

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR, DE LA

MINISTERE DE LA SANTE

RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET DE L'INNOVATION

UNIVERSITE POLYTECHNIQUE DE BOBO-DIOULASSO

LABORATOIRE NATIONAL DE SANTE

(UPB)

PUBLIQUE (LNSP)



RAPPORT DE FIN DE CYCLE

Présenté par :

KAMBOU Adama

Pour l'obtention du diplôme de

LICENCE PROFESSIONNELLE EN GENIE BIOLOGIQUE, OPTION :

AGROALIMENTAIRE

Sur le thème :

**Evaluation de la teneur en caféine par HPLC de
quelques produits consommés au Burkina Faso**

Soutenu le 30 janvier 2016

Devant le jury composé de :

Président : **Dr Younoussa MILLOGO**, Maitre de conférence de chimie, Université

Polytechnique de Bobo-Dioulasso

Membres : **Dr Constantin DABIRE**, Maitre-assistant de chimie, Université Polytechnique

de Bobo-Dioulasso, Directeur de rapport

M. Raoul BAZIE, Ingénieur en agroalimentaire, Laboratoire National de Santé

Publique, Directeur de stage

Table des matières

DEDICACE.....	I
REMERCIEMENTS	II
LISTE DES TABLEAUX.....	III
LISTE DES FIGURES.....	IV
SIGLES ET ABREVIATIONS	V
RESUME.....	VI
ABSTRACT.....	VII
Introduction	1
STRUCTURE D'ACCEUIL	3
I. Présentation du Laboratoire National de Santé Publique (LNSP).....	4
II. Présentation et mission de la DCANA	5
Première partie : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	6
Chapitre 1 : PRESENTATION ET PROPRIETES DE LA CAFEINE.....	7
I. Historique et différentes sources	7
I.1. Historique	7
I.2. Principales sources de caféine	7
II. Caractéristiques physico-chimiques	9
Chapitre 2 : EFFETS DE LA CAFEINE SUR LA SANTE.....	11
I. Mode d'action de la caféine	11
II. Effets sur la santé de l'organisme.....	12
II.1. Effets physiologiques.....	12
II.2. Risques d'intoxication	13
II.3. Risques par groupes de personnes sensibles	14
III. Interaction entre la caféine et certaines substances	16
III.1. Caféine et médicaments	16
III.2. Caféine et alcool	16
IV. Réglementation.....	16
Chapitre 3 : TECHNIQUES ANALYTIQUES DE LA CAFEINE	21
I. Méthodes d'analyse de la caféine.....	21
I.1. Méthodes spectrophotométriques	21
I.2. Méthodes chromatographiques	21
I.3. Autres méthodes	22
II. Validation de méthodes d'analyse physico-chimiques.....	22

II.1. Définitions et objectifs d'une validation de méthode	22
II.2. Les paramètres de validation	23
II.3. Processus de validation d'une méthode d'analyse	24
DEUXIEME PARTIE : DOSAGE DE LA CAFEINE PAR HPLC	26
Chapitre 1 : MATERIELS ET METHODES	27
I. Matériels	27
I.1. Réactifs et solvants	27
I.2. Appareillage et conditions analytiques	27
II. Méthodes	28
II.1. Echantillonnage	28
II.2. Préparation des solutions	29
II.3. Préparation des échantillons	29
II.4. Modes opératoires	30
Chapitre 2 : RESULTATS ET DISCUSSION	31
I. Résultats	31
I.1. Résultats de l'étude des paramètres de la validation	31
I.2. Résultat de l'analyse des échantillons	35
II. DISCUSSION	42
II.1. Caractérisation de la teneur en caféine	42
II.2. Impact de la teneur en caféine sur la santé	43
CONCLUSION	44
REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE	45
ANNEXE	48

DEDICACE

Grâce soit rendue à Dieu le Père Tout Puissant, pour être demeuré en tout temps et en tout lieu ma Puissante Forteresse, mon Bouclier, mon Rocher en qui je me confie.

Je dédie ce travail :

A mes parents

Aujourd'hui vous représentez la principale raison qui justifie mon combat pour la réussite. Que Dieu vous accorde une longue vie et beaucoup de santé.

A mon frère Paul COULIBALY

Tes conseils et ton soutien ne m'ont jamais fait défaut. Ce travail est également le tien.

A mes frères, sœurs, cousins, neveux et nièces

En témoignage de tout ce que vous avez fait et continuez de faire pour moi. Soyez rassurés de ma reconnaissance.



REMERCIEMENTS

Nos sincères remerciements :

A Monsieur le Directeur Général du LNSP, Pr Maxime K. DRABO,

Grâce à vous nous avons pu bénéficier de ce stage. Sincères remerciements et profondes gratitude.

A Monsieur Eloi SANON, chef du Service de Toxicologie Alimentaire (STA)

Pour m'avoir accueillie dans son service.

A Monsieur Raoul BAZIE, technicien supérieur au LNSP, mon maitre de stage

Merci d'avoir initié et guidé avec rigueur ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de notre profond respect et notre admiration pour vos grandes qualités scientifiques et d'homme à objectifs. Hommage respectueux.

Au Docteur Constantin DABIRE, enseignant à l'UPB, mon Directeur de mémoire

Vous nous faites honneur en jugeant notre travail. Vos qualités humaines et scientifiques nous forcent admiration. Sincère reconnaissance.

A tout le personnel de la DCANA

Pour votre soutien et vos précieux conseils.

Au Professeur Georges Anicet OUEDRAOGO, Président de l'Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso ; et respectivement au professeur Sado TRAORE, directeur de l'UFR/ST ; et à tout le personnel enseignement de l'UFR/ST.

Vous qui ne ménagez aucun effort pour la bonne marche des activités à l'université et particulièrement à l'UFR/ST, je vous remercie.

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

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Teneur en caféine des différents types de cafés	8
Tableau 2: Principaux effets physiologiques de la caféine chez l'homme	13
Tableau 3: Signes toxiques engendrés par la caféine	14
Tableau 4: Teneur en caféine permise par Santé Canada pour les boissons énergisantes et les boissons gazeuses	18
Tableau 5: Limites recommandées de l'apport quotidien en caféine chez la population en bonne santé	19
Tableau 6: La teneur en caféine des différentes BDE échantillonnés	28
Tableau 7: Préparation des points de calibration	29
Tableau 8: Aire des pics pour la courbe de calibration	31
Tableau 9: Préparation des solutions pour la LD	32
Tableau 10: Aire des pics de la répétabilité et de la reproductivité	33
Tableau 11: Résultats de la répétabilité	34
Tableau 12: Résultats de la reproductibilité	34
Tableau 13: calcul du taux de récupération	35
Tableau 14: Résultats d'analyse des échantillons de cafés	36
Tableau 15: Résultats des échantillons de colas	37
Tableau 16: Résultats de l'analyse des boissons gazeuses	39
Tableau 17: Résultats des différentes boissons énergisantes	40
Tableau 18: Teneur en caféine des portions de boissons	41

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Structure de la caféine.....	9
Figure 2: Courbe de calibration de la caféine.....	31
Figure 3: Chromatogramme de la limite de détection.....	32
Figure 4: Comparaison de la teneur en caféine des cafés et colas.....	38
Figure 5: Comparaison de la teneur en caféine des différentes boissons.....	41
Figure 6: Principe de fonctionnement de la HPLC.....	48
Figure 7: Chromatogramme de la solution standard.....	48
Figure 8: Chromatogramme d'un échantillon de petit cola.....	49
Figure 9: Chromatogramme d'un échantillon de café.....	49
Figure 10: Chromatogramme d'un échantillon de XXL.....	50

SIGLES ET ABREVIATIONS

Ac :	Aire du pic de l'échantillon
A_{caf} :	Aire de pic de la solution standard
AMP_c :	Adénosine monophosphate cyclique
ATP :	Adénosine triphosphate
BDE :	Boisson Dite Energisante
C_c :	Concentration en caféine de l'échantillon
C_{caf} :	Concentration en caféine de la solution standard
CIO :	Comité Internationale Olympique
CLHP ou HPLC :	Chromatographie Liquide Haute Performance
CV :	Coefficient de Variation
DAD :	Diode Aray Detector
DCANA :	Direction du Contrôle des Aliments et de la Nutrition Appliquée
DJA :	Dose Journalière Admissible
EFSA :	European Food Safety Authority
EPSA :	Etablissement Public de Santé à caractère Administratif
FDA :	Food and Drug Administration
LD :	Limite de Détection
LNSP :	Laboratoire National de Santé Publique
LQ :	Limite de Quantification
Moy :	Moyenne
S :	Ecart type
SNC :	Système Nerveux Central
ST :	Solution de Travail
STA :	Service de Toxicologie Alimentaire
STD :	Solution standard
UPB :	Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso

RESUME

La caféine est une substance stimulante légalement consommée dans le monde. Les aliments et boissons contenant de la caféine occupent une place importante dans de nombreuses cultures. Bien que cette substance puisse produire un certain effet stimulant recherché, ses effets ne sont pas que positifs. Même lors d'une consommation modérée de caféine, certaines personnes peuvent ressentir des effets désagréables tels que : maux de tête, palpitations, agitation, irritabilité, nervosité, tremblements et troubles gastro-intestinaux.

Les objectifs visés par la présente étude étaient de doser la caféine dans différents boissons et aliments, qui peuvent en contenir, commercialisés au Burkina Faso et d'identifier les effets pervers de ce composé sur la santé de ces consommateurs en majorité jeunes.

La réalisation de ce travail a nécessité tout d'abord la mise en place de la méthode basée sur le principe de la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP). Les paramètres étudiés pour la validation sont : la linéarité, la fidélité (répétabilité et reproductivité), le taux de récupération ainsi que les limites de détection et de quantification. Ce travail de validation a été complété ensuite par l'analyse des échantillons.

Les résultats de l'étude permettent d'affirmer que la HPLC permet l'identification de la caféine. Les teneurs que nous avons trouvés pour les différents échantillons analysés varient respectivement pour les cafés de 700 à 4000 mg/Kg ; pour les colas de 440 à 500 mg/Kg ; celles des boissons à base de cola sont comprises entre 99 et 125 mg/L ; le moca café a une teneur d'environ 12 mg/L ; quant aux boissons énergisantes la teneur en caféine varie de 325 à 455 mg/L.

La plupart des boissons énergisantes ont une teneur en caféine supérieur à la réglementation fixée par l'Union Européenne. Les autres boissons gazeuses respectent la réglementation proposée par Santé Canada. Quant aux cafés et colas les consommateurs doivent savoir que ceux sont des sources naturelles de caféine.

Mots clés: CAFEINE-HPLC- VALIDATION

ABSTRACT

Foods and drinks that contain caffeine occupy an important place in many cultures. Caffeine is a stimulating substance legally consumed in the world. Although this substance can produce a certain sought-after stimulating effect, its effects are not only positive. Even at the time of a consumption curbed of caffeine, some people can feel unpleasant effects as: headaches, palpitations, agitation, fretfulness, jumpiness, tremors and gastro-intestinal unrests.

The objectives aimed by the present survey were to measure out caffeine in different drinks and foods, contain caffeine, merchandised in Burkina Faso and to identify the perverse effects of this compound on the health of these consumers in majority youngsters.

The realization of this work first of all required the setting up of the method based on the principle of the High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The parameters studied for validation are: the linearity and the repeatability and the reproductivity. We also established the limits of detection and quantification. This work of validation has been completed then by the analysis of the samples.

The results of the survey permit to affirm that the HPLC permits the identification of caffeine. Contents that we found for the different analyzed samples vary respectively for the coffees of 700 to 4000 mg/Kg; for colas of 440 to 500 mg/Kg; those of drinks based on cola are between 99 and 125 mg/L; moca coffee has a content of about 12 mg/L; as for energy drinks the content in caffeine varies 325 to 455 mg/L.

Most energy drinks have a content in caffeine superior to the European Union regulation. The other sparkling drinks respect the regulation proposed by Canada Health. As for coffees and colas consumers must know that those are some sources natural of caffeine.

Key word: CAFFEINE – HPLC- VALIDATION

Introduction

La caféine est un alcaloïde (substance azotée hétérocyclique) de la famille des méthylxanthines, présent dans de nombreux aliments. Elle agit comme stimulant psychotrope et augmente la sécrétion urinaire entraînant ainsi une hypertension artérielle. La caféine a été découverte en 1819 par le chimiste allemand **Friedlieb Ferdinand Runge**. Il la nomma « *kaffein* » en tant que composé chimique du café, qui en français devint « caféine ».

La caféine est présente dans les graines, les feuilles et les fruits de différentes plantes où elle agit comme insecticide naturelle contre les insectes qui s'en nourrissent.

