

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ADAPTATION D'UNE MÉTHODE DE SYNTHÈSE ET D'ANALYSE
POUR UNE DÉTERMINATION GLOBALE
DES AMIDES

MÉMOIRE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
KHADIJA ID-HAMMOU

MAI 2008

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Tous d'abord, mes remerciements vont à mon directeur de recherche, le Docteur *Huu Van Tra*, ainsi qu'à mon co-directeur le Docteur *Livain Breau* de l'Université du Québec à Montréal (UQAM), pour leur supervision attentionnée, leur confiance qu'ils m'ont accordée et pour leurs encouragements qui m'ont permis de réaliser ce travail.

J'aimerais également remercier la Docteure *Phuong Nguyen* pour son soutien et ses nombreux conseils universitaires et je n'oublie pas toutes les personnes qui ont passé de nombreuses heures sur les différentes parties de ce manuscrit.

Aussi je me dois de remercier le personnel professoral et technique du département de chimie de l'Université du Québec à Montréal (UQAM) pour leur support pédagogique et technique, leur disponibilité et leur amabilité. Je remercie aussi tous mes collègues du laboratoire et mes amis du département de chimie de l'UQAM pour leurs encouragements.

Finalement, j'adresse mes remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail. Je remercie donc mon époux pour son appui, ainsi que ma famille, notamment mes chers parents qui malgré les distances étaient toujours présents pour me soutenir moralement et m'encourager tout au long de ma maîtrise afin de persévérer et de réussir mes études.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ÉQUATIONS.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	xi
LISTE DES SYMBOLES	xiii
RÉSUMÉ.....	xiv
CHAPITRE I	
1 INTRODUCTION	I
1.1 APPLICATION DES AMIDES	2
1.2 TOXICITÉS DES AMIDES.....	4
1.3 LIMITES PERMISES DES AMIDES DANS LES ALIMENTS.....	8
1.4 MÉTHODES D'IDENTIFICATION ET DE QUANTIFICATION ACTUELLES EMPLOYÉES POUR L'ANALYSE DE L'ACRYLAMIDE DANS LES ALIMENTS.....	14
1.4.1 <i>Chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse (GC/MS).....</i>	<i>14</i>
1.4.2 <i>Chromatographie en phase liquide / spectrométrie de masse en tandem (LC- MS/MS).....</i>	<i>15</i>
1.4.3 <i>Détermination des marqueurs biologiques de l'exposition</i>	<i>15</i>
1.5 PRINCIPE DE LA FLUORESCENCE	16
CHAPITRE II	
2 SYNTHÈSE DES DÉRIVÉS STANDARDS DNS-AMIDES.....	19
2.1 MÉTHODES DE RÉFÉRENCES DE LA DÉRIVATISATION DES AMIDES	19
2.2 LE RÉACTIF DE DÉRIVATISATION (DNS-Cl)	24
CHAPITRE III	
3 MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	27
3.1 GÉNÉRALITÉS.....	27
3.2 RÉACTIFS ET SOLVANTS UTILISÉS POUR LA DÉRIVATISATION DES AMIDES ÉTUDIÉS ET L'ANALYSE DE LEURS PRODUITS DÉRIVÉS DNS-AMIDES.....	28
3.3 PROPRIÉTÉS DES RÉACTIFS.....	29

3.4	PROCÉDURE DE DÉRIVATISATION DES AMIDES ÉTUDIÉS PAR LE CHLORURE DE DANSYLE	30
3.4.1	<i>Description du protocole général de la dérivation des amides étudiés par le chlorure de dansyle</i>	30
3.4.2	<i>Exemple spécifique; synthèse du dérivé DNS-benzamide.....</i>	32
3.5	CHOIX DE LA TECHNIQUE D'ANALYSE	35
3.6	INSTRUMENTATION D'ANALYSE	36
CHAPITRE IV		
4	RÉSULTATS ET DISCUSSION	38
4.1	SYNTHÈSE DES DÉRIVÉS DNS-AMIDES	38
4.1.1	<i>Synthèse du dérivé DNS-benzamide</i>	38
4.1.2	<i>Synthèse du dérivé DNS-acrylamide</i>	40
4.1.3	<i>Synthèse du dérivé DNS-acétamide.....</i>	41
4.1.4	<i>Synthèse du dérivé DNS-propionamide</i>	42
4.2	CARACTÉRISATION PAR INFRAROUGE (IR) DES DÉRIVÉS DNS-AMIDES	43
4.2.1	<i>Vibrations spécifiques au dérivé DNS-benzamide</i>	46
4.2.2	<i>Vibrations spécifiques au dérivé DNS-acrylamide.....</i>	47
4.2.3	<i>Vibrations spécifiques au dérivé DNS-acétamide</i>	48
4.2.4	<i>Vibrations spécifiques au dérivé DNS-propionamide</i>	49
4.3	CARACTÉRISATION PAR LA MÉTHODE RMN DU PROTON (^1H) DES DÉRIVÉS DNS-AMIDES.....	50
4.3.1	<i>Analyse des données du spectre RMN ^1H du réactif DNS- Cl</i>	50
4.3.2	<i>Analyse des données du spectre RMN ^1H du dérivé standard DNS- benzamide</i>	51
4.3.3	<i>Analyse des données du spectre RMN ^1H du dérivé standard DNS- acrylamide</i>	54
4.3.4	<i>Analyse des données du spectre RMN ^1H du dérivé standard DNS- acétamide</i>	56
4.3.5	<i>Analyse des données du spectre RMN ^1H du dérivé standard DNS- propionamide</i>	57

4.4	CARACTÉRISATION PAR LA MÉTHODE RMN DU CARBONE 13 (^{13}C) DES DÉRIVÉS DNS-AMIDES.....	59
4.4.1	<i>Analyse des données du spectre RMN ^{13}C du réactif DNS-Cl.....</i>	60
4.4.2	<i>Analyse des données du spectre RMN ^{13}C du dérivé standard DNS- benzamide.....</i>	61
4.4.3	<i>Analyse des données du spectre RMN ^{13}C du dérivé standard DNS- acrylamide.....</i>	63
4.4.4	<i>Analyse des données du spectre RMN ^{13}C du dérivé standard DNS- acétamide.....</i>	65
4.4.5	<i>Analyse des données du spectre RMN ^{13}C du dérivé standard DNS- propionamide.....</i>	67
4.5	DÉVELOPPEMENT DE LA MÉTHODE ANALYTIQUE	70
4.5.1	<i>Détermination des longueurs d'ondes d'absorption, d'excitation et d'émission des dérivés standards DNS-amides.....</i>	70
4.5.2	<i>Interprétation des chromatogrammes HPLC-UV / FLUO des dérivés standards DNS-amides.....</i>	71
4.5.3	<i>Analyse d'un mélange des dérivés DNS-amides par HPLC-UV/FLUO.....</i>	75
4.5.4	<i>Analyse des courbes d'étalonnage des quatre dérivés standards DNS- amides.....</i>	78
4.5.5	<i>Limitations de la méthode HPLC-UV/FLUO.....</i>	83
4.5.6	<i>Stabilité des quatre dérivés standards DNS-amides.....</i>	86
CHAPITRE V		
5	CONCLUSION.....	89
6	PERSPECTIVE.....	91
RÉFÉRENCES		92

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Dégradation du glycérol en acroléine.....	12
Figure 2.1	Mécanisme de dérivatisation des barbiturates par le DNS-Cl	20
Figure 2.2	Les voies de la synthèse du N-acylarylsulfonamide [Ishizuka, N. et al., 2000].....	23
Figure 2.3	Réaction globale de dérivatisation des amides primaires.....	26
Figure 2.4	Mécanisme de dérivatisation des amides primaires	26
Figure 3.1	Structures chimiques des dérivés DNS-amides étudiés issus de la réaction de dérivatisation par le DNS-Cl.....	31
Figure 3.2	Plaques de CCM des deux réactifs ; benzamide et DNS-Cl (A) et du produit obtenu après purification (B).....	33
Figure 3.3	Chromatogrammes HPLC-UV (détecteur UV modèle ; Perkin Elmer LC- 15) des réactifs; benzamide (1,7 min) et DNS-Cl (2,6 min) ainsi que du produit obtenu après purification (3,2 min).....	34
Figure 4.1	Spectre IR du dérivé DNS-benzamide	46
Figure 4.2	Spectre IR du dérivé DNS-acrylamide.....	47
Figure 4.3	Spectre IR du dérivé DNS-acétamide	48
Figure 4.4	Spectre IR du dérivé DNS-propionamide.....	49
Figure 4.5	Spectre RMN ¹ H du réactif DNS-Cl.....	51
Figure 4.6	Spectre RMN ¹ H du dérivé DNS-benzamide	53

Figure 4.7 Expansion de la zone (5,5 ppm à 8,8 ppm) du spectre RMN ^1H du dérivé DNS-benzamide.....	53
Figure 4.8 Spectre RMN ^1H du dérivé DNS-acrylamide.....	55
Figure 4.9 Expansion de la zone (5,6 ppm à 8,9 ppm) du spectre RMN ^1H du dérivé DNS-acrylamide	55
Figure 4.10 Spectre RMN ^1H du dérivé DNS-acétamide.....	57
Figure 4.11 Spectre RMN ^1H du dérivé DNS-propionamide.....	59
Figure 4.12 Spectre RMN ^{13}C du réactif DNS-Cl	61
Figure 4.13 Spectre RMN ^{13}C du dérivé DNS-benzamide	63
Figure 4.14 Spectre RMN ^{13}C du dérivé DNS-acrylamide.....	65
Figure 4.15 Spectre RMN ^{13}C du dérivé DNS-acétamide	67
Figure 4.16 Spectre RMN ^{13}C du dérivé DNS-propionamide.....	69
Figure 4.17 Spectres d'émission des quatre standards dérivés DNS-amides (longueur d'excitation 345 nm)	71
Figure 4.18 Chromatogrammes HPLC-UV des dérivés standards DNS-amides (détecteur UV modèle; VARIAN 9050)	72
Figure 4.19 Chromatogrammes HPLC-FLUO des dérivés standards DNS-amides (détecteur fluorescence modèle ; HITACHI L-7480).....	73
Figure 4.20 Structure chimique générale des dérivés DNS-amides	74
Figure 4.21 Chromatogrammes de séparation du mélange DNS-amides en mode gradient par la méthode HPLC-UV (détecteur UV modèle ; VARIAN 9050).....	76

Figure 4.22 Chromatogrammes de séparation du mélange DNS-amides en mode gradient par HPLC-FLUO (détecteur fluorescence, modèle ; HITACHI L-7480).....	77
Figure 4.23 Courbes d'étalonnage du dérivé DNS-benzamide	79
Figure 4.24 Courbes d'étalonnage du dérivé DNS-acrylamide.....	80
Figure 4.25 Courbes d'étalonnage du dérivé DNS- acétamide	81
Figure 4.26 Courbes d'étalonnage du dérivé DNS-propionamide	82
Figure 4.27 Stabilité des dérivés standards DNS-amides en solution dans ACN, analysés par la méthode HPLC-UV (n = 3).....	87
Figure 4.28 Stabilité des dérivés standards DNS-amides en solution dans ACN, analysés par la méthode HPLC-FLUO (n = 3)	88

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Teneur en acrylamide dans les aliments.	10
Tableau 3.1 Propriétés physiques des réactifs DNS-Cl et KOH	29
Tableau 3.2 Propriétés physiques des amides primaires étudiés.....	29
Tableau 3.3 Paramètres optimaux de HPLC	36
Tableau 3.4 Paramètres optimaux des deux détecteurs (UV et fluorescence)	37
Tableau 4.1 Paramètres de dérivatisation du benzamide par le DNS-Cl en solution dans le CH ₂ Cl ₂	39
Tableau 4.2 Paramètres de dérivatisation de l'acrylamide par le DNS-Cl en solution dans le CH ₂ Cl ₂	40
Tableau 4.3 Paramètres de dérivatisation de l'acrylamide par le DNS-Cl en solution dans le THF.....	41
Tableau 4.4 Paramètres de dérivatisation de l'acétamide par le DNS-Cl en solution dans le CH ₂ Cl ₂	42
Tableau 4.5 Paramètres de dérivatisation du propionamide par le DNS-Cl en solution dans le CH ₂ Cl ₂	43
Tableau 4.6 Fréquences des principaux groupements organiques des dérivés DNS-amides étudiés.....	45
Tableau 4.7 Interprétation du spectre RMN ¹ H du réactif DNS-Cl.....	50
Tableau 4.8 Interprétation du spectre RMN ¹ H du DNS-benzamide	52
Tableau 4.9 Interprétation du spectre RMN ¹ H du DNS-acrylamide.....	54

Tableau 4.10	Interprétation du spectre RMN ^1H du DNS-acétamide	56
Tableau 4.11	Interprétation du spectre RMN ^1H du DNS-propionamide.....	58
Tableau 4.12	Interprétation du spectre RMN ^{13}C du réactif DNS-Cl.....	60
Tableau 4.13	Interprétation du spectre RMN ^{13}C du DNS-benzamide	62
Tableau 4.14	Interprétation du spectre RMN ^{13}C du DNS-acrylamide.....	64
Tableau 4.15	Interprétation du spectre RMN ^{13}C du DNS-acétamide	66
Tableau 4.16	Interprétation du spectre RMN ^{13}C du DNS-propionamide.....	68
Tableau 4.17	Limites de détection des dérivés standards DNS-amides obtenues par HPLC-UV	83
Tableau 4.18	Limites de détection des dérivés standards DNS-amides obtenues par HPLC-FLUO	84
Tableau 4.19	Limites de détection des amides étudiés obtenues par HPLC-UV	85
Tableau 4.20	Limites de détection des amides étudiés obtenues par HPLC-FLUO	85
Tableau 4.21	Comparaison de la limite de détection et de quantification de l'acrylamide avec les autres méthodes analytiques.....	86

LISTE DES ÉQUATIONS

ÉQUATION 1	17
ÉQUATION 2	78
ÉQUATION 3	83
ÉQUATION 4	83

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ACN	Acétonitrile
AcOET	Acétate d'éthyle
BHT	4- méthyl-2,6-di-t -butyl-phénol
CCM	Chromatographie sur couche mince
CDCl ₃	Chloroforme deutéré
CDI	Carbonyldiimidazole
CH ₂ Cl ₂	Dichlorométhane
CMPI	Iodure du 2-chloro- <i>N</i> -méthylpyridinium
D ₂ O	Oxyde de deutérium
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DNS-amides	Dérivés dansyle-amides
DNS-Cl	Chlorure de dansyle
GC/MS	Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
H ₂ O	Eau
HCl	Acide chlorhydrique
HCO ₂ H	Acide formique
HPLC-FLUO	Chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur fluorescence
HPLC-UV	Chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur ultraviolet
I ₂	Iode
IR	Infrarouge
KOH	Hydroxyde de potassium
LC- MS/MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LDD	Limite de détection
LDQ	Limite de quantification
MgSO ₄	Sulfate de magnésium
Na ₂ CO ₃	Carbonate de sodium

NaCl	Chlorure de sodium
Rf	Rapport frontal
RMN ¹³ C	Résonance magnétique nucléaire de carbone 13
RMN H ¹	Résonance magnétique nucléaire de proton
SiO ₂	Silice
T amb.	Température ambiante
THF	Tétrahydrofurane
tr	Temps de rétention
UV	Ultraviolet

LISTE DES SYMBOLES

°C	Degré centigrade
c	Vitesse de la lumière, (mètre par seconde)
cm ⁻¹	Un par centimètre
d	Doublet en RMN
E	Énergie de la fréquence
g	Gramme
h	Constant de Planck (Joule .seconde)
Hz	Hertz
Kg	Kilogramme
mg	Milligramme
min	Minute
mL	Millilitre
mm	Millimètre
nm	Nanomètre
pH	Potentiel hydrogène
ppb	Partie par billion
ppm	Partie par million
R ²	Coefficient de corrélation
s	Singulet en RMN
t	Triplet en RMN
u.a.	Unité arbitraire
µg	Microgramme
µL	Microlitre
µm	Micromètre
v/v	Volume par volume
v	Fréquence
%	Pourcentage
λ	Longueur d'onde

RÉSUMÉ

La présence d'amides dans l'environnement et leurs effets néfastes sur la santé a suscité le développement d'une méthode d'analyse globale des amides (R-CO-NH₂). Cette méthode est basée sur la chromatographie liquide à haute performance à phase inverse dotée respectivement d'un détecteur UV et fluorescence (HPLC-UV/FLUO). Ceci a nécessité la transformation des amides en dérivés amides susceptibles d'être détectés en UV et fluorescence. Lors de la présente étude, le réactif le chlorure de dansyle (DNS-Cl) a été utilisé pour la dérivation des amides. Le groupement sulfonyle du DNS-Cl réagit avec le groupement NH₂ des amides primaires pour former des produits dérivés aromatiques fluorescents. Les dérivés standards DNS-amides ne sont pas disponibles commercialement, ce qui a nécessité le développement d'une méthode de préparation des dérivés standards de trois classes d'amides primaires un amide aromatique, un amide aliphatique insaturé et deux amides aliphatiques saturés (benzamide, acrylamide, acétamide et propionamide). Le rendement moyen obtenu est de 55 % non optimisé.

