



**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES POUR  
L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

THÈME :

**Etude de stabilité de la vitamine C dans des comprimés effervescents de  
500mg par iodométrie.**

Présenté par :

**AMRANI Souhila  
BEDDOU Fatima Zohra**

Soutenu le  
**30/06/2022**

**Jury :**

**Président :**

Dr. BOUKLI Imene

Maitre assistante en hydro bromatologie

**Membres :**

Dr. HADJILA Amina

Maitre assistante en hydro bromatologie

Dr. NOUREDINE Zakaria Ibrahim

Maitre assistant en chimie analytique

**Encadrante :**

Dr. GHENIMI Fatima Zahra

Maitre assistante en chimie analytique

**Co-Encadrante**

Dr. FELLAH Houda

Assistante en chimie analytique

## REMERCIEMENTS

---

Louange à notre Seigneur « **ALLAH** » qui nous a doté de la merveilleuse faculté de raisonnement. Louange à notre Créateur qui nous a incité à acquérir le savoir. C'est à lui que nous adressons toute notre gratitude en premier

on voudrait exprimer notre profonde gratitude à **nos parents** pour tout l'amour qu'ils n'ont pas cessé de nous le donner.

### A notre encadrante, Dr. GHENIMI Fatima Zahra:

On tient à vous remercier, pour votre attention discrète, votre disponibilité, vos recommandations mesurées, vos précieux conseils et votre patience à la correction de ce mémoire.

### A notre co-encadrante Dr. FELLAH Houda:

On tient à vous remercier pour le temps que vous avez consacré, pour votre aide et collaboration pour élaborer ce travail. Vous nous avez éblouis par votre sympathie, votre gentillesse et votre modestie.

On tient à remercier notre présidente de jury **Dr. BOUKLI Imene** maitre assistante en hydro bromatologie , et nos jury **Dr. HADJILA Amina** maitre assistante en hydro bromatologie et **Dr. NOUREDINE Zakaria Ibrahim** maitre assistant en chimie analytique de nous avoir fait l'honneur de juger ce mémoire.

On tient à remercier les ingénieurs des laboratoires de chimie analytique, de chimie minérale, d'hydro bromatologie, de toxicologie et de gnosie pour toute l'aide que vous avez apporté lors de la réalisation de ce travail.

**Enfin, on remercie tous ceux qui ont collaboré, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.**

M<sup>lle</sup> AMRANI Souhila

M<sup>lle</sup> BEDDOU Fatima Zohra

## *Dédicace*

*C'est avec profonde gratitude et sincères mots,  
que nous dédions ce modeste travail de fin d'étude à  
nos chers parents, qui ont sacrifié leur vie pour  
notre réussite et nous ont éclairé le chemin par  
leurs conseils judicieux .*

*Nous espérons qu'un jour,  
nous pouvons leurs rendre un peu de ce qu'ils ont  
fait pour nous, que dieu leur prête bonheur et longue vie .*

*Nous dédions aussi ce travail à nos frères et sœurs,  
nos familles, nos amis,*

*tous nos professeurs qui nous ont enseigné  
et à tous ceux qui nous sont chers .*

## Table des matières

---

Remerciements :	
Dédicaces :	
Table des matières :	
Liste des abréviations :	
Liste des figures :	
Liste des tableaux :	
Introduction générale :.....	1

### Synthèse bibliographique

#### Chapitre I : L'acide ascorbique

I.1. Généralités :.....	2
I.2. Définition et structure :.....	2
I.3. Propriétés physico chimiques :.....	2
I.4. Dérivés de la vitamine C :.....	5
I.5. Besoins en Vitamine C :.....	6
I.6. Sources de la vitamine C :.....	7
I.7. Rôle physiologique de l'acide ascorbique :.....	8
I.7.1. Système immunitaire :.....	8
I.7.2. Santé cardiovasculaire :.....	9
I.7.3. Diabète :.....	9
I.7.4. Fonction neurologique :.....	10
I.7.5. Grossesse :.....	10

## Table des matières

---

I.7.6. Santé de la peau : .....	10
I.7.7. Cataracte : .....	10
I.7.8. Santé pulmonaire : .....	11
I.7.9. Propriétés anti carcinogène : .....	11
I.8. Carence en vitamine C : .....	11
I.8.1. Hypovitaminose C : .....	12
I.8.2. Scorbut : .....	12
I.9. Effets indésirables de la vitamine C : .....	13
<b>Chapitre II : Méthodes de dosage de l'acide ascorbique</b>	
II.1. Généralités : .....	14
II.2. Méthodes non citées dans les pharmacopées : .....	14
II.2.1. Méthode titrimétrique : .....	14
II.2.1.1. Principe : .....	14
II.2.1.2. Avantages de la méthode : .....	14
II.2.1.3. Inconvénients de la méthode : .....	15
II.2.1.4. Exemples de dosage : .....	15
II.2.2. Méthode électrochimique : .....	16
II.2.2.1. Principe : .....	16
II.2.2.2. Avantages de la méthode : .....	16
II.2.2.3. Les méthodes électrochimiques appliquées à la détermination de l'AA : .....	16
II.2.3. Méthode enzymatique : .....	18
II.2.3.1. Principe : .....	18

## Table des matières

---

II.2.3.2. Avantages de la méthode :.....	19
II.2.3.3. Exemples de dosage : .....	19
II.2.4. Chimiluminescence : .....	20
II.2.4.1. Principe :.....	20
II.2.4.2. Avantages de la méthode :.....	20
II.2.4.3. Exemples de dosage : .....	21
II.2.5. Méthodes spectrophotométriques :.....	21
II.2.5.1. Dans l’ultra-violet UV :.....	21
II.2.5.2. Méthodes fluométriques :.....	22
II.2.6. Les méthodes chromatographiques : .....	25
II.2.6.1. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) : .....	25
II.2.6.2. La chromatographie sur couche mince (CCM) : .....	26
II.2.6.3. Chromatographie en phase gazeuse (CPG) : .....	27
II.3. Méthodes citées dans les pharmacopées : .....	27
II.3.1. Méthode de dosage du principe actif PA : .....	27
II.3.1.1. Iodométrie : .....	27
II.3.2. Méthodes de dosage du produit fini : .....	29
II.3.2.1. Méthodes de dosages citées dans l’USP : .....	29
II.3.2.2. Méthodes de dosage citées dans la BP : .....	29
II.3.2.3. La cérimétrie : .....	30
<b>Chapitre III : Etude de stabilité</b>	
III.1. Généralités : .....	31

## Table des matières

---

III.2. Stabilité de l'acide ascorbique pure : .....	31
III.2.1. Effet de la température : .....	32
III.2.2 Effet du pH : .....	32
III.2.3. Effet de l'humidité : .....	32
III.2.4. Effet des métaux : .....	33
III.2.5. Effet de l'oxygène : .....	33
III.2.6. Effet de la lumière : .....	34
III.2.7. Effet de l'eau : .....	34
III.3. Stabilité de l'acide ascorbique sous forme de comprimé : .....	34
III.3.1. Effet de l'oxygène : .....	35
III.3.2. Effet de la température : .....	35
III.3.3 Effet du temps de stockage : .....	35
III.3.4. Effet de l'humidité : .....	36

## Partie pratique

**Parite I :** Développement et validation de la méthode de dosage de la vitamine C dans les comprimés effervescents par iodométrie.

I.1. Objectif de l'étude : .....	37
I.2. Lieu de l'étude : .....	37
I.3. Période de l'étude : .....	37
I.4. Opérateurs : .....	37
I.5. Matériels et réactifs : .....	37
I.5.1. Réactifs : .....	37

## Table des matières

---

I.5.2. Matériels : .....	38
I.6. Méthodes : .....	39
I.6.1. Type de la méthode : .....	39
I.6.2. Description de la méthode de dosage de l'AA : .....	40
I.6.3. Description de la phase de l'étalonnage : .....	40
I.6.3.1. Vérification du titre de l'iode : .....	40
I.7. Mise en œuvre de l'étude de validation : .....	41
I.7.1. Procédure de référence de validation analytique: .....	42
I.7.2. Limites de la procédure de validation : .....	43
I.7.3. Critères de validation .....	44
I.7.4. Description de la procédure de validation : .....	44
<b>Partie II : Etude de stabilité de la vitamine C par iodométrie</b>	
II.1. Objectif de l'étude : .....	46
II.2. Type de l'étude : .....	46
II.3. Lieu de l'étude : .....	46
II.4. Période de l'étude : .....	46
II.5. Opérateurs : .....	46
II.6. Matériels et réactifs : .....	46
II.6.1. Collection des échantillons : .....	46
II.6.2. Type d'échantillon/matrice : .....	47
II.6.3. Présentation : .....	47
II.7. Méthode : .....	47



## Table des matières

---

II.8. Stockage et conservation à court terme : .....	48
II.8.1. Stockage et conservation à T° ambiante : .....	48
II.8.1.1. Tube fermé : .....	48
II.8.1.2. Tube ouvert : .....	51
II.8.2. Stockage et conservation à T° basse (2°C) : .....	52
II.8.2.1. Détermination du poids moyen : .....	52
II.8.2.2. Détermination de la teneur en AA : .....	52
II.8.3. Effet de la température : .....	52
II.8.3.1. Procédure de dosage : .....	52
II.8.4. Temps de préparation : .....	53
II.8.4.1. Procédure de dosage : .....	54
<b>Chapitre III : Résultats et discussions</b>	
III.1. Résultats et discussion de la partie I : .....	55
III.1.1. Détermination de la droite d'étalonnage : .....	55
III.1.2. Etude de l'effet matrice : .....	57
III.1.3. Spécificité : .....	58
III.1.4. Répétabilité : .....	59
III.1.5. Fidélité intermédiaire : .....	60
III.2. Résultats et discussion de la partie II : .....	61
III.2.1. Résultats de la partie II : .....	61
III.2.1.1. Description des comprimés : .....	61
III.2.1.2. Normalité : .....	62

## Table des matières

---

III.2.1.3. Stockage et conservation :.....	63
III.2.1.4. Comparaison des résultats de la teneur en % d'AA des tubes fermés à température ambiante et à basse température : .....	78
III.2.1.5. Effet de la température :.....	79
III.2.1.6. Effet de la dissolution : .....	81
III.3. Discussion générale : .....	85
Conclusion et perspectives :.....	88
Références bibliographiques :	
Annexes :	
Résumé :	

## Liste des abréviations

---

**AA** : Acide ascorbique

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**AJR** : Apport journalier

**AGPI** : acides gras polyinsaturés

**AOAC** : Association des chimistes analystes officiels (Association of Official Analytical Chemists)

**BP** : Pharmacopée britannique

**CCM** : Chromatographie sur couche mince

**CL** : chimiluminescence

**Cp** : Comprimé

**CPG** : Chromatographie en phase gazeuse

**DCI** : Dénomination commune internationale

**DCIP** : 2,6-dichloroindophénol

**DHAA** : Acide déhydroascorbique

**EP** : Pharmacopée européenne

**HPLC** : Chromatographie liquide à haute performance

**IUPAC** : Union Internationale de la chimie pure et appliquée (International Union of Pure and Applied Chemistry)

**L-AA** : Acide L-ascorbique

**LC** : Chromatographie liquide

**L-DHAA** : Acide L-déhydroascorbique

**LDL** : lipoprotéines de basse densité

## Liste des abréviations

---

**MB** : Bleu de méthylène

**MWCNT** : nanotube de carbone multi-parois (Multi-Walled Carbon Nanotube)

**NAS** : National Academy of Sciences

**OMS** : Organisation Mondiale de la santé

**OPDA** : o-phenylenediamine

**PCPF** : p-carboxyphénylfluorone

**PE** : Prise d'Essai

**PM** : Poids moyen

**RH** : Humidité relative

**ROS** : Espèces réactives de l'oxygène (Reactiveoxygenspecies)

**SARS-CoV-2** :coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)

**SE** : Standard d'étalonnage

**SV** : Standard de validation

**SFSTP** :Société française des sciences et techniques pharmaceutiques

**T°** : Température

**TB** : Bleu de toluidine

**USP** : Pharmacopée américaine

**UV** : Ultra-violet

**XA** : Acide xanthurénique

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : La structure chimique de l'AA (12).....	2
<b>Figure 2</b> : La réaction de dégradation de l'AA (13).....	4
<b>Figure 3</b> : La fonction acide de l'AA (12).....	5
<b>Figure 4</b> : La fonction réductrice de l'AA (12).....	5
<b>Figure 5</b> : Représentation de l'assemblage de la procédure de titrage.....	53
<b>Figure 6</b> : La variation de volume d'I <sub>2</sub> en fonction de la prise d'essai d'AA.....	56
<b>Figure 7</b> : Variation de volume titrant en fonction de la masse d'AA.....	57
<b>Figure 8</b> : Aspect des comprimés et du broyat à la fin de l'étude.....	61
<b>Figure 9</b> : Résultats de la normalité des 06 semaines d'étude.....	62
<b>Figure 10</b> :PM des tubes fermés à température ambiante.....	64
<b>Figure 11</b> : Teneur en AA/Cp des tubes fermés à température ambiante.....	66
<b>Figure 12</b> : Teneur en AA en % des tubes fermés à température ambiante.....	67
<b>Figure 13</b> : La teneur en eau en % des tubes fermés à température ambiante.....	68
<b>Figure 14</b> : PM des tubes ouverts à température ambiante.....	70
<b>Figure 15</b> : Teneur en AA/Cp des tubes ouverts à température ambiante.....	72
<b>Figure 16</b> : Teneur en % d'AA des tubes ouverts à température ambiante.....	73
<b>Figure 17</b> : Comparaison de l'effet d'humidité des tubes ouverts et fermés à température ambiante.....	74
<b>Figure 18</b> : PM des tubes conservés à basse température.....	75
<b>Figure 19</b> : Teneur en AA/Cp des tubes conservés à température basse.....	77
<b>Figure 20</b> : Teneur e % d'AA des tubes conservés à basse température.....	78
<b>Figure 21</b> : Comparaison des teneurs en % d'AA des tubes fermés conservés à basse température et à température ambiante.....	79
<b>Figure 22</b> : Teneur en AA/Cp sous l'effet de température.....	80

## Liste des figures

---

<b>Figure 23</b> : Teneur en % en AA sous l'effet de température.....	81
<b>Figure 24</b> : Teneur en AA/Cp sous l'effet de la dissolution.....	83
<b>Figure 25</b> : Teneur en % en AA sous l'effet de la dissolution.....	85

## Liste des tableaux

---

<b>Tableau I</b> : Les propriétés physiques de l'AA (11).....	4
<b>Tableau II</b> : L'apport journalier en AA recommandé par l'OMS.....	7
<b>Tableau III</b> : Les principaux aliments contenant l'AA.....	8
<b>Tableau IV</b> : Liste des réactifs utilisés dans l'étude pratique.....	38
<b>Tableau V</b> : La validation analytique.....	43
<b>Tableau VI</b> : Le nombre d'essai pour chaque critère de validation.....	45
<b>Tableau VII</b> : Composition d'un comprimé de vitamine C.....	47
<b>Tableau VIII</b> : Résultats de la détermination de la droite de l'étalonnage.....	55
<b>Tableau IX</b> : Les valeurs de chutes de burettes moyennes obtenues pour les standards d'étalonnage avec et sans matrice.....	57
<b>Tableau X</b> : comparaison des pentes de droite d'étalonnage en présence et absence de la matrice....	58
<b>Tableau XI</b> : Résultats de test statistique de student.....	58
<b>Tableau XII</b> : Les masses calculées pour les différents niveaux de concentration.....	59
<b>Tableau XIII</b> : Les valeurs des estimateurs de la répétabilité.....	59
<b>Tableau XIV</b> : Les masses calculées pour les différents niveaux de concentration.....	60
<b>Tableau XV</b> : Les valeurs des estimateurs de la fidélité intermédiaire.....	60
<b>Tableau XVI</b> : Description des comprimés et du broyat à la fin de l'étude.....	62
<b>Tableau XVII</b> : PM des 06 semaines d'étude à température ambiante.....	63
<b>Tableau XVIII</b> : Teneur en AA/cp des tubes fermés à température ambiante.....	65
<b>Tableau XIX</b> : Conformité des tubes fermés à température ambiante.....	66

## Liste des tableaux

---

<b>Tableau XX</b> : La teneur en eau en % des tubes fermés à température ambiante.....	68
<b>Tableau XXI</b> : PM des tubes ouverts à température ambiante.....	69
<b>Tableau XXII</b> : Teneur en AA/cp des tubes ouverts à température ambiante.....	71
<b>Tableau XXIII</b> : Teneur en % d'AA des tubes ouverts à température ambiante.....	72
<b>Tableau XXIV</b> : PM des tubes conservés à basse température.....	75
<b>Tableau XXV</b> : Teneur en AA/cp des tubes conservés à basse température.....	76
<b>Tableau XXVI</b> : Teneur en % d'AA des tubes conservés à basse température.....	77
<b>Tableau XXVII</b> : Chute de burette pour l'effet de température.....	79
<b>Tableau XXVIII</b> : Teneur en AA/Cp sous l'effet de température.....	80
<b>Tableau XXIX</b> : Teneur en % en AA sous l'effet de température.....	81
<b>Tableau XXX</b> : Chute de burette de l'effet de la dissolution.....	82
<b>Tableau XXXI</b> : Teneur en AA/Cp sous l'effet de la dissolution.....	82
<b>Tableau XXXII</b> : Teneur en % en AA sous l'effet de la dissolution.....	84



# **Introduction générale**

### **I. Introduction générale :**

L'utilisation des compléments alimentaires est devenue une tendance croissante dans le monde entier. Elle peut être la résultante de plusieurs facteurs influençant : comme le recours à des nouvelles techniques de marketing (médias, publicité, etc), l'utilisation des compléments en pensant qu'ils peuvent améliorer la santé, réduire les symptômes et prévenir les maladies et c'est ce qui a été observé lors de la pandémie de Sars Covid-19 qui a pu envahir le monde entier. Parmi ces derniers la vitamine C qui a connu une fréquence de consommation considérablement accrue (1, 2).

La vitamine C à haute dose pourrait être considérée comme analogue à un antibiotique, mais elle agirait aussi bien sur les virus que sur les bactéries, et renforcerait le système immunitaire. L'acide ascorbique AA est une vitamine hydrosoluble, un piègeur de radicaux et qui joue un rôle central dans la protection des composants cellulaires contre les dommages oxydatifs causés par les radicaux libres et les oxydants (3-5).

Cependant la vitamine C est la plus fragile de toutes les vitamines : elle est sensible à l'eau, à la chaleur, à l'air et à la lumière. A température ambiante, la moitié de la teneur en vitamine C d'un aliment peut être perdue en 24 heures. Par conséquent le stockage doit être adapté de manière à limiter les pertes dû à cette instabilité (6).

Donc, quel est l'impact de ces facteurs sur la stabilité de la vitamine C ? Comment pouvons-nous vérifier cette dernière ?

Dans notre étude, nous avons deux principaux objectifs à atteindre : la vérification de la stabilité des comprimés de vitamine C effervescents de 500 mg à travers les différents facteurs environnementaux : la température et l'humidité, Ainsi le développement et la validation d'une méthode de dosage de l'AA par iodométrie, adaptée à l'analyse en routine au niveau des laboratoires.

# **Chapitre I : L'acide ascorbique**

### I.1. Généralités :

La vitamine C est chimiquement la plus simple des vitamines et pour cela elle fut parmi les premières à être isolées, caractérisées et purifiées et à avoir sa structure déterminée. En effet c'est la vitamine la plus produite industriellement que toute autres vitamines (7).

La vitamine C est présente dans les légumes et les fruits d'une façon ubiquitaire cependant elle ne couvre qu'une quantité minime de la quantité journalière nécessaire. Pour cela plusieurs préparations pharmaceutiques ont été élaborées dont les compléments alimentaires qui utilisent généralement l'acide ascorbique sous forme de sels (ascorbate de sodium , ascorbate de calcium ...), neutres ou légèrement alcalins plutôt qu'acides et qui peuvent être moins irritants pour l'estomac (4).

### I.2. Définition et structure :

La vitamine C ou l'AA (DCI : Dénomination commune internationale) qui doit son nom au scorbut, une maladie qui a pris la vie de plusieurs maritimes à l'époque (1740), c'est la conséquence d'une carence de la vitamine C. Elle est enregistrée sous le n° de CAS : [50-81-7] (8-10).

Sa Dénomination Chimique selon les règles de nomenclature d'IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) :

- (R)-5-[(S)-1, 2- dihydroxyéthyl]-3,4-dihydroxy-5H-furan-2-one. (11)

La structure chimique développée de la vitamine C est illustrée ci-après :

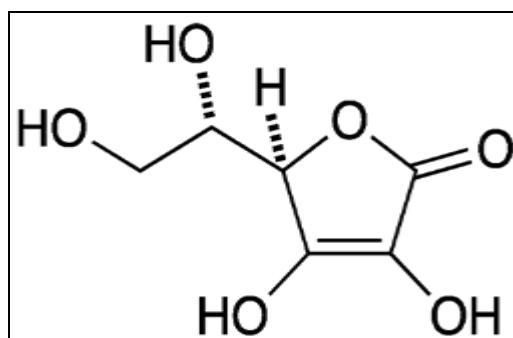


Figure 1 : La structure chimique de l'AA (12).

### I.3. Propriétés physico chimiques :

Elles figurent sur la pharmacopée européenne 10<sup>ème</sup> édition.

### ❖ *Caractère :*

L'AA se présente sous forme de poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche ou cristaux incolores se colorant par exposition à l'air et à l'humidité (10).

### ❖ *Solubilité :*

La poudre de la vitamine C est facilement soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol à 96% (10).

Cependant elle est insoluble dans l'éther, le chloroforme, le benzène, l'éther de pétrole, les huiles, les graisses et les solvants gras (11).

### ❖ *Stabilité :*

L'AA est stable à l'air une fois sec ; en préparation impure et dans de nombreux produits naturels, la vitamine s'oxyde lorsqu'elle est exposée à l'air et à la lumière (11).

Les solutions aqueuses sont rapidement oxydées par l'air, accélérées par les alcalis, le fer, le cuivre (11).

L'AA fond en se décomposant vers 190 °C (10).

### ❖ *Chiralité et pouvoir rotatoire :*

La vitamine C est un hexose issu de la cascade initiée par le D-glucose. Elle possède deux types de pouvoir rotatoire et seule la forme lévogyre est active, qui est la forme naturelle, sur le plan biologique (10).

### ❖ *Conservation :*

La poudre se conserve en récipient non métallique, à l'abri de la lumière (10).

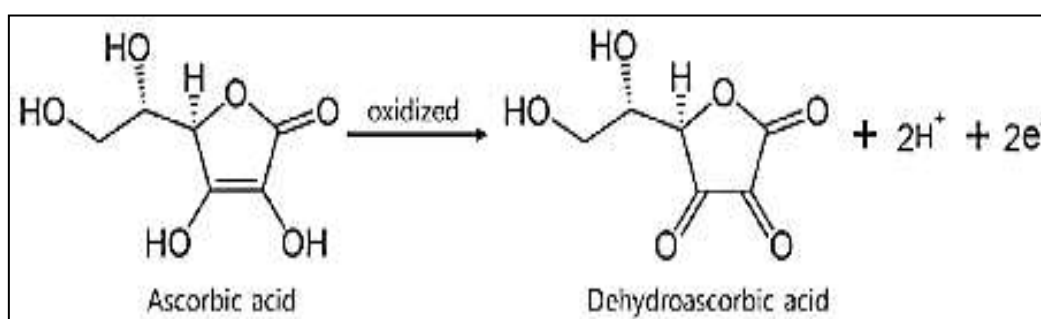
Les autres données sur les propriétés physiques de l'AA sont regroupées dans le tableau suivant :

**Tableau I :** Les propriétés physiques de l'AA (11).

<b>Masse moléculaire</b>	176 ,12 g/mol
<b>Densité</b>	1.65 g/cm <sup>3</sup> .
<b>Point d'ébullition</b>	552.67°C, 760.00 mmHg
<b>Point de fusion</b>	191 °C (se décompose).
<b>Pouvoir rotatoire</b>	[ $\alpha$ ] D/20 entre + 20,5° et + 21,5° (solution aqueuse à 10 % p/v).
<b>Constante de dissociation</b>	$Pk_1 = 4,17$ et $Pk_2 = 11,57$
<b>pH</b>	Entre 2,4 et 2,8 (solution aqueuse de 2 %)
<b>Solubilité dans l'eau</b>	333,00 g/l à 20 °C

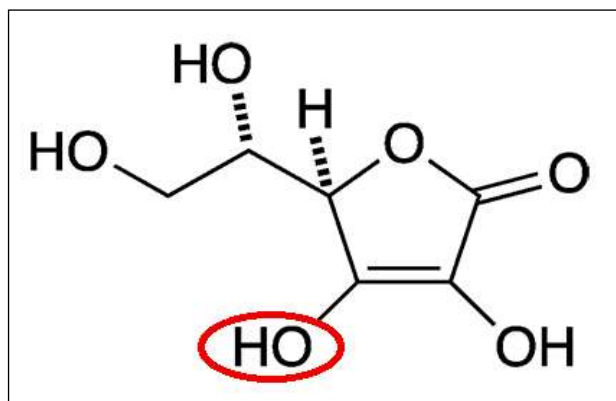
❖ *Les propriétés acides :*

L'AA est une vitamine hydrosoluble naturelle, de formule brute  $C_6H_8O_6$  ; le groupement essentiel de la vitamine C est la fonction enediol en C2 avec ses hydrogènes mobiles qui confèrent à la molécule des propriétés acides (formation de sels sodique , calcique, ...etc) (4). Son hydrolyse en solution aqueuse donne l'acide déhydroascorbique DHAA selon la réaction suivante :



**Figure 2 :** La réaction de dégradation de l'AA (13).

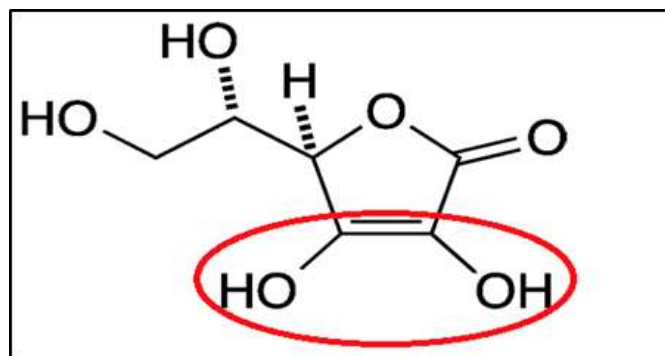
En effet, le groupement OH fixé à la double liaison en C3 (figure 3) possède une acidité comparable à celle d'un groupement carboxylique avec un pKa de 4,2 (14).



**Figure 3 :** La fonction acide de l'AA (12).

### ❖ *Les propriétés réductrices :*

La même fonction « ènediol » donne à la molécule un pouvoir réducteur et antioxydant remarquable par le biais de sa fonction hydroxyle (figure 4) (15, 16).



**Figure 4 :** La fonction réductrice de l'AA (12).

L'AA, en milieu aqueux, peut figurer sous sa forme oxydée et cela en présence de métaux, d'alcalins, d'oxygène dissous et à la lumière. Le pH, la température et la nature des métaux présent vont contrôler sa vitesse d'oxydation (17).

### **I.4. Dérivés de la vitamine C :**

L'instabilité de l'AA s'observe lorsqu'il se trouve dans un milieu aqueux, en effet sous forme ionisé, il va être oxydé ce qui va rendre la formulation plus difficile. Pour éviter ce problème, on peut effectuer une exclusion de l'oxygène durant la formulation, utiliser un

packaging imperméable à l'oxygène, manipuler avec un faible pH, ou une quantité minimale d'eau et ajouter des électrolytes et autres antioxydants (17).

On distingue deux types de dérivés de l'AA qui sont des molécules plus stables, donc plus faciles à formuler :

-Des esters liposolubles caractérisés par une couleur jaunâtre, on cite : le palmitate d'ascorbyle, le stéarate d'ascorbyle.

-Des esters hydrosolubles caractérisés par une couleur blanche comme l'AA, on mentionne : le phosphate d'ascorbyle, l'ascorbyle phosphate de magnésium, le glucoside d'ascorbyle, le glucosamine d'ascorbyle et le magnésium ascorbyl (17).

### **I.5. Besoins en Vitamine C :**

Selon la National Academy of Sciences (NAS), les besoins en vitamine C diffèrent d'un individu à un autre en fonction de : l'âge, le sexe, la prise du tabac, la grossesse et l'allaitement. Néanmoins, il est recommandé un apport journalier (AJR) de 45 à 60 mg pour un adulte et de 30 à 40 mg pour un enfant avec une dose minimale de 10 mg par jour afin d'éviter le scorbut (8).

Le tableau ci-dessous montre l'AJR recommandé par l'organisation mondiale de la santé OMS (18) :



**Tableau II :** L'apport journalier en AA recommandé par l'OMS.

Populations	AJR (mg/jr)
<i>Nourrissons et enfants</i>	
0-12 mois	25
1- 3 ans	30
4-6 ans	30
7-9 ans	35
<i>Adolescents 10-18 ans</i>	40
<i>Adultes 19–65 ans et 65+ ans</i>	45
<i>Femmes enceintes</i>	55
<i>Femmes allaitantes</i>	70

Les besoins en vitamine C sont augmentés chez les sportifs, au cours d'infections, de stress ou de fatigue physique et intellectuelle et également chez les femmes enceintes et allaitantes et les fumeurs à 100 mg (18).

### **I.6. Sources de la vitamine C :**

La vitamine C est synthétisée dans le foie de certains mammifères et dans les reins des oiseaux et des reptiles. Cependant, plusieurs espèces, dont l'être humain, les primates non humains et les cochons d'Inde sont incapables de synthétiser la vitamine C à cause de l'absence de l'enzyme responsable de l'oxydation de la L-gulonolactone (issue de glucose) en AA, qui est la L-gulolactone oxydase ; associé avec le réticulum endoplasmique membranaire et qui est déficitaire chez l'homme (8).