Chez l'homme, la caféine agit comme stimulant du Système Nerveux Central (SNC) et du système cardio-vasculaire, diminuant la somnolence et augmentant l'attention temporairement. Des boissons très populaires contiennent de la caféine : café ou thé, certaines boissons gazeuses et les boissons énergisantes. Elle est présente aussi dans de nombreux aliments et compléments alimentaires, ainsi que dans certains médicaments, à des concentrations variables. De ce fait, la caféine est la substance possédant un effet sur le cerveau (comportement nerveux...) la plus consommée au monde ; elle est légale dans tous les pays à la différence d'autres substances psycho-actives. La Food and Drug Administration (FDA) liste la caféine parmi « les substances alimentaires à buts multiples généralement reconnues comme sans danger » aux doses habituelles, mais mortellement toxique au-delà d'une certaine dose.

Mais quelle quantité de caféine peut-on consommer pour avoir les effets bénéfiques sans les effets négatifs ? Il devient plus que jamais nécessaire de connaître la teneur en caféine des aliments que nous consommons ; afin de mieux contrôler le taux de caféine qui circule dans notre organisme. D'où notre thème : « **évaluation de la teneur en caféine par HPLC de quelques produits consommés au BURKINA FASO** ».

L'objectif global de cette étude est de doser la caféine dans certains produits tels que les cafés, les boissons gazeuses et celles dites énergisantes consommés au Burkina Faso.

Pour atteindre cet objectif, nous nous sommes fixés les objectifs spécifiques suivants:

- ❖ recenser les aliments et boissons contenant de la caféine ;
- ❖ valider une méthode d'analyse par HPLC ;

- ❖ identifier et doser la caféine dans le café, le cola, les boissons gazeuses (coca-cola, peps max, zen cola, moca café, 4 hair cola) et les boissons dites énergisantes (XXL, 5 star, Red Bull, Shark, Cody's).

Ce document s'articule en deux (02) grandes parties :

- ✓ la première partie, qui est une synthèse bibliographique traite de la présentation de la caféine et ses effets sur la santé humaine ainsi que les différentes méthodes qui permettent son indentification et sa quantification ;
- ✓ la deuxième partie, qui est consacrée au dosage de la caféine dans les cafés, les colas et les boissons énergisantes.

Mais avant nous présenterons la structure où nous avons été accueillis pour le stage.

STRUCTURE D'ACCEUIL

I. Présentation du Laboratoire National de Santé Publique (LNSP)

Le Laboratoire National de Santé Publique (LNSP) est un Etablissement Public de Santé à caractère Administratif (E.P.S.A), créée par décret N° 1999-377/PRES/PM/MS du 28/10/1999, inauguré le 12 novembre 2002. Le LNSP est situé sur le boulevard circulaire (Tengsoba, ex-secteur 30) et dispose également d'une antenne de prélèvements à Bitou et d'un laboratoire dans la ville de Bobo-Dioulasso.

Il a pour objet de servir de laboratoire central de référence pour les analyses, contrôles et expertises de toute nature relatives à la biologie médicale, l'alimentation, la nutrition, la pharmacie, l'eau, l'environnement et tout autre domaine en rapport avec la santé publique et la sécurité sanitaire.

Il a pour mission de :

- ❖ mettre en place l'organisation et la réalisation du contrôle de la qualité sur toutes les analyses effectuées au Burkina Faso ayant trait à la santé ;
- ❖ valider les techniques d'analyses et veiller régulièrement au respect des normes et des bonnes pratiques de laboratoire d'analyse médicale ;
- ❖ contrôler la qualité des aliments, médicaments, vaccins, sérums, réactifs, produits biologiques ; la qualité des eaux de consommation et de boisson de toute nature...

Le LNSP est placé sous la tutelle technique du Ministère de la Santé et du ministère chargé des finances. Son statut d'établissement public de santé à caractère non hospitalier le soumet à une organisation administrative particulière. Il compte six directions techniques qui sont :

- ❖ la Direction de la Biologie Médicale (DBM) ;
- ❖ la Direction de la Coordination Technique et de l'Assurance Qualité (DCTAQ) ;
- ❖ la Direction du Contrôle des Médicaments et des produits non alimentaires (DCM/PNA) ;
- ❖ la Direction de la Toxicologie, du contrôle de l'environnement et de l'Hygiène publique (DTCE/HP) ;
- ❖ la Direction du Contrôle des aliments et de la Nutrition Appliquée (DCANA) ;
- ❖ La Direction de Recherche et de la Formation (DRF).

C'est au sein de la Direction du Contrôle des aliments et de la Nutrition Appliquée (D.C.A.N.A.) que nous avons effectué notre stage.

II. Présentation et mission de la DCANA

La D.C.A.N.A est divisée en quatre (04) services qui sont : Toxicologie Alimentaire, Physico-Chimie Alimentaire, Microbiologie Alimentaire et la Nutrition Appliquée.

Le Service de Toxicologie Alimentaire (STA) comporte trois (3) sections qui sont :

- ❖ la section des contaminants chimiques : analyse des mycotoxines, des métaux lourds, le méthanol et les alcools supérieurs ;
- ❖ la section des additifs alimentaires : Contrôler les conservateurs chimiques, les colorants alimentaires et les améliorants de panification ;
- ❖ le contrôle des résidus de médicaments vétérinaires qui est en phase expérimentale.

Elle a pour mission :

- ❖ le contrôle de la qualité des aliments ;
- ❖ la vérification du respect de la conformité aux normes de qualités des produits alimentaires importés ou fabriqués sur le territoire national ;
- ❖ l'aide aux partenaires dans le domaine des industries agroalimentaires et à l'amélioration de la qualité de leurs produits finis ;
- ❖ la contribution à la protection et à la sécurité sanitaire par des actions d'observation, de surveillance, d'information, d'éducation, de communication, de contrôle et d'alerte en rapport avec ses activités.

Première partie :

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

En préambule à la présentation des résultats obtenus au cours de cette étude, il était essentiel de faire le point sur les données bibliographiques concernant la caféine. Dans un premier temps, nous décrirons brièvement la molécule dont il est question : la caféine.

Nous nous attacherons dans un deuxième temps à récapituler les différentes propriétés physiologiques de ce composé naturel, qui ont largement contribué au succès mondial des boissons comme le café, le thé ou le Coca-cola; mais aussi ces effets néfastes sur la santé des consommateurs en cas d'abus ou de surconsommation.

Le troisième volet de cette analyse bibliographique sera consacré aux différentes méthodes qui permettent l'identification de la caféine dans les aliments.

Chapitre 1 : PRESENTATION ET PROPRIETES DE LA CAFEINE

Ce chapitre est consacré à la présentation du composé utilisé dans l'étude, la caféine : historique, différentes sources, caractéristiques chimique.

I. Historique et différentes sources

I.1. Historique

Les hommes consomment de la caféine depuis l'âge de la pierre [1]. Les premiers peuples ont découvert que mâcher les graines, l'écorce ou les racines de certaines plantes diminuait provisoirement la fatigue, et stimulait la vigilance ou améliorait l'humeur. C'est bien plus tard qu'il fut constaté que l'effet de la caféine augmentait en faisant tremper certains composants végétaux séchés et/ou torréfiés et broyés dans de l'eau chaude. De nombreuses cultures ont des légendes qui attribuent la découverte de telles plantes à des gens vivant il y a des milliers d'années.

La caféine fut isolée pour la première fois en 1819 par un chimiste allemand Friedrich Runge, dans les grains de café et décrite en 1821 par les chimistes français Pierre Joseph Pelletier et Pierre Jean Robiquet. En 1827, Oudry isola des feuilles de thé une substance qu'il dénomma «théine» et ce n'est qu'en 1838, que Gerardus Mulder et Jobat ont montré que ces deux composés n'en formaient en réalité qu'un seul [1, 2, 3]. Ces deux appellations continuent pourtant d'être utilisées de nos jours.

I.2. Principales sources de caféine

La présence de la caféine a été détectée dans 63 espèces végétales comme le café, le thé, le cacao, la noix de kola ou la graine de guarana [2, 3]. Lorsqu'on surveille sa consommation quotidienne de caféine, il est essentiel de connaître les aliments, boissons et compléments alimentaires qui peuvent en contenir.

I.2.1. Le café

Le café est une plante originaire d'Ethiopie. Parmi les quatre (04) espèces existantes, *Coffea arabica* et *Coffea robusta* représentent respectivement 70 et 29% de la consommation mondiale. Au-delà des propriétés liées à la présence de la caféine, le café est utilisé dans les compléments alimentaires comme source d'acide chlorogénique, une substance présente dans les pommes de terre et les carottes.

La teneur en caféine d'une tasse de café peut varier de façon considérable selon l'origine et la composition du mélange, la méthode de préparation ; même les graines issues

d'une même plante peuvent présenter des différences de concentration. En fonction de la méthode de préparation, la teneur en caféine est donnée dans le tableau suivant [4].

Tableau 1: Teneur en caféine des différents types de cafés

Boissons	Teneur en caféine (mg/L)
Café filtre	700-1100
Café infusé	570
Café percolateur	500-600
Café soluble (instantané)	350-450
Café espresso	1400-1800
Café décaféiné	13

1.2.2. Le thé

Tous les différents thés sont issus de la même plante *Camelia sinensis*. Les bourgeons et les jeunes tiges du théier sont ramassés, laisser oxyder à l'air quelques heures et séchés rapidement dans de grands plats chauffés. La durée de l'oxydation (appelé improprement fermentation) détermine le type de thé produit. Ainsi on distingue les thés verts qui possèdent une teneur en caféine comprise entre 110 et 180 mg/L et les thés noirs dont la teneur en caféine varie de 180-280 mg/L [4].

1.2.3. Le cacao

Le cacao est extrait à partir des fèves (graines) contenu dans la cabosse (le fruit) d'un arbre, *Theobroma cacao*. La teneur en caféine des produits à base de cacao (chocolat) varie selon leur concentration en cacao.

Une barre de chocolat au lait de 28g contient ainsi à peu près autant de caféine qu'un café décaféiné (13 mg/L) [5].

1.2.4. La noix de cola

Récoltée sur des arbres d'Afrique de l'ouest (*Cola nitida et Cola acuminata*), la noix de cola est la source traditionnelle de caféine dans les pays africains. Sa teneur en caféine est légèrement supérieure à celle du café. Elle se mâche pour chasser la fatigue.

1.2.5. Les boissons dites énergisantes

Depuis quelques années, les boissons « énergisantes » ont fait leur apparition dans les rayons des supermarchés. Les boissons « énergisantes » ou « stimulantes » correspondent au concept anglo-saxon des « energy drinks », boissons destinées à donner un regain d'énergie à leur consommateur, c'est-à-dire une stimulation mentale et/ou physique.

Le terme « boisson énergisante » désigne tout produit se présentant sous la forme d'une boisson ou d'un concentré liquide et qui prétend contenir un mélange d'ingrédients ayant la propriété de rehausser les niveaux d'énergie et de vivacité, excluant les boissons pour sportifs [6, 7]. Ces boissons auraient vues le jour en Écosse en 1901 où elles étaient commercialisées sous le nom de « Iron Brew ».

L'ingrédient principal de ces boissons est la caféine souvent accompagnée de diverses autres substances tels que la taurine, le D-glucuronolactone ainsi que des vitamines du groupes B qui contribueraient supposément à leur effet stimulant.

II. Caractéristiques physico-chimiques

La caféine ($C_8H_{10}N_4O_2$) ou 1,3,7-triméthylpurine-2,6-dione ou encore 1,3,7-triméthyl-1H-purine-2,6(3H,7H)-dione, naturellement présente dans le café, est un alcaloïde de la famille des méthylxanthines qui comprend également la théophylline et la théobromine [2, 3, 8]. Dans sa forme pure, elle se présente comme un solide inodore, blanc ayant la forme d'aiguilles ou de poudre. Son gout est extrêmement amer et présente une masse molaire de 194.19 g/mol. En raison de sa polarité modérée, sa solubilité est faible dans l'eau et les solvants organiques [1, 9]. Une représentation schématique de la molécule est proposée à la figure 1 [10].

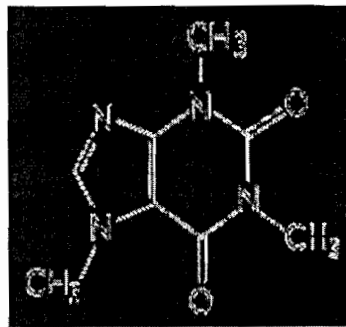


Figure 1: Structure de la caféine.

