

République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
Université A. Mira de Bejaia
Faculté de Technologie
Département de Génie des Procédés
Mémoire de fin de cycle
Pour l'obtention du diplôme de MASTER
En : Génie des Procédés
Option : Science et Technologie du Médicament.

Thème :

**Etude de la stabilité de la substance
active (AMLODIPINE) dans
l'extrait de la plante de thé**

Réalisé par :

M^{elle} TIZIT SONIA

M^{me} BOUCHENEB NORIA

Membre du jury :

Mr KACHBI

M^{me} BOUARICHE

Encadré par :

M^{me} H.BELKACEMI

M^{me} SENHADJI

Promotion

2014-2015

Remerciements

Nous tenons à remercier tout d'abord le bon dieu qui nous a donné la volonté et le courage afin de réaliser ce modeste travail.

Nous voudrions remercier :

Nos promotrices: M^{me} BELKACEMI et M^m SENHADJI pour le temps qu'elle nous a accordé et pour nous avoir suivis dans nos démarches, pour nous avoir transmis les renseignements nécessaires à la réalisation de ce projet.

M^r KACHEBI d'avoir accepté de présider notre jury.

M^{me} BOUARICHE d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous remercions profondément tous les enseignants du département de génie des procédés qui nous ont donné de leurs savoir et nous ont soutenu tout au long de notre cursus.

Nous tenons également à remercier toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.



Merci à tous



Dédicace



A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie.



Je dédie ce humble travail à :

Ma grand mère **Yaya** que dieu t'accorde une longue vie et bonheur.

Mes très chers parents (**Malik et Nacera**), pour leur amour et leur sacrifice, que Dieu vous procure une longue vie et bonne santé.

Mes très chers frères : **Ahcén** et sa femme **Lydia** et **Nourddine**.

Mes très chers sœurs : **Katia** et son mari **Younes**, **Zoubida** et son mari **Farouk** et **Samia**.

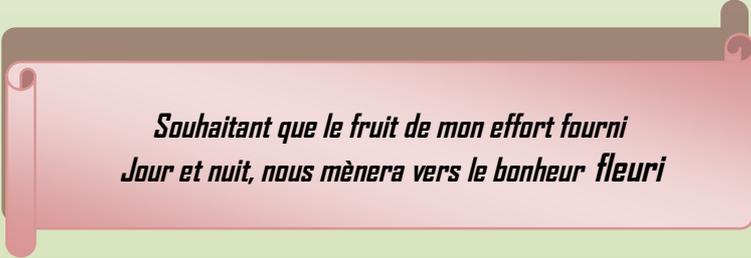
Mes nièces et neveu : **Alicia**, **Amélia** et **RAYAN**

Mes oncles et tantes surtout **Khalti Nora** et **Tata Houria**.

Mes cousins et cousines surtout **Taous**.

Tous mes amis (es) sans exception.

Un ami spécial et unique  qui est présent en tout au long de cette période universitaire dans tout les moments.



*Souhaitant que le fruit de mon effort fourni
Jour et nuit, nous mènera vers le bonheur fleuri*



Sonía

Dédicace

*Je rend grâce, à mon dieu de m'avoir donné la force, la volonté,
l'intelligence et la sagesse d'être patiente dans mes études.*

Je dédie ce travail à mes parents :

*A ma mère Zakia : aucune dédicace ne serait exprimé l'affection et le
respect que j'éprouve envers toi*

*A mon père Rachid : puisse ce modeste travail constitue une légère
recompence pour tous les nobles sacrifices que tu t'es imposé pour
assurer mon éducation.*

A mes sœurs Souhila et sonia.

A mes frères : zahir et sofiane

A beau frere massi et sa fille lena

*A mon très chère mari Ghiles j'épère qu'il trouvera dans ce travail tout
mon amour*

A mon petit ange Alicia

Toute ma belle famille :

Mes beaux parents Hecene et Ghania

Ma belle sœur Samira

Mes beaux frères : Rachid, Yahia, Hadi, Rabia, Zahir, Fares et Lyes

Tous ceux qui me connaissent.

Que Dieu vous gardent

Noria



SOMMAIRE

Liste des abréviations.

Liste des tableaux.

Listes des figures.

INTRODUCTION.....1

Chapitre 1 : Etude Bibliographique.

I. Introduction.....	2
I.1. Extraction des composants poly phénolique de la plante de thé.....	2
I.1.1. Définition de thé.....	2
I.1.2. L'origine.....	3
I.1.3. Description botanique et classification.....	3
I.1.4. Composition chimique du thé.....	4
I.1.5. La CUEILLETTE de CAMELLIA SINENSIS.....	5
I.1.6. Différentes type de thé.....	6
I.1.7. Thé vert et sa richesse en composés phénolique.....	7
I.1.8. Le pouvoir antioxydant « test au DPPH ».....	9
I.2. Les antioxydants.....	11
I.2.1. Les antioxydants les plus utilisés.....	12
I.2.2. Rôle et intérêt de la vitamine C.....	12
I.3. Les maladies cardiovasculaire.....	13
I.3.1. Les maladies cardiovasculaires et leurs classes pharmacologiques.....	13
I.3.2. Les facteurs de risques.....	14
I.3.3. Médicament ciblant le système cardiovasculaire.....	14
I.3.4. Définition, rôle et classe de l'amlodipine bésylate.....	16
I.4. La stabilité physico chimique d'une substance active.....	17
I.4.1. Définition de la stabilité.....	17
I.4.2. Les objectifs de l'étude de stabilité.....	18
I.4.3. Les facteurs influençant la stabilité d'un médicament.....	18

Chapitre II : Mise en œuvre expérimentale.

II.1. Spectrophotométrie d'absorption UV- visible.....	22
II.2. Spectroscopie infrarouge	23
II.3. Caractérisation du principe active (Bésylate amlodipine).....	24
II.4. Caractérisation de l'excipient (l'acide ascorbique).....	25
II.5. Matériels et échantillonnage.....	25
II.6. Matériel végétal.....	26
II.7. Préparation des échantillons.....	27
II.8. Les paramètres d'étude de la stabilité de l'amlodipine.....	28
II.9. Optimisation du temps de stabilité de l'amlodipine dans la liqueur de thé.....	33
II.10. Activité anti radicalaire (test du DPPH) de la liqueur de thé.....	34

Chapitre III. Résultats et discussions.

III.1. Caractérisation par infrarouge des matières premières.....	36
III.2. Détermination du temps critique de stabilité de l'amlodipine seul.....	39
III.2.1. Variation de la stabilité de l'amlodipine seul en fonction du temps.....	39
III.2.2. Suivi de la stabilité de l'amlodipine seul à 37°C	42
III.2.3. Stabilité de l'amlodipine en présence de l'acide ascorbique.....	42
III.2.4. Stabilité de l'amlodipine avec l'acide ascorbique à 37°C.....	43
III.3. Etude de l'effet de l'adition d'une liqueur de thé sur la stabilité de l'amlodipine.....	44
III.3.1. Influence du volume de la liqueur de thé.....	45
III.3.2. Influence de la température.....	49
III.3.3. Influence du pH.....	51
III.4. Optimisation du temps de stabilité de l'amlodipine, dans les conditions optimales.....	54
III.5. Détermination de l'activité antiradicalaire (test de DPPH).....	55
Conclusion.....	57

References bibliographiques.

Annexes.

LISTE DES ABREVIATIONS

AA : Acide ascorbique.

Abs : absorbance.

AMLO : Amlodipine.

C : Concentration (mg/l).

CN : Condition normal.

DPPH: 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl.

DPPH-H: 1,1-Diphényl-2-Picrylhydrazine.

EGCG : l'épigallocatechinegallate.

EOA : espèces oxygénées activées.

EGC : épigallocatechine.

EBD : eau bi distillé.

EC50 : efficient concentration.

ED : eau distillé.

HCL : Acide hydrochlorique.

Liq : Liqueur de thé vert.

mM : milli molaire.

M : Masse molaire (g/mole).

NAOH : Acide hydroxyde de sodium.

T : Température (°C).

t : temps (min).

λ : longueur d'onde (nm).

Liste des tableaux

Chapitre II

Tableau II.1 : Caractéristiques physicochimiques de l'amlodipine

Tableau II.2 : Caractéristiques physicochimiques de l'acide ascorbique.

Tableau II.3 : Conditions optimales fixées pour l'étude de la stabilité de l'amlodipine seule et avec l'acide ascorbique dans la liqueur de thé.

Chapitre III

Tableau III.1. Propriétés physico-chimique de la liqueur de thé.

Tableau III.2. Concentrations de l'amlodipine en fonction des volumes de la liqueur de thé, à différents paramètres optimaux fixés de T° , de pH et de temps critique de stabilité.

Tableau III.3. Concentrations de l'amlodipine en fonction du pH de la solution de liqueur de thé.

Tableau III.4. Concentrations de l'amlodipine dans la liqueur de thé et dans les conditions optimales fixes, en fonction du temps optimisé.

Tableau III.5. Activité antiradicalaire avec la DPPH pour différents volumes de liqueur de thé.

Tableau III.6. Résultats des absorbances de l'amlodipine dans les conditions normales et conditions de chauffages à 37°C pour différents temps.

Tableau III.7. Résultats des absorbances de l'amlodipine avec l'acide ascorbique dans les conditions normales et conditions de chauffages à 37°C pour différents temps.

Tableau III.8. Résultats des absorbances de l'amlodipine dans les conditions normales et conditions de chauffages à 37°C pour différents volumes de la liqueur de thé.

Tableau III.9. Résultats des absorbances de l'amlodipine avec l'acide ascorbique dans les conditions normales et conditions de chauffages à 37°C pour différents volumes de la liqueur de thé.

Tableau III.10. Résultats des absorbances de l'amlodipine en fonction des volumes de la liqueur de thé, à différents paramètres optimaux fixés de T° , de pH et de temps critique de stabilité

Liste des tableaux

Tableau III.11. Résultats des absorbances de l'amlodipine aux Tc et pH fixes en fonction du volume de la liqueur de thé et pour différentes températures.

Tableau III.12. Résultats des absorbances de l'amlodipine avec l'acide ascorbique aux Tc et pH fixes en fonction du volume de la liqueur de thé pour différentes températures.

Tableau III.13 : Résultats des absorbances de l'amlodipine en fonction du pH de la solution de liqueur de thé.

Tableau III.14 : Absorbances de l'amlodipine dans la liqueur de thé et dans les conditions optimales fixes, en fonction du temps optimisé

Tableau III.15. Résultat du test DPPH de la solution de la liqueur de thé.

Listes des figures

Chapitre I

Figure I.1: Photos montrant *Camellia sinensis*.

Figure I.2 : La cueillette des feuilles de thé.

Figure I.3 : Flétrissage du thé.

Figure I.4 : torréfaction du thé.

Figure I.5 : roulage du thé.

Figure I.6 : séchage manuel du thé.

Figure I.7 : Effets biologiques des poly phénols.

Figure I.8 : Structure des différents types de catéchines.

Figure I.9 : Forme libre et réduite du DPPH°.

Figure I.10 : Structure chimique de l'amlodipine Bésylate.

Figure I.11 : Schéma de la réaction thermo et photo dégradation par oxydation d'un dérivé 1,4 dihydropyridine (Amlodipine).

Figure I.12 : Dégradation chimique de l'amlodipine par l'acide ascorbique en présence de la chaleur.

Chapitre II

Figure II.1 : UV-visible Spectro scan 50.

Figure II.2 : Le thé vert BARARI.

Figure II.3 : les étapes de la préparation de la liqueur de thé.

Chapitre III

Figure III.1. Spectre IR d'Amlodipine Bésylate dans le Kbr.

Figure III.2. Spectre IR de thé vert BARARI dans le Kbr.

Figure III.3. Spectre IR de l'acide ascorbique dans le Kbr.

Figure III.4 : Spectre d'absorption UV de l'amlodipine dissoute dans l'eau bidistillée.

Figure III.5 : Spectre d'absorption UV de l'acide ascorbique dissous dans l'eau bidistillée.

Figure III.6 : Spectre d'absorption UV de la liqueur de thé.

Figure III.7. Evolution en fonction du temps des spectres d'absorption UV de l'amlodipine seul.

Figure III.8. Evolution en fonction du temps des spectres d'absorption UV de l'amlodipine seule à 37°C (température physiologique) à pH neutre (eau bidistillée)

Figure III.9. Evolution en fonction du temps des spectres d'absorption UV de l'amlodipine en mélange avec l'acide ascorbique.

Figure III.10. Evolution en fonction du temps des spectres d'absorption UV de l'amlodipine en présence de l'acide ascorbique à 37°C.

Figure III.11. Spectres d'absorption UV de l'amlodipine dans : **a)** les conditions normales CN (T_{amb} ; pH EBD) et **b)** à 37°C, au temps $t_c=20min$, pour différents volumes de liqueur de thé.

Figure III.12 stabilité de l'amlodipine avec l'acide ascorbique en fonction du temps : a) dans CN et b) à 37°C pour différents volume de la liqueur de thé.

Figure III.13. Comparaison des spectres UV de l'amlodipine avec l'acide ascorbique dans : **a)** les conditions normales CN et **b)** à 37°C, au temps $t_c= 240min$, avec et sans la liqueur de thé.

Figure III.14. Concentrations de l'amlodipine avec la liqueur de thé, avec ou sans l'acide ascorbique, en fonction du volume de la liqueur de thé.

Figure III.15. Stabilité de l'amlodipine dans les mélanges de liqueur de thé : a) amlo seule ; b) amlo + AA, aux temps t_c et pH (eau bidistillée) fixes, en fonction du volume de liqueur de thé et pour différentes températures.

Figure III.16. Variation de l'absorbance de l'amlodipine dans la liqueur de thé, aux conditions optimales fixes de volume de liqueur de thé $V_{liq} = 10ml$ et de température $T=30°C$, pour différents pH en fonction du temps.

Figure III.17. Variation de l'absorbance de l'amlodipine avec l'acide ascorbique et la liqueur de thé, dans les conditions optimales de volume de liqueur de thé $V_{liq} = 3ml$ et de température $T=37^{\circ}C$ fixes, pour différents pH en fonction du temps.

Figure III.18. Concentrations de l'amlodipine dans les mélanges (Amlo + liqueur) et (Amlo + AA + liqueur) aux conditions optimales de T° et de temps critique, en fonction du pH.

Figure III.19. Stabilité de l'amlodipine dans la liqueur de thé en fonction du temps dans les conditions optimales de T° , de pH et de volume V_{liq} jusqu'à 4 jours.

Figure III.20. Pourcentage d'inhibition de la DPPH en fonction des volumes de la liqueur de thé.

INTRODUCTION

Dans le processus du développement pharmaceutique, la stabilité constitue l'une des préoccupations majeures qui régit à la fois la formulation, le conditionnement et la conservation du médicament. Ainsi, il doit subir une série de tests dits « essais de stabilité ».

La notion de stabilité comprend la constance de la qualité d'un médicament, de sa sécurité et de son activité thérapeutique dans le temps c'est-à-dire au cours de sa conservation.

L'amlodipine est un antagoniste du calcium de la classe des dihydropyridines. C'est une classe médicamenteuse qui joue un rôle important dans le traitement de l'hypertension artérielle. L'inconvénient de cette molécule est qu'elle a une faible biodisponibilité, du fait de sa faible solubilité dans l'eau est dans les liquides biologiques. Ce qui implique une forte augmentation des doses administrées aux patients pour atteindre l'objectif thérapeutiques fixé, et donc un accroissement des possibles effets secondaires liés aux traitements médicaux [1].

Les plantes sont capables de produire de nombreux métabolites secondaires parmi lesquels on distingue la famille des composés phénoliques. Avec sa diversité structurale remarquable, ces derniers, également appelés polyphénols, constituent une richesse déjà largement exploitée par les industries agro-alimentaire, cosmétiques et pharmaceutiques. Les polyphénols (flavonoïdes, acide phénoliques, tannins) sont présents dans toutes les parties de la plante. Ils entrent dans la composition des produits de consommation les plus courants, en particulier les produits transformés comme le thé [2].

L'objectif de ce travail est de rechercher les causes de la dégradation du principe actif amlodipine et de déterminer une éventuelle incompatibilité avec la vitamine C, ainsi que l'influence des facteurs physiques tels que : la température, pH, lumière, et oxygène sur la stabilité de l'amlodipine.

Dans le présent manuscrit, nous présentons dans notre premier chapitre une revue bibliographique qui comporte deux parties qui porte sur : les propriétés antioxydants et de la stabilité physico chimique d'un principe actif (Amlodipine), d'une part et sur l'extraction de la plante de thé.

Le deuxième chapitre est consacré à la mise en œuvre expérimentale, ainsi que matériel et méthodes exploités dans cette étude Dans le troisième chapitre sont consignés l'ensemble des résultats et discussions. Et nous terminons par une conclusion qui résume les résultats les plus concluants de ce travail.

Chapitre I

Etude bibliographique

I. Introduction.

Le thé est une plante médicinale qui a été employée pendant des siècles comme remèdes des maladies humaines, parce qu'elle contient des composants de valeurs thérapeutiques [4].

Le thé vert est un thé peu oxydé possédant de nombreux bénéfices pour la santé de l'homme. Ces derniers qui sont en train d'émerger, de plus en plus, à travers les recherches scientifiques.

La plupart de ses effets bienfaits sont dû à des composés phénoliques qui appartiennent à la sous famille des flavonoïdes appelés catéchines et en particulier l'épigallo catéchine gallate (EGCG) qui est un antioxydant très puissant [3].

Ces dernières années, nous observons un débordement d'informations sur le rôle du stress oxydatif dans le déclenchement d'un certain nombre de maladies graves, ainsi que sur le rôle thérapeutique des antioxydants dans ces pathologies [5].

En effet le stress oxydatif est défini comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression (EOA), suite à un déséquilibre lié soit à une production accrue d'EOA soit à une diminution de la capacité de défense antioxydants [6]. De nombreuses études ont été effectuées pour montrer le rôle des catéchines comme antioxydants dans la diminution du stress oxydant et par conséquent dans la prévention de la photo vieillissement, du cancer et des maladies cardio-vasculaires [7].

Il a été trouvé que l'EGCG réduit considérablement les espèces oxygénées réactives et joue un rôle important dans le piégeage des radicaux libres [8].

I.1. Extraction des composants polyphénoliques de la plante de thé.

I.1.1. Définition du thé.

Le thé est connu surtout pour sa boisson très consommée dans le monde. C'est le breuvage le plus consommé au monde après l'eau, c'est aussi une boisson très ancienne puisque la consommation de thé trouve ses origines en Chine, il y a environ 4500 ans [1].

Le thé est une plante médicinale qui a été employée pendant des siècles comme remède pour les maladies humaines parce qu'elle contient des composants de valeurs thérapeutiques [4]. Il existe trois formes de thé, nommément thé vert non fermenté, thé noir totalement fermenté et thé OOLONG partiellement fermenté [3].

Il semble que le thé vert soit celui qui possède le plus de vertus thérapeutiques, ces derniers reconnues depuis longtemps par la médecine traditionnelle chinoise.

En effet, il représente une source naturelle d'antioxydants réduisant, de ce fait, les risques de maladies cardiovasculaires, tout en possédant des propriétés anticancéreuses. De plus, il agit positivement sur le système immunitaire sanguin, nerveux et digestif [4]. Il a été montré, d'après la littérature, que l'activité antioxydante des différents types de thé décroît suivant cet ordre: vert > oolong > noir [9].

I.1.2. L'Origine.

Elle remonte probablement au Yunnan chinois (culture de *Camellia sinensis*), au nord de l'Inde dans les régions de l'Assam (culture de *Camellia assamica*) en s'étendant jusqu'au Sud de la Chine [10].

Le théier croit dans les régions tropicales et subtropicales entre le 42^{ème} degré de latitude nord dans l'hémisphère nord et le 31^{ème} degré de latitude sud dans l'hémisphère sud [10,12].

Plusieurs pays pratiquent l'exploitation du thé dans le monde, ce sont principalement la Chine, l'Inde, le Sri Lanka, le Taïwan, le Japon, le Népal, la Turquie et le Kenya [11].

I.1.3. Description botanique et classification.

I.1.3.1. Description botanique.

Tous les théiers du monde proviennent d'une même plante, il s'agit de l'espèce *camellia sinensis*.

A l'état naturel, le théier est un petit arbre très rameux, de 5 à 10 mètres de haut et pouvant atteindre 15 mètres [10], qui possède un système racinaire pivotant et sa durée de vie est en moyenne de 50ans [11].

Les feuilles de théier représentent la partie la plus importante du point de vue utilisation. Elles sont alternées, persistantes, leur forme est allongée, elliptiques, brillantes avec une face en vert foncé, le pétiole est court et mesure de 4 à 10mm, la base est canée et l'apex est aigue à acuminé et des marges dentées [3].

Il existe deux principaux types, le type chine « *camellia sinesiesinensie* » et le type assamica « *camellia sinesieassamica* », malgré leurs variétés descendant de la même espèce, mais leurs différences morphologiques sont bien remarquées, la variété sinesie mesure 2 à 3m et peut vivre 100 ans et plus, caractérisée par des petite feuilles arrondies, épaisses et résistantes au froid, par contre la

variété assamica mesure 20 à 30m et est caractérisée par de grandes feuilles souples et pointues et une faible tolérance au froid [11, 3].

I.1.3.2. Classification [3]

Les botanistes ont classé la plante de thé (**figure I-1**) selon la nomenclature qui suit :

Règne : plantae
Division: magnoliophyta
Classe : magnoliopsida
Ordre : theales
Famille : Theaceae
Genre : *camellia*
Espèce : *sinensis*



**Figure I-1: photo montrant
Camellia sinensis[3]**

I.1.4. Composition chimique du thé.

La feuille du thé ne contient pas moins de 350 constituants. A l'état frais, le thé renferme 27 % de matières sèches [3,9]. Ses principaux constituants sont :

- **Les glucides (40%), 15 à 23 % de protides et 2 à 3 % de lipides.** Ces substances, peu solubles, sont faiblement extraites lors de l'infusion.
- **Les matières minérales (9%) :** 45 % de manganèse, 10 % de potassium et 5 % de magnésium. Par ailleurs, le thé est une boisson riche en fluor qui favorise la prévention des caries.
- **Les vitamines :** Le thé est riche en vitamines du groupe B telles que la thiamine (B1), la riboflavine (B2) et la niacine (B3). La vitamine C se trouve aussi en quantité significative dans le thé vert.

L'infusion de thé contient aussi la vitamine P, qui favorise la perméabilité capillaire et l'élasticité de la paroi des vaisseaux sanguins.

- **Théine (ou caféine) (1 à 5 %) :** est présente dans tous les types de thé, comme c'est une molécule relativement stable et résistante, la teneur en caféine dans les feuilles sèches de tous les types de thé est semblable.

- **Les polyphénols (15 à 30 %)**: Ils sont présents dans tous les thés, quelle que soit leur couleur. Ce sont eux qui donnent au thé ses propriétés anti-oxydantes.
- **Les flavanoïdes (un groupe de polyphénols)** : sont présents à des proportions similaires dans les thés oxydés ou non-oxydés. Ce qui varie, c'est le type de polyphénols présents. Par contre, les thés verts contiennent plus de catéchine (groupe de flavonoïdes simples).
- **Les tannins (tanins)** : sont aussi des molécules de types phénols ou polyphénols liés par des amidons. Le goût astringent du thé provient des tannins.
- **Le carotène** : est connu pour abaisser le taux de cholestérol et le taux de sucre dans le sang ainsi que pour diminuer la tension artérielle. Il serait en outre utile en cas d'infection et diminuerait les allergies alimentaires.
- **Les glycosides** : sont connus pour empêcher l'augmentation du taux de sucre dans le sang et pour leurs propriétés antidiabétiques, tout comme les polysaccharides.