C'est pour cela qu'il est indispensable d'avoir un apport exogène en vitamine C qui peut être d'origine naturelle ou synthétique. L'alimentation est riche en vitamine C, elle est présente dans les fruits frais, les légumes frais, les pommes de terre, les graines germées, les organes des animaux tels que le foie et les reins, mais en faible quantité dans la viande. Parmi les

fruits : la cerise et le kiwi sont les plus abondants en vitamine C. La consommation de fruits et légumes frais à chaque repas comble les besoins journaliers en vitamine C (19). Le tableau ci-dessous montre les portions comestibles des principaux aliments contenant l'AA (19) :

**Tableau III** : Les principaux aliments contenant l'AA.

<b>Produits animaux</b>	<b>Portion comestible en mg/100 g</b>	<b>Produits végétales</b>	<b>Portion comestible en mg/100 g</b>
<b>Lait de vache</b>	0,5-2	<b>Groseille rouge</b>	20-50
<b>Lait humain</b>	3-6	<b>Groseille noire</b>	150-200
<b>Bœuf</b>	1-2	<b>Pamplemousse</b>	30-70
<b>Veau</b>	1-1,5	<b>Kiwi</b>	80-90
<b>Jambon</b>	20-25	<b>Citron</b>	40-50
<b>Foie de poulet</b>	15-20	<b>Orange</b>	30-50
<b>Rein de poulet</b>	6-8	<b>Cynorhodon</b>	250-800
<b>Cœur de poulet</b>	5	<b>Tomate</b>	10-201
<b>Gésier de poulet</b>	5-7	<b>Fraise</b>	40-70
<b>Homard</b>	3		
<b>Crevette</b>	2-4		

### **I.7. Rôle physiologique de l'acide ascorbique :**

#### **I.7.1. Système immunitaire :**

L'AA a été trouvé pour affecter la fonction immunitaire de plusieurs façons. Les cellules phagocytaires du système immunitaire produisent des oxydants lors d'infections qui peuvent jouer un certain rôle dans l'apparition de signes et de symptômes. Par conséquent, on peut s'attendre à ce que l'acide ascorbique, qui est présent à des concentrations élevées dans les phagocytes et les lymphocytes, fournisse une certaine protection antioxydante. En effet, des études ont montré que la vitamine C augmente les réponses prolifératives des

lymphocytes, est associée à une activité accrue des cellules tueuses naturelles, augmente la production d'interféron et diminue la réplication virale dans les systèmes de culture cellulaire. L'AA est impliqué dans le métabolisme de l'histamine, agissant avec  $\text{Cu}^{2+}$  pour inhiber sa libération et favoriser sa dégradation. Cet effet se traduit par des réductions des taux d'histamine endogène ainsi que l'activité d'histidine décarboxylase, une mesure de la capacité de synthèse de l'histamine (20).

La concentration d'histamine circulante est connue pour être réduite par de fortes doses de vitamine C, un fait qui a été à la base de l'utilisation thérapeutique de la vitamine pour se protéger contre le choc anaphylactique induit par l'histamine. L'AA a été prouvé son efficacité dans plusieurs infections : le rhume, *Helicobacter.pylori*, l'herpès, ainsi que la maladie de Covid 19 causée par le virus SARS-CoV-2 (20).

### **I.7.2. Santé cardiovasculaire :**

Les caractéristiques antioxydantes de l'AA lui permettent d'avoir une fonction anti-athérogène en réduisant l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL), un événement clé précoce conduisant à l'athérosclérose. Étant riches à la fois en cholestérol et en acides gras polyinsaturés (AGPI), les LDL sont sensibles à la peroxydation lipidique par l'attaque oxydative des espèces réactives de l'oxygène. Selon ce point de vue, l'athérogenèse peut être réduite en protégeant les LDL des attaques des radicaux libres. La protection complète des LDL semble impliquer à la fois l'AA et la vitamine E (20).

Il a été constaté que la pression artérielle au repos chez l'homme était inversement proportionnelle à l'apport en vitamine C ou à la concentration plasmatique d'AA. Il a été démontré que le risque d'accident vasculaire cérébral est inversement lié au statut en vitamine C. Les concentrations sériques de vitamine C  $45 \mu\text{mol/l}$  ont été associées à des réductions de 30 à 50 % du risque d'infarctus cérébral et d'accident cardio-vasculaire hémorragique (20)

### **I.7.3. Diabète :**

Les patients diabétiques et les sujets atteints du syndrome métabolique présentent généralement des concentrations sériques d'AA plus faibles que les témoins non diabétiques. En conséquence, une activité antioxydante sérique réduite a été impliquée dans la pathogenèse de la maladie. Il a été démontré que la supplémentation en vitamine C réduit la glycosylation des protéines plasmatiques ce qui pourrait jouer un rôle dans la prévention des complications du diabète. Des essais d'intervention contrôlés ont montré que la supplémentation en vitamine C peut être efficace pour réduire l'accumulation de sorbitol dans les érythrocytes et l'excrétion

urinaire d'albumine chez les diabétiques non insulino-dépendants. Il a également été démontré que le traitement à la vitamine C prévient les changements hémodynamiques artériels induits par l'hyperglycémie (20).

### **I.7.4. Fonction neurologique :**

Il a été démontré que les concentrations plasmatiques d'AA sont positivement associées aux performances de la mémoire chez les patients atteints de démence, et les performances cognitives chez les sujets âgés. Un faible statut en vitamine C est une constatation fréquente chez les patients atteints de schizophrénie chronique ou la supplémentation en vitamine C paraît bénéfique. Il a été suggéré que des conditions pathologiques peuvent augmenter l'oxydation de l'AA, dont environ 2% se retournent dans le cerveau chaque heure. Il est également possible que la supplémentation en vitamine C améliore la protection contre les effets des médiateurs inflammatoires et des radicaux libres impliqués dans la pathogenèse des maladies neurodégénératives (20).

### **I.7.5. Grossesse :**

Il a été démontré qu'un faible statut en vitamine C est associé à des risques accrus de diabète gestationnel et d'accouchement prématuré en raison d'une rupture prématurée des membranes chorioamniotiques. Ces derniers ont répondu à la supplémentation en vitamine C (20).

### **I.7.6. Santé de la peau :**

L'AA est essentiel pour la santé de l'épiderme, en raison de son rôle essentiel dans la synthèse du collagène. Des concentrations plus élevées d'AA semblent être nécessaires pour le maintien de l'intégrité de la plaie que pour le développement du collagène. L'application topique d'AA s'est avérée utile dans le traitement de la peau photo-endommagée, ainsi que des affections inflammatoires de la peau telles que l'acné et l'eczéma. Le fait que la réparation des plaies diminue généralement avec l'âge a été suggéré comme une indication des besoins croissants en vitamine C des personnes âgées (20).

### **I.7.7. Cataracte :**

On pense que les cataractes, impliquant l'opacification de la lentille oculaire, résultent des effets photo-oxydants cumulatifs de la lumière ultraviolette dont la lentille est protégée par trois antioxydants : l'AA, le tocophérol et le glutathion réduit. Le cristallin contient

généralement des concentrations relativement élevées d'AA (par exemple, jusqu'à 30 fois celles du plasma), qui sont plus faibles dans le cristallin âgé et cataracté (20).

### **I.7.8. Santé pulmonaire :**

Les propriétés redox confèrent à l'AA un rôle important dans la protection antioxydante du poumon, qui est constamment exposé à de fortes concentrations d'oxygène et de gaz toxiques inhalés. Les cellules parenchymateuses pulmonaires génèrent également des espèces réactives de l'oxygène ROS, par conséquent les patients souffrant d'asthme ou d'un syndrome de détresse respiratoire aiguë présentent généralement des concentrations d'AA inférieures à la normale dans le plasma et les leucocytes. Comme la vitamine C entre dans la synthèse du collagène elle participe ainsi à la synthèse des apoprotéines tensioactives, qui ont des domaines de type collagène qui nécessitent une hydroxylation dépendant de l'AA pour un repliement et une stabilité appropriés. Certaines études ont démontré l'efficacité de l'AA dans la prévention et la réduction des symptômes de la pneumonie (20).

### **I.7.9. Propriétés anti carcinogène :**

Certaines études épidémiologiques ont suggéré des rôles protecteurs de la vitamine C contre les cancers sur plusieurs sites. Des rapports cliniques ont indiqué que des doses élevées (10 à 60 g) peuvent être utiles pour élever l'AA plasmatique à des niveaux (20 mmol/L) capable de tuer les cellules cancéreuses in vitro. Il a été observé que l'AA réduit la liaison des carcinogènes aromatiques polycycliques à l'acide désoxyribonucléique ADN et pour retarder la formation de tumeurs. Cet effet implique l'extinction des intermédiaires radicaux du métabolisme cancérogène. L'AA est également un puissant inhibiteur de la carcinogène induite par la nitrosamine, agissant comme un piègeur de nitrite (20).

### **I.8. Carence en vitamine C :**

Une carence en vitamine C peut être causée par de faibles apports alimentaires, ainsi que par des conditions dans lesquelles les demandes métaboliques en AA peuvent dépasser le taux de sa biosynthèse endogène, augmentant ainsi le renouvellement de la vitamine dans le corps. Ces conditions comprennent le tabagisme, le stress environnemental et physique, les maladies chroniques et le diabète (21).

### **I.8.1. Hypovitaminose C :**

La carence sub-clinique est caractérisée par un taux plasmatique d'ascorbate  $<0,75$  mg/dL et un pool corporel total de vitamine C  $<600$  mg.

Il survient souvent chez les personnes âgées en tant que produit d'une diminution de l'absorption entérique et d'un renouvellement accru. Cela peut entraîner plusieurs signes et symptômes pré-scorbutiques non spécifiques : lassitude, fatigue, anorexie, faiblesse musculaire et sensibilité accrue aux infections. Les données épidémiologiques indiquent des associations significatives entre une faible concentration plasmatique d'AA et un risque accru de cardiopathie ischémique ou d'hypertension (21).

L'hypovitaminose C semble compromettre l'activité du cholestérol 7- $\alpha$ -hydroxylase, l'étape limitant la vitesse de conversion du cholestérol en acides biliaires. Des études ont montrés une relation inverse cohérente entre l'AA sérique et l'incidence des calculs biliaires, l'utilisation de suppléments de vitamine C étant indépendamment associée à une prévalence de la maladie de 34 % inférieure (21).

### **I.8.2. Scorbut :**

Une carence alimentaire aiguë en vitamine C se manifeste par divers signes du syndrome appelé scorbut. Le signe clinique dominant est un temps de cicatrisation prolongé en raison de la diminution des taux de synthèse de collagène ainsi que de leur sensibilité accrue aux infections. Le scorbut classique se manifeste chez l'adulte après 60 à 90 jours d'arrêt de la consommation de vitamine C, bien que d'autres signes puissent être présents. Le scorbut se présente lorsque le pool corporel total de vitamine C est réduit à  $<300$  mg par rapport à son niveau normal de  $\sim 1500$ mg. À ce niveau bas, les patients présentent des taux plasmatiques en AA de 0,13 à 0,25 mg/dL (les taux normaux sont de 0,8 à 1,4mg/dL) (21).

Les signes de la maladie surviennent principalement dans les tissus mésenchymateux. Les défauts de formation du collagène se manifestent par une hémorragie (dans la peau, les muqueuses, les organes internes et les muscles), un œdème, une cicatrisation altérée et affaiblissement des structures collagènes dans les os, le cartilage, les dents et les tissus conjonctifs. Les adultes scorbutiques peuvent présenter des gencives enflées et saignantes avec perte de dents ; cette condition peut signifier une maladie parodontale associée. Ils montrent également de la léthargie, de la fatigue, des douleurs rhumatismales dans les jambes, une atrophie musculaire, des lésions cutanées. Ces caractéristiques s'accompagnent

fréquemment de changements psychologiques : hystérie, hypocondrie et dépression. Des études expérimentales sur la privation de vitamine C menées dans les années 1950 et 1960 ont indiqué que la dose quotidienne minimale de vitamine C qui préviendrait ces signes était  $\leq 10\text{mg}$  (21).

### **I.9. Effets indésirables de la vitamine C :**

Aucun effet indésirable significatif de l'AA, de ses différents sels et esters, n'a été identifié. Des doses élevées de la vitamine C ont été utilisées à la fois par voie orale et intraveineuse sans incident.(21)

Cependant, des apports de 2 à 3 g/jour de vitamine C produisent des troubles gastro-intestinaux de type diarrhée désagréable due aux effets osmotiques de la vitamine non absorbée dans la lumière intestinale chez la plupart des gens. Ces troubles peuvent survenir après l'ingestion d'une quantité aussi faible que 1 g, car environ la moitié de cette quantité ne serait pas absorbée à cette dose. L'oxalate est un produit final du catabolisme de l'ascorbate et joue un rôle important dans la formation de calculs rénaux. Des quantités quotidiennes excessives de vitamine C produisent une hyperoxalurie. Cependant, le risque de formation de calculs d'oxalate peut devenir important avec des apports élevés en vitamine C (>1 g), en particulier chez les sujets présentant des quantités élevées de calcium urinaire tel le cas de calculs rénaux (18).

La vitamine C peut précipiter l'hémolyse chez certaines personnes, y compris celles présentant un déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase, hémoglobinurie paroxystique nocturne, ou d'autres conditions où un risque accru d'hémolyse des globules rouges peut survenir où la protection contre l'élimination des produits du métabolisme du fer peut être altérée, comme chez les personnes présentant le phénotype haptoglobine Hp2-2 (18).

# **Chapitre II : Méthodes de dosage de l'acide ascorbique**



### **II.1. Généralités :**

L'analyse de l'acide L-ascorbique L-AA sous ses diverses formes présente de nombreuses difficultés et, encore aujourd'hui, il n'existe pas de méthode d'analyse universelle et routinière exempte d'interférences. Toute procédure doit faire la distinction entre L-AA et ses divers produits d'oxydation. Elle doit également être censée de doser l'AA et ces produits d'oxydation simultanément avec un minimum de préparation d'échantillon et d'interférence des autres espèces présentes. Grâce au comportement redox de l'AA, de nombreuses procédures analytiques ont pu être développées. D'autres méthodes ont impliqué la détermination de la vitamine C totale sous les formes oxydées et réduites. (7)

Parmi les méthodes analytiques qui ont été mentionnées dans la littérature, pour la détermination des teneurs en AA : la titrimétrie, l'électrochimie, la fluorimétrie, la chimiluminescence, la chromatographie en phase gazeuse (CPG), la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et la spectrophotométrie. (22)

### **II.2. Méthodes non citées dans les pharmacopées :**

#### **II.2.1. Méthode titrimétrique :**

##### **II.2.1.1. Principe :**

Elle appartient aux méthodes citées dans les références AOAC (Association of Official Analytical Chemists) ; Le titrage du 2,6-dichloroindophénol (DCIP) est une méthode établie pour déterminer la teneur en L-AA. Le DCIP fonctionne sur le principe de la réduction L-AA en une solution incolore à partir du bleu foncé caractérisant l'indicateur coloré oxydé. (23)

Par la suite, le L-AA est oxydé en acide L-déhydroascorbique L-DHAA et l'excès de l'indicateur donne naissance à la couleur rose de la solution (le DCIP devient rose en milieu acide), formant un point de virage visible indiquant la fin de la réaction. (23)

##### **II.2.1.2. Avantages de la méthode :**

Parmi les avantages de la méthode titrimétrique dans le dosage de l'AA :

- Une méthode rapide, précise et peu coûteuse. (26)

- Elle peut être miniaturisée pour une analyse spectrométrique par absorbance sur microplaques à 505 nm. (26)

### II.2.1.3. Inconvénients de la méthode :

- Le titrage du DCIP convient aux préparations pharmaceutiques qui ne contiennent pas de quantités significatives d'ions de Fe (II), Sn (II), Cu (I), SO<sub>2</sub>, SO<sub>3</sub> et S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> qui sont généralement associés à des préparations multivitaminées. L'applicabilité de la méthode est limitée uniquement aux comprimés multivitaminés qui ne contiennent pas de minéraux. (24)
- Le titrage est limité à la quantification de L-AA uniquement. Le L-DHAA ne peut pas être mesuré, à moins qu'il doit être d'abord réduit à L-AA. (23)
- Une spécificité pauvre. (25)
- Un indicateur instable. (25)
- De plus, il a été découvert que le DCIP oxyde les thiols. Par conséquent, un agent oxydant doux comme le DCIP avec un potentiel redox de +0,217 ou tout autre agent oxydant n'a pas pu être utilisé pour le dosage de l'AA en présence de thiols. (24)

### II.2.1.4. Exemples de dosage :

Tillmans et al sont les premiers a rapporté l'analyse de l'AA en 1932 par le DCIP à 518nm. Ensuite, Hoffman et al ont automatisé la méthode pour l'utiliser au dosage de l'AA dans les jus d'orange et de pamplemousse. (25)

D'autres réactifs comme : la variamine bleue, tétrachlorure de carbon ou le chloroforme ont été utilisé par Murty et Rao ; ces derniers ont proposé le naphtol bleue noir, amaranthe ou le 5R ponceau brillant comme indicateur alternatif. (27)

Seetharampa et Shubha ont proposé une méthode titrimétrique basée sur l'oxydation de l'AA avec le pyridinium chlorochromate. (27)

Une version automatisée était introduite par Egberg et ses collègues pour le dosage des céréales et des boissons enrichies. (25)

Hiromi et ses collègues ont travaillé sur l'amélioration de la limite de détection de la méthode. (25)

Zannoni et ses collaborateurs ont révélé une méthode qui mis en évidence de l'AA dans des échantillons de plasma et des tissus. (25)

Okamura a proposé une procédure afin de pouvoir déterminer l'AA et le DHAA simultanément. (25)

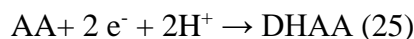
Llyod et al ont développé une méthode d'analyse d'AA présent dans les plaquettes par le 2,4,6-tripyridyl-S-triazine. (25)

### **II.2.2. Méthode électrochimique :**

#### **II.2.2.1. Principe :**

La détermination de la L-AA par électrochimie est due à l'électro-oxydation de la L-AA en L-DHAA. (23)

L'électro-oxydation de l'AA à une électrode suit un mécanisme irréversible, impliquant la perte de  $2 e^-$  et  $2 H^+$  pour former le DHAA. (25)



L'oxydation de l'AA est interprétée sur la base d'un mécanisme impliquant une réaction électrode réversible suivie par la conversion irréversible d'un intermédiaire instable en DHAA stable. (28)

#### **II.2.2.2. Avantages de la méthode :**

- Les techniques électrochimiques sont considérablement utilisées pour la L-AA en raison de leur sensibilité, leur réponse rapide, leur fonctionnement simple et de leur faible coût. (24)
- Étant donné que le prétraitement de l'échantillon (extraction) ne nécessite que des exigences minimales, ces techniques sont souvent préférées aux méthodes instrumentales laborieuses pour la détermination de la L-AA, qui permettent d'obtenir des résultats dans des milieux complexes. (24)

#### **II.2.2.3. Les méthodes électrochimiques appliquées à la détermination de l'AA :**

##### **II.2.2.3.1. La polarographie :**

L'analyse polarographique est basée sur les courbes de tension de courant et l'AA étant un électrolyte réductible. (29)

Dans la polarographie, l'AA est dissous dans une solution de base contenant un excès d'un électrolyte support (l'acétate ou du citrate (pH de 4,5 à 4,6), le phosphate et les solutions tampons universelles (pH de 2,2 à 7,0)) et il est placé dans une cellule électrolytique spéciale, qui comporte une anode à mercure plongeante à raison d'une goutte toutes les 2 à 4 secondes. Quand une tension progressivement croissante est appliquée à la cellule et que le courant correspondant est mesuré sur un galvanomètre, il est possible de déterminer, à partir de la courbe courant-tension obtenue, la concentration de l'AA. (27)

Dans des conditions standards, le courant de diffusion est proportionnel à la concentration de l'AA. (30)

Les courbes courant-tension, ou polarogrammes, peuvent être tracées manuellement ou enregistrées, soit photographiquement, soit au moyen d'un enregistreur à stylo. Un instrument d'enregistrement est recommandé pour les recherches pharmaceutiques. (30)

L'interférence des réducteurs nécessite un prétraitement de l'échantillon avec le formaldéhyde. (27)

### **II.2.2.3.1.1. Avantages :**

Les principaux avantages associés à cette méthode sont sa spécificité, sa rapidité relative, et son applicabilité aux solutions très colorées. Elle est sensible à de petites quantités d'électrolyte et elle nécessite pas de coloration. (29, 31)

### **II.2.2.3.1.2. Inconvénients :**

Elle présente la limite de son incapacité à déterminer la forme totale de l'AA. (31)

### **II.2.2.3.2. La voltammétrie :**

L'analyse voltampérométrique avec ces différentes électrodes (électrodes conventionnelles, électrodes à microdisque, électrodes à microbande et à microbande multiple et électrodes à pâte de carbone) a été utilisée pour la détermination de la vitamine C.

#### **II.2.2.3.2.1. Avantages de la méthode :**

- La voltampérométrie est une méthode peu coûteuse, modeste et rapide. Cette technique est également réputée pour ses faibles limites de détection. (32)

- La méthode voltammétrique peut être couplée à la titrimétrie. (27)

### **II.2.3.2.2. Inconvénients de la méthode :**

- La fiabilité de l'applicabilité générale des électrodes diminue avec l'usage répété à cause de l'encrassement de l'électrode par les produits d'oxydation. (24)

- Le L-AA étant l'un des biomolécules les plus électroactives, il est difficile de déterminer sa concentration sur des électrodes en carbone non modifié ou en métal nu, en raison de l'apparition de réactions de surface. (23)

### **II.2.3.2.3. Exemples de dosage :**

- Pournaghi-Azar a rapporté l'analyse de préparations pharmaceutiques impliquant l'oxydation électrocatalytique de l'AA dans des solutions homogènes en utilisant l'acide ferricinium carboxylique électrogénéré comme médiateur. (24)

- La technique de voltammétrie cyclique a été utilisée pour la détermination de l'AA à la surface d'une électrode en carbone vitreux modifiée par un mélange de diborure de magnésium  $MgB_2$  et de nanotube de carbone multi-parois (Multi-Walled Carbon Nanotube) MWCNT, montrant une bonne reproductibilité et un bon taux de récupération de l'AA dans les échantillons de fruits tropical. (32)

- L'analyse voltampérométrique/ampérométrique utilisant différentes électrodes (par exemple, des électrodes métalliques ou carbonées modifiées et des composites de nanoparticules et de céramique avec des capteurs chimiques et biochimiques appropriés) a été développée. Les électrodes de carbone vitreux et de pâte de carbone, l'électrode de platine et l'électrode de mercure à goutte suspendue ont été utilisées pour la détermination de la L-AA. (23)

## **II.2.3. Méthode enzymatique :**

### **II.2.3.1. Principe :**

L'AA peut être aussi déterminé par les méthodes enzymatiques, l'enzyme responsable de l'oxydation de ce dernier est principalement l'acide ascorbique oxydase, isolée à partir du matériel végétal. (25)

En revanche, peu de méthodes pratiquées pour la détermination de l'ascorbate ont été rapportées, car l'enzyme n'était pas disponible dans le commerce. Lee et Dawson ont présenté

un rapport approfondi sur l'isolement et la caractérisation de l'ascorbate oxydase. (25)

### II.2.3.2. Avantages de la méthode :

- Les composés endogènes présents dans les échantillons biologiques n'interfèrent pas. (25)
- La déprotéinisation des échantillons n'est pas nécessaire. (25)
- La procédure est terminée en 25 minutes avec un équipement de laboratoire clinique de routine. (25)

### II.2.3.3. Exemples de dosage :

- Une procédure enzymatique est basée sur la différence d'absorbance avant et après incubation et est utilisée pour la quantification de l'AA dans les jus de fruits (aliments d'origine végétale en général). La réponse de la méthode était linéaire. Cette procédure est applicable aussi aux aliments d'origine animale et les paramètres expérimentaux optimaux pour l'application de cette procédure aux deux genres d'aliments sont : un pH de 5,5 pour la sensibilité et la stabilité enzymatique et une incubation de 30 min à 30°C. Cette procédure a donné des résultats comparables à ceux utilisant le 2,6-dichloroindophénol ou la 2,4-dinitrophénylhydrazine. (25)
- Roe et Bruemmer ont aussi décrit une autre procédure pour la détermination de l'AA présent dans les jus de fruits en utilisant l'enzyme peroxydase de raifort. Cette procédure cinétique est basée sur le temps de latence produit entre l'AA, la phénylènediamine et la peroxydase de raifort. Dans cette procédure, l'enzyme convertit *p*- phénylènediamine à sa forme oxydée colorée. L'AA réagit rapidement avec la forme oxydée, la reconvertissant en phénylènediamine. Le temps nécessaire à la production d'une couleur stable est proportionnel à la quantité initiale d'AA. Cette méthode a été appliquée avec succès à l'assurance qualité pour la conformité de l'étiquetage des jus de fruits. (25)
- Liu et ses collègues ont utilisé l'AA oxydase disponible dans le commerce pour développer une méthode appropriée pour les échantillons cliniques de sérum ou de plasma. Dans cette procédure, l'AA est spécifiquement quantifié en traitant l'un d'une paire d'échantillons répétés avec l'enzyme AA peroxydase. Les deux échantillons sont mis à réagir avec du Fe (III) et le réactif complexométrique 2, 4,6-tris (2 pyridyl) -S-triazine. La différence d'absorbance (à 593 nm) de ces échantillons est proportionnelle à la concentration d'AA d'origine. La méthode

était linéaire et avait une bonne précision. (25)

### **II.2.4. Chimiluminescence :**

#### **II.2.4.1. Principe :**

La chimiluminescence (CL) est une bonne méthode de détermination d'AA qui a comme objectif d'étudier l'oxydation de l'AA en présence d'oxygène photosensibilisé par le bleu de toluidine (TB). Les produits de cette réaction photochimique réagissent rapidement avec la lucigénine pour donner une très forte intensité qui peut être facilement utilisée pour la détermination sensible de l'AA dans un système d'injection de flux.

Le taux de photooxydation de l'AA sensibilisé par la TB dépend du pH. Le taux de réaction dans l'intervalle de pH de 2,8 à 3,4 a donné des valeurs presque constantes, mais fortement diminuées en dehors de cet intervalle ; un pH de 3,0 obtenu avec un tampon phosphate a été choisi pour les expériences ultérieures.

La lucigénine (nitrate de N,N'-diméthylodiacridinium) (Luc) est un réactif CL populaire et est utilisé pour générer du CL lorsqu'il est attaqué par de nombreux nucléophiles et agents réducteurs. L'émission verte est due à l'émetteur primaire, la N-méthylacridone à l'état excité, qui émet à environ 420 à 500 nm avec un maximum à environ 440 nm. (33)

Les méthodes CL sont basées sur les réactifs lucigénine et luminol. La réaction AA-lucigénine CL donne un signal très fort, mais l'intensité CL pour la DHAA est plus élevée.

#### **II.2.4.2. Avantages de la méthode :**

- La précision de la méthode a été illustrée par les résultats obtenus dans l'analyse de diverses préparations pharmaceutiques, jus de fruits, légumes et boissons non alcoolisées. Cette procédure convient également à l'analyse clinique. (26, 33)
- Cette méthode est applicable seulement pour les échantillons de petites tailles. (33)
- Les techniques sont potentiellement très sensibles mais nécessitent l'utilisation d'un spectrophotomètre modifié pour faire des mesures. (24)

- Le manque de sélectivité limite leur application directe aux analyses d'échantillons réels. (24)

### **II.2.4.3. Exemples de dosage :**

Une procédure discontinue basée sur le couplage des deux méthodes enzymatiques et CL a été proposé par Sato et al après exploitation de ce phénomène pour déterminer l'AA ; cette dernière consiste à mesurer la différence entre les intensités CL de l'AA et de la DHAA après la réaction enzymatique avec l'ascorbate oxydase. (33)

Perez et Ruiz ont proposé une autre méthode CL d'injection de flux basée sur la photo oxydation sensibilisée de l'acide ascorbique. (24)

### **II.2.5. Méthodes spectrophotométriques :**

#### **II.2.5.1. Dans l'ultra-violet UV :**

En raison de la capacité d'absorption de l'AA dans l'UV et dont l'absorption maximale à pH 2 est vers une longueur d'onde de 245 nm, et à pH 6,4 est vers une longueur d'onde de 265 nm, le dosage de l'AA a pu être réalisé. (11)

##### **II.2.5.1.1. Principe :**

Le principe de cette méthode consiste à mesurer l'absorbance de la vitamine c en UV par la réduction du fer (III) en mesurant le fer réduit (II) par sa complexation avec la 1,10-phénanthroline. (24)

##### **II.2.5.1.2. Avantages de la méthode :**

- Elle est utilisée pour l'analyse des formulations médicamenteuses et des jus de fruits frais. (24)
- L'acide chlorhydrique ne présente pas d'interférence avec l'AA. (34)
- L'équipement et le solvant sont accessibles pour la majorité des laboratoires. (34)
- Cette méthode est rapide, simple, sélective, sensible, exact, précise, reproductible, robuste et économique. (34)
- Cette méthode est recommandée pour le contrôle analytique de routine que ce soit pour la matière première ou le produit fini. (34)



### II.2.5.1.3. Exemples de dosage :

Une méthode de dosage direct a été proposée par Selimović et al, avec l'oxalate de sodium comme stabilisateur de l'AA. Les propriétés d'absorption de L-AA dépendent du pH du milieu aqueux. Au-dessus de pH 5, L-AA existe principalement sous forme de mono-anion et présente une absorption maximale à 265 nm. Une autre forme non dissociée, se trouve à des niveaux de pH plus acides, l'absorption maximale se situe autour de 245 nm. (35)

Puisque l'absorbance maximale dépend du pH, la solution tampon dihydrogénophosphate de potassium-disodium disodique (pH = 5,4) a été utilisée. Les solutions d'AA restent stables pendant au moins 30 minutes à température ambiante. (35)

- Une méthode spectrophotométrique simple et très sensible pour la détermination de l'AA a été établie en utilisant du fer (III) et de la p-carboxyphénylfluorone (PCPF) dans un milieu micellaire tensioactif cationique. (24)

La procédure a été appliquée avec succès au dosage de l'AA dans les préparations pharmaceutiques. Il a été suggéré que le complexe coloré produit était un mélange du complexe fer (II)-PCPF et du complexe DHAA-fer (III)-PCPF. (24)

- Pandey a proposé une autre méthode spectrophotométrique pour doser l'AA à 336 nm, via une diminution de l'absorbance de la tétrachlorobenzoquinone (chloranil)  $7.10^{-4}$  M dans 80 % acétone-eau (v/v) à température ambiante. La méthode proposée a été appliquée avec succès à des préparations pharmaceutiques. Les agents réducteurs puissants, y compris la plupart des thiols et la sérine, la glycine, l'alanine, les acides citriques, oxaliques, tartriques, le glucose, le saccharose et le maltose n'interfèrent pas, même lorsqu'ils sont présents jusqu'à un excès molaire de  $10^{-15}$  M de vitamine C. D'où la résolution des mélanges de la vitamine C et les thiols est possible. (24)

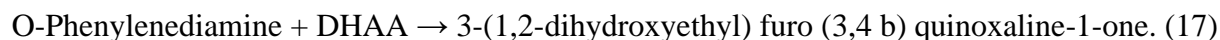
### II.2.5.2. Méthodes fluorimétriques :

#### II.2.5.2.1. Principe :

Le dosage de la vitamine C est basé sur la méthode de Mike J. Deutsch et Cora E. Weeks. C'est l'une des méthodes les plus classiques qui se base sur la fluorescence de l'AA qui nécessite une oxydation préalable de ce dernier en DHAA par un agent oxydant, qui est le Norit (charbon actif), ensuite le DHAA est condensé avec le o-phenylenediamine (OPDA) qui

va donner un dérivé quinoxaline fluorescent jaune vif dont le spectre d'adsorption est situé entre  $\lambda_{Ex} = 350$  nm et  $\lambda_{Em} = 430$  nm. (36)

La réaction de formation du composé fluorescent est la suivante :



Le blanc est préparé en complexifiant la vitamine oxydée avec de l'acide borique afin d'éviter la formation du dérivé de quinoxaline. Il est utilisé pour révéler toute fluorescence due à des substances interférentes. (37)

### II.2.5.2.2. Avantages de la méthode :

- Cette méthode montre une bonne sélectivité et sensibilité avec une faible limite de détection de  $2\mu\text{g/ml}$ . (38)

### II.2.5.2.3. Inconvénients de la méthode :

- L'instabilité du réactif pendant le temps de réaction long (35 min pour obtenir l'équilibre) est un inconvénient majeur, qui peut causer une mauvaise reproductibilité. (39)

### II.2.5.2.4. Exemples du dosage :

Pour pallier à l'instabilité de l'OPDA, plusieurs modifications sont faites par de nombreux chercheurs :

- La méthode manuelle de l'OPDA a été automatisée sur un Technicon Auto Analyzer en remplaçant l'étape d'oxydation du Norit par des réactifs redox.

