

Licence Sciences et Techniques (LST)

GENIE CHIMIQUE

PROJET DE FIN D'ETUDES

Contrôle qualité du produit NPV : Protocoles et techniques d'analyses.

Présenté par :

◆ **Nada EL YOUBI**

Encadré par :

- ◆ **Mme Samira OUKHOUIA (Société LIAV)**
- ◆ **Pr. Khalid MISBAHI (FST)**

Soutenu Le 07 Juillet 2022 devant le jury composé de :

- **Pr. Khalid MISBAHI**
- **Pr. Hicham CHTIOUI**
- **Pr. HASSAN GRECHE**

**Stage effectué à LIAV.
Année Universitaire 2021 / 2022**

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier Dieu le Tout Puissant pour tous les biens et bonnes choses dont j'ai pu disposer tout au long de mon existence.

A mes deux anges gardiens, pour leur encouragement, leur amour, leur confiance ainsi que leur présence qui ne pourrait être décrite en de simples mots.

A Pr. Adnane Remmal,

Je vous remercie d'avoir partagé avec moi votre passion pour la recherche et l'encadrement. J'ai grandement apprécié votre soutien, votre engagement, et votre partage d'expérience tout au long de mon stage.

Je suis très reconnaissante de votre engagement et des efforts que vous avez faits pour le bon déroulement du stage.

Mes remerciements à l'égard de mon encadrant technique, Mme Samira Oukhouia, pour sa rigueur et les éclaircissements dont j'ai pu bénéficier tout au long de mon stage.

A Pr. Khalid Misbahi, mon encadrant pédagogique qui a eu l'amabilité de répondre à mes questions et me fournir davantage d'explications, et de temps tout au long de mon parcours.

Merci à toute l'équipe pédagogique, allant de mes chers professeurs au staffe administratif qui ont pu répondre présent à chaque appel et chaque besoin. Je tiens encore à remercier les membres de jury Pr. Chtioui Hicham et Pr. Greche Hassan pour l'honneur qu'ils nous font en acceptant de juger ce travail.

Finalement, je saisis cette occasion pour adresser mes profonds remerciements aux étudiantes doctorantes à LIAV Mmes Chaimae Squalli, Malak Tabib, pour la qualité de leur travail, leur implication dans le domaine et le tonnerre d'explications qu'on m'a offert.

Résumé.

L'étude décrit la mise au point d'une méthode de dosage spectroscopique UV pour l'estimation de la concentration en thymol du produit NPV dans différents lots des années 2019, 2020, 2021, 2022 qui sont à 12% en thymol (15% pour le lot de 2019). Le système de solvants utilisés était le chloroforme et l'éthanol. Le spectre a été balayé dans la gamme de 200-400nm. Le maximum d'absorption du thymol a été trouvé à 299nm et 297 nm dans l'éthanol et le chloroforme respectivement et les courbes d'étalonnages ont vérifié la loi de Beer-Lambert pour les solutions dont l'absorbance était inférieure à 2. Des tests de fiabilités ont vérifié les courbes d'étalonnages instaurées. Finalement, une comparaison a été réalisée entre la nouvelle méthode proposée et la méthode adoptée par le service de contrôle qualité de la société.

Mots clés : NPV, dosage spectrophotométrique UV, thymol, loi de Beer-Lambert.

Abstract.

The study describes the development of a UV spectroscopic assay method for estimating the thymol concentration of NPV product of different batches for the years 2019, 2020, and 2021, 2022, which contain 12% thymol (15% for the 2019 batch). The solvent system used was chloroform and ethanol. The spectrum was scanned in the 200-400nm range. The maximum absorption of thymol was found at 299nm and 297 nm in ethanol and chloroform, respectively. Thus, the calibration curves verified the Beer-Lambert law for solutions with absorbance less than 2. Reliability tests verified the calibration curves established. Finally, a comparison was made between the proposed new method and the method adopted by the company's quality control department.

Keywords: NPV, UV spectrophotometric assay, thymol, Beer-Lambert law.

Liste des figures.

Figure 1: Spectre électromagnétique de la lumière et domaine UV-Visible.....	7
Figure 2: Principe de la spectrophotométrie d'absorption moléculaire (Camut, 2009)	7
Figure 3: Spectre d'absorption	11
Figure 4: Spectre d'absorption du chloroforme.	15
Figure 5: Spectre d'absorbance de l'éthanol.	16
Figure 6: Courbe d'étalonnage du thymol dans le chloroforme (entre 1% et 5%)......	17
Figure 7: Courbe d'étalonnage du thymol dans le chloroforme (entre 5% et 12,5%).	18
Figure 8: Courbe d'étalonnage du thymol dans de l'éthanol.....	19

Liste des tableaux.

Tableau 1: Fiche technique de l'entreprise LIAV.....	3
Tableau 2 : Concentration de thymol en %, sa masse mesurée et le volume de chloroforme correspondants.....	17
Tableau 3: Concentration de Thymol en %, sa masse mesurée et le volume de l'éthanol correspondants.....	18
Tableau 4 : Les masses de thymol et les volumes des solvants correspondants.....	20
Tableau 5 : Concentrations en % trouvées des solutions A et B.	20
Tableau 6: Résultats du dosage du thymol dans le produit fabriqué à l'échelle laboratoire après 1h et 1j	21
Tableau 7: Concentrations trouvées des produits fabriqués à l'échelle laboratoire à différentes concentrations.....	21
Tableau 8: Concentrations trouvées des produits fabriqués à l'échelle laboratoire à différentes concentrations.....	22
Tableau 9 : Tests sur les solutions à différents concentrations de thymol par les deux méthodes.	23
Tableau 10: Comparaison des résultats des deux méthodes 1 et 2.....	23

Sommaire

Introduction	1
1 Chapitre 1 : Présentation de la société	1
1.1 Secteur d'activité de l'entreprise :	3
1.2 Fiche technique de l'entreprise :.....	3
1.3 Produits commercialisés par LIAV :	3
2 Chapitre 2 : Synthèse bibliographique sur la spectroscopie	5
2.1 La spectroscopie.....	5
2.1.1 Histoire de la spectroscopie :	5
2.1.2 Généralités sur les méthodes spectroscopiques :	5
2.2 Le dosage par spectrométrie d'absorption moléculaire :	6
2.2.1 Définition :	6
2.2.2 Mesure de l'absorbance :	7
2.2.3 Aspect quantitatif :	8
2.3 Identification et dosage des terpènes :	9
Etude sur le contrôle qualité du produit NPV	
3 Chapitre 3 : Matériel et méthodes.	11
3.1 Spectre d'absorption	11
3.2 Courbe d'étalonnage.....	12
3.3 Test de fiabilité	12
3.4 Comparaison du test de fiabilité avec la méthode adoptée par la société.....	13
4 Chapitre 4 : Résultats et discussions.	15
4.1 Spectre d'absorption :	15
4.2 Courbe d'étalonnage :	16
4.3 Test de fiabilité :	19
4.4 Comparaison du test de fiabilité avec la méthode adoptée par le laboratoire :	22

Conclusion et perspectives.
Références.

