

## QUANTIFICATION DE LA CAFÉINE DANS DES BOISSONS GAZEUSES À BASE DE KOLA PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE (CLHP)

Gildas Komenan GBASSI<sup>1,2\*</sup>, Christophe N'cho AMIN<sup>1</sup>,  
Mariette Desirée YEHE<sup>1,2</sup>, Quentin Max Yavo ATTE<sup>1</sup>,  
Germain Amani BROU<sup>1</sup> et Philippe Andre Sawa KPAIBE<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université Félix Houphouët Boigny, UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Département de Chimie Analytique, Bromatologie, Chimie Générale et Minérale, 01 BP V 34, Abidjan, Côte d'Ivoire

<sup>2</sup> Laboratoire National de la Santé Publique, Service Contrôle des Aliments, 18 BP 2403, Abidjan, Côte d'Ivoire

---

\*Correspondance, e-mail : [gildas.gbassi@univ-fhb.edu.ci](mailto:gildas.gbassi@univ-fhb.edu.ci)

### RÉSUMÉ

Ce travail porte sur la quantification de la caféine dans des boissons gazeuses à base de kola par chromatographie liquide (CLHP). Les formats en canettes de deux marques ont été retenus dans cette étude. Le dosage de la caféine par CLHP a été validé sur les critères de performance suivants : linéarité, fidélité, exactitude et sensibilité. La courbe d'étalonnage a été déterminée à partir d'une gamme étalon de caféine. Cette dernière a été extraite des boissons à l'aide du dichlorométhane suivi de l'évaporation de ce solvant. Le dosage a nécessité une phase mobile à base de méthanol/eau (70 / 30 : v / v). Les résultats satisfaisants de la validation ont justifié l'application de la méthode au dosage quantitatif de la caféine. Toutes les concentrations de caféine obtenues étaient comprises entre 10,13 mg et 26,02 mg par canette. Ces concentrations sont conformes à la quantité maximale fixée par la FDA (Food and Drug Administration) qui est de 65 mg par canette.

**Mots-clés :** *boisson gazeuse, kola, caféine, CLHP.*

### ABSTRACT

**Quantification of caffeine in cola-based soft drinks by liquid chromatography (HPLC)**

This work deals with the quantification of caffeine in cola-based soft drinks by liquid chromatography (HPLC). Cans of two brands were selected in this study. The determination of caffeine by HPLC has been validated on the

following performance criteria: linearity, fidelity, accuracy and sensitivity. The standard curve was determined from a standard range of caffeine. Caffeine was extracted from the beverages with dichloromethane followed by the evaporation of this solvent. The assay required a mobile phase based on methanol / water (70 / 30 : v / v). The satisfactory results of the validation justified the application of the method to the quantitative determination of caffeine. All caffeine concentrations obtained ranged from 10.13 mg to 26.02 mg per can. These concentrations are in accordance with the maximum quantity set by the FDA (Food and Drug Administration) which is 65 mg per can.