Ensuite Egberg et al ont développé une version semi-automatique. Cette méthode implique une étape manuelle d'oxydation du Norit avant l'introduction de l'échantillon dans un Auto Analyzer pour résoudre les problèmes d'interférence dus aux composés naturellement fluorescents ou pour éviter la production d'espèces fluorescentes par l'oxydation des composants de l'échantillon. (39)

D'autres méthodes ont été élaborées :

- J. Yang a proposé une méthode cinétique qui est plus simple en utilisant 2 cyanoacétamide, qui en présence de l'AA forme un composé fluorescent. L'intensité de fluorescence a été

mesurée à différentes longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 329 à 380 nm respectivement. Cette méthode offre l'avantage de minimiser les étapes car l'échantillon ne nécessite pas un prétraitement ainsi qu'elle est beaucoup plus simple et plus sensible que les autres méthodes fluorimétriques, en outre elle a une limite de détection de 0.03µg/ml. Cette méthode a été utilisée pour doser l'AA dans les urines et les comprimés de la vitamine C. (38)

- Feng a aussi développée une méthode cinétique qui repose sur l'effet activateur de l'AA sur l'oxydation de la rhodamine 6G par le bromate de potassium en présence de vanadium(V) qui joue le rôle d'un catalyseur. La méthode est simple, rapide, sensible et sélectif. Sa limite de détection est de 0,62 ng/ml, ce qui est inférieur à celui de toute autre méthode signalée dans la littérature. Cette méthode a été utilisée pour déterminer l'AA dans les produits pharmaceutiques. (40)

- Lin a décrit une méthode simple et rapide visant à quantifier l'AA dans les préparations pharmaceutiques. Le principe de la méthode est basé sur l'observation de la fluorescence générée par l'acide xanthurénique (XA) et dont ce dernier peut être atténué proportionnellement par l'AA d'une manière dépendante de la concentration. (24)

-Yusuf et Gurel ont élaboré une méthode dont la procédure est basée sur la réaction entre l'AA et le bleu de méthylène (MB). Le bleu de méthylène comme il fait partie des colorants thiaziniques, il génère une fluorescence bleu intense.

L'intensité de cette dernière est mesurée à l'excitation et l'émission de 664 et 682 nm, respectivement. La concentration de MB diminue en fonction de la diminution de l'intensité de fluorescence due à la formation de la forme incolore de MB (Leuco-MB) dans la réaction entre AA et MB. Une relation linéaire va être obtenue entre l'intensité de fluorescence décroissante et la concentration d'AA. La limite de détection est de  $2,5 \cdot 10^{-7}$  mol/L. La méthode proposée a été appliquée avec succès pour la détermination de l'AA dans les comprimés de vitamine C. (41)

#### **II.2.5.2.4. Avantages de la méthode :**

En raison de la stabilité du XA dans le tampon d'acide phosphate de potassium, une grande réserve de réactif peut être préparée et entreposée pour une utilisation à long terme.

En comparaison avec d'autres méthodes. Cette procédure est considérablement plus rapide et plus simple, car le nombre d'étapes de la procédure est réduit au minimum et, par conséquent, le temps de rotation devrait être considérablement amélioré. (24)

### **II.2.6. Les méthodes chromatographiques :**

Etant donné que de nombreuses méthodes spectroscopiques et électrochimiques, qui ont été discutées, ne peuvent pas distinguer l'AA, le DHAA, ou d'autres composés oxydables, il n'est pas rare que des méthodes de séparation aient été utilisées pour augmenter la sélectivité. (27)

#### **II.2.6.1. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) :**

##### **II.2.6.1.1. Principe :**

De nombreux procédés de la chromatographie liquide LC utilisant des colonnes comportant des résines échangeuses d'anions. Ces méthodes utilisent de l'acétate de sodium ou un tampon acétate dilué ou une solution de dihydrogénophosphate de sodium  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  comme phase mobile avec des dispositifs de détection comprenant une détection électrochimique, CL (chimiluminescence), ampérométrie ou UV à 254 ou 265 nm. L'utilité de ces méthodes a été testée pour la détermination de la vitamine C dans des comprimés. (27)

L'utilisation de la LC en phase inversée pour la détermination de l'AA avec détection UV dans la gamme 220-260 nm a été rapportée par plusieurs chercheurs. Des échantillons tels que des préparations pharmaceutiques, des vitamines, ont été analysés par cette technique en utilisant comme éluant du dihydrogénophosphate d'ammonium, de l'acide pentane sulfonique 10mM, du salicylate d'octylaminium, du méthanol-eau ou de l'acide métaphosphorique à 1%. (27)

##### **II.2.6.1.2. Avantages de la méthode :**

- Les méthodes LC sont suffisamment sensibles pour mesurer de très petites quantités de la vitamine.
- La rapidité souhaitable de ces méthodes fait généralement défaut. Cependant, l'automatisation de ces méthodes permet d'éviter un temps excessif pour l'opérateur. (27)

### II.2.6.1.3. Exemples de dosage :

- La première séparation qualitative de l'AA de l'DHAA a été reportée par Partridge ; qui a utilisé le nitrate d'argent  $\text{AgNO}_3$  ammoniacal à froid pour figurer la zone chromatographique. Le DHAA a été révéler après chauffage.
- Mapson et Partridge ont décrit une autre méthode pour la séparation de l'AA de l'DHAA en utilisant de papier filtre Whatman n°1 avec un solvant de développement acidifié le cyanure de potassium KCN.
- D'autre part Mitchell et Patterson ont reporté une méthode d'excrétion de l'AA des urines. (25)

### II.2.6.2. La chromatographie sur couche mince (CCM) :

Elle s'est avérée plus utile que la chromatographie sur papier pour la quantification de l'AA. (25)

#### II.2.6.2.1. Avantages de la méthode :

- Une sensibilité et une résolution accrues.
- La possibilité d'exécuter plusieurs chromatogrammes en parallèle.
- La possibilité d'utiliser la détection densitométrique et fluorimétrique. (25)

#### II.2.6.2.2. Exemples de dosage :

- Saari et ses collègues ont étudié l'oxydation de l'AA en utilisant un composé marqué au  $\text{C}^{*14}$  et une détection densitométrique et radio-autographique. Le système de séparation a permis de séparer l'AA et le DHAA, ainsi qu'un autre composé présumé être l'acide 2,3-dicétogulonique. Une méthode de détection densitométrique a également été utilisée pour mesurer l'AA dans les formulations du sirop pharmaceutique. (25)
- Lyle et Tehrani ont proposé une autre méthode de chromatographie sur couche mince qui implique la pyrolyse des zones de couche mince directement dans un chromatographe en phase gazeuse à ionisation de flamme. Cette méthode était linéaire dans la gamme de 0,2-3,0  $\mu\text{g}$  d'AA. (25)

### II.2.6.3. Chromatographie en phase gazeuse (CPG) :

La découverte et l'application de la chromatographie en phase gazeuse à l'analyse des traces organiques ont permis d'améliorer considérablement la sensibilité et la sélectivité. (25)

Les détecteurs à conductivité thermique et à ionisation de flamme étaient les détecteurs les plus universels. Malheureusement, les composés polaires comme l'AA n'étaient pas facilement analysés par cette technique.

Sweeley et ses collègues ont rapporté la première analyse par CPG de l'AA. Des dérivés de l'éther triméthylsilyle ont été synthétisés pour augmenter la volatilité ; La réaction de dérivatisation a été effectuée dans un mélange d'hexaméthylidisilazane et de triméthylchlorosilane dans la pyridine. (25)

### II.3. Méthodes citées dans les pharmacopées :

#### II.3.1. Méthode de dosage du principe actif PA :

##### II.3.1.1. Iodométrie :

###### II.3.1.1.1. Principe :

C'est une méthode de dosage par oxydoréduction utilisant le pouvoir oxydant de l'iode. Elle est la méthode de référence de dosage de l'AA, et elle figure dans la pharmacopée européenne EP 10<sup>ème</sup> édition, la pharmacopée américaine USP 2021 et la pharmacopée britannique BP 2020 (la pharmacopée britannique). Soit une solution d'AA est titrée, en présence d'acide sulfurique, par l'iode en utilisant l'amidon comme indicateur de fin titrage jusqu'à persistance d'une couleur bleue-violette. (10, 42, 43)

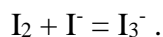
Cette technique mis en jeu les propriétés réductrices de l'AA ainsi que le pouvoir oxydant de l'iode. L'AA (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>) est oxydé en DHAA (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>6</sub>), tandis que l'iode est réduit en ions iodure (I<sup>-</sup>). L'équation de la réaction peut être représentée comme suit :



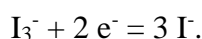
L'iode est immédiatement réduit en ions iodure tant que de l'AA est présent pour réagir avec lui. Une fois que l'AA a été complètement oxydé, l'excès d'iode va réagir librement avec

l'indicateur coloré l'amidon, formant un complexe bleu-noir amidon-iodure. Le virage au bleu, persistant après 20 secondes d'agitation, indique le point de fin du titrage.

L'utilisation de l'iode comme réactif de titrage présente deux inconvénients majeurs. Premièrement, l'iode est peu soluble dans l'eau, et deuxièmement, l'iode est quelque peu volatil. Par conséquent, des quantités importantes d'iode dissous s'échappent de la solution. Ces deux inconvénients sont surmontés en ajoutant de l'iodure ( $I^-$ ) aux solutions d'iode. En présence d'iodure, l'iode réagit pour former du triiodure ( $I_3^-$ ) qui est très soluble et non volatil. La réaction est :



La principale espèce chimique présente dans ces solutions est le triiodure. La réduction du triiodure en iodure est analogue à la réduction de l'iode. Selon la réaction suivante :



Dans ce cas, le triiodure oxyde l'AA pour former le DHAA suivant cette réaction :



A faible pH, les iodures peuvent être oxydés par l'oxygène de l'air en iode. Ce processus peut être la source d'erreurs de titrage.

### II.3.1.1.2. Avantages de la méthode :

- L'iodométrie peut être utilisée pour déterminer la concentration des agents réducteurs et oxydants.
- Elle a la capacité de déterminer avec précision la concentration de l'analyte.
- Elle permet de détecter visuellement la réactivité au(x) point(s) d'équilibre.
- La présence d'iode dans l'amidon provoque un changement de couleur bleue visible qui se produit simultanément, ce qui est l'un des deux critères les plus importants du titrage.
- Elle ne nécessite qu'une petite quantité de produits chimiques ou de substances.

### II.3.1.1.3. Inconvénients de la méthode :

- La perte d'iode en raison de sa volatilité.

- Les solutions d'iodure sont oxydées par l'oxygène de l'air.
- L'amidon est peu coûteux et instable (sous forme de suspension).
- La possibilité de remplacer l'iode par du glycollate d'amidon de sodium.

### II.3.2. Méthodes de dosage du produit fini :

L'USP et la BP s'intéressent au dosage de l'AA dans les produits finis.

#### II.3.2.1. Méthodes de dosages citées dans l'USP :

##### Les comprimés :

Il existe plusieurs méthodes citées dans la monographie mais la plus utilisée est la titrimétrie directe qui utilise comme titrant le DCIP en milieu acide jusqu'à l'apparition d'une couleur rose qui persiste au moins 5s. (45)

##### Les injections :

Pour les injections, la pharmacopée Américaine cite la méthode chromatographique HPLC comme méthode de référence pour doser l'AA présent dans les injections en utilisant un détecteur UV à 245nm. (45)

##### Les comprimés à croquer :

La méthode de détermination de l'AA dans les comprimés à croquer est l'HPLC en utilisant un détecteur UV à 245 nm. (45)

##### Les solutions orales :

La méthode de dosage de l'AA contenu dans les solutions orales est la titrimétrie qui utilise comme titrant le DCIP en milieu acide. (45)

##### Les solutions orales à reconstituer :

La méthode utilisée dans ce cas est l'HPLC en utilisant un détecteur UV à 220 nm. (45)

#### II.3.2.2. Méthodes de dosage citées dans la BP :

##### Les solutions injectables :



Une simple titration avec l'iode après ajout de l'acide sulfurique en utilisant le mucilage d'amidon comme indicateur de fin de titrage. (46)

### Les comprimés et les comprimés à croquer :

#### II.3.2.3. La cérimétrie :

Le dosage se fait avec titration sur un milieu acidifié avec de l'acide sulfurique, le titrant est l'ammonium cérium (IV) sulfate avec comme indicateur coloré : la ferroïne. (46)

Sullman semble avoir été le premier à utiliser le sulfate de cérium (IV) pour la détermination de l'AA. Traitant un échantillon avec un excès de solution de sulfate de cérium (IV) et titrant à nouveau après environ 30 minutes avec une solution standard de fer(II), il a rapporté qu'une mole d'AA consommait une quantité de cérium (IV) équivalente à trois atomes d'oxygène. (47)

G. Gopala Rao et G. Sitarama Sastry ont titré l'AA avec le sulfate de cérium (IV) en présence de l'acide sulfurique pour rendre le milieu acide, en utilisant comme indicateur de fin de réaction : la solution de sulfate de ferroïne, cette dernière peut être réduite par le DHAA, la réduction est inhibée par l'ajout de l'acide orthophosphorique. L'atteinte de point d'équivalence se manifeste par un virage d'une couleur rouge à bleu clair. (47)

##### II.3.2.2.1. Performances de la méthode :

- Les solutions de sulfate cérique sont assez stables sur des périodes prolongées ; elles ne sont pas affectées par la lumière ni même par l'ébullition.

Les solutions de sulfate cérique peuvent être titrées par les agents réducteurs. (48)

##### II.3.2.2.2. Inconvénients de la méthode :

- L'acide phosphorique peut retarder la réaction directe entre l'AA et le cérium (IV) en raison de sa complexation avec ce dernier.
- Le sulfate de cérium (IV) peut se précipiter si l'acidité est en dessous de 0,5 M pendant le titrage. (47)

# **Chapitre III : Etude de stabilité**

### III.1. Généralités :

La dégradation chimique et la dégradation physique des substances médicamenteuses peuvent modifier leurs effets pharmacologiques, entraînant une altération thérapeutique ainsi que des répercussions toxicologiques. Les produits pharmaceutiques étant utilisés à des fins thérapeutiques en fonction de leur efficacité et de leur sécurité, ils doivent être stables et conserver leur qualité jusqu'au moment de leur utilisation ou jusqu'à leur date de péremption. La qualité doit être maintenue dans les diverses conditions que les produits pharmaceutiques rencontrent, pendant la production, le stockage dans des entrepôts, le transport et le stockage dans les pharmacies et les structures hospitalières ainsi qu'à domicile. Il est donc essentiel de comprendre les facteurs qui modifient la stabilité des produits pharmaceutiques et d'identifier les moyens de garantir leur stabilité (49).

Parmi ces substances : l'AA, et dont la perte de sa stabilité structurale est due à ses propriétés réductrices ; lorsque le groupe 2-hydroxy s'ionise, il place deux charges négatives, ce qui favorise la rupture du cycle. De plus, la dégradation oxydative favorise probablement l'instabilité en raison de la tendance de l'anion ascorbate à agir comme un réducteur. Ces dégradations peuvent être catalysées par la présence d'un métal de transition ( $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{2+}$ ). La dégradation peut également se produire en raison d'une attaque de l'eau en vrac (50, 51).

L'instabilité de L-AA entraîne une réduction de l'efficacité en raison de la perte d'actif et de divers inconvénients, y compris une courte durée de conservation, la date d'expiration requise, des coûts de production plus élevés et des considérations particulières en matière de stockage. Cette instabilité impose la mise au point de méthodes et de procédures optimales pour le dosage de l'acide ascorbique qui nécessite la sélection de conditions permettant d'obtenir une stabilité maximale. C'est pourquoi les compositions où l'acide ascorbique est stable sont recherchées (50, 52).

### III.2. Stabilité de l'acide ascorbique pure :

Plusieurs études ont décrit la stabilité de l'AA et ce par l'exposition de ce dernier à différents facteurs environnementaux : notamment le pH, la température, l'oxygène, la lumière et l'humidité (53).

### III.2.1. Effet de la température :

Une réduction de la teneur en AA a été observé avec l'augmentation de la température de stockage (de 35°C allant jusqu'à 95°C). Cette réduction a été moindre dans le cas d'un stockage au réfrigérateur (4-5°C). Le stockage sous réfrigération a donné la plus grande stabilité ou a connu le moins de dégradation tandis que le stockage à température ambiante a connu la plus forte dégradation (54, 55).

Généralement une température au-dessous de 35°C n'a pas une grande influence sur la dégradation de l'AA. Jutkus et al ont constaté qu'il n'y avait pas de différences significatives entre les stabilités chimiques de l'acide ascorbique entreposé à 22 et 35°C par contre pour les échantillons d'AA entreposés à 40, 50 et 60°C, l'augmentation de la température a entraîné une plus grande instabilité chimique au fil du temps. La dégradation chimique de l'AA a semblé suivre une cinétique de vitesse de réaction de premier ordre (53).

Puisque la température est un facteur important qui affecte la vitesse de dégradation de l'AA, des températures plus basses pourraient inhiber la dégradation de l'acide ascorbique et limiter ainsi l'accumulation de divers produits de dégradation (55).

### III.2.2 Effet du pH :

Le pH est le deuxième facteur, par ordre d'importance, qui détermine la stabilité d'AA. Les solutions de l'AA sont plus stables à un pH compris entre 5,0 et 8,0. À un pH de 3,0 à 4,5 et de 10,0 à 12,0, l'AA est moins stable. Cependant la vitesse de décomposition à pH 6 (pH de stabilité maximale) est environ 20 fois plus rapide en conditions d'aérobie. Dans les conditions d'anaérobie, la réaction de déshydratation est plus rapide en milieu acide qu'en milieu basique en raison de la catalyse par les ions hydrogène (51, 55).

### III.2.3. Effet de l'humidité :

Selon Jutkus et al, Il a été observé que l'humidité relative initiale  $RH_0$  de l'AA est de 96,8 % à 25°C qui est proche de celle citée dans la littérature où  $RH_0$  est de 98%. Dans les échantillons d'AA, des différences significatives dans la stabilité chimique n'ont été trouvées que dans les échantillons qui avaient également des RH significativement plus élevées que le  $RH_0$ . D'autres auteurs ont rapporté qu'à des RH inférieures à  $RH_0$ , la vitamine C est relativement stable, tandis qu'au-dessus ou à l'approche de  $RH_0$ , la vitamine C commence à se dégrader.

Cependant, dans ces études, les échantillons en poudre ont absorbé de l'humidité au fil du temps alors qu'ils étaient stockés dans des récipients ouverts dans des dessiccateurs à RH constante, ce qui peut avoir entraîné des différences dans les voies de dégradation et modifié le seuil de sorption de l'humidité relative à la dégradation chimique (53).

La teneur en humidité initiale et l'interaction entre la teneur en humidité initiale et la température de stockage ont le plus contribué à la modification de la stabilité chimique de la vitamine C et, en particulier, les changements d'humidité relative ont eu un impact plus important sur la stabilité chimique que la température (53).

### III.2.4. Effet des métaux :

La dégradation est nettement accrue en présence d'ions de métaux de transition, en particulier  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$ . Le mécanisme de la décomposition catalytique d'AA sous l'action des ions métalliques conduit à la formation des composés complexes, dont la vitesse de décomposition est considérablement plus élevée que la vitesse de décomposition de l'AA libre dans les mêmes conditions. Les ions métalliques sont classés dans l'ordre suivant en fonction de leur activité catalytique (57, 58) :



### III.2.5. Effet de l'oxygène :

Il faut savoir que la dégradation de l'AA se produit dans des conditions aérobies donnant différents produits de décomposition. Dans ces conditions, l'AA est oxydé en acide déhydroascorbique, puis hydrolysé et oxydé pour donner de l'acide dicétogulonique et de l'acide oxalique (51).

Etant donné que la vitesse d'oxydation est déterminée par la vitesse d'entrée de l'oxygène dans la solution, le stockage des solutions d'AA dans une atmosphère d'azote va limiter en quelque sorte sa décomposition, Si cette solution entre en contact avec l'air, la vitesse de décomposition de l'AA augmente fortement par suite de la diffusion de l'oxygène de l'air dans la solution. La concentration de l'AA a un effet considérable sur ce processus. Il a été établi que, toutes conditions similaires par ailleurs, l'oxydation de l'AA a lieu plus rapidement et plus profondément dans les solutions diluées que dans les solutions concentrées et la dégradation

anaérobie de l'AA aura lieu aussi. Elle conduit à la déshydratation et à l'hydrolyse de ce dernier pour donner du furfural et du dioxyde de carbone à pH = 4.3 (57, 59).

### **III.2.6. Effet de la lumière :**

L'AA est sensible à la lumière. En effet, il est conservé dans un récipient fermé, à l'abri de la lumière. Le groupe "enediol" de la molécule d'AA est le site de la première étape de son oxydation et est responsable de l'absorption dans la lumière ultraviolette. Sous irradiation UV, la vitesse de photolyse d'AA augmente fortement, surtout en milieu alcalin et en présence de catalyseurs (57, 59, 60).

### **III.2.7. Effet de l'eau :**

Bien que l'eau soit le meilleur solvant pour fournir une solution d'AA, elle est paradoxalement l'un des moins privilégiées pour protéger l'AA contre les dommages oxydatifs. Le problème à résoudre pour les solutions d'AA a toujours été de trouver un compromis entre la solubilisation et la stabilité (60).

Diverses études ont été faites pour produire des solutions stables d'acide L-ascorbique. Il fallait éliminer les ions métalliques, l'eau et surtout l'oxygène dissous dans l'eau, ce qui est obtenu par saturation des solutions avec de l'azote (57).

L'utilisation des stabilisateurs dont l'effet est basé sur l'inhibition des réactions de décomposition d'AA, sont utilisés pour augmenter la stabilité des préparations d'AA pendant le stockage. Ces substances peuvent lier l'oxygène et les ions métalliques, assurer le pH optimal des solutions, ainsi que de diminuer l'activité des molécules d'AA en solution. On cite : l'acide citrique, l'acide oxalique, les sucres tels : le glucose, le maltose ainsi que des sels tels que le sel disodique de l'acide éthylènediamine-tétraacétique qui est largement utilisé comme agent complexant qui inhibe la décomposition catalytique de l'AA. Toutefois, la stabilisation n'a pas été achevée par l'AA seul (57).

### **III.3. Stabilité de l'acide ascorbique sous forme de comprimé :**

Dans des conditions de stockage normales, les comprimés d'AA sont stables pendant plus de 5 ans, avec plus de 95 % de rétention de l'activité. Les quantités des produits de dégradation

formés dans les diverses conditions de stockage constituent un faible pourcentage du contenu en AA et ne présentent aucun risque (61).

### **III.3.1. Effet de l'oxygène :**

Selon l'étude de Rubin et Ritter, Les comprimés d'AA conservés dans des bouteilles fermées maintiennent leur teneur en vitamines pendant 5 ans ou plus à température ambiante. Le stockage de ces comprimés dans un récipient ouvert à 25°C ou l'ouverture quotidienne de flacons en verre ou en polyéthylène conservés à température ambiante ou au réfrigérateur pendant 20 semaines à ce jour ont entraîné une perte de 0 à 2 % d'AA ; de légères pertes se sont produites près de la surface des comprimés. De très petites quantités de DHAA sont trouvées dans les comprimés vieillis. Cette forme oxydée de la vitamine est entièrement active en tant qu'AA. Peu ou pas d'acide oxalique a été trouvé dans les comprimés vieillis, ou des quantités infimes trouvées sont insignifiantes par rapport aux niveaux normaux dans le régime alimentaire (61).

### **III.3.2. Effet de la température :**

Une étude récente (2016) vient soutenir celle de Rubin, faite par Klu et al : Les comprimés d'AA ont été stockés séparément à température ambiante et sous réfrigération et dosés périodiquement pendant 35 jours. Une dégradation significative de l'AA dans les comprimés stockés a suivi une cinétique de second ordre (54).

### **III.3.3 Effet du temps de stockage :**

Le vieillissement des comprimés peut affecter non seulement la stabilité chimique du médicament contenu, mais également certains paramètres physiques tels que la couleur (14).

Les comprimés d'AA se décolorent au cours du stockage dans des conditions normales de température et d'humidité. Les comprimés conservés dans des flacons en verre ambré à température ambiante passent progressivement du blanc au brun jaunâtre. Ceci est bien mis en évidence par le fait que les comprimés de vitamine C disponibles sur le marché diffèrent de l'un à l'autre, qui sont de couleur blanche à jaune pâle (62).

Vemuri a évalué le changement de coloration ou il a mis les comprimés sous une RH de 75 % en faisant varier la température à 25°C, 35°C et 45°C respectivement. Il a été établi que le

changement de couleur de l'AA est directement lié à la dégradation chimique de cette vitamine. Ce changement de couleur suit une réaction d'ordre zéro (62).

### **III.3.4. Effet de l'humidité :**

L'humidité semble être un facteur important contribuant au renforcement de l'instabilité chimique et physique des comprimés d'AA. Une étude de stabilité faite sur la conservation des comprimés dans des conditions tropicales ont favorisé l'instabilité chimique du médicament ainsi que l'instabilité physique de la forme pharmaceutique du comprimé. L'instabilité chimique de l'acide ascorbique a augmenté pendant la conservation des comprimés à 40°C et à 90% d'humidité relative. D'autre part, les comprimés conservés à 40°C et à 35% d'humidité relative se sont avérés chimiquement stables. Il apparaît donc que l'humidité est un facteur important dans l'augmentation de l'instabilité chimique des comprimés d'acide ascorbique (63).

Les comprimés conservés à 40°C et à 90% d'humidité relative se décolorent progressivement du blanc au jaune, au bronzé, au brun foncé puis au presque noir. Toutefois, les comprimés conservés à 4°C et à 35 % d'humidité relative ne présentaient qu'un très léger changement de couleur à la fin de la période de stockage, où ils ont pris une couleur chamois clair (63).



# **Partie pratique**

**Partie I : Développement et validation de la méthode de dosage de la vitamine C dans les comprimés effervescents par iodométrie.**

### **I.1. Objectif de l'étude :**

Dans cette partie on va essayer de développer et valider une méthode simple, facile et rapide du dosage de la vitamine c dans les comprimés effervescents par l'iodométrie.

### **I.2. Lieu de l'étude :**

Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire de chimie analytique, Département de Pharmacie, Faculté de médecine Dr. B. BENZERDJEB, à Tlemcen.

### **I.3. Période de l'étude :**

L'étude de validation a été faite dans une période de 2 jours : 27-28/04/2022

### **I.4. Opérateurs :**

Cette partie a été réalisé par nous-même : AMRANI Souhila et BEDDOU Fatima Zohra avec l'aide de notre encadrante Dr. GHENIMI Fatima et notre Co-encadrante Dr FELLAH Houda.

### **I.5. Matériels et réactifs :**

#### **I.5.1. Réactifs :**

Les réactifs utilisés sont décrits dans le tableau IV.

**PARTIE I : Développement et validation de la méthode de dosage de la vitamine C dans les comprimés effervescents par iodométrie**

**Tableau IV : Liste des réactifs utilisés dans l'étude pratique.**

Réactifs	Masse molaire	Pureté	Densité	n° de lot	Laboratoire de confection	Source
<b>Acide ascorbique</b> (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> )	M=176,124 1 ± 0,0072 g·mol <sup>-1</sup>	99%	/	Lot n°: S78498 -219	SIGMA- ALDRICH	Laboratoire de chimie analytique
<b>Acide sulfurique</b> (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	M=98.0 8g/mol	/	Densité (20°C) =1.840g/ m <sup>3</sup>	Lot n°: J2120	Honeywell / Fluka	Laboratoire de chimie minérale
<b>Iodure de potassium (KI)</b>	M=166,002 8 g/mol	/	/	/	/	Laboratoire de chimie analytique
<b>Le diode (I<sub>2</sub>)</b>	M=253,808 9 g/mol	/	/	/	/	Laboratoire de chimie analytique
<b>Thiosulfate de sodium penta hydraté</b> (Na <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub> * 5 H <sub>2</sub> O)	M=248.18 g /mol	/	/	/	/	Laboratoire de chimie minérale
<b>Amidon</b> (C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ) <sub>n</sub>	/	/	/	/	/	Laboratoire de chimie minérale

## **PARTIE I : Développement et validation de la méthode de dosage de la vitamine C dans les comprimés effervescents par iodométrie**

---

### **I.5.2. Matériels :**

- Plaque chauffante → VELP SCIENTIFICA.
- Balance analytique → OHAUS/ Item : PA64 (capacité maximale=65g /lecture 0.0001g).
- Etuve.
- Réfrigérateur (2°C) → Condor.
- Thermomètre.
- Eprouvette 25ml → ISOLAB GERMANY/ ORO3.3 (25±0.25ml).
- Eprouvette 50ml → Labbox / LBG3.3 (50±1.0ml).
- Fiole 500ml → GLASSCO / (500±0.25ml).
- Fiole 1000ml.
- Burette 25ml → GLASSCO / (25±0.05ml).
- Hotte aspirante.
- Pipette pasteur.
- Barreau magnétique.
- Erlenmeyer / bécher (50/100/150ml).