Introduction

Les antibiotiques ont été adoptés en médecine vétérinaire au début des années 1950 comme antimicrobiens, dans un but curatif ou préventif. A côté de leur utilisation en tant que médicaments anti-infectieux, il se trouve une utilisation très particulière à l'élevage de production (ruminants, porcs, volailles, poissons), qui est celle des additifs alimentaires ou antibiotiques à effet promoteur de croissance (Sanders, 2010).

Les dernières décennies ont été consacrées aux développements, de produits innovants pour la santé animale servant d'alternatives naturelles aux produits vétérinaires utilisés en élevage afin de lutter contre la résistance aux antibiotiques des bactéries transmissibles par l'alimentation (Martel and Chaslus-Dada, 2000).

Le NPV est un additif pour aliment de volailles pouvant remplacer les antibiotiques et les antiparasitaires chimiques responsables de la sélection des microbes résistants chez les animaux. Comme il peut renforcer leur action en cas d'association.

L'objectif de ce travail est d'étudier et réaliser une nouvelle méthode de dosage par spectroscopie UV du thymol, qui est le principe actif du produit NPV, en ayant recours aux méthodes analytiques qui sont mise en place pour déterminer d'une manière quantitative la concentration du NPV en thymol.

L'analyse chimique a pour objet de déterminer la nature des éléments qui forment un corps composé (analyse qualitative) et aussi les proportions en poids ou volume de chacun d'entre eux (analyse quantitative).(Feinberg, 2004)

L'analyse chimique comprend des opérations de préparation de l'échantillon et de mesure proprement dite : elle a pour but immédiat de donner un résultat quantitatif, comme la concentration d'un analyte dans un échantillon, ou qualitatif, comme la présence ou l'absence d'un analyte. La chimie analytique, quant à elle, englobe l'analyse chimique mais aussi l'ensemble des étapes qui vont permettre l'interprétation des résultats ou l'aide à la prise de décision : son but est alors de résoudre un problème posé.

Ainsi, le dosage du thymol dans un échantillon de NPV relève de l'analyse chimique simple. En revanche la recherche des méthodes les mieux adaptées pour l'évaluation et le contrôle de la qualité de la production de NPV repose sur la méthodologie de la chimie analytique (Feinberg, 1996).



Au cours de ce rapport, une veille scientifique sur la thématique sera réalisée dans laquelle il sera évoqué les différents principes et généralités sur le dosage par spectroscopie UV. Par la suite, les différents matériel et méthodes ainsi que leurs résultats seront présentés.

1 Chapitre 1 : Présentation de la société

1.1 Secteur d'activité de l'entreprise :

La société fondée par le Pr. Adnane Remmal, opère dans le secteur de l'alimentation animale, son activité majeure est la production des additifs pour produits vétérinaires servant essentiellement comme alternatives pour remplacer les antibiotiques et les agents antiparasitaires qui sont mis en cause dans plusieurs problèmes de santé animale et de santé publique pour leur toxicité, les résidus qu'ils peuvent générer dans les produits alimentaires d'origine animale et pour leur implication dans l'émergence de la résistance aux agents anti-infectieux.

1.2 Fiche technique de l'entreprise :

Le tableau ci-dessous représente la fiche technique de la société LIAV.

Tableau 1: Fiche technique de l'entreprise LIAV.

Fiche technique de la société	
Dénomination	Laboratoire Industriel d'Alternatives Vétérinaires « LIAV »
Raison sociale	Société à Responsabilité Limitée (SARL)
Date de création	28 Septembre 2016
Siège sociale	N°8 Av. Patrice Lomomba Résidence AL OFOQ 1 ^{er} étage bureau 11- Fes
Capital	100 000 DH

1.3 Produits commercialisés par LIAV :

- Natural Promotor Volailles (NPV) :

NPV est une poudre fine argileuse de couleur brune. Il est constitué exclusivement d'huiles essentielles intercalées entre les feuillets d'argile.

NPV est constitué de deux familles de principes actifs :

Des huiles essentielles : ayant un effet anticoccidien, promoteur de croissance et immunostimulant. Les molécules constituantes des huiles essentielles sont éliminées par trois voies : urinaire, hépatobiliaire et respiratoire. Ceci leur confère des effets hépato-protecteurs, diurétiques et antiseptiques pulmonaires.

Des argiles variées : pansement gastriques et intestinaux et fixateurs de mycotoxines et de toxines diverses.

Le Procédé breveté d'intercalation permet de stabiliser les huiles essentielles durant la fabrication et le stockage de l'aliment et de stopper la prolifération des moisissures. Une fois l'aliment hydraté dans le tube digestif, les argiles se gonflent libèrent les huiles essentielles qui agissent au niveau de l'intestin avant de passer dans la circulation sanguine. Les argiles restent dans le tube digestif pour protéger la muqueuse intestinale et fixer les toxines.

- NP eau de boisson

NP eau de boisson est une poudre granuleuse effervescente, allant du blanc au blanc cassé. C'est un additif vétérinaire multi actif à base de substances naturelles. NP eau de boisson est constitué de deux familles de principes actifs :

- Des huiles essentielles.
- Des supports minéraux.

- NP Rumen

NP Rumen est un additif alimentaire à base de substances naturelles pour grands et petits ruminants, modulant les microorganismes du rumen. Il est indiqué pour le renforcement des performances zootechniques (croissance, production laitière), la stimulation du système immunitaire et la réduction de la production du méthane (jusqu'à 30%).

NPV, NP eau de boisson et NP Rumen peuvent être conservés pendant 12 mois à partir de la date de fabrication dans son emballage d'origine resté hermétiquement fermé et placé dans un endroit sec et à une température inférieure à 25°C.

2 Chapitre 2 : Synthèse bibliographique sur la spectroscopie.

2.1 La spectroscopie.

2.1.1 Histoire de la spectroscopie :

En 1672, *NEWTON* montre que la lumière blanche est hétérogène ; elle est décomposée par le prisme en lumières colorées homogènes caractérisées par leur degré de réfrangibilité (indice). Du point de vue de la spectroscopie, l'expérience la plus intéressante est relatée dans son «Traité d'optique» où il fait remarquer l'importance de la dimension du diaphragme sur la «pureté» (séparation) des images de différentes couleurs. Les expériences faites au cours du XVIIIe siècle sont des reconstitutions fidèles des expériences de *NEWTON*.