Les dérivés standards DNS-amides obtenus ont été d'abord caractérisés par infrarouge (IR) et la résonance magnétique nucléaire du proton (¹H) et du carbone 13 (¹³C) et par la suite analysés par le couplage HPLC-UV/FLUO. Les longueurs d'onde (λ) d'absorption, d'excitation et d'émission (déterminées par le spectrofluorimètre) employées lors de cette étude sont respectivement de 254 nm, 345 nm et de 535 nm. Les valeurs des limites de détection obtenues pour les quatre amides étudiés (benzamide, acrylamide, acétamide et propionamide) par HPLC-UV sont respectivement de 0,02 ppm, 0,02 ppm, 0,03 ppm et 0,03 ppm et celles obtenus par HPLC-FLUO sont respectivement de 0,01 ppm, 0,04 ppm, 0,004 ppm et 0,003 ppm. L'étude montre que le couplage HPLC-UV/FLUO permet d'avoir une bonne sensibilité et que la technique HPLC-FLUO est plus sélective que la technique HPLC-UV.

MOTS CLÉS : Amides, benzamide, acrylamide, acétamide, propionamide, analyse globale, HPLC-UV/FLUO.

Chapitre I

1 INTRODUCTION

Les amides sont des composés organiques qui peuvent être considérées comme des dérivés d'acides et d'amines. Les amides dérivés des acides carboxyliques (excepté le formamide) sont solides à température ambiante lorsqu'ils sont simples et peuvent être également liquides lorsqu'ils sont substitués, avec un point d'ébullition assez élevé. Les amides dérivés des acides sulfoniques sont en général solides [International Labour Organization, «Encyclopaedia of Occupational Health and Safety, Fourth edition», 1998, Vol. 4, Part XVIII, 104. Guide to Chemicals, Amides].

L'utilisation fréquente des amides présente un risque reconnu pour la santé et l'environnement. C'est pourquoi une quantification de la teneur en amides dans les aliments ainsi que dans le système aquatique et environnemental est une nécessité. Cette quantification fait souvent appel à des méthodes limitées à l'analyse d'un seul amide, notamment l'acrylamide. Celui-ci, connu pour être toxique a fait l'objet d'études approfondies car il a été récemment détecté dans les produits alimentaires.

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude est de développer une nouvelle méthode simple et rapide pour une analyse globale des amides. La méthode consiste à rendre fluorescent les composés de type amide par dérivatisation à l'aide du chlorure de dansyle (DNS-Cl). Ceci permet d'obtenir des produits dérivés sulfonamides aromatiques (DNS-amides). L'avantage de cette méthode implique la séparation des dérivés DNS-amides par HPLC et la détection par UV-fluorescence (HPLC-UV/FLUO).

Étant donné que les standards dérivés DNS-amides n'étant pas disponibles commercialement, la présente étude s'est fixé pour objectif de développer une méthode de synthèse de trois classes d'amides : un primaire aromatique, un aliphatique insaturé et deux aliphatiques saturés (benzamide, acrylamide, acétamide et propionamide). La méthode de synthèse en question repose sur deux études, la première est la dérivatisation des barbiturates par le DNS-Cl en présence de Na_2CO_3 anhydre [Dünges, W et *al.*, 1974 et Cecchini, A. et *al.*, 1998] et la seconde est la synthèse du *N*-acylarylsulfonamide [Ishizuka, N. et *al.*, 2000] à partir du sulfonamide et du chlorure acide en présence de KOH en poudre. Le développement de cette procédure de synthèse implique l'adaptation des deux méthodes de préparation sus-citées. La première adaptation développée dans la présente étude réside dans le remplacement des barbiturates dans la méthode de Dünges [1974] et Cecchini [1998], par l'amide. La seconde adaptation consiste à ajuster la méthode d'Ishizuka [2000] à notre étude, en remplaçant le sulfonamide par un amide et le chlorure acide par le chlorure de dansyle. Ainsi, l'étude d'Ishizuka [2000] aurait servi à remédier au problème de la stabilité du dérivé DNS-amide en procédant au parachèvement en milieu acide de la réaction à la fin de la dérivatisation. Pour mieux comprendre l'importance d'étendre le champ d'application de la méthode de dérivatisation et d'analyse des amides, le présent mémoire sera axé dans les sections qui suivent sur une énonciation de quelques aspects liés à la chimie des amides.

1.1 APPLICATION DES AMIDES

Les amides sont employés dans plusieurs secteurs industriels : Les amides aliphatiques insaturés comme l'acrylamide sont des monomères réactifs utilisés dans la préparation des polymères [Chen, P., et *al.*, 2004]. Les polyacrylamides sont utilisés comme additifs pour le traitement de l'eau [Rogers, D.W., Poling, G.W., 1978]. L'acrylamide est également employé dans l'industrie du papier, de textile, des métaux (traitement des minerais métalliques) et en génie civil (construction des fondations de barrage et des tunnels), [Semih Ötles et Serkan Ötles, 2004]. L'acrylamide a été trouvé dans la fumée

de tabac et peut être contenu dans les emballages alimentaires ce qui signifie une contamination probable des aliments [Benedetti, J. L. et Weber, J. P., 2003].

D'autre part, les amides aliphatiques saturés tels que l'acétamide et le propionamide sont employés comme additifs dans l'industrie de papier, comme agent de démoulage pour les matières plastiques, comme flux de soudage ainsi que comme composants de pesticides notamment les herbicides et les fongicides [International Labour Organization, «Encyclopaedia of Occupational Health and Safety, Fourth edition», 1998, Vol.4, Part XVIII, 104. Guide to Chemicals, Amides]. L'acétamide a été trouvé également dans les lacs, les explosifs et le flux de soudage [International Labour Organization, «Encyclopaedia of Occupational Health and Safety, Fourth edition», 1998, Vol.4, Part XVIII, 104. Guide to Chemicals, Amides]. Les amides aromatiques comme le benzamide constituent des intermédiaires importants dans la fabrication des colorants et des médicaments. Finalement, les amides substitués, tels que *N,N*-diméthylacétamide et le diméthylformamide, sont de très bons solvants polaires aprotiques, qui sont utilisés dans de nombreuses réactions chimiques [International Labour Organization, «Encyclopaedia of Occupational Health and Safety, Fourth edition», 1998, Vol. 4, Part XVIII, 104. Guide to Chemicals, Amides].

Le diméthylformamide intervient également dans la fabrication des fibres synthétiques. Le *N,N*-diméthylacétamide fait partie des composants des décapants pour peinture [International Labour Organization, «Encyclopaedia of Occupational Health and Safety, Fourth edition», 1998, Vol. 4, Part XVIII, 104. Guide to Chemicals, Amides]. Du point d'une vue pharmacologique, la lidocaïne (DCI) est un anesthésique local de la famille des amino-amides qui est le plus utilisé dans le monde. Ce composé agit en inhibant la conduction nerveuse via le blocage du canal sodique [Gaudy, J. F. et Arreto, C. D., 2005. Manuel d'analgésie en odontostomatologie, «la lidocaïne», 2ed. Masson, p. 171]. Le Lidocaïne est également employé en cardiologie comme anti-arythmique d'urgence [Trellakis, S., 2007]. De plus, le paracétamol (acétaminophène) est l'un des médicaments les plus utilisés pour traitement de la douleur et de la fièvre. Il occupe une position unique parmi les médicaments analgésiques. [Bertolini, A. et *al.*, 2006]. Le

paracétamol a été rapporté comme étant capable de calmer les douleurs associées à l'ostéoartrrose aussi efficacement et avec moins de risques pour la santé que certains nouveaux anti-inflammatoires [Day, R.O. et Graham, G.G., 2005].

1.2 TOXICITÉS DES AMIDES

Les données abondantes sur le métabolisme de divers amides ne permettent pas d'expliquer la nature de leurs effets toxiques au niveau moléculaire ou cellulaire. De nombreux amides simples sont probablement hydrolysés au niveau du foie par des amidases non spécifiques et l'acide produit est excrété ou métabolisé par les voies normales [International Labour Organization, «Encyclopaedia of Occupational Health and Safety, Fourth edition», 1998, Vol. 4, Part XVIII, 104. Guide to Chemicals, Amides]. Certains amides aromatiques comme, le *N*-phénylacétamide (acétanilide) subissent une hydroxylation du cycle aromatique et sont excrétés. L'aptitude d'un certain nombre d'amides à traverser la peau intacte est particulièrement importante sur le plan de la prévention [International Labour Organization, «Encyclopaedia of Occupational Health and Safety, Fourth edition», 1998, Vol. 4, Part XVIII, 104. Guide to Chemicals, Amides]. La variété de la structure chimique des amides est reflétée par la diversité de leurs effets biologiques. Certains amides sont tout à fait inoffensifs tels que les amides des acides stéarique ou oléique, tandis que plusieurs autres sont classés comme toxiques (cancérogènes, neurotoxiques et hépatotoxiques) et présentent un grand risque pour la santé et l'environnement, notamment l'acrylamide qui a été détecté récemment dans les produits alimentaires et trouvé toxique [Duxbury, D., 2004].

Effets cancérogènes : Des essais effectués sur des animaux montrent que l'acrylamide, l'acétamide et le thioacétamide sont probablement cancérogènes pour l'humain [Benedetti, J. L. et Weber, J. P., 2003]. Néanmoins, il existe peu de données sur le lien entre l'acrylamide et le cancer chez des travailleurs exposés à cette substance au travail. Si l'on veut utiliser les données de cancérogénicité tirées de l'expérimentation animale pour évaluer le risque de cancer chez l'homme, l'extrapolation doit généralement se

faire en tenant compte du fait que l'exposition humaine d'origine alimentaire est inférieure de plusieurs ordres de grandeur à celle qui a été imposée aux animaux de laboratoire [Report of a Joint FAO/WHO Consultation, WHO Headquarters, «Health implications of acrylamide in food», Geneva, Switzerland, 25-27 June 2002]. Ce composé est capable de provoquer des cancers et des mutations héréditaires chez les animaux de laboratoire [Rice, J. M., 2005].

D'autre part, l'acétamide et le thioacétamide provoquent des hépatomes chez les rats après une ingestion prolongée. Le thioacétamide est plus actif à cet égard; il est également cancérigène pour la souris et peut provoquer des tumeurs des voies biliaires chez le rat [Report of a Joint FAO/WHO Consultation, WHO Headquarters, «Health implications of acrylamide in food», Geneva, Switzerland, 25-27 June 2002]. D'autres études montrent que le glycidamide; principal métabolite de l'acrylamide, peut être toxicologiquement plus important que le composé initial du fait des propriétés cancérigènes et génotoxiques dont il fait preuve chez l'animal. Le taux de transformation de l'acrylamide en glycidamide varie en fonction de la quantité d'acrylamide présente dans l'organisme, plus la dose est faible, plus le taux d'acrylamide métabolisé en glycidamide est important [Report of a Joint FAO/WHO Consultation, WHO Headquarters, «Health implications of acrylamide in food», Geneva, Switzerland, 25-27 June 2002].

Effets neurologiques : Chez les animaux, l'exposition à l'acrylamide provoque l'endommagement de l'ADN et à des doses élevées en ce composé, des effets d'ordre neurologiques sont observés [Report of a Joint FAO/WHO Consultation, WHO Headquarters, «Health implications of acrylamide in food», Geneva, Switzerland, 25-27 June 2002]. L'examen neurologique des sujets souffrants d'intoxication par l'acrylamide révèle une neuropathie périphérique assez typique avec faiblesse ou absence des réflexes tendineux, perte du sens postural, diminution ou perte de la sensibilité vibratoire ainsi qu'une ataxie et atrophie des muscles des extrémités [International Labour Organization, «Encyclopaedia of Occupational Health and Safety, Fourth edition», 1998, Vol. 4, Part XVIII, 104. Guide to Chemicals, Amides].

Une étude a montré que des travailleurs exposés à l'acrylamide présentent des anomalies neurologiques, se caractérisant principalement par des difficultés posturales et des troubles moteurs [International Labour Organization, «Encyclopaedia of Occupational Health and Safety, Fourth edition», 1998, Vol. 4, Part XVIII, 104. Guide to Chemicals, Amides]. Les symptômes relatés consistaient en un fourmillement dans les doigts, sensibilité au toucher, refroidissement des extrémités, sudation profuse des mains et des pieds, coloration rouge bleuâtre de la peau et des extrémités et tendance à la desquamation des doigts et des mains et des membres inférieurs, entraînant des difficultés pour marcher, monter les escaliers, etc [International Labour Organization, «Encyclopaedia of Occupational Health and Safety, Fourth edition», 1998, Vol. 4, Part XVIII, 104. Guide to Chemicals, Amides]. Néanmoins, le rétablissement des personnes souffrantes a été constaté lorsque l'exposition à l'acrylamide a été empêchée. Le temps de guérison variait de quelques semaines à une année.

Chez un sujet humain l'intoxication peut se produire par voie orale suite à l'ingestion d'eau contaminée par l'acrylamide [International Labour Organization, «Encyclopaedia of Occupational Health and Safety, Fourth edition», 1998, Vol. 4, Part XVIII, 104. Guide to Chemicals, Amides]. La pénétration percutanée a été mise en évidence sur le lapin et peut être la principale voie d'absorption dans les cas d'exposition professionnelle à l'acrylamide monomère qui ont été rapportés. Le risque lié à l'inhalation concerne essentiellement l'exposition à ce composé sous forme d'aérosol [Barber, D.S., 2001. *Neurotoxicology*, 22 (3) : 341–353]. La symptomatologie invoque une atteinte du système nerveux central. Si cet organe est atteint chez l'homme comme chez l'animal en cas d'exposition à des concentrations élevées en acrylamide, ceci n'exclut pas des effets cérébraux à long terme suite à une exposition à des faibles doses [Garey, J. et Paule, M.G., 2007].

