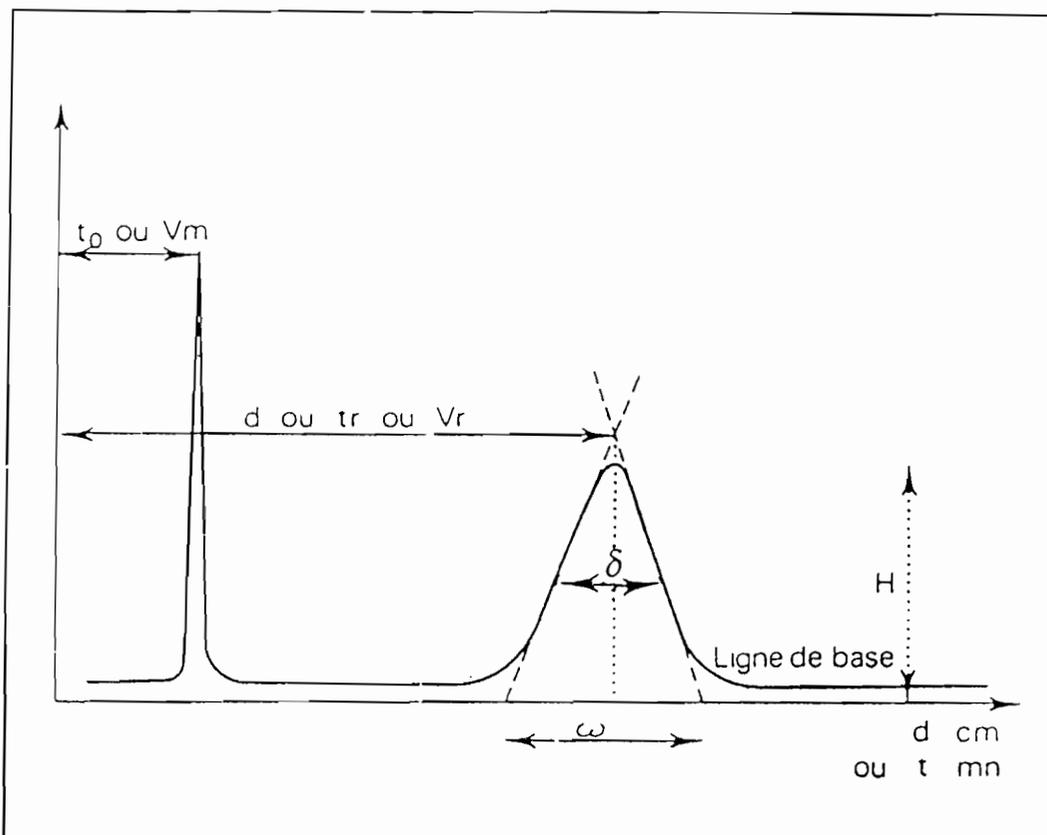


Figure 3: Chromatogramme illustrant les définitions ( 24 )

$d$  : distance entre le début de la chromatographie et le maximum du pic.

$\delta$  : largeur du pic à mi-hauteur

$H$  : hauteur du pic.

$T_r$  : Temps de rétention

$T_o$  : Temps d'éluion de la phase mobile contenu dans la colonne ( volume mort )

$V_m$  : Volume de la phase mobile contenu dans la colonne

$V_r$  : Volume de rétention

$\omega$  : largeur de pic à la base ;

- Le *temps de rétention* ( $t_R$ ) est le temps d'éluion au sommet du pic mesuré depuis l'injection de l'échantillon ;

- Le *volume de rétention* ( $v_R$ ) est le volume de phase mobile nécessaire pour éluer le soluté de la colonne.

- Le *temps* ( $t_0$ ) correspond au temps d'éluion du volume de la phase mobile ( $V_M$ ) contenu dans la colonne entre celle-ci et le détecteur (volume mort)

- Le *facteur de capacité* ( $K'$ ) caractérise la rétention d'une substance est défini par le rapport des quantités de soluté dans les phases stationnaire et mobile :

$$K' = \frac{C_S \cdot V_S}{C_M \cdot V_M} = K \frac{V_S}{V_M}$$

-  $C_S, C_M$  : concentration du soluté dans les phases stationnaire et mobile

-  $V_S, V_M$  : volume des phases stationnaire et mobile

-  $K$  : coefficient de partage.

Le facteur de capacité ( $K'$ ) peut être relié au temps de rétention ( $t_R$ ) par la relation :

$$t_R = t_0 (1 + K')$$

$$K' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Le temps de rétention et le volume de rétention sont des grandeurs caractéristiques d'un soluté pour un système chromatographique donné et servent comme moyen d'identification en analyse qualitative.

Aussi la durée d'une analyse peut être modifiée en intervenant sur les paramètres que sont la longueur de la colonne, le débit de la phase mobile et le facteur de capacité par le choix des différentes phases.

Une meilleure rétention des solutés est obtenue en chromatographie liquide pour le facteur de capacité ( $K'$ ) compris entre 2 et 5 (23, 24, 32).

#### II-2-4-2-3. Grandeurs de séparation

##### ❖ *Sélectivité d'une colonne (23, 24, 32)*

Le facteur de *sélectivité* ( $\alpha$ ) caractérise la distance séparant les sommets de deux pics successifs et il est défini par la relation:

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} = \frac{K'_2}{K'_1}$$

-  $t_{R1} = t_R$  du composé le moins retenu

-  $t_{R2} = t_R$  du composé le plus retenu

Pour avoir une séparation il faut  $\alpha > 1$ .

❖ *Efficacité d'une colonne (23, 24, 32*

L'efficacité d'une colonne dépend de l'élargissement des pics chromatographiques obtenus.

Par analogie aux phénomènes de distillation ou d'extraction, on exprime l'efficacité d'une colonne par son nombre de plateaux théoriques (N) calculé par la relation :

$$N = 16 (d/w)^2 = 5,54 (d/\delta)^2$$

Ayant calculé (N) et connaissant d'autre part la longueur (L) de la colonne, on déduit la hauteur équivalente à un plateau théorique (H.E.P.T):

$$\text{HEPT} = \frac{L}{N} = h$$

Une colonne est d'autant plus efficace que le nombre de plateaux est plus grand et que, par conséquent, la HEPT est plus faible.

#### II-2-4-2-4. Grandeurs de résolution

La *résolution* ( $R_S$ ) est le facteur qui indique le degré de séparation entre deux pics chromatographiques voisins (23, 24, 32).

Le degré de résolution ( $R_S$ ) dépend de deux grandeurs :

- la distance séparant les sommets des deux pics;
- la largeur de chacun des pics.

$$R_S = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_2 + w_1}$$

$R_S \geq 1$ , les pics sont séparés

$R_S < 1$  les pics se chevauchent

On démontre que:

$$R_S = \frac{1}{4} \left( \alpha - \frac{1}{\alpha} \right) \cdot \left( K'_2 / 1 + K'_2 \right) \cdot N_2^{1/2}$$

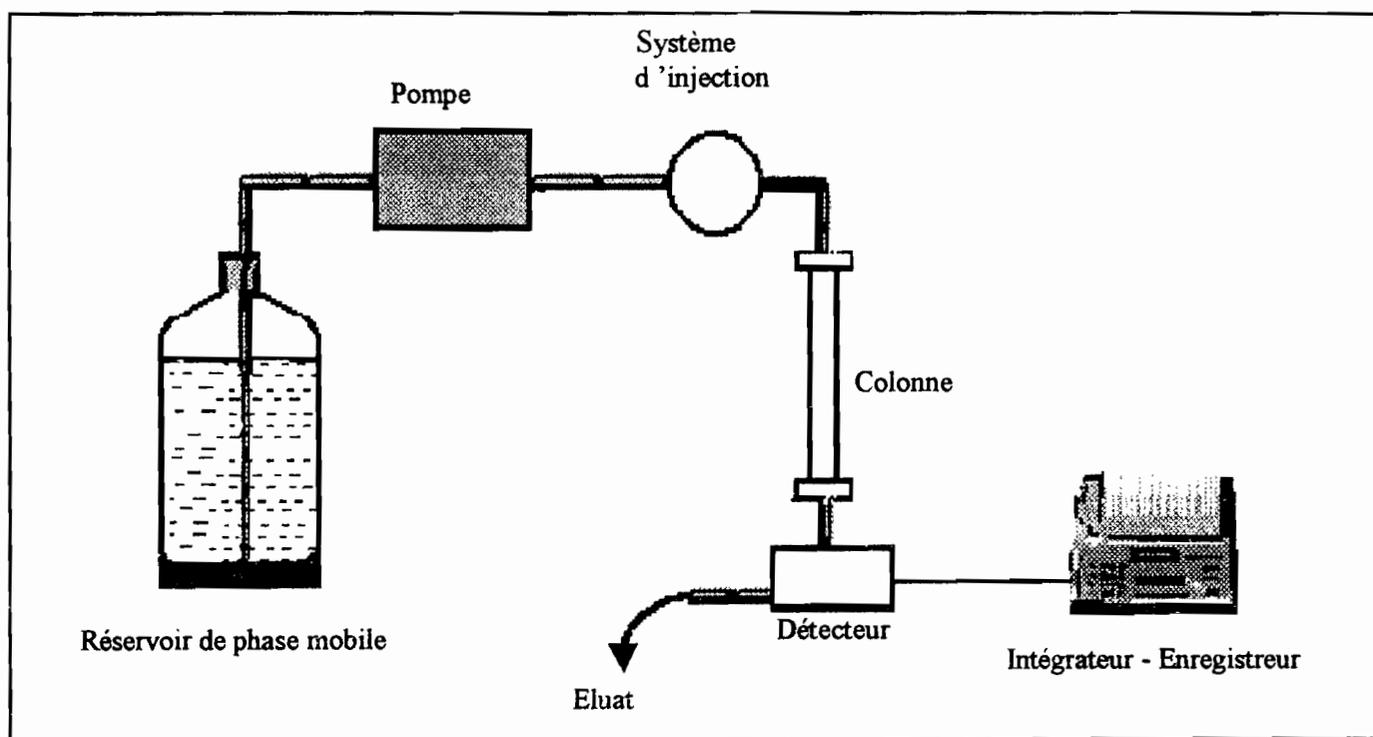
$N_2$ : composé le plus retenu

La résolution apparaît donc influencée par  $\alpha$  (sélectivité), par  $K'_1$  et  $K'_2$  (facteurs de capacité) et par  $N$  (nombre de plateaux théoriques).

### II-2-4-3. Appareillage

La figure 4 représente le schéma du principe d'un chromatographe liquide haute performance. Il comprend essentiellement (24) :

- un ou plusieurs réservoirs de phase mobile;
- un système de pompe;
- un système d'introduction des échantillons (système d'injection);
- un système de détection et d'enregistrement.



**Figure.4:** Schéma d'un chromatographe liquide haute performance (24)

La vitamine B<sub>2</sub> est séparée sur colonne type NH<sub>2</sub> et surtout de type hydrocarbonné (C<sub>3</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>) avec un mélange méthanol - eau ou acétonitrile-eau comme phase mobile.

La détection est réalisée soit par fluorimétrie, soit par spectrophotométrie dans l'ultraviolet - visible (17; 23, 27, 33).

La détection fluorimétrique présente plus d'avantage sur le plan de la sensibilité et de la spécificité par rapport à la détection spectrophotométrique (17, 43).

**Deuxième Partie :**

# Etude Expérimentale

*Thèse - Diplôme d'état de Docteur en Pharmacie ; BONY F. Nicaise*

*Thème : Mise au point d'une méthode d'analyse de la vitamine B<sub>2</sub> ou Riboflavine par Chromatographie Liquide Haute Performance (C.L.H.P.).  
Application au dosage dans les farines à base de céréales.*

L'étude expérimentale effectuée au département de chimie Analytique-Bromatologie de l'U.F.R. des sciences Pharmaceutiques et biologiques est réalisée en deux phases :

- La mise au point et la validation de la méthode de dosage de la Vitamine B<sub>2</sub> ;
- L'application au dosage dans les farines à base de céréales.

La méthode de dosage utilisée est la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP), méthode de choix de dosage des Vitamines connue pour sa grande spécificité, sensibilité et rapidité d'analyse.