Il faut attendre le début du XIXe siècle pour que naisse véritablement la spectroscopie. En 1800, *W. HERSCHELL* déplace un thermomètre dont le réservoir est noirci, dans le spectre solaire et constate que l'échauffement s'étend, du côté du rouge, bien au-delà du violet du spectre. Ainsi en 1802 on connaissait l'existence de ce que l'on appelle aujourd'hui l'infrarouge et l'ultraviolet. Entre 1826 et 1859, le problème des spectres est posé de façon très différente. Jusqu'en 1834, les dispositifs expérimentaux sont très rudimentaires et les observations, essentiellement qualitatives, n'ont pas la précision de celles qui ont été faites par *FRAUNHOFER*. Il faut attendre les années 1840 - 1850 pour que les montages utilisés soient performants et permettent de mieux définir les «objets» que l'on étudie. A partir de 1861 commence une longue série de travaux descriptifs destinés à définir précisément les spectres d'émission des différents éléments. En 1874, *LECOQ DE BOIBAUDRAN* (le découvreur du gallium en 1875) publie un ouvrage remarquable sur les « spectres lumineux » destinés aux recherches en chimie minérale fournit aux chimistes non spécialistes un guide clair et précis. La méthode peut être utilisée facilement pour mettre en évidence pratiquement tous les éléments. (Alain Brémond, 2008)

2.1.2 Généralités sur les méthodes spectroscopiques :

Les méthodes spectroscopiques les plus couramment rencontrées en chimie sont les suivantes : spectroscopies infrarouge (IR) (Ryzkowski, 2001), spectrophotométrie ultraviolet visible, spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) (Canet et al., 2020), ou encore

spectroscopie de masse (SM) (Chapitre and Electrolytiques, n.d.) et spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE) (Bertrand, 2012).

L'objectif est de voir quelles sont les informations que l'on peut tirer des spectres obtenus avec chaque spectroscopie. Des spectres fournissent des informations sur la structure, d'autres sur la présence de groupes fonctionnels etc... De plus, certaines méthodes permettent un suivi quantitatif de réactions.

Les méthodes spectroscopiques sont des techniques basées sur l'interaction entre un photon et un atome ou plus généralement une molécule. L'énergie du photon est absorbée par la molécule qui se retrouve alors dans un état excité. Selon l'énergie du photon, plusieurs types de processus d'excitation peuvent être engagés. La mécanique nous a appris que les différentes particules du monde microscopique suivent des règles très précises : les sauts d'énergie sont quantifiés. Les particules sont au repos dans un niveau fondamental d'énergie E_1 , et se retrouvent ensuite par apport d'une énergie ΔE dans un niveau excité E_2 , Avec $\Delta E = E_2 - E_1$. (Cohen-Tannoudji and Haroche, 1969)

2.2 Le dosage par spectrométrie d'absorption moléculaire :

Il existe plusieurs techniques de laboratoire pour le dosage et le contrôle de qualité d'un principe actif dans la matière première et le produit fini. Les plus courantes sont : la chromatographie en phase liquide à haute performance, la chromatographie en phase gazeuse et la spectrophotométrie d'absorption moléculaire. Ces méthodes diffèrent sensiblement quant à leurs capacités sur le plan analytique (par exemple limites de détection, exactitude), leurs coûts (coût d'achat et coût d'entretien du matériel, infrastructure nécessaire, réactifs et fournitures diverses) et leurs exigences techniques (par exemple préparation des échantillons, étalonnage, qualification du personnel). Ces facteurs vont, parallèlement à des considérations tenant à la situation et aux ressources du laboratoire, influencer la décision de choisir telle ou telle méthode.

Dans notre cas, la spectrophotométrie d'absorption moléculaire est la méthode choisie pour effectuer le dosage du thymol. (Aissani, 2021)

2.2.1 Définition :

La spectrophotométrie correspond à l'étude des variations de grandeurs photométriques spectrales ou de leur équivalent énergétique résultant de l'interaction du rayonnement avec une substance placée sur le faisceau (Vaubourdolle, 2007). Le domaine de longueur d'onde de l'UV

se situe entre 10 nm à 400 nm, celui du visible se situe entre 400 nm à 800 nm (Kuss, 2010).

Le thymol absorbe dans le domaine 200nm à 400nm ce qui sera le domaine de notre étude.

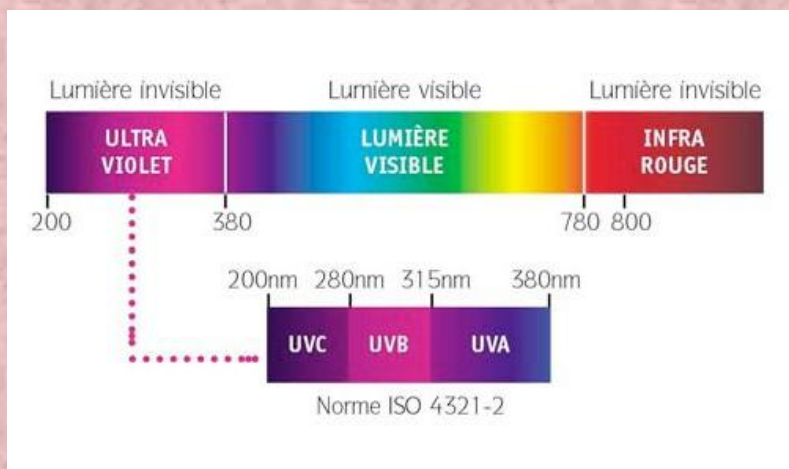


Figure 1: Spectre électromagnétique de la lumière et domaine UV-Visible.

En spectrophotométrie d'absorption moléculaire, on sélectionne des photons de fréquence ν_0 absorbables par la molécule à étudier. Ainsi, lorsqu'un faisceau d'intensité I_0 traverse une solution de molécule absorbante, le faisceau transmis présente une intensité I inférieure à I_0 (Camut, 2009).

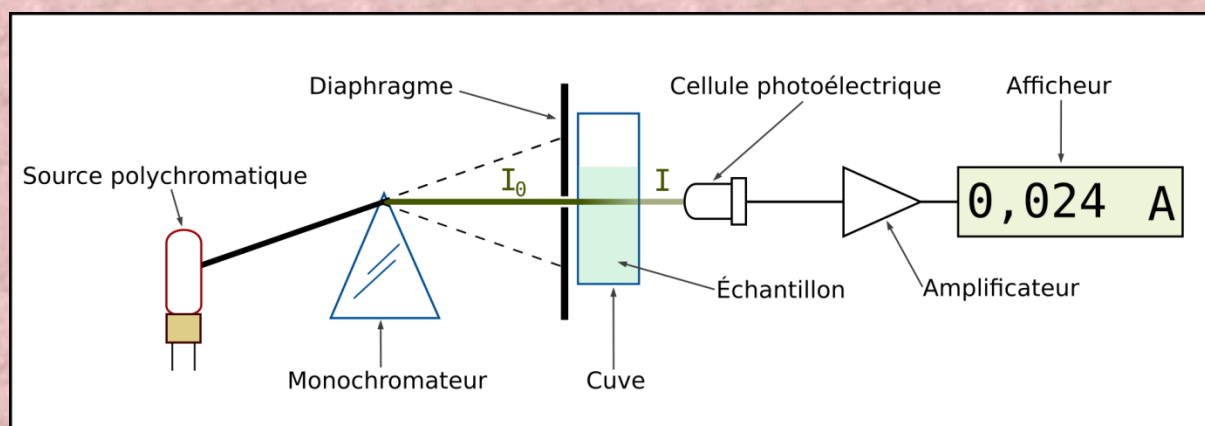


Figure 2: Principe de la spectrophotométrie d'absorption moléculaire (Camut, 2009)