Les principales caractéristiques physico-chimiques de la caféine sont les suivantes [3]:

- poids moléculaire : $194,2 \text{ g.mol}^{-1}$
- cristallisation sous une forme hydratée en proportion 4/5 (6,9 % d'eau) ; déshydratation complète à 80°C ;
- base très faible formant des sels instables avec les acides ; assez stable dans les solutions acides diluées et les solutions basiques;

- moyennement soluble dans l'eau et les solvants organiques;
- solubilité accrue dans l'eau en présence de sels : benzoate, cinnamates, citrates,...
- formation de nombreux complexes avec : chlorogénate de potassium (dans les grains de café), méthylgallate, coumarine, isoeugénol, acide indolacétique, anthocyanidine, dérivés puriques et pyrimidiques, . . .
- inodore, incolore (en solution), goût amer caractéristique.

Chapitre 2 : EFFETS DE LA CAFEINE SUR LA SANTE

Ce chapitre est consacré à l'étude des effets de la caféine sur la santé des consommateurs. Il s'agit du mode d'action de la caféine, ces effets physiologiques et la réglementation régissant son utilisation au niveau mondiale.

I. Mode d'action de la caféine

La caféine est un antagoniste des récepteurs à l'adénosine A1 et A2 [3]. A des doses moyennes et lors d'une consommation régulière de caféine chez l'homme, celle-ci présente une affinité égale pour les récepteurs A1 et A2. Lors d'administration aiguë, la caféine est dominante sur les récepteurs A1.

La consommation chronique de caféine provoque dans un premier temps des effets sur les récepteurs A1, sur lesquels elle devient ensuite négligeable, puis possède des effets dominants sur les récepteurs A2. Elle se fixe alors sélectivement sur les récepteurs de l'adénosine et inhibe de façon compétitive leur action.

La caféine permet donc la libération des neuro-modulateurs (noradrénaline, dopamine, et sérotonine) dans le cerveau ainsi que l'augmentation des catécholamines, conformément à l'inversion de l'effet inhibiteur de l'adénosine [3]. De plus, elle inhibe les phosphodiésterases et influence l'hémostase du calcium (Ca^{2+}) intracellulaire : il y a effectivement une amélioration de la libération de Ca^{2+} par le réticulum endoplasmique ou par l'intermédiaire des unités à moteur en inhibant les actions de l'adénosine sur le Système Nerveux Central (SNC).

La caféine constitue donc un puissant stimulant du SNC, de la respiration, du muscle squelettique ainsi que le système cardiaque en provoquant la dilatation des vaisseaux coronaires, la relaxation des muscles lisses cardiaques, etc.

En effet, étant un composé ergogénique, elle augmente la fréquence cardiaque et la pression artérielle. Se liant au récepteur de l'adénosine lui-même couplé à la protéine G (protéine permettant le transport d'information à l'intérieur de la cellule) à la surface des cellules du muscle cardiaque, elle active l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) dans les cellules et imite les effets de l'adénosine. De ce fait, le taux de glycolyse augmente, augmentant à son tour la quantité de l'adénosine triphosphate (ATP) disponible pour la contraction musculaire et la relaxation. Il en résulte un effet inotrope et chronotrope positif, soit un rythme cardiaque plus fort et plus rapide [9].

II. Effets sur la santé de l'organisme

II.1. Effets physiologiques

La caféine possède de nombreux effets physiologiques sur le système nerveux, le système cardiovasculaire, le système digestif et le système respiratoire. La fonction rénale et les muscles squelettiques sont aussi affectés par son action [2, 3].

❖ Système nerveux central (SNC)

La caféine est principalement un stimulant du système nerveux central. Elle améliore les performances intellectuelles tout en diminuant le temps de réaction. Elle augmente l'attention et la concentration favorisant ainsi l'apprentissage.

❖ Système cardiovasculaire

La caféine est aussi un stimulant du système cardio-vasculaire. Elle entraîne une accélération du rythme cardiaque pouvant causer des palpitations et une augmentation de la tension artérielle, une telle augmentation étant d'environ 6 à 8 mm Hg pour 250 mg de caféine. Elle favorise une contraction des vaisseaux sanguins, d'où ses propriétés d'anti-migraines.

❖ Système gastro-intestinal

La caféine, en augmentant la production d'acide gastrique dans l'estomac, peut aggraver le reflux gastro-œsophagien et les ulcères d'estomac. Elle réduit l'appétit et facilite la digestion par une stimulation de la sécrétion de la bile par la vésicule biliaire, du suc pancréatique.

La caféine, ayant pour effet de détendre les muscles du sphincter anal interne, ne devrait pas être prise par les gens souffrant de diarrhée, du syndrome de l'intestin irritable et d'incontinence fécale.

❖ Système squelettique

Une récente analyse conclut que la caféine semble nuire à la masse osseuse, surtout chez les femmes, quand les apports en calcium sont insuffisants. La caféine augmenterait l'excrétion de calcium par les urines et les selles, tout en diminuant l'absorption de calcium par l'intestin.

Les principaux effets biologiques de la caféine (pour des doses faibles à moyennes) recensés chez l'homme par différents auteurs, sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2: Principaux effets physiologiques de la caféine chez l'homme

Systèmes affectés	Effets biologiques de la caféine
SNC (Système Nerveux Central)	<ul style="list-style-type: none">-Effet stimulateur-Légère stimulation de l'activité électrique cérébrale; stimulation de divers centre cérébraux-Diminution du débit sanguin des vaisseaux cérébraux.-Augmentation de la vigilance, de la sensation de bien-être, des facultés intellectuelles.-Diminution de la sensation de fatigue et d'ennui, du temps de sommeil.
Système cardio-vasculaire	<ul style="list-style-type: none">- Augmentation du rythme cardiaque- Effet vasodilatateur
Fonction rénale	<ul style="list-style-type: none">- Augmentation de la diurèse par augmentation de la filtration glomérulaire et diminution de la résorption tubulaire.
Système gastro-intestinal	<ul style="list-style-type: none">-Augmentation des sécrétions gastriques-Augmentation des sécrétions intestinale d'eau et de sodium, absorptions de macromolécules ou de l'alcool.-Relaxation du muscle lisse intestinal.
Système respiratoire	<ul style="list-style-type: none">- Effet vasodilatation (augmentation du débit sanguin dans les poumons).
Métabolisme énergétique	<ul style="list-style-type: none">- Augmentation de la lipolyse- Amélioration du stockage du glycogène

II.2. Risques d'intoxication

Une prise trop importante de caféine peut conduire à un syndrome d'intoxication chronique appelé « cafénisme » qui peut se manifester par les symptômes suivants: insomnie, nervosité, excitation, augmentation de la diurèse, des troubles gastro-intestinaux, des contractions musculaires involontaires, des pensées et propos décousus, de l'arythmie

cardiaque, une agitation psychomotrice, une augmentation de la fréquence cardiaque, une hypertension transitoire, des brûlures d'estomac, des tremblements des mains, une mauvaise coordination des mouvements [6].

Le tableau suivant permet d'évaluer les signes cliniques provoqués par la caféine en fonction du dosage.

Tableau 3: Signes toxiques engendrés par la caféine

	Quantités faibles à modérées (1-3 mg/ kg)	Consommation de 4 à 12 mg/kg	Symptôme d'intoxication :
Signes	- Augmentation de l'endurance physique	- Anxiété	- Tremblements
	- Amélioration de la cognition	- Nervosité	- Tachycardie
	- Diminution du temps de réaction	- Maux de tête	- Palpitations
	- Amélioration de l'humeur avec privation de sommeil.	- Fatigue.	- Maux d'estomac
			- Douleurs abdominales
			- Hallucinations
			Plus grave :
			- Accident vasculaire cérébral
			- Paralysie
			- Altération de la conscience
			- Convulsions
			- Arythmies
			- Mort

II.3. Risques par groupes de personnes sensibles

II.3.1. Chez les diabétiques

Les personnes diabétiques doivent éviter de consommer de grande quantité de caféine, car il semble que celle-ci entraîne une augmentation de la glycémie (taux de sucre dans le sang), en particulier en fin de journée [11].

II.3.2. Chez le sportif

Durant l'effort, la caféine peut jouer un rôle néfaste du point de vue physiologique. En effet, elle a tendance à jouer un rôle sur l'aldostérone (hormone antidiurétique) provoquant ainsi une grande rétention d'eau. De même, après un effort physique, la caféine a un effet diurétique qui limite la réhydratation en augmentant la production d'urine lorsque le corps est au repos. De ce fait, la caféine ne doit pas être consommée dans les heures précédant ou suivant un exercice physique. En effet, l'hydratation du sportif est primordiale durant cette période [9].

II.3.3. Chez les femmes enceintes ou allaitants

Santé Canada recommande que les femmes qui prévoient devenir enceintes, les femmes qui le sont et les mères qui allaitent ne doivent pas consommer plus de 300 mg de caféine par jour. La caféine stimule le système nerveux de la femme et du fœtus, ce qui peut perturber le sommeil. La grossesse peut aussi rendre la femme plus sensible aux effets négatifs de la caféine. Aussi, trop de caféine pourrait augmenter le risque d'avortement spontané, communément appelé fausse-couche. De plus, considérant les besoins élevés en fer de la femme enceinte, la prise de café ou thé au repas est à limiter. Chez la femme qui allaite, la caféine se retrouve dans le lait maternel 1 à 3 heures après sa consommation. Elle peut donc s'accumuler dans l'organisme de l'enfant et nuire à son sommeil [11]. Une consommation supérieure à l'équivalente de trois tasses à café par jour a été associée à une augmentation de la fréquence des fausses couches et de la naissance de bébés de faible poids [12].

II.3.4. Chez les enfants et adolescents

De tous les composés qui possèdent des effets stimulants, la caféine est sans aucun doute la plus susceptible d'être consommée par les enfants et les adolescents du fait qu'elle existe sous plusieurs formes (café, thé, cacao, chocolat, boissons gazeuses, boissons énergisantes, médicaments en vente libre, etc.). Les enfants et les adolescents sont beaucoup plus susceptibles à l'apparition d'effets indésirables lorsqu'ils consomment de la caféine [6].

Chez les enfants en bonne santé et âgés de 12 ans et moins, Santé Canada recommande une consommation de caféine quotidienne maximale de 2,5 mg/kg/jour de poids corporel, c'est-à-dire de 45 à 85 mg par jour selon le groupe d'âge (voir tableau 4). De faibles doses de caféine (< 3 mg/kg) auraient des effets indésirables négligeables chez l'enfant normal, en bonne santé. A plus fortes doses (> 10 mg/kg), on rapporte une amélioration de la vigilance et de l'activité locomotrice, mais également la présence d'effets indésirables tels que des nausées, des céphalées et des douleurs abdominales [13].

Chez les adolescents âgés de 13 ans et plus, Santé Canada suggère une consommation quotidienne maximale de caféine de 2,5 mg/kg/jour, jusqu'à concurrence de 400 mg/jour. Les adolescents constituent un groupe à risque d'intoxication consécutive à une consommation excessive de caféine. En effet, le métabolisme de la caféine ralentit pendant la puberté en raison de la forte progression naturelle de l'hormone de croissance, ce qui augmente le risque d'effets toxiques de la caféine chez cette population [13].

III. Interaction entre la caféine et certaines substances

III.1. Caféine et médicaments

Les personnes souffrant de troubles cardiaques, d'insomnie, de troubles anxieux, d'hypertension artérielle, de problèmes d'estomac ou de rein ou encore d'ostéoporose doivent limiter leur consommation de caféine. Cette substance peut interagir avec de nombreux médicaments : certains antibiotiques (ciprofloxacine, enoxacine, norfloxacine), la mexilétine et le stiripentol.

III.2. Caféine et alcool

De nos jours, on voit apparaître une plus forte tendance à associer les BDE à des boissons alcoolisées. Que ce soit dans les cafés-restaurants ou à la maison, ce mélange est très prisé, en particulier par les jeunes. Cependant le débat sur la nocivité de ce type de boisson fait rage ; les associations de protection des consommateurs et les spécialistes de santé émettent fréquemment des avis défavorables sur ce type de boissons.

Le mélange des BDE et l'alcool apporte de nombreuses modifications à l'organisme. Ces différentes modifications sont [7, 9] :

- une diminution des signes d'intoxications liés à l'alcool.
- une réduction des symptômes subjectifs de l'ivresse
- une augmentation de la fréquence de consommation
- une augmentation des épisodes de la consommation excessive et des épisodes d'ivresse hebdomadaire
- une augmentation de la prévalence des risques liés à l'alcool.

IV. Réglementation

Au niveau international, la caféine est considérée comme un composé naturel et est par conséquent, soumis à une législation quasi inexistante. Malgré cette considération les boissons énergisantes à fortes teneur en caféine sont interdites dans certains pays d'Europe

comme la France et le Danemark. Le Burkina ne dispose pas d'une législation concernant la teneur en caféine. Il serait donc utile de faire appel à la législation de l'Union Européenne et de certains pays dans notre étude.