Effets hépatotoxiques : Des études effectuées sur des animaux montrent que le diméthylformamide provoque des lésions du rein et du foie chez le rat, le lapin et le chat. Ces effets ont été observés après administration par voie intrapéritonéale et respiratoire. Ce composé passe facilement à travers la peau chez l'humain et peut

produire des effets cumulatifs nuisibles [International Labour Organization, «Encyclopaedia of Occupational Health and Safety, Fourth edition», 1998, Vol. 4, Part XVIII, 104. Guide to Chemicals, Amides]. Ces études montrent également que le *N,N*-diméthylacétamide provoque des lésions hépatiques chez l'animal suite à une exposition répétée ou continue. De même, le contact du *N,N*-diméthylacétamide avec la peau peut provoquer l'absorption de quantités importantes et dangereuses de ce composé. L'expérimentation montre également que le formamide et le *N*-méthylformamide sont tératogènes [International Labour Organization, «Encyclopaedia of Occupational Health and Safety, Fourth edition», 1998, Vol. 4, Part XVIII, 104. Guide to Chemicals, Amides].

Effets sur la fertilité : L'expérimentation animale montre que l'acrylamide provoque des lésions testiculaires et qu'il diminue la fécondité. In vivo, l'acrylamide se révèle génotoxique vis-à-vis des cellules somatiques et germinales et il est capable de causer des lésions héréditaires au niveau des chromosomes et des gènes. Ceci peut causer une diminution du nombre et de la mobilité des spermatozoïdes [Sublet, V.H. et al., 1989 et Sakamoto, J. et Hashimoto, K., 1986]. Lors d'une autre étude au cours de laquelle les animaux ont été soumis à une exposition répétée à l'acrylamide administrée chaque jour par voie orale pendant 8 semaines, une dégénérescence des spermatides et des spermatocytes a été observé. L'effet sur la fertilité n'apparaît pas aussi clairement, la diminution de l'aptitude copulatoire peut s'expliquer par une faiblesse des pattes postérieures imputable à la neuropathie [Report of a Joint FAO/WHO Consultation, WHO Headquarters, «Health implications of acrylamide in food», Geneva, Switzerland, 25-27 June 2002].

Donc, les effets toxiques de certains amides exigent que les personnes exposées à ces composés soient soumises à un contrôle médical régulier, en particulier sur le plan neurologique et hépatique. De même, le fait que certains de ces composés chimiques soient des cancérigènes possibles ou probables exige la plus grande prudence dans les conditions de travail.

1.3 LIMITES PERMISES DES AMIDES DANS LES ALIMENTS

D'une part, les amides de type pesticides notamment les fongicides et les herbicides sont considérés comme des inhibiteurs du développement des plantes [Benoît, M. et *al.*, 2005]. Ainsi, le fongicide de type cyazofamide est un inhibiteur respiratoire (inhibition du complexe mitochondrial III, QiI). De plus les herbicides de type benzamide tels que le propozamide et le tébutam sont des inhibiteurs de la division cellulaire et les herbicides de type chloroacétamides tels que l'alachlore et le métolachlore provoquent l'inhibition de la synthèse des lipides à longues chaînes (inhibition des élongases) [Benoît, M. et *al.*, 2005].

Les pesticides sont présents à l'état de traces dans presque tous les écosystèmes de notre planète. Les pesticides altèrent gravement le fonctionnement des êtres vivants, ce qui affecte la faune et la flore. L'auto-intoxication par les pesticides provoque chaque année la mort de 300.000 personnes, notamment dans le monde rural, où les pesticides sont largement utilisés dans l'agriculture [Eddleston, M. et Bateman, D.N., 2007]. Les pesticides les plus dangereux pour la population sont les organophosphorés et les carbamates qui causent des intoxications graves nécessitant la réanimation d'urgence et l'administration de l'oxygène, de l'atropine et des oximes [Eddleston, M. et Bateman, D.N., 2007]. Un certain nombre de pesticides peuvent causer une neurotoxicité, notamment les insecticides tels que les organophosphorés, les carbamates, les pyréthriinoïdes et les organochlorés [Costa, L. G. et *al.*, 2008]. L'exposition utero et néonatal aux pesticides contribue à des troubles du développement chez l'enfant tels que le trouble d'hyperactivité avec déficit de l'attention et l'autisme [Costa, L. G. et *al.*, 2008]. L'exposition chronique à de faibles doses à certains pesticides peut contribuer à l'étiologie de certaines maladies neuro-dégénératives (notamment la maladie de Parkinson) [Ascherio, A. et *al.*, 2006]. Une étude montre que l'exposition des parents aux pesticides dans le milieu de travail provoque chez l'enfant les leucémies, les néphroblastomes et particulièrement les tumeurs cérébrales qui peuvent survenir au début et au cours de la grossesse [Tron, I., Piquet, O. et Cohuet, S., 2001]. Cette étude montre que le pesticide (dibromochloropropane) a un effet démontré sur la reproduction

humaine en diminuant la fertilité masculine. D'autres effets toxiques sont suspectés : Mort foetale, prématurité, hypotrophie, retard de croissance intra utérin (RCIU) et malformations congénitales [Tron, I., Piquet, O. et Cohuet, S., 2001].

Par conséquent, des études rapportent que la concentration maximale des pesticides ou d'un produit apparenté tolérable dans l'eau potable est de 0,01 ppb et la somme de tous les pesticides ne doit pas dépasser 0,5 ppb [Montiel, A., 2005]. Ces concentrations varient en fonction de chaque pesticide [WORLD health organization, (WHO), 2006, «Guidelines for drinking-water quality», (electronic resource): Incorporating first addendum. Vol. 1, Recommendations, 3rd ed]. De même, le règlement sur les aliments et drogues (RAD) exige que la norme générale relative à une limite maximale de résidus (LMR) de 0,1 ppm à moins qu'une limite maximale de résidu spécifique n'existe. Cependant, selon le besoin, ces limites peuvent être diminuées si un progrès dans le domaine analytique a été réalisé, ce qui permet de mesurer des concentrations inférieures à 0,01 ppm dans le cadre des programmes généraux de surveillance des aliments [Pest Management Regulatory Agency and Health Canada, Revocation of 0.1 ppm as a General Maximum Residue Limit for Food Pesticide Residues, 23 June 2006].

D'autre part, la présence de l'acrylamide dans certains aliments nécessite des études supplémentaires, pour évaluer une grande variété de produits et connaître les limites permises de ce composé dans l'alimentation. Parmi le petit nombre de produits analysés jusqu'à présent, ce sont les pommes de terre et les produits à base de céréales frits, grillés ou cuits au four qui présentent les plus fortes teneurs en acrylamide [Report of a Joint FAO/WHO Consultation, WHO Headquarters, «Health implications of acrylamide in food», Geneva, Switzerland, 25-27 June 2002]. On en a également trouvé à faible concentration dans d'autres aliments cuits (voir tableau 1.1).

Tableau 1.1 Teneur en acrylamide dans les aliments [Report of a Joint FAO/WHO Consultation, WHO Headquarters, «Health implications of acrylamide in food», Geneva, Switzerland, 25-27 June 2002].

Produit ou groupe de produit	Teneur en acrylamide (ppb) ¹			
	Moyenne ²	Médiane	Minimum-Maximum	Nombre d'échantillon
Chips, Pommes de terre/patates douces ³	1312	1343	170-2287	38
Pommes de terre frite ⁴	537	330	< 50-3500	39
Produits en beignets	36	36	< 30-42	2
Produits de boulangerie-pâtisserie	112	< 50	< 50-450	19
Biscuits, craquelins, pains grillés suédois	423	142	< 30-3200	58
Céréales de petit déjeuner	298	150	< 30-1346	29
Feuilles de maïs	218	167	34-416	7
Pain	50	30	< 30-162	41
Poissons et fruits de mer panés ou en beignets	35	35	30-39	4
Volaille ou gibier panés ou en beignets	52	52	39-64	2
Boissons maltées instantanées	50	50	< 50-70	3
Chocolats en poudre	75	75	< 50-100	2
Café en poudre	200	200	170-230	3
Bière	< 30	< 30	< 30	1

¹ Les limites de détection et de dosage varient d'un laboratoire à l'autre; l'indication "inférieure à telle ou telle valeur" signifie que la teneur est inférieure à la limite indiquée par le laboratoire [Report of a Joint FAO/WHO Consultation, WHO Headquarters, «Health implications of acrylamide in food», Geneva, Switzerland, 25-27 June 2002].

² La moyenne et la médiane ont été calculées lorsqu'on disposait de données individuelles; la taille des échantillons était extrêmement faible, notamment pour certaines catégories de produits. Lorsque la moyenne et la médiane ne sont pas identiques, cela signifie que la distribution des données collectées dans les divers pays est asymétrique et pourrait correspondre à des produits différents d'une vaste catégorie [Report of a Joint FAO/WHO Consultation, WHO Headquarters, «Health implications of acrylamide in food», Geneva, Switzerland, 25-27 June 2002].

³ Produits coupés en tranches très minces puis frits (comprennent les produits appelés "potato chips" dans certains pays, notamment en Amérique du Nord).

⁴ Produits coupés en tranches plus épaisses (comprennent les produits appelés "French fries" dans certains pays, notamment en Amérique du Nord) [Report of a Joint FAO/WHO Consultation, WHO Headquarters, «Health implications of acrylamide in food», Geneva, Switzerland, 25-27 June 2002].

Des recherches montrent que l'acrylamide peut se former dans certains aliments riches en amidon ou carbohydrates, comme les pommes de terre frites et les croustilles lorsqu'ils sont cuits à haute température. D'autres études soutiennent que la teneur en acrylamide dans les pommes de terre frites augmente fortement lorsque le temps et la température de cuisson se prolongent [Report of a Joint FAO/WHO Consultation, WHO Headquarters, «Health implications of acrylamide in food», Geneva, Switzerland, 25-27 June 2002].

Certaines études montrent que toutes les conditions de cuisson (four, micro-onde et friture...) sauf l'ébullition mènent à la formation de l'acrylamide à des concentrations variables dans les aliments. Cependant, aucune formation d'acrylamide à température au dessous de 120°C n'a été observée. Afin d'évaluer l'hypothèse sur la formation de l'acrylamide pendant la cuisson des produits alimentaires, une expérience du gavage des animaux a été réalisée. Une augmentation forte de la teneur d'acrylamide dans le sang des rats a été observée suite au gavage de ces animaux avec des patates frites cuites à haute température [Report of a Joint FAO/WHO Consultation, WHO Headquarters, «Health implications of acrylamide in food», Geneva, Switzerland, 25-27 June 2002].

Le niveau réel d'acrylamide dans un produit alimentaire spécifique, peut refléter l'équilibre entre la facilité de sa formation et la possibilité d'autres réaction (à cause de la double liaison et du groupement NH_2) avec d'autres composés présents dans la matrice des aliments ou formés pendant la cuisson, tels que l'urée ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$), les amines (R_2NH) et les aldéhydes (RCHO) [Swedish Food Federation, Report from Swedish Scientific Expert Committee, «ACRYLAMIDE IN FOOD, Mechanisms of formation and influencing factors during heating of foods», 30 june 2002].

Les données courantes au sujet de l'acrylamide pour divers aliments sont toujours très limitées et insuffisantes pour avoir des mécanismes finaux de la formation d'acrylamide [Swedish Food Federation, Report from Swedish Scientific Expert Committee,

«ACRYLAMIDE IN FOOD, Mechanisms of formation and influencing factors during heating of foods», 30 june 2002].

Le mécanisme chimique exact pour la formation d'acrylamide dans la nourriture cuite n'est pas connu. Des recherches soutiennent que l'acrylamide peut se former directement à partir des protéines et des acides aminés après une série de transformations (hydrolyse, réarrangement, désamination et décarboxylation....) [Swedish Food Federation, Report from Swedish Scientific Expert Committee, «ACRYLAMIDE IN FOOD, Mechanisms of formation and influencing factors during heating of foods», 30 june 2002].

D'autres études montrent que l'acroléine (2-propenal) pourrait être le principale précurseur de la formation d'acrylamide (2-propénamide) vu qu'il représente la même structure carbonée que lui [Swedish Food Federation, Report from Swedish Scientific Expert Committee, «ACRYLAMIDE IN FOOD, Mechanisms of formation and influencing factors during heating of foods», 30 june 2002]. L'acroléine peut être généré à partir de la dégradation du glycérol (figure 1.1) [Stevens, J. F. et Maier, C. S., 2008 et Umamo, K. et Shibamoto, T., 1987].

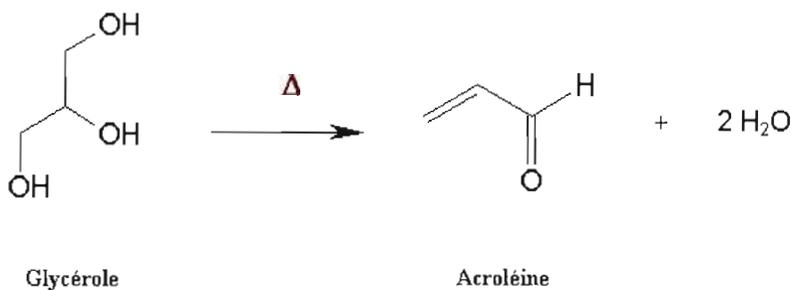


Figure 1.1 Dégradation du glycérol en acroléine

L'acroléine peut se produire également suite à la dégradation des acides aminés et des protéines [Jo, C. et Ahn, D. U., 2000] ou lorsque l'asparagine (acide aminé naturel) entre en réaction avec des sucres naturels dans l'aliment à des températures utilisées pour la cuisson au four, micro-onde ou la friture selon la réaction dite de *Maillard* [Ferretti, A. et Flanagan, V. P., 1971]. Cette réaction serait à l'origine de la plus grande partie d'acrylamide présent dans les aliments. L'azote nécessaire à la formation de la molécule d'acrylamide pourrait provenir de l'ammoniac libéré lors des réactions de désamination de certains composés tels que les acides aminés ou les protéines [Machiels, D. et Istasse, L., 2002]. Une étude démontre la possibilité de production de l'acrylamide à partir de la réaction de l'acroléine avec de l'ammoniac [Tezer, N. et Ozkan, R., 2001].

Des études réalisées sur le rat à partir d'acrylamide ajouté à l'eau potable montrent un effet cancérigène à une dose journalière de 2 mg/kg avec apparition de tumeurs bénignes et malignes, thyroïdiennes, mammaires, du scrotum et du système nerveux central. À une dose quatre fois plus faible, soit de 0,5 mg/kg, on n'observe plus d'effet cancérigène [Swedish Food Federation, Report from Swedish Scientific Expert Committee, «ACRYLAMIDE IN FOOD, Mechanisms of formation and influencing factors during heating of foods», 30 June 2002].

D'autres études montrent que les effets toxiques de l'acrylamide sur le système nerveux de l'homme et de l'animal ou sur l'appareil reproducteur du rat mâle se produisent après ingestion d'une dose unique supérieure ou égale à 10^4 - 10^5 fois la dose estimative quotidienne d'acrylamide apportée par les aliments [Report of a Joint FAO/WHO Consultation, WHO Headquarters, «Health implications of acrylamide in food», Geneva, Switzerland, 25-27 June 2002]. En Chine, des travailleurs exposés pendant deux ans ou plus à de l'acrylamide et de l'acrylonitrile ont été examinés et le taux sanguin d'adduits acrylamide-hémoglobine a été dosé, afin de rechercher des signes de neuropathie périphérique. Une corrélation a été observée entre le taux de ces adduits et la gravité de la neuropathie périphérique. Selon ces études, une exposition supérieure à 1 mg/kg par jour entraîne une neuropathie [Report of a Joint FAO/WHO Consultation,

WHO Headquarters, «Health implications of acrylamide in food», Geneva, Switzerland, 25-27 June 2002]. Des études montrent aussi une diminution de la fertilité chez des rats mâles exposés à une dose quotidienne de 15 mg/kg pendant 5 jours ainsi que chez des souris exposées pendant quatre semaines à des doses journalières allant jusqu'à 12 mg/kg [Report of a Joint FAO/WHO Consultation, WHO Headquarters, «Health implications of acrylamide in food», Geneva, Switzerland, 25-27 June 2002]. Lors d'une étude au cours de laquelle les animaux ont été soumis à une exposition répétée à l'acrylamide à une dose d'environ 36 mg/kg administrée chaque jour par voie orale pendant 8 semaines, on a observé une dégénérescence des spermatides et des spermatozoïdes [Report of a Joint FAO/WHO Consultation, WHO Headquarters, «Health implications of acrylamide in food», Geneva, Switzerland, 25-27 June 2002].