2.2.2 Mesure de l'absorbance :

Les applications analytiques de la spectrophotométrie d'absorption moléculaire UV-visible concernent les molécules en solution ; elles peuvent être qualitatives ou (et) quantitatives. Dans les deux cas, elles font appel à la loi de Beer-Lambert qui établit la relation existante entre intensité transmise I et intensité incidente I_0 . Il a été démontré que :

$$I = I_0 e^{-KCL}$$

I : intensité de la lumière transmise

I_0 : intensité incidente de la lumière traversée

K : constante de proportionnalité

C : concentration de la solution en soluté absorbant

L : épaisseur de la solution traversée par le flux lumineux

Le phénomène d'absorption ne peut être évalué que par le rapport entre intensité incidente I_0 et intensité transmise I du faisceau transmis dans la même direction. L'absorbance (A) ou densité optique (DO) est défini par :

$$A = \log (I_0/I) = \epsilon \cdot l \cdot C$$

Où : ϵ est le coefficient d'extinction de la molécule, qui s'exprime de façon différente selon les unités choisies pour exprimer la concentration (Rouessac et al., 2019).

2.2.3 Aspect quantitatif :

La loi de Beer-Lambert se prête à l'analyse quantitative dans la mesure où le signal mesuré l'absorbance (A) est proportionnel à la concentration en soluté absorbant de la solution. La validité de la loi de Beer Lambert n'est vraie que dans certaines conditions :

- Une lumière monochromatique
- Une concentration plutôt faible
- Absence de fluorescence et diffusion négligeables (hétérogénéité)
- La substance ne doit pas donner lieu à des réactions chimiques sous l'effet du rayonnement incident
- La substance ne doit pas donner lieu à des associations variables avec le solvant.

Par ailleurs, lorsque plusieurs substances absorbantes sont présentes en solution, on observe une additivité des phénomènes (Meyer et al., 1996).

✚ La **méthode de spectrophotométrie** est très fréquemment utilisée en raison de ses nombreux avantages : elle est facile à mettre en œuvre, elle permet d'étudier des molécules biologiques en solution et de déterminer leur concentrations, elle ne nécessite que des mesures simples et elle peut également permettre de tester un ensemble de paramètres annexes, tels que la température, le pH, etc. On utilise en général une **spectrophotométrie UV**, laquelle permet aussi de mesurer l'absorbance de gaz ou de solides bien que cela soit

plus rare que des solutions. Toutefois, l'absorption UV-visible n'est pas un test spécifique pour tout composé, car il peut être perturbé par divers éléments, comme la nature du solvant, le pH de la solution, sa température, la présence d'impuretés. (Bv and Hydraulics, 2000)

2.3 Identification et dosage des terpènes :

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) a été utilisée pour déterminer la composition chimique des terpènes. A titre d'exemple, nous pouvons citer le thym (p-cymène, thymol). L'identification est faite en tenant compte des temps de rétention et des spectres de masse des étalons. L'analyse quantitative est menée sur les échantillons, d'une part par normalisation interne permettant le calcul de la composition centésimale de chaque composant identifié par rapport à l'ensemble des substances organiques dissoutes et présentes dans le chromatogramme, d'autre part sur un échantillon, par l'utilisation de la méthode à l'étalon interne permettant de déterminer la concentration exacte de chaque terpène dans l'hydrolat.

Le dosage par normalisation interne permet d'obtenir la composition centésimale de chaque terpène, celui par la méthode à l'étalon interne, la concentration de chaque terpène dans l'hydrolat. On prépare, d'une part, une dilution de l'hydrolat renfermant l'étalon interne et d'autre part une gamme d'étalonnage avec les terpènes et renfermant l'étalon interne. Après avoir calculé l'équation de la droite de régression pour l'étalonnage des terpènes, on tiendra compte du rapport des surfaces du pic de chaque terpène considéré par rapport à celui de l'étalon interne dans la dilution de l'hydrolat. Il est nécessaire, au cours d'un essai préliminaire, d'identifier les terpènes présents dans l'hydrolat et de vérifier que leur teneur est supérieure à la limite de détection. (Kaloustian et al., 2008)

- Thymol :

Le thymol $C_{10}H_{14}O$ (2-isopropyl-5-méthylphénol) est une substance cristalline blanche à l'odeur aromatique agréable et aux fortes propriétés antiseptiques. (Malkar and Yadav, 2017). Cette molécule possède une large gamme d'activités antioxydants, conservateur antimicrobien, antiseptique, antitussif, expectorant et antispasmodique (Singh). Le thymol appartenant au groupe des terpénoïdes, est un monoterpène cyclique possédant une fonction phénol.

Différentes méthodes ont été rapportées pour la détermination du thymol, dont la chromatographie en phase gazeuse, la chromatographie en phase liquide, HPLC, RV-HPLC, HPLC-ED et voltampérométrie différentielle à impulsion. (Marion, 2019)

Etude sur le contrôle qualité du produit NPV

3 Chapitre 3 : Matériel et méthodes.

Au cours de ce chapitre, nous présenterons les méthodes et les dispositifs utilisés pour le contrôle qualité de NPV (produit fini) plus précisément la détermination et le dosage du principe actif (Thymol) afin de vérifier la conformité des lots.

L'étude est réalisée en utilisant deux types de solvants : le chloroforme (solvant polaire) et l'éthanol (solvant apolaire).

N.B. : - Toutes les mesures sont répétées trois fois.

- Les concentrations sont exprimées en pourcentage massique.

3.1 Spectre d'absorption

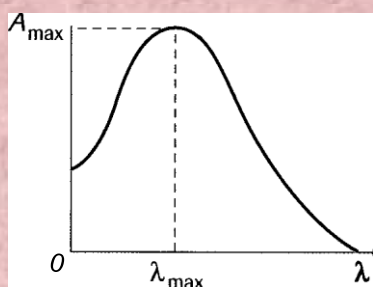


Figure 3: Spectre d'absorption

On cherche à déterminer la longueur d'onde λ_{max} pour laquelle un maximum d'absorption est obtenu. Pour ce faire, le spectre d'absorption de la solution contenant le soluté à titrer est tracé, c'est-à-dire la représentation graphique $A = f(\lambda)$. C'est cette longueur d'onde que l'on choisit pour réaliser le titrage. (Bv and Hydraulics, 2000)

o Mode opératoire :

Les spectres d'absorptions ont été réalisés à l'aide de deux solvants : chloroforme (solvant A polaire) et éthanol (solvant B apolaire).