### **I.6. Méthodes :**

#### **I.6.1. Type de la méthode :**

Il s'agit d'une méthode quantitative, non normalisée, adaptée et validée suivant le raisonnement suivant :

Le dosage de l'acide ascorbique comme matière première est réalisé par iodométrie selon les recommandations des trois pharmacopées :

- Pharmacopée européenne 10<sup>ème</sup> édition
- Pharmacopée britannique 2020 (BP2020)
- Pharmacopée américaine (USP 44 NF 39)

Cependant les techniques de dosage de l'AA dans les produits finis sont différentes ; allant de la titrimétrie jusqu'aux méthodes chromatographiques (voir chapitre 02) et n'utilisent pas la iodométrie comme méthode de dosage.

## **PARTIE I : Développement et validation de la méthode de dosage de la vitamine C dans les comprimés effervescents par iodométrie**

---

En effet la BP 2020 préconise un dosage direct de l'AA dans les comprimés par cérimétrie (voir annexe n°2).

Dans ce travail, nous avons proposé une technique de dosage par iodométrie basée sur le protocole de dosage de la BP, adaptée et validée pour le dosage de l'acide ascorbique dans des comprimés effervescents de vitamine C.

### **I.6.2. Description de la méthode de dosage de l'AA :**

- **Analyte / mesurande détecté :** le volume de la solution d'iode sert de métrande, qui détecte la quantité d'analyte à doser qui est dans notre cas l'AA
- **Principe analytique évalué :** c'est la détermination de la concentration du titré « l'AA » avec le titrant « solution d'iode » par titrimétrie redox à l'aide d'un indicateur de fin de réaction : l'amidon ou il marque le virage de couleur vers le bleu-violet.

### **I.6.3. Description de la phase de l'étalonnage :**

#### **I.6.3.1. Vérification du titre de l'iode :**

##### **I.6.3.1.1. But de l'étalonnage d'I<sub>2</sub> :**

Les solutions de I<sub>2</sub> doivent être obligatoirement étalonnées avant utilisation car elles présentent une instabilité qui est dû à leur volatilité, en outre elles s'oxydent par l'oxygène de l'air (48).

En effet, l'étalonnage peut être réalisé avec plusieurs étalons, nous citons : l'anhydride arsénieux, le thiosulfate.

Dans notre travail nous avons utilisé une solution de thiosulfate 0,1 N pour réaliser l'étalonnage du I<sub>2</sub>

##### **I.6.3.1.2. Description de l'étalonnage de I<sub>2</sub> :**

Dans un erlenmeyer de (150ml) on verse 10 ml d'une solution de thiosulfate prélevé par une éprouvette de 10ml, on ajoute 1ml d'une solution d'amidon de 1%, où ce mélange est incolore. On effectue la titration par la solution d'iode préalablement remplie dans la burette, le point d'équivalence peut être repéré par une apparition d'une coloration jaunâtre.

##### **✚ Préparation des solutions :**

## **PARTIE I : Développement et validation de la méthode de dosage de la vitamine C dans les comprimés effervescents par iodométrie**

---

- Préparation d'une solution de thiosulfate 0,1N :
  - Peser 12,7g de cristaux de thiosulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ).
  - Les dissoudre dans de l'eau distillée bouillie et compléter à 500 ml dans une fiole jaugée avec la même eau.
  - Ajouter 0,1 carbonate de sodium.
- Préparation d'une solution d'iode 0,1 N :
  - Dans une fiole de 1000 ml dissoudre 20g d'iodure de potassium dans une quantité minimale d'eau distillée ;
  - Ajouter 12.7g d'iode ;
  - Placer le mélange sur un agitateur magnétique en introduisant le Baro magnétique ;
  - Une fois dissolution totale, compléter avec de l'eau distillée jusqu'à le trait de jauge ;
  - Verser le contenu de la fiole dans une verrerie opaque pour éviter toute altération possible. (42)
- Préparation d'une solution d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N :

$$\rho = 1.83\text{g/ml} \quad 98\% \quad M=98\text{g/mol}$$

$$\begin{cases} 5.5\text{ml d'H}_2\text{SO}_4 \text{ concentré} \rightarrow 100\text{ml} \\ 27.5\text{ml d'H}_2\text{SO}_4 \text{ concentré} \rightarrow 500\text{ml} \end{cases}$$

- 1- Dans une fiole de 500 ml ; introduit 300ml d'eau distillée ;
  - 2- Ajouter 27.5ml d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  (  $p = 98\%$  ;  $p \rightarrow$  pureté ) concentré ;
  - 3- Laisser refroidir et diluer à 500ml avec le même solvant.(42)
- Préparation de l'indicateur (empois d'amidon 1%) :
    - 1- Dissoudre 1g d'amidon soluble dans 5ml d'eau distillée ;
    - 2- Tout en remuant ; verser le mélange dans 100ml d'eau bouillante ;
    - 3- Agiter jusqu'à homogénéisation du mélange ;
    - 4- Refroidir et conserver. (42)

### **I.7. Mise en œuvre de l'étude de validation :**

#### **I.7.1. Procédure de référence de validation analytique :**

Le but de cette partie était de valider la méthode de dosage de l'AA dans des comprimés effervescents de 500 mg, préétablie, selon les recommandations de la société française de sciences techniques pharmaceutique SFSTP.

## **PARTIE I : Développement et validation de la méthode de dosage de la vitamine C dans les comprimés effervescents par iodométrie**

---

La commission SFSTP propose une méthodologie de validation des procédures analytiques quantitatives avec une démarche harmonisée, sous forme d'un guide publié dans la revue française *"Validation des procédures analytiques quantitatives : Harmonisation des démarches"*.

Le logigramme (annexe n°3) présente la démarche proposée dans le guide de la **SFSTP** pharmaceutique pour sélectionner un protocole expérimental de validation en fonction des contraintes ou des spécificités liées à la procédure de dosage sous épreuve.

Le choix d'un de ces protocoles se base d'abord sur la présence ou l'absence de l'effet de la matrice. En l'absence de ce dernier effet, la question suivante porte sur le niveau ou les niveaux de concentration qui seront utilisés en routine pour l'étalonnage.

Dans la présente procédure, le protocole de référence choisi est le protocole V2 (absence de l'effet matrice) avec un nombre de 33 essais à réaliser pour la validation analytique (voir tableau V).

Le nombre total d'essais peut parfois se réduire mais aussi s'accroître suivant l'objectif de la procédure analytique.

Le tableau ci-dessous représente le choix du nombre de standards d'étalonnage et validation en fonction du protocole choisi (V2).



**Tableau V : La validation analytique.**

Standards	Niveau de concentration	de	Protocole V2
SE. Etalonnage sans matrice	<b>Bas</b>		<b>2</b>
	<b>Médian</b>		<b>2</b>
	<b>Haut</b>		<b>2</b>
SV. Validation avec la matrice	<b>Bas</b>		<b>3</b>
	<b>Haut</b>		<b>3</b>
	<b>Médian</b>		<b>3</b>
Nombre minimum de séries			<b>3</b>
Nombre total d'essais (minimum)			<b>33</b>

### **I.7.2. Limites de la procédure de validation :**

Le choix d'une procédure de validation (critères de performance à évaluer, protocole suivi, et nombre d'essais) dépend non seulement du protocole de référence, mais aussi du type d'analyse, de l'évaluation du risque, du coût, du temps de la technique, de la faisabilité et du jugement analytique.

Dans notre travail, nous avons essayé d'adapter le protocole de référence avec les moyens disponibles à notre niveau (réactifs et matières premières).

En effet, la limite principale de l'application du protocole de la SFSTP était la non disponibilité des différents excipients constituant la matrice, et qui doivent être utilisés pour constituer les standards de validation (SV).

À cette fin, nous avons utilisés uniquement des standards d'étalonnage (SE) préparés avec de l'AA étalon selon le mode opératoire de la technique de dosage.

La deuxième limite, réside dans l'insuffisance des réactifs disponibles à notre niveau (l'acide sulfurique, l'amidon), ce qui s'est répercuté sur le nombre de répétitions par niveau de concentration.

### **I.7.3. Critères de validation**

Selon les référentiels, les principaux objectifs de la phase de validation sont de :

- Vérifier la linéarité de la procédure analytique.
- Démontrer la spécificité (sélectivité),
- Valider la fonction de réponse (ou modèle d'étalonnage utilisé en routine),
- Estimer la fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire),
- Estimer la justesse,
- Estimer l'exactitude,
- Valider les seuils de quantification et de détection,
- Valider l'intervalle de dosage,

Dans ce travail, nous avons traité, en plus de l'effet matrice, les critères de validation suivants:

- Spécificité ;
- Linéarité (courbe d'étalonnage) ;
- Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) ;

### **I.7.4. Description de la procédure de validation :**

Dans le choix des niveaux de concentration nous avons respecté les recommandations de la SFSTP. En effet cette dernière exige pour la validation analytique d'une procédure analytique de dosage d'un produit fini trois niveaux de concentration : 80%, 100% et 120 %.

Pour certain type d'analyse tel que la titrimétrie ou la potentiométrie, la gamme de travail peut s'élargir de 70% jusqu'à 130% avec la possibilité d'augmenter le nombre de points.

De ce fait nous avons opté pour quatre niveaux de concentration, trois principaux pour l'étalonnage en routine (70%, 100% et 130%) et le quatrième à 33 % qui peut être utilisé dans le cas où on veut réduire la prise d'essai.

Concernant le nombre de série, pour l'étude de l'effet matrice nous avons travaillé avec deux gammes, la première avec les standards d'étalonnage et la deuxième avec le produit fini (pour substituer la gamme de validation), chacune répétée deux fois.

Les mêmes standards d'étalonnage nous ont servi de gamme pour vérifier la linéarité de la fonction.

**PARTIE I : Développement et validation de la méthode de dosage de la vitamine C dans les comprimés effervescents par iodométrie**

Pour vérifier la répétabilité, la gamme d'étalonnage a été répétée trois fois par le même opérateur, avec le même équipement dans un intervalle de temps court.

Pour vérifier la fidélité intermédiaire, nous avons changé d'opérateur et d'équipement tout en gardant le même laboratoire.

Pour l'essai de spécificité, deux essais ont été réalisés : le premier en présence de l'AA (SE) et le deuxième en absence d'AA (blanc).

Tous les points ont été préparés selon le mode opératoire de la technique de dosage.

Ci-dessous un tableau regroupant le nombre d'essai pour chaque critère de validation.

**Tableau VI : Le nombre d'essai pour chaque critère de validation.**

Critère de validation	Niveau de concentration	de	Nombre de série
Linéarité (SE)	33		2
	70		2
	100		2
	130		2
Répétabilité (SE)	33		3
	70		3
	100		3
	130		3
Fidélité intermédiaire (SE)	33		3
	70		3
	100		3
	130		3
Spécificité (SE)	Blanc		1
	100		1
Effet matrice (produit fini)	33		2
	70		2
	100		2
	130		2
Nombre total d'essai			42

# **Partie II : Etude de Stabilité de la vitamine C par Iodométrie**

### **II.1. Objectif de l'étude :**

Le but de notre étude est de vérifier la stabilité de l'acide ascorbique contenu dans des comprimés effervescents de 500 mg, par l'exposition de ces derniers à différents facteurs tel que : la modalité de conservation, la température et la dissolution.

### **II.2. Type de l'étude :**

C'est une étude analytique expérimentale, prospective, longitudinale.

### **II.3. Lieu de l'étude :**

Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire de chimie analytique, Département de Pharmacie, Faculté de médecine Dr. B. BENZERDJEB, à Tlemcen.

### **II.4. Période de l'étude :**

Notre étude a été faite sur une durée de 7 semaines du 20 avril 2022 jusqu'à le 8 juin 2022.

### **II.5. Opérateurs :**

-La partie d'étude de stabilité de la vitamine c par iodométrie a été réalisée par nous-même : AMRANI Souhila et BEDDOU Fatima Zohra.

### **II.6. Matériels et réactifs :**

Dans le but de réaliser cette étude, nous avons utilisé la verrerie, le matériel et les réactifs cités précédemment (Chapitre I).

#### **II.6.1. Collection des échantillons :**

Nous avons utilisé au totale 100 Cp de vitamine C.

Pour les tests de stabilité les comprimés de vitamine C utilisés pour ce travail ont été obtenus le même jour portant le même lot : 086.

Tous les emballages primaires et secondaires des comprimés d'acide ascorbique ont été évalués visuellement et n'ont montré aucun signe de dégradation physique ou chimique dans leur

emballage.

### **II.6.2. Type d'échantillon/matrice :**

- Composition :

Ingrédients actifs : Vitamine C (Acide Ascorbique).

- Additifs alimentaires : sorbitol (édulcorant), Bicarbonate de sodium (régulateur d'acidité), Acide citrique (régulateur d'acidité), carbonate de sodium (régulateur d'acidité), PEG\*6000 (stabilisant), arôme orange, saccharine sodique (édulcorant), E110 (colorant).
- \*Polyols : une consommation excessive peut avoir des effets laxatifs. Ce produit est déconseillé aux individus allergiques et/ou présentant une intolérance aux additifs alimentaires.

**Tableau VII : Composition d'un comprimé de vitamine C.**

Composition pour un comprimé	Quantité
Vitamine C	500mg

### **II.6.3. Présentation :**

- Les comprimés effervescents de vitamine C sont conditionnés dans un tube en polypropylène avec un dessiccant en gel de silice MS/SiO<sub>2</sub> et un bouchon en polyéthylène. Les tubes contenant 20 comprimés sont emballés dans un emballage en carton.
- Les comprimés sont de couleur orange clair, aux bords lisses et nets.

### **II.7. Méthode :**

Les comprimés de vitamine C ont été conservés sous différentes conditions de température (température ambiante et basse température 2°C) et de stockage (tube ouvert, tube fermé) ; les essais ont été réalisés chaque semaine sur une durée de 07 semaines, comprenant la détermination du poids moyen, la teneur en AA et la teneur en eau.

Une évaluation de l'effet de température sur la stabilité de l'AA ainsi que l'effet de dissolution dans l'eau ont été réalisés par dosage iodométrique.

Ci-après les détails de chaque essai ainsi que la méthode de calcul :

## **II.8. Stockage et conservation à court terme :**

### **II.8.1. Stockage et conservation à T° ambiante :**

#### **II.8.1.1. Tube fermé :**

- Pour cette partie on a gardé les comprimés dans leur conteneur et même dans leur emballage à T° ambiante au laboratoire de chimie analytique, et chaque semaine on a effectué les déterminations suivantes :

##### **II.8.1.1.1. Détermination du poids moyen :**

- En utilisant une balance analytique ; nous pesons 3 comprimés du même lot individuellement.
- Nous allumons la balance analytique en cliquant sur le bouton (yes) ; et on attend jusqu'à que la valeur 0 s'affiche sur l'écran.
- Nous ouvrons le couvercle en verre et nous posons la verrerie (dans notre cas on a utilisé la boîte pétrie), nous fermons le couvercle en attendant que la balance se stabilise.
- Nous tarons cette valeur pour obtenir le 0.
- Nous plaçons nos comprimés un par un sur la verrerie ; et en notant à chaque pesée le poids.
- Pour calculer le PM (poids moyen) nous calculons la moyenne des 3 chiffres obtenus à la pesée.

##### **II.8.1.1.2. Détermination de la teneur en AA :**

###### **a - Calcul de la prise d'essai :**

- Après la pesée des 03 comprimés et le calcul de PM, nous effectuons un broyage en poudre fine de ces derniers.
- La prise d'essai correspond à l'équivalent de 150 mg en AA, comme décrit dans le chapitre I.
- Nous calculons la PE comme suite :
- La boîte contient 20 comprimés ; chaque comprimé est de 500 mg en AA.

- $PM(g) \rightarrow 500mg$  en AA

$$\begin{cases} PM(g) \rightarrow 500mg \text{ en AA} \\ PE(g) \rightarrow 150mg \text{ en AA} \end{cases} \rightarrow PE = (PM \times 150) / 500 \text{ (en g)}$$

**b - Dosage de l'acide ascorbique :**

- Nous pesons la PE et nous l'introduit dans un erlenmeyer. Nous rajoutons 30ml d'eau distillée, 20ml de  $H_2SO_4$  (2N) et 1ml d'amidon (1%) tout en agitant manuellement jusqu'à ce que la solution apparaisse homogène.
- Nous remplissons la burette avec la solution de  $I_2$  (fraichement préparée ou déjà étalonnée) et nous titrons goutte à goutte jusqu'à apparition d'une couleur bleu violet foncé persistante.
- Nous effectuons 2 essais.

**c - Calcul de la teneur en acide ascorbique :**

- La teneur en AA correspond à la masse (en mg) d'AA par comprimé de vitamine C.
- Pour cela, nous déterminons tout d'abord la masse d'AA contenue dans la prise d'essai puis, nous calculons la teneur de 1cp de poids moyen.
- La correspondance de calcul est la suivante :

1 ml  $I_2$  0.1N  $\rightarrow$  8.806mg d'AA (pharmacopée européenne)

- Le titre de la solution titrante doit être vérifié par étalonnage par la solution de thiosulfate 0.1N, et calculé comme suite :

On sait que :  $N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$

D'où:  $N(I_2) \times V(I_2) = N(Na_2S_2O_3) \times V(Na_2S_2O_3)$

$$\text{Donc : } N(I_2) = \frac{N(Na_2S_2O_3) \times V(Na_2S_2O_3)}{V(Na_2S_2O_3)}$$

On donne :

$$N(Na_2S_2O_3) = 0.1N$$

$$V(Na_2S_2O_3) = 10ml$$



$V(I_2) \blacktriangleright$  voir semaine correspondante

- Ainsi, nous rectifions la correspondance en fonction du titre trouvé de la solution d'I<sub>2</sub> :

1ml d'I<sub>2</sub> x normale  $\rightarrow$  X

$$\text{Avec } X = \frac{(8.806 \times x)}{0.1} \text{ mg en AA}$$

- Pour une moyenne de chute de burette égale à  $V = \frac{(V_1 + V_2)}{2}$ ,

- La masse en AA est donnée par la correspondance suivante :

$V$  d'I<sub>2</sub> x normale  $\rightarrow$  Y

$$\text{Avec } Y = \frac{(8.806 \times V \times X)}{0.1} \text{ mg d'AA}$$

Et par la suite nous pouvons calculer la teneur en AA en % comme :

PE (n semaine)  $\rightarrow$  masse en AA correspondante Y (en mg)

PM (n semaine)  $\rightarrow$  Z

$$\text{Avec : } Z = \frac{Y \times PM}{PE}$$

La teneur = Z mg d'AA/comprimé de vitamine C

#### **d - Evaluation de la conformité des comprimés :**

- La teneur peut être exprimée soit en masse d'AA/Cp soit par le pourcentage de l'AA expérimental par rapport à la valeur vraie donnée par le fabricant :

$$\text{Teneur} = \frac{Z}{500} \times 100$$

- De cette manière, nous pouvons dire si le produit est conforme ou non, en comparant cette teneur avec les limites d'acceptabilités fixées par l'USP ou la BP.
- Dans le cas des comprimés de la vitamine C, les limites sont de 90% jusqu'à 110% (USP 44 NF39)

### **II.8.1.1.3. Détermination de la teneur en eau :**

-Pour déterminer la teneur en eau des comprimés des tubes ouverts, on va effectuer le test de la perte à la dessiccation qui est manipulé comme suite :

1/ Nous pesons la capsule en porcelaine vide →  $P_c = 28.8839g$

2/ Nous plaçons 03 comprimés dans la même capsule et on les pèse en tarant le poids de capsule, on note le poids initial →  $P_{initial}$

3/ Nous les mettons à l'étuve à 105°C pendant 03 heures (on a utilisé l'étuve de laboratoire de la Toxicologie, de Chimie minérale et de Pharmacognosie).

4/ Nous notons le poids après refroidissement.

5/ Nous soustrairons le poids de capsule pour obtenir le poids sec →  $P_{sec}$

6/ Nous soustrairons le  $P_{sec}$  du  $P_i$  et nous devisons sur 3 pour obtenir la teneur en eau.

$$\text{Teneur H}_2\text{O} = \frac{(P_i - P_{sec})}{3}$$

7/ Nous multiplions le résultat obtenu par 100 pour obtenir la teneur en eau en % :

$$\text{Teneur H}_2\text{O} \% = \frac{(P_i - P_{sec})}{P_i} \times 100$$

### **II.8.1.2. Tube ouvert :**

Pour réaliser cette partie nous avons laissé le contenant des comprimés ouvert à  $T^\circ$  ambiante dans le laboratoire de chimie analytique pendant 06 semaines.

Les déterminations suivantes ont été pratiquées chaque semaine.

#### **II.8.1.2.1. Détermination du poids moyen :**

- Les étapes de la détermination sont les mêmes que pour le tube fermé sauf que les comprimés utilisés dans cette partie ont été laissés à l'air libre.

#### **II.8.1.2.2. Détermination de la teneur en AA :**

- Nous allons déterminer la teneur en AA pour le tube ouvert de la même façon que pour le tube fermé sauf que les comprimés utilisés ont été laissés dans un conteneur ouvert à  $T^\circ$

ambiante.

### **II.8.2. Stockage et conservation à T° basse (2°C) :**

- Dans cette partie nous avons gardé les comprimés dans leurs contenants fermés et même dans leurs emballages, dans le réfrigérateur à 2°C dans laboratoire de hydro bromatologie pendant 06 semaines.
- Nous avons fait sortir les comprimés du réfrigérateur pour effectuer les déterminations suivantes chaque semaine puis nous avons les remis au réfrigérateur.

#### **II.8.2.1. Détermination du poids moyen :**

Les étapes de cette détermination sont les mêmes que celles de la T° ambiante sauf que les comprimés utilisés dans celle-ci été conservés au réfrigérateur à 2°C.

#### **II.8.2.2. Détermination de la teneur en AA :**

- Cette détermination a été réalisée de la même façon que pour la T° ambiante sauf que les comprimés utilisés dans cette partie ont été conservés dans le réfrigérateur de laboratoire d'hydro-bromatologie à 2°C.

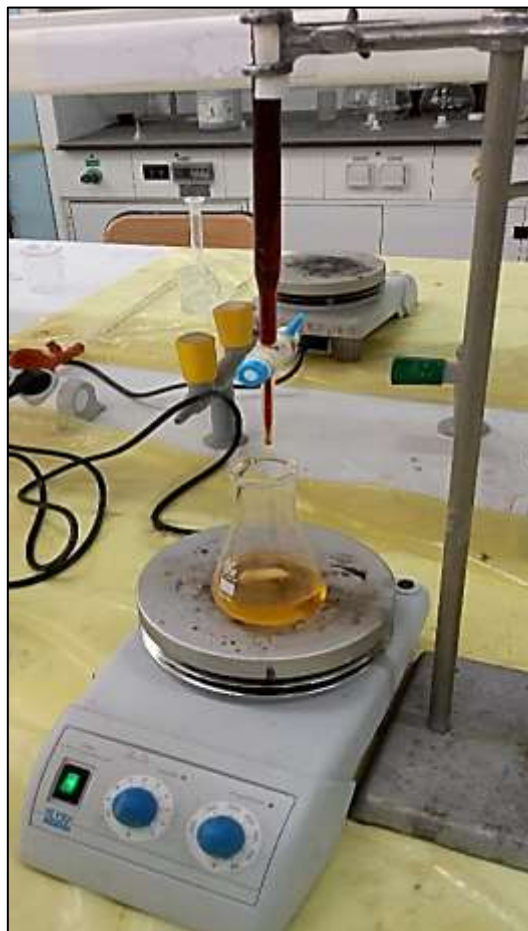
### **II.8.3. Effet de la température :**

- Dans le but d'étudier l'influence de la température sur la stabilité de l'AA, nous avons dosé ce dernier à différentes températures (T° ambiante 21°C, 36°C, 45°C), par iodométrie.
- Les différents dosages ont été faits sur le même échantillon (03 comprimés conservés à température ambiante), avec le même équipement et par le même opérateur.
- La température a été fixée par une plaque chauffante et mesurée continuellement avec un thermomètre.
- Chaque essai a été répété au moins deux fois.
- La teneur en AA est ainsi déterminée à chaque température.

#### **II.8.3.1. Procédure de dosage :**

- Après la pesée des 03 comprimés et calcul de PM, nous effectuons un broyage en poudre fine de ces derniers.

- Nous pesons la PE et on l'introduit dans un erlenmeyer. Nous rajoutons 30ml d'eau distillée, 20ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2N) et 1ml d'amidon (1%) tout en agitant manuellement jusqu'à ce que la solution apparaisse homogène.
- Nous plaçons l'erlenmeyer sur la plaque chauffante et nous introduisons le thermomètre pour contrôler la température.
- Nous remplissons la burette avec la solution de I<sub>2</sub> (fraîchement préparée ou déjà étalonnée) et nous titrons goutte à goutte jusqu'à apparition d'une couleur bleu foncé persistante.



**Figure 5 :** Représentation de l'assemblage de la procédure de titrage.

- Les comprimés utilisés sont à T° ambiante.
- Ce test était effectué dans la semaine n°01 par notre Co-encadrante Mlle. FELLAH Houda.

### II.8.4. Temps de préparation :

Ce test a été effectué afin de voir si la solution reste stable après un certain temps de dissolution de la vitamine c.

- 7 Essai ont été réalisés à des intervalles de temps différents (0min, 15min, 30min, 60min,

2h, 6h et 24h) et à chaque essai la teneur en AA est déterminée par iodométrie sur le même échantillon.

**II.8.4.1. Procédure de dosage :**

-Dans un erlenmeyer, nous introduisons la PE de la vitamine c (préalablement broyée en poudre fine) avec 30ml d'eau distillée et 20ml d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  (2N), nous laissons cette solution pour un certain temps (avant le titrage).

- Ce test a été réalisé dans la semaine n°02 par notre contribution.

# **Chapitre III : Résultats et discussions**

Dans ce chapitre nous regroupons les résultats avec leurs interprétations et discussions pour les 2 parties du travail.

### III.1. Résultats et discussion de la partie I :

#### III.1.1. Détermination de la droite d'étalonnage :

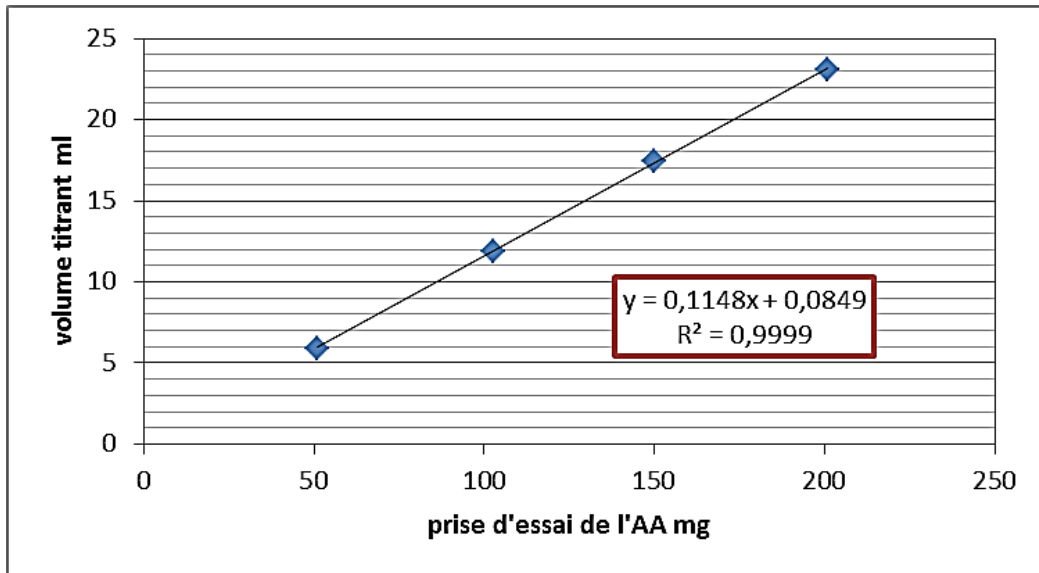
La droite d'étalonnage est déterminée avec la gamme d'étalonnage citée précédemment. Chaque point est traité par l'acide sulfurique dilué, suivant le même protocole du dosage de l'AA dans le produit fini. Le tableau VIII Représente les résultats obtenus.

**Tableau VIII** : Résultats de la détermination de la droite de l'étalonnage.

ETALONS	PE1 (mg)	PE2 (mg)	V1 (ml)	V2 (ml)	PE (moyenne)	V moyen
50	51,4	50,8	6	5,8	51,1	5,9
100	103	102,1	11,9	11,9	102,55	11,9
150	150,7	149,4	17,4	17,4	150,05	17,4
200	202,6	199,4	23,3	22,9	201	23,1

La courbe d'étalonnage est déterminée en phase de validation avec la moyenne de deux essais pour vérifier que la méthode est linéaire pour tous les points constituant la gamme choisie pour l'étalonnage.

Ci-après la courbe d'étalonnage exprimant la relation qui lie le signal enregistré (le volume d'I<sub>2</sub>) à la prise d'essai de l'AA.



**Figure 6 :** La variation de volume d'I<sub>2</sub> en fonction de la prise d'essai d'AA.

Les paramètres de régression : la pente et le coefficient de régression sont calculés par la méthode des moindres carrés. Les calculs et les graphes sont réalisés par MS Excel 2007.

**La droite de régression  $V_{I_2}=f(PE)$ :**

- **L'ordonnée à l'origine :**  $b = 0.084$
- **La pente :**  $0.114$
- **Le Coefficient de corrélation :**  $R^2 = 0.999$



III.1.2. Etude de l'effet matrice :

Les résultats de l'effet matrice réalisés sur la gamme d'étalonnage sans et avec matrice sont reportés sur la figure n°6.

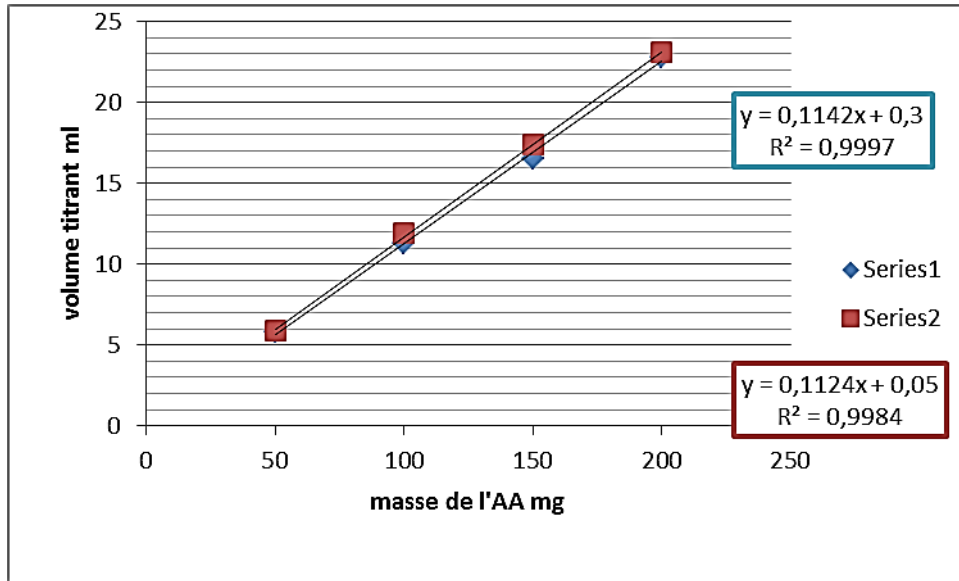


Figure 7 : Variation de volume titrant en fonction de la masse d'AA.