**Keywords :** *soft drink, cola, caffeine, HPLC.*

## I - INTRODUCTION

Les boissons à base de kola, toutes inventées en grande partie par des pharmaciens à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle [1, 2], ont gardé jusqu'au XXI<sup>ème</sup> siècle, des applications thérapeutiques [2]. L'un des composants essentiels de ces boissons fait l'objet d'une attention particulière, il s'agit de la caféine [1]. Alcaloïde de la famille des méthylxanthines, la caféine est connue comme un stimulant du système nerveux central, par son action antagoniste de l'adénosine [3, 4]. Elle est naturellement présente dans les feuilles, les graines et les fruits d'au moins 63 espèces de plantes du monde entier dont le café, le kola et le cacao [5]. En 1911, le kola fait l'objet d'une des premières menaces de santé publique documentée [2, 5]. En effet, le 13 mars de cette même année, le gouvernement américain intenta un procès à Coca-Cola afin d'obliger la compagnie à retirer la caféine de ses formules. Bien que le juge ait rendu un verdict en faveur de Coca-Cola, deux lois furent introduites à la chambre des représentants en 1912 pour amender le texte en ajoutant la caféine à la liste des substances nuisibles créant une dépendance au-delà d'une certaine dose [6]. La FDA (Food and Drug Administration), organisme fédéral de réglementation américain, a fixé à 65 mg la quantité maximale de caféine dans tout format de boisson [7]. En 2003, à la suite d'une étude, "Santé Canada" recommandait aux adultes sains de ne pas prendre plus de 400 mg de caféine par jour [8]. Face à ces mises en garde, il apparaît nécessaire de vérifier les quantités de caféine contenues dans l'ensemble des boissons commercialisées en Côte d'Ivoire. La présente étude s'intéresse aux boissons gazeuses à base de kolas commercialisées en Côte d'Ivoire et a pour objectif de déterminer la teneur en caféine par canette de boisson.

## II - MATÉRIEL ET MÉTHODES

### II-1. Matériel

#### II-1-1. Appareillage

Un chromatographe liquide haute performance (Waters Alliance e2695) équipé de plusieurs modules dont une pompe (débit réglé à 0,5 mL / min); un injecteur à boucle de 20  $\mu$ L; un détecteur à barrette d'iode (PDA 2998 réglé à 272 nm), une colonne de silice greffée en C18 (15 cm x 0,4 cm x 5  $\mu$ m) précédée d'une précolonne de protection, et un ordinateur de bureau équipé du logiciel Empower. L'étude a nécessité également un Rotavapor (Heidolph Hei-Vap) et une balance de précision (Shimadzu).

#### II-1-2. Réactifs

Les réactifs utilisés étaient de qualité analytique : méthanol pour CLHP (VWR, Fontenay-sous-Bois, France); sodium hydrogénocarbonate (Fischer, Strasbourg, France) ; carbonate de sodium (Fischer, Strasbourg, France) ; sulfate de sodium anhydre (Panreac, Barcelone, Espagne) ; dichlorométhane (VWR, Fontenay-sous-Bois, France); eau ultra-pure (Millipore, Guyancourt, France); solution étalon de caféine (Sigma-Aldrich, Buchs, Suisse). Les solutions de travail ont été préparées de la manière suivante :

##### II-1-2-1. Préparation de la solution tampon

8,401 g de sodium hydrogénocarbonate ( $\text{NaHCO}_3$ ) et 10,600 g de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ont été pesés et dissout chacun dans un litre d'eau. 10 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  et 90 mL de  $\text{NaHCO}_3$  ont été prélevés et mélangés pour constituer la solution tampon.

##### II-1-2-2. Préparation de la phase mobile

La phase mobile était constituée du mélange Méthanol / Eau (70 / 30 (v / v)).

##### II-1-2-3. Préparation de la gamme étalon (solutions diluées d'étalonnage)

La solution étalon de caféine à 0,2 g / L a permis de préparer neuf solutions diluées de concentrations comprises entre 0,4 et 2  $\mu$ g/L. Chacune des solutions préparées a été injectée dans le CLHP. Les surfaces des pics obtenues à partir de chaque injection de concentration connue ont permis de tracer la courbe d'étalonnage à partir de laquelle ont été déterminés les paramètres de régression linéaire. Il s'agit d'une droite d'équation

$$Y = aX + b \quad (1)$$

$Y$  étant la surface du pic,  $X$  la concentration connue de caféine,  $a$  le coefficient directeur et  $b$  l'ordonnée à l'origine. La concentration ( $X$ ) de caféine des échantillons est déduite de l'Équation (1).

### II-1-3. Échantillonnage

L'échantillonnage était constitué de sept marques de boissons gazeuses à base de kola, de format en canettes de 330 mL, commercialisées dans le circuit officiel. Ces boissons en canettes provenaient de différents fabricants. Chaque marque a été représentée par un échantillon de trois canettes issues de lots différents, soit un total de vingt et une canettes (**Tableau 1**).