Une solution de 10% de thymol a été préparée : 1g de thymol est pesé à l'aide d'une balance ensuite dilué dans 9ml de solvant et la solution est ensuite agitée à l'aide d'un vortex et mise dans un bain-marie à l'aide d'une plaque chauffante pendant 10min jusqu'à dissolution complète des cristaux de thymol (cette étape est sautée en utilisant le chloroforme car le thymol

est très soluble dans ce dernier). La mesure de l'absorbance de la solution sera effectuée dans le domaine UV (entre 200nm et 400nm) car le thymol absorbe dans ce domaine. Dans la première cuve, le blanc (solvant A ou B) est versée dans une cuve en quartz, ensuite elle est placée dans l'appareil et une touche permet de régler la valeur de l'absorbance à zéro et d'afficher zéro sur le spectrophotomètre. Ce réglage doit être effectué chaque fois que la longueur d'onde de la lumière sélectionnée change. La solution préparée est versée dans la deuxième cuve et nous procédons à mesurer son absorbance entre $200\text{nm} < \lambda < 400\text{nm}$.

Afin de s'assurer de l'homogénéité du mélange, une observation microscopique a été effectuée.

3.2 Courbe d'étalonnage.

Une série de solutions (contenant différentes concentrations du soluté à titrer) a été préparée puis placée à la longueur d'onde λ_{max} , afin de mesurer l'absorbance de chaque solution. Une représentation graphique a été tracé par la suite $A = f(c)$.

Si la loi de Beer-Lambert est bien respectée, on obtient une droite passant par l'origine. (Bv and Hydraulics, 2000)

Mode opératoire :

Une série de solutions de différentes concentrations du Thymol ont été préparées de volume total $V_T=5\text{ml}$. Deux séries de solutions ont été préparées : le solvant de la première série est le chloroforme et de la deuxième l'éthanol. Les solutions ont été ensuite bien agitées à l'aide d'un vortex. Ensuite, le spectrophotomètre est réglé à λ_{max} et l'absorbance de chaque solution est mesurée.

3.3 Test de fiabilité.

Pour tester la fiabilité de la méthode utilisée, nous avons utilisé deux autres méthodes. En premier temps, nous avons préparé des solutions de Thymol (solutions A et solutions B) à des concentrations connues (2,5%, 5%, 7,5%, 10%). Le solvant utilisé dans les solutions A est le chloroforme, tandis que le solvant utilisé dans les solutions B est l'éthanol.

En second temps, nous avons fabriqué le produit NPV à échelle laboratoire à différentes concentrations de Thymol (5%, 10%, 15%).

Mode opératoire :

-Première méthode :

Une série de solutions est préparée de différentes concentrations de thymol connues (2,5%, 5%, 7,5%, 10%) de volume total $V_T=5\text{ml}$ et de dilution 1/10 dans les deux solvants choisis : solvant A (chloroforme) et solvant B (éthanol). Les solutions sont bien agitées ensuite le spectrophotomètre est réglé à λ_{max} équivalente à chaque solvant et l'absorbance de chaque solution est mesurée.

-Deuxième méthode :

Les quantités de thymol et de poudres sont pesées, mélangées et préparées selon un procédé établie par la société (le procédé de fabrication est confidentiel). Une dilution de 1/10 est réalisée : 1g du produit (5%, 10%, 15%) est pesé, 9ml du solvant est mesuré et ils sont ajoutés dans les tubes, le mélange est agité à l'aide d'un vortex puis centrifugé pendant 10min et son absorbance a été mesurée par la suite. Pour le produit à 15% de Thymol, une dilution de 1/100 a été effectuée.

3.4 Comparaison du test de fiabilité avec la méthode adoptée par la société.

✚ Mode opératoire du test adopté par la société :

Pour contrôler la concentration du thymol contenue dans les sachets produits de NPV. Le service qualité de LIAV a adopté une technique qui est la suivante :

1g de produit NPV est pesé ensuite dilué dans 3ml de chloroforme. Le mélange est agité à l'aide d'un vortex et centrifugé pendant 10min. Nous mesurons 1ml du surnageant et nous le versons dans une boîte de pétri sous la hotte. Une fois le chloroforme évaporé, le thymol cristallisé est finalement pesé.

La concentration en % du Thymol est calculée par la formule suivante :

$$\% [C_{10}H_{14}O] = m_{C_{10}H_{14}O} \times 3 \times 100 \quad (1)$$

Ce test est également effectué pour les solutions 2,5% ; 5% ; 7,5% ; 10%.

✚ Mode opératoire du contrôle de la stabilité de la concentration en thymol dans NPV :

Pour contrôler la stabilité de la concentration du Thymol dans le produit NPV au fil des années : 2019, 2020, 2021, 2022, nous allons effectuer un dosage spectrophotométrique :

Une solution mère de 10% en produit NPV et d'un $V_T=5\text{ml}$ est préparé dans du chloroforme pour chacun des lots. Une série de dilution est effectuée et l'absorbance est mesurée pour chaque solution fille. A l'aide de la courbe d'étalonnage, il suffit de repérer l'absorbance trouvée et de reporter la mesure sur la droite.

4 Chapitre 4 : Résultats et discussions.

Au cours de ce chapitre, les différents résultats obtenus durant l'étude du contrôle qualité du produit NPV sont présentés.

4.1 Spectre d'absorption :

- *Chloroforme* :

Les résultats obtenus du spectre d'absorbance dans l'UV sont présentés dans la figure 5 :

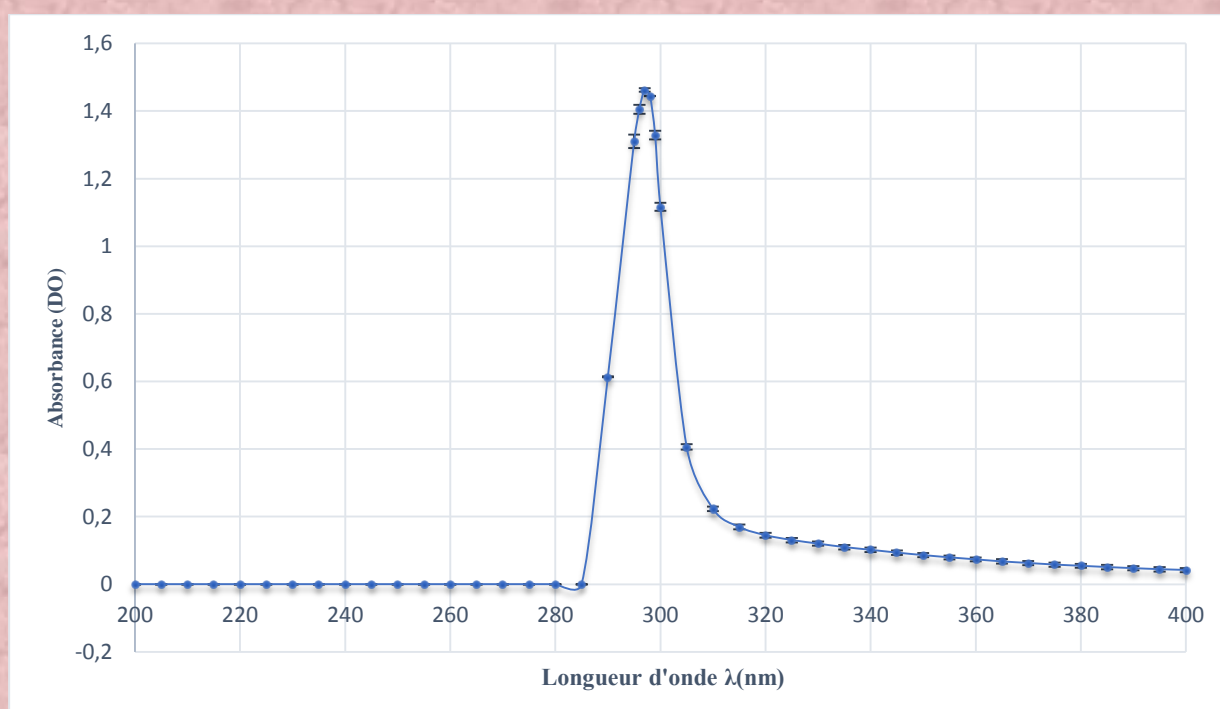


Figure 4: Spectre d'absorption du chloroforme.