Tableau IX : Les valeurs de chutes de burettes moyennes obtenues pour les standards d'étalonnage avec et sans matrice.

Masse d'AA	Nombre des observations	Moyenne du $V_{\text{titrant}}$ avec matrice	Moyenne du $V_{\text{titrant}}$ sans matrice
50	04	5,8	5,9
100	04	11,3	11,9
150	04	16,5	17,4
200	04	22,8	23,1

L'effet de la matrice est déterminé par comparaison des pentes de droite d'étalonnage en présence et en absence de la matrice.

**Tableau X** : comparaison des pentes de droite d'étalonnage en présence et absence de la matrice.

Pente 01	Pente 02	Degrés de liberté	Moyenne des pentes	Variance des pentes	Variance pondérée des pentes
0,114	0,112	02	0,113	0,000002	0,000001

La comparaison se fait par le test statistique de student : test t (voir table de student sur annexe 4).

**Tableau XI** : Résultats de test statistique de student.

Valeur de t expérimental (distribution unilatérale)	Valeur de t expérimental (distribution bilatérale)	Valeur de t théorique (distribution unilatérale)	Valeur de t théorique (distribution bilatérale)
0,03645004	0,07290008	2,920	4,303

On remarque que :

- Les deux courbes se superposent.
- Selon le test de comparaison des pentes :  $t_{\text{expérimental}} < t_{\text{théorique}}$  : **pas d'effet de matrice.**

### II.1.3. Spécificité :

Le dosage effectué sur le blanc (Echantillon sans AA), dans les mêmes conditions, n'a pas donné de virage de la solution avec des volumes dépassants les 25 ml.

En parallèle pour la même concentration en AA de l'étalon et du produit fini, nous avons obtenu les mêmes chutes de burettes (résultats de l'effet matrice).

Ainsi, nous considérons que la technique de dosage de l'AA dans les comprimés effervescents est spécifique.

**III.1.4. Répétabilité :**

On commence tout d'abord par le calcul en retour des concentrations prédites par la prédiction inverse selon la formule suivante :  $x = \frac{Y-b}{a}$

Le tableaux XII regroupent les masses calculées pour les différents niveaux de concentration répétés trois fois, par extrapolation sur la droite d'étalonnage correspondante.

**Tableau XII :** Les masses calculées pour les différents niveaux de concentration.

Masse introduite d'AA	Volume de l'essai 01	Volume de l'essai 02	Volume de l'essai 03	Masse calculée de l'AA. Essai 01	Masse calculée de l'AA. Essai 02	Masse calculée de l'AA. Essai 03
50	6	6,1	5,9	51,8947368	52,7719298	51,0175439
100	11,9	11,9	11,7	103,649123	103,649123	101,894737
150	17,4	17,2	17,4	151,894737	150,140351	151,894737
200	23,3	23,5	23,3	203,649123	205,403509	203,649123

Les valeurs des estimateurs de la répétabilité sont représentées dans les tableaux ci-dessous.

**Tableau XIII :** Les valeurs des estimateurs de la répétabilité.

Masse introduite d'AA	Moyenne des masses calculées	Ecart type	Coefficient de variation
50	51,8947368	0,877192982	1,690331305
100	103,064327	1,012895209	0,982779623
150	151,309942	1,012895209	0,669417488
200	204,233918	1,012895209	0,495948576

Les coefficients de variation de la répétabilité pour les différentes concentrations sont < 5 %, la méthode est donc répétable.

**III.1.5. Fidélité intermédiaire :**

On commence tout d'abord par le calcul en retour des concentrations prédites par la prédiction inverse des résultats des trois séries.

Les tableaux XIV regroupent les masses calculées pour les différents niveaux de concentration.

**Tableau XIV :** Les masses calculées pour les différents niveaux de concentration.

Masse introduite d'AA	Volume de l'essai 01	Volume de l'essai 02	Volume de l'essai 03	Masse calculée de l'AA. Essai 01	Masse calculée de l'AA. Essai 02	Masse calculée de l'AA. Essai 03
<b>50</b>	6	5,7	5,8	51,8947368	49,2631579	50,1403509
<b>100</b>	11,9	11,8	11,9	103,649123	102,77193	103,649123
<b>150</b>	17,4	17,5	17,4	151,894737	152,77193	151,894737
<b>200</b>	23,3	22,9	22,9	203,649123	200,140351	200,140351

Les valeurs des estimateurs de la fidélité intermédiaire sont représentées dans les tableaux ci-dessous :

**Tableau XV :** Les valeurs des estimateurs de la fidélité intermédiaire.

Masse introduite d'AA	Moyenne des masses calculées	Ecart type	Coefficient de variation
<b>50</b>	50,4327485	1,33993441	2,65687366
<b>100</b>	103,356725	0,5064476	0,48999966
<b>150</b>	152,187135	0,5064476	0,33277951
<b>200</b>	201,309942	2,02579042	1,00630421

Les coefficients de variation de la fidélité intermédiaire sont  $<05\%$ , on considère que la méthode est fidèle.

## III.2. Résultats et discussion de la partie II :

### III.2.1. Résultats de la partie II :

#### III.2.1.1. Description des comprimés :

- Nous avons remarqué un changement progressif de l'aspect (figure 8) des comprimés durant toute la période de travail.

-Néanmoins, ce changement varie selon la température et la modalité de conservation. .



**Figure 8** : aspect des comprimés et du broyat à la fin de l'étude.

-Nous citons ci-après la description des comprimés et du broyat à la fin de l'étude (semaine 06)

**Tableau XVI** : Description des comprimés et du broyat à la fin de l'étude.

Condition	Forme	Couleur (orange)	Friabilité	Bords
Température ambiante (25°C)	Comprimé	++	+++	Lisse et net
	Poudre	+++	/	/
Tube ouvert	Comprimé	+++	+	Irrégulier
	Poudre	++++	/	/
Réfrigérateur à 2°C	Comprimé	+	++++	Lisse et net
	Poudre	++	/	/

++++ : Très intense

++ : Moins intense

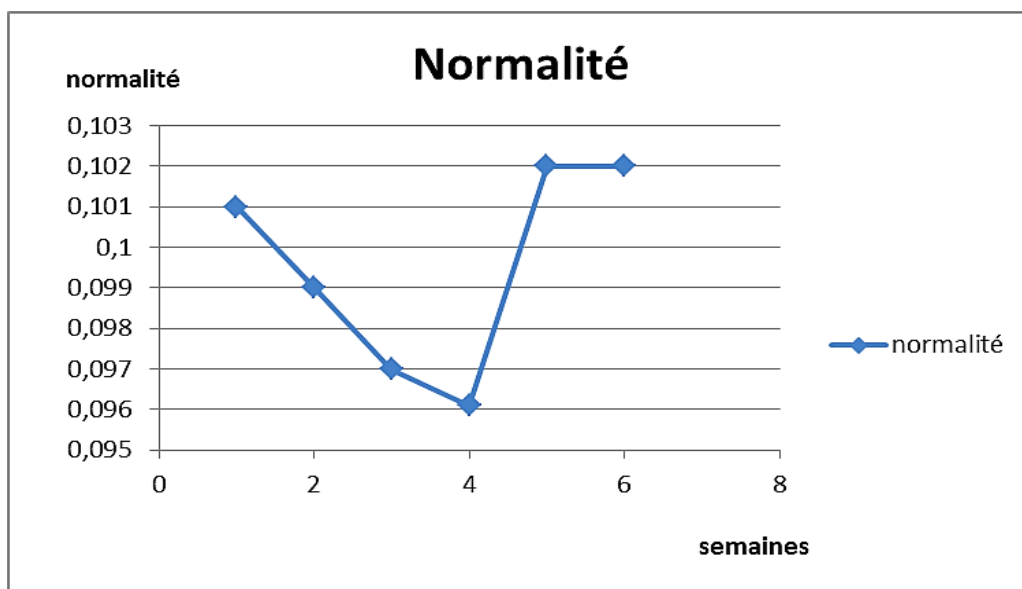
+++ : Plus ou moins intense

+ : faiblement intense

### III.2.1.2. Normalité :

#### III.2.1.2.1. Résultats de la normalité :

- Les résultats de la normalité des 06 semaines sont montrés dans la figure suivante :



**Figure 9** : Résultats de la normalité des 06 semaines d'étude.

-La courbe montre une diminution la normalité jusqu'à la 4<sup>ème</sup> semaine ça indique l'instabilité de la solution d'iode par contre on observe une augmentation au niveau des deux dernières semaines car on a préparé une autre solution d'iode.

-Toute les valeurs sont incluses dans un intervalle de  $(0.1 \pm 0.004)$  N.

### III.2.1.3. Stockage et conservation :

#### III.2.1.3.1. Stockage à T° ambiante :

##### a- Tube fermé :

-C'est le cas où les comprimés utilisés sont conservés dans leur conteneur fermé à température ambiante.

-Pour mieux voir les changements de notre échantillon sous ces conditions, on a effectué les déterminations suivantes :

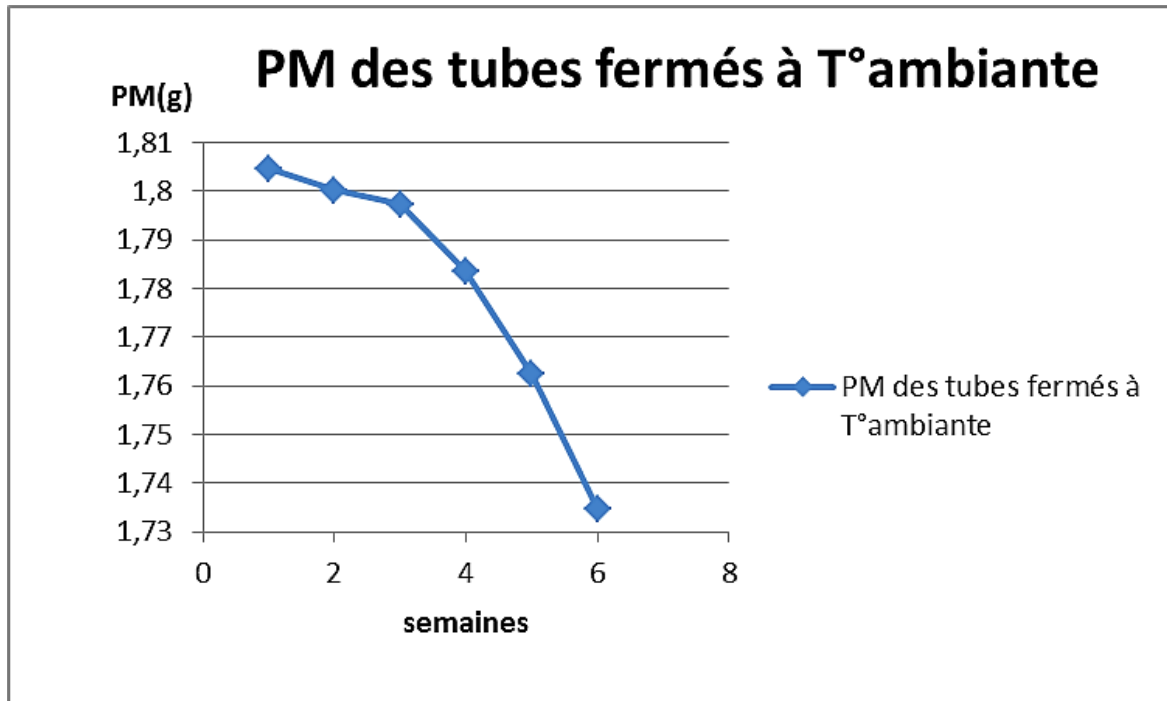
##### Détermination du poids moyen :

Le tableau si dessous présente les résultats des 6 semaines (de la semaine 1 à la semaine 6) concernant le PM à T° ambiante :

**Tableau XVII :** PM des 06 semaines d'étude à température ambiante.

Semaines	PM (g)
Semaine 1	1,8047
Semaine 2	1,7885
Semaine 3	1,7885
Semaine 4	1,7837
Semaine 5	1,7624
Semaine 6	1,7347

Les résultats sont exprimés par suite sous forme de graphe :



**Figure 10 :** PM des tubes fermés à température ambiante.

- Nous avons remarqué une diminution progressive du PM des comprimés avec une moyenne de 1.7770 et une variance de  $6.10^{-4}$ .

- La relation entre la durée de conservation et le PM peut être considérée comme linéaire avec comme équation  $y = -0.012x + 1.820$  et un coefficient de régression  $R^2 = 0.870$ .

- La linéarité est d'autant plus visible à partir de la 3<sup>ème</sup> semaine avec un  $R^2 = 0.924$ .

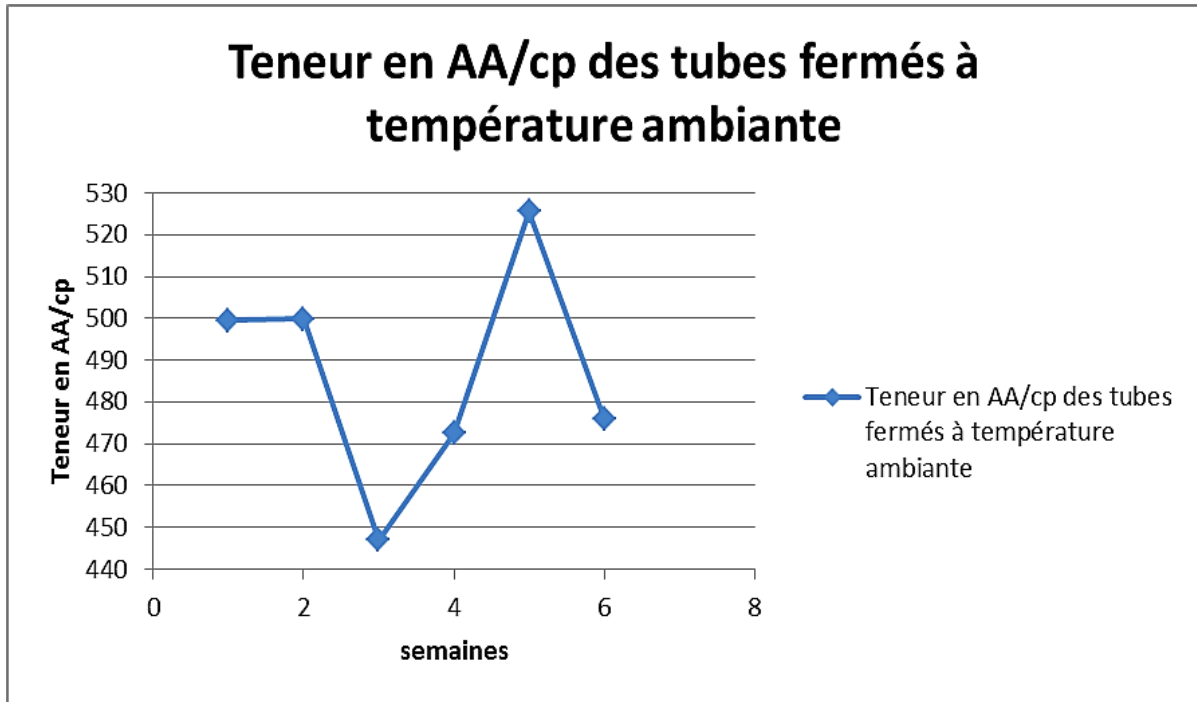
#### ✚ Détermination de la teneur en AA/ Cp :

Les résultats de nos calculs pour les 06 semaines d'étude figurent dans le tableau et la courbe suivants :



Tableau XVIII : Teneur en AA/Cp des tubes fermés à température ambiante.

Semaines	Chute de burette (ml)	PE (g)	PM (g)	Masse en AA/Cp (mg)
Semaine1	16,8	0,5414	1,8047	499,55556
	16,9			
Semaine2	17,2	0,54006	1,8002	499,826267
	17,2			
Semaine3	15,7	0,5392	1,7974	447,037448
	15,7			
Semaine4	16,7	0,5351	1,7837	472,498413
	16,8			
Semaine5	17,6	0,5287	1,7624	525,472727
	17,5			
Semaine6	16	0,5287	1,7347	476,097782
	15,8			

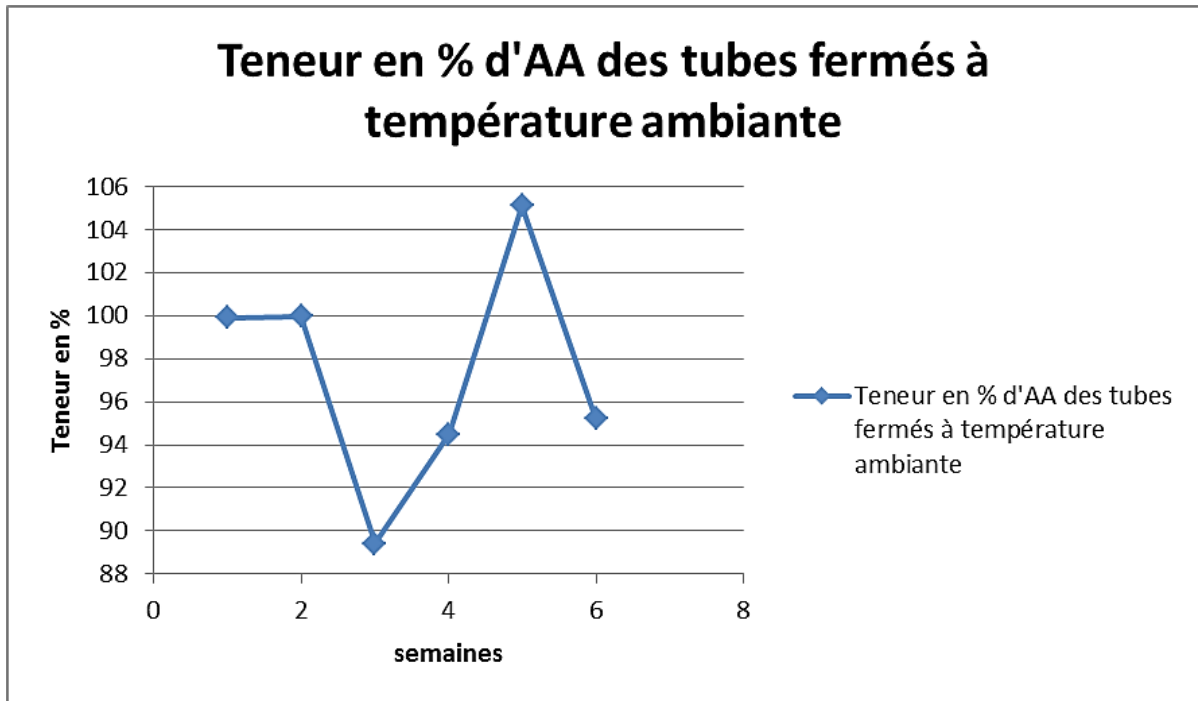


**Figure 11 :** Teneur en AA/Cp des tubes fermés à température ambiante.

- La conformité correspond à la teneur en AA/Cp exprimée en % ; le tableau et la courbe si dessous présentent les résultats obtenus dans notre pratique :

**Tableau XIX :** Conformité des tubes fermés à température ambiante.

Semaines	Teneur en AA/Cp	Teneur en AA en %
Semaine 1	0,99911112	99,9111121
Semaine 2	0,99965253	99,9652533
Semaine 3	0,8940749	89,4074895
Semaine 4	0,94499683	94,4996827
Semaine 5	1,05094545	105,094545
Semaine 6	0,95219556	95,2195564



**Figure 12 :** Teneur en AA en % des tubes fermés à température ambiante.

- Une fluctuation de la teneur a été observée durant les 06 semaines de l'étude.
- La relation entre la teneur et la durée de conservation n'est donc pas linéaire et ne suit pas un ordre logique.
- Toutes les teneurs obtenues se trouvent dans un intervalle allant de 447 mg/Cp jusqu'à 525 mg/Cp, avec une moyenne de 485 mg/Cp.
- Cependant, 5 sur 6 teneurs se trouvent à l'intérieur des limites d'acceptabilité fixées par l'USP, preuve de la conformité des comprimés mais aussi de la stabilité et l'efficacité de l'AA conservé à température ambiante à une courte durée (06 semaines).

**✚ Teneur en eau :**

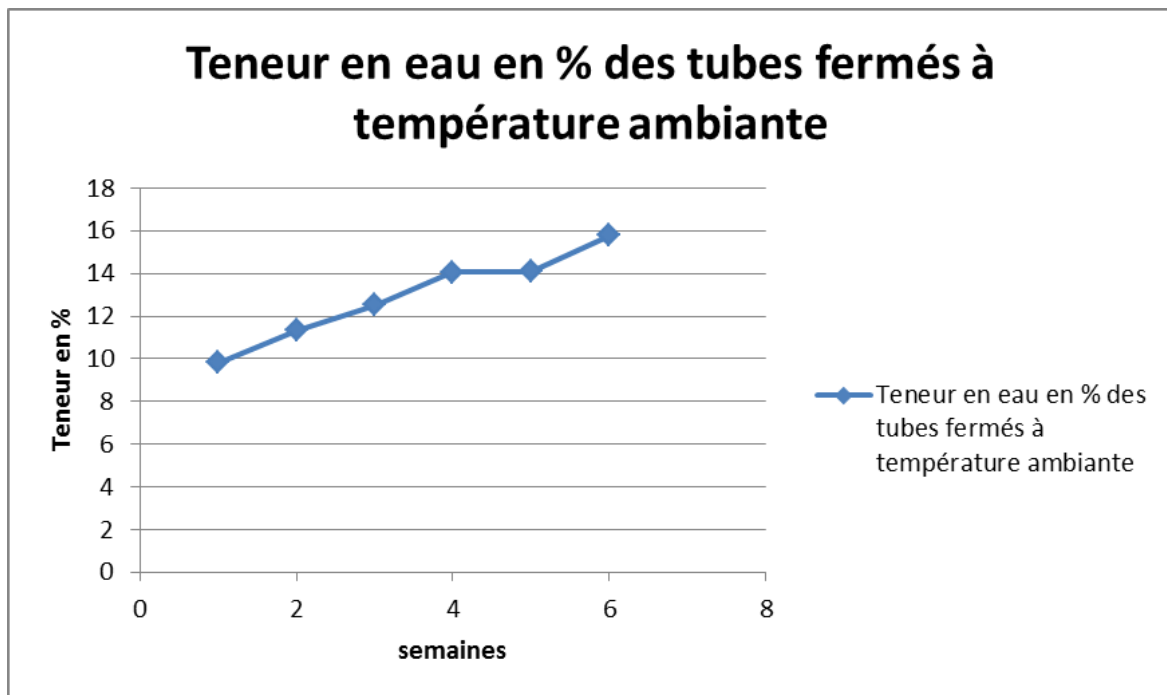
**Résultats :**

On a pu déduire la quantité d'eau présente dans nos échantillons par le test de la perte à la dessiccation ; les résultats sont démontrés par la suite sous forme de tableau :

**Tableau XX** : La teneur en eau en % des tubes fermés à température ambiante.

Semaines	Pi (g)	Psec (g)	Teneur en eau/Cp	Teneur H2O %
Semaine 1	5,3972	4,5454	0,28393333	15,7822575
Semaine 2	5,3665	4,6122	0,25143333	14,055716
Semaine 3	5,3915	4,6325	0,253	14,0777149
Semaine 4	5,4173	4,7387	0,2262	12,5265354
Semaine 5	5,3583	4,7515	0,20226667	11,3244872
Semaine 6	5,322	4,8	0,174	9,80834273

Ces mêmes résultats vont figurer sous forme de courbe par la suite :



**Figure 13** : La teneur en eau en % des tubes fermés à température ambiante.

Les résultats présentent une augmentation de la teneur en eau par rapport à la durée de conservation, la relation entre la teneur en eau et la durée de conservation à température

ambiante est linéaire avec  $y = 46.69x - 7.320$  et un coefficient  $R^2 = 0.969$ .

- Ainsi, le pourcentage en eau augmente de 9,80834273 % à 15,7822575 %.

- Nous avons remarqué que les valeurs de la teneur en eau de nos comprimés étaient importantes, pouvant aller jusqu'à 15% d'eau, elle signale une absorption continue de l'humidité de l'air malgré les échantillons ont été conservé dans des conteneurs hermétiquement clos, probablement à cause de l'ouverture de ces derniers périodiquement.

**b- Tube ouvert :**

Dans cette partie les comprimés utilisés sont conservés à température ambiante mais leur conteneur été ouvert.

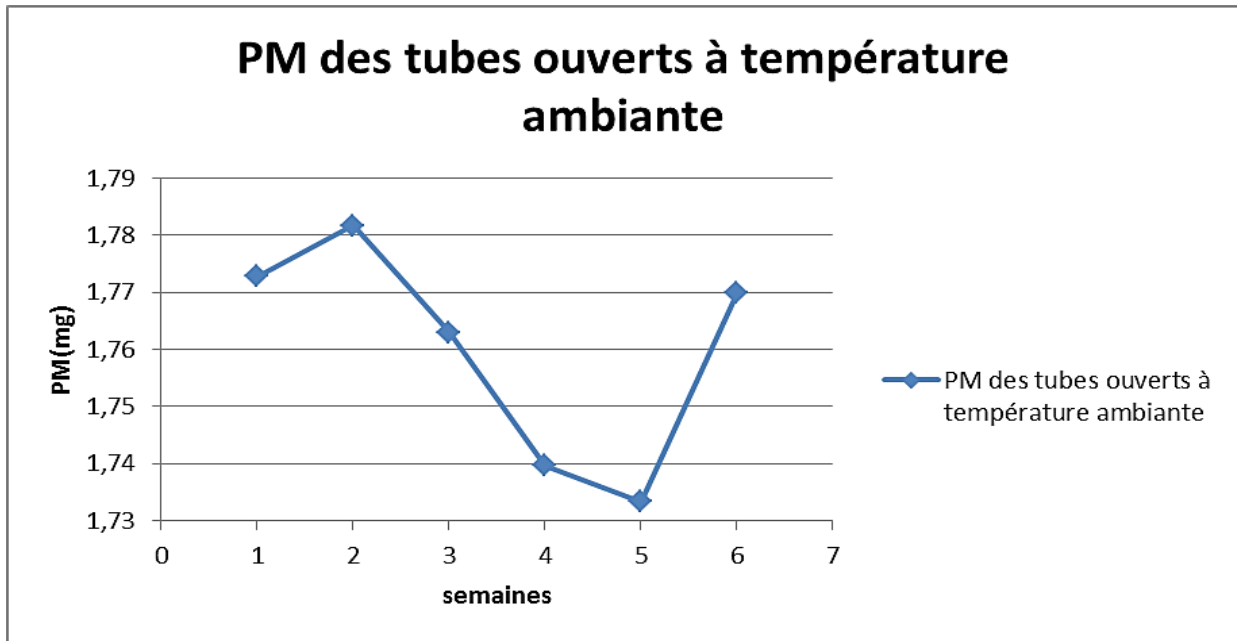
**✚ Détermination du poids moyen :**

Les résultats reportés dans les 06 semaines d'étude sont exprimés par la suite sous forme de tableau :

**Tableau XXI : PM des tubes ouverts à température ambiante.**

Semaines	PM (g)
Semaine 1	1,7728
Semaine 2	1,78173
Semaine 3	1,763
Semaine 4	1,7396
Semaine 5	1,7333
Semaine 6	1,7699

Ces résultats sont reportés sous forme de courbe par la suite :



**Figure 14 :** PM des tubes ouverts à température ambiante.

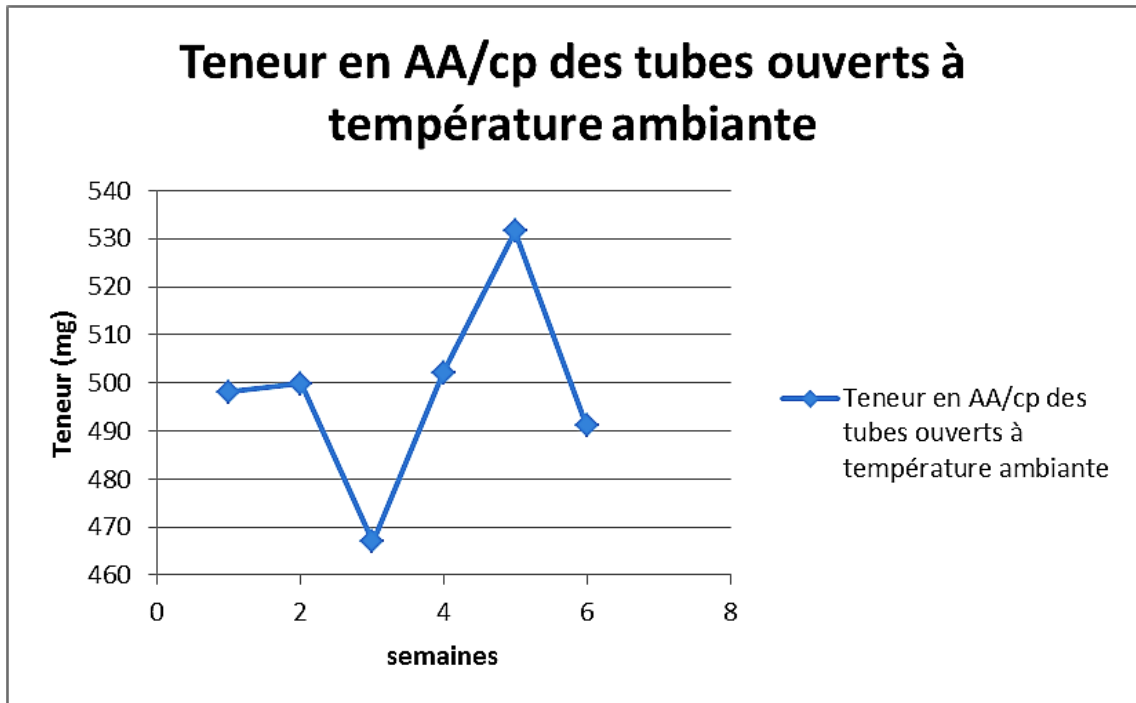
- Globalement, une diminution de PM a été observée entre 2<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> semaine.
- La variation ne l'est pas la même que celle des comprimés conservés dans un tube fermé.
- Cela peut être expliqué par le fait que seul le premier comprimé est en contact direct avec l'air, et qui peut absorber l'humidité.
- Ensuite, on va entamer la détermination de la teneur en AA pour voir si ces conditions ont une influence sur la teneur en AA de notre échantillon des comprimés.