I.1.5. La cueillette de *camellia sinensis*.

Elle s'effectue encore à la main, le plus souvent par des femmes, sauf au Japon et en Géorgie où elle est mécanisée. Elle se pratique plusieurs fois par an, jusqu'à quatre fois ou plus suivant les régions. Les cueillettes se font par relais de 4 à 14 jours, le temps que le théier se renouvelle [12].

Les feuilles les plus jeunes sont vert clair. Ce sont les plus riches en substances actives (caféine, tanin, etc.) et celles qui fournissent la boisson la plus goûteuse et la plus raffinée. À l'extrémité des branches se trouve un bourgeon recouvert d'un duvet blanchâtre, le pekoe, qui signifie en chinois duvet blanc et qui n'est autre que la jeune pousse enroulée sur elle-même.

Ce bourgeon est particulièrement recherché. Plus on redescend sur la branche, plus les feuilles sont larges et moins la boisson est savoureuse. Nous effectuons donc plusieurs sortes de cueillettes suivant la qualité recherchée de la boisson. Dans la cueillette dite « impériale », on cueille uniquement le pekoe plus une feuille, dans la cueillette « fine », le pekoe plus deux feuilles et dans la cueillette normale, le pekoe et trois feuilles ou plus.

Le thé vert est un thé dont les feuilles, après la cueillette, seront le plus souvent flétries et chauffées à haute température, afin de neutraliser les enzymes responsables de l'oxydation. Elles seront ensuite roulées et séchées plusieurs fois afin d'obtenir une forme particulière.

On peut distinguer deux méthodes principales pour obtenir du thé vert. La méthode chinoise, par laquelle les feuilles sont chauffées dans de grandes bassines de cuivre placées sur le feu, et la

méthode japonaise, par laquelle les feuilles seront chauffées à la vapeur, très brièvement, en moins d'une minute, avant d'être roulées et séchées.

I.1.6. Différents types de thé :

Les saveurs du thé varient beaucoup en fonction de leur couleur, de leur provenance, de leur qualité... Noir, vert, rouge, blanc... Le ou lesquels choisir ?

Thé vert, thé blanc et thé noir proviennent du même arbuste (le *camellia sinensis*) cultivé en Chine, au Japon et surtout en Inde et au Sri Lanka (Ceylan)

Leur différence réside dans la fermentation. En résumé, le thé noir est fermenté, le vert est non fermenté, et entre les deux, il y a le thé oolong semi-fermenté [1,4].

- **Le thé noir** est en moyenne plus théiné, donc plus tonique que le thé vert. La fermentation altérerait ses polyphénols et les rendraient inactifs. Le thé Darjeeling est un des rares thé noirs à contenir des catéchines.
- **Le thé oolong** : possède un goût subtil et parfumé incomparable. Il est préconisé contre la rétention d'eau et la cellulite.
- **Le thé blanc** : est en quelque sorte la fine fleur du thé vert, il est constitué des bourgeons et des meilleurs feuilles du thé soumises à un processus de séchage moins long. Il possède les mêmes vertus que le thé vert, avec une teneur en polyphénols plus élevée.
- **Le thé rouge** : (rooibos) est issu de la fermentation des feuilles de l'*Aspalathus linearis*, cultivé en Afrique du Sud. Ce n'est donc pas du vrai thé. Dépourvu de théine, antispasmodique et antiallergique, il est idéal pour les enfants qui de plus apprécient son goût.
- **Le thé vert** : est celui qui a fait semble-il l'objet de plus d'études et à qui l'on reconnaît le plus de bienfaits, grâce à ses puissantes vertus antioxydantes en raison de la présence de polyphénols et de flavonoïdes.

La fabrication d'un thé vert se déroule en 5 étapes principales [10,4] :

- ✓ La cueillette: les thé verts sont fabriqués à partir de jeunes pousses. En effet, selon le grade désiré, les cueilleuses doivent sélectionner le bourgeon seul ou le bourgeon accompagné, de deux ou trois jeunes feuilles (**figure I-2**).
- ✓ Le flétrissage: Le but du flétrissage est de réduire le plus rapidement la teneur en eau des feuilles afin de limiter les phénomènes d'oxydation (**figure I-3**).

- ✓ La torréfaction: cette étape, est sans doute la plus importante dans le processus de fabrication d'un thé vert. C'est d'elle que dépendra la couleur, l'odeur et le goût du thé vert (**figure I-4**).
- ✓ Le roulage: en inactivant les enzymes présentes dans les feuilles fraîches, elle arrêtera définitivement l'oxydation enzymatique, pour préserver les précieux polyphénols et réduire voir éliminer la saveur végétale de la feuille fraîche et libérer les arômes (**figure 1- 5**).
- ✓ Le séchage : est l'ultime étape de la fabrication d'un thé vert. Il va assurer une parfaite conservation du thé et développer de nombreux composés aromatiques nouveaux (**figure 1- 6**).



Figure I-2: La cueillette des feuilles du thé



Figure I-3: flétrissage du thé



Figure I-4: torréfaction du thé



Figure I-5 : roulage du thé



Figure I-6: séchage manuel du thé

I.1.7. Thé vert et sa richesse en composés phénoliques :

I.1.7.1. Les polyphénols :

Les composés phénoliques ou les polyphénols (**Figure I.7**) sont des produits du métabolisme secondaire des plantes [14].

Les polyphénols sont des antioxydants puissants qui aident à prévenir les dommages cellulaires dans l'organisme causés par les radicaux libres [15].

Ils représentent les principaux constituants des feuilles de thé ; les jeunes feuilles et les bourgeons sont les plus riches, suivis par les feuilles plus âgées et enfin la tige. D'où l'intérêt de boire du thé de haute qualité, pour profiter au mieux des effets bénéfiques des polyphénols [10].

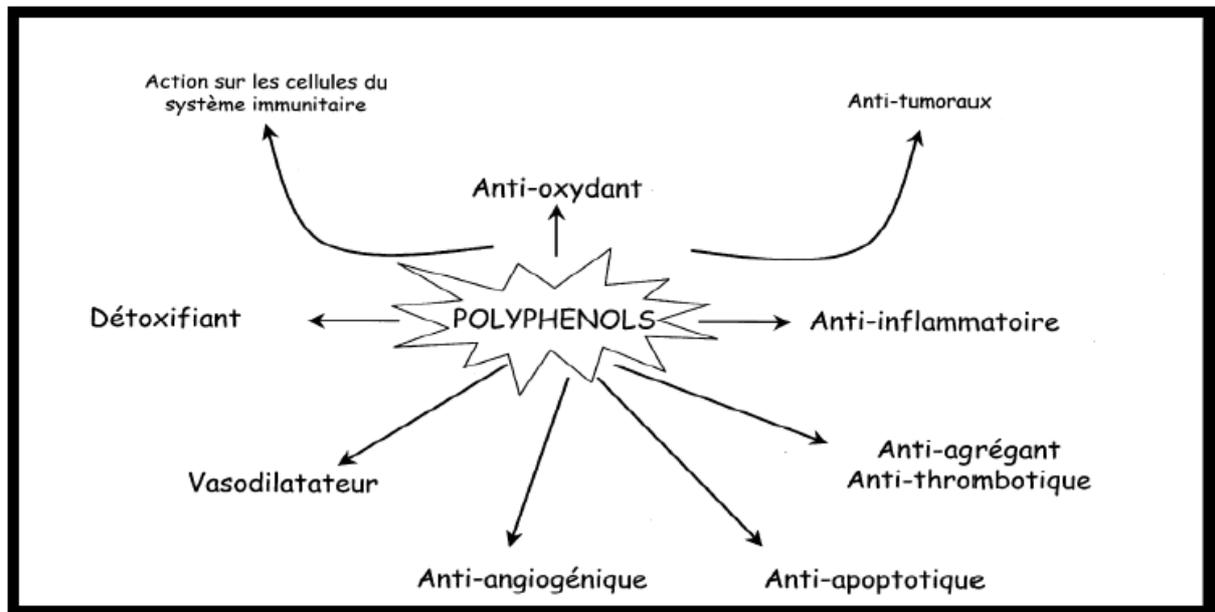


Figure I.7: Effets biologiques des poly phénols

Les propriétés pharmacologiques du thé vert sont dues principalement à la présence des polyphénols. Plus de trois-quarts de ces derniers appartiennent au groupe des flavanols, couramment appelés les tanins, et largement représentés par des catéchines dont le plus important est l'épigallocatechine (EGC) et son gallate (de 48 à 55% du contenu total en polyphénols). On rencontre quatre composés, (-) épigallocatechine-3-gallate (EGCG), (-) épigallocatechine (EGC), épicatechine-3-gallate (ECG) et (-) épicatechine (EC), ainsi que quatre composés minoritaires, (+)gallocatéchin-3-gallate (GCG), (+) gallocatéchine(GC), (+) catéchine-3-gallate(CG) et (+) catéchine(C), qui sont présentés dans la figure I.8 [13].

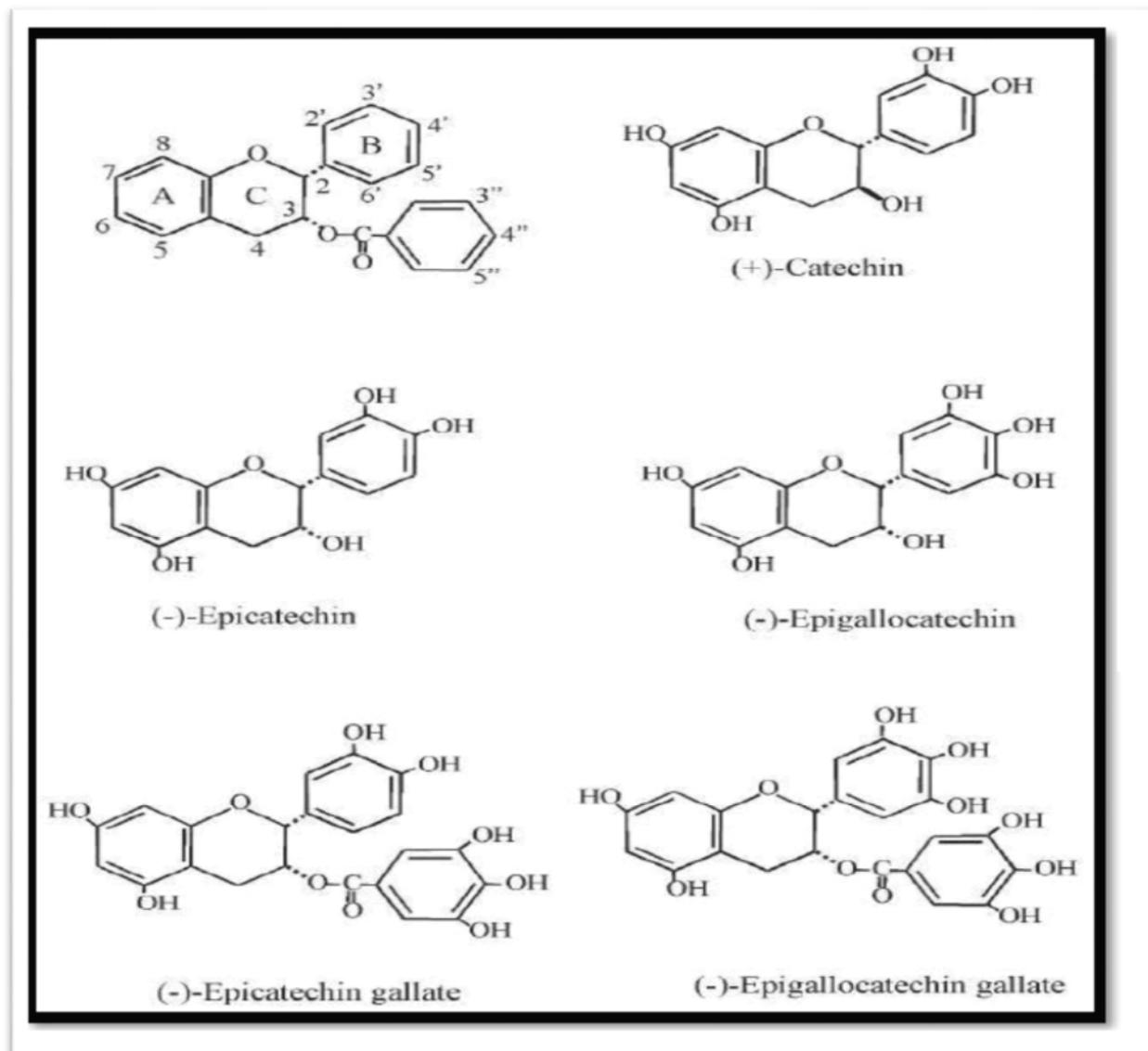


Figure I.8. Structure des différents types de catéchine.

I.1.8. Le pouvoir antioxydant « test au DPPH° »

I.1.8.1. Définition :

La méthode de DPPH° a d'abord été décrite par Blois en 1958 [16] et a ensuite été largement modifiée par de nombreux chercheurs [17]. Le DPPH° (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle) (C₁₈H₁₂N₅O₆ ; M= 394,33g/mole) est un radical libre stable, de couleur violette (**Figure I.9**). Celui-ci réagit avec des composés qui peuvent donner un atome d'hydrogène, mais il est sensible à la lumière, à l'oxygène, au pH et à la nature du solvant utilisé [18].

I.1.8.2. Principe

Cette méthode est basée sur le principe que le DPPH° accepte un atome d'hydrogène (H) à partir d'une molécule scavenger, par exemple un antioxydant, résultant une réduction du DPPH° en DPPH₂. Un changement de la couleur (violette) en jaune est observé, avec une diminution concomitante de l'absorbance à 515nm [19]. Le degré de changement de la couleur est proportionnel à la concentration et à la puissance des antioxydants. L'activité antioxydante est ensuite mesurée par la diminution de l'absorbance à 515nm. Une grande diminution de l'absorbance du mélange réactionnel indique une activité significative du composé à l'essai [17]

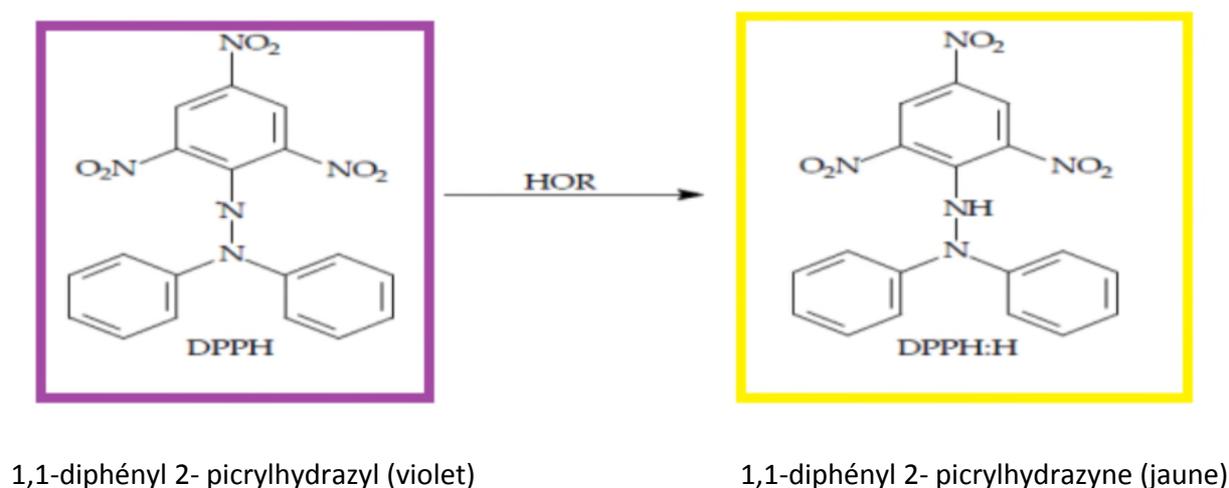


Figure I.9 : Forme libre et réduite du DPPH° [17]

I.1.8.3. Mesure de l'activité antiradicalaire à la (DPPH°)_R

➤ Préparation de la solution mère du DPPH°

Le DPPH est solubilisé dans le méthanol absolu pour en avoir une solution de 0,1 millimolaire (mM) [19].

➤ Méthodologie

La méthode de Brand-Williams et *al.* (1995) a été suivie pour la réalisation de notre test. La méthode consiste à faire mélanger 0,1 ml de chaque extrait à tester avec 3,9 ml de la solution de DPPH°, le mélange est agité vigoureusement pendant quelques secondes. Celui-ci est laissé à l'obscurité pendant 30min. La mesure de l'absorbance a été effectuée à 515nm, en utilisant un spectrophotomètre type SHIMADZU UV-Visible (1601) contre le blanc correspondant.

Le contrôle positif est représenté par des solutions d'antioxydants standards : l'acide gallique, l'acide tannique et la quercétine dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons testés.

➤ Expression des résultats

Plusieurs paramètres peuvent être pris en compte pour déterminer l'activité anti-radicalaire entre autre, et de calculer la concentration efficace (EC50 « efficient concentration »).

-La concentration efficace (EC50 « efficient concentration »)

Pour obtenir la concentration efficace (EC50), qui réduit la concentration initiale de DPPH° de 50%, les résultats sont exprimés en pourcentage (%) d'inhibition selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(Abs_{t=0} - Abs_{t=30}) / Abs_{t=0}] \times 100 \quad [19]$$

$Abs_{t=0}$ et $Abs_{t=30\text{min}}$ correspondent à l'absorbance à 515nm du radical de DPPH°, en absence et en présence de la substance à tester respectivement.

La valeur EC_{50} a été définie comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH°. Ou encore la concentration de l'échantillon exigée pour donner une diminution de 50% de la solution contrôle constituée de méthanol et de DPPH°. L' EC_{50} a été calculée par la régression linéaire où l'abscisse est représentée par la concentration des composés testés et l'ordonnée par l'activité antioxydante en %.

I.2. Les antioxydants :

L'oxydation des médicaments est un véritable problème pharmaceutique en tant que facteur d'instabilité. Il s'agit le plus souvent d'une oxydation spontanée due à une fixation de l'oxygène, dont l'importance est fonction de la température et de la lumière.

L'agent d'oxydation principal est l'air atmosphérique auquel viennent s'ajouter : la nature des récipients et des agents intrinsèques responsables de l'instabilité tardive.

L'action aboutit le plus souvent à la formation des peroxydes (phénomènes primaires) :

- La réaction se produit dans la masse du substrat avec l'oxygène, qui diffuse à partir de la surface.

- La réaction peut être nulle, peu saturée ou presque : elle est importante pour les corps polygéniques.

I.2.1. Les antioxydants les plus utilisés :

Parmi les antioxydants qui existent, ceux qui sont les plus exploités sont :

- Acide ascorbique et ses dérivés : L'acide citrique (synergiste), leur est souvent associé.

Ils sont utilisés habituellement dans les cas des huiles et graisses solubles (palmitate d'ascorbyle et oléate d'ascorbyle). Au-delà d'une certaine concentration, le produit peut devenir pro-autoxydant.

- Tocophérols : a, B, y, & : Obtenue à partir du blé, ce sont des antioxydants naturels, liposolubles. Le mélange des 4 isomères est commercialisé sous l'appellation d'Inhibition Synergiste : acide citrique, H₃PO₄.

I.2.1.1. La vitamine C :

L'acide ascorbique est une poudre cristalline, blanche, inodore, stable au contact de l'air, à la lumière du jour et à température ambiante, pendant plusieurs mois. De saveur légèrement acide, il se décompose à la température de 190° C. Il est facilement soluble dans l'eau, moins soluble dans l'alcool [20].

I.2.2. Rôle et intérêt de la vitamine C :

La vitamine C ou acide ascorbique joue un rôle essentiel dans les compartiments intra et extra cellulaires, ses principaux rôles sont les suivants [21].

- ❖ Formation du collagène.
- ❖ Protection des différents tissus de l'organisme, des vaisseaux sanguins, des os et des dents.
- ❖ Aide à stopper certaines hémorragies.
- ❖ Lutte contre les effets néfastes du tabac.
- ❖ Favorise l'absorption du fer.
- ❖ Aide à traiter les rhumes.
- ❖ Diminue la cholestérolémie.
- ❖ A une action anti-cancérogène et renforce le système immunitaire.
- ❖ A un rôle antioxydant.

I.3. Les Maladies cardiovasculaires :

Introduction :

Les maladies cardiovasculaires sont une cause majeure d'incapacité et de décès prématurés dans le monde entier. La pathologie sous-jacente est l'athérosclérose, qui s'est développée sur de longues années a généralement déjà atteint un stade avancé lorsque les symptômes se manifestent, habituellement en milieu de vie. Il est fréquent que les événements coronariens aigus (crises cardiaques) et les accidents vasculaires cérébraux (AVC) surviennent brutalement et provoquent la mort de la victime, avant qu'on ait pu lui prodiguer des soins. En agissant sur les facteurs de risque, il est possible de réduire la fréquence des événements cliniques et la mortalité prématurée, chez les personnes présentant déjà une pathologie cardiovasculaire établie, ainsi que chez celles dont le risque cardiovasculaire est majoré par la présence d'un ou plusieurs facteurs de risque supplémentaires [22].

On estime à 17,3 millions le nombre de décès imputables aux maladies cardiovasculaires, soit 30% de la mortalité mondiale totale [23]. Parmi ces décès, on estime que 7,3 millions sont dus à une cardiopathie coronarienne et 6,2 millions à un AVC (statistiques 2008) [24]. Plus de 80% des décès interviennent dans des pays à revenu moyen ou faible et touchent presque également les hommes et les femmes.

Il est possible de prévenir la plupart des maladies cardiovasculaires, en s'attaquant aux facteurs de risque tels que le tabagisme, une mauvaise alimentation et l'obésité, le manque d'activité physique, l'hypertension artérielle, le diabète et l'hyperlipidémie. Les statistiques avancent un chiffre de 9,4 millions de décès chaque année, soit 16,5% de l'ensemble des décès, peuvent être attribués à l'hypertension artérielle [25].

I.3.1. Les maladies cardiovasculaires et leurs classes pharmacologiques :

On retrouve certaines classes pharmacologiques comme traitement de pathologie cardiovasculaires différentes :

- * Hypertension artérielle (HTA) : traitée par les antihypertenseurs.
- * Insuffisance coronaire : traitée par les anti-Angineux, anti-ischémique, anti-ischémique hypolipémiant.
- * Insuffisance cardiaque : traitée par les Inotropes positifs, Betabloquants, vasodilatateurs.
- * Troubles du rythme : traitée par les anti-arythmiques, antithrombotiques.

- * Pathologie veineuse et artérielle : traitée par les vasodilatateurs et anti-thrombotiques. [26]

I.3.2. Les facteurs de risques :

Ce sont les mêmes pour tous les accidents qu'ils soient coronariens ou vasculaires : l'hypertension artérielle, l'excès de cholestérol, le tabac, l'obésité [27], et plus particulièrement le mode de vie (sédentarité et alimentation déséquilibrée). Le diabète non ou mal traité et est également un facteur de risque important.

Il existe un certain nombre de déterminants sous jacents des maladies chroniques, ce sont en quelque sorte « les causes des causes ». Ils reflètent l'action des principaux moteurs de l'évolution sociale, économique et culturelle : globalisation, urbanisation et vieillissement des populations. Parmi eux figurent aussi la pauvreté, le stress et les facteurs héréditaires [28].