**Tableau 1 :** Identification des échantillons de l'étude

Désignation	Code d'identification	Nombre d'échantillons	Date de préemption
Coca Cola Life	CL	3	08 / 12 / 2017
Coca Cola Normal	CN	3	15 / 12 / 2017
Coca Cola Zero	CZ	3	01 / 12 / 2017
Pepsi Normal	PN	3	10 / 11 / 2017
Pepsi Light	PL	3	10 / 11 / 2017
Pepsi Max	PM	3	17 / 11 / 2017
Pepsi Next	PN	3	21 / 11 / 2017

## II-2. Méthodes

### II-2-1. Extraction de la caféine

La caféine a été extraite selon une adaptation de la procédure des auteurs de la référence [9]. 250 mL de l'échantillon ont été introduits dans un bécher de 600 mL, additionné de 1 mL de carbonate de sodium saturé pH 9. Après agitation, 50 mL de dichlorométhane sont ajoutés et l'agitation est maintenue durant 5 min. Le contenu du bécher est ensuite transféré dans une ampoule à décanter de 500 mL. Après agitation manuelle, la phase organique est recueillie dans un Erlenmeyer de 500 mL. Une deuxième extraction est réalisée avec à nouveau 50 mL de dichlorométhane. La phase organique est de nouveau recueillie dans le même Erlenmeyer. Celle-ci est filtrée sur du papier whatman contenant du sulfate de magnésium anhydre en vue d'éliminer les traces d'eau. Le dichlorométhane est évaporé à l'aide de l'évaporateur rotatif. Le résidu sec obtenu est ensuite dissout dans une petite quantité de la phase mobile (mélange méthanol / eau). La mixture finale est complétée à 20 mL avec la même phase mobile dans une fiole jaugée. Cette solution correspond à l'extrait.

### II-2-2. Dosage de la caféine dans l'échantillon

Dans une autre fiole jaugée de 20 mL est introduit 30  $\mu\text{L}$  de l'extrait précédent qui est complété à 20 mL avec la phase mobile. 5  $\mu\text{L}$  de la solution obtenue (extrait dilué) est injecté dans le CLHP. Le calcul de la concentration en caféine tient compte de différents facteurs de dilution.

### II-2-3. Expression des résultats

30  $\mu\text{L}$  de l'extrait ont été prélevés et complétés à 20 mL pour obtenir un extrait dilué. Le facteur  $F_1$  pour obtenir la concentration en caféine dans l'extrait de départ est :

$$F_1 = \frac{20 \text{ mL}}{30 \text{ } \mu\text{L}} = \frac{20 \text{ mL}}{0,03 \text{ mL}} = 666,67 \quad (2)$$

Pour obtenir l'extrait non dilué, le résidu sec a été repris avec 20 mL de phase mobile. Le facteur  $F_2$  pour obtenir la concentration en caféine dans les 250 mL d'échantillon de départ est  $F_2 = 20$

Sur les 330 mL de boisson contenue dans chaque canette, seulement 250 mL ont été utilisés. Le facteur  $F_3$  pour obtenir la concentration en caféine dans chaque canette est :

$$F_3 = \frac{330 \text{ mL}}{250 \text{ mL}} = 1,32 \quad (3)$$

La concentration en caféine (C) pour chaque canette analysée est déterminée en multipliant  $X$  (concentration en caféine obtenue à partir de la droite d'étalonnage) par les trois différents facteurs :