Selon la Directive 2002/67/CE de la Commission européenne, la présence de caféine doit être clairement indiquée sur l'étiquetage des boissons, dès lors qu'elle atteint une proportion supérieure à 150 mg/L. Cette règle s'applique à certaines boissons gazeuses et aux boissons énergisantes, mais pas au thé ni au café, ni à leurs produits connexes, car les consommateurs sont censés savoir qu'il s'agit de sources importantes de caféine et que le contenu en caféine est fonction de la technique de préparation (infusion plus longue ou temps d'extraction).

La législation en vigueur de l'UE interdit, en effet, la vente de produit contenant plus de 320mg/L de caféine [14]. Les États membres se sont dotés de lois nationales pour se conformer à cette directive (France, Danemark ...).

Depuis Décembre 2002, une contrainte supplémentaire encadre désormais la teneur des boissons énergisantes par contenant au Canada. Avant la nouvelle réglementation, la concentration en caféine des boissons énergisantes ayant été approuvées sous le Règlement sur les produits de santé naturels se situait en moyenne à 320 mg/L. Une limite de 180 mg s'applique aux formats considérés comme étant une portion unique (ou format individuel), c'est-à-dire tout contenant de moins de 750 ml et les contenants non réfermables de tout volume. Les contenants réfermables de plus de 750 ml sont considérés des multi-portions et sont contraints à une teneur en caféine de 360 mg/L [6]. Le tableau suivant présente les teneurs maximales permises pour les différents formats de boissons énergisantes, ainsi que celles applicables aux boissons gazeuses [6].

Santé Canada, la Food and Drug Administration (FDA) américaine et d'autres organismes internationaux de santé et de réglementation reconnaissent l'innocuité de la caféine qui peut être utilisée dans des boissons sans alcool.

Ces organismes élaborent ainsi les Doses Journalières Admissibles (DJA) en fonction de l'âge et de l'état physique du consommateur. Ainsi pour les enfants de 12 ans ou moins, Santé Canada recommande un apport quotidien maximal en caféine de 2,5mg/kg de poids corporel moyen de l'enfant. Pour les femmes en âge de procréer, l'apport maximal recommande est de 300 mg de caféine par jour. Pour les autres adultes en bonne santé, Santé Canada recommande un apport maximal de 400 mg par jour. Le tableau présente l'apport maximal en caféine recommandé par jour pour la population en bonne santé, selon Santé Canada [6].

Tableau 4: Teneur en caféine permise par Santé Canada pour les boissons énergisantes et les boissons gazeuses

	Teneur maximale permise	Exemple d'équivalence par contenant
Boissons énergisantes		
Contenants non réfermables et contenants de moins de 750 ml	Maximum 400 mg/L ou 180 mg par contenant	Canette de 250 ml : max. 100 mg Canette de 473 ml : max. 180 mg Canette de 710 ml : max. 180 mg
Contenants réfermables de plus de 750 ml	Maximum 180 mg/500ml (360 mg/L)	Bouteille de 1L : max. 360 mg
Boissons gazeuses		
Cola	Maximum 200 mg/L	Canette de 355 ml : max. 71 mg
Autres boissons gazeuses	Maximum 150 mg/L	Canette de 355 ml : max. 53 mg

Tableau 5: Limites recommandées de l'apport quotidien en caféine chez la population en bonne santé

Population	Apport quotidien maximal de caféine recommandé	Équivalence en tasse de café filtre contenant 135 mg de caféine
Enfants de 12 ans et moins	2,5 mg/kg de poids corporel	
4-6 ans	45 mg	≈ 1/3 de tasse
7-9 ans	62,5 mg	≈ 1/2 de tasse
10-12 ans	85 mg	≈ 2/3 de tasse
Adolescents âgés de 13 ans et plus	2,5 mg/kg de poids corporel	
	13 ans : fille ou garçon (45 kg) = 112 mg	≈ 3/4 de tasse
	17 ans : fille (55 kg) = 138 mg; garçon (65 kg) = 162 mg	≈ 1 tasse; 1/4 de tasse
Femmes enceintes	300 mg	≈ 2 1/4 tasses
Adultes	400 mg	≈ 3 tasses

La caféine a été ajoutée à la liste officielle des produits interdits dans le sport par le Comité International Olympique (CIO). Elle fait l'objet de recherche dans les urines.

En raison des préoccupations suscitées par les mélanges de boissons énergisantes et d'alcool, Santé Canada interdit depuis 2004 la production des boissons alcoolisées contenant de la caféine au Canada. [7].

De nombreuses méthodes permettent l'analyse et l'identification précise des molécules de caféine dans les aliments et autres produits. Elles diffèrent par leur sensibilité, leur coût et les difficultés techniques inhérentes à leur réalisation.

Chapitre 3 : TECHNIQUES ANALYTIQUES DE LA CAFEINE

Il existe une grande variété de techniques d'analyse qui permettent la caractérisation des composés organiques. Certaines techniques mesurent des constantes physiques comme la température de fusion pour les solides, l'indice de réfraction pour les liquides, l'activité optique. Certaines techniques plus complexes sont d'usage courant comme la chromatographie et la spectroscopie infrarouge. Ces techniques sont relativement simples au niveau de l'analyse de la caféine et leur application est faite dans les expériences d'isolement, de purification ou de synthèse.

I. Méthodes d'analyse de la caféine

Les premières méthodes d'analyse de la caféine dans les produits à base de café étaient basées sur une détermination par gravimétrie ou sur un dosage de l'azote ammoniacal de l'alcaloïde, après son extraction au chloroforme. Par la suite, diverses méthodes se sont appuyées sur la propriété de la caféine à présenter un maximum d'absorption à une longueur d'onde allant de 272 à 276 nm [3].

I.1. Méthodes spectrophotométriques

Il existe de nombreuses méthodes de dosage de la caféine basées sur le principe de la spectrophotométrie. Mais ces méthodes nécessitent une étape préalable de clarification afin d'éliminer les différents composés responsables d'interférences. En effet, la mesure spectrophotométrique directe permet alors un dosage de toutes les méthylxanthines sans distinction, puisque ces molécules présentent toutes un maximum d'absorption à une longueur d'onde identique [3]. Les autres méthodes de dosages de la caféine et des méthylxanthines sont des méthodes chromatographiques.

I.2. Méthodes chromatographiques

Chronologiquement, les premières méthodes étaient basées sur le principe de la chromatographie de surface sur papier, puis sur plaque de silice. L'évaluation quantitative des méthylxanthines était réalisée par spectrophotométrie après récupération des composés séparés. Par la suite, l'utilisation de scanners (détection UV) a permis une lecture directe des chromatogrammes [3].

Parallèlement, l'étude du métabolisme de la caféine chez les plantes a conduit à l'utilisation de produits radio marqués. Ces produits étaient également séparés par chromatographie de surface puis récupérés et quantifiés. Par ailleurs, certains auteurs ont utilisé la spectrométrie de masse (couplée à la chromatographie en phase gazeuse) pour

confirmer l'identification des méthylxanthines séparées par chromatographie sur couche mince.

Actuellement, la plupart des méthodes d'analyse de la caféine et de tous ses dérivés s'appuie sur la technique de Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP), couplée à un système de détection UV.

I.3. Autres méthodes

Deux autres techniques ont été récemment proposées pour le dosage de la caféine dans des aliments ou dans les grains de café. Dans le premier cas, il s'agit d'une technique d'électrophorèse capillaire, et dans le deuxième cas, il s'agit d'une technique de gel filtration. Comparées à des techniques d'analyse par chromatographie liquide haute performance, ces deux méthodes se sont montrées toutes aussi performantes à doser la caféine [3].

La validation de méthode figure parmi les mesures universellement reconnues comme faisant nécessairement partie d'un système exhaustif d'assurance qualité dans le domaine de la chimie analytique.

II. Validation de méthodes d'analyse physico-chimiques

II.1. Définitions et objectifs d'une validation de méthode

II.1.1. Définition

La validation de méthode utilise un ensemble de tests qui vérifient les hypothèses de base de la méthode d'analyse. Elle établit et documente les caractéristiques de performance de la méthode; ce faisant, elle démontre si une méthode est adaptée à son emploi analytique. Les caractéristiques de performance habituelles des méthodes d'analyse sont : définition du champ d'application; la spécificité; l'étalonnage (linéarité); la justesse; la fidélité; la gamme de validité; la limite de quantification; la limite de détection; la sensibilité et la robustesse.

II.1.2. Objectifs

La validation de méthode est ainsi une composante essentielle des mesures qu'un laboratoire devrait mettre en œuvre pour lui permettre de produire des données analytiques fiables.

La validation d'une méthode est l'ensemble des opérations nécessaire pour prouver que le protocole est suffisamment exact et fiable pour avoir confiance aux résultats.

Le but d'une validation de méthode d'analyse est de démontrer qu'elle correspond à l'usage pour lequel elle est prévue.

II.2. Les paramètres de validation

- **Spécificité** : est la capacité de la méthode de permettre une évaluation non équivoque de la molécule en présence de composants qui sont susceptibles d'être présents.
- **Linéarité** : est la capacité dans un intervalle donné d'obtenir des résultats de dosage directement proportionnels à la concentration ou à la quantité de la molécule dans l'échantillon.

L'étendue de concentration des étalons qui se situe entre la limite de quantification d'une méthode et la limite de linéarité est la zone quantifiable utilisée dans une méthode d'analyse. Le coefficient de corrélation doit être supérieur à 0,95 pour respecter le critère de la limite de linéarité.

- **Fidélité** : est l'étroitesse d'accord entre une série de mesures obtenues dans des conditions prescrites à partir de prises d'essais multiples provenant d'un même échantillon homogène.

Selon les conditions d'exécution de l'essai, cette caractéristique s'exprime sous forme de répétabilité, de reproductibilité ou de fidélité intermédiaire pour une méthode.

- répétabilité : fidélité mesurée avec des résultats d'essais indépendants obtenus :

- par la même méthode ;
- sur des échantillons identiques ;
- dans le même laboratoire ;
- avec le même opérateur ;
- avec les mêmes équipements.

- reproductivité: fidélité mesurée avec des résultats d'essais indépendants obtenus :

- par la même méthode
- sur des échantillons identiques,
- dans des laboratoires différents
- avec des opérateurs différents
- avec des équipements différents

La reproductibilité est toujours moins bonne que la répétabilité (il y a plus de facteurs qui varient).

- fidélité intermédiaire : un laboratoire unique n'aura généralement pas la possibilité de réaliser des essais dans les conditions de reproductibilité : un seul lieu, un seul automate...

On se placera alors dans les conditions intermédiaires entre répétabilité et reproductibilité, en faisant varier ce qui peut varier : deux techniciens, des lots de réactifs et de consommables différents, une heure de passage différentes (pour valider que l'automate ne dévie pas en cours de série).

- **Intervalle d'application** : est l'intervalle de concentration de la molécule à l'intérieur duquel la méthode peut être considérée comme étant valide.
- **Limite de détection** : est la plus petite quantité d'échantillon qui peut être détectée mais pas nécessairement quantifiée comme une valeur exacte.
- **Limite de quantification** : est la concentration minimale qui peut être quantifiée à l'aide d'une méthode d'analyse avec une fiabilité définie. C'est la concentration équivalente à 10 fois l'écart type (S) obtenu lors de l'établissement de la limite de détection d'une méthode.
- **Robustesse** : est la résistance au changement des résultats qu'elle produit quand des modifications mineures ont lieu par rapport aux conditions expérimentales décrites dans la procédure. La robustesse d'une méthode est testée en introduisant délibérément de légères variations dans la procédure et en observant les effets sur les résultats. Les exemples de paramètres que pourrait traiter un test de robustesse sont les suivants : changements d'instrument, d'opérateur ou de marque de réactif; concentration d'un réactif; pH d'une solution; température d'une réaction; temps imparti à l'achèvement du processus etc...

II.3. Processus de validation d'une méthode d'analyse

Si on utilise une méthode développée à l'interne, ou qu'on utilise une méthode connue, mais employée en dehors de son domaine d'application prévu, alors il faut prouver que la méthode en question est bien apte à l'emploi qu'on prévoit d'en faire.

Le travail de validation de méthode ne doit pas (ne devrait pas) être confondu avec le nécessaire travail de développement de méthode, qui constitue l'étape préalable. Néanmoins, il est possible de réutiliser, dans le dossier de validation, des résultats obtenus au cours de la phase de mise au point.