I.3.3. Médicaments ciblant le système cardiovasculaire :

1- Antihypertenseurs

Le contrôle de la pression artérielle et son maintien dans une fenêtre de valeurs cibles est primordiale. Les avantages d'un traitement anti hypertensif se définissent principalement sous deux aspects différents. Tout d'abord, au niveau clinique, il est maintenant évident que la réduction de la pression artérielle est associée à une réduction de la morbidité et de la mortalité. Les données découlant d'une récente méta-analyse suggèrent que les pourcentages de réduction des événements cardiovasculaires sont de l'ordre de 30% pour un accident vasculaire cérébral et de 23% pour un infarctus du myocarde, associé à une réduction de pression systolique de 10 mm Hg et de pression diastolique de 4 mm Hg [29]. D'autre part, traiter l'hypertension permet au système de santé d'éviter des coûts futurs pour le traitement des conséquences de l'hypertension comme des désordres rénaux ou un infarctus du myocarde [30]. Cette situation est d'autant plus vraie pour les personnes à haut risque cardiovasculaire

Une fois l'hypertension diagnostiquée, une stratégie de traitement doit être mise en place, que ce soit au niveau des modifications des habitudes de vie et/ou de l'initiation d'un traitement pharmacologique. Le choix du traitement se fait selon le stade d'hypertension, la présence de dommage aux organes cibles ou de d'autres facteurs de risque cardiovasculaire.

Les médicaments antihypertenseurs agissent aux différents sites anatomiques du contrôle de la pression artérielle, soit au niveau du système nerveux central, de la résistance artérielle, du cœur et des reins [31].

Il existe cinq classes principales d'antihypertenseurs recommandés en première intention dans le traitement de l'hypertension artérielle essentielle et non compliquée :

- Les Béta bloquants : acébutolol, aténolol, propranolol...
- Les diurétiques thiazidiques : hydrochlorothiazide.
- Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) : enalapril, lisinopril, ramipril...
- Les antagonistes de l'angiotensine II (ARA II ou sartans) : losartan, irbésartan, candésartan...
- Les inhibiteurs calciques : amlodipine par exemple. [32]

2- Vasodilatateurs :

• Les antagonistes calciques

Les antagonistes calciques ont représenté une classe pharmacologique relativement importante car largement utilisés dans l'hypertension artérielle et l'insuffisance coronaire.

Ils ont en commun la propriété de bloquer les canaux calciques voltage dépendants de type L (prédominants au niveau cardiaque et des fibres lisses par opposition aux canaux de type N présents sur les neurones et de type T présents au niveau des glandes sécrétrices). On distingue trois groupes dont les deux derniers sont représentés principalement chacun par une seule substance [32] :

- ❖ Les dihydropyridines (comme la néfédipine (Adalate*).
- ❖ La nicardipine (Loxen*).
- ❖ L'amlodipine (Amlor*).
- ❖ Les phenyl alkylamines : le verapamil (Isoptine*).
- ❖ Les benzothiazépines : le diltiazem (Tildiem*).

Les dihydropyridines sont les antagonistes calciques à action vasculaire préférentielle, le verapamil a une action cardiaque préférentielle, le diltiazem se situe entre les deux.

Les antagonistes calciques sont donc des anti-hypertenseurs et des substances anti-ischémiques cardiaques pour les antagonistes calciques comme le verapamil ou le diltiazem. En effet, l'action vasorelaxante au niveau coronaire augmente le débit coronaire et l'apport en oxygène au myocarde.

Les actions inotrope et chronotrope négatives diminuent la consommation myocardique en oxygène. Ces deux actions sont donc potentiellement anti-ischémiques. Cet avantage potentiel est annulé en cas de stimulation importante sympathique et réflexe. Ce qui est le cas avec les dihydropyridines.

I.3.4. Définition, rôle et classe de l'amlodipine bésylate:

Le bésylate d'amlodipine est un médicament cardiovasculaire couramment utilisé comme traitement unique pour l'hypertension artérielle ou il peut être combiné avec d'autres agents antihypertenseurs.

Les doses recommandées pour un patient qui utilisent ce médicament peuvent être de 5mg ou de 10mg, une fois par jour. Mais dans le cas d'un patient âgé ou d'un patient qui a des problèmes hépatiques, la dose doit être réduite à 2.5mg, parce que ce patient peut être facilement exposé aux risques des accidents dus à un autre combiné thérapeutique, pouvant provoquer des effets secondaires [33].

De formule chimique ($C_{26}H_{31}ClN_2O_8S$), et nommé aussi : Benzène sulfonate de (4RS)-2-[(2-aminoéthoxy)-4-(2-chlorophényl)-6-méthyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate de 3-éthyle et de 5-méthyle [22], est un inhibiteur de l'entrée des ions calcium dans la cellule (antagoniste du calcium ou inhibiteur calcique), de la classe des 1, 4 dihydropyridines [35]. Il se présente sous forme d'une poudre blanche, il est peu soluble dans l'eau, facilement soluble dans le méthanol et assez soluble dans l'éthanol, sa masse molaire est de $567.1 \text{ g/mole}^{-1}$ [34], et sa formule chimique est représentée sur la **figure I.10**.

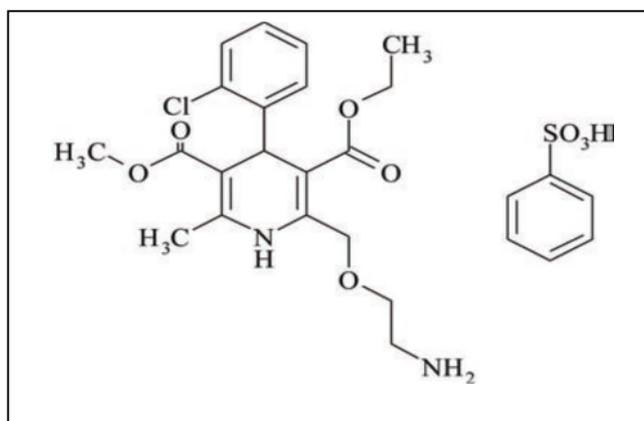


Figure I.10 : Structure chimique de l'amlodipine bésylate [34].

I.3.4.1. Mécanisme d'action de l'amlodipine

Le mécanisme de l'effet antihypertenseur de l'amlodipine est lié à un effet relaxant direct au niveau du muscle lisse vasculaire. Le mécanisme précis par lequel l'amlodipine soulage l'angor n'a pas été entièrement déterminé, mais l'amlodipine réduit la charge ischémique totale par les deux actions suivantes :

1) L'amlodipine dilate les artérioles périphériques et par conséquent réduit la résistance périphérique totale (postcharge) contre laquelle le cœur agit. Dans la mesure où la fréquence cardiaque reste stable, cette réduction du travail du cœur diminue la consommation d'énergie myocardique et les besoins en oxygène.

2) Le mécanisme d'action de l'amlodipine comporte aussi probablement la dilatation des principales artères coronaires et artérioles coronaires, dans les régions normales et ischémiques. Cette dilatation augmente la délivrance d'oxygène au myocarde chez les patients présentant un spasme des artères coronaires (angor de Prinzmetal).

I.3.4.2. Mode d'action de l'amlodipine :

L'amlodipine inhibe de façon sélective le passage des ions calcium à travers la membrane cellulaire, plus particulièrement celle du muscle lisse vasculaire plutôt que celle du muscle cardiaque. L'amlodipine n'altère pas la concentration plasmatique du calcium. A pH physiologique, l'amlodipine est un composé ionisé ; son interaction cinétique avec les récepteurs des canaux calciques se caractérise par sa fixation graduelle aux récepteurs suivie de la dissociation de ces derniers. Les données expérimentales nous permettent de croire que l'amlodipine se fixe à la fois aux récepteurs spécifiques des dihydropyridines et aux autres récepteurs [35].

A. Effet sur l'hypertension : L'amlodipine abaisse la tension artérielle en entraînant une vasodilatation artérielle périphérique et en réduisant la résistance vasculaire.

B. Angine de poitrine : Le mode d'action de l'amlodipine n'a pas été entièrement élucidé pour soulager l'angine de poitrine. L'amlodipine est un vasodilatateur des artères et des artérioles périphériques. Elle abaisse donc la résistance vasculaire totale, réduisant ainsi le travail du cœur (postcharge). On croit que cette réduction de la postcharge atténue l'ischémie et soulage l'angine d'effort en diminuant les besoins en oxygène du myocarde ainsi que sa consommation d'oxygène.

I.4. La stabilité physico chimique d'une substance active:

I.4.1. Définition de la stabilité :

La stabilité est une des propriétés de la forme pharmaceutique dans des conditions données de formulation, de fabrication, de conditionnement et de conservation durant une durée déterminée,

relative à une date limite d'expiration [36]. Celle-ci est précisée par une étude de stabilité en fonction de certains paramètres physicochimiques bien définis.

I.4.2. Les objectifs de l'étude de stabilité :

Les études de stabilité ont pour but de suivre et de prévoir les variations éventuelles de la qualité des principes actifs et des produits finis dans le temps, et ce sous l'influence de différents facteurs tels que la température, la chaleur, la lumière, l'humidité, l'oxygène...

I.4.3. Les facteurs influençant la stabilité d'un médicament :

I.4.3.1. Température :

La température constitue le facteur de dégradation potentiel le plus actif, qui manifeste son action néfaste de différentes façons par [37] :

- Modification de l'état physique (dureté, viscosité, solubilité).
- Modification de la vitesse de dégradation (la température catalyse certaine réaction chimique).
- Développement accéléré des microbes, et champignons naturellement présents dans les préparations non stériles.

La chaleur peut aussi provoquer des effets indirectes tel que :

- Le gonflement des bouchons en élastomères, et dissolution des matières colorantes.
- Fuite des flacons trop remplis.
- Déformation et défraîchissement de certains emballages, surtout lorsque l'humidité vient s'ajouter à ce facteur.

I.4.3.2. La lumière :

L'exposition à la lumière peut induire une dégradation des molécules susceptibles d'absorber l'énergie fournie par les photons [37]. L'exposition à la lumière conduit à :

- Une modification des caractères physiques et organoleptiques (coloration des solutions d'iodures par libération d'iode).
- Photo-oxydation.
- Photolyse : phénomène à évolution lente qui affecte la structure chimique du :

- Soit à une absorption directe de la lumière par la substance active qui se transforme en une autre entité chimique.
- Soit d'une photosensibilité de l'un des ingrédients de la formulation qui, en absorbant la lumière, active un autre ingrédient conduisant à la dégradation de la substance active.¹
- L'effet ionisant de ces UV provoque par arrachement des électrons périphériques, la formation de radicaux libres qui vont amorcer les réactions de dégradation (hydroxylation,...).[38].

Pour le cas précis de l'amlodipine, appartenant à la famille des dérivés 1, 4-dihydropyridines, celles-ci peuvent subir une dégradation sous l'effet de la chaleur ou de la lumière. [39], la réaction de thermodégradation et de photodégradation peuvent conduire par aromatisation au cycle pyridine, avec élimination d'une molécule d'eau (**figure I.11**).

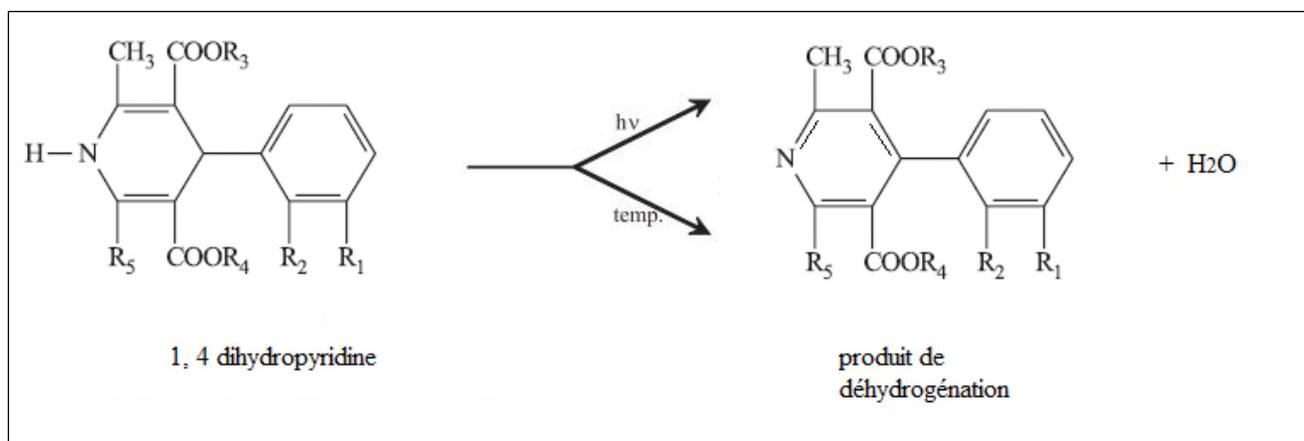


Figure I.11 : schéma de la réaction de thermo et photo dégradation par oxydation d'un dérivé 1, 4 dihydropyridine (amlodipine).

I.4.3.3. Chimique

En 1964, Jaroslav Bartos introduit la réaction de l'acide ascorbique (figure I.12) sur le groupement amine primaire de l'amlodipine dans le DMF [40]. La réaction se produit à chaud pendant 25 minutes. L'acide ascorbique peut réagir sous l'effet de la chaleur, en donnant le déhydroascorbate (produit de la thermo dégradation de l'acide ascorbique). Celui-ci interagit avec l'amlodipine par couplage en conduisant à l'imine correspondant (**figure I.12**).

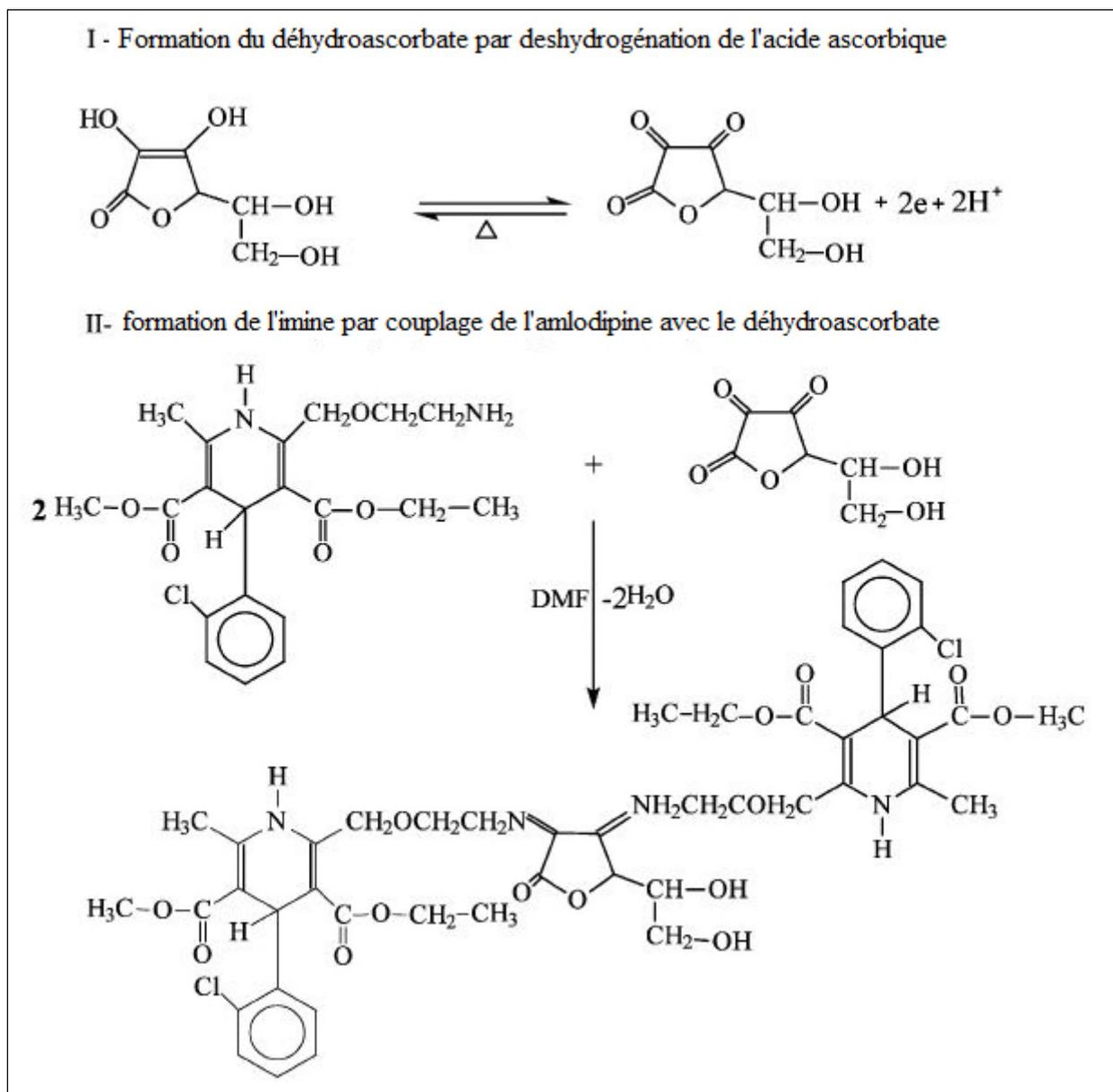


Figure I.12 : dégradation chimique de l'amlodipine par l'acide ascorbique en présence de la chaleur.

I.4.3.4. L'humidité

Le facteur lié à l'humidité joue un rôle considérable sur la stabilité des formes pharmaceutiques.

L'humidité agit par :

- Modification des caractères organoleptiques :
 - Déliquescence.
 - Efflorescence : déshydratation de certains sels.

- Modification des caractères physiques : dureté, friabilité...
- Hydratation : certains composés s'hydratent par reprise d'eau (acide acétique et glycérides).
- Développement de micro- organismes (microbes et moisissures). [38]

I.4.3.5. L'air atmosphérique :

L'oxygène et l'humidité sont des composants principaux de l'air atmosphérique. Ce sont des éléments destructeurs capitaux par phénomène d'oxydation, d'hydrolyse ou d'efflorescence. La pression atmosphérique n'est pas non plus à négliger [38].

-L'oxygène :

- Il entraîne une oxydation qui touche préférentiellement certains groupements (hydroxyles, hétérocycles aromatiques, groupement diène des corps gras insaturé et des vitamines).
- Ceci peut justifier l'usage de certains antioxydants chimiques ou le remplissage sous azote.
- Pour les solutions, il ne faut négliger ni l'oxygène dissous dans les solvants, ni celui de l'air résiduel existant dans les récipients clos, en particulier pour les vitamines et les corps gras [38].

I.4.3.6. Le pH :

La réaction d'hydrolyse, par dissociation des substances actives dans l'eau, est le plus souvent dépendante du pH, catalysée par les ions H^+ ou OH^- présents dans le milieu. D'autres phénomènes supplémentaires tels que l'oxydoréduction peuvent se rajouter à l'influence du pH, pour accentuer et accélérer le processus chimique et tendre vers un équilibre plus stable [39].

Chapitre II

Matériels et Méthodes

II.1. Spectrophotométrie d'absorption UV- Visible :

II.1.1. Appareillage :

L'appareillage utilisé est le spectrophotomètre UV- visible Spectro Scan 50 à double faisceaux couplé à un micro ordinateur (**Figure II.1**). L'analyse par UV-visible est une technique basée sur l'absorption des radiations lumineuses par la matière dans le domaine qui s'étend du proche ultraviolet au très proche infrarouge, soit entre 180 et 1100 nm.



Figure II.1. Appareil UV- visible Spectro Scan 50

II.1.2. Principe :

Le domaine spectral de la longueur d'onde UV- visible pratiquement exploitable s'étend entre [200nm-800nm]. La spectrophotométrie UV- visible est une méthode d'analyse qualitative et quantitative, sensible, et permet d'analyser les échantillons à faibles concentrations. Les spectres sont caractéristiques des molécules, et procurent des informations sur le squelette moléculaire et les différentes substitutions.

II.1.3. Application de l'UV-visible :

❖ Analyse qualitative :

Les applications de la spectrophotométrie dans l'UV-visible sont quelque peu limitées en analyse qualitative, parce que la résolution des bandes d'absorption des substances chimiques est moins importante. Elle permet de reconnaître la nature de la structure électronique des liaisons chimiques, leurs états d'énergie relatifs aux longueurs d'onde maximales d'absorption dans le domaine de l'UV-visible, qui sont spécifiques à des raies de résonance et de transitions électroniques propres à un ou plusieurs groupements chromophores appartenant au composé.

❖ Analyse quantitative :

La technique UV- visible est exploitée depuis fort longtemps. La loi de Beer-Lambert relie dans certaines conditions, l'absorption de la lumière à la concentration d'un composé en solutions standards. Sa forme est exprimée par :

$$A = \varepsilon I C, \text{ Avec :}$$

A : absorbance ; paramètre optique sans dimension, accessible au moyen du spectrophotomètre.

ε : Coefficient d'absorption molaire à la longueur d'onde λ spécifique à une substance qui absorbe en solution.

I : l'épaisseur (cm) de la solution traversée, ou trajet optique.

C : concentration molaire.

II.2. Spectroscopie infrarouge :

II.2.1. Principe :

Cette technique est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau [31, 32]

La spectrophotométrie IR est une méthode physique d'analyse qualitative et quantitative, fondée sur l'absorption des photons « $h\nu$ » transmis par une radiation très peu énergétique permettant de modifier l'énergie de vibration des molécules.

Ces radiations localisées au-delà des longueurs d'onde dans le rouge, sont situées entre la région du spectre visible et des ondes hertziennes. Le domaine infrarouge s'étend de 0.8 μm à 1000 μm . Il est arbitrairement divisé en 3 catégories, le proche infrarouge (0.8 à 2.5 μm soit

12500- 4000 cm^{-1}), le moyen infrarouge (2.5 à 25 μm soit 4000-400 cm^{-1}) et le lointain infrarouge (25 à 1000 μm soit 400-10 cm^{-1})

II.2.2. Caractérisation des structures par infrarouge

Il est cependant possible et intéressant à la fois d'exploiter cette méthode pour mettre en évidence des interactions susceptibles d'être établies dans un mélange entre les différents composants. Dans notre cas, nous avons utilisé FTIR pour caractériser le principe actif (Bésylate d'Amlodipine), Acide ascorbique et le thé vert BARARI, dans le but de déceler d'éventuelles interactions entre les différents constituants.

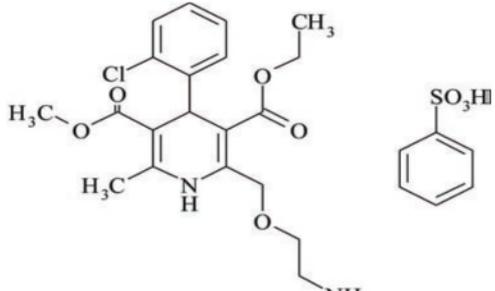
Nous analysons par infrarouge les trois substances, l'amlodipine, l'acide ascorbique et la poudre de thé pour évaluer leurs degrés de pureté ainsi que leur structures et leurs compositions, en déterminant les groupements fonctionnels spécifiques aux différentes substances étudiées. Pour cela, les échantillons (à 2%) ont été préparés dans des pastilles de KBr anhydre, les poudres ont été comprimées avec une presse hydraulique à 90kN, puis analysées avec un spectrophotomètre infrarouge de marque Affinity de Shimadzu. Les spectres IR obtenus sont présentés dans le chapitre III.