## **I-1 MATERIEL**

### **I-1-1 ECHANTILLONNAGE**

Notre étude a été appliquée à deux catégories de farine à base de céréales destinées à l'alimentation des nourrissons :

❖ La première catégorie comprend trois (3) farines industrielles vendues en Officine de pharmacie et dont les teneurs en Vitamine B<sub>2</sub> sont indiquées par le fabricant sur le conditionnement :

- *A* - Farine de céréales lactée biscuitée pour nourrissons dès 4 mois dosée à 800µg de Vitamine B<sub>2</sub> pour 100 g de Farine.

- *B* - Farine 7 céréales pour nourrissons dès 4 mois dosée à 600µg de Vitamine B<sub>2</sub> pour 100 g de farine.

- *C* - Farine de maïs au SOJA pour nourrissons dès 4 mois dosée à 300µg de Vitamine B<sub>2</sub> pour 100 g de farine.

❖ La deuxième catégorie est constituée par la farine *D* ou farine "5 céréales" préparée par le service de Diététique Préventive de l'Institut National de Santé Publique (INSP) d'Abidjan et proposée dans le cadre de la réhabilitation nutritionnelle des nourrissons :

- *Composition* : Maïs blanc.....1 kg  
Maïs jaune.....1 kg  
Mil .....1 kg  
Riz local.....1 kg  
Arachide.....0.5 kg

- *Préparation*

Les céréales et l'arachide sont dorées isolément en les faisant griller à feu doux et en évitant de les brûler. Elles sont ensuite broyées jusqu'à l'obtention d'une farine.

Les différentes farines obtenues sont séchées, puis mélangées jusqu'à l'obtention d'une farine homogène.

La farine commerciale A a été choisie pour les différents essais de mise au point de la méthode d'analyse de la vitamine B<sub>2</sub>.

### **I-1-2 VERRERIE ET ACCESSOIRES**

- Eprouvette graduée ( 20 ml )
- Erlenmeyer en Pyrex (125 ml )
- Fioles jaugées (10 ml, 20 ml, 100 ml, 500 ml, 1000 ml)
- Papier aluminium
- Papier Filtre (WHATMAN n°40 Ø 125 ml )
- Pipettes graduées ( 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml)
- Tubes à hémolyse

### I-1-3 REACTIFS

Tous les réactifs utilisés sont de qualité analytique

- Acétate de sodium ( PROLABO)
- Acide acétique 99%-100% (PROLABO)
- Acide chlorhydrique 35% ( PROLABO)
- Acide trichloroacétique ( PROLABO)
- $\alpha$ -Amylase : Takadiastase (SIGMA A6211)
- Carbonate d'Amonium pur  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  (MERK)
- Chlorure de potassium KCL (RIEDEL - DE HAËN)
- Méthanol pour CLHP (PROLABO)
- Riboflavine (SIGMA R4500 )

### I-1-4 PREPARATION DES SOLUTIONS

- *Acétate de sodium 2N* : Dissoudre dans une fiole jaugée de 1000ml, 272g d'acétate de sodium par de l'eau distillée.
- *Acide chlorhydrique 0,1N* : Diluer dans une fiole jaugée de 1000ml, 8.83ml d'acide chlorhydrique 35% par de l'eau distillée.
- *Acide trichloroacétique 50% ( m/v )*: Dissoudre dans une fiole jaugée de 100ml, 50mg d'acide trichloroacétique par de l'eau distillée

- *$\alpha$ -Amylase 6% ( m/v )* : Préparation extemporanée de la quantité suffisante pour l'analyse à raison de 0,06mg pour 1 ml d'eau distillée.
  
- *Carbonate d'ammonium 1% ( m/v )* : Dissoudre dans une fiole jaugée de 1000ml, 10mg de carbonate d'ammonium par de l'eau distillée.
  
- *Chlorure de potassium 1% ( m/v )* : Dissoudre dans une fiole jaugée de 1000ml, 10mg de chlorure de potassium par de l'eau distillée.
  
- *Dihydrogénophosphate de potassium 1% ( m/v )* : Dissoudre dans une fiole jaugée de 1000ml, 10mg de dihydrogénophosphate de potassium par de l'eau distillée.
  
- *Solutions de référence*
  - *Solution mère de Riboflavine (100 $\mu$ g/ml )* : Dans une fiole jaugée de 100ml suspendre 10mg de Riboflavine dans 60ml d'acide chlorhydrique 0,1N ; chauffer sous agitation permanente au Bain-Marie 100°C jusqu'à dissolution totale ; Refroidir et compléter à 100ml par l'acide chlorhydrique 0,1N. Conserver dans un flacon teinté au réfrigérateur (+4°C).
  - *Solution standard de Riboflavine (1  $\mu$ g/ml )* : Diluer au 1/100<sup>ème</sup> la solution mère dans de l'acide chlorhydrique 0,1N

### **I-2-5 APPAREILLAGE**

- Bain Marie thermostaté (47  $\pm$  2°C ) ( EMMERT )
- Bain Marie thermostaté (95  $\pm$  5°C ) ( EMMERT )
- Balance ( Précisa 808 M SCS)
- Balance de Précision ( SARTORIUS HANDY H51-F1 )

- Chromatographe liquide haute performance :
  - *Réservoir de phase mobile* (vase clos en matière plastique de 2 litres )  
réservoir unique pour un régime isocratique
  - *Pompe* (PERKIN ELMER \* série 200LC pump)
  - *Système d'injection* : Système à boucle de 20  $\mu$ l. avec une Microseringue en verre (25  $\mu$ l )
  - *Précolonne* (HS-3 Silica )
  - *Colonne de phase inverse* Zorbax ODS ( OctoDodecylSylane ) 5 $\mu$ m 100A  
( 150 x 4.6 mm i. d. )
  - *Détecteur UV-Visible* ( Applied Biosystems 785 A )
  - *Intégrateur* ( HEWLETT PACKARD HP 3395).
  
- Dispositif de Filtration type BÜCHNER
  - *Support à filtre*
  - *Fiole à vide*
  
- Etuve ( EMMERT )
  
- Micropipettes (P200, P1000 ; GILSON )
  
- pHmètre électronique ( WPA CD7000)
  
- Spectrophotomètre UV-visible (SPECTRONIC GENESIS 5 SPECTROPHOTOMETER ).

## **I-2 METHODE**

Le travail que nous avons réalisé comporte deux principales étapes :

- ❖ La mise au point de la méthode d'analyse ;
- ❖ Et la validation des résultats de cette méthode d'analyse.

### **I-2-1 MISE AU POINT DE LA METHODE D'ANALYSE**

La mise au point de la méthode d'analyse comporte deux phases :

- ❖ L'extraction ;
- ❖ Le dosage chromatographique.

#### **I-2-1-1 Méthode d'extraction**

La mise au point de la méthode d'extraction a consisté au choix d'une procédure garantissant la stabilité de la vitamine B<sub>2</sub> extraite avec un bon pourcentage de rendement.

La procédure d'extraction proposée est basée sur celles utilisées par ANG C. Y. et Coll, en 1980 (1) et HAGG M, en 1994 (16) qui ont réalisé une extraction simultanée avec d'autres vitamines du groupe B, surtout la vitamine B<sub>1</sub>, en trois phases :

- Hydrolyse acide
- Hydrolyse enzymatique
- Purification.

L'hydrolyse acide a été réalisée à l'étuve plutôt qu'à l'autoclave et l'hydrolyse enzymatique avec une solution aqueuse d' $\alpha$ -amylase de type Takadiastase.

Dans un souci de travailler sur des volumes réduits et aussi d'économiser les réactifs, nous avons réduit dans la même proportion (1/5<sup>ème</sup>) les quantités de l'échantillon et des réactifs.

### I-2-1-2 Méthode de dosage chromatographique

La mise au point de la méthode de dosage chromatographique de la vitamine B<sub>2</sub> a été réalisée en deux phases :

- ❖ Le choix de la composition et du débit de la phase mobile pour obtenir une bonne rétention et séparation du pic chromatographique de la vitamine B<sub>2</sub> ;
- ❖ Le choix d'une longueur d'onde de détection par spectrophotométrie dans l'ultraviolet - visible.

#### I-2-1-2-1 Choix de la composition et du débit de la phase mobile

Le choix de la composition et du débit de la phase mobile a été réalisé en s'inspirant de celles utilisées par TOMA R. B. et Coll (38) et WIMALAZIRI P. et Coll (43).

Ils ont utilisé un mélange de méthanol - eau avec ou non de l'acide acétique et en y additionnant des acides sulfoniques (contres ions organiques pour chromatographie par paire d'ions).

Nous avons proposé une phase mobile plus simple en substituant l'addition des acides sulfoniques par des sels ( le chlorure de potassium ou le carbonate d'ammonium ).

Cette substitution a été proposée au vu des travaux de WILLS R. B. H. et Coll (41) qui ont étudié :

- La résolution des vitamines du groupe B sur deux types de phases stationnaires (hydrocarboné C<sub>18</sub> et NH<sub>2</sub>) ;
- La rétention et la séparation de ces vitamines par variation de la proportion du mélange méthanol - eau et en y additionnant ou non de l'acide acétique, des sels ou des contres ions organiques pour chromatographie paire d'ions .

Les différents essais ont été réalisés de la manière suivante :

- ❖ Apprécier l'importance des contres ions par leur suppression des phases mobiles ;
- ❖ Substituer les contres ions par les sels ;
- ❖ Evaluer la séparation du pic chromatographique de la vitamine B<sub>2</sub> aux faibles concentrations ;
- ❖ Ajuster par l'acide acétique le pH à 5.7 ( pH pour une meilleure séparation des vitamines du groupe B ) (41).

L'appréciation de la rétention de la vitamine B<sub>2</sub> a été réalisée par le calcul du facteur de capacité K' (grandeur caractérisant la rétention d'un soluté ) à partir du chromatogramme de la solution standard à 1µg/ml ; Les meilleures valeurs étant comprises entre 2 et 5.

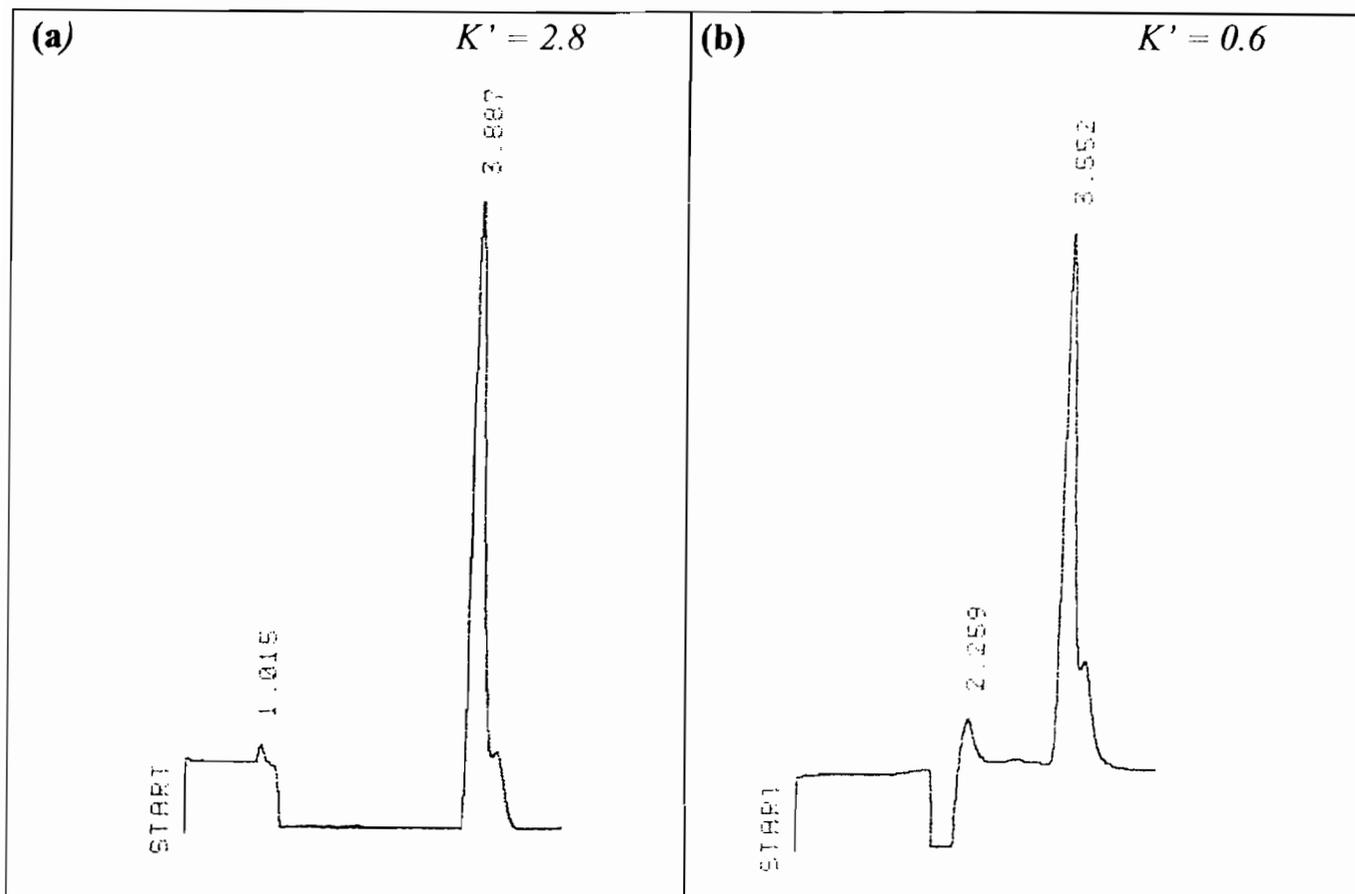
La séparation du pic chromatographique a été évaluée par l'analyse du chromatogramme d'un extrait de farine A additionné de 20µg de vitamine B<sub>2</sub> pour l'identification du pic chromatographique.