$$C = X * F_1 * F_2 * F_3 = X * 666,67 * 20 * 1,32 \quad (4)$$

### II-3. Validation de la méthode

La norme NF ISO/CEI 17025 [10] détaille le processus de validation d'une méthode de mesure dans les grandes lignes en laissant le choix sur les outils (sélection des critères, plan d'expérience, détermination de l'écart-type ou du coefficient de variation). La validation s'inscrit dans un ensemble et s'applique lorsque la méthode utilisée est non normalisée ou hors de son domaine d'application [11]. Elle vise à démontrer que la méthode utilisée est performante. Les critères de validation [12] évalués dans cette étude sont la linéarité qui a été appréciée sur le domaine des valeurs comprises entre 0,4 et 2  $\mu\text{g/L}$ . La précision a été estimée sous des conditions de répétabilité et de fidélité intermédiaire. La répétabilité de l'analyse chromatographique a nécessité l'injection de six solutions de référence ( $n = 6$ ) d'une même concentration de caféine à trois niveaux de concentrations

(0,4; 1,0 et 1,6 µg/L). Un coefficient de variation (CV) des surfaces des pics obtenus a été calculé. La fidélité intermédiaire de l'analyse a été réalisée sur six extraits différents (n = 6). Un CV des surfaces obtenues a aussi été calculé. L'exactitude a été réalisée selon la méthode des ajouts dosés. A cet effet, des volumes de 100 µL, 140 µL et 180 µL de la solution de caféine à 0,2 g / L ont été ajoutés à un échantillon à extraire afin de déterminer le pourcentage de récupération. La sensibilité de la méthode a été évaluée par la limite de détection (plus faible concentration qui produit un signal détectable et non intégrable) et la limite de quantification (plus faible concentration capable d'être intégrée). Ces deux limites sont quantifiables par de multiples manières. Le protocole retenu dans cette étude est celui qui utilise les résultats de l'étude de la linéarité, notamment les estimateurs  $a$  et  $b$  de l'équation de la droite  $Y = aX + b$ , ainsi que l'écart-type  $s$  associé à l'estimation de la constante  $a$ . Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) se calculent de la façon suivante :

$$LD = \frac{3 \times s \times b}{a} \quad (5)$$

$$LQ = \frac{10 \times s \times b}{a} \quad (6)$$

### III - RÉSULTATS ET DISCUSSION

#### III-1. Validation de la méthode

Les critères de validation de la méthode sont résumés dans le **Tableau 2**.

**Tableau 2 : Critères de validation de la méthode d'analyse**

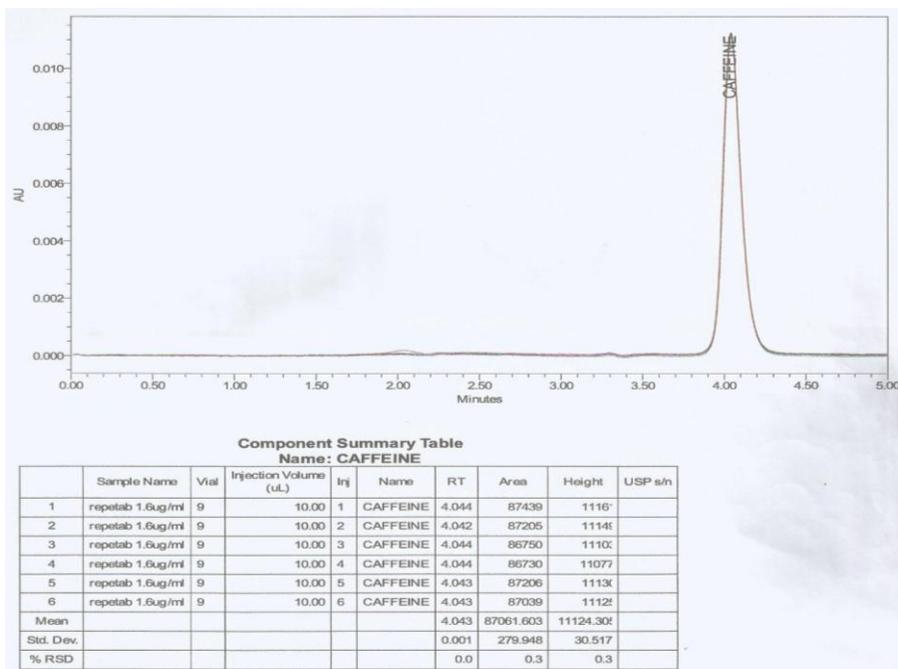
Critères	Résultats	Commentaires
Linéarité :		Existence d'une relation de
Domaine de linéarité	0,4-2,0 µg / L	proportionnalité entre la surface
Droite de régression	$y = 55493 x - 1792$	des pics (y) et la concentration
Coefficient de détermination	$R^2 = 0,9999$	(x, µg / L) sur tout le domaine de linéarité
Fidélité :		
Répétabilité (n = 6) sur trois niveaux de concentration :		
0,4 µg / L	CV = 0,9 %	Norme : CV < 2 %
1,0 µg / L	CV = 0,2 %	
1,6 µg / L	CV = 0,1 %	
Fidélité intermédiaire d'un extrait analysé (n = 6)	CV = 4,1 %	Norme : CV < 5 %
Exactitude (pourcentage moyen de récupération)	103,1 %	Norme : $100 \pm 5$ %
Sensibilité :		
Limite de détection	0,025 µg / L	-
Limite de quantification	0,050 µg / L	-