1.4 MÉTHODES D'IDENTIFICATION ET DE QUANTIFICATION ACTUELLES EMPLOYÉES POUR L'ANALYSE DE L'ACRYLAMIDE DANS LES ALIMENTS

Les méthodes d'analyse utilisables actuellement pour la recherche et le dosage reposent sur l'acrylamide lui-même dans les produits et ingrédients alimentaires, ou sur ses métabolites dans le sang sous forme d'adduits à l'hémoglobine. Le fait que l'acrylamide soit une substance réactive susceptible de disparaître en partie une fois formée contribue à compliquer la méthode d'analyse [Semih, Ö. et Serkan, Ö., 2004]

1.4.1 Chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse (GC/MS)

La procédure habituelle consiste cependant à opérer sur un dérivé bromé, plus facile à chromatographier [Castle, L. et *al.*, 1991.]. Ce dérivé est identifié par son temps de rétention et le rapport des ions caractéristiques obtenus en spectrométrie de masse (MS) [Tareke, E. et *al.*, 2002]. La limite inférieure de dosage au moyen de GC/MS de 5-10 µg/kg [Report of a Joint FAO/WHO Consultation, WHO Headquarters, «Health implications of acrylamide in food», Geneva, Switzerland, 25-27 June 2002].

Cependant, l'analyse peut être pratiquée directement sur le produit initial [Tateo, F. et Bononi, M., 2003 et Weisshaar, R., 2004].

1.4.2 Chromatographie en phase liquide / spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)

Étant donné la possibilité de formation d'artefacts lors de la bromation, une autre technique d'analyse directe au moyen de la méthode d'analyse LC-MS/MS a été effectuée [Eerola, S., et *al.*, 2007]. La molécule est identifiée par son temps de rétention et l'intensité relative des pics représentatifs des ions-fragments [Liu, J. et *al.*, 2008 et Becalski, A., et *al.*, 2003]. Cette technique rend inutile le passage par un dérivé bromé. La limite de validité de cette méthode est de 20-50 µg/kg [Report of a Joint FAO/WHO Consultation, WHO Headquarters, «Health implications of acrylamide in food», Geneva, Switzerland, 25-27 June 2002].

1.4.3 Détermination des marqueurs biologiques de l'exposition

L'acrylamide et son métabolite (le glycidamide) réagissent spontanément avec un certain nombre de biomolécules, notamment avec l'hémoglobine (Hb) [Tareke, E., et *al.*, 2000]. On a décrit des méthodes de dosage des adduits de l'acrylamide à l'hémoglobine (AA-Hb) et du glycidamide à l'hémoglobine (AG-Hb) dont les limites de détection sont de l'ordre des picomole par GC-MS [Pérez, H.L., et *al.*, 1999] et LC-MS/MS [Chevolleau, S., et *al.*, 2007]. Ainsi une méthode d'analyse basée sur LC-MS/MS avec une source d'ionisation à nébulisation électrostatique en mode négative a permis d'avoir une limite de quantification des adduits AA-Hb et AG-Hb respectivement de 2 pmol/g et 6 pmol/g de globine [Bjellaas, T. et *al.*, 2007]. Ces méthodes sont suffisamment sensibles pour permettre de doser ces adduits à des concentrations sanguines pouvant résulter d'une exposition à l'acrylamide par voie alimentaire. Ces adduits sont donc utilisables comme marqueurs biologiques de

l'exposition [Report of a Joint FAO/WHO Consultation, WHO Headquarters, «Health implications of acrylamide in food», Geneva, Switzerland, 25-27 June 2002].

Au cours de ce travail, la méthode fluorimétrique a été choisie, car le détecteur fluorescence en plus de procurer une bonne sensibilité permet d'avoir une méthode d'analyse très sélective et une performance accrue par rapport au détecteur UV. Lors de l'analyse par HPLC-FLUO, un grand nombre de solvants peut être applicable contrairement à l'analyse par HPLC-UV où la phase mobile doit être constituée de solvants de faible absorbance dans la plage de UV. Cependant, le choix des solvants en HPLC-FLUO est limité par le phénomène d'extinction, par exemple, dans le cas des solvants halogénés [Dünges, W et *al.*, 1974]. Les composés de base pour la mesure de la fluorescence sont semblables à ceux utilisés pour la spectroscopie d'absorption UV. La différence fondamentale surgit dans l'arrangement des divers composants. L'échantillon est irradié avec la lumière UV d'une lampe à décharges et l'isolement de la longueur d'onde d'excitation désirée se fait à l'aide des filtres ou par un monochromateur. L'émission de la fluorescence est isolée par des filtres ou par un monochromateur et le détecteur lequel est normalement un photomultiplicateur, convertit le rayonnement de luminescence en un courant électrique qui est ensuite amplifié en signal mesurable [Dünges, W et *al.*, 1974].

1.5 PRINCIPE DE LA FLUORESCENCE

La luminescence, ou l'émission légère est toujours précédée par absorption d'énergie. Dans le cas de la photo-luminescence, l'énergie est assurée par l'absorption d'ultraviolet, visible ou de lumière infrarouge. Les formes communes de la photo-luminescence sont la fluorescence et la phosphorescence [A.T. Rhys Williams, 1980, «Fluorescence detection in liquid chromatography», published by Pekin- Elmer, p. 3-7]. Pour expliquer le processus de l'absorption et d'émission de la lumière, il faut préciser que l'énergie radiante peut seulement être absorbée sous forme de quanta. L'énergie portée par un

quantum est proportionnelle à la fréquence de l'oscillation, comme décrit par l'équation [1].

$$E = h\nu = hc/\lambda \quad [\text{Équation 1}]$$

Où ν : Fréquence, Hz

λ : longueur d'onde, nm

h : Constant de Planck ($6,626 \times 10^{-34}$ J.s)

c : Vitesse de la lumière ($2,998 \times 10^{10}$ cm.s⁻¹)

Dans la région du spectre ultraviolet et visible, l'énergie associée à la fréquence de radiation est très élevée. Cette énergie est suffisamment intense pour induire des changements dans la structure électronique des molécules tels que le transfert des électrons aux orbitales moléculaires d'une énergie potentielle supérieure ou dans certains cas la rupture des liens moléculaires si l'énergie est suffisamment élevée. L'absorption des quanta de lumière permet la transition des électrons du niveau vibratoire le plus bas de l'état électronique (S_0) vers des niveaux électroniques d'énergie plus élevée $S_1, S_2 \dots S_n$: Ce processus prend environ 10^{-15} s [A.T. Rhys Williams, 1980, «Fluorescence detection in liquid chromatography», published by Pekin- Elmer, p. 3-7]. L'énergie absorbée par la molécule peut être dispersée par un certain nombre de processus photophysiques ou photochimiques. La photodissociation peut se produire si l'énergie absorbée est assez grande. L'absorption d'énergie par la molécule est suivie par une relaxation vers le niveau électronique vibrationnelle le plus bas. Ceci s'appelle la conversion interne et la relaxation vibrationnelle et se passe en environ 10^{-12} s. La molécule reste dans l'état excité pendant 10^{-7} à 10^{-9} secondes, après, il y a une transition radiative ou retour à l'état fondamental S_0 , produisant la fluorescence. L'électron excité ne retourne pas directement dans son état fondamental, il passe par des états d'énergie intermédiaire. Il revient donc dans l'état fondamental en émettant plusieurs photons d'énergie plus faible (donc de longueur d'onde plus grande) que le photon reçu. C'est ainsi que l'énergie de la lumière ultraviolette reçue peut être réémise sous forme de lumière visible. La longueur d'onde de la phosphorescence pour une molécule donnée

est plus longue que celle de la fluorescence. La phosphorescence peut être observée pour 10^{-4} à 10^{-2} s. Ceci est dû au fait que l'étape de relaxation en phosphorescence dure plus longtemps qu'en fluorescence [A.T. Rhys Williams, 1980, «Fluorescence detection in liquid chromatography», published by Pekin- Elmer, p. 3-7]. Dans l'analyse de la fluorescence, l'intensité de la lumière émise est proportionnelle à la concentration du fluorophore sur une gamme dynamique étendue. Cependant, aux concentrations élevées, le rapport devient non linéaire à cause de l'effet d'auto absorption (extinction). Ce phénomène est dû à la réabsorption de la lumière émise par le fluorophore lui-même ou par d'autres composés présents dans le milieu. Le phénomène de non linéarité peut également se produire lorsque la concentration du fluorophore est telle que le faisceau d'excitation est absorbé avant qu'il atteigne le centre de la cellule [A.T. Rhys Williams, 1980, «Fluorescence detection in liquid chromatography», published by Pekin- Elmer, p. 3-7]. Ainsi, la contamination peut être un problème important de réduction de la fluorescence ou en ajoutant une fluorescence non désirée, tels que la contamination de la verrerie, la pipette, les réactifs, les bouteilles de stockage et les solvants. Le maintien de la verrerie propre est essentiel dans l'analyse fluorométrique. Les réactifs et les solvants peuvent également être des sources de contamination et ceux-ci peuvent être détectés par la mesure de la fluorescence du blanc de réactif [A.T. Rhys Williams, 1980, «Fluorescence detection in liquid chromatography», published by Pekin- Elmer, p. 3-7].

La présente étude consiste à la synthèse de quatre dérivés DNS-amides, qui peuvent être sensiblement déterminés par le couplage HPLC-UV/FLUO. Pour se faire, quatre amides (benzamide, acrylamide, acétamide et propionamide), appartenant à trois classes d'amides primaires (aliphatiques insaturés, aromatiques et aliphatiques saturés) ont été choisis. L'étude a donc pour objectif de trouver une méthode de dérivatisation et d'analyse globale et simultanée des amides qui soit simple, facile, moins coûteuse et à la portée de tous les laboratoires, par rapport aux autres méthodes d'analyse actuellement employées et dont la majorité s'intéressent à un seul amide tel que l'acrylamide.

Chapitre II

2 SYNTHÈSE DES DÉRIVÉS STANDARDS DNS-AMIDES

Afin d'analyser les amides par le couplage HPLC-UV/FLUO, ces composés doivent être chimiquement modifiés par dérivation à l'aide du réactif DNS-Cl. Ceci procure des dérivés DNS-amides fluorescents et visibles en UV, ce qui favorise une détection sensible et sélective. Des études réalisées sur la dérivation des barbiturates [Dünges, W et *al.*, 1974 et Cecchini, A. et *al.*, 1998] et la synthèse du *N*-acylarylsulfonamide [Ishizuka, N. et *al.*, 2000] ont été adaptées au mode opératoire employé pour la dérivation des amides choisis lors de la présente étude.

2.1 MÉTHODES DE RÉFÉRENCES DE LA DÉRIVATION DES AMIDES

La méthode de dérivation des quatre amides (benzamide, acrylamide, l'acétamide et propionamide) avec le réactif DNS-Cl repose sur des études qui ont été précédemment effectuées sur les barbiturates, vu l'intérêt spécial de la détermination de ces produits à de faibles concentrations dans la thérapie de l'épilepsie et des intoxications [Dünges, W et *al.*, 1974 et Cecchini, A. et *al.*, 1998]. Les produits dérivés des barbiturates fortement fluorescents ont été séparés par HPLC et déterminés dans la gamme de picomole par la fluorométrie.

Les dérivés de barbiturates sont obtenus en mélangeant une quantité de 500 µg à 20 mg du réactif DNS-Cl et 5 µg à 5 mg d'acide barbiturique en solution dans 400 µL d'acétate d'éthyle, en présence de 40 mg de la base carbonate de sodium anhydre en poudre (Na_2CO_3). Le mélange a été chauffé au reflux pendant 2 heures. Les solutions obtenues sont ensuite analysées directement, ou après dilution appropriée avec de l'acétate éthylique [Dünges, W et *al.*, 1974]. Le mécanisme de dérivation des barbiturates par le DNS-Cl en présence de KOH est présenté dans ce qui suit.

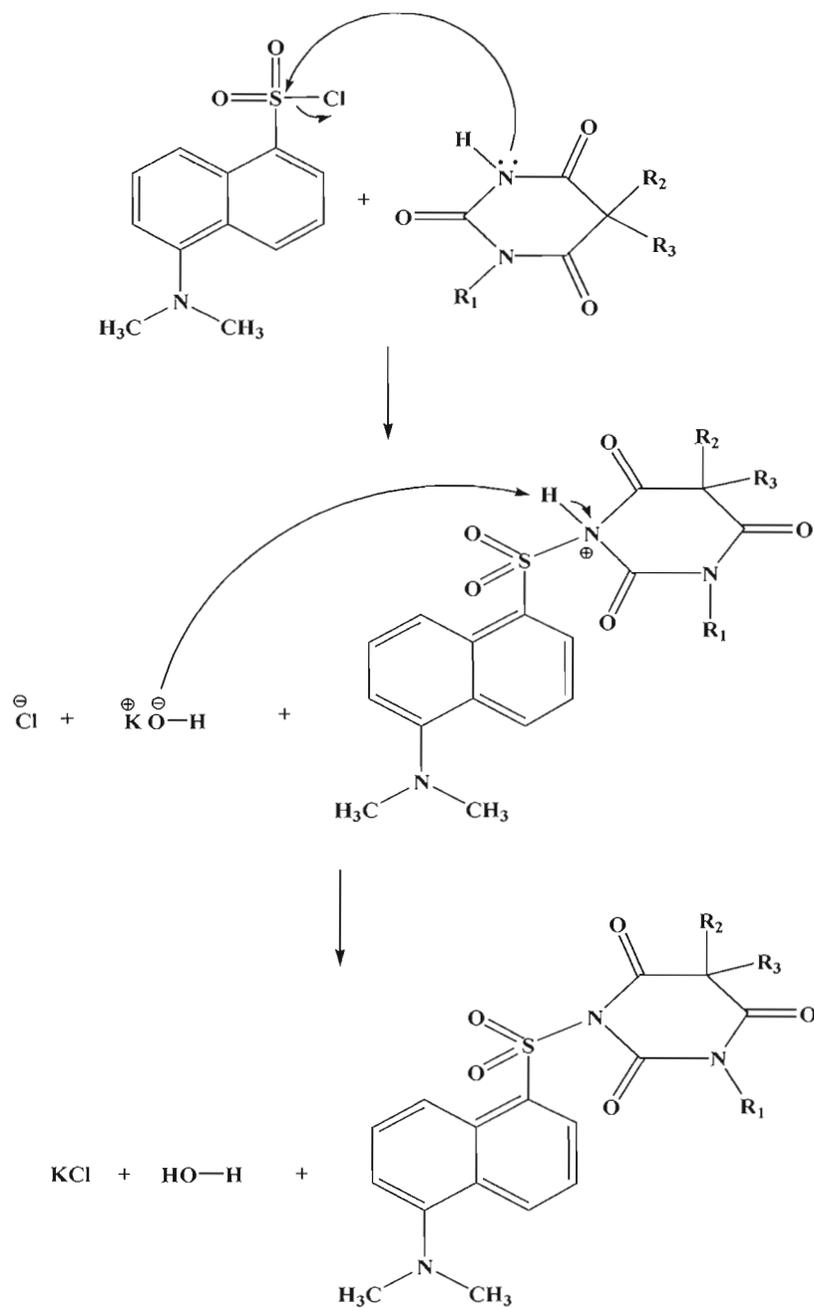


Figure 2.1 Mécanisme de dérivation des barbiturates par le DNS-Cl

Ce mode opératoire a été adapté au sein de nos laboratoires à la dérivatisation de l'acrylamide en solution dans l'acétate d'éthyle, cependant les résultats obtenus sont avérés non reproductibles. Le protocole expérimental a été ensuite modifié plusieurs fois. D'abord la base a été modifiée, vu que la réaction dépend fortement de la base. La dérivatisation a été donc explorée en présence de d'autres bases notamment le *terbutylate* de potassium, la triéthylamine et l'isopropylamine à température ambiante, car ces trois bases sont plus organiques et solubles, donc milieu homogène, ce qui permet de déprotoner facilement le groupement NH_2 de l'acrylamide et ainsi empêcher la dégradation qui peut se produire sous reflux de ce produit. Finalement, une base plus forte, l'hydroxyde de potassium granules (KOH) a été également utilisée, cependant les résultats restent insatisfaisants (impossible d'obtenir le produit dérivé qui est instable et qui s'hydrolyse en milieu basique aqueux lors du parachèvement de la réaction).