Pour les différents essais le débit de la phase mobile a été fixé à 1ml/mn et la longueur d'onde de détection dans l'ultraviolet à 254mn.

➤ *Essais des phases mobiles proposées par TOMA R. B. et Coll, et WIMALAZIRI P. et Coll avec Suppression des contres ions organiques*

L'observation des chromatogrammes figure 5 (a) et (b) (page 44 ) montre une mauvaise ligne de base en l'absence d'acide acétique.

Le facteur de capacité ( $K'$ ) égale à 0.6 avec l'addition d'acide acétique indique une faible rétention de la vitamine B<sub>2</sub>.



**Figure 5 (a) et (b) :**

**(a) :** Chromatogramme de la solution standard ( 1µg/ml ) correspondant à la phase mobile n°1 :

- Méthanol ( 40 % )
- H<sub>2</sub>O ( 60 % )

**(b) :** Chromatogramme de la solution standard ( 1µg/ml ) correspondant à la phase mobile n°2 :

- Méthanol ( 39 % )
- Acide acétique ( 1 % )
- H<sub>2</sub>O ( 60 % )

- *Essais de phases mobiles avec substitution de l'addition des contres ions par des sels*

Les deuxièmes essais ont été réalisés en remplaçant l'eau distillée par une solution aqueuse à 1% de sel ( chlorure de potassium ou carbonate de d'ammonium )

La proportion de méthanol a été réduite à 30% et 25% pour augmenter le temps de rétention de la vitamine B<sub>2</sub>, par l'augmentation de la polarité de la phase mobile.

L'analyse des chromatogrammes (figures 6, 7, 8, 9 ; pages 46 et 47 ) ainsi obtenus montre une augmentation du temps de rétention, plus élevée pour le carbonate de d'ammonium par rapport au chlorure de potassium.

Les facteurs de capacité indique de meilleure rétention avec la proportion de méthanol à 30%.

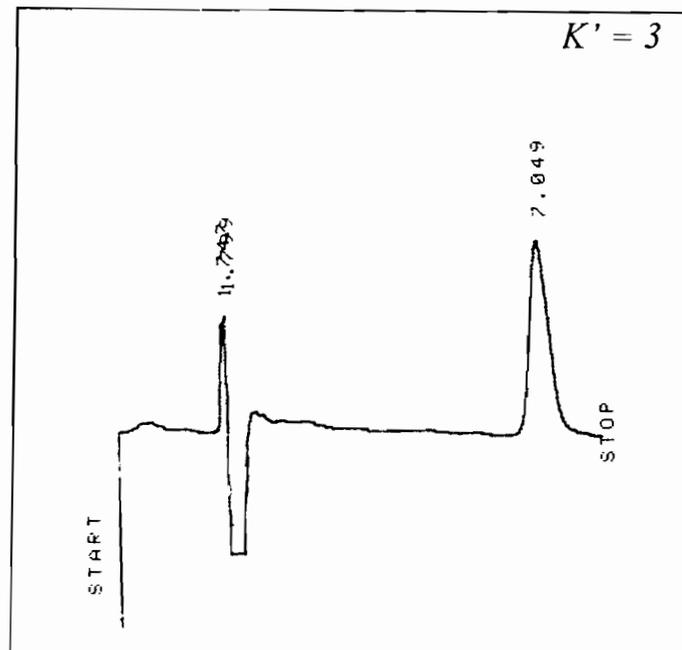


Figure 6 : Chromatogramme de la solution standard (  $1\mu\text{g/ml}$  ) correspondant à la phase mobile n°3:

- Méthanol ( 30 % )
- Acide acétique ( 1 % )
- KCL 1% ( 69 % )                      pH = 2.85

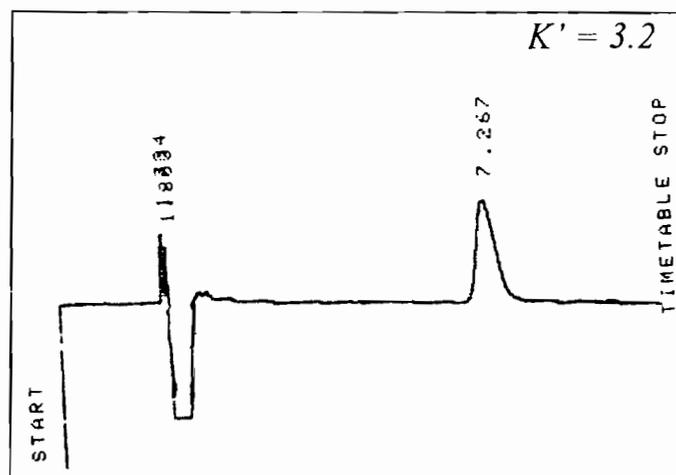
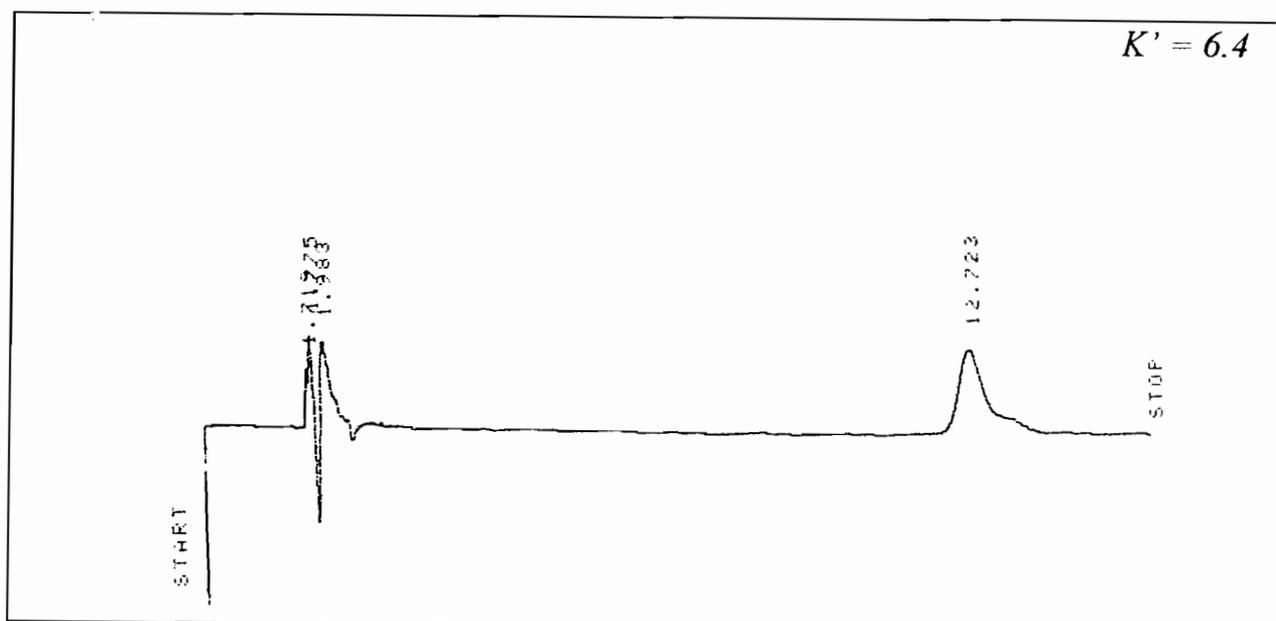


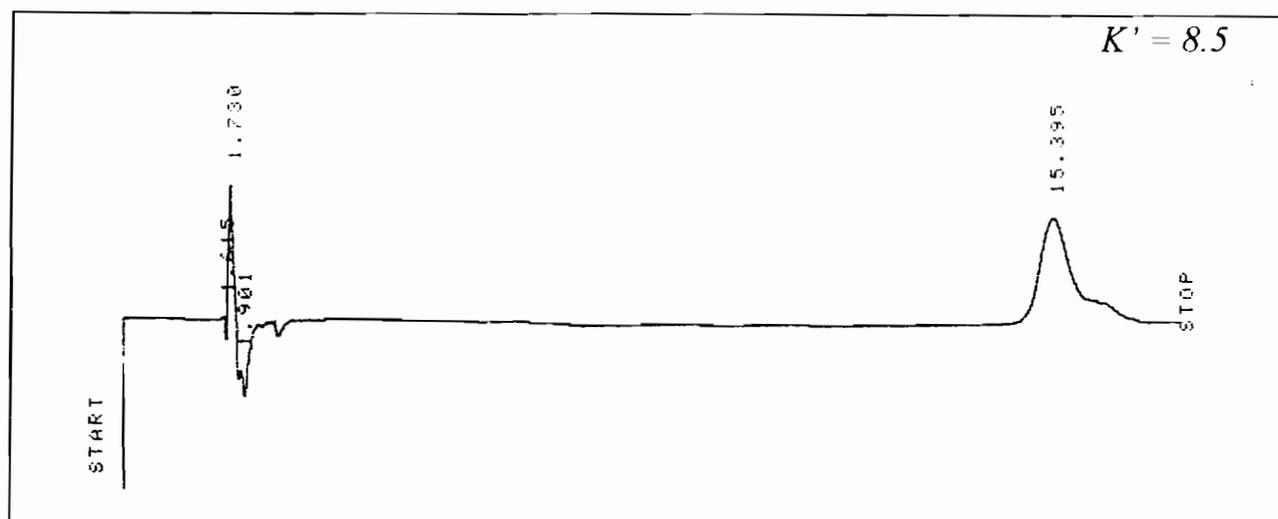
Figure 7 : Chromatogramme de la solution standard (  $1\mu\text{g/ml}$  ) correspondant à la phase mobile n°4:

- Méthanol. ( 30 % )
- Acide acétique ( 1 % )
- $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  1% ( 69 % )                      pH = 5.20



**Figure 8 :** Chromatogramme de la solution standard ( 1µg/ml ) correspondant à la phase mobile n°5:

- Méthanol ( 25 % )
- Acide acétique ( 1 % )
- KCL 1% ( 74 % )      pH = 2.9



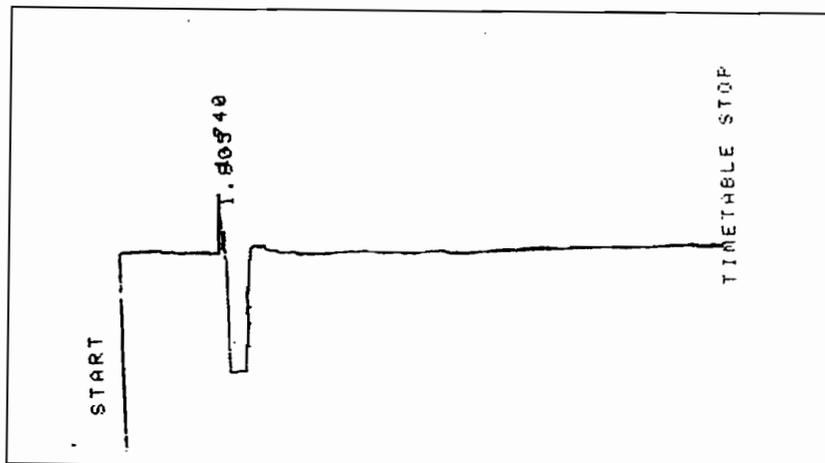
**Figure 9 :** Chromatogramme de la solution standard ( 1µg/ml ) correspondant à la phase mobile n°6:

- Méthanol ( 25% )
- Acide acétique ( 1% )
- (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1% ( 74% )      pH = 5.22

➤ *Séparation du pic chromatographique de la vitamine B<sub>2</sub> aux faibles concentrations*

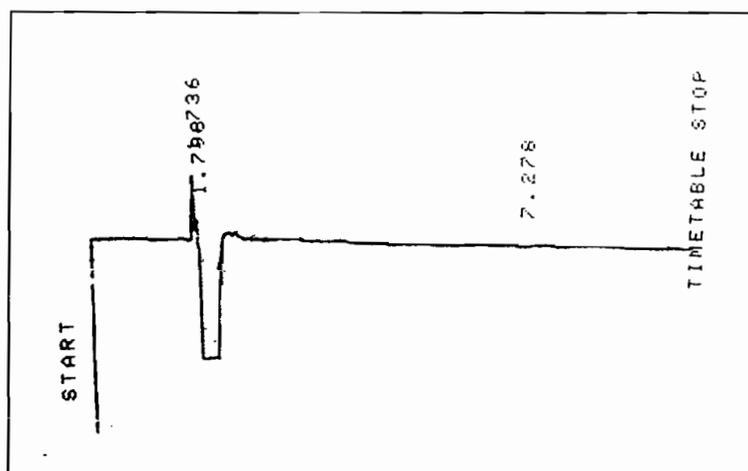
L'évaluation de la séparation du pic chromatographique de la vitamine B<sub>2</sub> aux faibles concentrations a été faite avec la solution standard à 0.02µg/ml.

L'analyse des chromatogrammes (figures 10 et 11 ; page 49 ) montre que le carbonate d'ammonium permet une séparation du pic chromatographique de la vitamine B<sub>2</sub> aux plus faibles concentrations par rapport au chlorure de potassium.



**Figure 10** : Chromatogramme de la solution standard (  $0.02\mu\text{g/ml}$  ) correspondant à la phase mobile n°3:

- Méthanol ( 30 % )
- Acide acétique ( 1 % )
- KCL 1% ( 69 % )      pH = 2.9



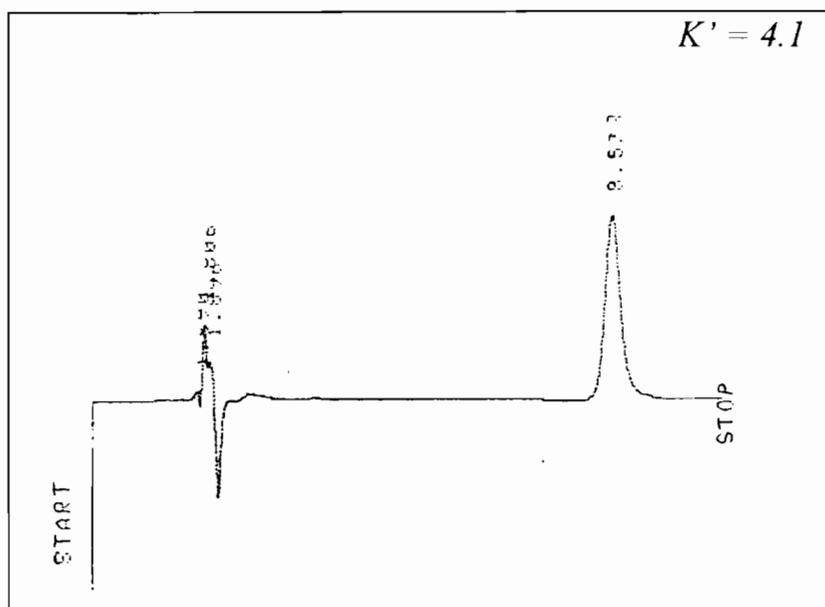
**Figure 11** : Chromatogramme de la solution standard (  $0.02\mu\text{g/ml}$  ) correspondant à la phase mobile n°4:

- Méthanol ( 30 % )
- Acide acétique ( 1 % )
- $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  1% ( 69 % )      pH = 5.20

➤ *Ajustement du pH à 5.7*

L'ajustement du pH à environ 5.7 est obtenu avec 0.75% d'acide acétique pour la phase mobile avec le carbonate d'ammonium.

Cette phase mobile a servi à l'analyse chromatographique de la solution standard à 1 µg/ml et à l'extrait de farine A additionnée de vitamine B<sub>2</sub>.



**Figure 12 :** Chromatogramme de la solution standard ( 1 µg/ml ) correspondant à la phase mobile n°7:

- Méthanol ( 30 % )
- Acide acétique ( 0.75 % )
- ( NH<sub>4</sub> )<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1% ( 69.25 % )                      pH = 5.8

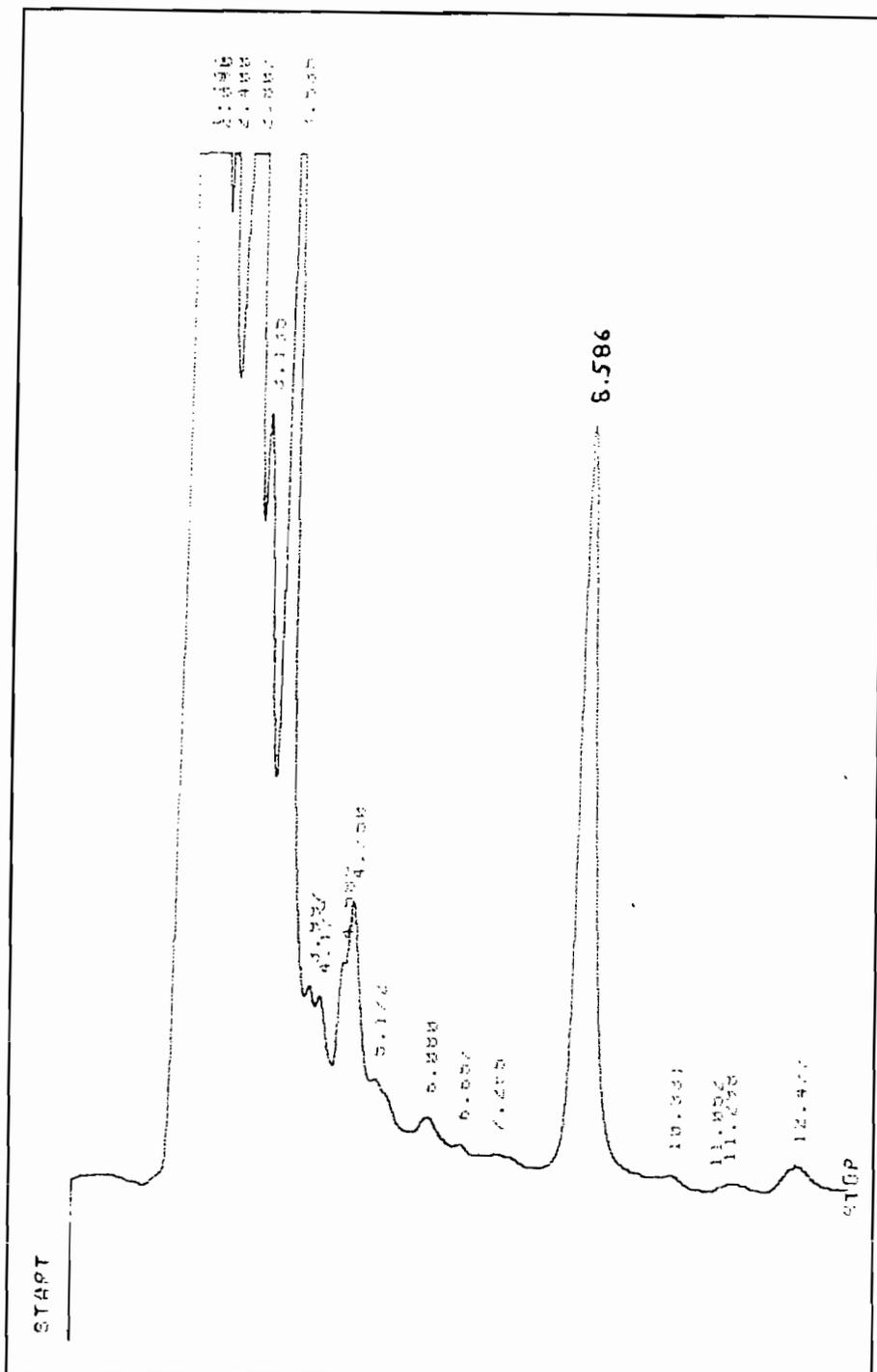


Figure 13 : Chromatogramme d'un extrait de farine A additionné de 20µg de vitamine B<sub>2</sub> correspondant à la phase mobile n°7 :

- Méthanol (30 %)
- Acide acétique (0.75 %)
- (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1% (69.25 %)      pH = 5.8

*Thèse - Diplôme d'état de Docteur en Pharmacie ; BONJ F. Nicaise*

*Thème : Mise au point d'une méthode d'analyse de la vitamine B<sub>2</sub> ou Riboflavine par Chromatographie Liquide Haute Performance (C.L.H.P.). Application au dosage dans les farines à base de céréales.*

Le facteur de capacité égale à 4.1 et l'analyse du chromatogramme de l'extrait de farine (figures 12 et 13 ) (pages 50 et 51 ) démontrent respectivement une bonne rétention et une bonne séparation du pic chromatographique de la vitamine B<sub>2</sub> par la phase mobile n°7.

On notera que Le choix des paramètres de l'intégrateur a été guidé par l'appréciation de l'aspect qualitatif du chromatogramme de l'extrait de farine A.

Les valeurs retenues sont les suivantes :

- Atténuation (  $ATT 2^{\wedge}$  ) = 5
- vitesse de déroulement du papier (  $CHT SP$  ) = 0.8
- Seuil de sensibilité (  $THRSH$  ) = 1

#### I-2-1-2-2 Choix de la longueur d'onde de détection

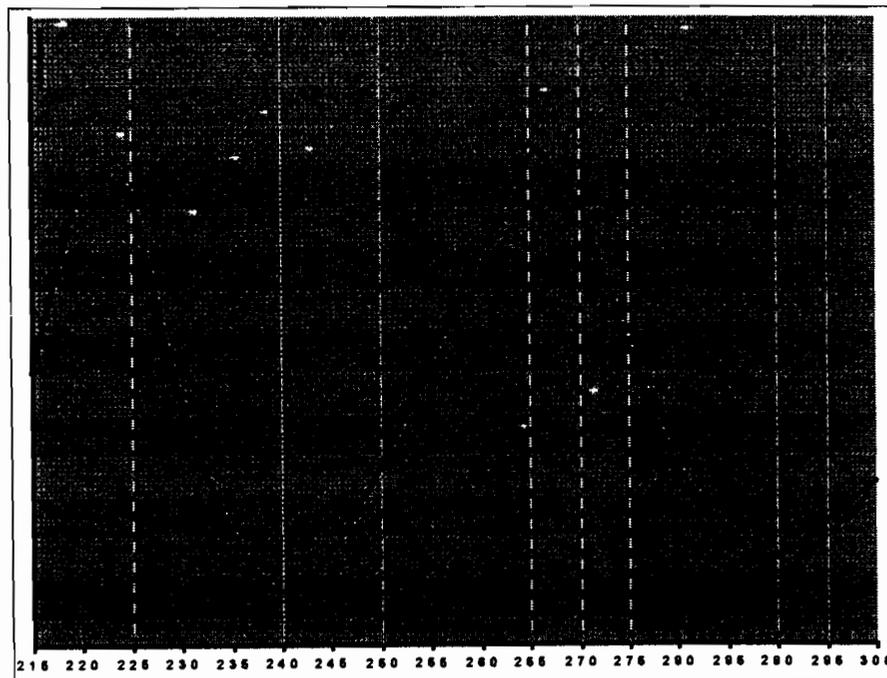
Le choix de la longueur d'onde de détection par spectrophotométrie dans l'Ultraviolet - Visible a été fait par le tracé du spectre d'absorption de la vitamine B<sub>2</sub> en suivant l'évolution de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde de la solution standard 1 µg/ml de vitamine B<sub>2</sub> au spectrophotomètre Ultraviolet - Visible.