La linéarité est la capacité d'une méthode, à l'intérieur d'un certain intervalle, à fournir une réponse ou des résultats proportionnels aux valeurs de la grandeur mesurée. Cette proportionnalité s'exprime au travers d'une expression mathématique définie (la droite de régression). À partir des résultats expérimentaux et du modèle supposé a priori (modélisation par une droite), il a été appliqué la méthode des moindres carrés ordinaires à l'aide du logiciel Excel qui propose l'équation de la droite de régression dans l'utilitaire d'analyse. On obtient ainsi les estimations de la pente et de l'ordonnée à l'origine. L'analyse visuelle du graphique permet de limiter le domaine d'application de la méthode au domaine de linéarité. La valeur du coefficient de détermination  $R^2$  calculé, si proche de 1, est le signe d'une bonne linéarité. La répétabilité est la fidélité dans des conditions où des résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode, sur des échantillons identiques, dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps. La quantification de la répétabilité est réalisée au travers d'un coefficient de variation de répétabilité dépendant du domaine d'application de la méthode étudiée.

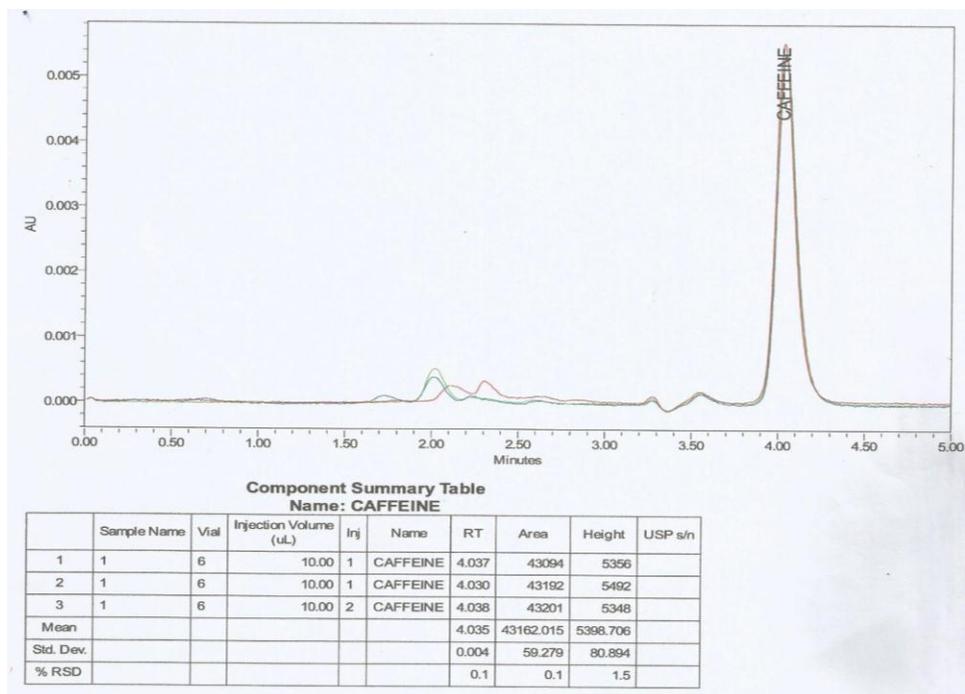
Un CV inférieur à 2 % est le signe d'une bonne répétabilité. Le principe de la fidélité intermédiaire est de faire varier les facteurs susceptibles d'avoir une influence sur le résultat de mesure (opérateur, temps, etc.). Dans notre cas, nous avons fait varier les jours d'analyse. Un CV de fidélité intermédiaire dû au facteur ayant varié a été calculé, et la valeur est inférieure à 5 %. Pour évaluer l'erreur sur l'exactitude, il faut une valeur de référence. La valeur de référence peut être matérialisée par un étalon ; un matériau de référence ; une méthode de référence ou un essai inter-laboratoires (essai d'aptitude). Dans notre cas, nous avons utilisé un étalon qui est la caféine. La