Par la suite d'autres solvants (acétonitrile, tétrahydrofurane et dichlorométhane) avec différents pourcentages en eau ont été utilisés, afin d'améliorer le contact avec la base KOH qui n'est pas soluble dans l'acétate d'éthyle. Ces essais ont permis de comprendre que le produit dérivé DNS-amide n'est pas stable en milieu basique aqueux. Afin de remédier à ce problème, une méthode de dérivatisation décrivant la synthèse d'un modèle du *N*-acylarylsulfonamide énantiomère pur avec un centre asymétrique en position alpha du groupe carbonyle, a été adaptée [Ishizuka, N. et *al.*, 2000]. La littérature montre deux procédures destinées à la préparation du modèle *N*-acylarylsulfonamide chiral [Ishizuka, N. et *al.*, 2000]. La première (figure 2.2, voie A) repose sur la réaction du dérivé acide phénylacétique¹ optiquement actif avec l'arylsulfonamide³ en présence d'un hydroxyde alcalin et d'un agent de condensation tels que le carbonyldiimidazole (CDI), l'iodure de 2-chloro-*N*-méthylpyridinium (CMPI) ou le dicyclohexylcarbodiimide (DCC). Lors de cette réaction le composé DCC, joue le rôle d'un agent de couplage qui active la fonction acide ($-\text{CO}-\text{OH}$) du dérivé acide phénylacétique¹ en espèce carbonyle électrophile pour recevoir l'attaque nucléophile de la paire d'électrons de la fonction $-\dot{\text{N}}\text{H}_2$ de l'arylsulfonamide³, formant ainsi le produit *N*-acylarylsulfonamide et le DCC. Le schéma de la réaction est présenté dans la figure 2.2.

La deuxième procédure de préparation du modèle de *N*-acylarylsulfonamide chiral (figure 2.1, voie B) s'effectue en deux étapes. La première étape est la conversion du dérivé acide phénylacétique¹ optiquement actif en chlorure d'acide² en présence du chlorure d'oxalyle en solution dans le CH₂Cl₂ à température de 0°C, suivie de l'évaporation de la partie volatile à température ambiante. La seconde étape est la réaction du chlorure d'acide² avec l'arylsulfonamide³ en solution dans le CH₂Cl₂ à une température de 0°C en présence de diverses bases. Des résultats satisfaisants ont été obtenus en employant les hydroxydes alcalins en poudre comme base. Selon cette méthode la réaction du chlorure d'acide² et de l'arylsulfonamide³ avec un rapport molaire de 1.1 équivalents en présence de la base KOH en poudre (3.3 équivalents) dans le CH₂Cl₂ à 0°C, a donné 99 % du produit brut *N*-acylarylsulfonamide. Le produit analytiquement pur a été obtenu avec un rendement de 85% après extraction suivie de la recristallisation [Ishizuka, N. et *al.*, 2000]. La littérature fait également état d'une attaque aisée des nucléophiles tels que l'eau et l'alcool, etc., sur la fonction carbonyle conduisant à l'hydrolyse rapide du produit *N*-acylarylsulfonamide en arylsulfonamide³ et en dérivé carboxylate (R₂, R₁-CH-CO-Nu), figure 2.2 [Ishizuka, N. et *al.*, 2000].

Les résultats de cette étude montrent qu'il faut avoir un milieu réactionnel propice pour la dérivatisation des amides par le DNS-Cl en solution dans le CH₂Cl₂ en présence de la base KOH granules. Ceci signifie que la réaction de dérivatisation doit être parachevée rapidement en milieu acide car le milieu basique aqueux à pour conséquence une réaction réversible qui se traduit par l'hydrolyse du produit dérivé DNS-amide en amide et en dansé hydrolysé (DNS-OH). Une solution d'acide chloridrique (HCl) de 0.1 N a donc été employée pour le parachèvement rapide de la réaction de dérivatisation des amides étudiés en milieu acide.

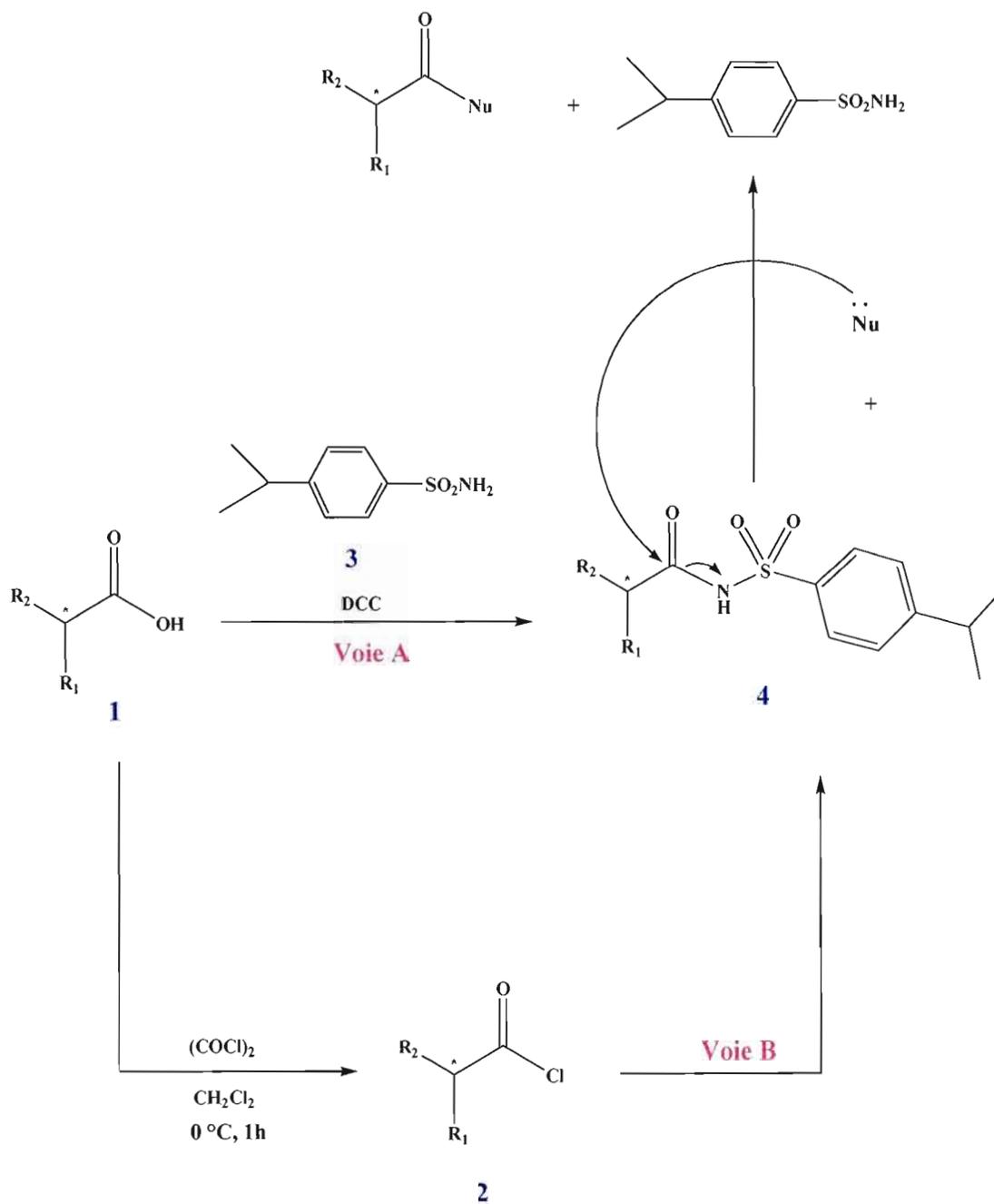


Figure 2.2 Les voies de la synthèse du N-acylarylsulfonamide [Ishizuka, N. et al., 2000]

2.2 LE RÉACTIF DE DÉRIVATISATION (DNS-Cl)

Il est plus pratique dans certains cas de transformer les composantes d'un échantillon en substances dérivées avant la séparation chromatographique, ce qui mène à la réduction de la polarité des espèces initiales. Ceci permet d'utiliser la chromatographie de partage plutôt que la chromatographie d'adsorption ou par échange ionique. La dérivatisation est également utilisée pour rendre un produit fortement fluorescent, ce qui a pour conséquence l'augmentation de la sensibilité du détecteur pour tous les constituants de l'échantillon et l'amélioration sélective de la réponse de celui-ci pour certains composés. Le réactif de dérivatisation doit être très stable pour permettre une dérivatisation complète des amides [Skoog, D. A. et *al.*, 2003. *Principe d'analyse instrumentale*; édition de Boeck Université, p. 746.].

Le chlorure de dansyle ou le chlorure de 5- diméthylamino-naphthalène-1-sulphonyle (DNS-Cl) est un réactif de détection fluorométrique. La principale caractéristique de ce réactif c'est qu'il est non fluorescent, quoiqu'il soit très visible en UV [Beesley, T. E., et *al.*, 2001, «Quantitative Chromatographic Analysis», édition Marcel Dekker Inc, New York , p. 71]. Cependant, le DNS-Cl est employé pour l'identification fluorescente dans les méthodes d'immunofluorescence [Laezza, C. et *al.*, 2006 et Bonaccorsi, S. et *al.*, 1988]. Le groupement sulfonyle du réactif DNS-Cl, réagit avec la fonction $-NH_2$ des amines et les groupements terminaux (NH_2 et $COOH$) des protéines et des peptides ainsi qu'avec les groupements phénoliques, pour former des composés fortement fluorescents [Dünges, W et *al.*, 1974; Tranchand, S., 2002 et Fournier, M., 2006].

Étant donné que les amides primaires contiennent une fonction NH_2 , il s'est avéré approprié d'utiliser le DNS-Cl pour la dérivatisation de ces composés. Ce réactif réagit avec le groupement NH_2 des amides primaires pour former des produits dérivés fortement fluorescents, susceptibles d'être analysés par la technique HPLC-UV/FLUO. La forte fluorescence des dérivés DNS-amides signifie que la paire d'électrons libre du groupement $\overset{\cdot}{N}H-C=O$ conjuguée avec le groupement sulfonyle du DNS-amide accentue

la délocalisation des électrons des deux noyaux aromatiques liée par les orbitales moléculaires, dans l'ensemble de la molécule, favorisant ainsi la relaxation et par la suite la fluorescence des dérivés DNS-amides. Ceci explique le fait que la longueur d'onde d'émission des dérivés DNS-amides soit de 530 nm est plus grande que celle d'excitation qui est de 345 nm. Ce phénomène explique aussi que la non fluorescence du DNS-Cl est due au groupement Cl (chlore) qui diminue la densité électronique dans les deux noyaux aromatiques et empêche donc la fluorescence de la molécule. La non fluorescence du DNS-Cl représente un avantage dans les analyses HPLC-FLUO, puisque ce réactif n'interfère pas avec les produits dérivés DNS-amides [Beesley, T. E., et al., 2001, «Quantitative Chromatographic Analysis», édition Marcel Dekker Inc, New York , p. 71].

Les dérivés DNS-amides ont une structure moléculaire semblable au composé arylsulfonamide employé dans la synthèse des *N*-acyarylsulfonamides qui sont largement employés comme bioisostères d'acide carboxylique en chimie médicinale [Ishizuka, N. et al., 2000]. Toutefois, le DNS-Cl présente plusieurs effets toxiques : Le contact avec les yeux peut endommager la cornée. Le contact avec la peau produit l'inflammation de la peau, caractérisée par des démangeaisons, des rougeurs et le gonflement de la peau [Material Safety Data Sheet for Dansyl chloride]. L'ingestion de ce réactif provoque la brûlure des tissus constituant le conduit gastro-intestinal. Le DNS-Cl réagit violemment avec l'eau libérant des vapeurs toxiques et corrosives dues au chlorure d'hydrogène et de l'acide chlorhydrique aqueux. L'inhalation peut être mortelle en raison de spasmes, de l'inflammation, de l'oedème du larynx et des bronches et de l'oedème pulmonaire. L'exposition chronique à ce réactif peut provoquer des effets semblables à ceux de l'exposition aiguë [Material Safety Data Sheet for Dansyl chloride].

Les figures 2.3 et 2.4 montrent respectivement la réaction globale et le mécanisme réactionnel de la dérivatisation des quatre amides primaires (benzamide, acrylamide, acétamide et propionamide) à l'aide du DNS-Cl.