Le processus de validation se déroule alors de la manière suivante :

- ✓ partir d'une méthode décrite avec précision, sans ambiguïté ;
- ✓ représenter les différentes étapes sous forme de logigramme ;
- ✓ à chaque étape, noter les matières, réactifs et/ou appareillages critique (ceux dont la maîtrise est indispensable) ;

- ✓ expliquer clairement les points à valider ;
- ✓ pour chacun d'entre eux, définir une stratégie de validation (manipulation à effectuer, validation par la bibliographie, résultats d'essai inter-laboratoire effectués, etc.) ;
- ✓ définir également une stratégie permettant de valider la manipulation dans son ensemble ;
- ✓ préparer les manipulations à réaliser (et en particulier, dimensionner l'étendue des essais de répétabilité et de reproductibilité) ;
- ✓ réaliser les essais en question ;
- ✓ analyser les résultats.

Si tout s'est déroulé conformément aux attentes, la méthode est validée, et on peut écrire le dossier de validation.

DEUXIEME PARTIE :

DOSAGE DE LA CAFEINE

PAR HPLC

Cette partie présente successivement :

- La méthodologie
- Les résultats
- La discussion

Chapitre 1 : MATERIELS ET METHODES

I. Matériels

I.1. Réactifs et solvants

- Standard de caféine pure en poudre fourni par VWR pour la préparation des solutions étalons.
- Méthanol de qualité pour HPLC fourni par SIGMA-ALDRICH.
- Eau ultra pure.

I.2. Appareillage et conditions analytiques

- Verreries usuelles du laboratoire : fiole jaugée, béchers, erlenmeyer...
- Broyeur pour broyer et homogénéiser les différents échantillons solides.
- Bac à ultrason pour dégazer les solutions (la phase mobile, les boissons gazeuses)
- Bain-marie utilisé pour l'extraction de la caféine.
- Agitateur magnétique chauffant pour homogénéiser les différents mélanges, la phase mobile essentiellement.
- Papier filtre et micro-filtre à 0,45 μ m pour la filtration des échantillons avant passage à la HPLC.
- Système chromatographique composé :
 - ✓ d'une pompe quaternaire Agilent 1100.
 - ✓ d'un détecteur D.A.D (Diode Array Detector) Agilent 1100.
 - ✓ d'un système d'acquisition de données, d'intégration.

Conditions chromatographiques :

- colonne en phase inverse C18 contenant des grains de silice dont on a greffé des molécules de carbone (20cm, 4,6mm, 5 μ m). Elle représente la phase stationnaire.
- phase mobile constituée à 70% d'eau ultra-pure et 30% de méthanol;
- pompe fonctionnant à débit constant (mode isochratique) de 0,8ml/min;
- longueur d'onde de détection fixée à 280nm ;
- volume de l'échantillon injecté 5 μ l ;
- température de la colonne est 25° C ;
- temps d'analyse de chaque échantillon est de 25 min.

II. Méthodes

II.1. Echantillonnage

L'échantillonnage est réalisé sur les boissons énergisantes, la cola et les boissons de type cola, le café et les produits à base de café ou cacao commercialisés dans les supermarchés, dans les boutiques et les marchés publics de la ville de Ouagadougou.

Quatre (04) types de café ont été principalement échantillonnés :

- l'Arabica Exclusif (moulu) à forte torréfaction de la marque Carte Noire ;
- l'Arabica Exclusif (grains) de la marque Carte Noire ;
- le café moulu traditionnelle originaire de la Côte d'Ivoire
- le Nescafé Classique de Nestlé largement consommé.

Au Burkina, nous avons principalement deux (02) variétés de cola identifiable par la couleur (rouge et blanc). Les principales boissons de type cola sont principalement ceux de la marque Coca-Cola :

- coca-Cola en cannette de 33 cl originaire de la Tunisie ;
- coca-Cola en bouteille de 0.5 L de la BRAKINA ;
- une bouteille de 0.5 L de Zen Cola.

Les noix appelées petit cola et une boisson à base de ces noix (4 Hair Cola) ont été aussi échantillonné.

Six (06) types BDE provenant des alimentations de la place faisaient partie de nos échantillons. Ces différents BDE sont recensés dans le tableau suivant.

Tableau 6: La teneur en caféine des différentes BDE échantillonnés

Nom des échantillons	Teneur en caféine sur l'étiquette	Portion
XXL Energy (BRAKINA)	70 mg	35 cl
5 Star Energy (Ghana)	Non précisé	35 cl
Red Bull (Autriche)	32 mg/100 ml	25 cl
Shark stimulation (Thaïlande)	32 mg/100 ml	25 cl
Pepsi Max	Non précisé	33 cl
Cody'sEnergy (Germany)	30 mg/100 ml	25 cl

Les produits échantillonnés sont transportés dans une glacière et stockés dans un réfrigérateur en attendant d'être analysés.

II.2. Préparation des solutions

II.2.1. Préparation de la solution standard (STD)

Dans une fiole de 100 ml, introduire 1g de caféine pesée à 0,1mg près et compléter avec de l'eau ultra pure jusqu'au trait de jauge.

Introduire un barreau aimanté dans la fiole et agiter à l'aide d'un agitateur jusqu'à dissolution totale. On obtient une solution étalon à 10g/L (10000mg/L).

Préparons une solution de travail (ST) de 1000mg/L à partir de la solution STD. Diluons 10ml de STD dans une fiole de 100ml. C'est elle qui sera utilisée dans les essais ultérieurs. Ces différentes solutions sont stockées dans un réfrigérateur.

II.2.2. Préparation des points de calibration

A partir de la solution ST précédemment obtenue, préparons des solutions de concentration allant de 10 à 100mg/L dans des fioles de 20ml. Les volumes à prélever pour la préparation de ces solutions sont mentionnés dans le tableau suivant.

Tableau 7: Préparation des points de calibration

Concentration à préparer (mg/L)	10	20	40	60	80	100
Volume à prélever (ml)	0,2	0,4	0,8	1,2	1,6	2

II.2.3. Préparation de la phase mobile

Mélanger de l'eau et du méthanol dans les proportions 70/30 (V/V) pour un volume de 100 ml et agité à l'aide d'un agitateur magnétique pendant environ 5 minutes. Placer le mélange ensuite dans un bac à ultrason pour dégazer pendant 30 minutes avant de le placer au niveau du chromatographe.

II.3. Préparation des échantillons

II.3.1. Les échantillons solides

2g d'échantillon broyé, pesé à 0,1mg près, sont introduits dans un erlenmeyer de 250 ml. On ajoute 100 ml d'eau ultra pure et on homogénéise. L'erlenmeyer est ensuite placée dans un bain-marie d'eau bouillant pendant une heure de temps en agitant de temps en temps.

Les échantillons sont ensuite refroidis puis filtrés sur papier filtre et on procède à la mise en vials après passage sur un micro filtre 0,45 μ m. L'échantillon est prêt à être injecté.

II.3.2. Les boissons

Elles sont directement injectées après dégazage pendant 20 minutes dans un bac à ultrason et filtration sur une membrane d'ester de cellulose dont le diamètre des pores est de 0.45 µm.

Remarque : le filtrat doit éventuellement être dilué afin que les concentrations en caféine se situent dans la zone de linéarité de la méthode.

II.4. Modes opératoires

La colonne chromatographique est stabilisée avec la phase mobile pendant environ 30 minutes.

La phase mobile, le standard et les échantillons sont injectés après filtration sur une membrane dont le diamètre des pores est de 0,45µm.

La concentration en caféine des échantillons est calculée par étalonnage externe par rapport à la solution STD de concentration connue.

Cas des échantillons solides :

$$C_c \text{ (en mg/Kg)} = C_{caf} * \frac{A_c}{A_{caf}} * \frac{10}{M}$$

M : prise d'essai en g

Cas des échantillons liquides :

$$C_c \text{ (en mg/L)} = C_{caf} * \frac{A_c}{A_{caf}} * D$$

D : facteur de dilution

C_{caf} = Concentration en caféine de la solution STD (en mg/L)

C_c = Concentration en caféine de l'échantillon

A_{caf} = Aire du pic de la solution STD

A_c = Aire du pic de l'échantillon.

Chapitre 2 : RESULTATS ET DISCUSSION

I. Résultats

I.1. Résultats de l'étude des paramètres de la validation

Le dosage de caféine est une méthode quantitative, les principaux paramètres étudiés pour la mise en place de la méthode sont : la linéarité, la répétabilité, la reproductibilité, les limites de détection et de quantification, le taux de récupération.

I.1.1. Etude de la linéarité

La linéarité a été étudiée à travers l'injection de différentes concentrations de la solution standard (solution préparée lors de la préparation des points de calibration) dont les aires des pics sont relevées dans le tableau suivant.

Tableau 8: Aire des pics pour la courbe de calibration

Concentrations (mg/L)	10	20	40	60	80	100
Aires des pics	118.403	274.869	571.511	892.249	1176.621	1447.089

Les données du tableau nous ont permis de tracer la courbe de calibration représentée ci-dessous.

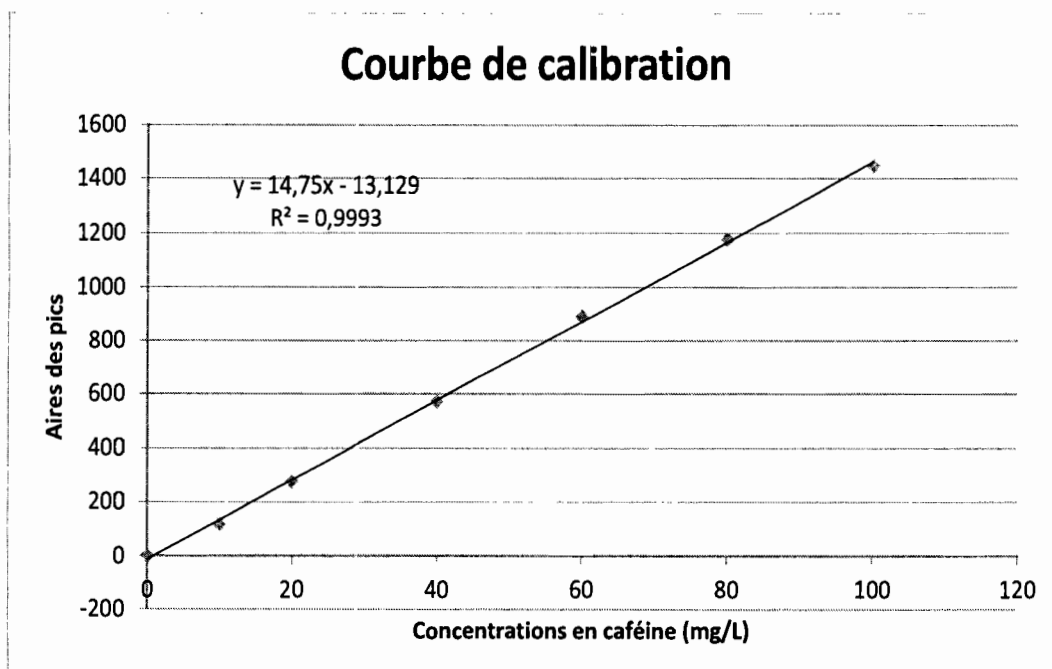


Figure 2: Courbe de calibration de la caféine

Le coefficient de corrélation R^2 est satisfaisant, c'est-à-dire supérieur à 95%, pour le rang de concentrations évaluées.

I.1.2. Les limites de détection et de quantification

Introduisons 100 μ L de la solution ST, prélevée à l'aide d'une micropipette, dans une fiole de 20mL et complétons avec de l'eau ultra pure jusqu'au trait de jauge. La solution ST1 ainsi obtenue a pour concentration 1mg/L. A partir de la solution ST1 nous allons préparer des solutions de concentrations variant entre 0,0625 et 0,5mg/L comme présentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 9: Préparation des solutions pour la LD

Concentrations à préparer (mg/L)	0,5	0,25	0,125	0,0625
Volume à prélevé (ml)	5	2,5	1,25	0,625

La Limite de Détection (LD) est déterminée manuellement et est égale au triple du bruit de fond (figure 3). Elle correspond dans cas à environ 0,25mg/L ; elle n'est pas quantifiable.

Pour qu'une solution soit détectable ; il faut que sa concentration soit égale à trois fois celle de la LD, on parle ainsi de Limite de Quantification (LQ) ; $LQ=3*LD$ soit $3*0,25= 0,75$. La zone quantifiable de la méthode commence donc par 0,75 mg/L.