**✚ Détermination de la teneur en AA/Cp :**

- Le tableau et la courbe ci-dessous affichent les résultats obtenus dans nos 06 semaines de travail :

Tableau XXII : Teneur en AA/Cp des tubes ouverts à température ambiante.

Semaines	Chute de burette(ml)	PE (g)	PM (g)	Masse d'AA / Cp(mg)
Semaine 1	16.8	0,53184	1,7728	498,064
	16.8			
Semaine 2	17.2	0,5345	1,78173	499,844034
	17.2			
Semaine 3	16.4	0,5289	1,763	466,951733
	16.4			
Semaine 4	17.8	0,5218	1,7396	502,185314
	17.8			
Semaine 5	17.8	0,5199	1,7333	531,532915
	17.7			
Semaine 6	16.4	0,5309	1,7699	491,086209
	16.4			



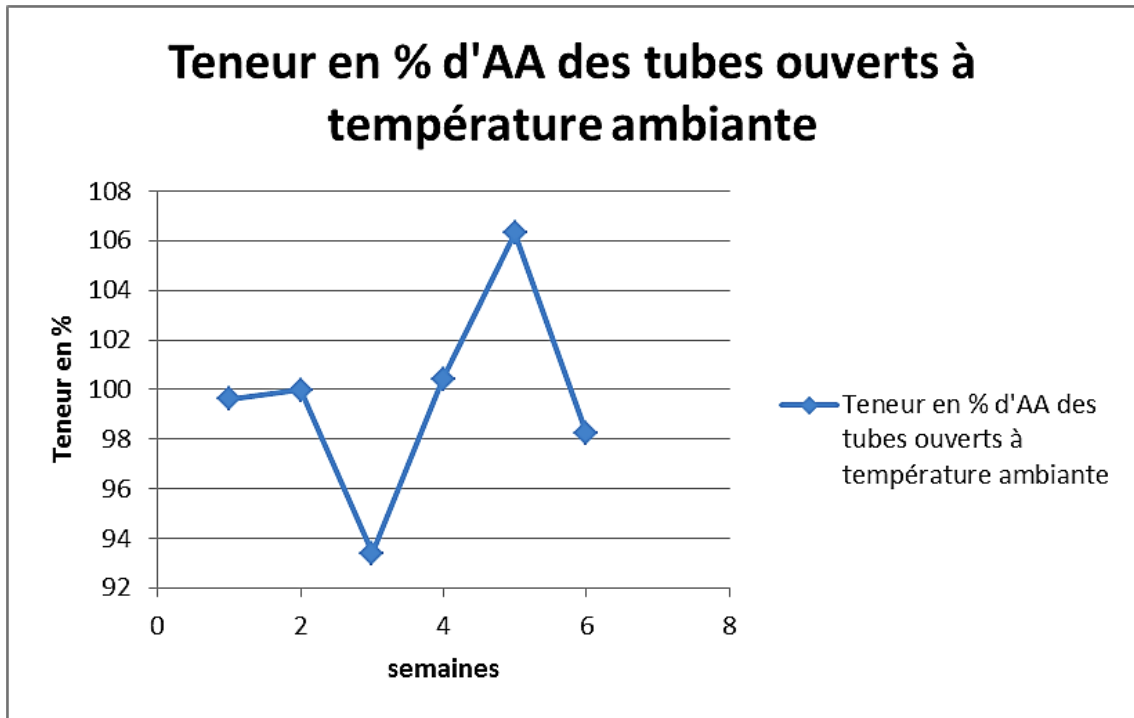
**Figure 15 :** Teneur en AA/Cp des tubes ouverts à température ambiante.

Les résultats obtenus dans les 06 semaines de ce travail sont exposés par la suite sous forme de tableau et de courbe :

**Tableau XXIII :** Teneur en % d'AA des tubes ouverts à température ambiante.

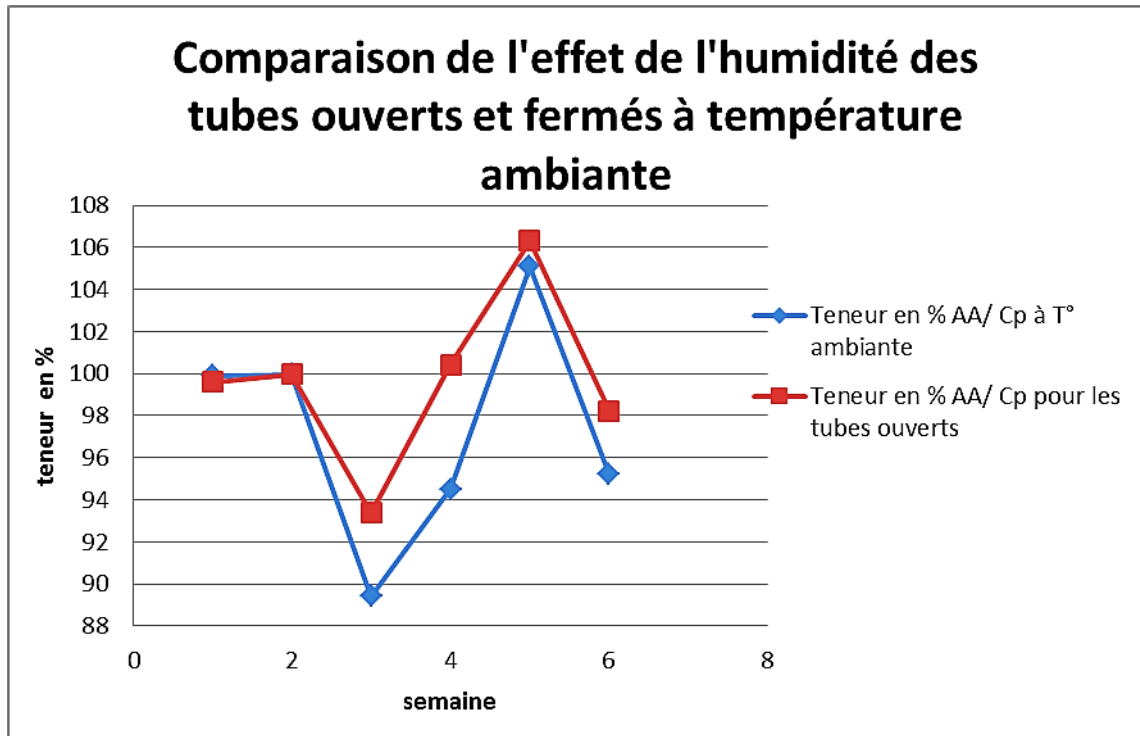
Semaines	Teneur en AA/Cp	Teneur en %
Semaine 1	0,996128	99,6128
Semaine 2	0,99968807	99,9688068
Semaine 3	0,93390347	93,3903467
Semaine 4	1,00437063	100,437063
Semaine 5	1,06306583	106,306583
Semaine 6	0,98217242	98,2172417





**Figure 16 :** Teneur en % d'AA des tubes ouverts à température ambiante.

- Une fluctuation de la teneur a été observée durant les 06 semaines de l'étude.
- La relation entre la teneur et la durée de conservation n'est donc pas linéaire et ne suit pas un ordre logique.
- Toutes les teneurs obtenues se trouvent dans un intervalle allant de 466 mg/Cp jusqu'à 531mg/Cp, avec une moyenne de 498mg/Cp.
- Ainsi que toutes les teneurs se trouvent à l'intérieur des limites d'acceptabilité fixées par l'USP, preuve de la conformité des comprimés mais aussi de la stabilité et l'efficacité de l'AA conservé à température ambiante à une courte durée (06 semaines).
- Pour évaluer l'importance d'effet de l'humidité on compare les 2 graphs :



**Figure 17 :** Comparaison de l’effet d’humidité des tubes ouverts et fermés à température ambiante.

-Par une comparaison visuelle des deux graphes concernant les tubes ouverts et les tubes fermés à température ambiante ; on peut dire que le fait de laisser le conteneur ouvert à température ambiante n’a pas donné un grand effet sur notre échantillon de comprimés utilisés car les deux graphes sont presque superposés.

**III.2.1.3.2. Stockage à basse température :**

- Dans cette partie, on va voir les différentes modifications sur les comprimés de la vitamine c stockés à basse température (2°C).

- Pour bien figurer ces modifications on déterminera les paramètres suivants :

**a- Détermination de poids moyen :**

Le tableau et la courbe suivants montrent les résultats obtenus dans les 06 semaines de notre étude :

Tableau XXIV : PM des tubes conservés à basse température.

Semaines	PM(g)
Semaine 1	1,7825
Semaine 2	1,7885
Semaine 3	1,79113
Semaine 4	1,7987
Semaine 5	1,7933
Semaine 6	1,7785

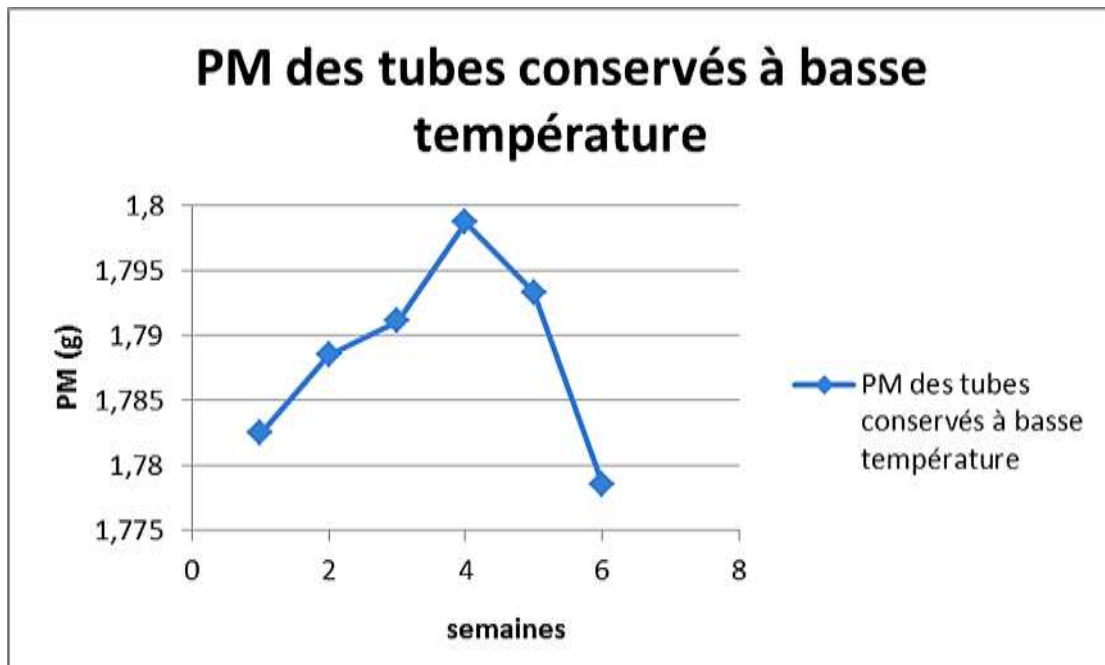


Figure 18 : PM des tubes conservés à basse température.

-Les résultats montrent une augmentation du poids moyen durant la conservation sous réfrigération à 2°C,

- Toutes les valeurs se situent dans un intervalle de  $1.788 \pm 0.01$  g.

-La variation de PM est minime (10mg) peut être due à la précision de la balance.

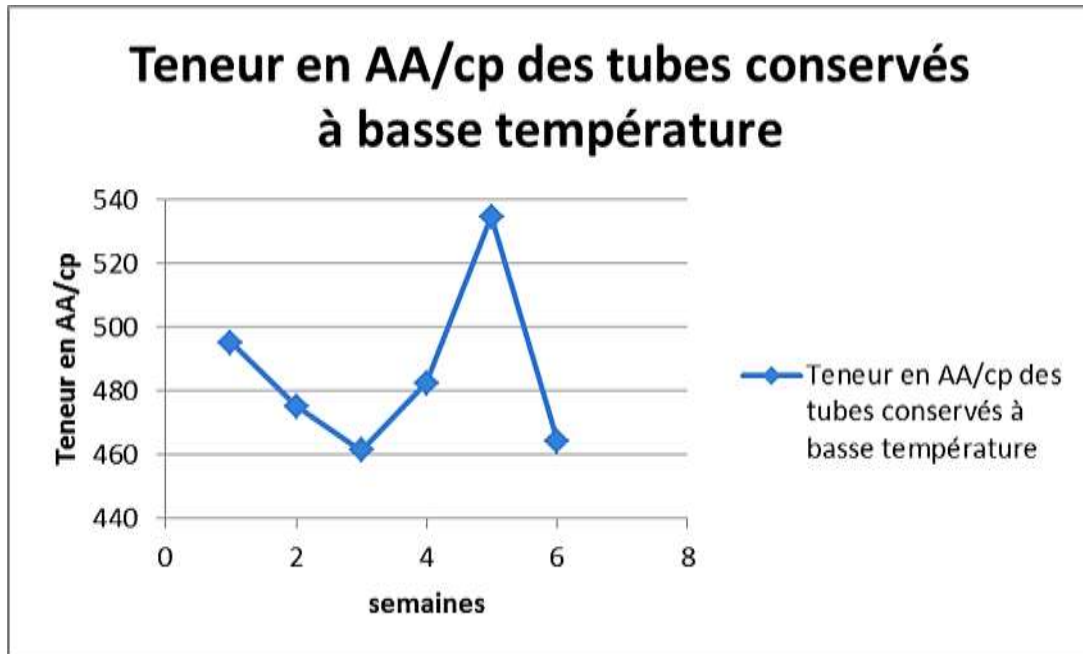
**b- Détermination de la teneur en AA/Cp :**

- Les résultats des 06 semaines de notre étude sont reportés sur le tableau suivant :

**Tableau XXV : Teneur en AA/Cp des tubes conservés à basse température**

<b>Semaines</b>	<b>Chute de burette (ml)</b>	<b>PE (g)</b>	<b>PM(g)</b>	<b>Masse en AA/Cp (mg)</b>
<b>Semaine 1</b>	16.7	0.53475	1.7825	495,099333
	16.7			
<b>Semaine 2</b>	16.3	0.5365	1.7885	475,16983
	16.4			
<b>Semaine 3</b>	16.2	0.5373	1.79113	461,29068
	16.2			
<b>Semaine 4</b>	17.1	0.5396	1.7987	482,371439
	17.1			
<b>Semaine 5</b>	17.9	0.5379	1.7933	534,52437
	17.8			
<b>Semaine 6</b>	15.5	0.5335	1.7785	464,11866
	15.5			

-Ces résultats sont reportés sur la courbe suivante :

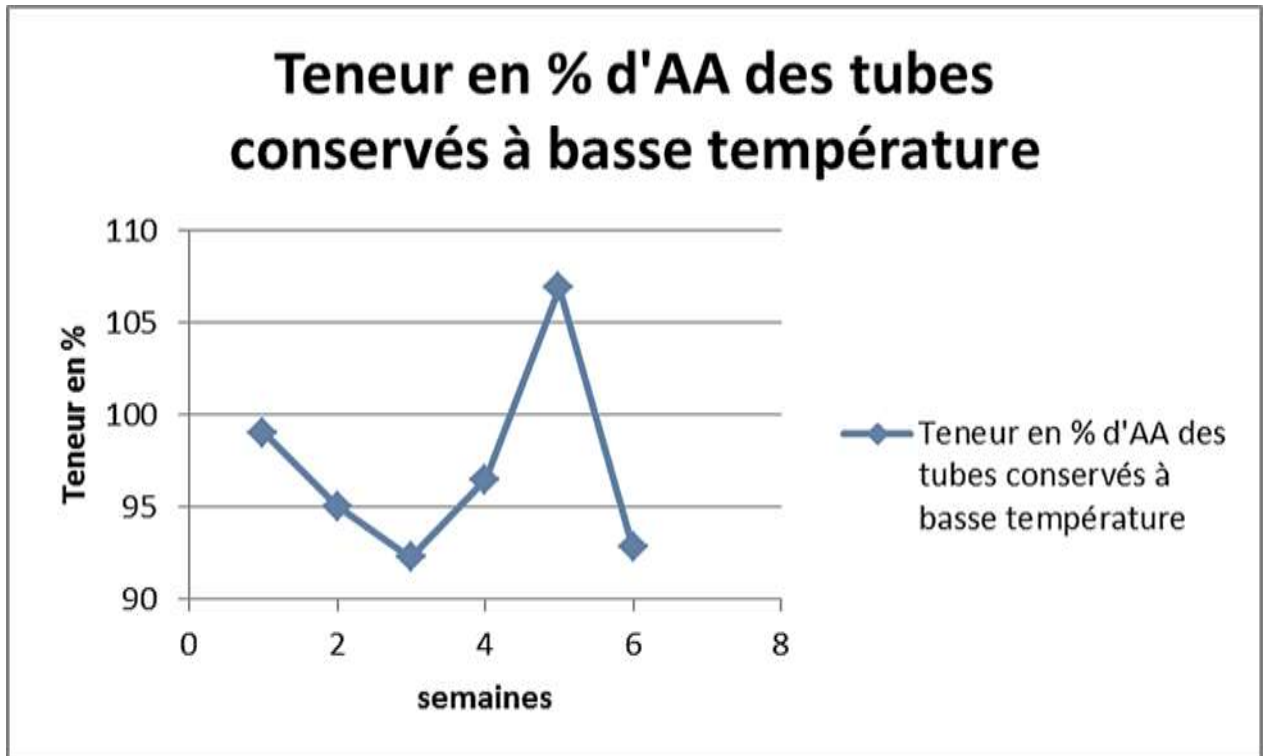


**Figure 19** : Teneur en AA/Cp des tubes conservés à température basse.

-Nous avons reporté nos résultats concernant les 06 semaines sous forme de tableau et courbe par la suite :

**Tableau XXVI** : Teneur en % d'AA des tubes conservés à basse température.

Semaines	Teneur en AA/cp	Teneur en %
Semaine 1	0,99019867	99,0198667
Semaine 2	0,95033966	95,033966
Semaine 3	0,92258136	92,2581361
Semaine 4	0,96474288	96,4742879
Semaine 5	1,06904874	106,904874

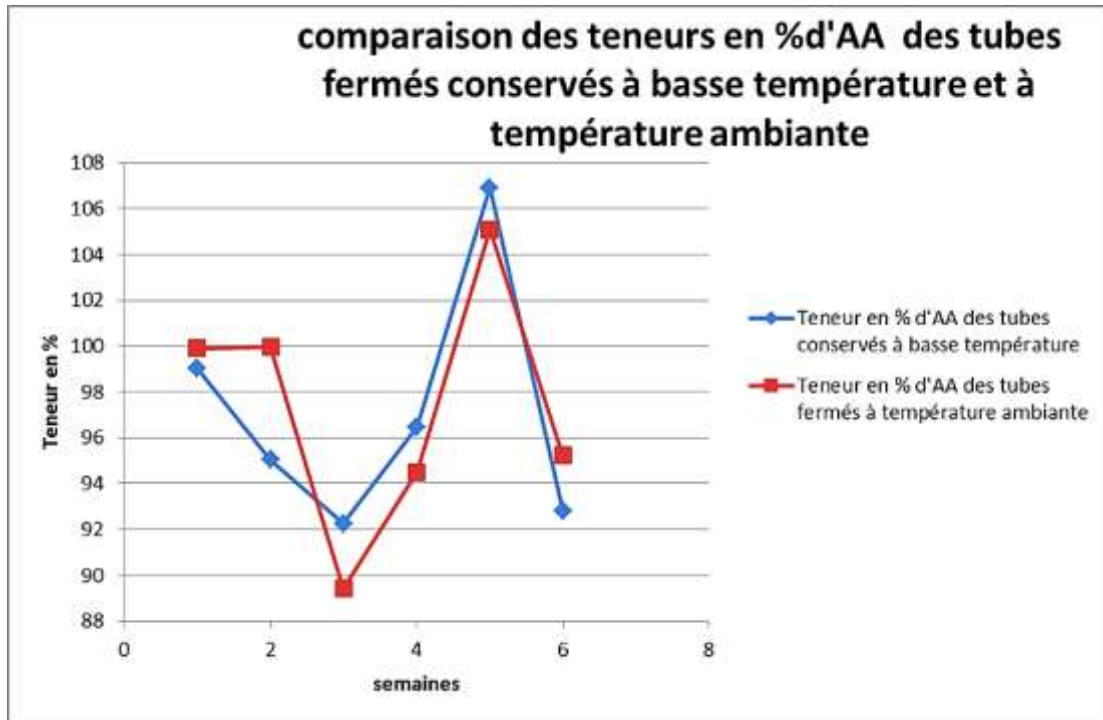


**Figure 20 :** Teneur e % d'AA des tubes conservés à basse température.

- Une fluctuation de la teneur a été observée durant les 06 semaines de l'étude.
- La relation entre la teneur et la durée de conservation n'est donc pas linéaire et ne suit pas un ordre logique.
- Toutes les teneurs obtenues se trouvent dans un intervalle allant de 461mg/Cp jusqu'à 534mg/Cp, avec une moyenne de 485mg/Cp.
- Toute les résultats obtenus sont inclus à l'intérieur des limites d'acceptabilité fixées par l'USP, preuve de la conformité des comprimés mais aussi de la stabilité et l'efficacité de l'AA conservé à température ambiante à une courte durée (06 semaines).

#### **III.2.1.4. Comparaison des résultats de la teneur en % d'AA des tubes fermés à température ambiante et à basse température :**

Les résultats sont comparés sous formes de courbes :



**Figure 21 :** Comparaison des teneurs en % d'AA des tubes fermés conservés à basse température et à température ambiante.

-Nous avons remarqué que les deux graphes ont le même aspect,

-Quelques soit la température de conservation dans les tubes fermés ; nous avons obtenu les mêmes résultats, c'est une preuve de conformité et de stabilité durant les 06 semaines d'étude.

### III.2.1.5. Effet de la température :

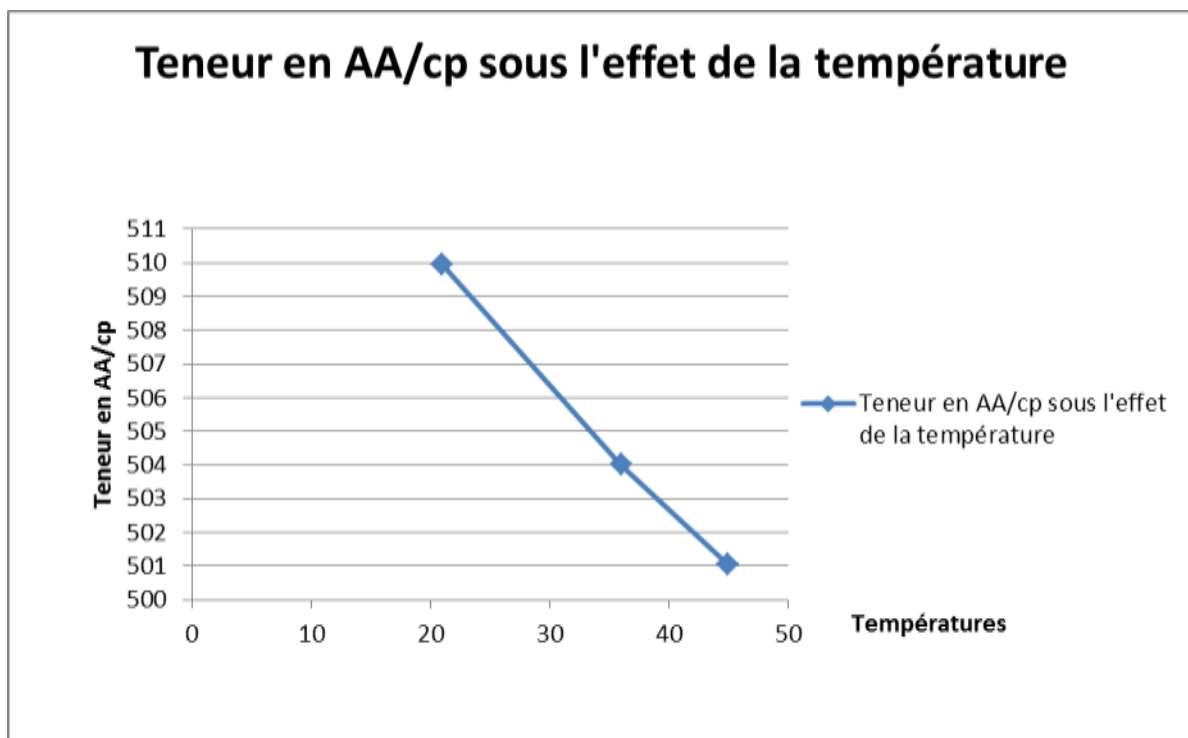
- Les résultats de cette partie sont démontrés ci-dessous sous forme de tableau et de courbe ;

**Tableau XXVII :** Chute de burette pour l'effet de température.

Essai	21°C	36°C	45°C
Essai1	V(I <sub>2</sub> ) =17.3ml	V(I <sub>2</sub> ) =17ml	V(I <sub>2</sub> ) =16.9ml
Essai2	V(I <sub>2</sub> ) =17.1ml	V(I <sub>2</sub> ) =17ml	V(I <sub>2</sub> ) =16.9ml

**Tableau XXVIII :** Teneur en AA/Cp sous l'effet de température.

Température	Moyenne de chute de burette (ml)	Masse d'AA/Cp (mg)
25°C	17,2	509,9320855
36°C	17	504,002642
45°C	16,9	501,037921

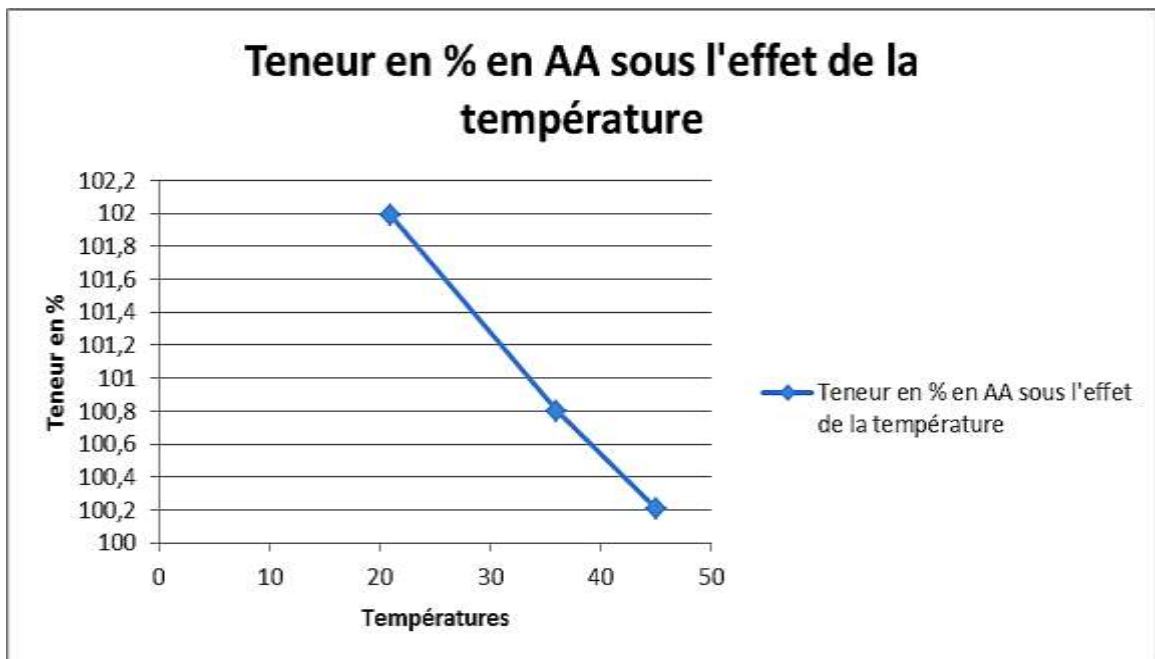


**Figure 22 :** Teneur en AA/Cp sous l'effet de température.



**Tableau XXIX :** Teneur en % en AA sous l'effet de température.

Température (°C)	Teneur en AA	Teneur en %
25	1,01986417	101,986417
36	1,00800528	100,800528
45	1,00207584	100,207584



**Figure 23 :** Teneur en % en AA sous l'effet de température.

- Les résultats donnent une droite décroissante des teneurs la fonction est linéaire ou  $y = -0.074x + 103.5$  avec  $R^2 = 0.998$ , une réduction a eu lieu, ce qui prouve la corrélation négative entre la température et la teneur en AA. Néanmoins les teneurs sont toujours dans la limite acceptable,

#### III.2.1.6. Effet de la dissolution :

Les résultats obtenus figurent par la suite sous forme de tableau et de graphe :

**Tableau XXX** : Chute de burette de l'effet de la dissolution.

Volume d'I <sub>2</sub> (ml)	T0	15 min	30 min	60 min	02h	06h	24h
<b>Essai 1</b>	17,2	17,1	16,9	16,7	16,5	16,2	16,1
<b>Essai 2</b>	17,2	17	16,8	16,7	16,4	16,2	16,1

**Tableau XXXI** : Teneur en AA/Cp sous l'effet de la dissolution.

Temps de préparation	Moyenne de Chute de burette (ml)	Masse d'AA/Cp (mg)
<b>0min</b>	17,2	499,826267
<b>15min</b>	17,05	495.46
<b>30min</b>	16,85	489,6553835
<b>60min</b>	16,7	485,296433
<b>120min</b>	16,45	478,0315165
<b>360min</b>	16,2	470,7666
<b>1440min</b>	16,1	467,860633

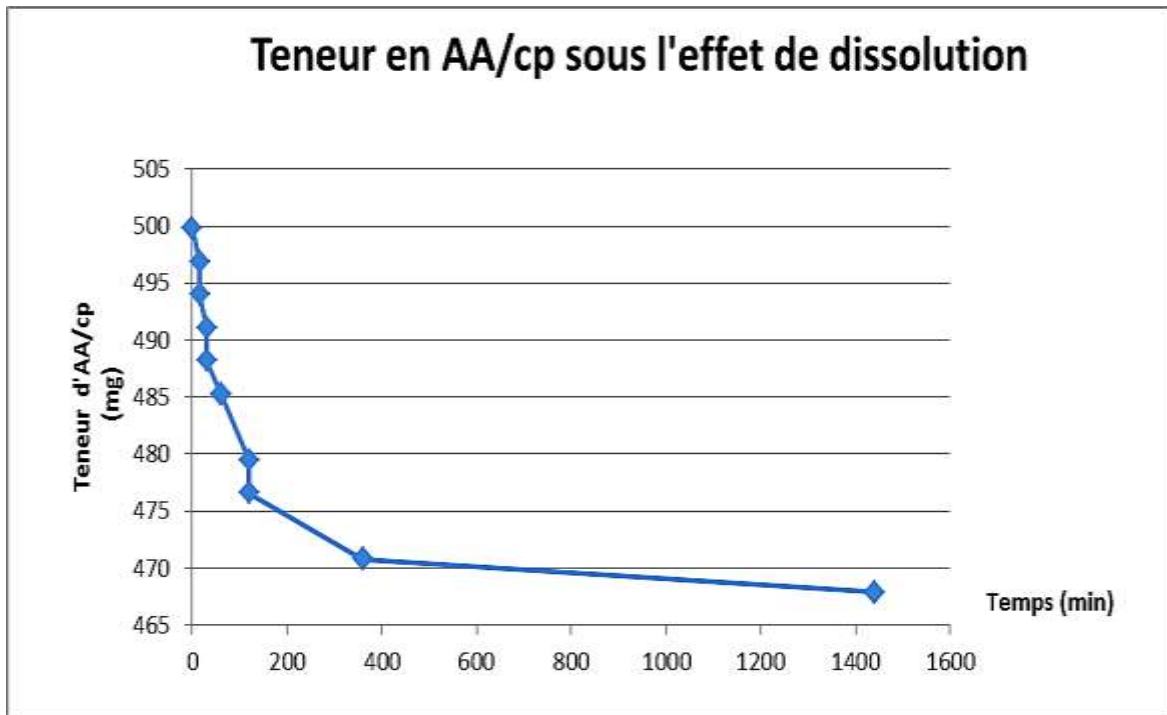
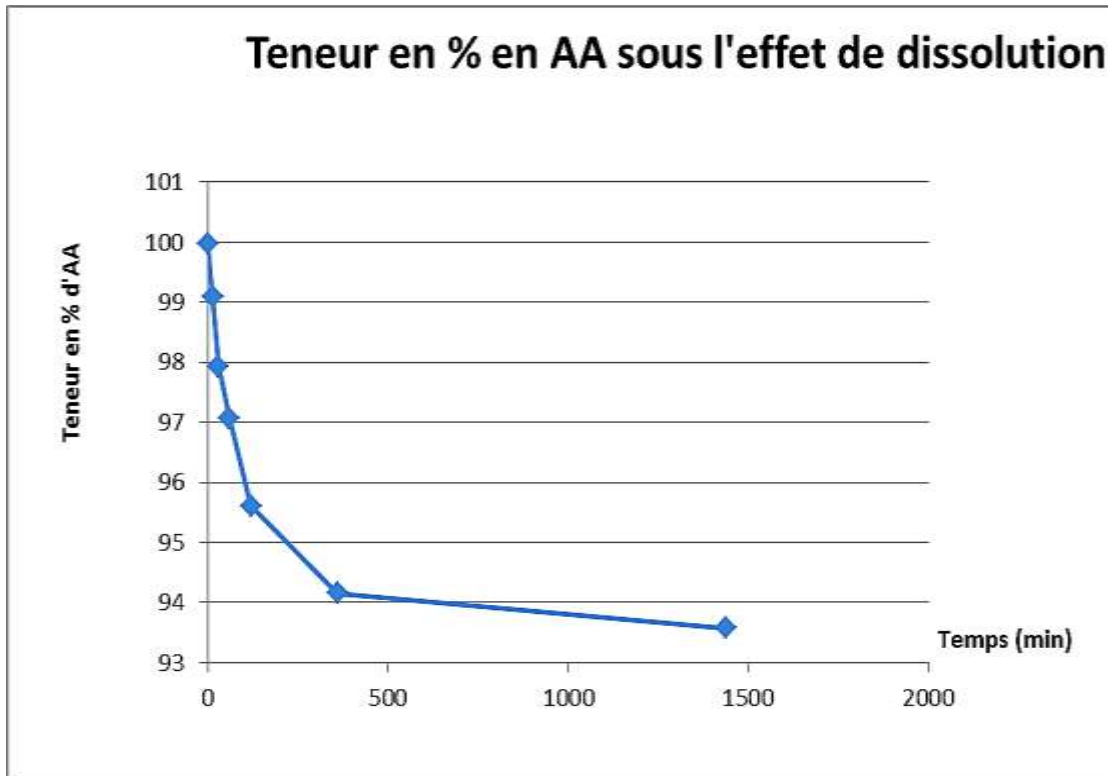


Figure 24 : Teneur en AA/Cp sous l'effet de la dissolution.