II.3. Caractérisation du principe actif (Bésylate Amlodipine) :

Les informations sur l'amlodipine bésylate sont résumées dans le tableau II.1 suivant :

Tableau II.1 : Caractéristiques physicochimiques de l'amlodipine [33]

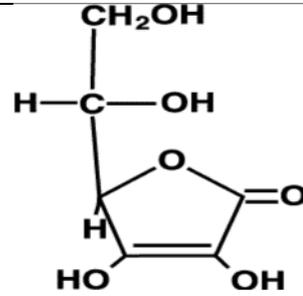
Aspect	Le bésylate d'Amlodipine est une poudre cristalline blanche.
Formule chimique	$\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{ClN}_2\text{O}_8\text{S}$
Le nom chimique	3-ethyl-5-methyl-2-(2-aminoethoxymethyl)-4-(2-chlorophenyl)-1,4-dihydro-6-methyl-3,5-pyridinedicarboxylate benzenesulfonate; 2-[(2-Aminoethoxy) methyl]-4(2-Chlorophenyl)-3-Ethoxycarbonyl-5-Methoxycarbonyl-6Methyl-1, 4-Dihydropyridine ;
Poids moléculaire	567.1 g/mole
Solubilité	Légèrement soluble dans l'eau

Structure chimique	
--------------------	--

II.4. Caractérisation de l'excipient (Acide ascorbique) :

Les informations sur l'acide ascorbique sont résumées dans le tableau II-2 :

Tableau II-2 : Caractéristiques physicochimiques de l'acide ascorbique

Aspect	L'acide ascorbique est une poudre cristalline blanche ou légèrement jaune avec un goût légèrement acide
Formule chimique	$C_6H_8O_6$
Le nom chimique	(R)-3,4-dihydroxy-5-((S)-1,2-dihydroxyethyl)furan-2(5H)-one
Poids moléculaire	176.12 g/mole
Solubilité	Soluble dans l'eau
Structure chimique	

I.5. Matériels et échantillonnages:

II.5.1. Matériels :

-  Spatule
-  Fiole (25 ml, 50ml, 100ml)
-  Entonnoir
-  Thermomètre
-  Pipettes (10ml et 1ml)

- ✚ Béchers (100ml et 150ml)
- ✚ Papier filtre
- ✚ Pissettes
- ✚ Para-film
- ✚ Pro-pipette
- ✚ Cuves en Quartz
- ✚ Erlen (100ml)
- ✚ Burette

II.5.2. Echantillons :

- ✚ Amlodipine 10mg.
- ✚ Acide ascorbique 10mg.
- ✚ La liqueur de thé.

II.6. Matériel végétal :

Le matériel végétal utilisé dans le présent travail porte sur le thé vert nommé « BARARI GUNPOWDER GREEN TEA » (**Figure II-2**).

La feuille de thé ne contient pas moins de 350 constituants, dont 40% de glucides, 20% de protides, 2% de lipides, 9% de minéraux (dont Manganèse, Potassium, Magnésium, Fluor), de nombreuses vitamines du groupe B (B1, B2, B3), de la vitamine C (dans le thé vert), et de la vitamine P favorisant l'élasticité des vaisseaux sanguins

Dans 100 grammes de thé sèche, on trouve :

- Polyphénols 35%
- Vitamine C 300 mg
- Vitamine E 100 mg
- Vitamine B 11 mg
- Bétacarotène 15 mg
- Fibres 20%
- Chlorophylle 1%
- Caféine 3%



Figure II-2. Le thé vert BARARI

II.7. Préparations des échantillons :

II.7.1. Préparation de la liqueur de thé vert par infusion :

- ❖ Un volume d'eau de 100ml, et une masse de feuille de 0,05g est pesée à $\pm 0,1$ mg à l'aide d'une balance de précision.
- ❖ L'eau est chauffée à 95°C puis versée sur les feuilles de thé et laissée en contact pendant 10min (le temps est contrôlé).
- ❖ La liqueur de thé est filtrée à l'aide d'un papier filtre de type Wattmans numéro 2 afin de retirer les feuilles (figure II-3).
- ❖ La liqueur est analysée concentrée et diluée 50 fois dans l'eau bidistillée, en utilisant le spectrophotomètre UV-visible et son spectre est enregistré dans l'intervalle [200-400nm].
 - 1 spectre de la solution de la liqueur de thé concentrée (10 ml).
 - 1 spectre de la solution de la liqueur de thé diluée 50fois (0,2ml de la liqueur + 9.8ml d'eau bidistillée) (voir les valeurs des absorbances dans l'Annexe 2).



a- Liqueur de thé au repos

b- Filtration de la liqueur de thé

c- La liqueur de thé filtrée et à l'abri de la lumière

Figure II.3. Les étapes de la préparation de la liqueur de thé.

II.8. Les paramètres d'étude de la stabilité de l'amlodipine.

II.8.1. Sans la liqueur de thé.

II.8.1.1. Détermination du temps critique de stabilité de l'amlodipine seule

Cette étape a pour but de déterminer le temps critique auquel la stabilité de l'amlodipine atteint son minimum, correspondant à la valeur minimale de l'absorbance de la solution, mesurée à la longueur d'onde spécifique de l'amlodipine en fonction du temps.

II.8.1.1.1. Variation de la stabilité de l'amlodipine en fonction du temps dans les conditions normales de température et de pH neutre (eau bidistillée):

Une masse de 10 mg d'Amlodipine en poudre est pesée à l'aide d'une balance de précision (à $\pm 0,1$ mg), ensuite celle-ci est dissoute dans 10 ml d'eau bidistillée dans un erlen de 100 ml, sous agitation magnétique pendant quelques secondes (t_0). Ensuite, des prélèvements de 0,2 ml de notre solution seront effectués dans des tubes à essai de 25 ml, aux quels nous ajoutons 9,8 ml d'eau bidistillée (dilution 50 fois), pour différents temps (de 0 à 24h). Les prélèvements seront faits par pas de 10mn jusqu'à 1 heure, ensuite chaque $\frac{1}{2}$ heure jusqu'à 4 h, et enfin après 17h et 24h.

Nous traçons les spectres d'absorption pour chaque prélèvement dilué, par rapport au blanc (eau bidistillée), par balayage de longueur d'onde entre 200 et 400 nm.

II.8.1.1.2 Stabilité de l'amlodipine en fonction du temps avec chauffage à 37°C :

Une masse de 10 mg d'amlodipine en poudre est pesée et est dissoute dans 10 ml d'eau bidistillée, chauffée au préalable à 37°C dans un erlen de 100 ml, placé sur une plaque chauffante avec agitation magnétique. Après quelques secondes d'agitation (t_0), nous appliquons la même procédure de prélèvements aux mêmes temps que précédemment (de 0 à 24h). Les spectres d'absorption des solutions prélevées et diluées 50 fois, seront réalisés dans le même domaine de balayage de longueur d'onde.

II.8.1.2 Détermination du temps critique de stabilité de l'amlodipine en présence de l'acide ascorbique :

Cette étape est prévue pour déterminer le temps critique de stabilité de l'amlodipine en présence de l'acide ascorbique, pour étudier son influence sur la stabilité de celle-ci et voire s'il pourrait exister des interactions chimiques entre ces deux molécules.

II.8.1.2.1 Stabilité de l'amlodipine en fonction du temps dans le mélange (amlo + acide ascorbique) dans les conditions normales :

Les mêmes étapes que précédemment ont été réalisées concernant l'amlodipine, sauf que pour ce cas nous devons dissoudre au préalable 10 mg d'acide ascorbique dans les 10 ml d'eau bidistillée, ensuite nous ajoutons les 10 mg de l'amlodipine sous agitation magnétique. Le 1^{er} prélèvement est effectué à $t_0 \approx 0$, instantanément après ajout des deux substances, puis les autres prélèvements seront faits en appliquant la même procédure d'échantillonnage en fonction du temps. Les spectres UV des solutions diluées (50 fois) seront ensuite tracés de la même manière que précédemment.

II.8.1.2.2 Stabilité de l'amlodipine en fonction du temps dans le mélange (amlo + acide ascorbique) avec chauffage à 37°C :

Initialement, une masse de 10 mg d'acide ascorbique est **dissoute dans 10 ml d'eau bidistillée, portée au préalable à 37°C dans un erlen de 100 ml placé sur une plaque chauffante avec agitation magnétique.** Une masse de 10 mg d'amlodipine en poudre est pesée et est ajoutée à la solution d'acide ascorbique à 37°C, sous agitation continue. Après quelques secondes d'agitation (t_0), nous appliquons la même procédure de prélèvements aux

mêmes temps que précédemment (de 0 à 24h). Les spectres d'absorption des solutions prélevées et diluées 50 fois, seront réalisés dans le même domaine de balayage de longueur d'onde.

II.8.2 Avec la liqueur de thé

Cette étape est prévue pour déterminer l'influence de la liqueur de thé sur la stabilité de l'amlodipine seule et en présence de l'acide ascorbique. Différents paramètres seront étudiés : la variation du volume de liqueur de thé, le pH, la température et l'optimisation du temps de stabilité.

II.8.2.1. Variation du volume de la liqueur de thé

Afin de déterminer l'influence de la liqueur de thé sur la stabilité de l'amlodipine, nous devons faire varier le volume de l'infusion de thé pour déterminer le volume optimale correspondant à la stabilité maximale de l'amlodipine seule ou dans le système binaire Amlo + AA, soit dans les CN soit à 37°C. Cette étude se fait dans un intervalle de temps compris entre 0 et le temps critique de stabilité de l'amlodipine précédemment déterminé. Le pH et la température ont maintenus fixes.

II.8.2.1.1 Stabilité de l'amlodipine seule dans les conditions normales, en fonction du volume de la liqueur de thé:

Nous avons suivi ces étapes :

- Prévoir 6 tubes à essai pour les mélanges d'eau bidistillée + liqueur de thé (1, 2, 3, 4, 5 et 10 ml de la liqueur de thé) contenant 10mg d'amlodipine (AMLO) et de l'eau bi-distillée (ED) (1,2 µs), à mettre dans l'agitateur (bain marie) à la température ambiante.
- Diluer chaque tube précédent 50 fois (0,2 ml de la solution (liqueur de thé+AMLO) + 9.8 ml ED), pour les temps de contact de : 1min, 10min, 20min.
- Analyser les solutions prélevées par UV-visible, en traçant le spectre d'absorption dans l'intervalle (200-400nm) pour différents volumes de liqueur de thé ajoutée et en fonction du temps.

Nous traçons ensuite la courbe de variation de l'absorbance maximale, à la longueur d'onde $\lambda_{\max} = 366$ nm spécifique de l'amlodipine dans les CN à pH fixe, en fonction du volume de la liqueur de thé.

II.8.2.1.2 Stabilité de l'amlodipine seule à 37°C en fonction du volume de la liqueur de thé:

Une masse de 10 mg d'amlodipine est dissoute dans des mélanges de 10 ml, contenant de l'eau bidistillée et différents volumes de liqueur : 1ml ; 2ml ; 3ml ; 4ml ; 5ml et 10ml, portés au préalable à 37°C et à pH fixe. Pour cela nous avons suivi ces étapes :

- Prévoir 6 tubes à essai de mélanges d'eau bidistillée + liqueur de thé (1, 2, 3, 4, 5, 10 ml de la liqueur de thé) contenant chacun 10mg d'amlodipine, à mettre dans l'agitateur (bain marie) à une température de 37°C.
- Diluer chaque tube précédent 50 fois (0,2 ml de la solution (liqueur de thé +AMLO) + 9,8 ml ED) pour les temps de contact de 1min, 10min et 20min.
- Analyse de la solution dans l'UV-visible par tracé des spectres d'absorption dans l'intervalle 200 à 400nm, en fonction du temps et pour chaque volume de liqueur de thé.

Nous traçons ensuite la courbe de variation de l'absorbance maximale, à la longueur d'onde $\lambda_{\max} = 366$ nm spécifique de l'amlodipine à 37°C, en fonction du volume de la liqueur de thé.

II.8.2.1.3 Stabilité de l'amlodipine dans le mélange (amlo + acide ascorbique+liq. de thé) dans les conditions normales, en fonction du volume de la liqueur de thé:

Les étapes suivantes ont été réalisées ainsi :

- Prévoir 6 tubes à essai pour les mélanges de l'eau bidistillée + liqueur de thé (1, 2, 3, 4, 5, 10 ml de la liqueur de thé), contenant d'abord l'acide ascorbique (AA), puis nous ajoutons 10mg d'amlodipine (Amlo). Les tubes à essai contenant les différents mélanges sont introduits dans l'agitateur (bain marie) à la température ambiante.
- Diluer chaque tube 50 fois (0,2 ml de la solution (liqueur de thé +AMLO + AA) + 9,8 ml ED). pour les temps de contact suivants : 1min, 10min, 20min, 30min, 60min, 90min, 120min, 150min, 180min, 210min et 240min.
- Analyser les solutions diluées dans UV, en traçant les spectres d'absorption dans l'intervalle 200 à 400nm.

Nous traçons les spectres UV pour les différents volumes de l'infusion de thé, et en fonction du temps. La courbe de variation de l'absorbance maximale, à la longueur d'onde 366 nm spécifique de l'amlodipine, est tracée en fonction du volume de la liqueur de thé.

II.8.2.1.4 Stabilité de l'amlodipine dans le mélange (amlo + acide ascorbique+liq. de thé) à 37°C, en fonction du volume de la liqueur de thé:

Ces étapes de préparation des mélanges et d l'analyse ont été suivies :

- Prévoir 6 tubes à essai pour les mélanges de **amlo + AA + liqueur de thé** (1, 2, 3, 4, 5, 10 ml de la liqueur de thé) contenant d'abord 10 mg d'acide ascorbique (AA), puis les tubes à essai sont introduits dans le bain marie chauffé à 37°C. Nous ajoutons ensuite 10 mg d'amlodipine aux différentes solutions.
- Diluer chaque précédent tube 50 fois (0,2 ml de la solution (**amlo + AA + liqueur de thé**) + 9,8 ml ED) pour les temps de contact : 1min, 10min, 20min, 30min, 60min, 90min, 120min, 150min, 180min, 210min et 240min.
- Analyse de la solution dans l'UV-visible, en traçant les spectres d'absorption dans l'intervalle 200 à 400nm.

Nous traçons les spectres UV pour chaque volume de l'infusion de thé en fonction du temps, et la courbe de variation de l'absorbance maximale, à la longueur d'onde 366 nm spécifique de l'amlodipine, en fonction du volume de la liqueur de thé.

II.8.2.2 Variation de la température

Nous avons tenté d'optimiser le paramètre de la température en faisant varier celle-ci pour les températures suivantes : 30°C, 40°C et 50°C, afin de voir son influence sur la stabilité de l'amlodipine, dans les mélanges de liqueur de thé, avec ou sans acide ascorbique. Les autres conditions : le volume optimal de la liqueur de thé V_{liq} et le temps maximal égal au temps critique t_c de stabilité de l'amlodipine, qui ont été déterminés lors des précédentes étapes, ont été maintenus fixes ainsi que le pH.

II.8.2.2.1 Stabilité de l'amlodipine dans le mélange (Amlo +liqueur de thé)

Nous avons suivi ces étapes : $t_c= 20min$ et $V_{liq}=10ml$

- Une série de 3 tubes à essai de 25 ml contenant les mélanges Amlo (10mg) + liqueur (10ml) ont été placés dans un bain mari chauffé au préalable à $T=30^\circ$. Des prélèvements de 0,2ml ont été effectués à différents temps : 1mn ; 10mn et 20mn, et dilués 50 fois avec 9,8 ml d'eau bidistillée.

- La procédure est répétée pour les températures $T= 40^{\circ}\text{C}$ et 50°C
- Analyse par UV en traçant les spectres des solutions diluées, pour différentes températures en fonction du temps.

II.8.2.2.2 Stabilité de l'amlodipine dans le mélange (Amlo +AA + liqueur de thé)

Nous avons suivi ces étapes : $t_c= 240\text{min}$ et $V_{\text{liq}}=3\text{ml}$

- Une série de 3 tubes à essai de 25 ml contenant les mélanges Amlo (10mg) + AA (10mg) + liqueur (10ml) ont été placés dans un bain mari chauffé au préalable à $T=30^{\circ}$. Des prélèvements de 0,2ml ont été effectués à différents temps : 1min, 10min, 20min, 30min, 60min, 90min, 120min, 150min, 180min, 210min et 240min, puis dilués 50 fois avec 9,8 ml d'eau bidistillée.
- La procédure est répétée pour les températures $T= 40^{\circ}\text{C}$ et 50°C
- Analyse par UV en traçant les spectres des solutions diluées, pour différentes températures en fonction du temps.

II.8.2.3 Variation du pH

Nous avons fait varier le $\text{pH}= 4 ; 5 ; 6.26 ; 7 ; 8$, de la solution de liqueur de thé correspondant aux conditions optimales fixes de volume de liqueur de thé, de température et de temps critique de la stabilité de l'amlodipine, seule ou avec l'acide ascorbique, afin d'étudier son influence sur la stabilité de l'amlodipine.

II.8.2.3.1 Stabilité de l'amlodipine dans le mélange (Amlo+ liqueur de thé)

Nous avons suivi ces étapes : conditions optimales $T= 30^{\circ}\text{C}$, $V_{\text{liq}} = 10\text{ml}$

- Prévoir 4 tubes à essai de 25 ml, dans lesquels nous introduisons 10 ml de liqueur de thé
- Contrôler le pH des solutions, puis le réajuster goutte à goutte avec une solution de HCl (1N) pour un pH acide (4 et 5), et avec une solution de NaOH (1N) pour un pH neutre ou basique (7 et 8), en utilisant un pH-mètre étalonné au préalable.
- Puis introduire 10 mg d'Amlo dans chacune des solutions à différents pH.
- Introduire les 4 solutions dans un bain marie porté au préalable à 30°C .
- Prélevez 0,2 ml des solutions à différents temps : 1mn ; 10mn et 20mn.

- Analyser les échantillons avec le spectrophotomètre U.V- visible, en traçant les spectres dans le domaine de l'UV entre 200 et 400 nm.

Nous traçons la courbe de variation de l'absorbance de l'amlodipine à 366 nm en fonction du temps pour différents pH.

II.8.2.3.2 Stabilité de l'amlodipine dans le mélange (Amlo+ AA + liqueur de thé)

Le même protocole s'applique pour les mélanges de la liqueur du thé, Acide Ascorbique (10mg) et Amlodipine (10mg), mais en fixant les valeurs aux conditions optimales qui sont $t_c = 240\text{min}$, $V_{\text{liq}}=3\text{ml}$ et $T^\circ = 37^\circ\text{C}$.

Les spectres des solutions sont tracés dans le même domaine de l'UV et les courbes de variation pour différentes valeurs de pH, en fonction du temps ont été réalisés.

II.9. Optimisation du temps de stabilité de l'amlodipine dans la liqueur de thé.

Nous voulons optimiser le temps de stabilité de l'amlodipine jusqu'à 4 jours, en maintenant fixes les autres conditions optimales trouvées précédemment, sauf pour la température qui est maintenue fixe à 37°C (température physiologique), pour les deux mélanges qui sont spécifiés dans le tableau II.3.

Tableau II.3. Conditions optimales fixées pour l'étude de la stabilité de l'amlodipine seule et avec l'acide ascorbique dans la liqueur de thé.

Conditions optimales fixes	Mélanges	
	AMLO + liqueur de thé	AMLO + AA + Liqueur de thé
pH	4	8
Volume de liqueur de thé (ml)	10	3
Température ($^\circ\text{C}$)	37	37

-Protocole :

Dans 2 tubes à essai, nous introduisons dans le premier 10 ml de liqueur puis 10 mg d'amlodipine. Dans le second tube, nous introduisons 3 ml de liqueur de thé, puis nous ajoutons 7 ml d'eau bidistillée et 10 mg de amlodipine. Ensuite, ces deux solutions sont introduites dans le même bain marie porté à 37°C .

Des prélèvements de 0.2 ml seront effectués dans les deux solutions à différents temps : 0h ; 24h ; 36h ; 72h et 96h. Ceux-ci sont dilués 50 fois en ajoutant dans chacun des tubes, 9.8 ml d'eau bidistillée.

Les absorbances des deux solutions diluées sont mesurées à la longueur d'onde maximale 366 nm de l'amlodipine.

Les courbes de variation, Abs et concentration de l'amlodipine en fonction du temps sont tracées pour les deux mélanges.

II.10. Activité anti radicalaire (test du DPPH) de la liqueur de thé:

-Protocole :

❖ Préparation de l'échantillon (DPPH) :

Une solution de DPPH à 63,4 μ M (10mg du DPPH dans 40ml d'éthanol) est mise dans une fiole de 100ml, couverte avec du papier aluminium, et laissée sous agitation (à l'abri de la lumière) jusqu'à dissolution complète puis laissée au repos pendant une heure [32].

❖ Préparation du blanc « B » :

La référence (blanc) est préparée par mélange de 0,1ml de d'eau bi-distillé avec 4ml d'éthanol.

❖ Préparation du témoin « T » :

Le témoin est préparé par mélange de 0,1ml de d'eau bi-distillé avec 3,9 ml de DPPH et 1 ml d'éthanol.

❖ Préparation de l'échantillon de la liqueur de thé :

Nous prélevons 0,1ml de la liqueur de thé, nous ajoutons 3,9ml de DPPH et 1ml d'éthanol.

Les deux solutions, témoin et échantillon sont laissées au repos et à l'abri de la lumière pendant 30 minutes, puis analysées par UV-Visible, en mesurant l'absorbance à la longueur d'onde de 517nm [39]. Le test est répété 2 fois. Nous calculons la moyenne sur deux essais.

Les mêmes opérations sont répétées pour 1ml et 3ml de la liqueur de thé.

Les absorbances ont été mesurées au bout de 30 mn et après 17h.

-Méthode de calcul de l'activité antiradicalaire (DPPH°)_R :

L'évaluation de L'activité anti-radicalaire en utilisant la méthode DPPH est exprimée en pourcentage, selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(A_t - A_e) / A_t] * 100. \text{ (Keceli et Gordon, 2001)}$$

A_t : Absorbance du témoin;

A_e : Absorbance de la solution du DPPH contenant l'extrait (la liqueur de thé).

Chapitre III

Résultats et discussions

Dans ce chapitre nous avons rassemblé les résultats que nous avons obtenus de cette étude. Ce travail est basé sur l'exploration des effets de plusieurs paramètres sur la stabilité d'un principe actif qui l'Amlodipine. Nous avons étudié en particulier, l'influence de l'addition d'une liqueur de thé sur cette stabilité et les paramètres : température, pH et temps de contact ont été optimisés.

III.1. Caractérisation par infrarouge des matières premières :

➤ Amlodipine

La figure III-1 montre le spectre IR du principe actif Amlodipine. Les bandes d'absorption les plus significatives sont données comme suit :

- 3300 et 3167 cm^{-1} : attribuées respectivement aux bandes de vibration de valence ν_{as} et ν_{s} de N-H de NH_2 d'amine primaire (moyennes)
- 1717 cm^{-1} : de l'élongation ν (C=O) de l'ester proche du méthyl en méta sur le cycle pyridinium (forte)
- 1674 cm^{-1} : de l'élongation ν (C=O) de l'ester proche de l'ether et en méta' sur le cycle pyridinium (forte)
- 1616 cm^{-1} : $\delta(\text{NH})$ dans le plan du groupement amine primaire NH_2 (forte)
- 1494 cm^{-1} : $\delta(\text{NH})$ dans le plan du groupement NH d'amine secondaire cyclique (forte)
- 1207 cm^{-1} : $\nu_{\text{as}}(\text{SO}_3)$ élongation asymétrique du groupement sulfonium (forte)
- 1126 cm^{-1} : $\nu(\text{C-O-C})$ élongation de la fonction éther (forte).

Cette analyse montre bien qu'il s'agit de la structure de l'amlodipine d'une bonne pureté.