Le tableau IV et le spectre d'absorption (figure 14 ; page 53 ) indiquent deux maxima d'absorption de la vitamine B<sub>2</sub> en solution chlorhydrique 0.1N : 222nm et 266nm.

Le maximum d'absorption 266nm a été choisi comme longueur d'onde de détection car conforme aux données de la littérature (23) ; en outre, en spectrophotométrie d'absorption dans l'Ultraviolet - Visible la détection est généralement faite à des longueurs d'onde supérieures à 250nm pour éviter l'absorption des phases mobiles (24).

**Tableau IV : Absorbances de la solution standard à 1 µg/ml en fonction de la longueur d'onde**

Longueur d'onde ( nm )	Absorbances du Standard ( 1 µg/ml )
215	0.035
220	0.058
224	0.059
225	0.058
230	0.032
235	0.015
240	0.007
245	0.012
250	0.023
255	0.036
260	0.050
265	0.062
268	0.060
270	0.057
275	0.038
280	0.023
285	0.015
290	0.011
300	0.021



**Figure 14 : Spectre d'absorption de la solution standard à 1 µg/ml**

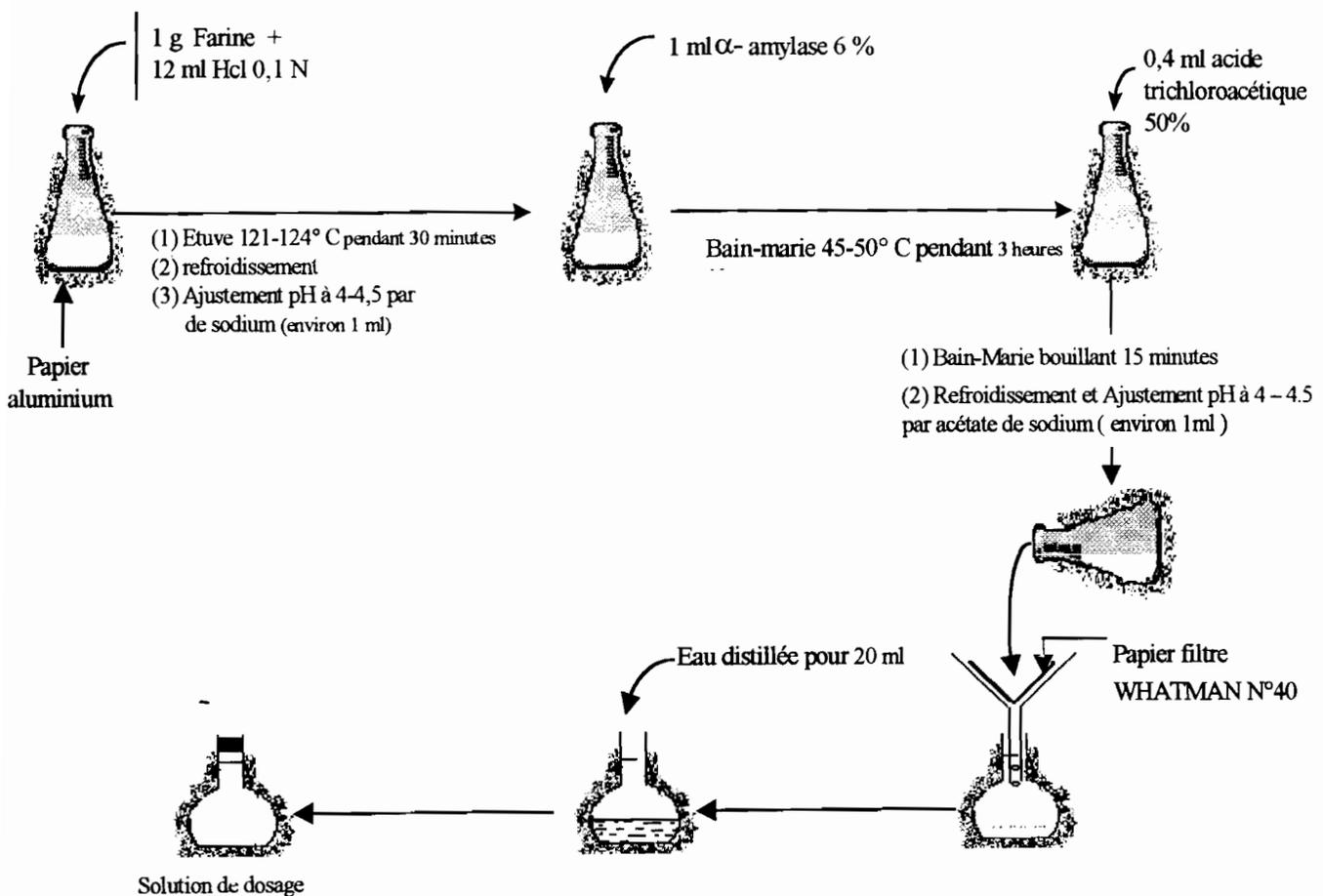
### I-2-1-3 Procédure d'analyse

L'analyse de la vitamine B<sub>2</sub> est basée sur le principe suivant :

La vitamine B<sub>2</sub> est libérée des complexes protéiques et des systèmes enzymatiques par une hydrolyse acide chlorhydrique, suivie d'une déphosphorylation des esters par une hydrolyse enzymatique (  $\alpha$ -amylase ).

L'extrait est purifié par une déprotéinisation et le dosage de la vitamine B<sub>2</sub> est ensuite réalisé par Chromatographie liquide haute Performance en phase inverse.

#### I-2-1-3-1 Protocole d'extraction



### I-2-1-3-2 Protocole de dosage

#### ❖ Préparation de la phase mobile

La phase mobile est préparée par simple mélange, puis filtrée sur un dispositif de filtration büchner et dégazée sous vide, le vide étant maintenu jusqu'à l'absence de dégagement de bulles d'air. La phase mobile est ensuite disposée dans le réservoir de la phase mobile en évitant la formation de bulles d'air .

#### ❖ Conditions opératoires

Les conditions d'analyse sont les suivantes :

- Phase mobile : - Méthanol ( 30 % )  
- Acide acétique ( 0.75 % )  
-  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  1% ( 69.25 % ) pH = 5.8
- Débit = 1ml/mn
- Longueur d'onde = 266nm
- Volume d'injection = 20 $\mu$ l

Avant tout début d'analyse on procède à la purge du circuit et ceci pour éliminer toute trace de bulles d'air. Cette purge est réalisée par l'ouverture d'une vanne prévue à cet effet.

Le conditionnement de la colonne est réalisé à faible débit ( 0.2ml/mn ) pendant 90 minutes. Après le conditionnement on remonte progressivement le débit jusqu'au débit d'analyse.

L'injection des échantillons est réalisée dans un premier temps en chargeant par trois fois son volume la boucle de 20 $\mu$ l ( dans la position chargement ou "Load" ) et dans un second temps en ramenant par un mouvement de rotation la vanne dans la position injection et ceci déclenche simultanément la détection et l'intégration .

L'intégrateur donne des résultats qui sont exprimés en surface de pic.

A la fin des manipulations, le circuit du chromatographe est rincé par un mélange méthanol - eau distillée ( 60/40 ).

### **I-2-2 VALIDATION DE LA METHODE D'ANALYSE**

La fiabilité et la précision des résultats de la méthode d'analyse vont être démontrées par une étude de validation.

Les paramètres utilisés pour la validation de la méthode sont les suivants :

- ❖ *Spécificité* de la méthode ;
- ❖ *Linéarité* de la méthode ;
- ❖ *Répétabilité* de l'analyse chromatographique et de l'ensemble de la procédure ;
- ❖ *Exactitude* de la méthode ;
- ❖ *Limite de détection* de la méthode.

### I-2-2-1. Spécificité de la méthode

La *spécificité* est la capacité d'une procédure à analyser effectivement la substance considérée.

L'étude de la spécificité a été réalisée par comparaison du spectre d'absorption des fractions d'éluat du pic au  $T_r = 8.5$ mn (figure 15 ; page 58 ) d'un extrait de farine A au spectre d'absorption de la solution standard de vitamine B<sub>2</sub> à 1 µg/ml.

Le recueillement des fractions d'éluat de l'extrait de farine A se fait manuellement partir de la 9<sup>ème</sup> goutte qui suit le début de la monte du stylet enregistreur du pic au temps de rétention de 8.5 minutes ( Figure 15 ; page 58 ).

Quatre fractions de deux extraits sont collectées dans un tube à essai puis évaporé à l'étuve à 121-124°C jusqu'au volume d'environ 0.2 ml et ensuite le concentré est repris par 1ml d'HCl 0.1N.

Cette solution ainsi obtenue est analysée au spectrophotomètre Ultraviolet - Visible.

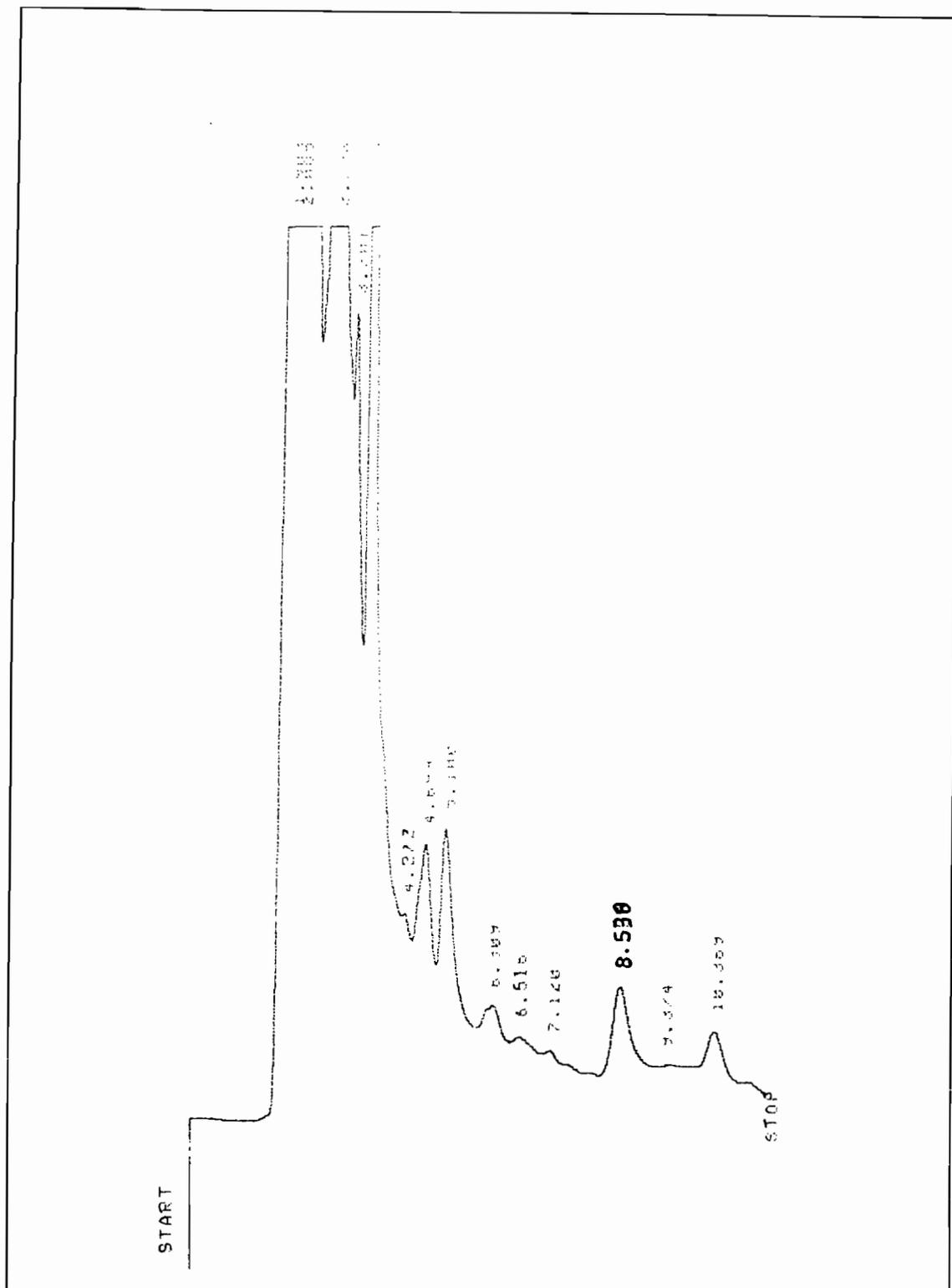


Figure 15 : Chromatogramme d'un extrait de farine A

### I-2-2-2 Linéarité de la méthode

La *linéarité* est la capacité d'une procédure à obtenir à l'intérieur d'un certain intervalle défini des résultats directement proportionnels à la quantité de substance à examiner dans l'échantillon;

L'étude de la linéarité a été faite sur un gamme étalon obtenu par dilution progressive de la solution mère et en déterminant les coefficients de corrélation et de détermination exprimant la relation entre les surfaces des pics obtenus et les concentrations en vitamine B<sub>2</sub>.