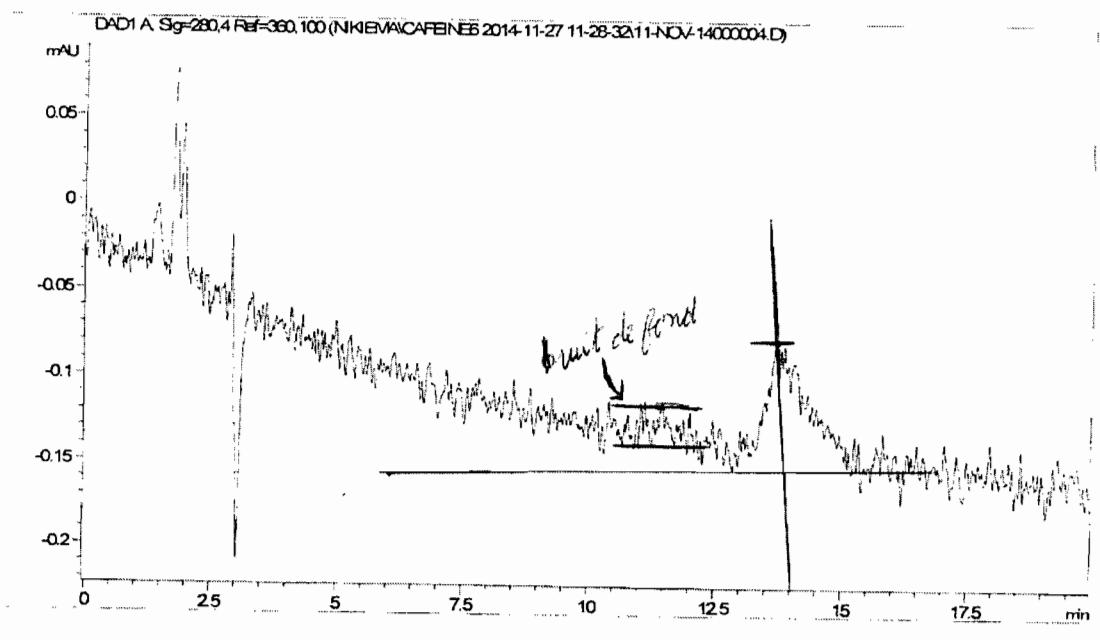


Figure 3: Chromatogramme de la limite de détection

I.1.3. Etude de la fidélité

Ce travail a été effectué avec un contrôle interne de qualité. Ainsi chaque série d'échantillons contient :

- la phase mobile
- la solution standard
- un échantillon test en cinq
- le même échantillon test contaminé à concentration connue fait en double.

Les aires des pics des échantillons de chaque matrice sont représentés dans le tableau suivant.

Tableau 10: Aire des pics de la répétabilité et de la reproductivité

		Aires des pics						
Echantillons		1	2	3	4	5	6	7
Jour 1	Café	2816,622	2777,409	2607,84	2823,173	2763,19	3790,663	3697,354
	Cola	2025,860	2007,441	1982,53	2046,140	2010,87	2856,84	2878,33
	Coca-cola	1321,072	1325,222	1355,39	1320,829	1337,31	1846,069	1848,707
Jour 2	Café	2739,081	2802,592	2626,13	2762,066	2668,99	3754,940	3564,879
	Cola	2025,281	2076,037	2018,45	2036,223	1957,34	2756,16	2800,89
	Coca-cola	1373,132	1362,026	1313,31	1369,457	1329,26	1846,069	1848,707

➤ Etude de la répétabilité

Nous avons calculé les coefficients de variations (CV) à partir des données de ce tableau en passant par le calcul de la moyenne et de l'écart type de chaque série d'analyse. Ces résultats sont consignés dans le tableau ci-après.

Tableau 11: Résultats de la répétabilité

	Echantillons	N	Moyennes	Ecart types	CV (%)
Jour 1	Café	07	3039,46	597,31	19,65
	Cola	07	2258	528,53	23,40
	Coca-cola	07	1479,22	362,39	24,49
Jour 2	Café	07	2988,38	577,63	19,32
	Cola	07	2238,62	485,06	21,66
	Coca-cola	07	1491,70	356,16	23,87

N : nombres d'échantillons

Selon la Directive de l'UE relative aux performances des techniques analytiques, le CV ne doit pas dépasser 25%. Les CV des résultats obtenus sont donc satisfaisants pour l'expérience réalisée.

➤ **Etude de la reproductivité**

Elle a été mesurée dans les conditions intermédiaires c'est-à-dire en faisant varier certains paramètres. Dans notre cas nous avons fait les jours d'analyse. Son CV ne doit pas dépasser 2%.

Tableau 12: Résultats de la reproductibilité

	Echantillons	N	Moyennes	Ecart-types	CV (%)
	Café	02	3013,92	36,12	1,19
	Cola	02	2248,31	13,70	0,60
	Coca-Cola	02	1485,46	8,88	0,59

N : Nombre de jours

I.1.4. Taux de récupération

Lors de la répétabilité certains échantillons ont été contaminés avec une certaine concentration de la solution ST préalablement préparée.

Le taux de récupération est le pourcentage de la concentration réelle d'une substance récupérée au cours du procédé d'analyse. Il est compris entre 80 et 120%.

$$\text{Taux de récupération} = \text{concentration retrouvée} * 100 / \text{concentration théorique}$$

Tableau 13: calcul du taux de récupération

	Concentration échantillons normaux (mg/L)	Concentration échantillons dopés (mg/L)	concentration théorique (mg/L)	Concentration retrouvée (mg/L)	Taux de récupération (%)
Café	186,57	251,87	60	65,30	108,84
Cola	137,75	192,28	60	54,54	90,9
Coca	91,78	126,14	40	34,35	85,88

Le taux de récupération pour chaque type d'échantillons respecte la marge proposée par la norme ISO 5725-4. La récupération moyenne de la méthode est 95,20% ; elle est satisfaisante.

Les résultats des analyses de la validation sont satisfaisants. Nous pouvons ainsi passer à l'analyse des échantillons proprement dits.

I.2. Résultat de l'analyse des échantillons

Les échantillons ont été subdivisés en deux (02) grands groupes. Le premier groupe comporte les produits contenant naturellement de la caféine (café et cola); le deuxième est composé des boissons (types cola et énergisantes) qui sont constituées d'un mélange de divers composés. Chaque groupe a été injecté dans une séquence comprenant la phase mobile et de la solution standard dans un ordre bien précis (phase mobile-STD-échantillons).

Après injection, nous obtenons pour chaque échantillon un chromatogramme sous-formes de pic (voir annexe). Les aires de chaque pic sont calculées directement au moyen d'une méthode d'acquisition et d'intégration de données chromatographiques.

La concentration en caféine d'un échantillon est calculée par étalonnage externe par rapport à la solution étalon suivant la formule énoncée plus haut.

I.2.1. La teneur en caféine des cafés et colas

Les résultats de l'analyse des différents produits sont représentés dans le tableau ci-après. Ils ont été calculés à partir de la formule présentée dans la partie E.1).

Tableau 14: Résultats d'analyse des échantillons de cafés

Les échantillons	Aires des pics	Concentrations (mg/kg)	Concentrations moyennes (mg/Kg)
	1	4009,535	1033,79
Arabica Exclusif moulu	2	3346,914	1137,25
	3	5876,063	
	1	4083,92	
Arabica Exclusif granulé	2	4087,44	1044,22
	3	3978,626	
	1	1,46E+04	
Nescafé Classique	2	1,46E+04	3767,79
	3	1,47E+04	
	1	2739,081	
Café ivoirien	2	2802,592	713,65
	3	2762,066	

Les concentrations moyennes des différents échantillons de cafés analysés sont comprises entre 700 et 4000mg/Kg. La plus forte concentration est observée au niveau des Nescafé et la plus faible valeur est enregistrée par le café traditionnel provenant de la Côte d'Ivoire. On observe aussi une légère différence de caféine entre les cafés Arabica (moulu et granulé) pourtant provenant de la même espèce.

Tableau 15: Résultats des échantillons de colas

Les échantillons	Aires des pics	Concentrations (mg/Kg)	Concentrations moyennes (mg/Kg)
	1	1916,42	494,11
Cola rouge	2	1908,898	494,35
	3	1926,704	
	1	1719,859	443,43
Cola blanc	2	1726,982	448,36
	3	1770,049	
	1	<LD	<LD
Petit cola	2	<LD	<LD
	3	<LD	

On observe en moyenne 450 à 500 mg/Kg de caféine dans les noix de cola que l'on trouve sur le marché. La variété de couleur rouge est un peu plus concentrée en caféine que celle de couleur blanche. Cependant, la quantité de caféine présente dans le petit cola n'est pas quantifiable par la méthode utilisée. Le graphique suivant résume ces différentes observations.

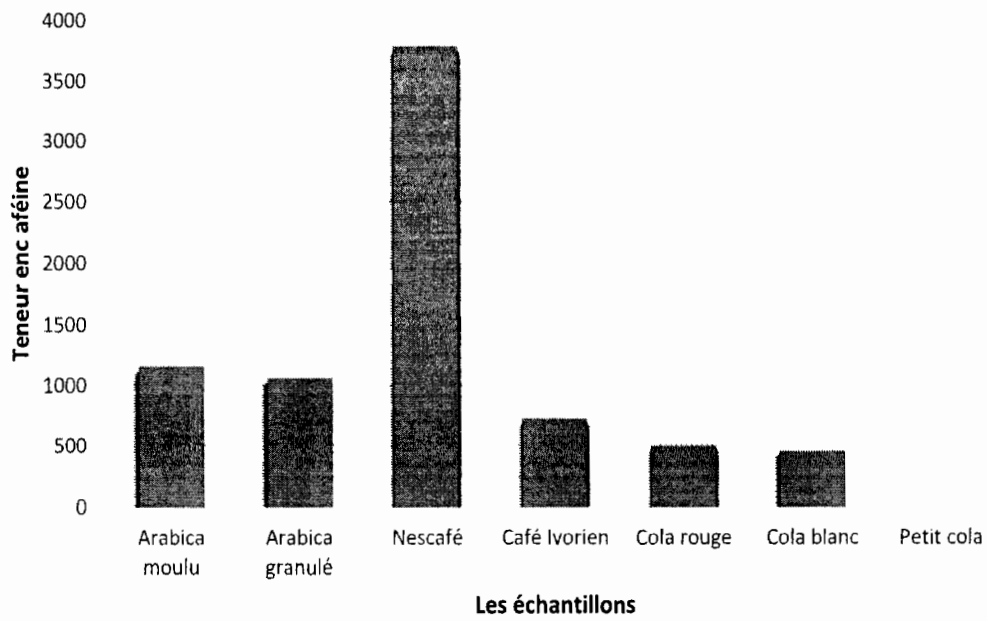


Figure 4: Comparaison de la teneur en caféine des cafés et colas

I.2.2. La teneur en caféine des boissons

Les boissons ont été analysées dans les mêmes conditions que les produits naturellement riches en caféine. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-contre.

Tableau 16: Résultats de l'analyse des boissons gazeuses

Les échantillons	Aires des pics	Concentrations (mg/L)	Concentrations moyennes (mg/L)
	1	179,25	13,04
Moca café	2	177,409	12,91
	3	174,462	12,71
	1	1373,132	93,98
Coca-cola 50 cl	2	1362,026	93,23
	3	1369,457	93,73
	1	1461,219	99,95
Coca-cola 33 cl	2	1469,399	100,51
	3	1442,191	98,66
	1	1479,087	101,16
Zen cola	2	1441,935	98,64
	3	1457,633	99,71
	1	1828,385	124,84
Pepsi Max	2	1831,547	125,06
	3	1837,751	125,48
	1	<LD	<LD
4 Hair cola	2	<LD	<LD
	3	<LD	<LD

La plus petite concentration en caféine quantifiable est enregistrée par l'échantillon Moca café (12,89 mg/L) et la concentration la plus élevée correspond à celle de l'échantillon

XXL (455,47 mg/L). Les concentrations moyennes varient ainsi de 12 à 450 mg/L dont la base est occupée par les boissons de types cola qui possèdent des concentrations comprise entre 90 et 125 mg/L. Toutes ces observations sont résumées par le graphique ci-après.