quantification de l'exactitude a été réalisée sur trois niveaux de concentration (0,4 ug / L; 1,0 ug / L; 1,6 ug / L) pour couvrir le domaine de linéarité. Le pourcentage de récupération obtenue se situe dans la marge de tolérance admise (entre 95 % et 105 %). La sensibilité de la méthode, évaluée par ses limites de détection et de quantification, ont mis en évidence les concentrations à partir desquelles il est possible d'appliquer la méthode. Les résultats obtenus sont satisfaisants. Les critères de validation évalués justifient l'application de la méthode au dosage quantitatif de la caféine dans les boissons gazeuses à base de kolas.

### III-2. Détermination de la concentration en caféine

Les chromatogrammes des 21 échantillons de boissons analysées ont été obtenus à l'issue des analyses. Les *Figures 1 et 2* montrent respectivement le pic chromatographique de la solution de référence et le profil chromatographique d'un extrait d'échantillon.



**Figure 1 :** Chromatogramme de la solution de référence de caféine à 1,6 µg/mL



**Figure 2 :** Profil chromatographique d'un extrait d'échantillon

La FDA (Food and Drug Administration) a mentionné la caféine dans la liste des substances nuisibles, en limitant la concentration maximale de caféine dans les formes canettes à 65 mg [7]. Dans le **Tableau 3**, toutes les canettes ont des concentrations moyennes inférieures à la valeur recommandée par la FDA.

**Tableau 3 :** Teneurs en caféine des différentes boissons en canettes

Code Échantillons	Concentrations obtenues (mg)	Concentrations moyennes (mg)
CL	CL1	14,26
	CL2	12,72
	CL3	10,14
CN	CN1	20,80
	CN2	21,16
	CN3	21,64
CZ	CZ1	23,04
	CZ2	20,60
	CZ3	18,02
PN	PN1	22,32
	PN2	21,81
	PN3	21,54
PL	PL1	23,28
	PL2	28,56
	PL3	26,26
PM	PM1	23,58
	PM2	24,57
	PM3	23,78
PNx	PNx1	11,28
	PNx2	09,03
	PNx3	10,08

*CL : Coca Life; CN : Coca Normal; CZ : Coca Zéro ; PN : Pepsi Normal; PL : Pepsi Light; PM : Pepsi Max; PNx : Pepsi Next.*