L'équation de la droite de régression et le domaine de linéarité seront ainsi définis.

### I-2-2-3 Répétabilité de la méthode

La *répétabilité* exprime la fidélité qui est l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites.

La répétabilité est démontrée par le calcul du coefficient de variation (CV) qui équivaut au pourcentage de l'écart entre une série de valeurs et la valeur moyenne :

$$CV = \frac{\sigma_{n-1}}{X} \cdot 100$$

-  $X$  : moyenne

-  $\sigma_{n-1}$  : écart-type

-  $n$  : nombre de mesure

$$X = \frac{\sum X_i}{n}$$

$$\sigma_{n-1} = \frac{\sum (X_i - X)^2}{n - 1}$$

La répétabilité a été étudiée :

- D'une part sur l'analyse chromatographique en l'appliquant dix fois à deux concentrations du standard ( 0.5 et 1µg/ml ) et à un extrait de farine A ;
- Et d'autre part sur l'ensemble de la procédure ("Whole test procedure ") en appliquant toute la procédure d'analyse à six prises de la farine A.

#### I-2-2-4 Exactitude de la méthode

L'exactitude de la méthode est évaluée par le calcul du pourcentage de récupération.

La détermination du pourcentage de récupération est réalisée par la méthode des ajouts dosés en procédant à quatre extractions de la farine A après ajout de quantité croissante de vitamine B<sub>2</sub>.

Le pourcentage de récupération des ajouts est déterminé par rapport à un extrait de farine A sans ajout.

Le rendement de la méthode d'extraction est égale à la moyenne des pourcentages de récupération des ajouts.

#### I-2-2-5 Limite de détection de la méthode

La limite de détection équivaut à la plus faible concentration détectable et intégrable.

Cette limite est déterminée en appliquant l'analyse chromatographique à des dilutions successives de la solution mère du standard.



## **II-1 RESULTATS**

### **II-1-1 VALIDATION DE LA METHODE D'ANALYSE**

#### **II-1-1-1. Spécificité la méthode**

L'interprétation du tableau V et des spectres d'absorption (figure 16 page 63) montre qu'on retrouve au niveau du spectre du pic au  $T_r = 8.5\text{mn}$  (figure 15 page 58) les points caractéristiques de la vitamine B<sub>2</sub>, avec deux maxima d'absorption à 230nm et 269nm.

Tableau V : Absorbances du standard ( 1µg/ml ) et des fractions d'éluat d'un extrait de farine A en fonction de la longueur d'onde

Longueur d'onde ( nm )	Absorbances du Standard ( 1µg/ml )	Absorbances "Extrait de Farine A"
215	0.035	-
220	0.058	-
224	0.059	-
225	0.058	0.054
235	0.015	0.087
240	0.007	0.064
245	0.012	0.035
250	0.023	0.027
255	0.036	0.026
260	0.050	0.027
265	0.062	0.028
	0.060	0.029
	0.057	
275	0.036	0.029
280	0.023	0.029
285	0.015	0.026
290	0.011	0.025
300	0.021	0.022

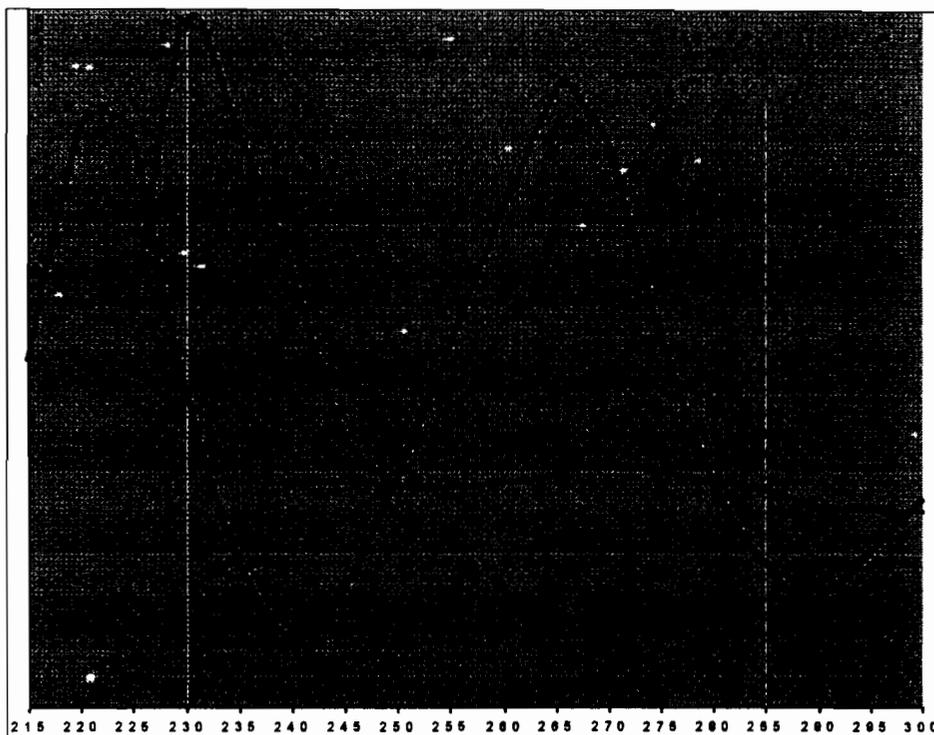


Figure 16 : Spectres d'absorption du standard ( 1µg/ml ) et des fractions d'éluat d'un extrait de farine A

### II-1-1-2 Linéarité de la méthode

- Coefficient de corrélation :  $r_{B_2} = 0.9998$
- Coefficient de détermination :  $r^2_{B_2} = 0.9996$
- Equation de la droite de régression :

$$y = 745118.74 x - 8715.73$$

*x*: concentration en  $\mu\text{g/ml}$

*y*: surface des pics

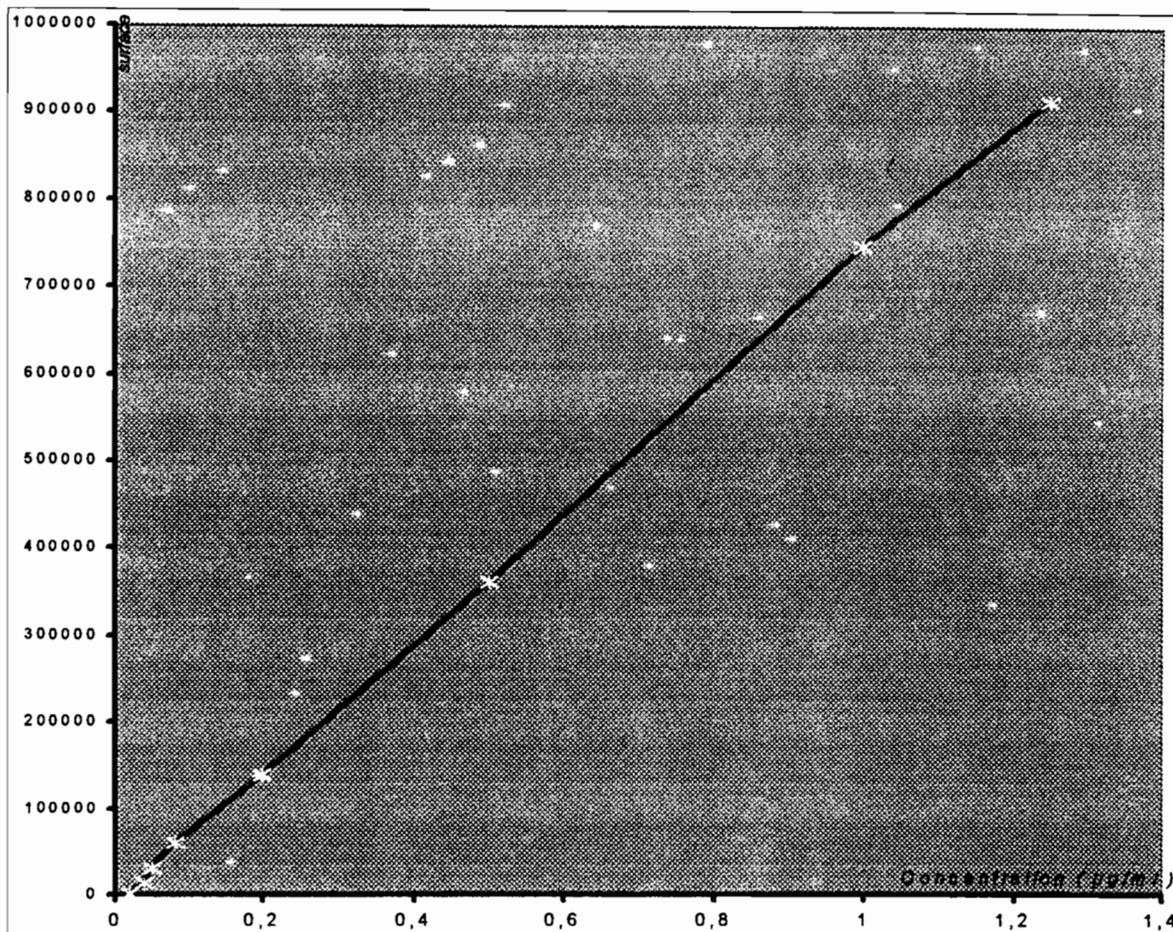
Les coefficients de corrélation et de détermination entre les concentrations et les surfaces des pics correspondantes respectivement 0.9998 et 0.9996 sont proches de 1 donc satisfaisants, ce qui indique qu'il existe une proportionnalité entre la surface des pics et la concentration en vitamine B<sub>2</sub>.

Cette proportionnalité est représentée par la droite d'étalonnage (figure 17 page 65) dont l'équation est :  $y = 745118.74.x - 8715.73$

On déduit de cette équation que le domaine de linéarité est compris entre 0.05 $\mu\text{g/ml}$  et 1.25 $\mu\text{g/ml}$

**Tableau VI : Gamme étalon de la vitamine B<sub>2</sub>**

CONCENTRATION ( $\mu\text{g/ml}$ )	SURFACE
0.02	1328
0.04	13691
0.05	30957
0.08	60377
0.2	140102
0.5	361799
1	747131
1.25	914562



**Figure 17 : Droite d'étalonnage**

### II-1-1-3 Repétabilité de la méthode

#### II-1-1-3-1 Repétabilité de l'analyse chromatographique

##### ❖ *Repétabilité du standard*

**Tableau VII:** Repétabilité du Standard ( 0.5 $\mu$ g/ml )

	<b>SURFACE</b>	<b>MOYENNE</b> ( $\mu$ g/ml )	$\sigma_{n-1}$ ( $\mu$ g/ml )	<b>CV</b> (%)
1	364429	360206	5435.49	1.51
2	363123			
3	353475			
4	360511			
5	370875			
6	356542			
7	364934			
8	357802			
9	358175			
10	352194			

**Tableau VIII :** Repétabilité du standard ( 1 $\mu$ g/ml )

	<b>SURFACE</b>	<b>MOYENNE</b> ( $\mu$ g/ml )	$\sigma_{n-1}$ ( $\mu$ g/ml )	<b>CV</b> (%)
1	746613	735309	13130.63	1.78
2	735024			
3	739972			
4	715015			
5	746865			
6	711753			
7	751259			
8	745701			
9	736124			
10	724764			

Les coefficients de variation obtenus pour les concentrations 0.5 $\mu$ g/ml et 1 $\mu$ g/ml respectivement 1.51% et 1.78% sont inférieurs à 2%, valeur généralement admise en analyse quantitative des solutions de références.