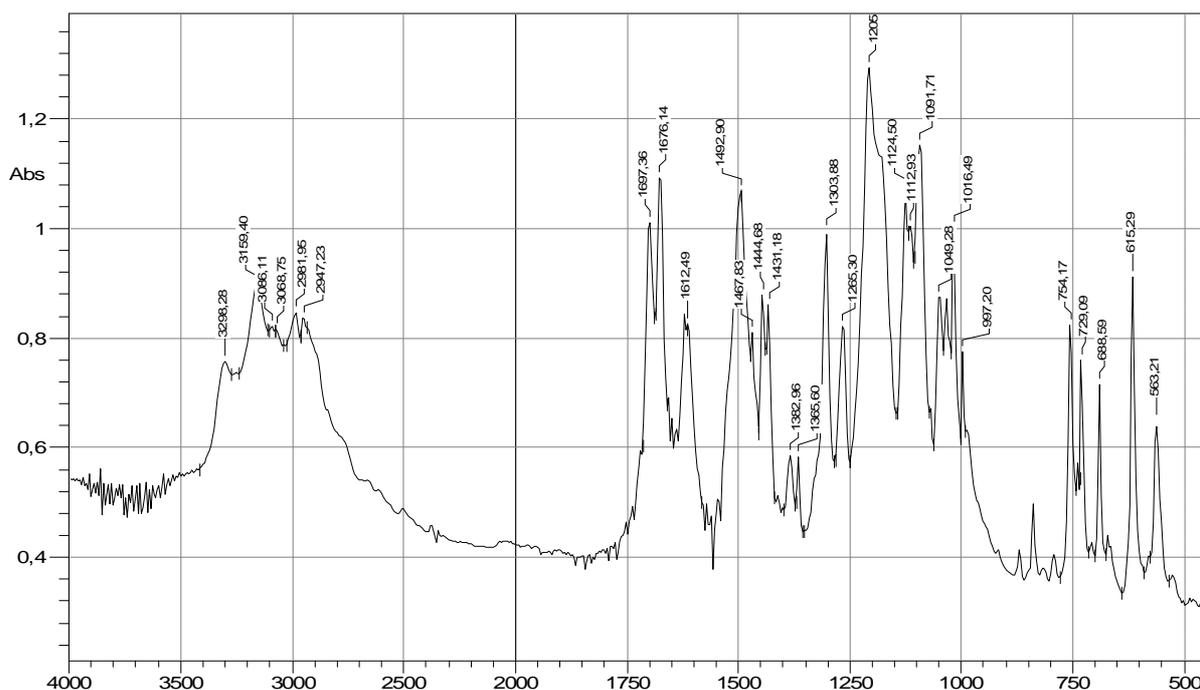


Figure III.1. Spectre IR d'Amlodipine Bésylate dans le KBr.

➤ Thé

Le spectre IR du thé donné sur la figure III.2, indique la présence d'un mélange de plusieurs composants, nous pouvons reconnaître quelques bandes caractéristiques des composés majoritaires qui sont les polyphénols :

- A environ 1600 cm^{-1} : bande intense des vibrations de valence des cycles aromatiques des polyphénols (forte)
- A à environ 3400 cm^{-1} : bande $\nu(\text{OH})_{\text{lié}}$ attribuée aux hydroxydes des polyphénols (forte et large)
- A 1050 cm^{-1} : élongation de la liaison C-O de la fonction alcool, appartenant aux polyphénols

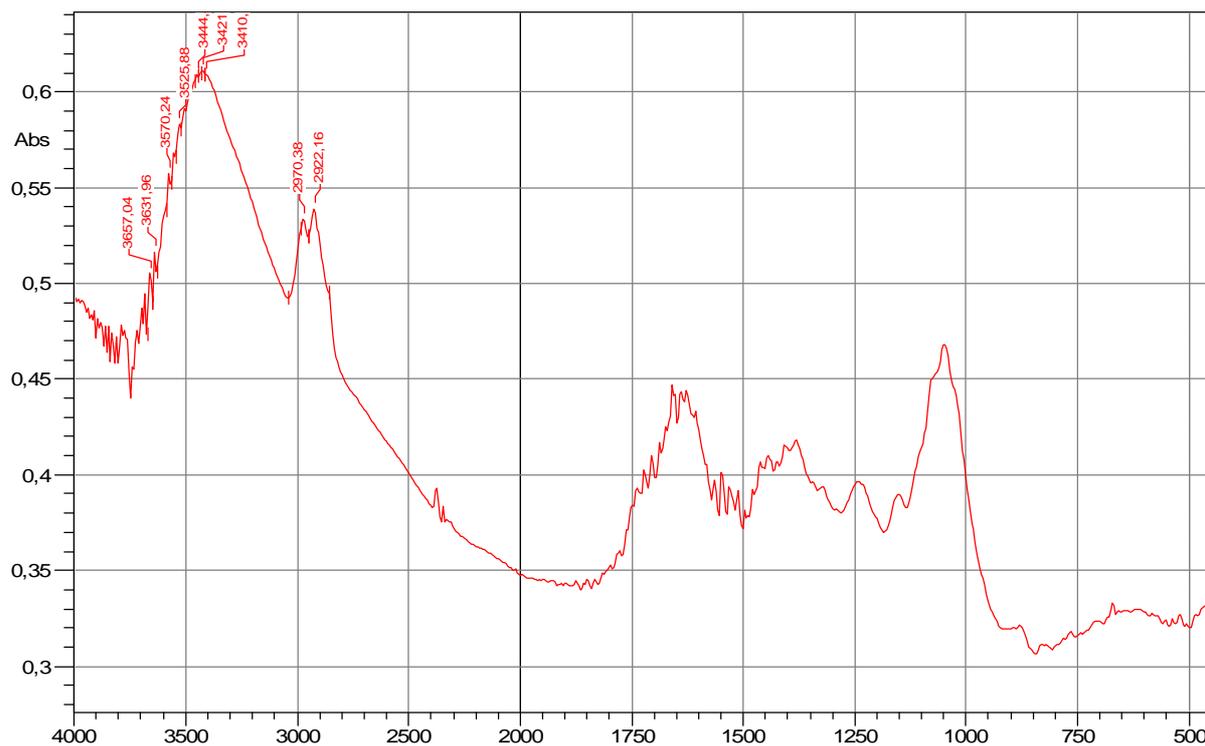


Figure III.2. Spectre IR du thé vert BARARI dans le KBr.

➤ Acide ascorbique

Le Spectre IR de la figure III.3 est relatif à l'acide ascorbique. Quelques bandes caractéristiques relevées sur le spectre, confirment bien la structure de cet acide.

- A 1753 cm^{-1} : élongation du C=O du cycle lactone conjugué avec la double liaison C=C en $\alpha\beta$ insaturé (forte)
- 1674 et 1668 cm^{-1} : vibration de valence de la double liaison cyclique conjuguée avec le carbonyle (fortes), des deux formes tautomères (énolisation)

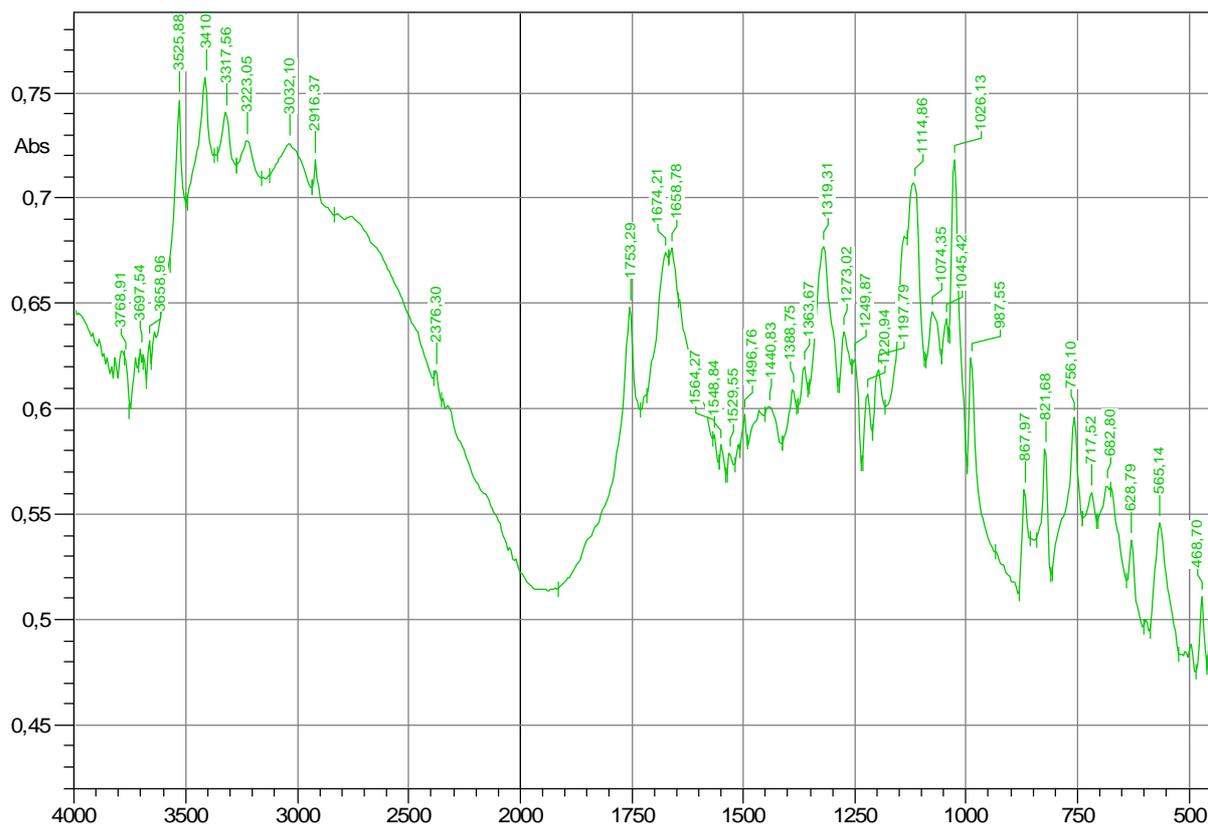


Figure III.3. Spectre IR De l'acide ascorbique dans le KBr.

III.2. Détermination du temps critique de stabilité de l'amlopidine seule

III.2.1. Variation de la stabilité de l'amlopidine seule en fonction du temps.

Le spectre d'absorption UV de l'amlopidine seule dans l'eau comporte deux bandes essentiellement (figure III.4) à 367 nm et à 247 nm. La plus spécifique et la moins intense est celle située à 367 nm caractéristique des dérivés 1, 4 dihydropyridin. Cette bande sera par conséquent exploitée durant l'analyse par la suite des mélanges, car elle n'interfère pas avec les bandes d'absorption de l'acide ascorbique et des polyphénols de l'infusion de thé.

Les spectres UV de l'acide ascorbique et de la liqueur de thé sont donnés dans les figures III.5 et III.6, respectivement. La bande d'absorption caractéristique de l'acide ascorbique est située vers 260 nm et celles relatives à la liqueur de thé sont enregistrées dans deux régions d'absorption, la plus intense entre 200 et 250 nm la moins intense est localisée entre 250 et 300 nm

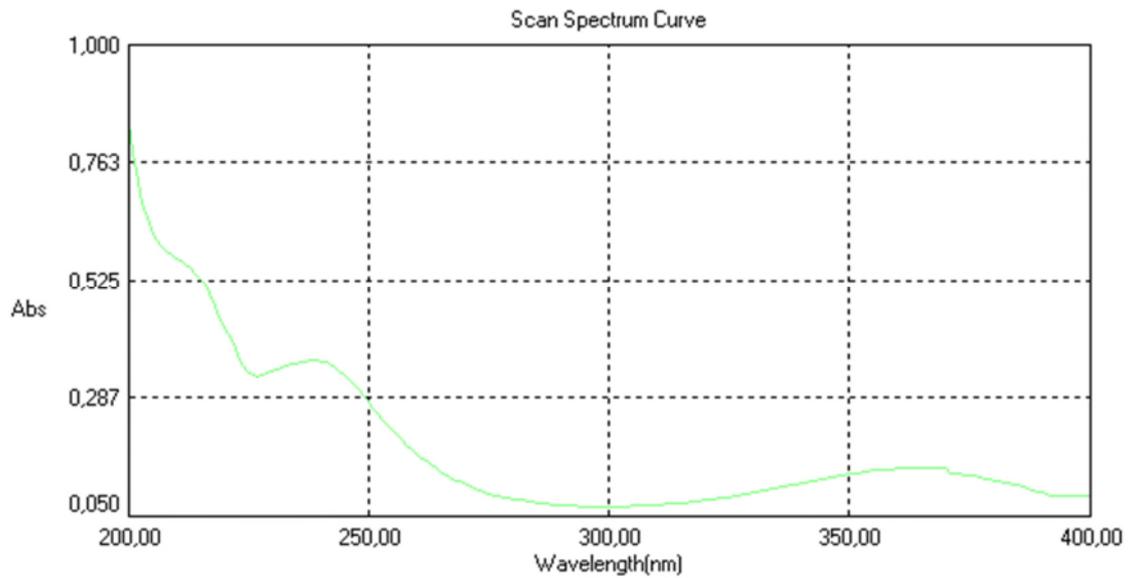


Figure III.4 : Spectre d'absorption UV de l'amlopidine dissoute dans l'eau bidistillée.

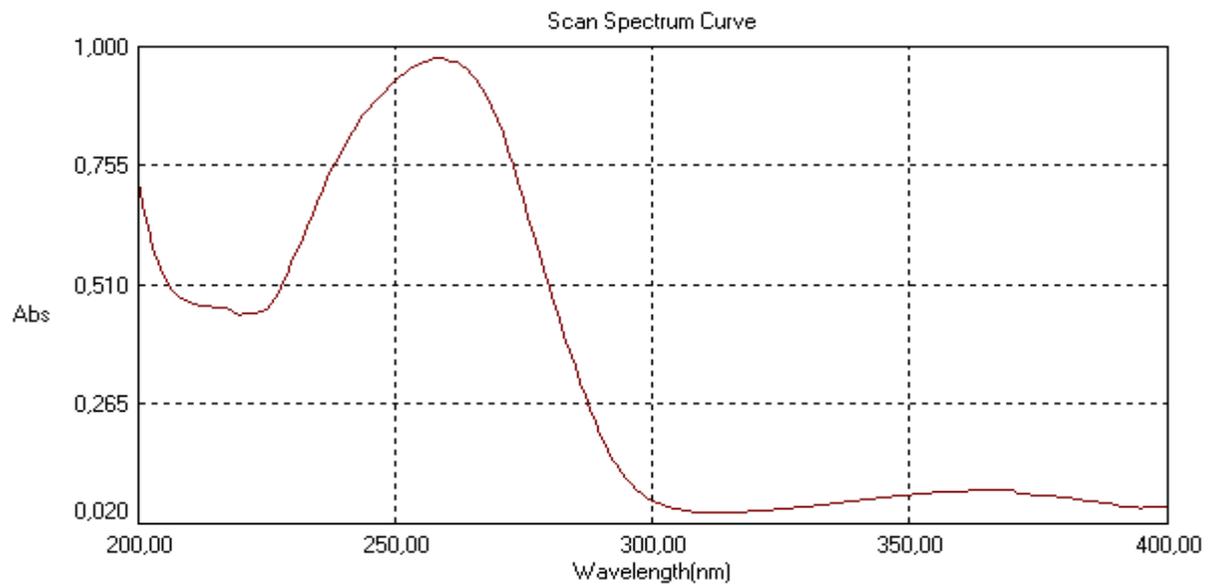


Figure III.5 : Spectre d'absorption UV de l'acide ascorbique dissous dans l'eau bidistillée.

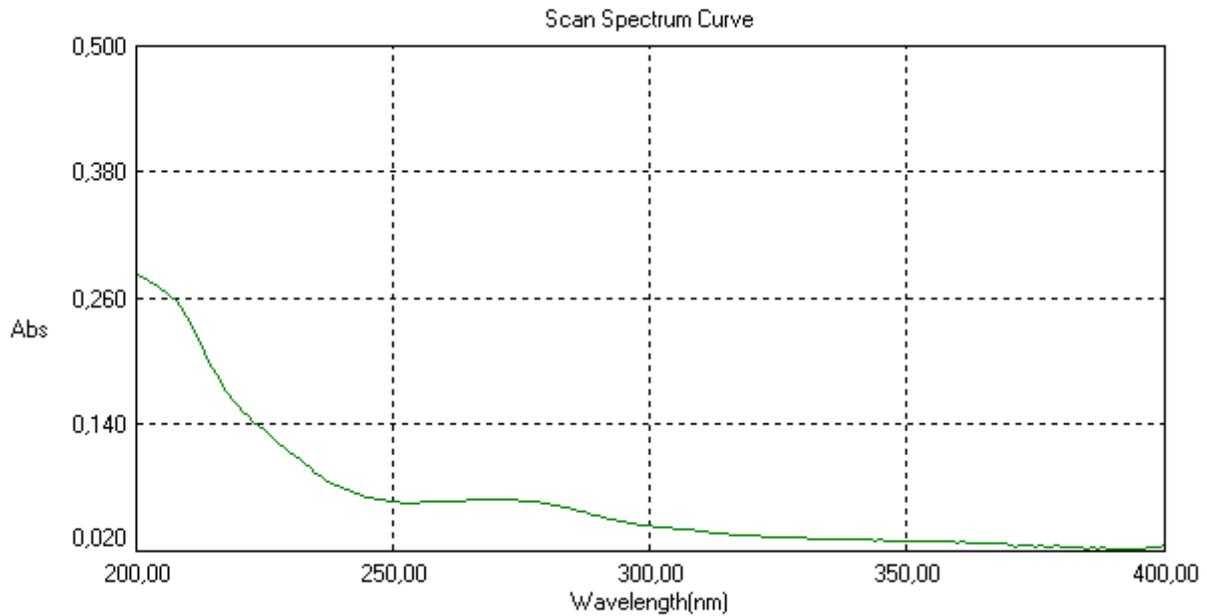


Figure III.6 : Spectre d'absorption UV de la liqueur de thé

Dans la **figure III.7** sont représentés les différents spectres d'absorption dans l'UV obtenus avec l'amlodipine seule dissoute dans l'eau bidistillée (1mg/ml) (dans les conditions normales de température et de pression (atmosphériques)), enregistrés à des temps de mise en solution allant de 0 à 24h. Nous remarquons un maximum d'absorption à la longueur d'onde de 367 nm spécifique de l'amlodipine. La diminution de la valeur de l'absorbance à partir de $t_c=20$ min, indique la dégradation de la substance active (Amlodipine) dans l'eau bidistillée. Des diminutions similaires sont notées pour les deux autres longueurs d'onde caractéristiques de l'amlodipine, qui sont 247 nm et 208 nm.

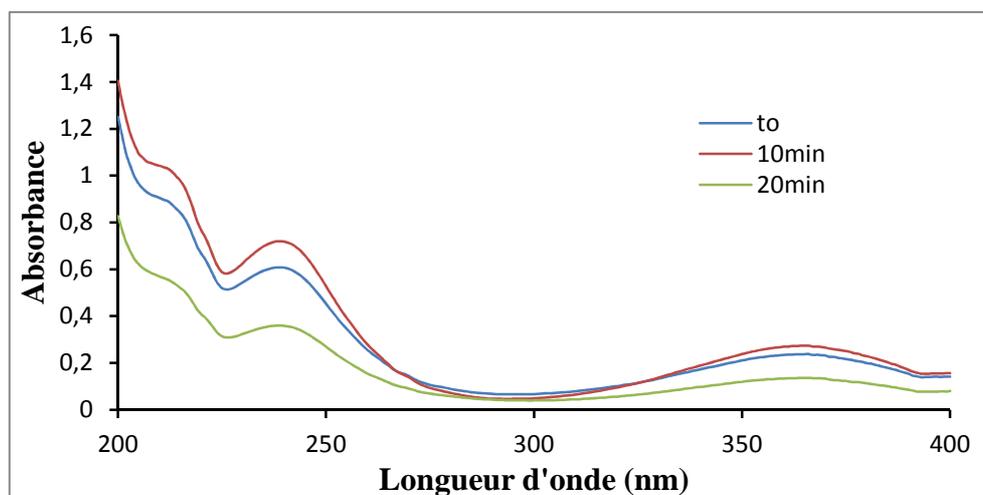


Figure III.7. Evolution en fonction du temps des spectres d'absorption UV de l'amlodipine seule.

III.2.2. Suivi de la Stabilité de l'amlodipine seule à 37°C (température physiologique).

Dans la **figure III.8** sont représentés les spectres d'absorption dans l'UV de l'amlodipine seule chauffée à 37°C (température physiologique) et à pH neutre. La valeur de l'absorbance à 367 nm diminue de façon remarquable pour un temps critique $t_c = 20$ mn, correspondant à une dégradation de l'amlodipine sous le seul effet de la température 37°C.

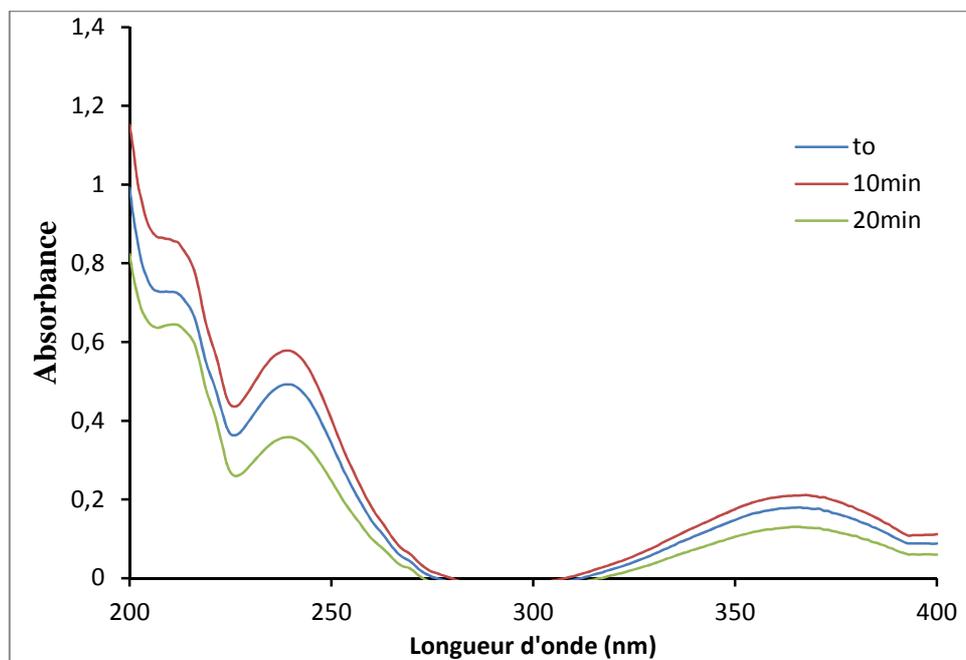


Figure III.8. Evolution en fonction du temps des spectres d'absorption UV de l'amlodipine seule à 37°C (température physiologique) à pH neutre (eau bidistillée).

III.2.3. Stabilité de l'amlodipine en présence de l'acide ascorbique

Dans la **figure III.9** sont représentés les spectres d'absorption dans l'UV de l'amlodipine en mélange avec l'acide ascorbique (1mg d'amlodipine et 1 mg d'AA dans 1 ml de solution) dans les conditions normales CN (T_{amb} , pH neutre de l'eau bidistillée). Nous remarquons que la valeur minimale de l'absorbance de l'amlodipine pour la longueur d'onde 367 nm, a été enregistrée au temps critique $t = 240$ min, due à une forte dégradation de la molécule (25% de l'amlodipine restant), par interaction avec l'acide ascorbique. L'apparition d'une nouvelle bande d'absorption de forte intensité entre 300 et 350 nm atteste la formation de produits de dégradation.