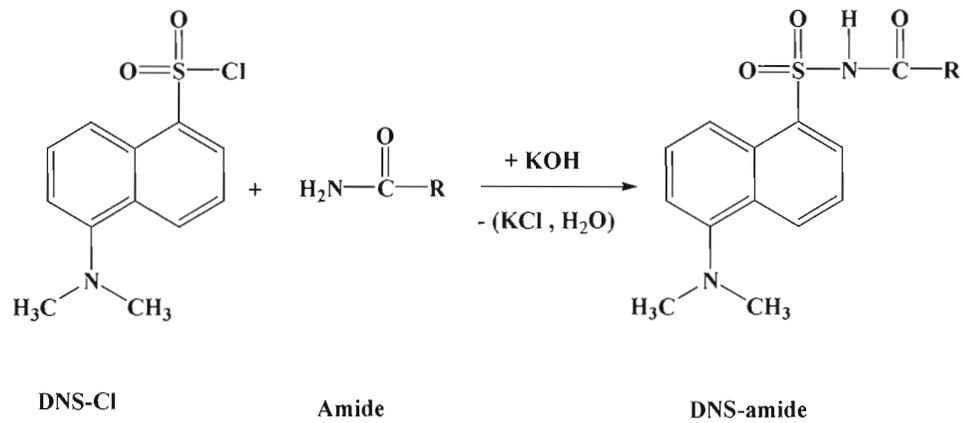


Figure 2.3 Réaction globale de dérivation des amides primaires

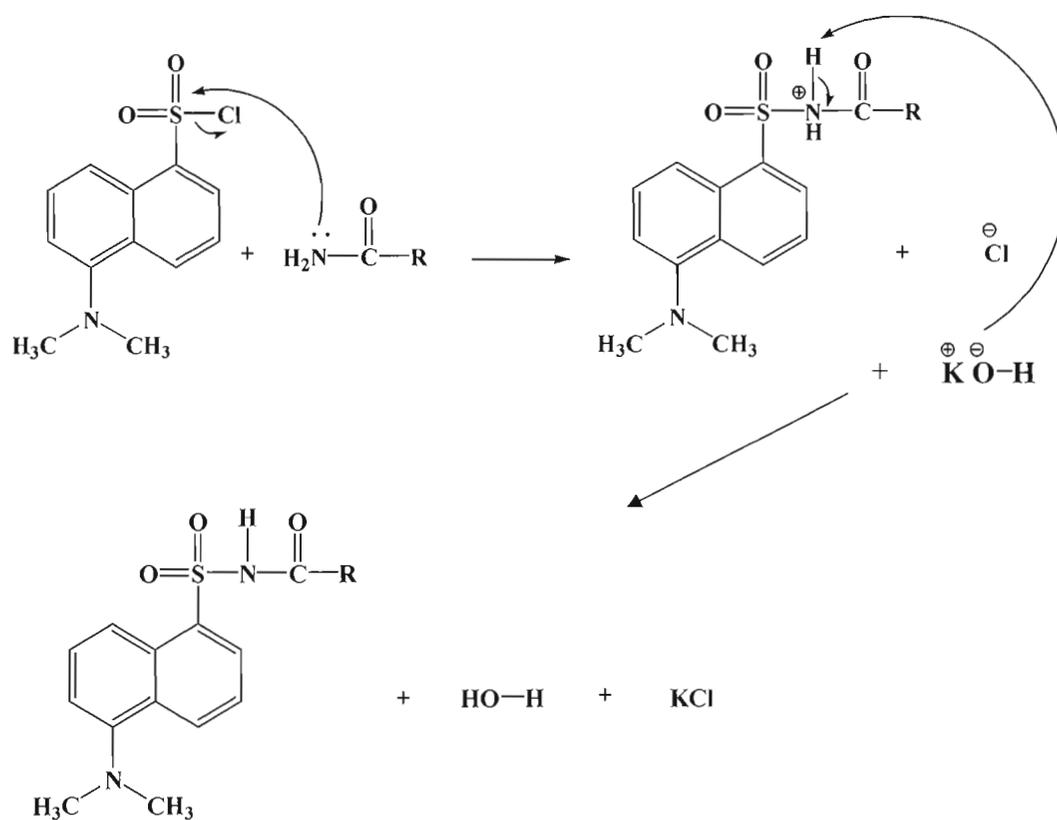


Figure 2.4 Mécanisme de dérivation des amides primaires

Chapitre III

3 MATÉRIEL ET MÉTHODE

3.1 GÉNÉRALITÉS

Les viales et les ballons utilisés pour contenir les produits dérivés bruts et purifiés ont été purgés sous une atmosphère d'azote (Liquid Carbonic). Les montages réactionnels ainsi que les ballons contenant les réactifs ont été fermés avec des septums en caoutchouc (Aldrich). Les mélanges réactionnels ont été agités à l'aide de barreaux magnétiques recouverts de Teflon^{md}. Des plaques chromatographiques commerciales en silice SiO₂ et d'une épaisseur de 2 mm ont été utilisées pour la chromatographie sur couche mince (CCM, plaque, Silica Gel 60 F₂₅₄, 250 nm, EM Separation Technology, Merck KGaA). La révélation des plaques CCM a été exécutée respectivement par une lampe de lumière ultraviolette de 254 nm et par l'iode (I₂). Les produits bruts ont été purifiés par chromatographie radiale à l'aide d'un Chromatotron^{md} (modèle 7924T, Harrison Research S.No.Y03). Les produits bruts et purifiés ont été obtenus en évaporant les solvants à l'aide d'un évaporateur rotatif (Modèle RE-47, lot no. A08031, Yamato scientific co. Ltd, Tokyo, Japan) sous pression réduite (générée par une trompe à eau).

Les spectres IR des produits dérivés purifiés ont été réalisés avec un appareil Perkin-Elmer 1600 en solution dans le tétrachlorure de carbone (CCl₄), en déposant une goutte entre deux pastilles de chlorure de sodium (film). Les spectres RMN du proton (RMN ¹H) et du carbone 13 (RMN ¹³C) ont été enregistrés avec un appareil Varian-Gemini 300BB à une fréquence respectivement de 300 MHz et de 75 MHz, en utilisant le chloroforme deutérié (CDCl₃) comme solvant. Les déplacements chimiques sont exprimés en parties par million (ppm) par rapport au chloroforme résiduel utilisé

comme référence interne dont le signal arbitrairement fixée à 7,27 ppm (RMN ^1H) et à 77,0 ppm (RMN ^{13}C).

3.2 RÉACTIFS ET SOLVANTS UTILISÉS POUR LA DÉRIVATISATION DES AMIDES ÉTUDIÉS ET L'ANALYSE DE LEURS PRODUITS DÉRIVÉS DNS-AMIDES.

Le solvant utilisé pour la dérivation est le dichlorométhane (CH_2Cl_2), grade ACS, (EMD Chemical Inc, lot n° 47212). Lors de la séparation des produits par la chromatographie radiale, l'acétate d'éthyle ($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$); grade ACS, pureté de 99.5%, (EMD Chemical Inc, lot n° 47038) a été utilisé en plus du CH_2Cl_2 .

Pour la recristallisation, deux solvants ont été utilisés, le tétrahydrofurane THF ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$); grade chromatographie liquide et gazeuse, stabilisé avec 250 ppm de BHT (4-méthyl-2,6-di-t-butyl-phénol), pureté de 99.95%, (EMD Chemical Inc, lot n° 44177428) et l'éther (éther diéthylique anhydre), grade ACS (Anachemia, lot n° 190503).

Les solvants utilisés pour la phase mobile sont : L'acétonitrile (CH_3CN); grade HPLC, pureté de 99.8%, (EMD Chemical Inc, lot n° 47078), acide formique (HCO_2H); grade ACS, pureté de 88%, (Fischer, lot n°026514).

Les amides, la base et le réactif employés sont : L'acrylamide ($\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$); pureté 99%; (Bioshop, lot n° 7E3991), l'acétamide (CH_3CONH_2); pureté de 98%, (Anachemia, lot n° 742523), le benzamide ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CONH}_2$); pureté de 99%; (Sigma, lot n° 07204AF), le propionamide ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CONH}_2$); pureté de 97% ; (Aldrich chemical company Inc, lot n° 614KE), l'hydroxyde de potassium anhydre granules (KOH); pureté 85% ; grade ACS; (Fischer scientifique) et le chlorure de dansyle (DNS – Cl); pureté de 95% (Sigma Aldrich chimio GmbH P.O, Steinheim, lot n° 125K2605).

3.3 PROPRIÉTÉS DES RÉACTIFS

Les propriétés physiques des réactifs et des amides primaires sont présentées dans les tableaux 3.1 et 3.2 respectivement.

Tableau 3.1 Propriétés physiques des réactifs DNS-Cl et KOH [Material Safety Data Sheet, Dansyl chloride]

	DNS-Cl	KOH
Numéro de CAS	605-65-2	1310-58-3
Masse molaire (g/mol)	269,75	56,11
Température de fusion (°C)	72-74	361

Tableau 3.2 Propriétés physiques des amides primaires étudiés [Hand Book of fine chemicals, p. 73, 111, 269 et 2112]

	Acrylamide	Acétamide	Benzamide	Propionamide
Numéro de CAS	79-06-1	60-35-5	55-21-0	79-05-0
Masse molaire (g/mol)	71,08	59,07	121,14	73,09
Température de fusion (°C)	82-86	78-80	125-128	76-79
Température d'ébullition (°C)	125 25 mm Hg	221	-	213
Densité (g/mL)	-	-	-	1,042

3.4 PROCÉDURE DE DÉRIVATISATION DES AMIDES ÉTUDIÉS PAR LE CHLORURE DE DANSYLE

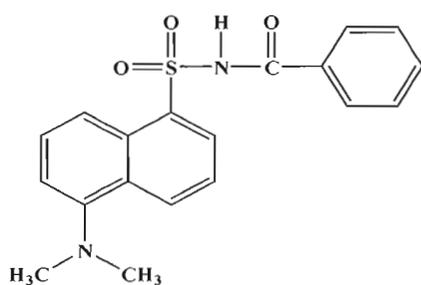
3.4.1 *Description du protocole général de la dérivation des amides étudiés par le chlorure de dansyle*

La dérivation des amides par le DNS-Cl a été effectuée en solution dans le dichlorométhane (CH_2Cl_2) en présence de la base KOH granules. La méthode de synthèse des dérivés standards DNS- amide est la suivante : Dans un ballon à fond rond de 50 mL munie d'un agitateur magnétique et contenant un volume de 10 mL de CH_2Cl_2 , une quantité de la base KOH granules a été ajoutée. Le mélange a été agité pendant 15 min, puis une quantité de 50 à 70 mg d'amide dissoute dans un volume de 15 mL à 20 mL de CH_2Cl_2 a été ajoutée en une portion au mélange réactionnel en agitant pendant une heure à température ambiante. Par la suite le mélange réactionnel a été refroidi à une température de 0°C sur une période de 10 min. Les rapports molaires des deux réactifs KOH / DNS-Cl sont présentés dans les tableaux 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 et 4.5 (section résultats et discussion).

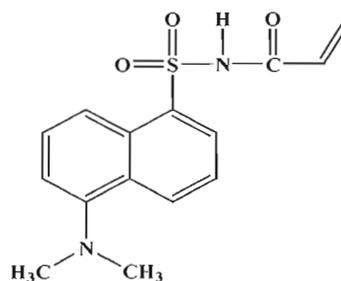
Ensuite, une solution de DNS-Cl/ CH_2Cl_2 (la concentration de DNS-Cl/ CH_2Cl_2 dépend du rapport molaire de l'amide et du DNS-Cl) maintenue à une température de 0°C a été ajoutée gouttes à gouttes au mélange réactionnel qui a été agité conformément aux paramètres ; temps et température selon les dérivés DNS-amides synthétisés (tableaux 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 et 4.5 ; section résultats et discussion). Finalement, la réaction a été parachevée rapidement en milieu acide, en ajoutant une solution d'acide chlorhydrique 0,1N afin de neutraliser le mélange réactionnel (pH = 6 à 7). La phase organique engendrée a été décantée et séchée avec un excès du sulfate de magnésium (MgSO_4).

Le mélange a été ensuite filtré et le solvant CH_2Cl_2 a été évaporé. Après, le produit brut obtenu a été séparé et purifié par la chromatographie radiale, en utilisant comme éluant un mélange composé des deux solvants ; $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (4 :1). Les fractions récupérées

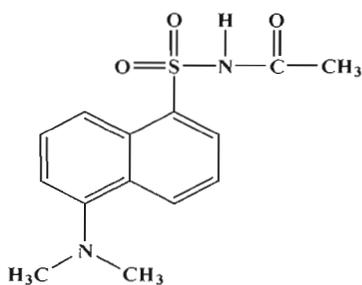
du produit dérivé pur DNS-amide (figure 3.1) ont été collectionnées, caractérisées par IR, RMN ^1H et RMN ^{13}C et par la suite analysées par le couplage HPLC-UV/FLUO. Dans le cas où la caractérisation montre que les produits dérivés DNS-amides purifiés par chromatographie radiale sont contaminés par des faibles quantités d'impuretés, la technique de recristallisation a été employée. Lors de cette étape, un mélange de deux solvants le tétrahydrofurane THF et l'éther a été utilisé.



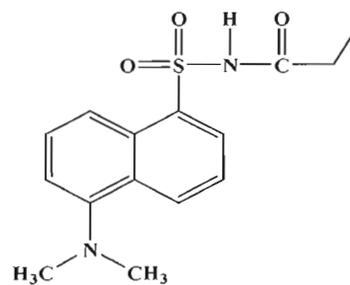
DNS- benzamide



DNS- acrylamide



DNS- acétamide



DNS- propionamide

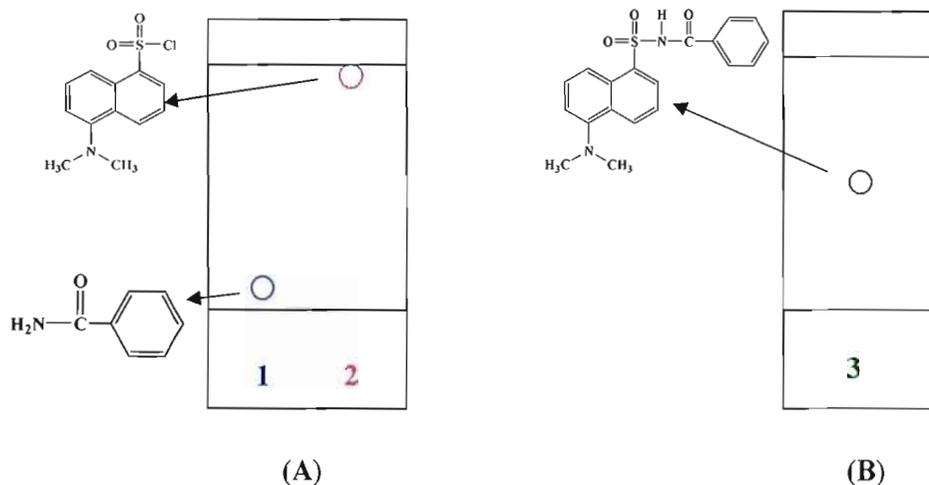
Figure 3.1 Structures chimiques des dérivés DNS-amides étudiés issus de la réaction de dérivatisation par le DNS-Cl

3.4.2 Exemple spécifique; synthèse du dérivé DNS-benzamide

Afin de développer la méthode de synthèse des quatre dérivés standards amides, le benzamide a été choisi au début, car c'est un amide qui est visible en UV, ce qui a permis de suivre le déroulement de la réaction par la chromatographie sur couche mince (CCM) et par la technique HPLC-UV.

La procédure de dérivatisation du benzamide qui a permis d'obtenir le meilleur rendement (47%) est la suivante : Dans un ballon à fond rond muni d'un agitateur magnétique et contenant une solution de CH_2Cl_2 (2 mL), une quantité de KOH granules (3 éq.; 115 mg; 2,10 mmol) est ajoutée. Le mélange est agité pendant 7 à 10 min. Par la suite, une solution de benzamide (1 éq.; 70 mg; 0,60 mmol) dissoute dans le CH_2Cl_2 (10 mL) est ajoutée. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant une heure à température de la pièce et fut portée à 0°C sur une période de 10 min. Ensuite une solution de DNS-Cl (1.2 éq.; 187 mg; 0,70 mmol) dans le CH_2Cl_2 (3 mL) est ajoutée goutte à goutte. Le mélange a été maintenu sous agitation pour une période de 5 heures à 0°C et ensuite à température ambiante pendant 24 heures. Finalement, la réaction a été parachevée rapidement en milieu acide avec l'ajout d'une solution de HCl 0.1 N, le pH fut ajusté de 6 à 7. La phase organique récupérée a été séchée avec un excès de MgSO_4 , filtrée et évaporée pour ainsi obtenir 100 mg du produit brut qui a été purifiée par chromatographie radiale (éluant 80 : 20 ; CH_2Cl_2 / AcOEt) afin d'isoler le produit dérivé pur le DNS-benzamide.

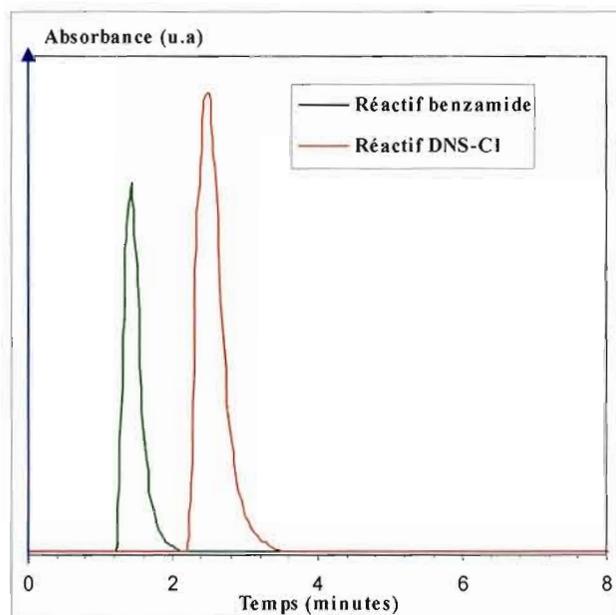
Les résultats d'élution de la plaque CCM des deux réactifs benzamide et DNS-Cl (figure 3.2 (A)) et de celle du produit obtenu après purification (figure 3.2 (B)) montrent l'apparition d'une nouvelle tache **3** (figure 3.2 (B)), dont le rapport frontal (Rf) est intermédiaire de ceux des deux taches **1** et **2** disparues et correspondent respectivement au benzamide et au DNS-Cl. Ceci signifie la formation d'un nouveau produit.