Les résultats montrent que le pic correspond à $\lambda_{max}=297$. Contrairement aux travaux réalisés par Naser Abdulhasan qui a trouvé que $\lambda_{max}=260$ (Naser et al., 2015).

- *Ethanol* :

Les résultats obtenus du spectre d'absorbance dans l'UV sont présentés dans la figure 6 :

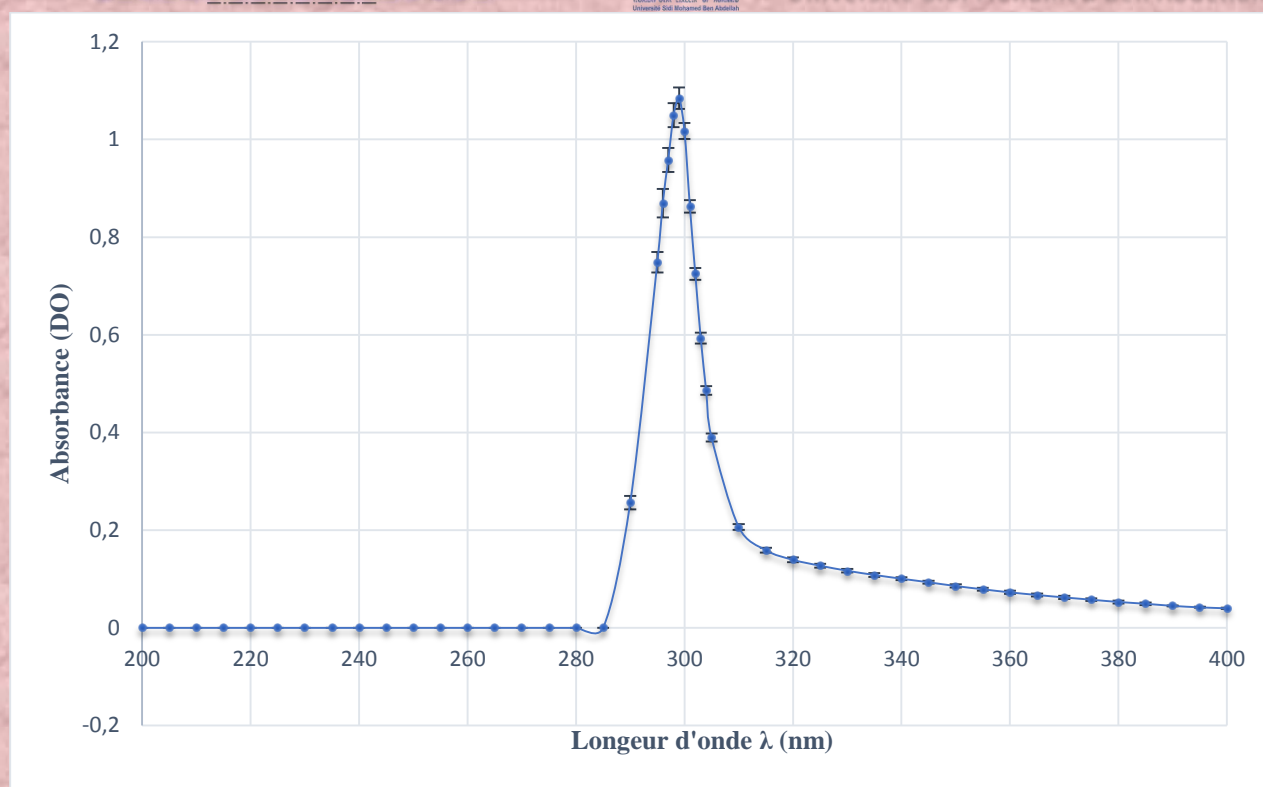


Figure 5: Spectre d'absorbance de l'éthanol.

Nous trouvons d'après les résultats que le pic correspond à $\lambda_{max}=297$. Contrairement aux résultats obtenus par Naser Abdulhasan qui a trouvé que $\lambda_{max}=270$ (Naser et al., 2015).

Le spectrophotomètre a donné les variations de l'absorbance A en fonction de la longueur d'onde d'excitation. Les deux spectres ainsi obtenus constituent une empreinte du composé absorbant bien que plusieurs chromophores présentent des bandes d'absorption assez larges et donc pas assez riches en informations structurales. Par ailleurs un étalonnage permet de remonter la valeur de la concentration C du composé absorbant (thymol) et par conséquent son dosage dans une solution donnée.

4.2 Courbe d'étalonnage :

- Chloroforme :

Le tableau suivant illustre les différentes mesures et pesés qui ont servi à la préparation des solutions à différentes concentrations en thymol dans du chloroforme :

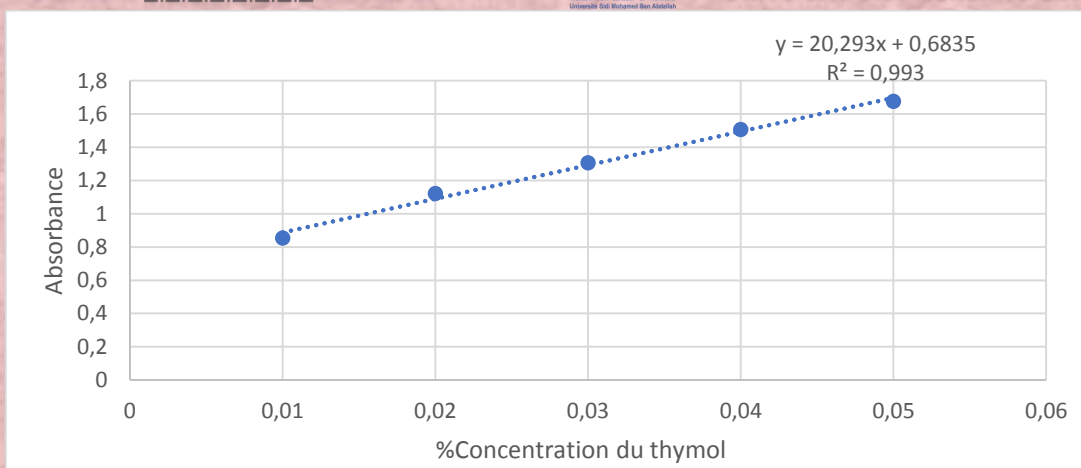


Figure 7: Courbe d'étalonnage du thymol dans le chloroforme (entre 1% et 5%).