**Tableau XXXII** : Teneur en % en AA sous l'effet de la dissolution.

<b>Temps de préparation</b>	<b>Teneur en AA</b>	<b>Teneur en %</b>
<b>0min</b>	0,99965253	99,9652533
<b>15min</b>	0.990934634	99,0934634
<b>30min</b>	0.979310767	97,9310767
<b>60min</b>	0,97059287	97,059287
<b>120min</b>	0.956063034	95,6063034
<b>360min</b>	0,9415332	94,15332
<b>1440min</b>	0,93572127	93,572127



**Figure 25 :** Teneur en % en AA sous l'effet de la dissolution.

- La masse en AA a subi une chute progressive, plus le temps passe, plus la teneur diminue, qui signale l'importante influence du temps de mise en contact avec de l'eau.
- Une décroissance progressive allant de 100% jusqu'à 93%.
- Les résultats sont en accord avec les données de la littérature.

Plus le contact avec l'eau est grand, plus l'AA est instable, ce qui justifier une perte de conformité et une perte d'efficacité.

### III.3. Discussion générale :

A partir de ces constatations on a pu développer une technique simple, rapide et efficace qui nous a permis de doser l'AA dans les comprimés effervescents en étant inspiré par la pharmacopée européenne, britannique et américaine. Cette technique est adaptée à l'analyse en routine, ainsi à nos besoins pour réaliser notre étude, cela est grâce à la disponibilité du matériel et réactifs.

Nous avons réussi à élaborer une méthode de dosage par iodométrie, qui a été validée selon les normes d'ICH et SFSTP pharma.

Durant notre étude, on a visé aussi à savoir l'effet de la température sur la conservation et la modalité de conservation à court terme.

D'après nos résultats on a pu démontrer que la température n'avait pas d'effet sur les comprimés de vitamine c conservés a courte durée (six semaines), ces comprimés étaient conformes pour les deux niveaux de température que ça soit à température ambiante (21 °c) ou à température basse (2°c), les résultats étaient presque semblables ce qui signifie : une absence de dégradation ce qui a permis de maintenir la stabilité.

Ces résultats sont en accord avec la littérature, citons les travaux de Rubin et al.

Par contre on trouve des discordances avec les travaux de M. WORLAKO KLU et al (en année 2016), Selon leur expérience, les concentrations d'acide ascorbique conservées, dans des conditions de stockage différentes, diminuent à des rythmes différents avec le temps. Le pourcentage de perte d'acide ascorbique est très important dans les comprimés stockés à température ambiante par rapport au stockage dans un réfrigérateur, donc, ils considèrent que toute augmentation de température favorise l'instabilité de la vitamine c. (54)

L'analyse d'effet de température su la stabilité de l'AA a fait aussi l'objet de l'étude d'Oyetade et al (en 2012), selon les résultats, il y avait une corrélation négative entre le temps de conservation et la teneur en acide ascorbique à différentes températures. Cependant, la corrélation négative entre les variables n'était pas significative dans des conditions de réfrigération. (55)

Concernant les résultats de la conservation de la vitamine c à court terme, selon deux manières (dans un tube ouvert ou un tube fermé), on a noté une fluctuation des teneurs en AA tout en gardant la conformité, ce qui implique une conservation de la stabilité.

En revanche, une étude (en 2012) vient s'opposer à nos constats, cette dernière a vérifié la stabilité des comprimés mis sous une température ambiante avec l'ouverture du contenant, il y avait une réduction marquée de la teneur en acide ascorbique avec la durée d'exposition. (55)

A partir des constatations qui concernent l'étude de stabilité sous différents facteurs de conservation nous n'avons pas remarqué une diminution significative de la stabilité pendant les six semaines d'étude, alors on peut dire que la stabilité n'était pas altérée.

L'étude d'effet de la température a révélé une diminution de la teneur d'AA lors de l'augmentation de la température avec un maximum de réduction à 40° c, néanmoins les comprimés restent conformes selon la limite d'acceptation de l'USP. Cela peut être soutenu par Jutkus et al (en 2015) ou ils ont constaté qu'il n'y avait pas de différences significatives entre les stabilités chimiques de l'acide ascorbique entreposé à 22 et 35°C par contre pour les échantillons d'AA entreposés à 40, 50 et 60°C, l'augmentation de la température a entraîné une plus grande instabilité chimique. (53).

Parmi nos objectifs est de voir aussi l'effet de la dissolution, une chute de la teneur d'AA a été observé, ceci peut dire que l'eau rend l'AA instable. Ce résultat est en accord avec la littérature, Bien que l'eau soit le meilleur solvant pour fournir une solution d'AA, elle est paradoxalement l'un des moins privilégiées pour protéger l'AA contre les dommages oxydatifs, en raison de la présence des ions métalliques, l'eau et surtout l'oxygène dissous dans l'eau (51, 57)

En revanche, on peut dire que les comprimés restent toujours conformes pour la conservation à court terme, quel que soit les conditions de stockage.

#### **IV. Limites :**

En dépit des bons résultats qu'on a pu avoir, cette technique est longue, où elle nécessite un étalonnage préalable de la solution d'iode par la solution de thiosulfate, ce dernier doit être aussi étalonné par l'iodate de potassium, par manque de ce dernier, on était obligé de préparer la solution de thiosulfate fréquemment.

La validation a été réalisée à l'aide d'une gamme d'étalonnage, sans avoir recours aux standards de validation et cela est dû à la non-disponibilité des excipients, donc nous n'avons pas respecté les recommandations exactes de la SFSTP pharma.

Les discordances remarquées avec les travaux de stabilité de la vit c tel que : worlako et oyetade et de hattendorf sont, probablement, le résultat d'une mauvaise uniformité des teneurs des comprimés utilisés dans notre travail d'une part, et d'une autre part l'usage de 3 comprimés pour nos tests au lieu de 20 comprimés comme le décrit la british pharmacopoeia ce qui a fait augmenter le risque d'erreur.

# **Conclusion et perspectives**



## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

---

### CONCLUSION ET PERSPECTIVES :

En conclusion on peut dire qu'on avait pu atteindre nos objectifs, où on a arrivé à développer et valider une technique simple et adaptée à l'analyse laborieuse ,par le biais de cette méthode on a pu récolter plusieurs résultats concernant la stabilité de la vitamine c en forme de comprimés effervescents sous forme de différents facteurs environnementaux .Durant notre travail ,qui a durée 6 semaines ,on a prouvé que la conservation ,à température ambiante (21°C) , à basse température ( 2°C) , et dans un tube ouvert , n'a dans aucun cas altérée la stabilité de la vitamine c. Néanmoins les essais sous différents niveaux de températures (25°C ,35°C, 45°C), ainsi que celle d'effet de dissolution ont démontré une perte de la stabilité.

Bien que ce travail était réalisé, on s'est retrouvé limités par plusieurs contraintes, citons : le manque de la gamme de validation et de réactifs (tel que l'iodate  $KIO_3$ ), l'utilisation de 3 comprimés au lieu de 20 comprimés comme le décrit la pharmacopée européenne.

Pour surmonter ces difficultés, on peut envisager plusieurs alternatives :

- La réalisation d'une étude de conservation à long terme
- L'application du contrôle qualité préalable du produit tel que les tests de l'uniformité de masse, ou l'uniformité de teneur.
- L'utilisation d'une technique normalisée par exemple la spectrophotométrie en UV ou bien l'HPLC sur différents types de matrices.

Compte tenu de ces points, on conseil la conservation des comprimés effervescents de la vitamine C dans leur contenants fermés à basse température (préférentiellement au réfrigérateur) et à l'abri de la lumière.

# **Bibliographie**

## Bibliographie

---

1. Boudia F, Dali AA, Mekaouche FZN, Fetati H, Senhadji I, Chaib H, et al. Automédication et conseil pharmaceutique en période de pandémie de COVID-19 à Oran. *Alger J health sci(Online Oran)*. 2021;30-7.
2. Mahdavi-Roshan M, Rezazadeh A, Joukar F, Khorshidi Y, Naghipour M, Mansour-Ghanaei F. Dietary supplements consumption and its association with socioeconomic factors, obesity and main non-communicable chronic diseases in the north of Iran: the PERSIAN Guilan Cohort Study (PGCS). *BMC nutrition*. 2021;7(1):1-8.
3. Les vitamines [Internet]. [cited 18 jun 2022]. Available from: [http://campus.cerimes.fr/nutrition/enseignement/nutrition\\_10/site/html/cours.pdf](http://campus.cerimes.fr/nutrition/enseignement/nutrition_10/site/html/cours.pdf).
4. Hickey S, Saul AW. *Vitamin C: The Real Story : the Remarkable and Controversial Healing Factor*: Basic Health Publications; 2008.
5. Olabisi AO. *The chemistry of L-ascorbic acid derivatives in the asymmetric synthesis of C2- and C3-substituted aldono- $\gamma$ -lactones*: Wichita State University; 2005.
6. Vitamine C ou acide ascorbique [Internet]. Maisons-Alfort Cedex, France: Anses; [cited 2022 18 Jun]. Available from: <https://www.anses.fr/fr/content/vitamine-c-ou-acide-ascorbique>.
7. Davies MB, Austin J, Partridge DA, Chemistry RSo. *Vitamin C: Its Chemistry and Biochemistry*: Royal Society of Chemistry; 1991.
8. Valdez L. *Encyclopedia of Vitamins: New Research (4 Volume Set)*: Nova Medicine & Health; 2019.
9. Cook GC. Scurvy in the British Mercantile Marine in the 19th century, and the contribution of the Seamen's Hospital Society. *Postgrad Med J*. 2004;80(942):224-9.
10. European pharmacopoeia. In: (EDQM), editor. *ASCORBIC ACID Acidum ascorbicum*. Vol.1. 10<sup>th</sup> ed. 67075 Strasbourg Cedex, France Council of Europe; 2019. p. 1877-9.
11. PubChem. [Internet]. Bethesda (MD):National library of medicine (US), National center for biotechnology information,2004-.Ascorbic acid [cited 2022 Apr. 16]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ascorbic-acid>.

## Bibliographie

---

12. ACS. [Internet]:American chemical society (US).Ascorbic acid [cited 2022 Apr. 16] Available from: <https://www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-theweek/archive/a/ascorbic-acid.html>
13. Espacecorps-espritforme. [Internet]: Resvératrol et vitamine C associés pour la santé de la peau [ cited 2022 Apr. 16] Available from : <https://www.espacecorps-espritforme.fr/resveratrol-et-vitamine-c-associes-pour-la-sante-de-la-peau/17194>
14. Streller S, Roth K. Von Seefahrern, Meerschweinchen und Citrusfrüchten. Der lange Kampf gegen Skorbut. Chemie in unserer Zeit. 2009;43(1):38-54.
15. Duncan SE, Chang H-H. Chapter Two - Implications of Light Energy on Food Quality and Packaging Selection. In: Henry J, editor. Advances in Food and Nutrition Research. 67: Academic Press; 2012. p. 25-73.
16. Barrita JLS, Sánchez, M. d. S. S. Antioxidant Role of Ascorbic Acid and His Protective Effects on Chronic Diseases [Internet] London: IntechOpen; [updated 2013; cited 2022 Apr 23]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/44846>
17. Schwartz E. La vitamine c [thèse]: Université du Quebec a Chicoutimi; 2016.
18. Organization WH. Vitamin and mineral requirements in human nutrition: World Health Organization; 2004.
19. Zempleni J, Suttie JW, Gregory JF, Stover PJ. Handbook of Vitamins. 5eme ed: CRC Press; 2013.
20. Combs GF. The Vitamins : fundamental aspects in nutrition and health. 4eme ed: Elsevier Science; 2012.
21. Combs GF, McClung JP. The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health. 5 ed: Elsevier Science; 2017.
22. Yang W, Xu H. Industrial Fermentation of Vitamin C. Industrial Biotechnology of Vitamins, Biopigments, and Antioxidants2016. p. 161-92.
23. Chang SK, Ismail A, Daud ZAM, editors. Ascorbic Acid: Properties, Determination and Uses2016.

## Bibliographie

---

24. Hossu A, Magearu V. Determination of vitamin C in pharmaceutical products with physico-chemical and bioanalytical technics. *Romanian Biotechnological Letters*. 2004;9:1497-504.
25. Pachla LA, Reynolds DL, Kissinger PT. Analytical Methods for Determining Ascorbic Acid in Biological Samples, Food Products, and Pharmaceuticals. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*. 2020;68(1):1-12.
26. Catherine B. Prédiction de la dégradation de la vitamine C en conditions de traitement thermique: étude en milieu modèle liquide entre 50 et 90° C: Paris, AgroParisTech; 2016.
27. Arya S, Mahajan M, Jain P. Non-spectrophotometric methods for the determination of vitamin C. *Analytica Chimica Acta*. 2000;417(1):1-14.
28. Gupta SRN. Development of Calibration and Standard Addition Polarographic Determination of Ascorbic Acid. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*. 2015;6(2):86.
29. Kirk M. Polarographic determination of ascorbic acid. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*. 1941;13(9):625-6.
30. Page JE. APPLICATIONS OF POLAROGRAPHY IN PHARMACEUTICAL ANALYSIS. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1952;4.
31. Lento H, Daugherty C, Denton A. Ascorbic acid measurement, polarographic determination of total ascorbic acid in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1963;11(1):22-6.
32. Škrovánková S, Mlček J, Sochor J, Baroň M, Kynický J, Juríková T. Determination of ascorbic acid by electrochemical techniques and other methods. *International Journal of Electrochemical Science*. 2015.
33. Pérez-Ruiz T, Martínez-Lozano C, Sanz A. Flow-injection chemiluminometric determination of ascorbic acid based on its sensitized photooxidation. *Analytica chimica acta*. 1995;308(1-3):299-307.
34. Kakumba Jocelyn M, Kialengila D, Adelard M, Jeremie M, Mabaya T. Development and Validation of a UV/vis Spectrometric Method for Determination of Ascorbic Acid in Pur State (Raw Material) and Dosage Forms. 2021;6:696-701.

## Bibliographie

---

35. Selimović A, Salkić M, Selimović A. Direct spectrophotometric determination of L-ascorbic acid in pharmaceutical preparations using sodium oxalate as a stabilizer. *Int J Basic Appl Sci.* 2011;11(2):106-9.
36. Deutsch MJ, Weeks CE. Microfluorometry Assay for Vitamin C. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists.* 1965;48(6):1248-56.
37. Pathy K. Process for preparation of vitamin C and method for determination of vitamin c in tablets. *SF J Chem Res.* 2018;2(1):2.
38. Yang J, Ma Q, Huang F, Sun L, Dong J. A new fluorimetric method for the determination of ascorbic acid. *Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-organic Chemistry.* 1998;31(15):2757-66.
39. Perez-Ruiz T, Martinez-Lozano C, Tomas V, Fenol J. Fluorimetric determination of total ascorbic acid by a stopped-flow mixing technique. *Analyst.* 2001;126(8):1436-9.
40. Feng S, Chen X, Fan J, Zhang G, Jiang J, Wei X. Kinetic determination of ultratrace amounts of ascorbic acid with spectrofluorimetric detection. *Analytical letters.* 1998;31(3):463-74.
41. Dilgin Y, Nişli G. Fluorimetric determination of ascorbic acid in vitamin C tablets using methylene blue. *Chemical and pharmaceutical bulletin.* 2005;53(10):1251-4.
42. British pharmacopoeia. Vol 1. Ascorbic Acid. London: Medicines and Healthcare products Regulatory Agency; 2020. p. 208.
43. The United States pharmacopoeia. Vol 1. Ascorbic Acid. Rockville (MD): United States Pharmacopeial Convention; 2021.
44. Coursehero.com[Internet] Redwood City, CA: Course Hero, Inc.; [updated 2020; cited 9 Jun 2022]. The National University of Malaysia:[Available from: <https://www.coursehero.com/file/76947557/Experiment-6-Determination-of-Ascorbic-Acid-Using-Iodometric-Titration-Methodpdf/>].
45. The United States pharmacopoeia. Vol 3. Ascorbic Acid. Rockville (MD): United States Pharmacopeial Convention; 2021.

## Bibliographie

---

46. British pharmacopoeia. Vol 3. Ascorbic Acid. London: Medicines and Healthcare products Regulatory Agency; 2020. p. 166-7.
47. Rao GG, Sastry GS. Titrimetric determination of ascorbic acid with cerium(IV) sulphate. *Analytica Chimica Acta*. 1971;56(2):325-8.
48. Tutorhelpdesk.com[Internet] [cited 9 Jun 2022]. Available from: <https://www.tutorhelpdesk.com/homeworkhelp/Chemistry-/Ceric-Sulphate-Titrations-Assignment-Help.html>.
49. Yoshioka S, Stella VJ. *Stability of Drugs and Dosage Forms*: Springer US; 2007.
50. Hattendorf J RJ, inventor; OMP, INC, assignee. STABLE ASCORBIC ACID COMPOSITIONS [Internet]. Unated States 2007 Apr 12.
51. Connors KA, Amidon GL, Stella VJ. *Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists*: Wiley; 1986.
52. Golubitskii GB, Budko EV, Basova EM, Kostarnoi AV, Ivanov VM. Stability of ascorbic acid in aqueous and aqueous-organic solutions for quantitative determination. *Journal of Analytical Chemistry*. 2007;62(8):742-7.
53. Jutkus RAL, Li N, Taylor LS, Mauer LJ. Effect of Temperature and Initial Moisture Content on the Chemical Stability and Color Change of Various Forms of Vitamin C. *International Journal of Food Properties*. 2015;18(4):862-79.
54. Klu MW, Addy BS, Oppong EE, Sakyi ES, Mintah DN. EFFECT OF STORAGE CONDITIONS ON THE STABILITY OF ASCORBIC ACID IN SOME FORMULATIONS. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2016;8(4):26-31.
55. Journals I, Oyetade OA, Akintunde AO. Stability Studies on Ascorbic Acid (Vitamin C) From Different Sources. *IOSR Journal of Applied Chemistry*. 2012;2:20-4.
56. Yuan J-P, Chen F. Degradation of Ascorbic Acid in Aqueous Solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998;46(12):5078-82.
57. Gladkikh SP. Ascorbic acid and methods of increasing its stability in drugs. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 1970;4(12):699-705.

## Bibliographie

---

58. Sigmaaldrich.com Missouri,USA: Sigma; [cited 10 Jun 2022]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/221/043/a7506pis.pdf>.
59. Sheraz M, Ahmed S, Ahmad I, Shaikh R, Vaid FHM, Iqbal K. Formulation and stability of ascorbic acid in topical preparations. *Systematic Reviews in Pharmacy*. 2011;2:86.
60. *Canadian Journal of Research*. 1950;28e(1):19-32.
61. Rubin SH, DeRitter E, Johnson JB. Stability of vitamin C (ascorbic acid) in tablets. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1976;65 7:963-8.
62. Vemuri S. Color Stability of Ascorbic Acid Tablets Measured by Tristimulus Colorimeter. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1985;11(1):207-22.
63. Asker AF, Harris CW. Influence of Storage Under Tropical Conditions on the Stability and Dissolution of Ascorbic Acid Tablets. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1990;16(1):165-74.



# **Annexes**

## Annexe 1

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 10.0

Ascorbic acid

- *sum of impurities other than A*: not more than 5 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.5 per cent);
- *disregard limit*: 0.5 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.05 per cent).

**Loss on drying** (2.2.32): maximum 0.5 per cent, determined on 1.000 g by drying in an oven at 105 °C for 5 h.

**Sulfated ash** (2.4.14): maximum 0.1 per cent, determined on 1.0 g.

## ASSAY

Dissolve 0.250 g in a mixture of 5.0 mL of 0.01 M hydrochloric acid and 50 mL of ethanol (96 per cent) R. Carry out a potentiometric titration (2.2.20) using 0.1 M sodium hydroxide. Read the volume added between the 2 points of inflexion.

1 mL of 0.1 M sodium hydroxide is equivalent to 32.08 mg of  $C_{13}H_{21}ClN_2O_3S$ .

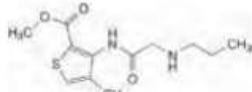
## STORAGE

Protected from light.

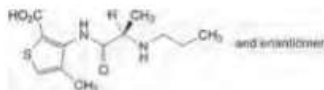
## IMPURITIES

*Specified impurities: A.*

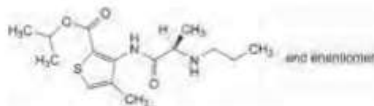
*Other detectable impurities* (the following substances would, if present at a sufficient level, be detected by one or other of the tests in the monograph. They are limited by the general acceptance criterion for other/unspecified impurities and/or by the general monograph *Substances for pharmaceutical use* (2034). It is therefore not necessary to identify these impurities for demonstration of compliance. See also 5.10. *Control of impurities in substances for pharmaceutical use*): B, C, D, E, F, G, H, I, J.



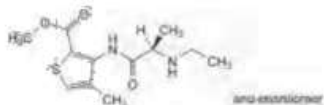
A. methyl 4-methyl-3-[[2-(propylamino)acetyl]amino]thiophene-2-carboxylate (acetamidoarticaïne),



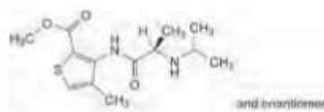
B. 4-methyl-3-[[2-(propylamino)propanoyl]amino]thiophene-2-carboxylic acid (articaïne acid),



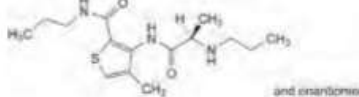
C. 1-methylethyl 4-methyl-3-[[2-(propylamino)propanoyl]amino]thiophene-2-carboxylate (articaïne isopropyl ester),



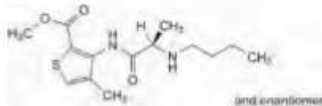
D. methyl 3-[[2-(ethylamino)propanoyl]amino]-4-methylthiophene-2-carboxylate (ethylarticaïne),



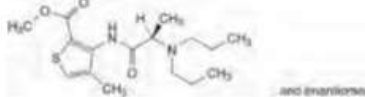
E. methyl 4-methyl-3-[[2-(1-methylethyl)amino]propanoyl]amino]thiophene-2-carboxylate (isopropylarticaïne),



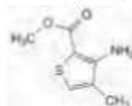
F. 4-methyl-N-propyl-3-[[2-(propylamino)propanoyl]amino]thiophene-2-carboxamide (articaïne acid propionamide),



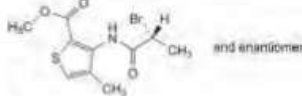
G. methyl 3-[[2-(butylamino)propanoyl]amino]-4-methylthiophene-2-carboxylate (butylarticaïne),



H. methyl 3-[[2-(dipropylamino)propanoyl]amino]-4-methylthiophene-2-carboxylate (dipropylarticaïne),



I. methyl 3-amino-4-methylthiophene-2-carboxylate (3-aminoarticaïne),



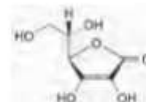
J. methyl 3-[[2-(bromopropanoyl)amino]-4-methylthiophene-2-carboxylate (bromo compound).

07/2019:0253



## ASCORBIC ACID

Acidum ascorbicum



$C_6H_8O_6$   
[50-81-7]

M<sub>r</sub> 176.1

## DEFINITION

(5R)-5-[(1S)-1,2-Dihydroxyethyl]-3,4-dihydroxyfuran-2(5H)-one.

*Content*: 99.0 per cent to 100.5 per cent.

## CHARACTERS

**Appearance:** white or almost white, crystalline powder or colourless crystals, becoming discoloured on exposure to air and moisture.

**Solubility:** freely soluble in water, sparingly soluble in ethanol (96 per cent).

**mp:** about 190 °C, with decomposition.

## IDENTIFICATION

**First identification:** B, C.

**Second identification:** A, C, D.

**A. Ultraviolet and visible absorption spectrophotometry (2.2.25).**

**Test solution.** Dissolve 0.10 g in *water R* and dilute immediately to 100.0 mL with the same solvent. Add 1.0 mL of the solution to 10 mL of a 10.3 g/L solution of *hydrochloric acid R* and dilute to 100.0 mL with *water R*.

**Absorption maximum:** at 243 nm, determined immediately after dissolution.

**Specific absorbance at the absorption maximum:** 545 to 585.

**B. Infrared absorption spectrophotometry (2.2.24).**

**Comparison:** *ascorbic acid CRS*.

**C. pH (2.2.3):** 2.1 to 2.6 for solution S (see Tests).

**D. To 1 mL of solution S add 0.2 mL of dilute nitric acid R and 0.2 mL of silver nitrate solution R2. A grey precipitate is formed.**

## TESTS

**Solution S.** Dissolve 1.0 g in *carbon dioxide-free water R* and dilute to 20 mL with the same solvent.

**Appearance of solution.** Solution S is clear (2.2.1) and not more intensely coloured than reference solution BY<sub>7</sub> (2.2.2, Method I).

**Specific optical rotation (2.2.7):** + 20.5 to + 21.5.

Dissolve 2.50 g in *water R* and dilute to 25.0 mL with the same solvent.

**Impurity E:** maximum 0.2 per cent.

**Test solution.** Dissolve 0.25 g in 5 mL of *water R*. Neutralise using *dilute sodium hydroxide solution R*, then add 1 mL of *dilute acetic acid R* and 0.5 mL of *calcium chloride solution R*.

**Reference solution.** Dissolve 70 mg of *oxalic acid R* (dihydrate of impurity E) in *water R* and dilute to 500 mL with the same solvent; to 5 mL of the solution add 1 mL of *dilute acetic acid R* and 0.5 mL of *calcium chloride solution R*.

Allow the solutions to stand for 1 h. Any opalescence in the test solution is not more intense than that in the reference solution.

**Related substances.** Liquid chromatography (2.2.29). Prepare the solutions immediately before use.

**Phosphate buffer solution.** Dissolve 6.8 g of *potassium dihydrogen phosphate R* in *water for chromatography R* and dilute to about 175 mL with the same solvent. Filter through a membrane filter (nominal pore size 0.45 µm) and dilute to 1000 mL with *water for chromatography R*.

**Test solution.** Dissolve 0.500 g of the substance to be examined in the mobile phase and dilute to 10.0 mL with the mobile phase.

**Reference solution (a).** Dissolve 10.0 mg of *ascorbic acid impurity C CRS* in the mobile phase and dilute to 5.0 mL with the mobile phase.

**Reference solution (b).** Dissolve 5.0 mg of *ascorbic acid impurity D CRS* and 5.0 mg of *ascorbic acid CRS* in the mobile phase, add 2.5 mL of reference solution (a) and dilute to 100.0 mL with the mobile phase.