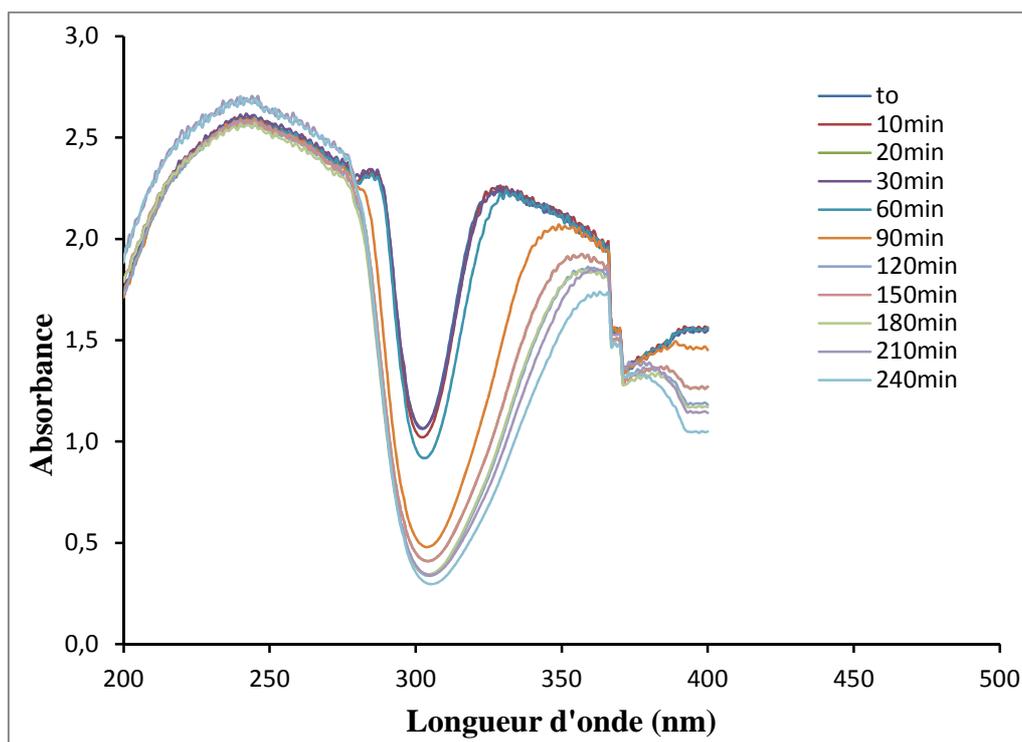


Figure III.9. Evolution en fonction du temps des spectres d'absorption UV de l'amlodipine en mélange avec l'acide ascorbique.

III.2.4- Stabilité de l'amlodipine avec l'acide ascorbique à 37°C

Dans la **figure III.10** sont représentés les spectres d'absorption UV de l'amlodipine avec l'acide ascorbique à 37°C (température physiologique). Nous remarquons également pour ces spectres un minimum d'absorption à 367 nm, correspondant au même temps critique de stabilité de l'amlodipine $t_c=240$ mn. Cette diminution est due à une forte dégradation de la substance active (Amlodipine) au bout de 4h. Par ailleurs, nous notons une dégradation totale de l'acide ascorbique au bout de 24h.

Conclusion :

Après comparaison des spectres d'absorption de l'amlodipine (1mg/ml) seule dans les conditions normales et à 37°C, il s'ensuit que l'amlodipine seule se dégrade au bout de seulement 20 mn. Lorsque nous ajoutons l'acide ascorbique à 1mg/ml, la dégradation de l'amlodipine est repoussée jusqu'à 240 mn (4h), et le processus de dégradation est plus important à 37°C, comparé à celui dans les conditions normales de température (environ 20°C).

Cela signifie que l'augmentation de la température est défavorable à la stabilité de l'amlodipine, cependant cette stabilité est améliorée en présence d'acide ascorbique.

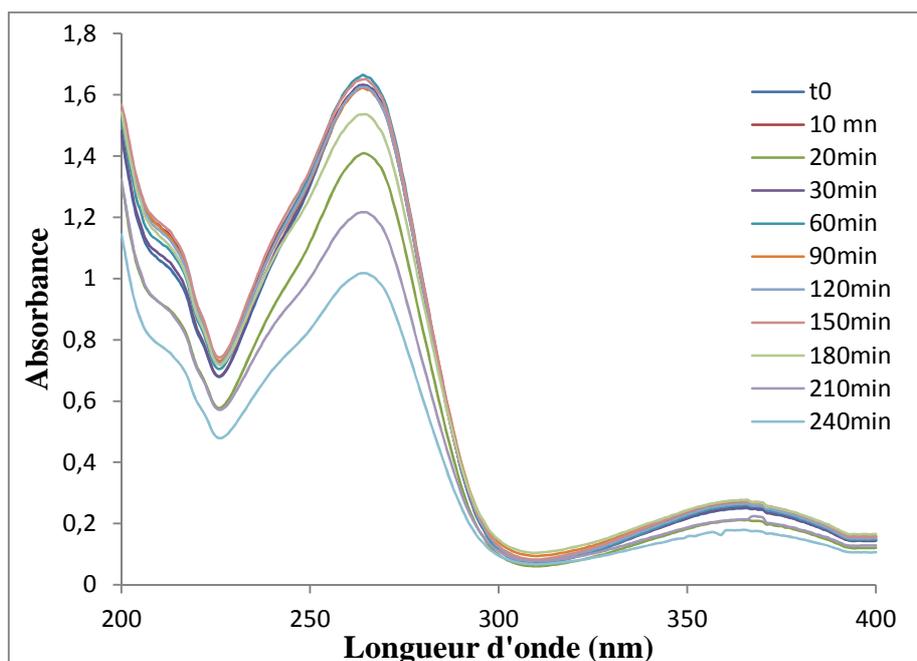


Figure III.10. Evolution en fonction du temps des spectres d'absorption UV de l'amlodipine en présence de l'acide ascorbique à 37°C.

III.3. Etude de l'effet de l'addition d'une liqueur de thé sur la stabilité de l'amlodipine

La masse de thé qui a été utilisée est de 100mg, et le volume d'eau est de 100ml.

Quelques propriétés physico-chimiques de la liqueur de thé (obtenue) ont été déterminées, il s'agit de la conductivité, du pH et de la température (tableau III.1).

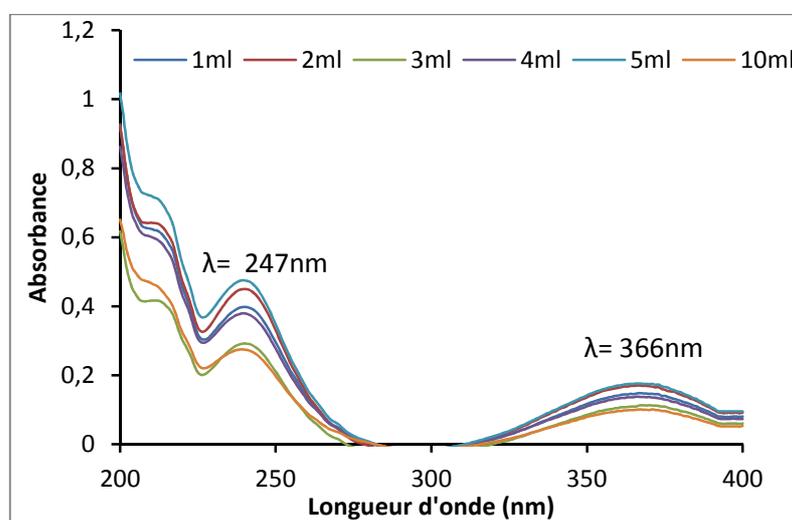
Tableau III.1 : Propriétés physico-chimique de la liqueur de thé.

Paramètres	Valeurs
Conductivité	50,6 μ s
pH	6,26
Température	23,2°C

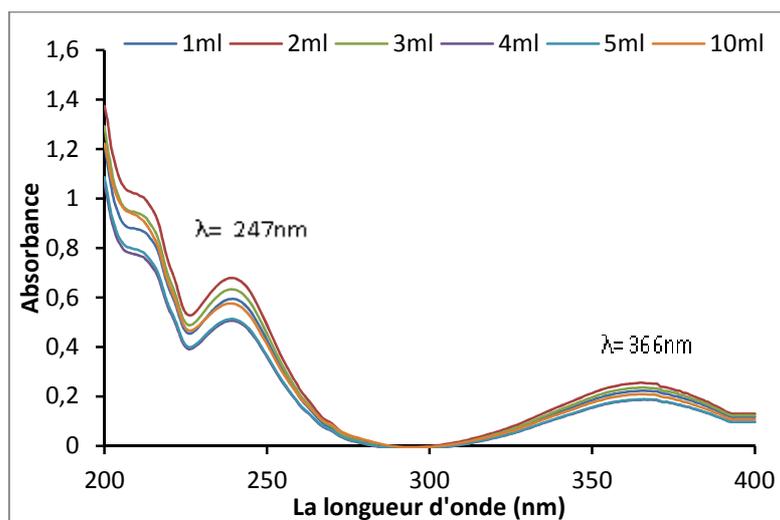
III.3.1. Influence du volume de la liqueur de thé.

III.3.1.1. Comparaison des spectres d'absorption UV de l'amlodipine dans les conditions normales CN et à 37° pour différents volumes de liqueur de thé.

Dans la figure III.11 sont représentés les spectres d'absorption UV de l'amlodipine dans les conditions normales (T_{amb} ; pH de l'eau bidistillée) et à 37°C qui montrent l'influence du volume de la liqueur de thé sur la stabilité de l'amlodipine au temps critique $t_c=20$ mn. Nous remarquons des valeurs des absorbances maximales (0,174 et 0,256) à 247 nm et à 366 nm spécifiques de l'amlodipine, pour le volume de la liqueur de 5ml dans les CN (Fig. III-11.a) et de 2 ml à 37°C (Fig. III-11.b), correspondant à une stabilité optimale pour l'AMLO.



-a-



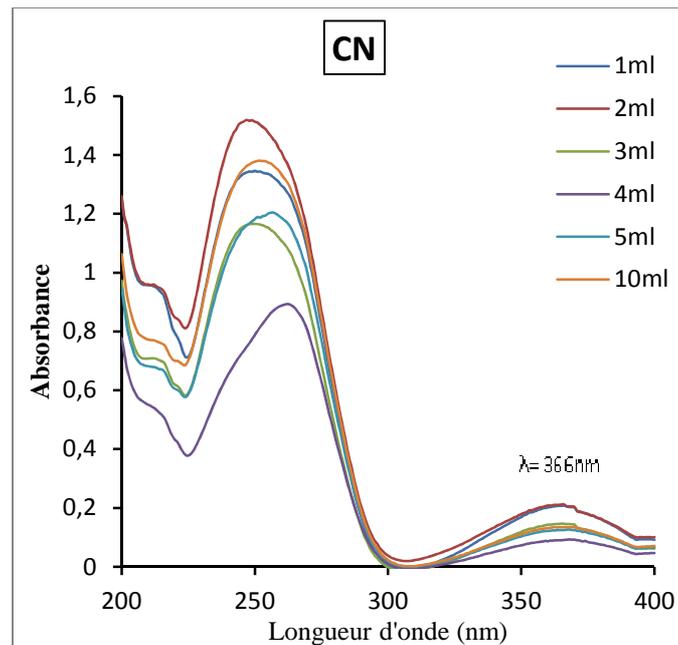
-b-

Figure III.11. Spectres d'absorption UV de l'amlodipine dans : **a)** les conditions normales CN (T_{amb} ; pH EBD) et **b)** à 37°C, au temps $t_c=20$ min, pour différents volumes de liqueur de thé.

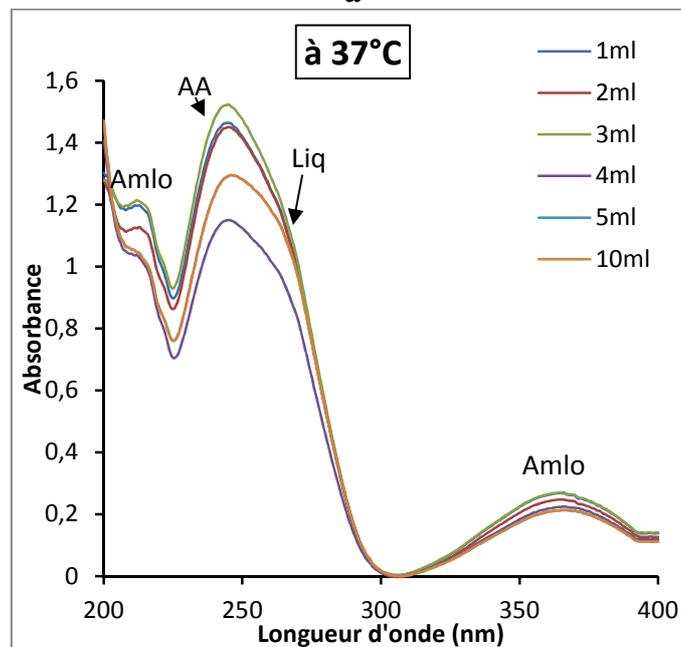
III.3.1.2. Stabilité de l'amlopidine dans les mélanges de l'acide ascorbique et de la liqueur de thé :

- Spectres d'absorption UV des mélanges de l'amlopidine + acide ascorbique + liqueur de thé, dans les conditions normales (CN) et à 37°C pour différents volumes de liqueur de thé :

Dans la **figure III.12** sont représentés les spectres d'absorption du mélange **amlopidine + acide ascorbique + liqueur de thé**, en fonction du volume de la liqueur de thé.



-a-



-b-

Figure III.12 stabilité de l'amlopidine avec l'acide ascorbique en fonction du temps :
a) Dans les conditions normales (CN) et b) à 37°C,
pour différents volumes de la liqueur de thé.

Nous remarquons que l'absorbance est maximale à 366nm (Amlo), pour les volumes de liqueur $V_{liq}= 2ml$ (Fig. III.12-a) et 3ml (Fig. III.12-b) respectivement dans les conditions CN et à 37°C. De plus, nous observons une importante interférence entre les bandes d'absorption de la liqueur avec celle de l'acide ascorbique et un chevauchement avec la 1^e bande d'absorption de l'amlodipine (à 247nm) dans la région de l'UV comprise entre 200 et 300 nm.

➤ **Comparaison de la stabilité de l'amlodipine avec l'acide ascorbique dans les conditions normales CN et à 37°C, au temps critique et avec le volume optimal de la liqueur de thé**

Nous remarquons que les deux spectres UV de l'amlodipine avec l'acide ascorbique dans les conditions normales CN se superposent avec ou sans liqueur de thé (**Figure III.13-a**).

Ce résultat peut être expliqué par l'absence de la dégradation et une meilleure stabilisation de l'amlodipine dans les conditions normales, tandis qu'à 37°C, les absorbances de l'amlo et de l'AA sans la liqueur de thé sont très inférieures à celles obtenues avec le volume optimal (3ml) de la liqueur de thé (**Figure III.13-b**).

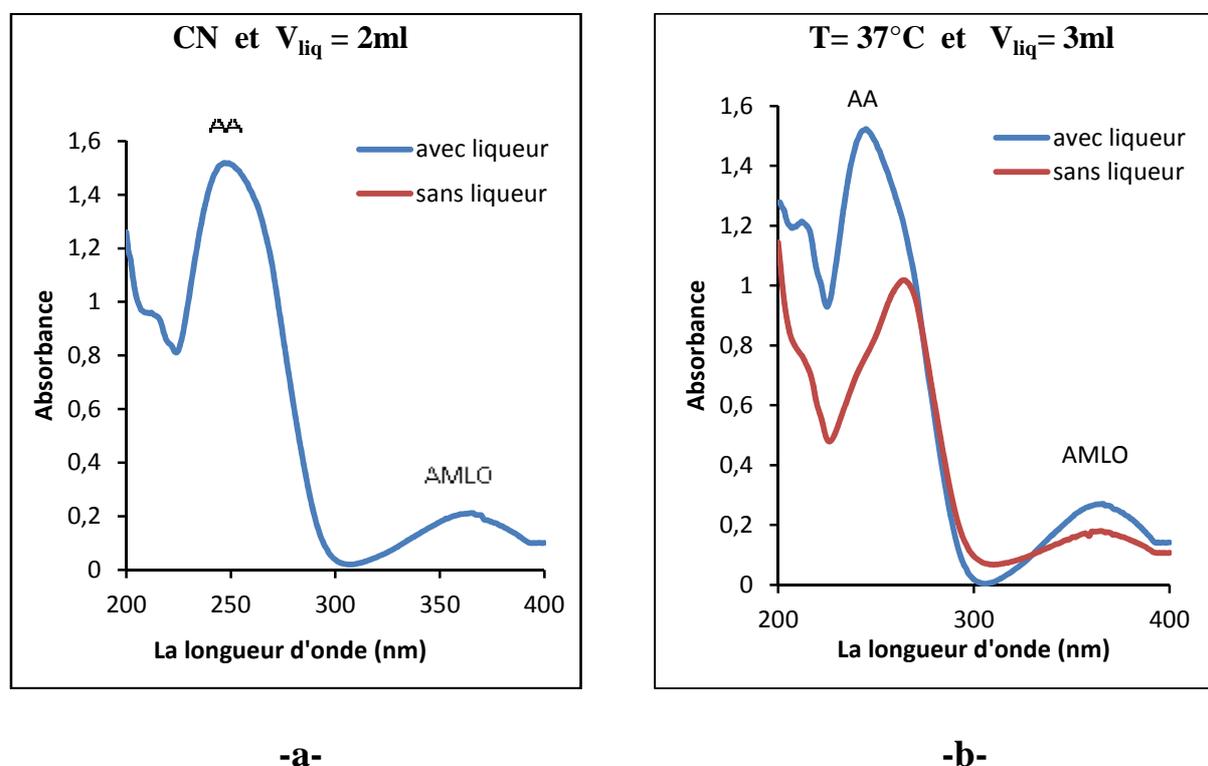


Figure III.13. Comparaison des spectres UV de l'amlodipine avec l'acide ascorbique dans :
a) les conditions normales CN et
b) à 37°C, au temps $t_c= 240min$, avec et sans la liqueur de thé.

Ceci montre une bonne stabilité des deux substances, AMLO et AA à 37°C avec la liqueur de thé, qui empêchent des interactions chimiques entre ces deux substances. Une dégradation très importante de l'AMLO et de l'AA à 37°C sans la liqueur de thé, prouve la nécessité de recourir à la stabilisation des deux molécules par les composants de la liqueur de thé, qui sont essentiellement les polyphénols et les flavonoïdes doués de propriétés anti-oxydantes et anti-radicalaires.

➤ **Détermination de la concentration de l'amlodipine dans la solution contenant la liqueur de thé**

En utilisant l'équation de la courbe d'étalonnage de l'amlodipine :

$$\text{Abs} = 0.00916 C + 0.0283$$

Nous pouvons déterminer avec précision les concentrations de l'amlodipine dans les solutions des mélanges amlo+liqueur de thé avec ou sans l'AA à l'équilibre. Le facteur de dilution est F=50. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau III.2, dans lequel nous avons porté les concentrations de l'amlodipine subsistant après stabilisation, au temps critique correspondant à chacun des mélanges suivants :

M1= (liq+AMLO) ; M2= (liqueur+AMLO+AA) dans les CN,

M3= (liq +AMLO) ; M4= (liq+AMLO+AA) à 37°C

Les concentrations sont calculées à partir des absorbances mesurées à 367nm, pour différents volumes de liqueur de thé (1ml, 2ml, 3ml, 4ml, 5ml, 10ml). Les concentrations sont spécifiées come suit :

C1 : (Liq+AMLO) dans les CN

C2 : (Liq+AMLO+AA) dans les CN

C3 : (Liq+AMLO) à 37°C

C4 : (Liq+AMLO+AA) à 37°C

Tableau III.2 : Concentrations de l'amlodipine en fonction des volumes de la liqueur de thé, à différents paramètres optimaux fixés de T°, de pH et de temps critique de stabilité.

V (ml)	1	2	3	4	5	10
C 1 (mg/l)	13.06	15.46	11.97	11.97	16.12	7.93
C 2 (mg/l)	19.61	20.05	12.95	7.06	10.77	11.64
C 3 (mg/l)	21.25	24.85	22.67	17.32	17.54	19.72
C4 (mg/l)	26.16	23.87	26.49	21.47	22.23	20.16

Dans la **figure III.14**, nous remarquons que la concentration maximale (26.49 mg/L) est celle obtenue pour le mélange Amlodipine + liqueur de thé ($V_{liq}= 3ml$) dans les conditions normales (CN), relative à la meilleure stabilité de l'amlodipine. La valeur minimale (7.06mg/L) correspond au mélange amlo+AA+ 4ml liqueur de thé à 37°C, en raison de la forte dégradation de l'amlo et de l'AA qui interagissent entre eux par une réaction d'oxydoréduction.

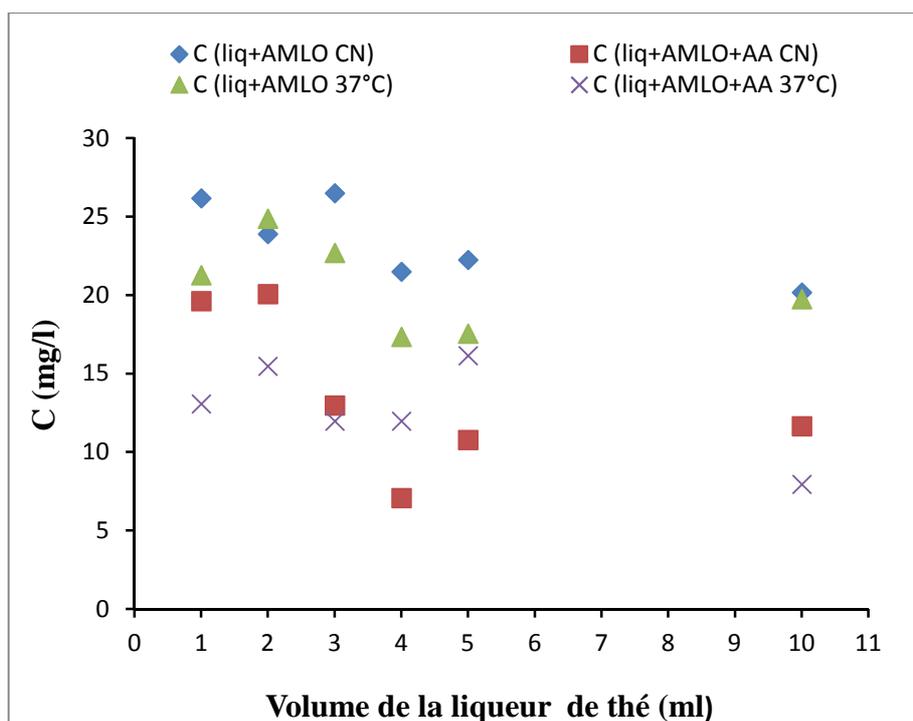


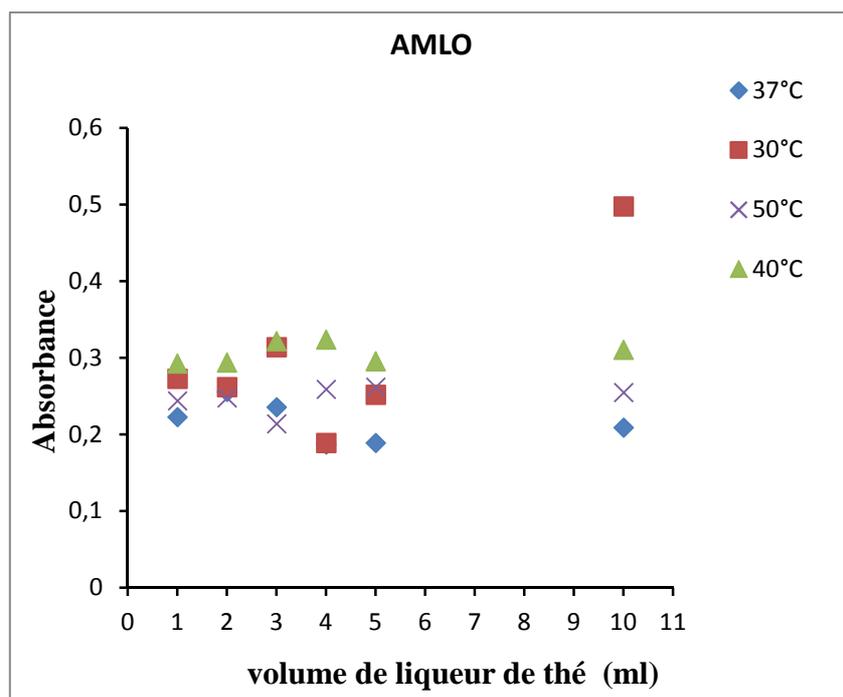
Figure III.14. Concentrations de l'amlodipine avec la liqueur de thé, avec ou sans l'acide ascorbique, en fonction du volume de la liqueur de thé.