La concentration est proportionnelle à l'absorption dans ce domaine. Nous allons utiliser la droite de régression linéaire simple qui représente une prédiction pour toutes les concentrations que nous souhaitons déterminer.

- Ethanol :

Le tableau suivant illustre les différentes mesures et pesés qui ont servi à la préparation des solutions à différentes concentrations en thymol dans du chloroforme :

Tableau 3: Concentration de Thymol en %, sa masse mesurée et le volume de l'éthanol correspondants.

$[C_{10}H_{14}O]\%$	$m_{C_{10}H_{14}O}(g)$	$V_{C_2H_5OH}(ml)$
2,5%	0,05	4,95
5%	0,1	4,9
7,5%	0,15	4,85
10%	0,2	4,8
12%	0,25	4,75

- Les mesures des solutions de concentrations entre 2,5% et 12% nous ont permis de trouver les résultats présentés dans le graphique suivant (Figure 9) :

Tableau 4 : Les masses de thymol et les volumes des solvants correspondants.

Solutions A	$m_{C_{10}H_{14}O}(g)$	$V_{CHCl_3}(ml)$	Solutions B	$m_{C_{10}H_{14}O}(g)$	$V_{C_2H_5OH}(ml)$
$A_1 = 2,5\%$	0,125	4,875	$B_1 = 2,5\%$	0,125	4,875
$A_2 = 5\%$	0,25	4,75	$B_2 = 5\%$	0,25	4,75
$A_3 = 7,5\%$	0,375	4,625	$B_3 = 7,5\%$	0,375	4,625
$A_4 = 10\%$	0,5	4,5	$B_4 = 10\%$	0,5	4,5

Les résultats des mesures sont résumés dans les tableaux suivants pour les solutions A et B :

Tableau 5 : Concentrations en % trouvées des solutions A et B.

% [$C_{10}H_{14}O$]	% [$C_{10}H_{14}O$]des solutions A.	% [$C_{10}H_{14}O$] des solutions B.
2,50%	$A_1 = 1,786 \pm 0,035$	$B_1 = 2,061 \pm 0,243$
5%	$A_2 = 4,117 \pm 0,066$	$B_2 = 5,351 \pm 0,062$
7,50%	$A_3 = 7,349 \pm 0,028$	$B_3 = 8,004 \pm 0,06$
10%	$A_4 = 9,924 \pm 0,059$	$B_4 = 9,976 \pm 0,095$

Les résultats obtenus avec les deux solvants sont très proches l'un de l'autre ainsi que de la concentration du thymol initialement introduite. L'accroissement des valeurs des concentrations peut être expliqué par le fait que les solvants utilisés sont hautement volatils et donc la concentration est susceptible de croître. Les résultats obtenus avec le chloroforme sont les plus exacts.

- ✓ Deuxième méthode :
- Chloroforme :

Les résultats suivants montrent la concentration du thymol après 1h et 1j de préparation :

Tableau 6: Résultats du dosage du thymol dans le produit fabriqué à l'échelle laboratoire après 1h et 1j

Le temps % [C ₁₀ H ₁₄ O]	1h Concentration du thymol trouvée en %	1 jour Concentration du thymol trouvée en %
5%	-0,692	4,968±0,677
10%	-0,256	10,169±0,670
15%	-0,229	13,301±0,068

Les résultats obtenus des concentrations après 1h sont négatifs et n'appartiennent pas à la gamme d'étalonnage donc non significatifs. Après 1 jour, les résultats obtenus sont plus significatifs pour les produits 5% et 10% que pour le produit 15%. Ce résultat indique qu'il faut réaliser plus d'essais car il y'a eu une saturation de la solution ce qui suggère d'essayer de nouvelles dilutions.

D'où l'idée de faire un suivi cinétique, pour trouver à quel moment nous commençons à avoir des résultats correctes. Ainsi que d'essayer de trouver une nouvelle dilution convenable vu que nous n'avons pas trouvé de résultats fiables pour la concentration 15%.

Au bout de 3h30min, des résultats significatifs sont atteints pour les deux produits à 5% et 10% avec une dilution de 1/10 mais toujours pas pour le produit à 15%. Ce dernier est dilué davantage (1/100) pour trouver le résultat souhaité. Le tableau suivant présente les résultats de chacune des dilutions :

Tableau 7: Concentrations trouvées des produits fabriqués à l'échelle laboratoire à différentes concentrations.

% [C ₁₀ H ₁₄ O]	Concentration du thymol trouvée en %
5% (1/10)	4,962±0,213
10%(1/10)	9,988±0,067
15%(1/100)	14,072±0,037

Le suivi cinétique a montré que la réaction d'extraction du thymol par le chloroforme n'est pas immédiate et qu'il faut du temps pour que le solvant extrait le thymol infiltré dans l'argile.

Les tests des produits à 5% et 10% à une dilution de 1/10 ont permis d'avoir des résultats corrects pour les produits à 5% et 10%. Par contre, il a fallu augmenter la dilution (1/100) pour

obtenir des résultats proches de la concentration du produit à 15%. Il peut être déduit du résultat de la concentration du produit à 15% n'est pas exacte. Ceci peut être expliqué par le fait que la loi de Beer-Lambert n'est valable que pour les **faibles concentrations** et en général pour des absorbances inférieures à 2. Ainsi qu'il peut y'avoir le problème d'homogénéité du produit puisque qu'il a été fabriqué à l'échelle laboratoire ce qui a entraîné des résultats faussés.

- *Ethanol* :

Pour tester la capacité de l'éthanol à extraire le thymol plusieurs essais ont été réalisés avec des dilutions (1/5, 1/10, 1/100). Ces dilutions n'ont pas permis d'extraire le thymol, un extrait des résultats de la dilution 1/100 est présenté dans le tableau 8 :

Tableau 8: Concentrations trouvées des produits fabriqués à l'échelle laboratoire à différentes concentrations.

% [$C_{10}H_{14}O$]	Concentration du thymol trouvée en %
5%	0,037±0,046
10%	0,248±0,009
15%	0,307±0,006

D'après ces résultats, on peut conclure que :

- Les courbes d'étalonnages établies sont fiables.
- L'extraction du thymol par le solvant chloroforme qui a été réalisée est plus performante qu'en utilisant l'éthanol comme solvant. L'extraction du thymol du produit fabriqué à l'aide de l'éthanol n'a pas été réussie.

A cet égard, nous allons continuer nos tests en utilisant le chloroforme uniquement comme solvant.

4.4 Comparaison du test de fiabilité avec la méthode adoptée par le laboratoire :

- Tests sur les solutions de différentes concentrations :

Ce test sera effectué sur les solutions 2,5% ; 5% ; 7,5% ; 10% de thymol. Les résultats sont trouvés en appliquant l'équation 1.