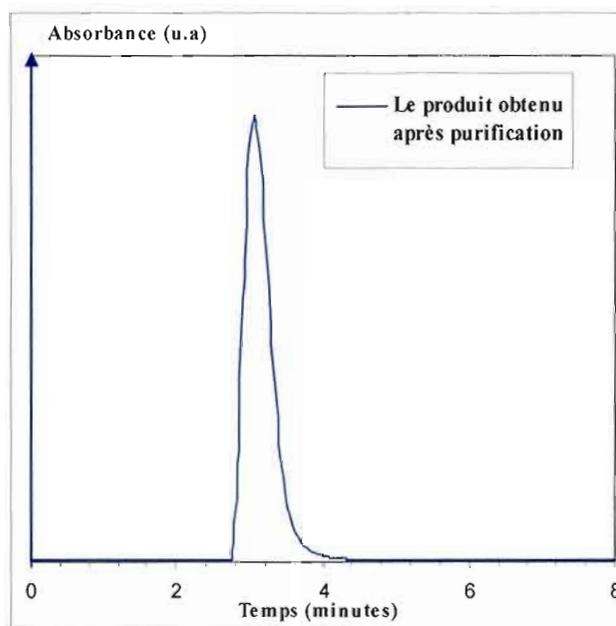
Plaque de CCM A ; tache 1 : Benzamide
 Plaque de CCM A ; tache 2 : Réactif DNS-Cl
 Plaque de CCM B ; tache 3 : Produit obtenu après purification

Figure 3.2 Plaques de CCM des deux réactifs ; benzamide¹ et DNS-Cl² (A) et du produit obtenu après purification³ (B)

Ces résultats ont été confirmés par la méthode d'analyse HPLC-UV (détecteur UV modèle; Perkin Elmer LC-15). Les figures 3.3 (A) et 3.3 (B) montrent respectivement les chromatogrammes des deux réactifs le benzamide (1,7 min) et le DNS-Cl (2,6 min) ainsi que le chromatogramme du produit obtenu après purification (3,2 min). Ces résultats montrent que le temps de rétention (tr) de ce dernier est différent de ceux des deux réactifs le benzamide et le DNS-Cl et concordent avec les données obtenues par CCM. De même, l'analyse simultanée par la méthode HPLC-FLUO (modèle détecteur; PERKIN ELMER 650 S) montre que le produit formé est fluorescent. Afin d'identifier la structure de ce nouveau produit et de s'assurer de la formation du dérivé attendu le DNS-benzamide, des analyses IR, RMN ¹H et RMN ¹³C ont été réalisées. Les spectres IR et RMN obtenus pour ce produit sont présentés dans la section résultats et discussion (figures 4.1, 4.6 et 4.13).



(A)



(B)

Figure 3.3 Chromatogrammes HPLC-UV (détecteur UV modèle ; Perkin Elmer LC-15) des réactifs; benzamide (1,7 min) et DNS-Cl (2,6 min) ainsi que du produit obtenu après purification (3,2 min).

3.5 CHOIX DE LA TECHNIQUE D'ANALYSE

Les produits dérivés DNS-amides synthétisés sont séparés par HPLC à phase inverse et détectés respectivement par UV et fluorescence. Le choix de la méthode d'analyse est dû d'une part et comme il a été déjà mentionné à la section 2.2 (le réactif de dérivatisation) au fait que les produits dérivés DNS-amides sont non ioniques et peu polaires. La séparation des produits en HPLC à phase inverse repose donc en plus de la polarité des produits à séparer (le plus polaire et le moins retenu est élué en premier), sur leur affinité vis-à-vis de la phase stationnaire et de la phase mobile.

La phase stationnaire de la colonne en mode inverse est une C18 (n-octyldécyle), constituée de longues chaînes d'hydrocarbonées qui sont alignées parallèlement les unes aux autres et perpendiculairement à la surface des particules, donnant naissance à une structure en brosse considérée comme une surface sur laquelle se produit une adsorption physique. Les molécules entrent en compétition pour occuper un site sur la surface organique. Les longueurs des chaînes permettent d'avoir des phases dont la capacité de rétention est plus élevée et d'utiliser des échantillons plus volumineux [Skoog, D. A. et al., 2003. *Principe d'analyse instrumentale*; édition de Boeck Université, p. 740]. L'éluion en mode inverse s'effectue avec une phase mobile constituée d'un mélange de solvants polaires, tels que l'eau, le méthanol et l'acétonitrile. La structure des produits DNS-amides synthétisés varie selon la chaîne hydrocarbonée qui est propre à chaque amide (fonction R, figure 2.4). Ceci signifie que les interactions de cette chaîne avec celles constituant la phase stationnaire de la colonne et avec les solvants de la phase mobile dépendent de la structure chimique de chaque dérivé standard DNS-amide, ce qui devrait permettre leur séparation.

D'autre part et comme mentionné précédemment, les dérivés DNS-amides en plus d'être fluorescents, ils absorbent en UV, ce qui permet d'utiliser respectivement le détecteur UV et fluorescence pour les décerner.

3.6 INSTRUMENTATION D'ANALYSE

Les conditions choisies pour le couplage HPLC-UV/FLUO sont présentées dans les tableaux suivants (tableaux 3.3 et 3.4).

Tableau 3.3 Paramètres optimaux de HPLC

	Suivi de la réaction de dérivatisation du DNS-benzamide	Analyse des dérivés standards DNS-amides étudiés
Colonne	CSC – Spherisorb ODS-1; 5 µm 150 x 4,6 mm d.i	
Pompe	WATERS	HITACHI, L-6 200 A
Condition d'élution	Mode isocratique ACN : H ₂ O : HCO ₂ H (80 : 18 : 2) Débit : 1,5 mL/min	- Analyse individuelle des dérivés en mode isocratique ACN : H ₂ O : HCO ₂ H (80 : 18 : 2) Débit : 1,5 mL/min - Séparation du mélange des dérivés en mode gradient ACN +2 % HCO ₂ H / H ₂ O Gradient : 0 à 40 min 40% à 60% ACN (équilibre : 5 min) Débit : 0,7 mL/min
Volume d'injection (µL)	20	

Tableau 3.4 Paramètres optimaux des deux détecteurs (UV et fluorescence)

	Suivi de la réaction de dérivatisation du DNS-benzamide	Analyse des dérivés standards DNS-amides étudiés
DÉTECTEUR UV		
Modèle	PERKIN ELMER LC-15	VARIAN 9050
$\lambda_{\text{absorption}}$ (nm)	254	254
DÉTECTEUR FLUO		
Modèle	PERKIN ELMER 650 S	HITACHI L-7480
$\lambda_{\text{excitation}}$ (nm)	345	345
$\lambda_{\text{émission}}$ (nm)	530	535

Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission employées en fluorescence et qui sont de 345 nm et 535 nm ont été déterminées respectivement par le spectromètre UV (modèle CARY/1E) et le spectrofluorimètre (modèle Perkin Elmer, LS 50B).

Chapitre IV

4 RÉSULTATS ET DISCUSSION

4.1 SYNTHÈSE DES DÉRIVÉS DNS-AMIDES

Au cours de ce travail, une méthode de dérivation et d'analyse globale des amides a été développée. Afin d'élaborer la technique analytique, il fallait avoir des standards purs de chaque dérivé DNS-amide, mais puisque ces produits ne sont pas disponibles commercialement, il s'est avéré nécessaire de les synthétiser. Une méthode de synthèse a été alors développée pour les trois classes d'amides primaires (aromatiques, aliphatiques insaturés et aliphatiques saturés). Les amides choisis pendant cette étude sont le benzamide, l'acrylamide, l'acétamide et le propionamide. Les produits dérivés bruts obtenus ont été isolés et purifiés par chromatographie radiale accélérée par force centrifuge (Chromatotron). Les produits standards purs qui en résultent ont été caractérisés par IR, RMN ^{13}C et RMN ^1H .

4.1.1 Synthèse du dérivé DNS-benzamide

Lors de l'optimisation de la réaction de dérivation du benzamide par le DNS-Cl, le rapport molaire des réactifs et les paramètres (temps de réaction et température) ont été variés un seul à la fois afin d'avoir un rendement acceptable, ce qui permet l'isolation et la purification rapide du produit dérivé brut. La réaction de dérivation a été effectuée en solution dans le CH_2Cl_2 (tableau 4.1). Les résultats montrent que lors du premier essai, des rapports molaires DNS-Cl : benzamide : KOH de (1 : 1 : 3) ont été utilisés et que la température a été maintenue à 0°C selon la méthode de référence [Ishizuka, N. et *al.*, 2000]. Cependant aucune formation de produit dérivé n'a été constatée après 4h. Le mélange réactionnel a été alors laissé à température de la pièce sur une période de 4h. Pendant ce temps, la plaque de CCM a indiqué la formation d'un nouveau produit. Le

rendement obtenu fut de 31 %. Afin d'améliorer ce dernier, le rapport molaire de KOH : DNS-Cl a été augmenté à 44 : 1 et la réaction a été maintenue à température ambiante pendant une nuit (entrée 2) en gardant le même rapport molaire benzamide : DNS-Cl, cependant le rendement a diminué à 26 %. Ces résultats, montrent l'intérêt de garder le mélange réactionnel à 0°C pour 5 heures après l'ajout du réactif DNS-Cl, ce qui permet d'éviter l'hydrolyse de ce dernier. Le mode opératoire a été par la suite modifié en utilisant 3 équivalents de KOH (un excès plus élevé 44 :1 ne conduit pas à une amélioration du rendement; entrée 2). Le rapport molaire des réactifs benzamide : DNS-Cl a été augmenté à 2 : 1 et la réaction a été maintenue à 0°C sur une période de 5h, ainsi qu'à température ambiante jusqu'à disparition totale du DNS-Cl (18 h), ce qui a permis de donner lieu à un rendement de 40%. Cependant, le produit est contaminé avec une quantité équimolaire de benzamide. Étant donné que ces résultats ne s'avèrent pas suffisants, les rapports molaires des réactifs DNS-Cl : benzamide : KOH ont été modifiés à 1,2 : 1 : 3. La réaction a été maintenue à 0°C pendant 5 h comme dans le troisième essai et ensuite à température ambiante sur une période de 24 h, afin d'avoir un épuisement total du réactif benzamide. Ces paramètres ont permis d'améliorer le rendement à 47%.

Tableau 4.1 Paramètres de dérivatisation du benzamide par le DNS-Cl en solution dans le CH_2Cl_2

Entrées	Temps de réaction	Rapport molaire DNS-Cl : benzamide : KOH	Solvant	Rendement (%)
1	4h à 0 °C et 4h à T amb.	1 : 1 : 3	CH_2Cl_2	31
2	Une nuit à T amb.	1 : 1 : 44	CH_2Cl_2	26
3	5h à T 0 °C et 18h à T amb.	1 : 2 : 3	CH_2Cl_2	40
4	5h à T 0 °C et 24h à T amb.	1,2 : 1 : 3	CH_2Cl_2	47

4.1.2 Synthèse du dérivé DNS-acrylamide

Tous d'abord, la synthèse du produit dérivé DNS-acrylamide a été réalisée en utilisant les mêmes conditions opératoires que ceux de la synthèse du dérivé DNS-benzamide ; solvant (CH_2Cl_2), base (KOH) et parachèvement en milieu acide avec du HCl 0,1N. Au cours de l'étude de cette réaction de dérivatisation, les paramètres (température, temps et rapport molaire des réactifs) ont été variés un seul à la fois. Le meilleur rendement obtenu fut de 58 %, lorsqu'un rapport molaire DNS-Cl : acrylamide : KOH de (1,2 : 1 : 3) est utilisé et que la réaction est maintenue à 0°C sur une période de 5h et à température ambiante sur une période de 24h. Les résultats obtenus pour le DNS-acrylamide (tableau 4.2) concordent avec ceux obtenus pour le DNS-benzamide et montrent que l'amélioration du rendement dépend fortement de la température qui doit être maintenue à 0°C au début de la réaction.

Tableau 4.2 Paramètres de dérivatisation de l'acrylamide par le DNS-Cl en solution dans le CH_2Cl_2

Entrées	Temps de réaction	Rapport molaire DNS-Cl : Acrylamide : KOH	Solvant	Rendement (%)
1	Une nuit à T amb.	1 : 1 : 3	CH_2Cl_2	17
2	5h à T 0 °C et 18h à T amb.	1 : 2 : 3	CH_2Cl_2	56
3	5h à T 0 °C et 24h à T amb.	1,2 : 1 : 3	CH_2Cl_2	58

Étant donné que l'acrylamide n'est pas complètement soluble dans le solvant CH_2Cl_2 , un autre solvant a été choisi soit le tétrahydrofurane (THF ; $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$). Ceci a permis la solubilisation totale de l'acrylamide. La comparaison des résultats avec ceux obtenus en solution dans CH_2Cl_2 montre une augmentation du rendement (entrée 1, tableaux 4.2 et 4.3). Un rendement similaire à celui du DNS-benzamide (entrée 2, tableaux 4.2 et 4.3) est obtenu après une nuit à température de 0°C . L'entrée 3 indique également une diminution du temps de réaction avec un rendement optimal de 89 % du produit brut, mais l'isolation et la purification subséquente du produit brut par la chromatographie radiale produit une perte par hydrolyse du dérivé DNS-acrylamide pour donner un rendement de 41 % du produit purifié. Les résultats sont présentés dans le tableau 4.3.

Tableau 4.3 Paramètres de dérivatisation de l'acrylamide par le DNS-Cl en solution dans le THF

Entrées	Temps de réaction	Rapport molaire Acrylamide : DNS-Cl : KOH	Solvant	Rendement (%)
1	Une nuit à T amb.	1 : 1 : 3	THF	44
2	Une nuit à T 0°C	1 : 2 : 3	THF	54
3	2h à T 0°C et 6h à T amb.	1 : 2 : 3	THF	89 (41 après séparation)

4.1.3 Synthèse du dérivé DNS-acétamide

Des rapports molaire des réactifs identiques à ceux employés pour la synthèse du dérivé DNS-acrylamide en solution dans le CH_2Cl_2 (tableau 4.2, entrées 2 et 3) ont été utilisés afin d'avoir un bon rendement de la réaction de dérivatisation. Deux essais ont été

réalisés lors desquels les paramètres (temps et température de la réaction) ont été variés un seul à la fois. Le meilleur rendement obtenu fut de 55 % avec 1,2 équivalents de DNS-Cl et 3 équivalents de KOH (tableau 4.4).