Tableau 17: Résultats des différentes boissons énergisantes

Les échantillons	Aires des pics	Concentrations (mg/L)	Concentrations moyennes (mg/L)
	1	6075,923	412,81
XXL	2	7175,666	487,37
	3	6863,777	466,23
	1	3878,615	263,84
5 Star	2	3969,703	270,02
	3	3984,116	270,99
	1	5108,842	347,25
Red Bull	2	5050,95	343,32
	3	5050,557	343,30
	1	4973,49	338,07
Shark	2	5003,995	340,14
	3	5000,434	339,90
	1	4791,722	325,75
Cody's	2	4789,768	325,62
	3	4835,982	328,75

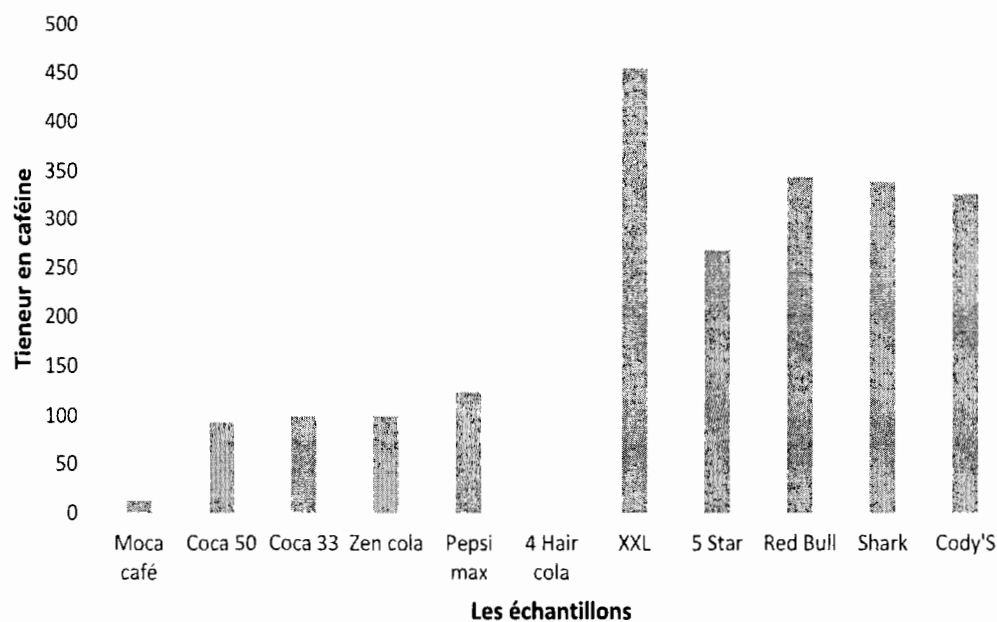


Figure 5: Comparaison de la teneur en caféine des différentes boissons

La plus part des BDE ne respecte pas la directive de l'UE qui interdit la vente des boissons contenant plus de 320 mg/L de caféine. La quantité de caféine apportée par jour à l'organisme dépend considérablement du type de boissons et du volume du format consommé.

Les boissons sont conservées dans des bouteilles à usage individuel dont le volume varie de 25 cl à 50 cl. La quantité de caféine de chaque portion est donnée dans le tableau suivant.

Tableau 18: Teneur en caféine des portions de boissons

Les échantillons	Volume de la portion (ml)	Teneur (mg)
Moca café	330	4,254
Coca-cola 0,5	500	46,824
Coca-cola 0,33	330	32,904
Zen cola	500	49,921
XXL	350	113,868
5 Star	330	93,901
Red Bull	250	86,156
Shark	250	84,843
Pepsi Max	330	41,293
Cody's	250	81,677

Chaque portion consommée correspond à une quantité bien connue de caféine absorbée par l'organisme. La quantité de caféine dans l'organisme est donc proportionnelle au nombre de format consommé par jour.

II. DISCUSSION

II.1. Caractérisation de la teneur en caféine

II.1.1. Les cafés et colas

La teneur en caféine des cafés peut varier de façon considérable selon l'origine, la technique de séchage, la méthode de préparation. Les cafés provenant de l'espèce Robusta ont une teneur en caféine deux fois supérieure à celle provenant de l'espèce Arabica sans pour cela nuire à leur consommation. La méthode utilisée pour l'extraction dans cette étude correspond bien à la description d'un café infusé. Le temps d'infusion fixé à une heure permet en effet de pouvoir extraire le maximum de caféine contenu dans les différents cafés. Le NESCAFE classic est issu du café robusta ; c'est ce qui explique sa forte teneur en caféine par rapport aux cafés de type arabica obtenu lors de l'échantillonnage. La forte torréfaction (cas du café ivoirien) diminue fortement la quantité de caféine contenue dans le café. Le fait que le café reste sous forme de grains ou sous forme de poudre ne joue pas sur la teneur en caféine.

Les disparités constatées expérimentalement entre les différentes sources naturelles de caféine pourraient être dues au fait que la caféine extraites de ces plantes contient également des proportions très variables, d'autres xanthines dont la théophylline et la théobromine, qui sont aussi des stimulants cardiaques, et d'autres substances telles que les poly-phénols qui forment des complexes insolubles avec la caféine. Ce qui empêche l'extraction totale, voire même inhibe complètement l'extraction de la caféine. C'est ce qui explique la non détection de la caféine dans les échantillons de petit cola et de 4 Hair cola, boisson à base de petit cola. De nombreux écrits affirment que la noix de petit cola en plus de la caféine est très riche en théobromine.

II.1.2. Les boissons fraîches

La caféine est l'ingrédient principal de certaines boissons telles que le Coca-cola où ces propriétés stimulantes remplacent les extraits de la noix de cola utilisés originellement pour sa préparation. Ces boissons contiennent généralement entre 10 à 50 mg de caféine par portion. En comparaison, une boisson énergisante dépasse les 80 mg par portion. La caféine de ces boissons provient des ingrédients utilisées (guarana surtout) ou est ajouté comme

additif ; elle est alors obtenue par synthèse chimique d'un produit naturel tels que le café, le cacao, le cola, etc.

II.2. Impact de la teneur en caféine sur la santé

Les données disponibles ne permettent pas d'évaluer l'apport total de caféine (incluant la quantité provenant des boissons énergisantes) chez les jeunes et de comparer cette valeur aux limites recommandées. La consommation d'une seule boisson énergisante peut toutefois représenter un apport important de caféine pour les enfants et les adolescents :

- la teneur en caféine d'une boisson énergisante (tableau 17) dépasse l'apport maximal recommandé chez les enfants de 12 ans et moins (tableau 5). Même les moins concentrées peuvent facilement fournir un excès de caféine pour plusieurs d'entre eux. Santé Canada déconseille d'ailleurs la consommation de boissons énergisantes chez les enfants ;
- pour les adolescents, une boisson énergisante à elle seule ou combinée à d'autres sources de caféine peut représenter un apport excessif en caféine (tableau 5). Notons que la teneur en caféine des cafés peut aussi excéder cette limite ;
- chez la plupart des enfants et des adolescents en bonne santé, la consommation occasionnelle d'une boisson énergisante est susceptible d'entraîner des effets indésirables modérés et temporaires, tels que : agitation, anxiété, nervosité, maux de tête, troubles gastro-intestinaux, palpitations et troubles du sommeil.

En plus des boissons énergisantes, les autres sources de caféine qui sont susceptibles d'être consommées par les enfants et les adolescents incluent : le café et les boissons au café, le thé, les boissons gazeuses de type cola, le chocolat, ainsi que diverses friandises caféinées. Tous ces produits contribuent à l'effet cumulatif de la caféine consommée au cours d'une même journée.

CONCLUSION

La caféine, alcaloïde dérivé de la xanthine, est une molécule naturellement produite par une soixantaine de végétaux dont le café et le cola. Elle entre dans la fabrication de nombreuses boissons et de différents médicaments, qu'ils soient ou non délivrés sur ordonnance. La caféine est sans aucun doute la substance stimulante la plus consommée dans le monde.

Cette étude nous a permis d'abord de recenser quelques produits caféinés vendus dans les supermarchés et de connaître la teneur en caféine de ces différents produits très prisés par une tranche importante de la jeunesse. L'étude de la caféine a permis aussi de comprendre le principe de la chromatographie liquide, méthode qui a permis l'identification et la quantification de la molécule de caféine dans ces différents produits.

A l'issue de cette étude on remarque que la caféine est un constituant naturel des cafés et des colas. La teneur moyenne en caféine des grains de café arabica torréfié moulu est d'environ 700-1000 mg/Kg, celle d'un café instantané provenant de la plante robusta peut atteindre jusqu'à 3500 mg/Kg. Cependant il faut noter que la teneur en caféine d'une tasse de café est influencée par de nombreux facteurs tels la taille de la tasse, la quantité de café utilisée, le mode de préparation, etc.

La teneur moyenne des noix de cola que l'on trouve sur le marché peut atteindre jusqu'à 500 mg/Kg. Cependant, la méthode d'extraction utilisée ne permet pas l'identification de caféine contenue dans les noix de petits colas.

La caféine est ajoutée aux différentes boissons comme additif. Ainsi un verre (330 ml) de boisson gazeuse caféinée contient entre 20 et 60 mg de caféine et une BDE contiennent environ 40 à 100 mg de caféine par portion (250 ml). Les BDE sont très riches en caféine d'où leur interdiction pour les enfants et les adolescents.

La caféine joue de nombreuses rôles dans l'organisme de l'homme (améliorer la vigilance, combattre la fatigue). C'est ainsi que certaines organismes affirment que la caféine pourrait diminuer le risque de cancer du poumon et du sein.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Caféine (en ligne). <http://fr.m.wikipedia.org/wiki/caféine> (consulté le 06 février 2015).
2. Anne-Amandine Decroix (2009), Stabilité physique et désordre orientationnel dans un cristal à usage thérapeutique : La caféine, Thèse de docteur en Molécules et Matière condensée, Université de Lille 1, France.
3. Denis Sylvain (1996). Dégradation de la caféine par *Aspergillus* sp et *Penicillium* sp. Étude physiologique et Biochimique, Thèse de docteur en Biochimie et Biologie Moléculaire, Université Montpellier 2, France.
4. Marian Chabaud (2010), La caféine, Antenne Médicale de Prévention du Dopage Languedoc-Roussillon (AMPD LR).
5. La caféine dans les aliments- Additifs alimentaires (en ligne). <http://www.cs-hc.gc.ca> (consulté le 14 novembre 2014).
6. Laurie Plamondon (2011), Les boissons énergisantes : entre menace et banalisation, collection TOPO, Numéro 2, Institut National de Santé Public du Québec, Québec.
7. Joel Rotstien, Jennifer Borber, Carl Strowbridge, Stephen Hayward, Rong Huang et Samuel Benreheb Godefroy, (juin 2013). Boissons énergisantes : une évaluation des risques potentiels pour la santé en contexte canadien. *Int. Food risk. J*, vol 3 page 1-37.
8. A. Mendes-Oustrie, A. Guerrin, P. Roualt, L. Roux, A. Pech, O. Coste, (2010). Etude d'impact de condition extrême de stockage de comprimés en opérations : cas de la caféine à libération prolongée. *Médecine et armées*, N° 38 (4), page 321-328.
9. Constance BEGUERIE (2014). Boissons dites « énergisantes » : composition et conséquences sur la santé des consommateurs, Thèse de docteur en Pharmacie, Université de Bordeaux, France.
10. Schéma de la molécule de caféine (en ligne). http://fr.wikipedia.org/wiki/Image:Caffeine_molecule.png (consulté le 07 janvier 2015).
11. Hélène Baribeau, la caféine et ses effets néfastes sur la santé (en ligne). <http://www.helenebaribeau.com/> (consulté le 14 novembre 2014).
12. L'effet de la caféine pendant la grossesse (en ligne). <http://sante.lefigaro.fr/> (consulté le 11 novembre 2014).
13. Institut national de santé publique du Québec (Novembre 2010). Boissons énergisantes : risques liés à la consommation et perspective de santé publique, Institut national de santé publique, Québec. Page : 15-61.
14. Document législatif n° 5-1093/1 du sénat de Belgique (en ligne). <http://www.senate.be/> (consulté le 02 décembre 2014).

15. Centre d'expertise en analyse environnementale de Québec (Juin 2009). Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie, DR-12-VMC, Québec, Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, Edition courante.
16. Office Internationale de la Vigne et du Vin (OIV), 2005, Recommandations harmonisées pour la validation des méthodes d'analyses par un seul laboratoire (rapport technique), OIV, Paris.
17. Michèle Désenfant, Marc Priel, Cédric Rivier, De la validation des méthodes d'analyses à l'évaluation de l'incertitude des résultats de mesures, Laboratoire National d'Essais BNM-LNE, Paris.
18. Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, de l'Alimentation, de l'Environnement et de Travail (ANSES), (septembre 2013). Évaluation des risques liés à la consommation de boissons dite « énergisante ». ANSES, Paris.
19. Brache, K., G. Thomas et T. Stockwell (2012). La consommation de boissons alcoolisées caféinées au Canada : prévalence, risques et recommandations en matière de politiques, Centre canadien de lutte contre l'alcoolisme et les toxicomanies, Ottawa (Ontario).
20. Francis Rouessac, Annick Rouessac (2004), Analyse Chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes, cours et exercices corrigés, 6^e édition, DUNOD, Paris, page 36-60.
21. SAFI Mohamed (2008-2009), cours chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP), Université HASSAN II, Mohammedia.
22. Jean-Louis CUQ, Chromatographie Liquide, Université Montpellier 2, France.
23. L. R. Mekacher, A. Zouani, M. Azouz, M. Reggabi, statut de la caféine dans le dopage : Evaluation des taux urinaires chez un groupe de footballeurs algériens, Revue campus N° 16, page 3-10.
24. M. Bruce, N. Scott, M. Lader, V. Marks, (1986), The psychopharmacological and electrophysiological effect of single doses of caffeine in healthy human subjects, Br. J. clin. Pharmac N° 22, page 81-87.
25. M. LeventAltun (2002). HPLC method for the analysis of paracetamol, caffeine and dipyrone, Turk J chem N° 26, page 521-528
26. Uwe Fuhr, Karl Ludwig Rost, Reinold Engelhardt (et al), (1996), Evaluation of caffeine as a test drug for CYP1A2, NAT2 and CYP2E1 phenotyping in man by in vivo versus in vitro correlations, Pharmacogenetics N° 6, page 159-176.