Les plus faibles concentrations ont été observées au niveau des échantillons CL et PNx. Les concentrations en caféine des échantillons CN et PN de cette étude étaient respectivement de 21,20 mg et 21,89 mg tandis que les auteurs de la référence [13] sur le même type de boissons avec des conditionnements de 480 mL ont trouvé 29,50 mg pour CN et 31,70 pour PN. Les teneurs variaient de 41,50 mg à 48,40 mg pour d'autres types de boissons. Les quantités de caféine incorporées dans les canettes de coca vendues en Côte d'Ivoire sont inférieures à celles des autres pays (Etats-Unis, Angleterre, France) tels que rapportées par les auteurs de la référence [13]. Ces valeurs demeurent toutefois conformes aux recommandations de la FDA. Au niveau Européen, l'agence Européenne de sécurité alimentaire [14] a mentionnée une teneur moyenne de 40 mg de caféine dans les canettes standard de cola (355 mL).

#### IV - CONCLUSION

L'objectif de ce travail est de quantifier la caféine dans les vingt et une boissons gazeuses à base de kola par chromatographie liquide. Au total, Soixante-trois analyses ont été réalisées sur la base d'un triple essai par échantillon. Les résultats montrent que la méthode est fiable et rapide (temps de rétention de 4 min en moyenne). Les quantités de caféine contenues dans les boissons gazeuses analysées ont toutes été inférieures à la valeur recommandée par la FDA qui est de 65 mg par boisson. Ce travail trouve une application en routine dans le contrôle de qualité et de conformité des boissons gazeuses importées sur le territoire Ivoirien, et devrait être étendu à d'autres ingrédients contenus dans ces boissons comme le profil en sucres ou le taux d'acide phosphorique (E338) qui ont certainement un impact sur la santé en cas de consommation exagérée. En tenant compte de la recommandation de Santé Canada de ne pas excéder une consommation en caféine de 400 mg / jour, il est possible de consommer à volonté ces boissons, en moyenne une quinzaine par jour en tenant compte des variations de concentration pour chaque type de canette. Toutefois, la caféine n'étant pas le seul ingrédient contenu dans ces boissons, la prudence est nécessaire sur la base des teneurs en sucres de ces boissons.

#### RÉFÉRENCES

- [1] - V. R. PREEDY, "*Royal Society of Chemistry*", Cambridge, UK, (2012)
- [2] - <https://www.cocacoland.e-monsites.com/pages>, consulté le 20 décembre 2016
- [3] - D. B. BAYLUN, *Ref. Module Biom. Sci.*, 01 (2016) 1 - 7
- [4] - J. COSTENTIN, *Psych. Sci. Hum. Neurosci.*, 08 (2010) 182 - 186
- [5] - D. G. CALDERON, C. GONZALEZ-ROMERO, C. A GONZALEZ-GONZALEZ and A. FUENTES-BENITES, *Educacion Quimica*, 26 (1) (2015) 9 - 12
- [6] - <https://fr.wikipedia.org/wiki/Cafeine>, consulté le 20 janvier 2017
- [7] - FDA (Food and Drug Administration), Report 82N-0318, 52 (1987) 97. <https://www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/oc02267.pdf>. Consulté le 10 décembre 2016
- [8] - SANTE CANADA, <https://www.hc-sc.gc.ca>. Consulté le 30 janvier 2017
- [9] - G. HUDON, P. LEBEL, *Expo J.*, 11 (2002) C3.2 - C3.6
- [10] - NF ISO/CEI 17025, (2017)
- [11] - ICH VALIDATION Q2-R1, (2015)
- [12] - S. AMAROUCHE, *Tech. Ing.*, SL1040 (2010) 1 - 14
- [13] - R. R. MCCUSKER, B. A. GOLDBERGER, E. J. CONE, *J. Anal. Toxicol.*, 30 (2006) 112 - 114
- [14] - [http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate\\_publications/files/efsaexplainscaffeine150527fr.pdf](http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/efsaexplainscaffeine150527fr.pdf), consulté le 14 février 2017