III.3.2 : Influence de la température :

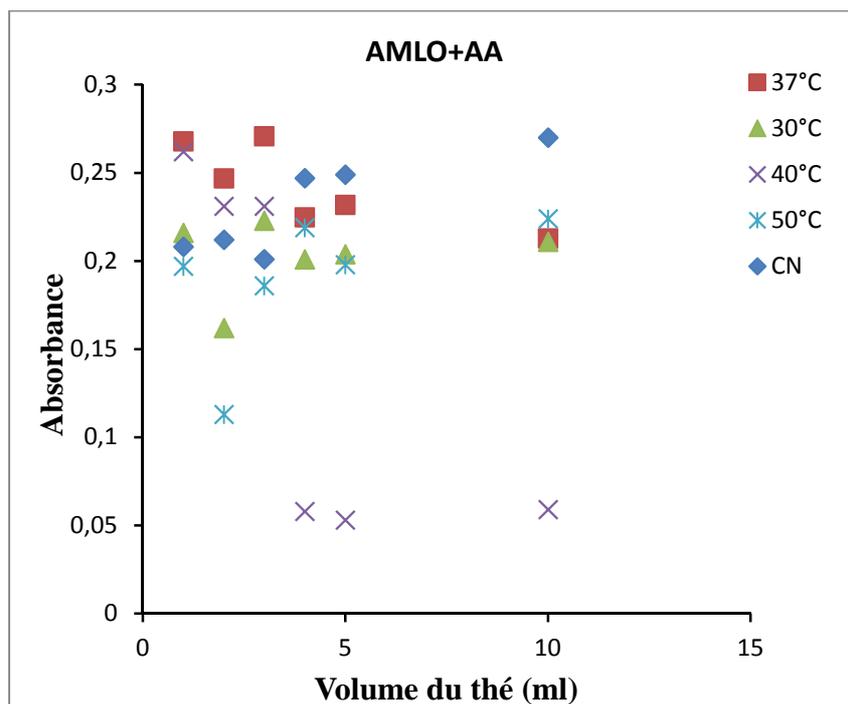
L'étude de la stabilité de l'amlodipine en fonction de la température (T_{amb} , $T=30^{\circ}C$, $37^{\circ}C$, $40^{\circ}C$, $50^{\circ}C$), dans les mélanges de liqueur de thé, avec ou sans acide ascorbique, aux conditions optimales fixes de V_{liq} et au temps critique de stabilité, a aboutit aux résultats qui suivent (Fig III.15):

Dans la **figure III.15** nous remarquons la meilleure stabilité de l'amlodipine, relative à l'absorbance maximale est obtenue pour deux cas de mélanges :

- ✓ Amlo + liqueur de thé ; à $t_c = 20min$: $T=30^{\circ}C$ et $V_{liq}=10ml$ (Fig.III.15-a)
- ✓ Amlo + AA + liqueur de thé ; à $t_c = 240min$: $T=37^{\circ}C$ et $V_{liq}= 3ml$ (Fig.III.15-b)



-a-



-b-

Figure III.15. Stabilité de l'amlopidine dans les mélanges de liqueur de thé : a) amlo seule ; b) amlo + AA, aux temps t_c et pH (eau bidistillée) fixes, en fonction du volume de liqueur de thé et pour différentes températures.

-Interprétation :

Les résultats de la variation de la température montrent qu'il existe une grande influence de ce paramètre sur la stabilité de l'amlodipine. Lorsqu'elle est seule dans 10 ml de l'infusion de thé, l'absorbance maximale a été notée à 30°C. Par contre, pour le système binaire (Amlo+AA), la meilleure absorbance a été enregistrée pour deux températures, à 37°C pour 3ml de liqueur de thé, et à la T_{amb} (CN) pour 10 ml de liqueur de thé. Ce qui signifie que l'amlodipine est plus stable aux plus faibles températures. L'absorbance minimale a été enregistrée à 40°C, ce qui prouve que l'amlodipine est moins stable à cette température.

III.3.3. Influence du pH :**III.3.3.1. Amlo + liqueur de thé :**

Nous avons obtenus les résultats pour différentes valeurs de pH= 4; 5; 7; 8, et 6.26 (pH de la liqueur de thé) aux conditions optimales fixes de $T= 30^{\circ}\text{C}$, $V_{liq} = 10\text{ml}$ en fonction du temps.

La **figure III.16** montre que la valeur de l'absorbance la plus élevée, est obtenue pour le pH=6.26 de la solution de la liqueur de thé, au bout de 10 mn et reste pratiquement constante jusqu'à 20 mn. Ce qui signifie que l'amlodipine seule dans la liqueur de thé à 30°C, est plus stable à ce pH. La valeur la moins élevée à 20 mn de l'absorbance est obtenue pour le pH=8, montrant ainsi une forte instabilité de l'amlodipine à ce pH au bout de 20 mn de contact avec la liqueur de thé. Mais, la valeur la plus faible a été obtenue pour le pH=7 au bout de seulement 10 mn, mettant en évidence une très grande instabilité de l'amlodipine dans 1 milieu neutre, malgré la présence de la liqueur de thé.

En conclusion, le caractère faiblement acide (pH=6.26) de la liqueur de thé [Ref, Aurélie MOSSION, thèse de doctorat, Etude de la composition minérale et organique des liqueurs de thé et de leurs caractéristiques organoleptiques : influence des paramètres physico-chimiques de l'eau] favorise la stabilité de l'amlodipine.

III.2.3.2 Amlo + AA + liqueur de thé

Nous avons obtenus les résultats pour différentes valeurs de pH= 4 ; 5 ; 7 ; 8, aux conditions optimales fixes de $T= 37^{\circ}\text{C}$, $V_{liq} = 3 \text{ ml}$ en fonction du temps.

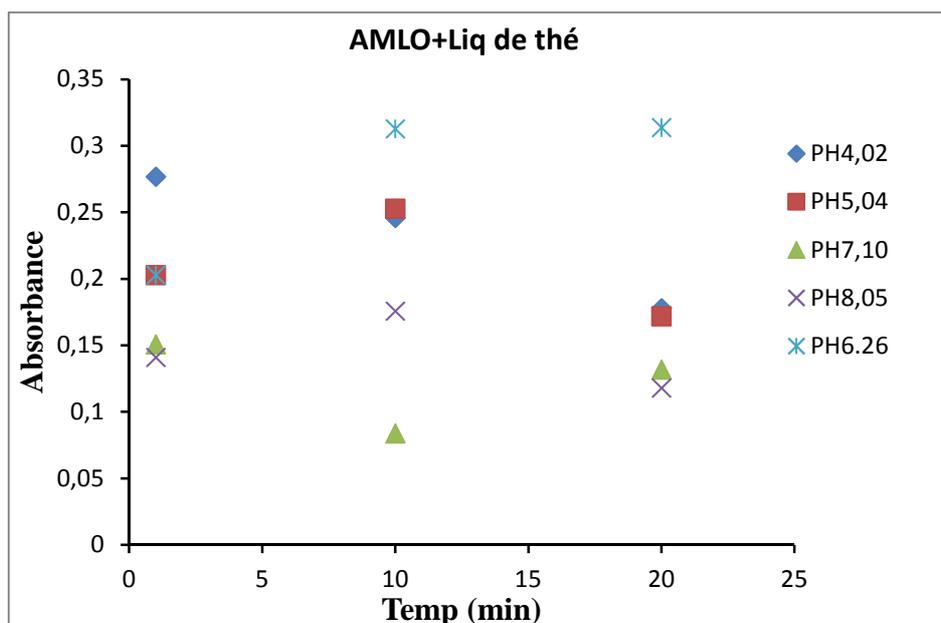


Figure III.16. Variation de l'absorbance de l'amlodipine dans la liqueur de thé, aux conditions optimales fixes de volume de liqueur de thé $V_{liq} = 10ml$ et de température $T=30^{\circ}C$, pour différents pH en fonction du temps.

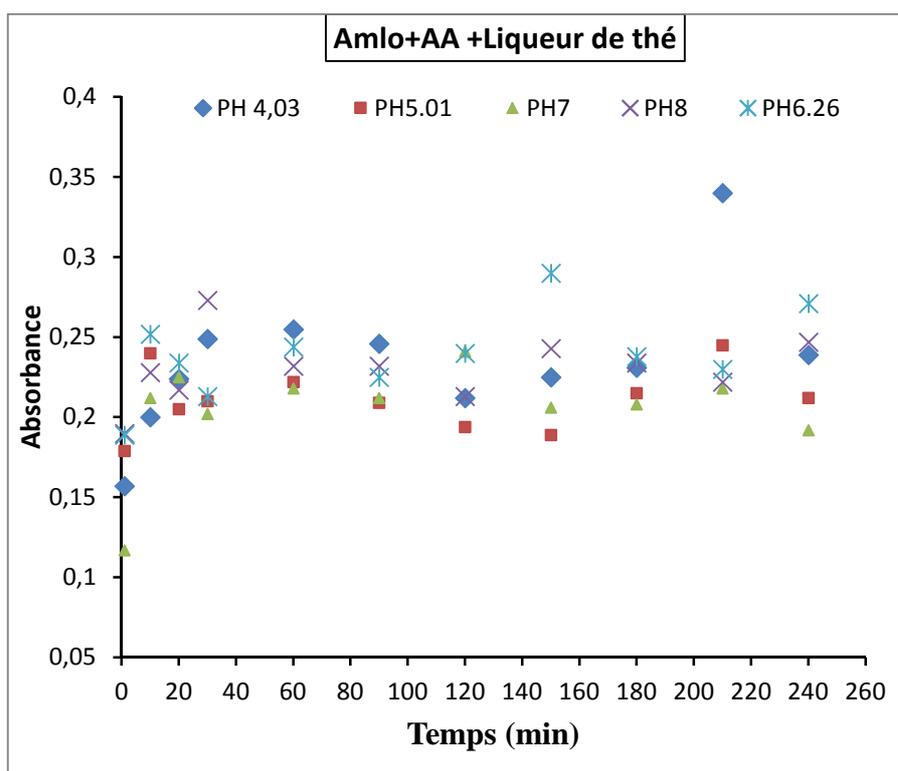


Figure III.17. Variation de l'absorbance de l'amlodipine avec l'acide ascorbique et la liqueur de thé, dans les conditions optimales de volume de liqueur de thé $V_{liq} = 3ml$ et de température $T=37^{\circ}C$ fixes, pour différents pH en fonction du temps.

La **figure III.17** montre que la valeur la plus élevée de l'absorbance de l'amlodipine est obtenue au pH= 4 au bout de 210 mn, attestant d'une meilleure stabilité de l'amlodipine avec l'acide ascorbique et la liqueur de thé. Nous notons que l'absorbance diminue lorsque le pH augmente de 4 à 8, ce qui montre que pour t=210mn la stabilité de l'amlodipine diminue avec l'augmentation de la valeur du pH. De plus, la valeur la plus élevée au temps maximal $t_c=240$ min, est obtenue pour le pH= 6.26 de la solution de liqueur. Par contre, les valeurs les plus faibles sont obtenues au pH=7, qui correspond à la stabilité la plus faible de l'amlodipine dans ce mélange.

En conclusion, la meilleure stabilité de l'amlodipine avec l'acide ascorbique et la liqueur de thé a été enregistrée dans les milieux acides de pH=4 et 6.26.

➤ **Concentrations de l'amlodipine dans les conditions optimales de stabilité en fonction du pH :**

Nous calculons la concentration de l'amlodipine à partir de la courbe d'étalonnage pour les mélanges : (liq+AMLO) et (liq+AMLO+AA) à une longueur d'onde de 367nm et à différentes valeurs de pH, les autres paramètres sont fixés aux conditions optimales de V_{liq} , de T° et de temps critique de stabilité. Les résultats sont consignés dans le tableau III.3.

Avec :

C1 : AMLO + Liq

C2 : AMLO + AA + Liq

Tableau III.3 : Concentrations de l'amlodipine en fonction du pH de la solution de liqueur de thé.

pH	4	5	6.26	7	8
C1 (mg/l)	16.34	15.68	51.27	11.32	9.79
C2 (mg/l)	23	20.05	26.49	17.87	23.87

Dans la **figure III.18**, nous pouvons observer que les concentrations maximales de l'amlodipine, 51.27 mg/L et 26.49 mg/L respectivement pour les mélanges (Amlo + liqueur) et (Amlo+ AA + liqueur), ont été obtenues pour le pH de la solution de la liqueur de thé qui est de 6.26.

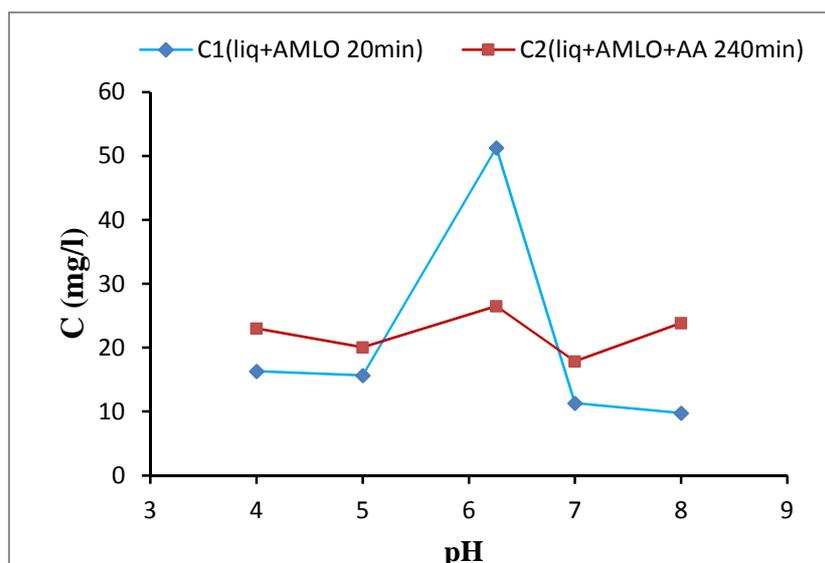


Figure III.18. Concentrations de l'amlodipine dans les mélanges (Amlo + liqueur) et (Amlo + AA + liqueur) aux conditions optimales de T° et de temps critique, en fonction du pH.

III.4. Optimisation du temps de stabilité de l'amlodipine, dans les conditions optimales :

Les résultats de l'optimisation de la stabilité de l'amlodipine jusqu'à 4 jours (96H) de contact à 37°C aux conditions optimales de pH et de volume de la liqueur de thé V_{liq} relatifs aux mélanges, ont été consignés dans le tableau III.4.

Avec :

C1 = amlo + liqueur de thé

C2 = amlo + AA + liqueur de thé

Tableau III.4 : Concentrations de l'amlodipine dans la liqueur de thé et dans les conditions optimales fixes, en fonction du temps optimisé.

Temp optimisé (heures)	0h	24h	48h	72h	96h
C1	13.94	21.14	18.64	19.39	19.18
C2	14.38	18.64	16.23	14.26	17.21

Dans la Figure III.19, nous pouvons remarquer qu'après chaque durée (0h ; 24h ; 48h ; 72h ; 96h) au bout de quatre jour de contact de l'amlodipine dans la liqueur de thé, dans les conditions optimales de $T^\circ=37^\circ\text{C}$, de $V_{\text{liq}}=2$ ml, et de $\text{pH}=4$, pour le mélange Amlo + liqueur de thé, et de $V_{\text{liq}}= 10\text{ml}$, $\text{pH}=6.26$ pour le mélange Amlo + AA+ liqueur de thé.

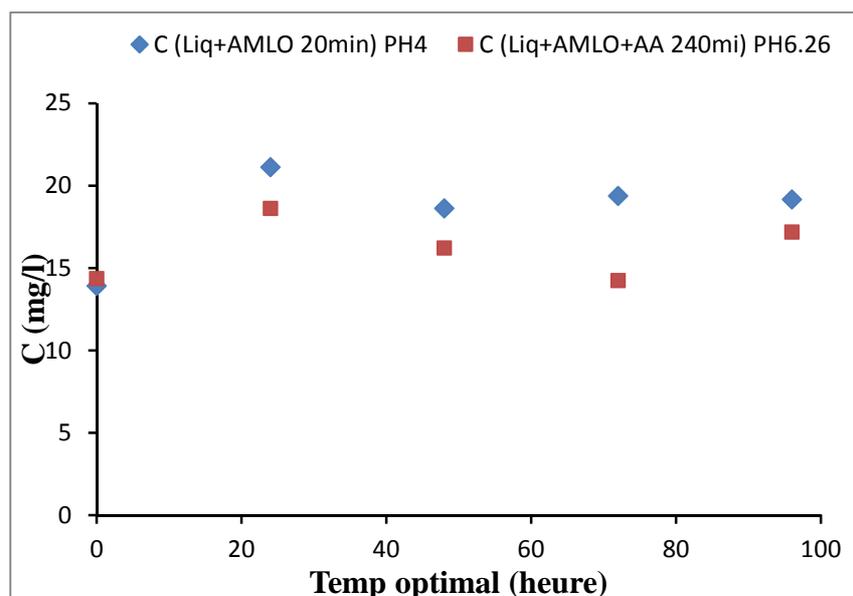


Figure III.19. Stabilité de l'amlodipine dans la liqueur de thé en fonction du temps dans les conditions optimales de T° , de pH et de volume V_{liq} jusqu'à 4 jours.

Les résultats de l'étude de la stabilité optimisée de l'amlodipine prolongée jusqu'à 4 jours, montrent que les résultats sont meilleurs pour le mélange (Amlo+Liqueur) à pH =4, et les valeurs maximales de stabilité et de concentration sont atteintes au bout de 24H (1j). Celles-ci diminuent légèrement à 48H (2j) et restent constantes jusqu'à 96H (4j). Les valeurs obtenues pour le mélange (Amlo + AA + Liqueur de thé) sont inférieures et suivent pratiquement le même sens de variation que le précédent cas de mélange.

Conclusion : nous montrons par cette étude que malgré la stabilisation de l'amlodipine par la liqueur de thé, mais l'ajout de 1mg/ml de l'acide ascorbique diminue sensiblement la stabilité de l'amlodipine au bout de 72 (3j).

III.4. Détermination de l'activité anti-radicalaire (test de DPPH) :

Les résultats de l'activité anti radicalaire des extraits de thé, exprimés en pourcentage d'inhibition du radical DPPH sont représentés dans le **tableau III.5** et illustrés par l'histogramme de **la figure III.20**.

L'activité antiradicalaire exprimée en pourcentage de DPPH [19] augmente avec le volume de la liqueur de thé. Nous avons obtenu la meilleure activité anti-radicalaire (3.18%) pour un volume de 3ml de la liqueur de thé, correspondant au volume de liqueur optimal utilisé dans le mélange (Amlo + AA + Liqueur). Nous remarquons aussi que celle-ci croit

non seulement avec la quantité avec le volume de liqueur de thé, due à l'augmentation de la concentration des composés poly phénoliques et flavonoïdes naturellement présents dans la liqueur de thé, mais aussi avec le temps. Les valeurs des activités obtenues après 30 mn d'inhibition sont inférieures à celles obtenues après 17h d'inhibition.

Tableau III.5. Activité antiradicalaire avec la DPPH pour différents volumes de liqueur de thé.

	% (DPPH) _R		
Volume de thé Durée	0.1ml	1ml	3ml
30min	0.13%	0.34%	3.18%
17h	0.31%	0.58%	

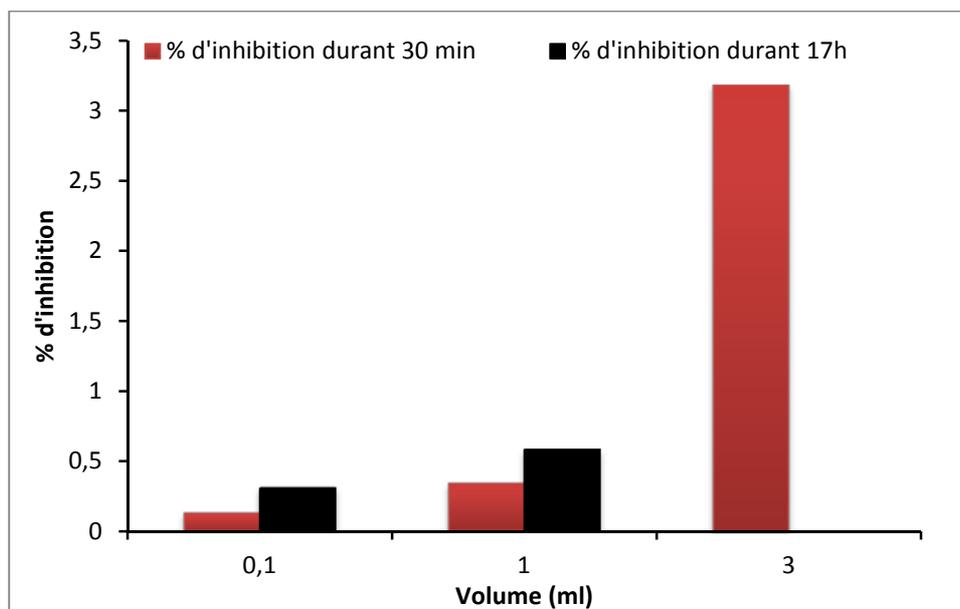


Figure III.20. Pourcentage d'inhibition de la DPPH en fonction des volumes de la liqueur de thé.

Conclusion

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet d'addition de la liqueur de thé sur la stabilité d'un Principe actif qui est l'amlodipine, pour cela différents paramètres peuvent influencer cette stabilité ont été examinés en l'occurrence : temps, température, volume, pH et la présence d'acide ascorbique.