❖ *Répétabilité d'un extrait de farine A***Tableau IX** : Répétabilité d'un extrait de farine A

	<b>SURFACE</b>	<b>CONCENTRATION ( µg/ml )</b>	<b>MOYENNE ( µg/ml )</b>	<b><math>\sigma_{n-1}</math> ( µg/ml )</b>	<b>CV ( % )</b>
1	536720	0.732	<b>0.6860</b>	<b>0.020</b>	<b>2.9</b>
2	494767	0.676			
3	498284	0.680			
4	491093	0.671			
5	505035	0.689			
6	481413	0.658			
7	514397	0.702			
8	489897	0.669			
9	504035	0.688			
10	509880	0.696			

Le coefficient de variation (2.9% ) de l'extrait de farine A est inférieur à 5%, valeur généralement admise dans les tests de répétabilité d'une analyse chromatographique d'un extrait.

### II-1-1-3-2 Répétabilité de l'ensemble de la procédure " Whole test procedure "

**Tableau X : Répétabilité l'ensemble de la procédure**

	<b>SURFACE</b>	<b>CONCENTRATION ( µg/ml )</b>	<b>MOYENNE ( µg/ml )</b>	$\sigma_{n-1}$ ( µg/ml )	<b>CV ( % )</b>
1	502552	0.686	<b>0.679</b>	<b>0.036</b>	<b>5.3</b>
2	483724	0.661			
3	460841	0.630			
4	498567	0.681			
5	489541	0.669			
6	549399	0.749			

Le coefficient de variation ( 5.3% ) de l'ensemble de la procédure, "whole test procedure" est inférieur à 10%, valeur généralement recommandée en analyse alimentaire.

#### II-1-1-4 Exactitude de la méthode

**Tableau XI : Pourcentage de récupération**

Quantité ajoutée ( µg )	Quantité total trouvée ( µg/g )	Quantité d'ajout trouvée ( µg )	Pourcentage d'ajout récupéré ( % )
0	15.26	--	--
2	17.04	1.78	89
4	18.88	3.62	90.5
5	19.72	4.46	89.2
6	20.96	5.7	95
<b>Pourcentage de récupération = 91 ± 2.42%</b>			

Le rendement 91% est compris entre 90 et 100%, valeurs généralement recommandées en analyse quantitative.

**II-1-1-5 limite de détection de la méthode****Tableau XII : Evaluation de la limite de détection**

DILUTION	CONCENTRATION ( $\mu\text{g/ml}$ )	SURFACE
1/100	0.10	747131
1/200	0.50	361799
1/500	0.20	140102
1/2000	0.05	30957
1/5000		1328
1/10000	0.01	--

La limite de détection de la vitamine B<sub>2</sub> est égale à 0.02 $\mu\text{g/ml}$

## II-1-2 APPLICATIONS AU DOSAGE DE LA VITAMINE B<sub>2</sub> DANS LES FARINES A BASE DE CEREALES

**Tableau XIII : Teneurs en vitamine B<sub>2</sub> des farines**

ECHANTILLON	TENEUR DETERMINEE ( mg/100g )	TENEUR AFFICHEE ( mg/100g )	RAPPORT ( R )
A	1.358	0.800	1.7
B	9.542	0.600	15.9
C	0.400	0.300	1.33
D	0.201		

La teneur en vitamine B<sub>2</sub> des farines industrielles A, B et C sont supérieures aux valeurs indiquées par le fabricant sur le conditionnement.

La teneur en vitamine B<sub>2</sub> de la farine "5 céréales" est de 0.201µg pour 100g de farine.

## **II-2 DISCUSSION**

La méthode d'analyse chromatographique proposée respecte les principes généraux des techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires des vitamines du groupe B (23, 33).

Notre méthode d'extraction est réalisée avec des quantités réduites de l'échantillon et des réactifs, facilitant les différentes manipulations et permettant d'économiser les réactifs.

Notre méthode de dosage utilise une phase mobile simple qui ne nécessite pas l'utilisation de contre ions organiques pour chromatographie par paire d'ions, mais plutôt un sel (le carbonate d'ammonium) plus favorable à la durée de survie de la phase stationnaire (14).

Elle permet d'obtenir une bonne rétention de la vitamine B<sub>2</sub> (facteur de capacité égale à 4.01) et une bonne séparation de son pic chromatographique (figure 13 page 51).

Par ailleurs l'utilisation des sels permet une réduction du coût de l'analyse par rapport aux contre ions organiques qui ont un coût très élevé.

### **II-2-1 VALIDATION DE LA METHODE D'ANALYSE**

La validation de la méthode d'analyse a été menée avec des critères du guide de validation analytique établis par une commission de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (S.F.S.T.P) dans le but d'aider les industriels à valider leurs procédures d'analyse (5).

### II-2-1-1. Spécificité de la méthode

Les résultats de l'étude de la spécificité (tableau V et figure 16 page 63 ) ont montré que le pic au  $T_r = 8.5\text{mn}$  (figure 15 page 58 ) possède les points caractéristiques de la vitamine B<sub>2</sub>.

Cependant l'absence de symétrie autour des maximums d'absorption pourrait être imputable à la présence d'impureté due au mode de prélèvement et aussi à la composition complexe des farines qui sont des dérivés biologiques naturels.

Notre méthode d'analyse avec une méthode de détection par spectrophotométrie dans l'ultraviolet possède une spécificité d'analyse de la vitamine B<sub>2</sub>.

### II-2-1-2. Linéarité de la méthode

Les coefficients de corrélation (0.9998 ) et de détermination (0.9996 ) étant proches de 1 (page 64 ) et la figure 17 (page 65 ) indiquent que notre méthode d'analyse possède une linéarité de réponse dans un large domaine de concentrations allant de 0.05 à 1.25 $\mu\text{g/ml}$ .

### II-2-1-3. Répétabilité de la méthode

Le coefficient de variation 5.3% (Tableau X page 68) de l'ensemble de la procédure inférieur à 10% indique que notre méthode d'analyse possède une bonne répétabilité des mesures.

#### II-2-1-4. Exactitude de la méthode

La méthode d'extraction proposée avec des quantités réduites de l'échantillon et des réactifs donne un pourcentage moyen de récupération de 91% (Tableau XI page 69) ; pourcentage supérieur à ceux obtenus par ANG C. Y. et Coll et HAGG M respectivement 89.3% et 88% (1, 16 )

#### II-2-1-6. Limite de détection de la méthode

La méthode d'analyse proposée avec une méthode de détection par spectrophotométrie dans l'ultraviolet a une limite de détection de 0.02 $\mu$ g/ml (page 70) soit 0.04mg/100g d'aliment.

Cette limite est satisfaisante car proche des faibles teneurs en vitamine B<sub>2</sub> des aliments, environ 0.02mg/100g d'aliment (Tableau I page 11 ).

WIMALASIRI P. et Coll (43 ) ont obtenu une limite de détection de 0.25 $\mu$ g/ml, soit une amélioration de la limite de détection 12.5 fois par notre méthode d'analyse.

### **II-2-2 APPLICATIONS AU DOSAGE DE LA VITAMINE B<sub>2</sub> DANS LES FARINES A BASE DE CEREALES**

Les différents résultats de l'étude de validation montrent que la méthode d'analyse est performante.

L'application au dosage de la vitamine B<sub>2</sub> dans deux catégories de farines à base de céréales destinées à l'alimentation des nourrissons montre que :

❖ Les trois farines industrielles (A, B, C) ont les teneurs déterminées (1.358, 9.542, et 0.400mg/100g) (Tableau XIII page 71) supérieures aux teneurs indiquées par le fabricant sur le conditionnement respectivement 0.800, 0.600, 0.300mg/100g.

Des résultats similaires ont été obtenus par CHASE G. W. et Coll (6).

En effet, dans l'industrie on procède à la supplémentation en vitamine, afin d'obtenir à la fin du process des produits diététiques à teneur garantie en vitamine ; généralement cette supplémentation se fait dans une proportion comprise entre 80 et 200%, exception faite pour les vitamines D et K (37).

Les farines A et C sont donc supplémentées respectivement à 186% et 135%, alors que la farine B est très fortement supplémentée 1600%.

❖ La farine " 5 céréales " préparée et proposée par le service de Diététique Préventive de l'Institut National de Santé Publique d'Abidjan est dosée à 0.201mg de vitamine B<sub>2</sub> pour 100g de farine (Tableau XIII page 71).

La connaissance de cette teneur permettra aux diététiciens de mieux prescrire les quantités de farine nécessaire et la répartition des différents repas en vu d'un meilleur apport vitaminique aux nourrissons.

Cette détermination dans la farine " 5 céréales " devra être élargie aux autres vitamines du groupe B.

# Conclusion

*Thèse - Diplôme d'état de Docteur en Pharmacie ; B.N.Y.F. Nicaise*

*Thème : Mise au point d'une méthode d'analyse de la vitamine B<sub>2</sub> ou Riboflavine par Chromatographie Liquide Haute Performance (C.L.H.P.).  
Application au dosage dans les farines à base de céréales.*

La vitamine B<sub>2</sub> ou Riboflavine est un nutriment qui possède un rôle essentiel sur la croissance.

Divers essais et analyses nous ont permis de mettre au point une méthode d'analyse de la vitamine B<sub>2</sub> par Chromatographie Liquide Haute Performance comportant deux étapes :

❖ l'extraction par une hydrolyse acide chlorhydrique et enzymatique (  $\alpha$ -amylase type Takadiastase ), suivie d'une purification par déprotéinisation ; utilisant des quantités réduites d'échantillon et de réactifs.

❖ le dosage par chromatographie en phase inverse avec les conditions opératoires suivantes :

- phase stationnaire en C<sub>18</sub> (Zorbax )
- phase mobile, un mélange (30% méthanol-0.75% acide acétique-69.25% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1%)
- débit de phase mobile à 1ml/mn
- détection dans l'ultraviolet à 266nm
- volume d'injection 20 $\mu$ l

Les Critères de validation appliqués (spécificité, linéarité, répétabilité, exactitude et limite de détection) ont donné les résultats suivants :

- ❖ Coefficient de corrélation = 0.9998 et Coefficient de détermination = 0.9996
- ❖ Coefficient de variation de l'analyse = 5.3 %
- ❖ Exactitude = 91 %
- ❖ Limite de détection = 0.02  $\mu$ g/ml ( 0.04mg/100g d'aliment ).

Ces résultats montrent que la méthode d'analyse est performante.

L'application au dosage de la vitamine B<sub>2</sub> dans deux catégories de farines à base de céréales destinées à l'alimentation des nourrissons montre que :

❖ Les farines industrielles ont leurs teneurs en vitamine B<sub>2</sub> déterminées (1.358, 9.542, et 0.400mg/100g ) supérieures aux teneurs indiquées par le fabricant sur le conditionnement respectivement 0.800, 0.600, 0.300mg/100g. Ce qui est courant dans les produits diététiques industriels.

❖ La farine "5 céréales" préparée et proposée par le service de diététique préventive de l'Institut de Santé Publique d'Abidjan dans le cadre de la réhabilitation nutritionnelle des nourrissons est dosée à 0.201mg de vitamine B<sub>2</sub> pour 100g de farine.

Notre étude présente donc l'intérêt :

➤ D'aider les diététiciens du service de nutrition de l'Institut National de Santé Publique (I.N.S.P. ) d'Abidjan de mieux prescrire les quantités de farine nécessaire et la répartition des différents repas en vu d'un meilleur apport vitaminique aux nourrissons.

➤ Et aussi d'être le point de départ de la mise au point des méthodes d'analyse des vitamines du groupe B, contribuant ainsi à la mise en place de méthodes de contrôle de qualité des produits pharmaceutiques et à l'établissement de la table de composition des aliments couramment consommés en Côte d'Ivoire.

# Bibliographie



*Thèse - Diplôme d'état de Docteur en Pharmacie ; BONY F. Nicaise*

*Thème : Mise au point d'une méthode d'analyse de la vitamine B<sub>2</sub> ou Riboflavine par Chromatographie Liquide Haute Performance (C.L.H.P.).  
Application au dosage dans les farines à base de céréales.*

**1 - ANG C.Y.W. AND MOSELEY F.A.**

Détermination of thiamin and riboflavin in meat and meat products by High-Pressure Liquid Chromatography.

*J. Agric. Food chem* 1980 ;**28** :486-489.