27. Risques associés aux boissons énergisantes (en ligne).
<https://www.evidis.ch/pharmadigest/FR/pharmadigestcardview.aspx> (Consulté le 24 novembre 2014).
28. Boisson énergisantes de plus en plus de cas aux urgences (en ligne).
<http://sante.lefigaro.fr/> (consulté le 11 novembre 2014).
29. Dossier technique pour les boissons riches en caféine ou énergisantes (en ligne).
<http://www.vd.ch/unite-psps> (consulté le 19 novembre 2014).
30. Caf-lib, substitut de café et thé : FAQ (Foire Aux Questions) (en ligne).
<http://www.caflib.com/fr/faq/> (consulté le 09 février 2015).

ANNEXE

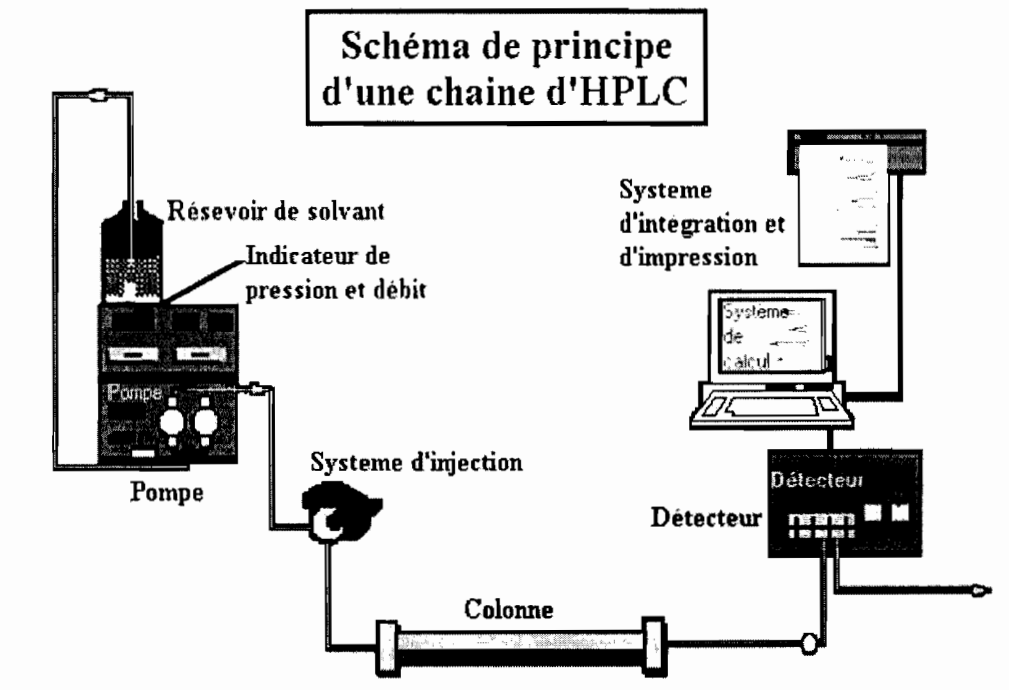


Figure 6: Principe de fonctionnement de la HPLC

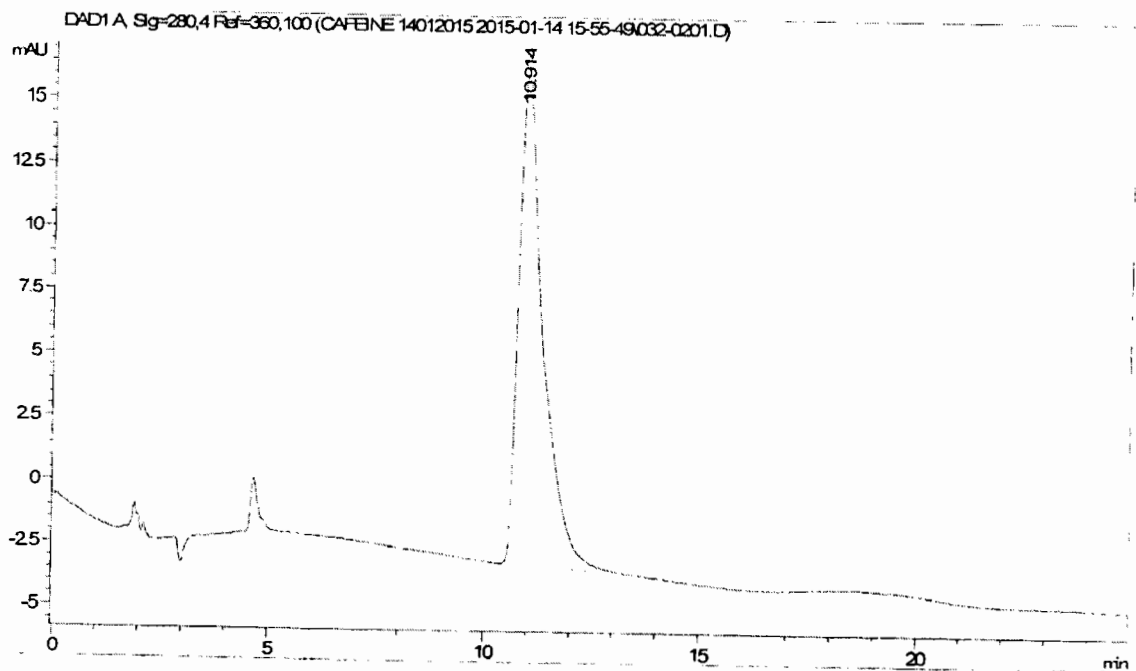


Figure 7: Chromatogramme de la solution standard

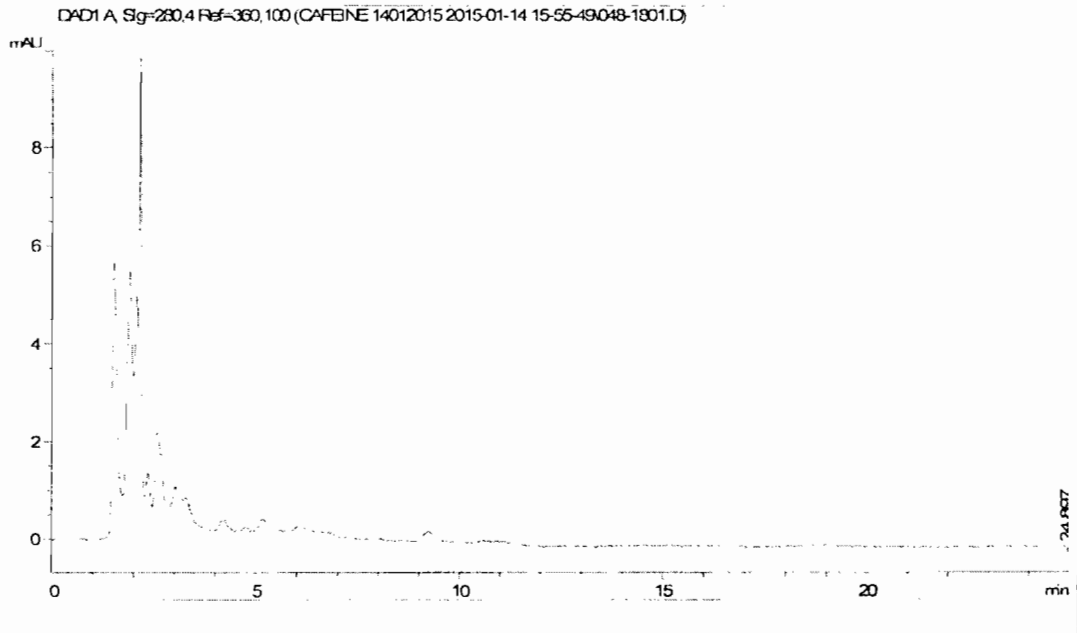


Figure 8: Chromatogramme d'un échantillon de petit cola

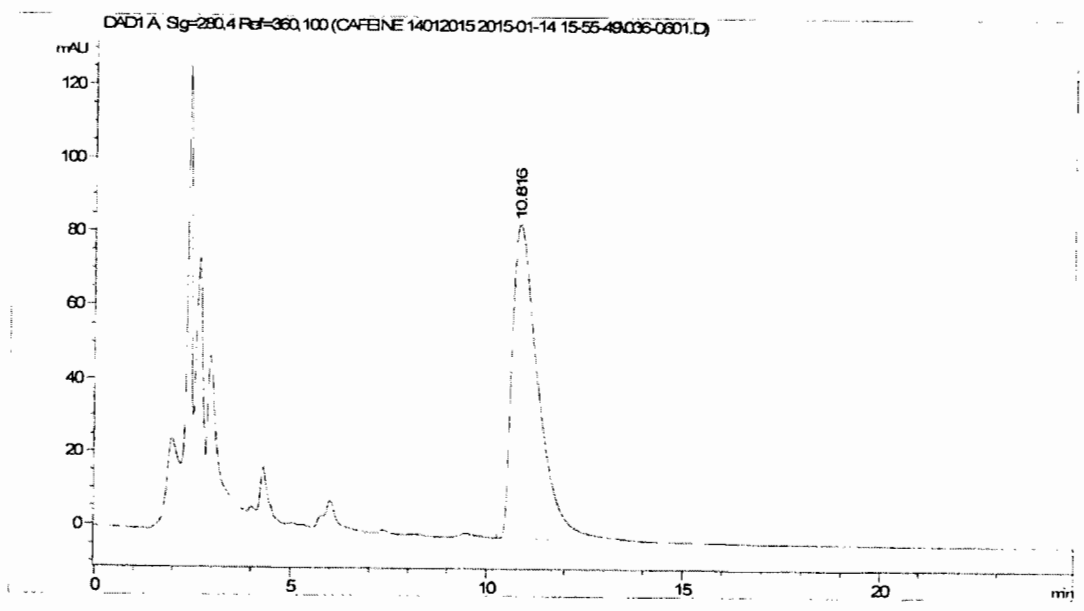


Figure 9: Chromatogramme d'un échantillon de café

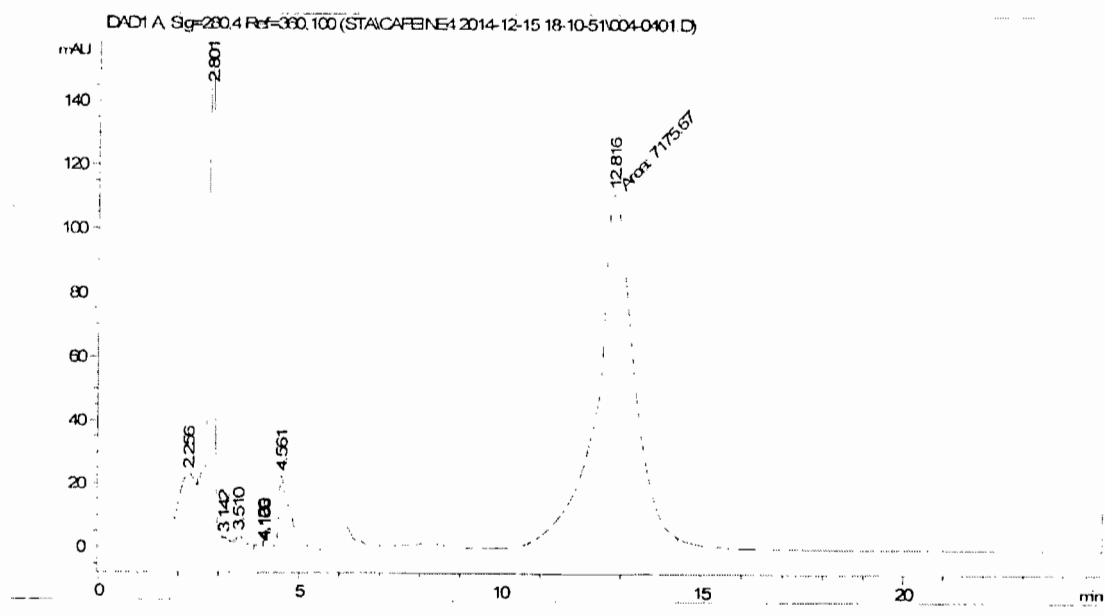


Figure 10: Chromatogramme d'un échantillon de XXL