**Reference solution (c).** Dilute 1 mL of the test solution to 200 mL with the mobile phase. Mix 1 mL of this solution and 1 mL of reference solution (a).

## Column:

– **size:**  $l = 0.25$  m,  $\varnothing = 4.6$  mm;

– **stationary phase:** *aminopropylsilyl silica gel for chromatography R* (5 µm);

– **temperature:** 45 °C.

**Mobile phase:** phosphate buffer solution, *acetonitrile R1* (25:75 V/V).

**Flow rate:** 1.0 mL/min.

**Detection:** spectrophotometer at 210 nm.

**Injection:** 20 µL of the test solution and reference solutions (b) and (c).

**Run time:** 2.5 times the retention time of ascorbic acid.

**Identification of impurities:** use the chromatogram obtained with reference solution (b) to identify the peaks due to impurities C and D.

**Relative retention** with reference to ascorbic acid (retention time = about 11 min): impurity D = about 0.4; impurity C = about 1.7.

## System suitability:

– **resolution:** minimum 3.0 between the peaks due to ascorbic acid and impurity C in the chromatogram obtained with reference solution (c);

– **signal-to-noise ratio:** minimum 20 for the peak due to impurity C in the chromatogram obtained with reference solution (b).

## Limits:

– **impurities C, D:** for each impurity, not more than 1.5 times the area of the corresponding peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.15 per cent);

– **unspecified impurities:** for each impurity, not more than the area of the peak due to ascorbic acid in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.10 per cent);

– **sum of impurities other than C and D:** not more than twice the area of the peak due to ascorbic acid in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.2 per cent);

– **disregard limit:** 0.5 times the area of the peak due to ascorbic acid in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.05 per cent).

**Copper:** maximum 5 ppm.

Atomic absorption spectrometry (2.2.23, Method I).

**Test solution.** Dissolve 2.0 g in 0.1 M *nitric acid* and dilute to 25.0 mL with the same acid.

**Reference solutions.** Prepare the reference solutions (0.2 ppm, 0.4 ppm and 0.6 ppm) using *copper standard solution (10 ppm Cu) R*, diluting with 0.1 M *nitric acid*.

**Source:** copper hollow-cathode lamp.

**Wavelength:** 324.8 nm.

**Atomisation device:** air-acetylene flame.

Adjust the zero of the apparatus using 0.1 M *nitric acid*.

**Iron:** maximum 2 ppm.

Atomic absorption spectrometry (2.2.23, Method I).

**Test solution.** Dissolve 5.0 g in 0.1 M *nitric acid* and dilute to 25.0 mL with the same acid.

**Reference solutions.** Prepare the reference solutions (0.2 ppm, 0.4 ppm and 0.6 ppm) using *iron standard solution (20 ppm Fe) R*, diluting with 0.1 M *nitric acid*.

**Source:** iron hollow-cathode lamp.

**Wavelength:** 248.3 nm.

**Atomisation device:** air-acetylene flame.

Adjust the zero of the apparatus using 0.1 M *nitric acid*.

**Sulfated ash (2.4.14):** maximum 0.1 per cent, determined on 1.0 g.

## ASSAY

Dissolve 0.150 g in a mixture of 10 mL of *dilute sulfuric acid R* and 80 mL of *carbon dioxide-free water R*. Add 1 mL of *starch solution R*. Titrate with 0.05 M *iodine* until a persistent violet-blue colour is obtained.

1 mL of 0.05 M *iodine* is equivalent to 8.81 mg of  $C_6H_8O_6$ .

## STORAGE

In a non-metallic container, protected from light.

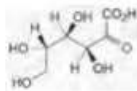
## IMPURITIES

*Specified impurities: C, D, E.*

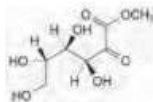
*Other detectable impurities* (the following substances would, if present at a sufficient level, be detected by one or other of the tests in the monograph. They are limited by the general acceptance criterion for other/unspecified impurities and/or by the general monograph *Substances for pharmaceutical use (2034)*. It is therefore not necessary to identify these impurities for demonstration of compliance. See also 5.10. *Control of impurities in substances for pharmaceutical use*): A, E, G, H.



A. furan-2-carbaldehyde,



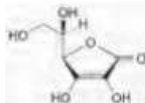
C. L-xylo-hex-2-ulosonic acid (L-sorbosonic acid),



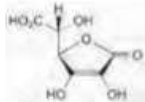
D. methyl L-xylo-hex-2-ulosonate (methyl L-sorbosonate),



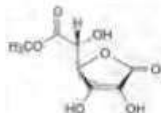
E. oxalic acid,



F. (5R)-5-[(1R)-1,2-dihydroxyethyl]-3,4-dihydroxyfuran-2(5H)-one,



G. (R)-[(2R)-3,4-dihydroxy-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl]hydroxyacetic acid,

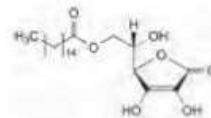


H. methyl (R)-[(2R)-3,4-dihydroxy-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl]hydroxyacetate.



## ASCORBYL PALMITATE

## Ascorbylis palmitas



$C_{22}H_{38}O_7$   
[137-66-6]

$M_r$  414.5

## DEFINITION

(2S)-2-[(2R)-3,4-Dihydroxy-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl]-2-hydroxyethyl hexadecanoate.

*Content*: 98.0 per cent to 100.5 per cent (dried substance).

## CHARACTERS

*Appearance*: white or yellowish-white powder.

*Solubility*: practically insoluble in water, freely soluble in ethanol (96 per cent) and in methanol, practically insoluble in methylene chloride and in fatty oils.

## IDENTIFICATION

A. Specific optical rotation (see Tests).

B. Infrared absorption spectrophotometry (2.2.24).

*Comparison*: ascorbyl palmitate CRS.

C. Dissolve about 10 mg in 5 mL of *methanol R*. The solution decolourises *dichlorophenolindophenol standard solution R*.

## TESTS

**Solution S.** Dissolve 2.50 g in *methanol R* and dilute to 25.0 mL with the same solvent.

**Appearance of solution.** Solution S is clear (2.2.1) and not more intensely coloured than reference solution BY<sub>4</sub> (2.2.2, Method I).

**Specific optical rotation** (2.2.7): + 21 to + 24 (dried substance), determined on solution S.

**Related substances.** The thresholds indicated under Related substances (Table 2034.-1) in the general monograph *Substances for pharmaceutical use (2034)* do not apply.

**Loss on drying** (2.2.32): maximum 1.0 per cent, determined on 1.000 g by drying *in vacuo* at 60 °C for 5 h.

**Sulfated ash** (2.4.14): maximum 0.1 per cent, determined on 1.0 g.

## ASSAY

Dissolve 0.200 g in 50 mL of *ethanol (96 per cent) R*. Add 30 mL of *water R* and titrate with 0.05 M *iodine* until a yellow colour is obtained.

1 mL of 0.05 M *iodine* is equivalent to 20.73 mg of  $C_{22}H_{38}O_7$ .

## STORAGE

In an airtight container, protected from light.



**ASSAY**

Weigh and powder 20 tablets. Dissolve a quantity of the powder containing 0.15 g of Ascorbic Acid as completely as possible in a mixture of 30 mL of water and 20 mL of 1M sulfuric acid and titrate with 0.1M ammonium cerium(IV) sulfate VS using ferroin solution as indicator. Each mL of 0.1M ammonium cerium(IV) sulfate VS is equivalent to 8.806 mg of  $C_6H_8O_6$ .

**STORAGE**

Ascorbic Acid Tablets should be kept free from contact with metal and protected from light and moisture.

When vitamin C tablets are prescribed or demanded, Ascorbic Acid Tablets shall be dispensed or supplied.

**Ascorbic Acid Chewable Tablets**

Chewable Ascorbic Acid Tablets

**Action and use**

Vitamin C.

**DEFINITION**

Ascorbic Acid Chewable Tablets contain Ascorbic Acid.

The tablets comply with the requirements stated under Tablets and with the following requirements.

**Content of ascorbic acid,  $C_6H_8O_6$** 

95.0 to 107.5% of the stated amount.

**IDENTIFICATION**

A. Carry out the method for *thin-layer chromatography*, Appendix III A, using the following solutions.

(1) Shake a quantity of the powdered tablets containing 50 mg of Ascorbic Acid with 10 mL of water for 15 minutes and filter.

(2) 0.5% w/v of ascorbic acid BPCRS in water.

**CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS**

(a) Use as the coating silica gel F<sub>254</sub> precoated plate (Merck silica gel 60 F<sub>254</sub> plates are suitable).

(b) Use the mobile phase as described below.

(c) Apply 2 µL of each solution.

(d) Develop the plate to 15 cm.

(e) After removal of the plate, allow it to dry in air and examine under ultraviolet light (254 nm).

**MOBILE PHASE**

A mixture of 20 volumes of water and 120 volumes of ethanol (96%).

**CONFIRMATION**

The principal spot in the chromatogram obtained with solution (1) corresponds in position and colour to that in the chromatogram obtained with solution (2).

B. Shake a quantity of the powdered tablets with water and filter. The filtrate is acidic to limus solution, decolourises 2,6-dichlorophenolindophenol solution and reduces silver nitrate solution immediately at room temperature producing a black precipitate.

**TESTS****Disintegration**

The requirement for Disintegration does not apply to Ascorbic Acid Chewable Tablets.

**ASSAY**

Weigh and powder 20 tablets. Dissolve a quantity of the powder containing 0.15 g of Ascorbic Acid as completely as possible in a mixture of 30 mL of water and 20 mL of 1M sulfuric acid and titrate with 0.1M ammonium cerium(IV) sulfate VS using ferroin solution as indicator. Each mL of 0.1M ammonium cerium(IV) sulfate VS is equivalent to 8.806 mg of  $C_6H_8O_6$ .

**STORAGE**

Ascorbic Acid Chewable Tablets should be kept free from contact with metal and protected from light and moisture.

When vitamin C chewable tablets are prescribed or demanded, Ascorbic Acid Chewable Tablets shall be dispensed or supplied.

**Aspirin Tablets**

Acetylsalicylic Acid Tablets

**Action and use**

Salicylate; non-selective cyclo-oxygenase inhibitor; antipyretic; analgesic; anti-inflammatory.

**DEFINITION**

Aspirin Tablets contain Aspirin.

The tablets comply with the requirements stated under Tablets and with the following requirements.

**Content of aspirin,  $C_9H_8O_4$** 

95.0 to 105.0% of the stated amount.

**IDENTIFICATION**

Shake a quantity of the powdered tablets containing 0.5 g of Aspirin with 20 mL of absolute ethanol, filter (Whatman GF/C is suitable), evaporate the filtrate and dry the residue at 60° for 1 hour. The infrared absorption spectrum of the residue, is concordant with the reference spectrum of aspirin (RS 483).

**TESTS****Dissolution**

Comply with the requirements for Monographs of the British Pharmacopoeia in the dissolution test for tablets and capsules, Appendix XII B1.

**TEST CONDITIONS**

(a) Use Apparatus 1, rotating the basket at 50 revolutions per minute.

(b) Use 500 mL of a pH 4.5 buffer prepared by mixing 29.9 g of sodium acetate and 16.6 mL of glacial acetic acid with sufficient water to produce 10 litres at a temperature of 37°, as the medium.

**PROCEDURE**

(1) After 45 minutes withdraw a sample of the medium and measure the absorbance of the filtered sample, suitably diluted with the dissolution medium if necessary, at the maximum at 265 nm, Appendix II B using dissolution medium in the reference cell.

(2) Measure the absorbance of a suitable solution of aspirin BPCRS using dissolution medium in the reference cell.

**DETERMINATION OF CONTENT**

Calculate the total content of aspirin,  $C_9H_8O_4$ , in the medium using the declared content of  $C_9H_8O_4$  in aspirin BPCRS.

## MOBILE PHASE

100 volumes of *methanol* and 400 volumes of 0.2M *sodium dihydrogen orthophosphate* containing 0.3% w/v of *sodium dodecyl sulfate*; adjust the pH to 3.3 with *orthophosphoric acid*.

## SYSTEM SUITABILITY

The Assay is not valid unless, in the chromatogram obtained with solution (2), the *column efficiency* is at least 1800 *theoretical plates* per metre.

## DETERMINATION OF CONTENT

Determine the *weight per mL* of the oral solution, Appendix V G, and calculate the content of  $C_6H_{14}N_4O_2$ , HCl, weight in volume, using the declared content of  $C_6H_{14}N_4O_2$ , HCl in *arginine hydrochloride BPCRS*.

## STORAGE

Arginine Hydrochloride Oral Solution should be protected from light.

## Ascorbic Acid Injection

## Action and use

Vitamin C.

## DEFINITION

Ascorbic Acid Injection is a sterile solution of Ascorbic Acid in Water for Injections containing Sodium Bicarbonate.

*The injection complies with the requirements stated under Parenteral Preparations and with the following requirements.*

Content of ascorbic acid,  $C_6H_8O_6$ 

95.0 to 105.0% of the stated amount.

## CHARACTERISTICS

A colourless liquid.

## IDENTIFICATION

A. Carry out the method for *thin-layer chromatography*, Appendix III A, using the following solutions in *water*.

(1) Dilute the injection, if necessary, to contain 0.5% w/v of Ascorbic Acid.

(2) 0.5% w/v of *ascorbic acid BPCRS*.

## CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS

(a) Use a silica gel F<sub>254</sub> precoated plate (Merck silica gel 60 F<sub>254</sub> plates are suitable).

(b) Use the mobile phase as described below.

(c) Apply 2  $\mu$ L of each solution.

(d) Develop the plate to 15 cm.

(e) After removal of the plate, dry in air and examine under *ultraviolet light* (254 nm).

## MOBILE PHASE

20 volumes of *water* and 120 volumes of *ethanol* (96%).

## CONFIRMATION

The principal spot in the chromatogram obtained with solution (1) corresponds in position and colour to that in the chromatogram obtained with solution (2).

B. To a volume containing 50 mg of Ascorbic Acid add 0.2 mL of 2M *nitric acid* and 0.2 mL of 0.1M *silver nitrate*. A grey precipitate is produced.

## TESTS

## Acidity

pH, 5.0 to 6.5; Appendix V L.

## Oxalic acid

Dilute a volume containing 0.25 g to 5 mL with *water*, neutralise to *litmus paper* with 2M *sodium hydroxide*, add 1 mL of 2M *acetic acid* and 0.5 mL of *calcium chloride solution* and allow to stand for 1 hour. Any opalescence produced is not more intense than that in a solution prepared at the same time and in the following manner. Dissolve 70 mg of *oxalic acid* in 500 mL of *water* and to 5 mL of the resulting solution add 1 mL of 2M *acetic acid* and 0.5 mL of *calcium chloride solution* (0.3%).

## ASSAY

To a volume containing 0.2 g add 5 mL of 2M *sulfuric acid* and titrate with 0.05M *iodine VS* using *starch mucilage* as indicator. Each mL of 0.05M *iodine VS* is equivalent to 8.806 mg of  $C_6H_8O_6$ .

## STORAGE

Ascorbic Acid Injection should be protected from light and stored at a temperature of 2° to 8°.

When vitamin C injection is prescribed or demanded, Ascorbic Acid Injection shall be dispensed or supplied.

## Ascorbic Acid Tablets

## Action and use

Vitamin C.

## DEFINITION

Ascorbic Acid Tablets contain Ascorbic Acid.

*The tablets comply with the requirements stated under Tablets and with the following requirements.*

Content of ascorbic acid,  $C_6H_8O_6$ 

95.0 to 107.5% of the stated amount.

## IDENTIFICATION

A. Carry out the method for *thin-layer chromatography*, Appendix III A, using the following solutions.

(1) Shake a quantity of the powdered tablets containing 50 mg of Ascorbic Acid with 10 mL of *water* for 15 minutes and filter.

(2) 0.5% w/v of *ascorbic acid BPCRS* in *water*.

## CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS

(a) Use silica gel F<sub>254</sub> precoated plate (Merck silica gel 60 F<sub>254</sub> plates are suitable).

(b) Use the mobile phase as described below.

(c) Apply 2  $\mu$ L of each solution.

(d) Develop the plate to 15 cm.

(e) After removal of the plate, allow it to dry in air and examine under *ultraviolet light* (254 nm).

## MOBILE PHASE

20 volumes of *water* and 120 volumes of *ethanol* (96%).

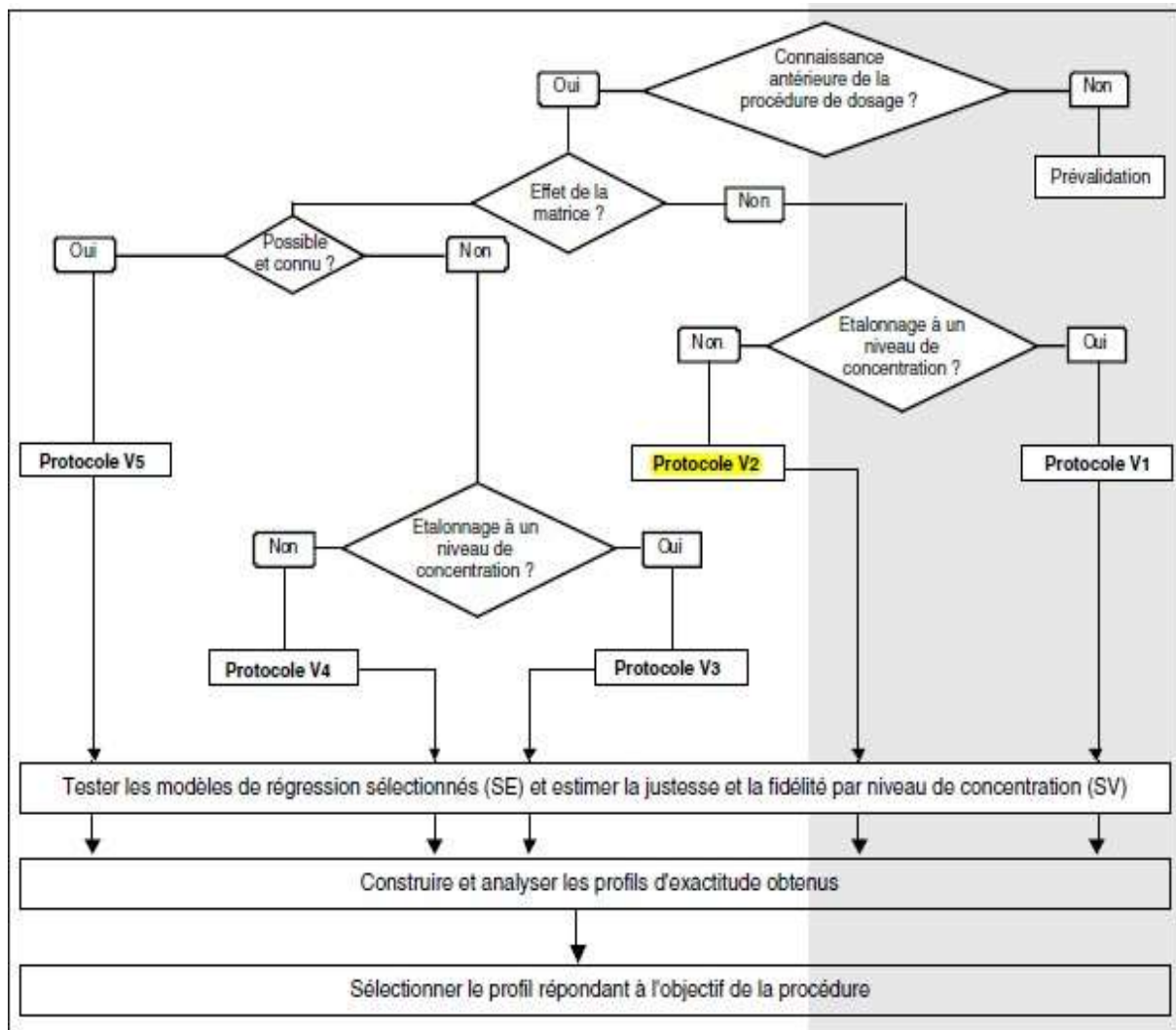
## CONFIRMATION

The principal spot in the chromatogram obtained with solution (1) corresponds in position and colour to that in the chromatogram obtained with solution (2).

B. Shake a quantity of the powdered tablets with *water* and filter. The filtrate is acidic to *litmus solution*, decolourises 2,6-dichlorophenolindophenol solution and reduces *silver nitrate solution* immediately at room temperature producing a black precipitate.

# Annexes

## Annexe 3:





# Annexes

## Annexe 4:

**TABLE of CRITICAL VALUES for STUDENT'S *t* DISTRIBUTIONS**

Column headings denote probabilities ( $\alpha$ ) **above** tabulated values.

d.f.	0.40	0.25	0.10	0.05	0.04	0.025	0.02	0.01	0.005	0.0025	0.001	0.0005
1	0.325	1.000	3.078	6.314	7.916	12.706	15.894	31.821	63.656	127.321	318.289	636.578
2	0.289	0.816	1.886	2.920	3.320	4.303	4.849	6.965	9.925	14.089	22.328	31.600
3	0.277	0.765	1.638	2.353	2.605	3.182	3.482	4.541	5.841	7.453	10.214	12.924
4	0.271	0.741	1.533	2.132	2.333	2.776	2.999	3.747	4.604	5.598	7.173	8.610
5	0.267	0.727	1.476	2.015	2.191	2.571	2.757	3.365	4.032	4.773	5.894	6.869
6	0.265	0.718	1.440	1.943	2.104	2.447	2.612	3.143	3.707	4.317	5.208	5.959
7	0.263	0.711	1.415	1.895	2.046	2.365	2.517	2.998	3.499	4.029	4.785	5.408
8	0.262	0.706	1.397	1.860	2.004	2.306	2.449	2.896	3.355	3.833	4.501	5.041
9	0.261	0.703	1.383	1.833	1.973	2.262	2.398	2.821	3.250	3.690	4.297	4.781
10	0.260	0.700	1.372	1.812	1.948	2.228	2.359	2.764	3.169	3.581	4.144	4.587
11	0.260	0.697	1.363	1.796	1.928	2.201	2.328	2.718	3.106	3.497	4.025	4.437
12	0.259	0.695	1.356	1.782	1.912	2.179	2.303	2.681	3.055	3.428	3.930	4.318
13	0.259	0.694	1.350	1.771	1.899	2.160	2.282	2.650	3.012	3.372	3.852	4.221
14	0.258	0.692	1.345	1.761	1.887	2.145	2.264	2.624	2.977	3.326	3.787	4.140
15	0.258	0.691	1.341	1.753	1.878	2.131	2.249	2.602	2.947	3.286	3.733	4.073
16	0.258	0.690	1.337	1.746	1.869	2.120	2.235	2.583	2.921	3.252	3.686	4.015
17	0.257	0.689	1.333	1.740	1.862	2.110	2.224	2.567	2.898	3.222	3.646	3.965
18	0.257	0.688	1.330	1.734	1.855	2.101	2.214	2.552	2.878	3.197	3.610	3.922
19	0.257	0.688	1.328	1.729	1.850	2.093	2.205	2.539	2.861	3.174	3.579	3.883
20	0.257	0.687	1.325	1.725	1.844	2.086	2.197	2.528	2.845	3.153	3.552	3.850
21	0.257	0.686	1.323	1.721	1.840	2.080	2.189	2.518	2.831	3.135	3.527	3.819
22	0.256	0.686	1.321	1.717	1.835	2.074	2.183	2.508	2.819	3.119	3.505	3.792
23	0.256	0.685	1.319	1.714	1.832	2.069	2.177	2.500	2.807	3.104	3.485	3.768
24	0.256	0.685	1.318	1.711	1.828	2.064	2.172	2.492	2.797	3.091	3.467	3.745
25	0.256	0.684	1.316	1.708	1.825	2.060	2.167	2.485	2.787	3.078	3.450	3.725
26	0.256	0.684	1.315	1.706	1.822	2.056	2.162	2.479	2.779	3.067	3.435	3.707
27	0.256	0.684	1.314	1.703	1.819	2.052	2.158	2.473	2.771	3.057	3.421	3.689
28	0.256	0.683	1.313	1.701	1.817	2.048	2.154	2.467	2.763	3.047	3.408	3.674
29	0.256	0.683	1.311	1.699	1.814	2.045	2.150	2.462	2.756	3.038	3.396	3.660
30	0.256	0.683	1.310	1.697	1.812	2.042	2.147	2.457	2.750	3.030	3.385	3.646
31	0.256	0.682	1.309	1.696	1.810	2.040	2.144	2.453	2.744	3.022	3.375	3.633
32	0.255	0.682	1.309	1.694	1.808	2.037	2.141	2.449	2.738	3.015	3.365	3.622
33	0.255	0.682	1.308	1.692	1.806	2.035	2.138	2.445	2.733	3.008	3.356	3.611
34	0.255	0.682	1.307	1.691	1.805	2.032	2.136	2.441	2.728	3.002	3.348	3.601
35	0.255	0.682	1.306	1.690	1.803	2.030	2.133	2.438	2.724	2.996	3.340	3.591
36	0.255	0.681	1.306	1.688	1.802	2.028	2.131	2.434	2.719	2.990	3.333	3.582
37	0.255	0.681	1.305	1.687	1.800	2.026	2.129	2.431	2.715	2.985	3.326	3.574
38	0.255	0.681	1.304	1.686	1.799	2.024	2.127	2.429	2.712	2.980	3.319	3.566
39	0.255	0.681	1.304	1.685	1.798	2.023	2.125	2.426	2.708	2.976	3.313	3.558
40	0.255	0.681	1.303	1.684	1.796	2.021	2.123	2.423	2.704	2.971	3.307	3.551
60	0.254	0.679	1.296	1.671	1.781	2.000	2.099	2.390	2.660	2.915	3.232	3.460
80	0.254	0.678	1.292	1.664	1.773	1.990	2.088	2.374	2.639	2.887	3.195	3.416
100	0.254	0.677	1.290	1.660	1.769	1.984	2.081	2.364	2.626	2.871	3.174	3.390
120	0.254	0.677	1.289	1.658	1.766	1.980	2.076	2.358	2.617	2.860	3.160	3.373
140	0.254	0.676	1.288	1.656	1.763	1.977	2.073	2.353	2.611	2.852	3.149	3.361
160	0.254	0.676	1.287	1.654	1.762	1.975	2.071	2.350	2.607	2.847	3.142	3.352
180	0.254	0.676	1.286	1.653	1.761	1.973	2.069	2.347	2.603	2.842	3.136	3.345
200	0.254	0.676	1.286	1.653	1.760	1.972	2.067	2.345	2.601	2.838	3.131	3.340
250	0.254	0.675	1.285	1.651	1.758	1.969	2.065	2.341	2.596	2.832	3.123	3.330
inf	0.253	0.674	1.282	1.645	1.751	1.960	2.054	2.326	2.576	2.807	3.090	3.290



## RESUME :

**Introduction :** La vitamine C est une vitamine hydrosoluble, utilisée pour ses propriétés bénéfiques surtout pour le système immunitaire dont elle protège contre les dommages oxydatifs, cependant elle se trouve sensible à l'eau, à la chaleur à l'air et à la lumière

**Matériel et méthodes :** Les comprimés d'acide ascorbique ont été échantillonnés et stockés séparément à température ambiante à 21°C (dans un tube fermé et un tube ouvert) et sous réfrigération à 2°C, puis dosés périodiquement pendant 6 semaines, l'étude d'effet de température (à 25°C, 35°C, 45°C) et de l'effet de dissolution ont fait aussi l'objet de notre essai. La méthode de dosage était l'iodométrie qui a été développée et validée auparavant.

**Résultats :** La conservation, à température ambiante (21°C), à basse température (2°C), et dans un tube ouvert, n'a dans aucun cas altérée la stabilité de la vitamine c. Néanmoins les essais sous différents niveaux de températures ainsi que celle d'effet de dissolution ont démontré une perte de la stabilité.

**Conclusion :** Une conservation des comprimés effervescents de la vitamine C dans leur contenants fermés à basse température (préférentiellement au réfrigérateur) et à l'abri de la lumière, est requise.

**Mots clés :** vitamine C ; stabilité ; iodométrie ; stockage ; acide ascorbique.

## ABSTRACT:

**Introduction:** Vitamin C is a water-soluble vitamin, used for its beneficial properties especially for the immune system which it protects against oxidative damage, however it is sensitive to water, heat, air and light.

**Material and methods:** The ascorbic acid tablets were sampled and stored separately at room temperature at 21°C (in a closed tube and an open tube) and under refrigeration at 2°C, then dosed periodically for 6 weeks, the study of temperature effect (at 25°C, 35°C, 45°C) and the effect of dissolution were also the subject of our test. The method of assay was the iodimetry which was developed and validated before.

**Results:** The conservation, at room temperature (21°C), at low temperature (2°C), and in an open tube, did not in any case damage the stability of the vitamin C. However, the tests under different levels of temperature as well as that of the effect of dissolution showed a loss of the stability.

**Conclusion:** A conservation of the effervescent tablets of the vitamin C in their container closed at low temperature (preferably in the refrigerator) and protected from the light, is required.

**Keywords:** vitamin c; stability; iodimetry; storage; ascorbic acid.

## ملخص:

**المقدمة:** فيتامين ج هو فيتامين قابل للذوبان في الماء، يستخدم لخصائصه المفيدة خاصة لجهاز المناعة الذي يحميه من التلف التأكسدي، ومع ذلك فهو حساس للماء والحرارة والهواء والضوء.

**المواد والطرق:** تم أخذ عينات من أقراص حمض الأسكوربيك وتخزينها بشكل منفصل في درجة حرارة الغرفة عند 21°C درجة مئوية (في أنبوب مغلق وأنبوب مفتوح) وتحت التبريد (في الثلجة)، ثم تم قياس تركيزها بشكل دوري لمدة 6 أسابيع، وكانت دراسة تأثير درجة الحرارة (عند 25°C درجة مئوية، 35°C درجة مئوية، 45°C درجة مئوية) وتأثير الذوبان من أهداف اختبارنا. كانت طريقة الفحص هي قياس البيود الذي تم تطويره والتحقق من صحته من قبل.

**النتائج:** عند الحفظ، في درجة حرارة الغرفة (21°C درجة مئوية)، في درجة حرارة منخفضة (2°C درجة مئوية)، وفي أنبوب مفتوح، على أي حال لم يضر باستقرار فيتامين ج. ومع هذا، أظهرت الاختبارات تحت مستويات مختلفة من درجة الحرارة، وكذلك تأثير الذوبان فقدان للاستقرار.

**الخلاصة:** من المستحسن حفظ أقراص فيتامين ج الفوارة في حاويتها المغلقة عند درجة حرارة منخفضة (ويفضل أن تكون في الثلجة) ومحمية من الضوء.

**الكلمات المفتاحية:** فيتامين ج ؛ الاستقرار ؛ قياس البيود ؛ التخزين ؛ حمض الاسكوربيك .