Il faut noter que la méthode 1 est le test de fiabilité et la méthode 2 est celle adoptée par le laboratoire.

Conclusion et perspectives.

Le fruit de l'étude du contrôle de la qualité du produit NPV s'est concrétisé par de nombreux résultats. En guise de conclusion, on note que :

- La loi de Beer-Lambert a été vérifiée pour les deux solvants, à savoir : chloroforme et éthanol.
- Le solvant le plus adéquat est le chloroforme malgré sa toxicité et la difficulté de sa manipulation.
- Il est parfois nécessaire de réaliser des dilutions pour rester dans le domaine linéaire de la courbe d'étalonnage.
- La méthode proposée est simple et facile à appliquer mais elle est très sensible pour les échantillons de forte concentration, notamment les échantillons dont l'absorbance est supérieure à 2. Cette sensibilité peut être justifiée par la saturation des échantillons ainsi que la probabilité d'absorption.

Par faute de temps consacré à ce travail, ce dosage spectrophotométrique pourrait être amélioré en utilisant des additifs (Liesegang et al., 1986) tels l'hydroxy propyl méthyle cellulose (HPMC) ou bien l'éthyle cellulose (EC) pour une meilleure absorbance (Zamani et al., 2015). Plus favorablement, mettre à exécution d'autres techniques analytiques plus redondantes. Nous pouvons évoquer : les méthodes chromatographiques, ou bien les titrages volumétriques basés sur des réactions acido-basiques, de précipitations, de complexation ou d'oxydoréduction. Le point de fin de titrage est déterminé par un indicateur coloré ou par potentiométrie (Azzouz, L.2019). On peut citer à titre d'exemple le travail mené par Salih T. Al-Ramadhani qui a réalisé une détermination spectrophotométrique du thymol dans les produits pharmaceutiques : Préparation par réaction de diazotation avec la 4-aminoacétophénone (T. Al-Ramadhani, 2014). Ce travail est une initiation à la recherche scientifique, qui nous permettra par la suite de concevoir et d'élaborer à l'aide des connaissances accumulées durant ce stage de nouvelles méthodes et stratégies pour examiner les phénomènes, résoudre les problèmes et faire plus d'investigations pour obtenir des réponses rigoureusement. Bachelard, cité par SEM MBIMBI (2017) disait déjà « *Pour un chercheur toute connaissance est une réponse à une question, s'il n'y a pas de question, il ne peut y avoir de connaissance scientifique, rien ne va de soi, rien n'est donné, tout est construit* »

Références.

- Aissani, I., 2021. Développement et validation d'une nouvelle méthode du dosage d'un principe actif dans une forme pharmaceutique. Université jijel.
- Alain Brémond, 2008. La préhistoire de la spectroscopie 21.
- Bertrand, P., 2012. Spectroscopie de résonance paramagnétique électronique. EDP sciences.
- Bv, D.C., Hydraulics, D., 2000. Absorption spectroscopy.
- Canet, D., Boubel, J.-C., Canet-Soulas, E., 2020. La RMN concepts, méthodes et applications. Chapitre, I.V., Electrolytiques, S., n.d. Chimie organique-Université de M'sila.
- Cohen-Tannoudji, C., Haroche, S., 1969. Absorption et diffusion de photons optiques par un atome en interaction avec des photons de radiofréquence. Journal de Physique 30, 153–168.
- Feinberg, M., 2004. Validation des méthodes d'analyse - Une approche de l'assurance qualité au laboratoire, Technique et ingénierie. Dunod.
- Feinberg, M., 1996. La validation des méthodes d'analyse. Une approche chimométrique de l'assurance qualité au laboratoire. Elsevier Mason.
- Kaloustian, J., Mikail, C., Abou, L., Vergnes, M.-F., Nicolay, A., Portugal, H., 2008. Nouvelles perspectives industrielles pour les hydrolats. Acta Botanica Gallica 155, 367–373.
- Kuss, D., 2010. Gestion intégrée de rejets d'assainissement: applicabilité de la mesure de pollution par spectrophotométrie UV/Visible et des techniques d'identification de système. Strasbourg.
- Liesegang, T.J., Bourne, W.M., Ilstrup, D.M., 1986. The use of hydroxypropyl methylcellulose in extracapsular cataract extraction with intraocular lens implantation. American journal of ophthalmology 102, 723–726.
- Malkar, R.S., Yadav, G.D., 2017. Selectivity engineering in synthesis of thymol using sulfated ZrO₂-TiO₂. Industrial & Engineering Chemistry Research 56, 8437–8447.
- Marion, D., 2019. Le thymol : sources, propriétés et applications 91.
- Martel, J.L., Chaslus-Dada, E., 2000. L'UTILISATION DES ANTIBIOTIQUES CHEZ LES ANIMAUX 5.
- Naser, N.A., Muhammad, K.M., Ameer, A.H., Zahraa, K.S., 2015. Solvent effects on the electronic absorption spectra of thymol. Chem Educat 20, 176–82.
- Ryczkowski, J., 2001. IR spectroscopy in catalysis. Catalysis Today 68, 263–381.
- Sanders, P., 2010. Résistance aux antibiotiques chez les bactéries d'origine animale: Actions en cours dans le secteur vétérinaire. Med Sci (Paris) 26, 930–935.
<https://doi.org/10.1051/medsci/20102611930>
- T. Al-Ramadhani, S., 2014. Spectrophotometric Determination of Thymol in Pharmaceutical Preparation via Diazotization Reaction with 4-aminoacetophenone. RJS 25, 44–56.
<https://doi.org/10.33899/rjs.2014.88567>
- Zamani, Z., Alipour, D., Moghimi, H.R., Mortazavi, S.A.R., Saffary, M., 2015. Development and Evaluation of Thymol Microparticles Using Cellulose Derivatives as Controlled Release Dosage Form 10.
- Vaubourdolle, M. (2007). Toxicologie, sciences mathématiques, physiques et chimiques. Wolters Kluwer France.

- Kuss, D. (2010). Gestion intégrée de rejets d'assainissement : applicabilité de la mesure de pollution par spectrophotométrie UV/Visible et des techniques d'identification de système (Doctoral dissertation, Strasbourg).
- Camut, A. (2009). Mise en place du contrôle terminal des préparations d'anticancéreux injectables par spectrométrie UV-visible-IRTF, Multispec® à l'Unité de Pharmacie Clinique et Cancérologique de l'Hôpital Bon Secours de Metz: aspects analytiques et organisationnels (Doctoral dissertation, UHP-Université Henri Poincaré).
- Rouessac, F., Rouessac, A., Cruché, D., Duverger-Arfuso, C., Martel, A. (2019). Analyse chimique-9e éd.: Méthodes et techniques instrumentales. Dunod.
- Azzouz, L. (2019). Contrôle qualité matière première/produit fini.
- SEM, MBIMBI, P. et CORNET, A. (2017). Méthodes de recherche en sciences économiques et de gestion : Guide d'accompagnement pour la réalisation de la thèse, le mémoire ou le travail de fin de cycle. Lubumbashi, PUL.