**2 - APFELBAUM M, FORRAT C, NILLUS P.**

Abrégé de diététique et de nutrition.

2<sup>ème</sup> édition. Paris : MASSON, 1989 :473.

**3 - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC).**

Official methods of analysis of the Association of Official Analytical chemists.

14th ed. WASHINGTON, DC : *Association of Official Chemists*, 1984 : 840-886.

**4 - AUGUSTIN J.**

Simultaneous determination of thiamin and Riboflavin in foods by Liquid Chromatography.

*J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1984 ; **67**(5) : 1012 -1015.

**5 - CHAMINADE P. , FERAUD S. , BAILLET A. , FERRIER D.**

Validation d'une méthode analytique de dosage par CLHP : Test de robustesse et validation de la méthode.

*S.T.F. Pharma. Pratiques.* 1995; **5**(1):17-35

**6 - CHASE G.W., LANDER W.D., SOLIMAN A.M.AND J.R.,  
EITENMILLER RR.**

Method modification for Liquid Chromatographic determination of thiamme, riboflavin, and Pyridoxine in medical foods.

*Journal of AOAC international.* 1993 ; **76**(6): 1276 1280.

**7 - CHEFTEL J.C., CHEFTEL H. , BESANCON P.**

Introduction à la Biochimie et à la technologie des aliments .

Paris : Technique et Documentation / E.M.E, 1979 ; 2 : 420

**8 - DAWSON K.R. , UNKLESBAY N.F., HEDRICK H.B.**

HPLC determination of Riboflavin, Niacin, and thiamin in beef, Pork, and Lamb after Alternate Heat - Processing Methods.

*J. Agric. Food chem*; 1988 ; 36 : 1176-1179.

**9 - DUPIN H , CUQ J.L. , MALEWIA K. , LEYNAUD - ROUAUD C. ,  
BERTHIER A.M.**

Alimentation et nutrition humaine.

Paris : ESF éditeur, 1992 : 1533

**10 - F.A.O.**

Table de composition des aliments à l'usage de l'Afrique : Origine végétale  
Groupe 1 Céréales et produits dérivés.

Rome 1970 : 1-21.

**11 - FAVIER J-C., IRELAND-RIPERT J., LAUSSUCQ C., FEINBERG M.**

Répertoire général des aliments : Table de composition des fruits exotiques,  
fruits de cueillette d'Afrique.

Paris : ORSTOM - Technique et Documentation - INRA. 1993 ; tome III : 207.

**12 - FELLMAN J.K., ARTZ W.E., TASSINARI P.D., COLE C. L., AUGUSTIN J.**

Simultaneous determination of thiamin and Riboflavin in selected foods by High - Performance Liquid Chromatography.

*Journal of food science* . 1982 ; **47** : 2048 - 2050, 2067

**13 - FERNANDO S. M. , MURPHY P.A.**

HPLC determination of Thiamin and riboflavin in soybeans and Tofu .

*J. Agric. Food chem.* 1990 ; **38** : 163 - 167.

**14 - FINGLAS P.M. , FAULKS R.M.**

The HPLC analysis of thiamin and riboflavin in Potatoes.

*Food chemistry* 1984 ; **15** : 37 - 44

**15 - GUILARTE T.R.**

Radiometric microbiological assay of B-Vitamins. Part 2 : extraction methods. *J.Nutr. Biochem.* 1991 , july ; **2** : 399 - 402

**16 - HÄGG M.**

Effect of various commercially available enzymes in the Liquid Chromatographic determination with external standardization of thiamine and riboflavin in foods.

*Journal of AOAC International* 1994 ; **77(3)** :681 - 686.

**17 - HOLLMAN P.C.H. , SLANGEN J.H. , WAGSTAFFE P.J. , FAURE U.,  
SOUTHGATE D.A.T. , FINGLAS P.M.**

Intercomparison of Methods for the determination of vitamins in foods. Part  
2. Water - Soluble vitamins.

*Analyst* 1993 May ; **118** : 481 - 488.

**18 - HUOPALAHTI R. , SUNELL J.**

Use of capillary zone electrophoresis in the determination of B vitamins in  
Pharmaceutical products.

*Journal of chromatography* 1993 ; **636** : 133-135.

**19 - KAMMAN J.F. , LABUZA T.P. , WARTHESEN J.J.**

Thiamin and riboflavin analysis by High Performance Liquid  
Chromatography. *Journal of food science* 1980 , 45 :1497 - 1499,1504.

**20 - KIRCHMEIER R.L., UPTON R.P.**

Simultaneous determination of Niacin, Niacinamide, Pyridoxine, thiamine,  
and riboflavin in multivitamin Blends by ion - pair High - Pressure Liquid  
Chromatography.

*Journal of Pharmaceutical sciences.* 1978 ; **67**( 10 ) : 1444 -1446

**21 - LEBOULANGER J.**

Les Vitamines : Biochimie - Mode d'action - intérêt thérapeutique.

France Roche :1984

**22 - LESPAGNOL A.**

Chimie des médicaments.

Paris : EME - Technique et Documentation 1975 ; Tome II : 446

**23 - LINDEN G.**

Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires :  
Principes des techniques d'analyse.

Paris : Technique et Documentation - APRIA 1981 2: 59 - 95

**24 - MAHUZIER G. , HAMON M.**

Abrégé de chimie analytique : Méthodes de séparation.

2<sup>e</sup> édition : Paris : MASSON 1986 ; tome II : 262

**25 - MAURO D.J. , WETZEL D.L.**

Simultaneous determination of thiamin and riboflavin in enriched cereal based products by High - Performance Liquid Chromatography using selective detection.

*Journal of chromatography* 1984; 299 : 281 - 287

**26 - MUNNICH A. , OGIER H. , SAUDUBRAY J.M.**

Les vitamines : Aspects métaboliques, génétiques, nutritionnels et thérapeutiques.

Paris : ROCHE et MASSON 1987 :428

**27 - POLESELLO A. , RIZZOLO A.**

Applications of HPLC to the determination of water - soluble vitamins in foods (a review 1981 - 1985).

*Journal of Micronutrient Analysis.* 1986 ; 2 : 153 - 187.

**28 - REYES E.S.P. , SUBRYAN L.**

An improved method of simultaneous HPLC assay of riboflavin and thiamin in selected cereal Products.

*Journal of food composition and analysis* 1989 ; 2 : 41 - 47

**29 - RIZZOLO A., POLESELLO S.**

Chromatographic determination of vitamins in foods.

*Journal of chromatography*, 1992 ; 624 : 103 - 152.

**30 - ROCHE.**

Guide pratique des vitamines dans l'alimentation.

France : F. HOFFMAN - La ROCHE et C<sup>ie</sup>

**31 - ROCHE.**

Vitamines du groupe B : Aspects nutritionnels, Physiologiques et Pathologiques.

France : F. HOFFMAN - La ROCHE et C<sup>ie</sup>

**32 - ROSSET R. , CAUDE M. , JARDY A.**

Manuel pratique de chromatographie en phase liquide.

2<sup>e</sup> Edition : Paris : MASSON, 1982 : 374

**33 -ROUGEREAU A.**

Vitamines dans DEYMIRE B., MULTON J.L., SIMON D., eds. Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires.

Paris :Technique et Documentation - APRIA 1981 ; 245 - 263

**34 - ROY R.B. , SALPETER J. , DUNMIRE D.L.**

Evaluation of urea - acid system as a medium of extraction for B- Group vitamins. Simplified Automated analysis of Riboflavin in food products .  
*Journal of food science*, 1976 ; **41** : 996 - 1000

**35 - RUSSELL L. F., VANDERSLICE J.T.**

Non - degradative extraction and simultaneous quantitation of riboflavin, flavin mononucleotide, and flavin adenine dinucleotide in foods by HPLC .  
*Food chemistry* 1998 ; **43** : 151 - 162

**36 - SKURRAY G.R.**

A rapid method for selectively determining small amounts of niacin, riboflavin and thiamine in food .  
*Food chemistry* 1981 ; **7** : 77 - 80

**37 - SOMMAIRE P. A. , BOURRINET P.**

Les produits diététiques.  
*Les actualités pharmaceutiques* 1976, (120):38-45.

**38 - TOMA R. B. , TABEKHIA M. M.**

High Performance Liquid Chromatographic analysis of B-vitamins in rice and rice products.  
*Journal of Food Science* 1979 ; **44** :263-265,268

**39 - WATIER B.**

Un équilibre alimentaire en Afrique . Pourquoi ?  
France : F.HOFFMAN - La ROCHE et C<sup>ie</sup> 1981 :58.

**40 - WEHLING R. L. , WETZEL D. L.**

Simultaneous determination of pyridoxine ,riboflavine and thiamin  
in fortified cereal products by High Performance Liquid Chromatography.  
*J. Agric. Food Chem.* 1984 ; **32** : 1326-1331.

**41 - WILLS R. B. H. , SHAW C. G. , DAY W. R.**

Analysis of water soluble vitamins by High Pressure Liquid Chromatography  
*. Journal of Chromatographic Science .* July, 1977 ; **15** : 262 - 266

**42 - WILLS R. B. H. , WIMALASIRI P., GREENFIELD H.**

Comparative determination of thiamin and riboflavin in foods by High  
Performance Liquid Chromatography and fluorometric methods.  
*Journal of Micronutrient Analysis,* 1985 ; **1** : 23- 29.

**43 - WIMALASIRI P. , WILLS R. B. H.**

Simultaneous analysis of thiamin and riboflavin in foods by High Performance  
Liquid Chromatography.  
*Journal of Chromatography ,* 1985 ; **318** : 412 - 416.

# RESUME

La vitamine B<sub>2</sub> ou Riboflavine est un nutriment essentiel à divers métabolisme de l'organisme. Elle constitue un coenzyme de multiples réactions métaboliques au niveau de divers tissus et organes et possède donc un rôle essentiel sur la croissance.

La carence en vitamine B<sub>2</sub> provoque classiquement une augmentation insuffisante du poids et un retard de croissance chez le nourrisson et l'enfant et des lésions de la peau et des muqueuses (surtout la muqueuse buccale).

Les principales sources alimentaires de la vitamine B<sub>2</sub> sont diverses notamment les céréales, les légumes et les produits animaux (viandes, poissons, lait, œufs).

Divers essais et analyses ont permis de mettre au point une méthode d'analyse de la vitamine B<sub>2</sub> en deux étapes :

❖ L'extraction de la vitamine B<sub>2</sub> par une hydrolyse acide chlorhydrique et enzymatique ( $\alpha$ -amylase type Takadiastase), suivie d'une purification par déprotéinisation ;

❖ Et le dosage par Chromatographie Liquide Haute Performance en phase inverse avec une phase stationnaire C<sub>18</sub> (Zorbax), parcourue par un mélange (méthanol 30% - acide acétique 0.75% - (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1% 69.25%) au débit de 1 ml/min et une détection dans l'ultraviolet à 266nm, permettant d'obtenir une bonne rétention (facteur de capacité K' égale à 4.01) et séparation au temps de rétention 8.5 minutes.

Les Critères de validation appliqués (spécificité, linéarité, répétabilité, exactitude et limite de détection) ont donné les résultats suivants :

- ❖ Coefficient de corrélation = 0.9998 et Coefficient de détermination = 0.9996
- ❖ Coefficient de variation de l'analyse = 5.3 %
- ❖ Exactitude = 91 %
- ❖ Limite de détection = 0.02 µg/ml (0.04mg/100g d'aliment).

Ces résultats montrent que la méthode d'analyse est performante.

L'application au dosage de la vitamine B<sub>2</sub> dans deux catégories de farines à base de céréales destinées à l'alimentation des nourrissons montre que :

❖ Les farines industrielles ont leurs teneurs en vitamine B<sub>2</sub> déterminées (1.358, 9.542, et 0.400mg/100g) supérieures aux teneurs indiquées par le fabricant sur le conditionnement respectivement 0.800, 0.600, 0.300mg/100g. Ce qui est courant dans les produits diététiques industriels.

❖ La farine "5 céréales" préparée et proposée par le service de diététique préventive de l'Institut de Santé Publique d'Abidjan dans le cadre de la réhabilitation nutritionnelle des nourrissons est dosée à 0.201mg de vitamine B<sub>2</sub> pour 100g de farine.

MOTS CLES : Analyse -- Céréale -- C.L.H.P. -- Vitamine