Et nous avons fait les constatations suivantes :

- L'amlodipine seule se dégrade seulement au bout de 20min, lorsqu'on a rajouté l'acide ascorbique la dégradation de l'amlodipine est repoussée jusqu'à 240min (4h) et le processus de dégradation est plus important à 37°C comparé à celui dans les conditions normales de température, ce qui signifie que l'augmentation de la température est défavorable à la stabilité de l'amlodipine, cependant cette stabilité est améliorée en présence d'acide ascorbique.
- Une dégradation très importante de l'amlodipine et de l'acide ascorbique à 37°C sans la liqueur de thé, prouve la nécessité de recourir à la stabilisation des deux molécules par les composants de la liqueur de thé, qui sont essentiellement les polyphénols et les flavonoïdes dotés de propriétés anti-oxydantes et anti-radicalaires.
- le caractère faiblement acide (pH=6.26) de la liqueur de thé favorise la stabilité de l'amlodipine.
- la meilleure stabilité de l'amlodipine avec l'acide ascorbique et la liqueur de thé a été enregistrée dans les milieux acides de pH=4 et 6.26.
- nous montrons par cette étude que malgré la stabilisation de l'amlodipine par la liqueur de thé, mais l'ajout de 1mg/ml de l'acide ascorbique diminue sensiblement la stabilité de l'amlodipine au bout de 72 (3j).
- L'évaluation du potentiel anti radicalaire par le test DPPH, l'activité inhibitrice a montré que les composés phénoliques du thé vert BARARI exercent une activité anti oxydante considérable.

D'après ce travail, on conclue que l'amlodipine est stable dans les conditions optimales, sa solubilité dans l'eau est très souvent un paramètre important. A priori difficile à atteindre. La vitamine C (acide ascorbique) est altéré par la chaleur, les Ultraviolet et le temps, elle se dégrade au milieu acide lorsque les enzymes sont actifs.

Lorsqu'on a utilisé la technique UV-visible, elle nous a fournie pas mal d'information sur les composés contenue dans la liqueur de thé vert.

L'évaluation de l'activité anti radicalaire par le test DPPH a prouvée que l'extrait de thé vert BARARI à un effet important, et surtout elle à une bonne activité antioxydante similaire à celle de la liqueur de thé, acide ascorbique et amlodipine utilisé dans l'étude de la stabilité de l'amlodipine influencé par la liqueur de thé en fonction du temps dans les conditions optimales.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] **Vidal V.** rubrique « art de vivre » echo bio n°2 novembre-décembre 06 .www.valerievidal.fr
- [2] **Fujihara T., Nakagawa A., -Izumi, tozawa, Numata O. 2007.** High molecular weight polyphenols from oolong tea and black tea: purification, some properties, and role in increasing mitochondrial membrane potential. *BioBiotechnolBiochem* 71:711-719.
- [3] **Kabouche S. 2010.** Etude de la relation du thé vert, maladies cardiovasculaires et stress oxydant. Mémoire de magister de l'université Mentouri de Constantine.
- [4] **Marie LP. 2009.** Saison froide et thé vert font bon ménage. Le magazine santé AUNATUREL.
- [5] **Pelli K., Lyly M. 2003.** Les antioxydants dans l'alimentation
- [6] **Bauer M. 2005.** Stabilité des substances actives et des produits formulés, stp. *Pharma. pratiques*, volume 15, n°3-mai/juin 2005.
- [7] **Zhao B., Li X., He R., Cheng S., Wenjuan X. 1989.** Scavenging effect of extracts of green tea and natural antioxidants on active oxygen radicals. *Cell Biophysics* Vol. 14.
- [8] **Defraigne JO, Pincemail J. 2007.** Le stress oxydant et antioxydants. Mythes et réalités.
- [9] **Nookabkaew S., Rangkadilok N., Satayavivad J. 2006.** Determination of trace elements in herbal tea products and their infusions consumed in Thailand. *J Agric Food Chem*, 54:6939–6944.
- [10] **Romon M., Apfelbaum M., Dubus M. 2004.** Diététique et nutrition. 6ème Ed. Masson.
- [11] **Treffel B. 2006.** Thé. Centre de formation de la chambre de métiers et de l'artisanat du nord. Antenne de Wattignies.
- [12] **Mossion A. 2007.** Étude de la composition minérale et organique des liqueurs de thé et de leurs caractéristiques organoleptiques : Influence des paramètres physico-chimiques de l'eau-thèse de doctorat de l'université de Toulouse.
- [13] **Gramza A., Korczak J. 2005.** tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in lipid systems. *Trends Food SCI. Tech* 16, 351-358.

- [14] **Zeghad N. 2008.** Etude du contenu poly phénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus Vulgaris*, *Rosmarinusofficinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Mémoire de magister de l'université Mentouri de Constantine.
- [15] **Aubert L. 2009.** Les catéchines : entre promesses et réalité. Filière Nutrition et Diététique.
- [16] **Krieps M. 2009.** Le thé : Origine, Actualité et potentialités .Thèse de doctorat de l'université Henri Poincaré _ Nancy I.
- [17] **Marcel M. 2002.** La Rousse agricole, Ed, Mathilde Mjonel, 617-618.
- [18] **Fujihara T., Nakagawa-izumi A., Ozawa T., Numata O. 2007.** High molecular weight polyphenols from oolong tea and black tea: purification, some properties, and role in increasing mitochondrial membrane potential. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71:711–719.
- [19] **Zhu K.X., Lian C.X., Guo X.N., Peng W., Zhou H.M. 2011.** Antioxidant activities and total phenolic. Contents of various extracts from defatted wheat germ. *Food Chemistry* (126): 1122-1126.
- [20] **Marez M., Jehl B., Madet N. 2004.** L'acide ascorbique et sont utilisation entant qu'additif dans les industries alimentaires. Université Paris XII, Val de Marne: Licence IUP SIAL, 23p.
- [21] **Beltz H.D., Grosch W., Schieberle P. 2004.** Food Chemistry. 3rd Edition, Springer, 456.
- [22] Site web : [http://www.who.int/ cardiovascular_diseases](http://www.who.int/cardiovascular_diseases).
- [23] **Aiache J.M., Devissaguet J.P., Guyot-Hermann A.M. 1982.** Galenica2 : Biopharmacie, Paris : Tech et Doc.
- [24] **Senanayake N. 2013.** Green Tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications _ Are view. *Journal of functional foods* (1529-1541).
- [25] **Shargel, L. et Andrew B.C.YU. 1997.** Biopharmaceutics, in *Encyclopedia of pharmaceutical Technology*, Third Edition, p.208-227.
- [26] **Lechat P. 2006.** « Pharmacologie », université Pierre et Marie Curie.
- [27] **MacLean D.R., Petrasovits A., Nargundkar M., et coll. 1992.** Canadian Heart Health Surveys: A Profiles of cardiovascular Risk, *Can Med ASSOCJ*, 146, pp.1969- 2029.
- [28] Site web : www.fda.gov/gov/bbs/topics.html.

- [29] **Psaty B.M., Lumley T., Furberg C.D., Schellenbaum G., Pahor M., Alderman M.H., et al. 2003.** Health outcomes associated with various antihypertensive therapies used as first-line agents : a network meta-analysis. *Jama*; 289 (19): 2534-44.
- [30] Association AH. Heart and stroke Facts: 2005 Statistical Supplement. Dallas, Tx ; 2005.
- [31] **Katzung B.G. 2007.** Basic and Clinical pharmacology. Tenth Edition ed : Mc Graw-Hill Companies Inc.
- [32] **Keceli T. et Gordon M. H. 2001.** The antioxidant activity and stability of the phenolic fraction of green olives and extra virgin olive oil. *J. Sci Food Agri* (81): 21-32.
- [33] **Dale M. 1999.** The Complete Drug Référence, Pharmaceutical Presse London Thirty Second Edition, p. 822-823.
- [34] **Flynn J.T. 2004.** “ A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Amlodipine in Children with Hypertension”, *J Pediat*, vol. 145/3, p. 353-359.
- [35] **Abernethy D.R., Gutkowska J., et Lambert M.D. 1988.** Amlodipine in elderly hypertensives patients : “pharmacokinetics and pharmacodynamics”, *J Cardiovasc pharmacol*, vol. 12 (suppl.7).
- [36] **Dale M. 1999.** The Complete Drug Référence, Pharmaceutical Presse London Thirty Second Edition, p. 822-823.
- [37] **Michael J., pikal, Karen M. Dellerman. 1981.** Protocol for stability testing. *International journal of pharmaceutics* (8) 73-80.
- [38] **Fonzo-Christ C., Kuntheavy R. 2005.** Stabilité et conservation des médicaments : pharmacie des hopitaux universitaires de Genève. 2005.
- [39] B. MARCINIEC and M. OGRODOWCZYK, 2006. Thermal stability of 1, 4-dihydropyridine derivatives in solid state, *Acta Poloniae Pharmaceutica in Drug Research*, Vol. 63 No. 6 pp.477-484,
- [40] J. Bartos, *Ann. Pharm. Franc.* 22 (1964) 383-385.

Annexe 01 : Courbes d'étalonnages

1. Traçage de la courbe d'étalonnage pour l'amlodipine

➤ **Solution Standard** : 100mg/l d'amlodipine (mère)

10mg d'amlodipine sont dissous dans 100ml d'eau distillé dans une fiole de 100cm³

- Etalons : V= 10ml d'eau distillé (5tubes a essais)

Num	1	2	3	4	5
C (g/l)	1mg/l	2mg/l	3mg/l	5mg/l	10mg/l
V (ml)standr à 100 mg/l	0.1 ml	0.2 ml	0.3 ml	0.5 ml	1 ml
V (ml) ED	9.9 ml	9.8 ml	9.7ml	9.5ml	9ml
A _{max} (nm)	0.033	0.044	0.061	0.079	0.117

Avec la loi de dilution :

$$C_1V_1=C_0V_0$$

C₁=1mg/l ; V₁=10ml ; C₀=100ml ; V₀= ?

D'où : $V_0=C_1V_1 / C_0 = 1\text{mg/l} * 10\text{ml} / 100 = 0.1\text{ml}$

Donc : V₀=0.1 ml

1- Détermination de la longueur d'onde maximale de l'amlodipine :

On trace le spectre de la solution d'ETALON (5) et on cherche la longueur d'onde maximale.

A 10mg/l (5) entre 200 et 400 nm

2- Courbe d'étalonnage :

- On mesure les absorbances des étalons de 1mg/l → 10mg/l à λ_{max}
- On trace la courbe d'étalonnage pour l'amlodipine (étalon n°5)

On trouve : La longueur d'onde maximale étant 367nm avec son absorbance de 0.147

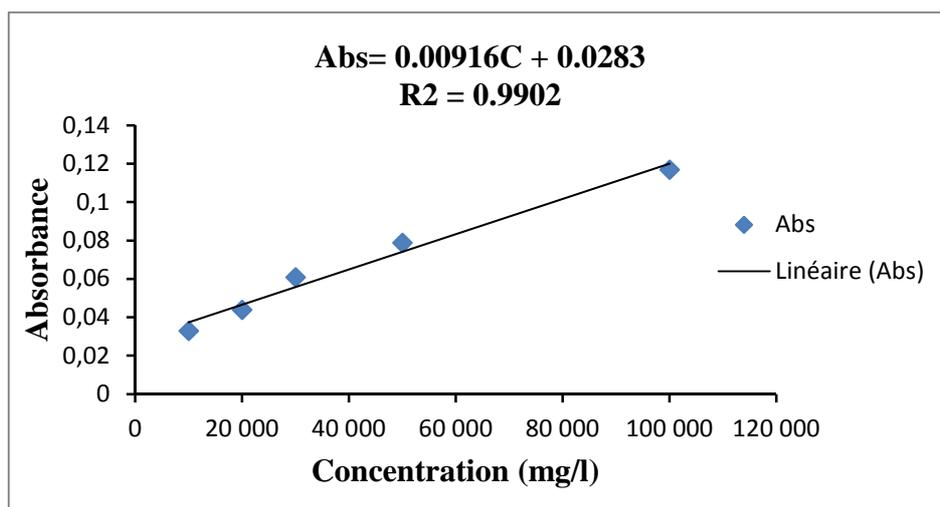


Figure (1) : Courbe d'étalonnage pour l'amlodipine

2. Traçage de la courbe d'étalonnage pour l'acide ascorbique :

- Solution standard : 100mg/l d'acide ascorbique (mère)

10mg d'acide ascorbique on les dissous dans 100ml d'eau distillé dans une fiole de 100 cm³

- Etalon V=100 ml d'eau distillé (5tube a essais)

Num	1	2	3	4	5
C (mg/l)	1	2	3	5	10
V (ml) stdr à 100mg/l	0.1	0.2	0.3	0.5	1
V (ml) ED	9.9	9.8	9.7	9.5	9
A (max)	0.142	0.205	0.239	0.410	0.675

On trace la courbe d'étalonnage pour l'étalon 5 on trouve la longueur d'onde = 264 nm

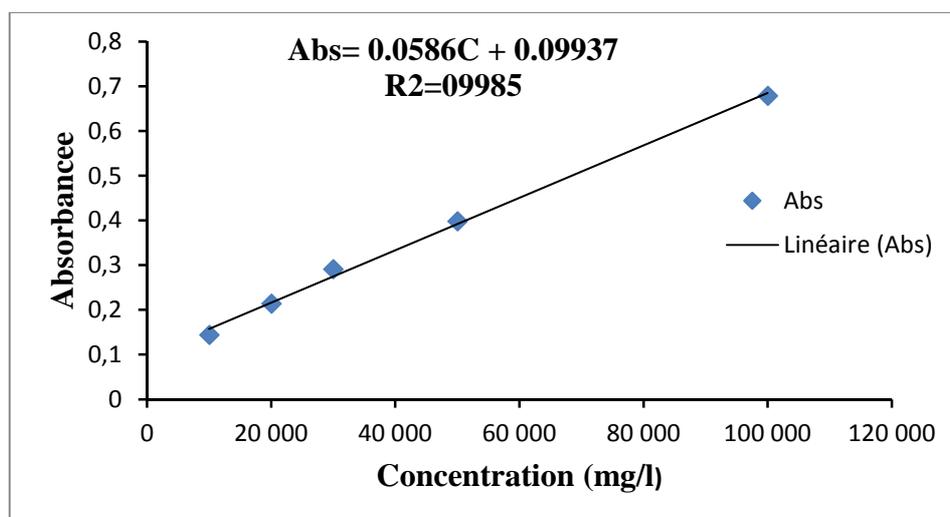


Figure (2) : Courbe d'étalonnage pour l'acide ascorbique

3. La courbe d'étalonnage de l'étalon acide ascorbique à 264nm :

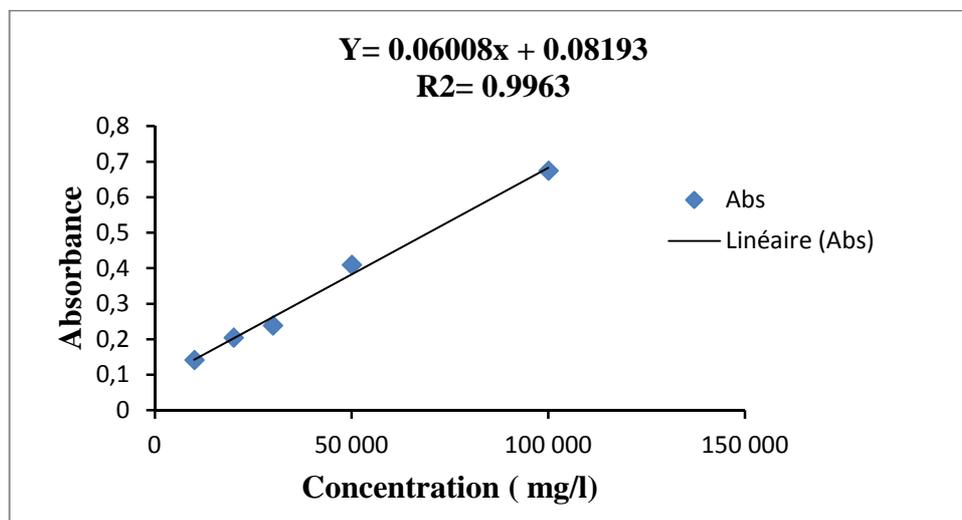


Figure (3). Courbe d'étalonnage de l'étalon acide ascorbique

Annexe 2 : les Spectres

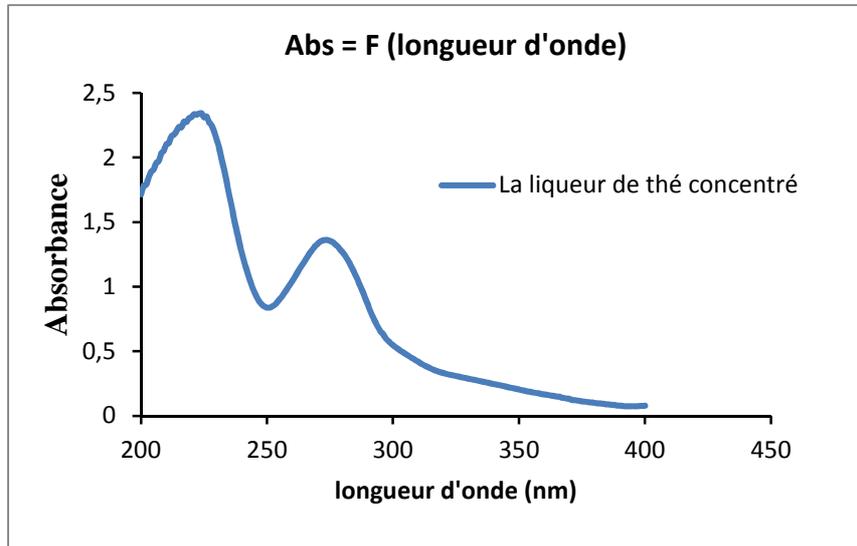


Figure II.17. Le spectre d'absorption UV-visible de la liqueur de thé vert concentré

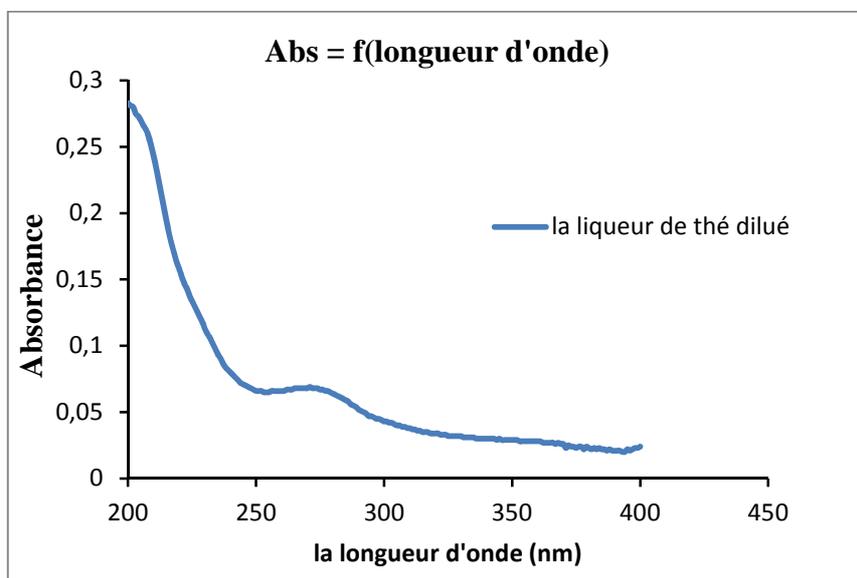


Figure II.18. Le spectre d'absorption UV-visible de la liqueur de thé vert dilué

Annexe 03 : Liste des tableaux

III.1. Stabilité de l'amlodipine sans la liqueur de thé :

Tableau III.6. Résultats des absorbances de l'amlodipine dans les conditions normales et conditions de chauffages à 37°C pour différents temps.

T (min)	to	10	20	30	60	90	120	150	180	210	240	17h	24h
A _{max} CN	0.238	0.274	0.136	0.283	0.279	0.277	1.195	0.280	0.272	0.291	0.293	0.299	0.297
A _{max} 37°C	0.180	0.211	0.130	0.216	0.174	0.211	0.225	0.258	0.238	0.238	0.343	0.314	0.302

Tableau III.7. Résultats des absorbances de l'amlodipine avec l'acide ascorbique dans les conditions normales et conditions de chauffages à 37°C pour différents temps.

T (min)	to	10	20	30	60	90	120	150	180	210	240	17h	24h
A _{max} CN	1.807	1.908	1.769	1.765	1.629	1.899	1.759	1.693	1.688	1.739	1.714	1.847	1.834
A _{max} 37°C	0.250	0.273	0.212	0.253	0.261	0.272	0.265	0.277	0.276	1.217	0.180	0.303	0.221

III.2. Stabilité de l'amlodipine avec la liqueur de thé :

Tableau III.8. Résultats des absorbances de l'amlodipine dans les conditions normales et conditions de chauffages à 37°C pour différents volumes de la liqueur de thé.

V (ml)	1	2	3	4	5	10
A _{max} CN	0.134	0.177	0.183	0.158	0.174	0.097
A _{max} 37°C	0.223	0.256	0.236	0.187	0.189	0.209

Tableau III.9. Résultats des absorbances de l'amlodipine avec l'acide ascorbique dans les conditions normales et conditions de chauffages à 37°C pour différents volumes de la liqueur de thé.

V (ml)	1	2	3	4	5	10
A _{max} CN	0.208	0.212	0.147	0.093	0.127	0.135
A _{max} 37°C	0.268	0.247	0.271	0.225	0.232	0.213

III. 3. Optimisation du temps de stabilité de l'amlodipine, dans les conditions optimales :

Tableau III.10 : Résultats des absorbances de l'amlodipine en fonction des volumes de la liqueur de thé, à différents paramètres optimaux fixés de T°, de pH et de temps critique de stabilité.

V (ml)	1	2	3	4	5	10
Abs1	0.148	0.170	0.138	0.138	0.176	0.101
Abs2	0.208	0.212	0.147	0.093	0.127	0.135
Abs3	0.223	0.256	0.236	0.187	0.189	0.209
Abs4	0.268	0.247	0.271	0.225	0.232	0.213

Tableau III.11. Résultats des absorbances de l'amlodipine aux Tc et pH fixes en fonction du volume de la liqueur de thé et pour différentes températures.

V (ml)	1	2	3	4	5	10
Abs (30°C)	0.273	0.262	0.314	0.189	0.252	0.498
Abs (37°C)	0.223	0.256	0.236	0.187	0.189	0.209
Abs (40°C)	0.293	0.294	0.322	0.324	0.296	0.311
Abs (50°C)	0.244	0.248	0.214	0.259	0.262	0.255

Tableau III.12. Résultats des absorbances de l'amlodipine avec l'acide ascorbique aux Tc et pH fixes en fonction du volume de la liqueur de thé pour différentes températures.

V (ml)	1	2	3	4	5	10
Abs (30°C)	0.216	0.162	0.223	0.201	0.204	0.211
Abs (37°C)	0.268	0.247	0.271	0.225	0.232	0.213
Abs (40°C)	0.262	0.231	0.231	0.058	0.053	0.059
Abs (50°C)	0.197	0.113	0.186	0.219	0.198	0.224
Abs CN	0.208	0.212	0.201	0.247	0.249	0.270

Tableau III.13 : Résultats des absorbances de l'amlodipine en fonction du pH de la solution de liqueur de thé.

pH	4	5	6.26	7	8
Abs1	0.178	0.172	0.498	0.132	0.118
Abs2	0.239	0.212	0.271	0.192	0.247

Tableau III.14. Absorbances de l'amlodipine dans la liqueur de thé et dans les conditions optimales fixes, en fonction du temps optimisé.

Temps optimisé (h)	0	24	48	72	96
Abs1	0.156	0.222	0.199	0.206	0.204
Abs2	0.239	0.212	0.271	0.192	0.247

III.4. Détermination de l'activité anti-radicalaire (test de DPPH) :

Tableau III.15. Résultat du test DPPH de la solution de la liqueur de thé.

Volume de thé (ml) \ Durée (heure)	0.1	1	3
1 /2 h (témoin)	2.243	2.329	2.106
1/2 h (échantillon)	2.240	2.321	2.039
17h (témoin)	2.215	2.238	
17h (échantillon)	2.208	2.225	