Tableau 4.4 Paramètres de dérivation de l'acétamide par le DNS-Cl en solution dans le CH_2Cl_2

Entrées	Temps de réaction	Rapport molaire DNS-Cl : Acétamide : KOH	Solvant	Rendement (%)
1	Une nuit à T 0 °C	1 : 2 : 3	CH_2Cl_2	48
2	5h à T 0 °C et 24h à T amb.	1,2 : 1 : 3	CH_2Cl_2	55

4.1.4 Synthèse du dérivé DNS-propionamide

Finalement, la synthèse du dérivé DNS-propionamide a été réalisée en solution dans le CH_2Cl_2 , en utilisant les conditions opératoires qui ont permis d'avoir des rendements acceptables pour les autres dérivés DNS-amides étudiés. Les résultats du tableau 4.5 montrent que l'emploi d'une basse température au début de la réaction de dérivation et le maintien de cette dernière à température ambiante permet d'avoir les meilleurs rendements. Ces résultats montrent également que l'entrée 2 donne un rendement légèrement plus élevé que l'entrée 1, ce qui signifie que les essais de dérivation basés sur le réactif DNS-Cl comme limitant donnent des rendements relativement meilleurs que ceux basés sur l'amide. Cette tendance est observée également pour les autres amides étudiés (benzamide, acrylamide et acétamide).

Tableau 4.5 Paramètres de dérivation du propionamide par le DNS-Cl en solution dans le CH_2Cl_2

Entrées	Temps de réaction	Rapport molaire DNS-Cl : Propionamide : KOH	Solvant	Rendement (%)
1	3h à T 0 °C et une nuit à -12°C et 9h à T amb.	1 : 2 : 3	CH_2Cl_2	52
2	5h à T 0 °C et 24h à T amb.	1,2 : 1 : 3	CH_2Cl_2	54

L'amélioration du rendement de la réaction de dérivation des amides étudiés a permis d'avoir une quantité suffisante de chaque dérivé DNS-amide et qui est susceptible d'être purifiée par la chromatographie radiale et caractérisée par les techniques IR, RMN ^1H et ^{13}C .

4.2 CARACTÉRISATION PAR INFRAROUGE (IR) DES DÉRIVÉS DNS-AMIDES

Les produits dérivés purs DNS-benzamide, DNS-acrylamide, DNS-acétamide et DNS-propionamide ont été respectivement caractérisés par IR. Les principales bandes caractéristiques obtenues à partir de l'analyse des spectres IR (pastille de NaCl) pour les quatre dérivés sont présentées dans le tableau 4.6.

- **Vibration d'allongement de la liaison N-H** : Les dérivés amides sulfonylés montrent une seule bande N-H qui se situe entre 3221cm^{-1} et 3262cm^{-1} , ce qui est consistant avec une fonction amide secondaire. Selon la littérature les sulfonamides secondaires $\text{R-SO}_2\text{-NHR}$ présentent une élévation à 3250cm^{-1} [Pavia, D. L. et *al.*, 1979. «Introduction to spectroscopy», page 69]. La variation de la fréquence d'absorbance de la bande N-H des dérivés DNS-amides dépend de la capacité de la délocalisation des électrons libres de l'azote vers la fonction carbonyle. La diminution du nombre d'onde d'absorbance de la

liaison N-H dans le dérivé DNS-acrylamide (3221 cm^{-1}) par rapport aux autres dérivés DNS-amides ($\sim 3255\text{ cm}^{-1}$) est expliquée par la forme de résonance dans laquelle les électrons libres de l'azote sont délocalisés vers la fonction carbonyle qui est davantage stabilisée par la conjugaison étendue de la liaison iminium avec le groupement vinyle. L'étirement aisé de l'hydrogène s'accompagne alors d'un déplacement des électrons de la liaison vers l'azote pour neutraliser sa charge. Ceci correspond en fait à une déprotonation de la fonction iminium dont la constante de la force du lien N-H est plus faible et donc de nombre d'onde plus bas. Cependant, cette forme de résonance ne semble pas être favorisée dans le dérivé DNS-benzamide qui exhibe un étirement de la fonction N-H à un nombre d'onde normale soit à 3257 cm^{-1} . Il semble donc que la délocalisation des électrons du groupe phényle n'est pas très contributive en raison de la perturbation subséquente du système aromatique de l'anneau ou des contraintes géométriques / stériques.

-Vibration d'allongement de la liaison C=O : Selon la littérature, les amides secondaires simple à chaîne ouverte ont une forte absorbance du carbonyle à environ 1640 cm^{-1} à l'état solide et jusqu'à 1670 cm^{-1} en solution diluée. [Silverstein, R. M. et *al.*, 1967. «Identification spectrométrique des composés organiques», p. 88-90]. Cependant, les résultats trouvés pour les dérivés étudiés DNS-amides (tableau 4.6) présentent un nombre d'onde plus élevée d'environ 30 cm^{-1} pour la bande carbonyle qui se situe en moyenne à 1710 cm^{-1} . Ceci est dû au fait que le groupement sulfonyle R-(SO₂)- se comporte comme un groupement attracteur et réduit de manière significative la délocalisation de la paire d'électrons libre de l'azote vers le carbonyle. Cette dernière présente alors un plus grand caractère de liaison double C=O, provoquant ainsi une augmentation du nombre d'onde d'absorbance pour son étirement. Les deux dérivés DNS-acrylamide et DNS-benzamide présentent toutefois une absorbance à un nombre d'onde inférieur de 24 cm^{-1} par rapport à ceux des dérivés d'amides saturés DNS-acétamide et DNS-propionamide. Ceci est dû à la délocalisation des électrons du groupe vinyle et phényle vers la fonction carbonyle réduisant ainsi le caractère de liaison double.

-Vibration d'allongement de la liaison $-(SO_2)-$: Les sulfonamides $R-SO_2-NH-R$ montrent généralement en solution deux bandes caractéristiques entre $1300\text{ cm}^{-1} - 1370\text{ cm}^{-1}$. À l'état solide, ces fréquences sont abaissées en moyenne de 15 cm^{-1} [Silverstein, R. M. et *al.*, 1967. «Identification spectrométrique des composés organiques», p. 93-94]. Ceci coïncide avec les résultats des spectres IR des dérivés DNS-amides qui montrent des bandes qui se situent entre 1321 cm^{-1} et 1343 cm^{-1} . Ces bandes peuvent également être dues à un allongement asymétrique de $S=O$ qui se présente à 1325 cm^{-1} [Pavia, D. L. et *al.*, 1979. «Introduction to spectroscopy», page 69]. L'allongement symétrique de $S=O$ se manifeste par une bande d'absorption entre 1059 cm^{-1} et 1064 cm^{-1} selon chaque dérivé DNS-amide.

*Tableau 4.6 Fréquences des principaux groupements organiques des dérivés
DNS-amides étudiés*

		N-H	C=O	R-SO₂-NH-	S=O
DNS- benzamide	Nombre d'onde (cm⁻¹)	3257	1705	1343	1059
	Intensité	Moyenne, large	Intense, fine	Moyenne, fine	Moyenne, fine
DNS- acrylamide	Nombre d'onde (cm⁻¹)	3221	1709	1336	1060
	Intensité	Intense, large	Intense, fine	Moyenne, fine	Moyenne, fine
DNS- acétamide	Nombre d'onde (cm⁻¹)	3262	1729	1321	1064
	Intensité	Intense, large	Intense, pointe	Moyenne, fine	Faible, fine
DNS- propionamide	Nombre d'onde (cm⁻¹)	3247	1729	1335	1061
	Intensité	Large, moyenne	Intense, fine	Moyenne, fine	Moyenne, fine

4.2.1 Vibrations spécifiques au dérivé DNS-benzamide

La comparaison du spectre IR du dérivé DNS-benzamide (figure 4.1) avec ceux des autres dérivés DNS-amides (figures 4.2, 4.3 et 4.4) montre l'apparition de bandes supplémentaires telle que la bande à 1692 cm^{-1} , qui est due à la fréquence d'absorbance de la liaison C=C aromatique du benzamide.

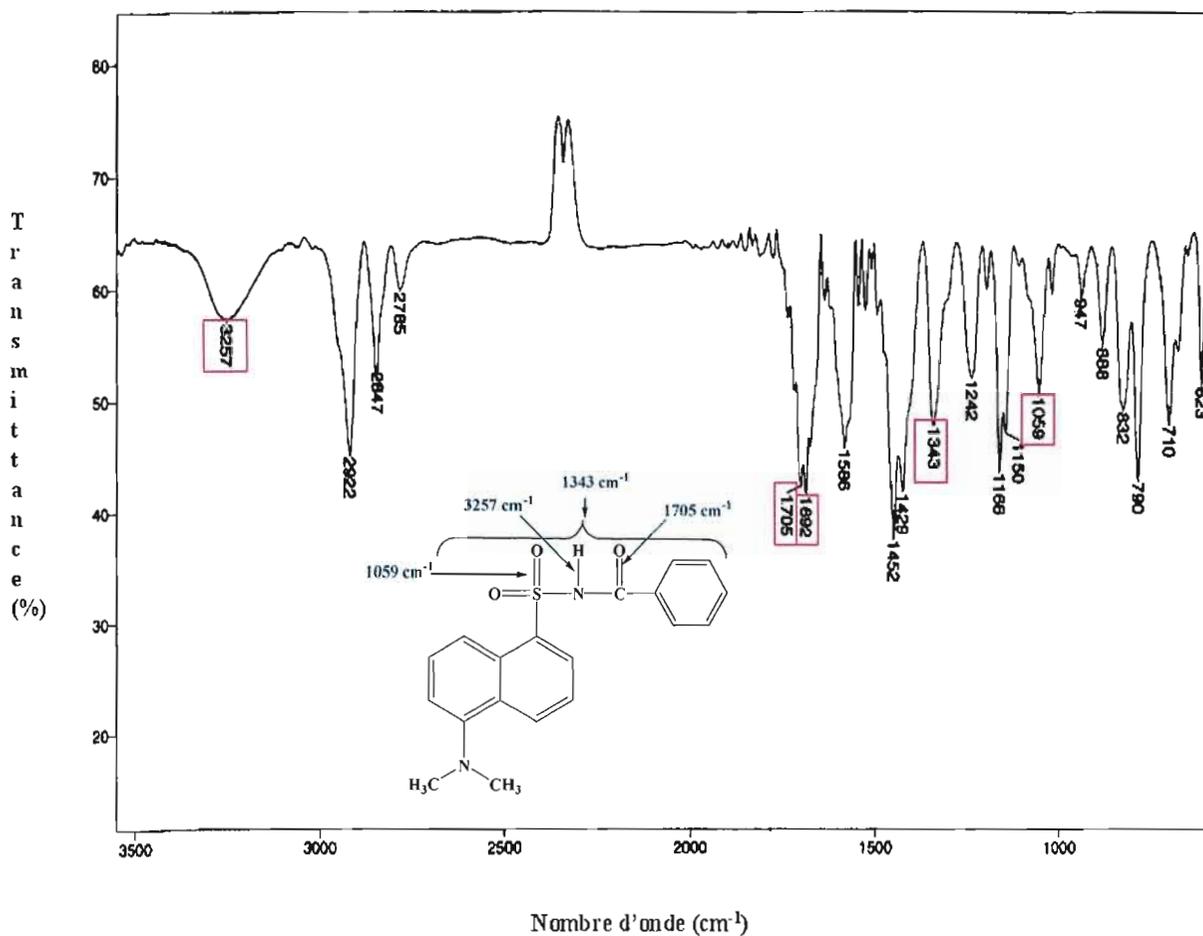


Figure 4.1 Spectre IR du dérivé DNS-benzamide

4.2.3 Vibrations spécifiques au dérivé DNS-acétamide

La figure 4.3 montre le spectre IR du dérivé DNS-acétamide et les bandes caractéristiques sont citées dans le tableau 4.6. L'analyse minutieuse des données indique que la bande à 2946 cm^{-1} est mieux que celle du dérivé DNS-acrylamide. Cette bande est attribuée à la somme des étirements C-H alkyle ($\text{CO-CH}_3 + \text{N}(\text{CH}_3)_2$).

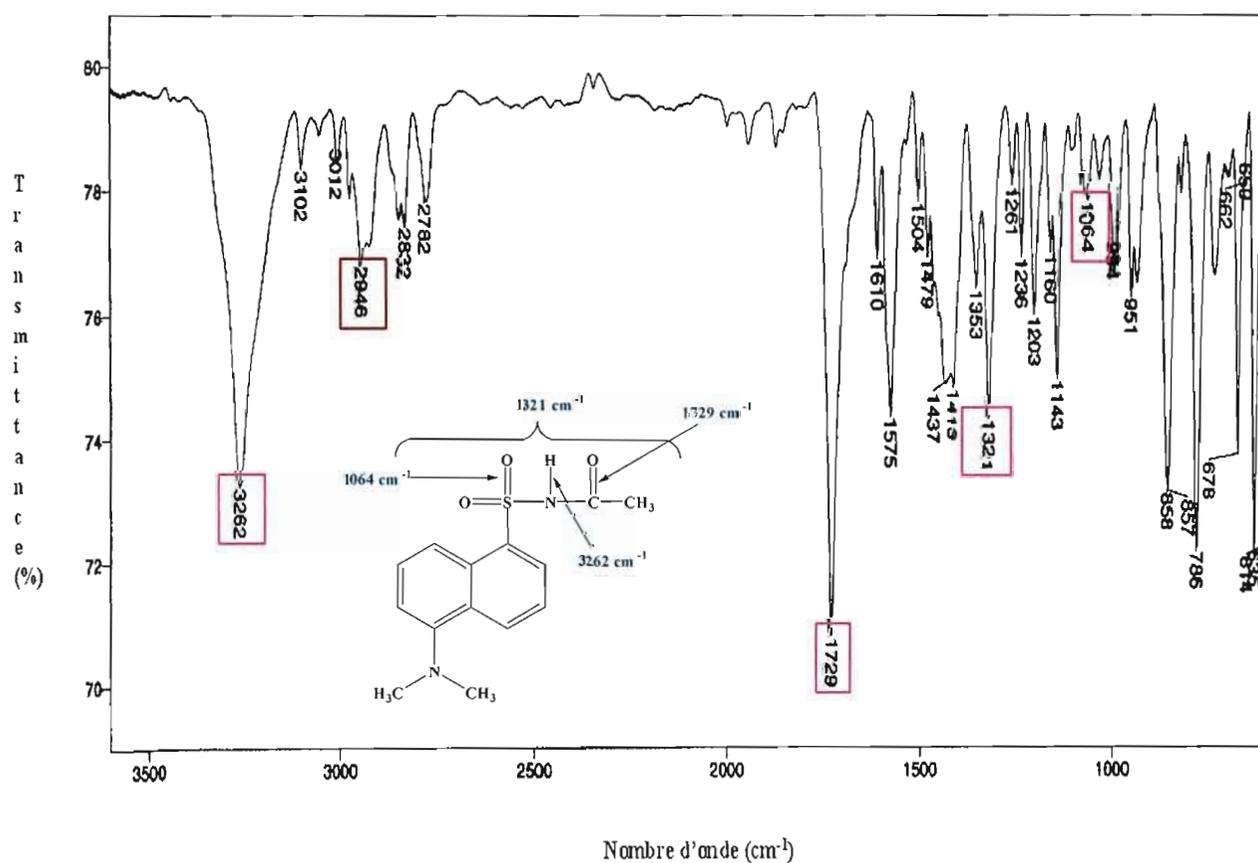


Figure 4.3 Spectre IR du dérivé DNS-acétamide

4.2.4 Vibrations spécifiques au dérivé DNS-propionamide

La figure 4.4 montre le spectre IR du dérivé DNS-propionamide. Ce spectre est quasi identique à celui du DNS-acétamide, mais une analyse qualitative indique que la bande à 2943 cm^{-1} est mieux définie que celles qui correspondent aux dérivés DNS-acétamide et DNS-acrylamide. Ces résultats sont dus à la somme des étirements H-C alkyle ($-\text{CH}_2\text{CH}_3 + \text{N}(\text{CH}_3)_2$). Les bandes caractéristiques du dérivé DNS-propionamide sont citées dans le tableau 4.6.

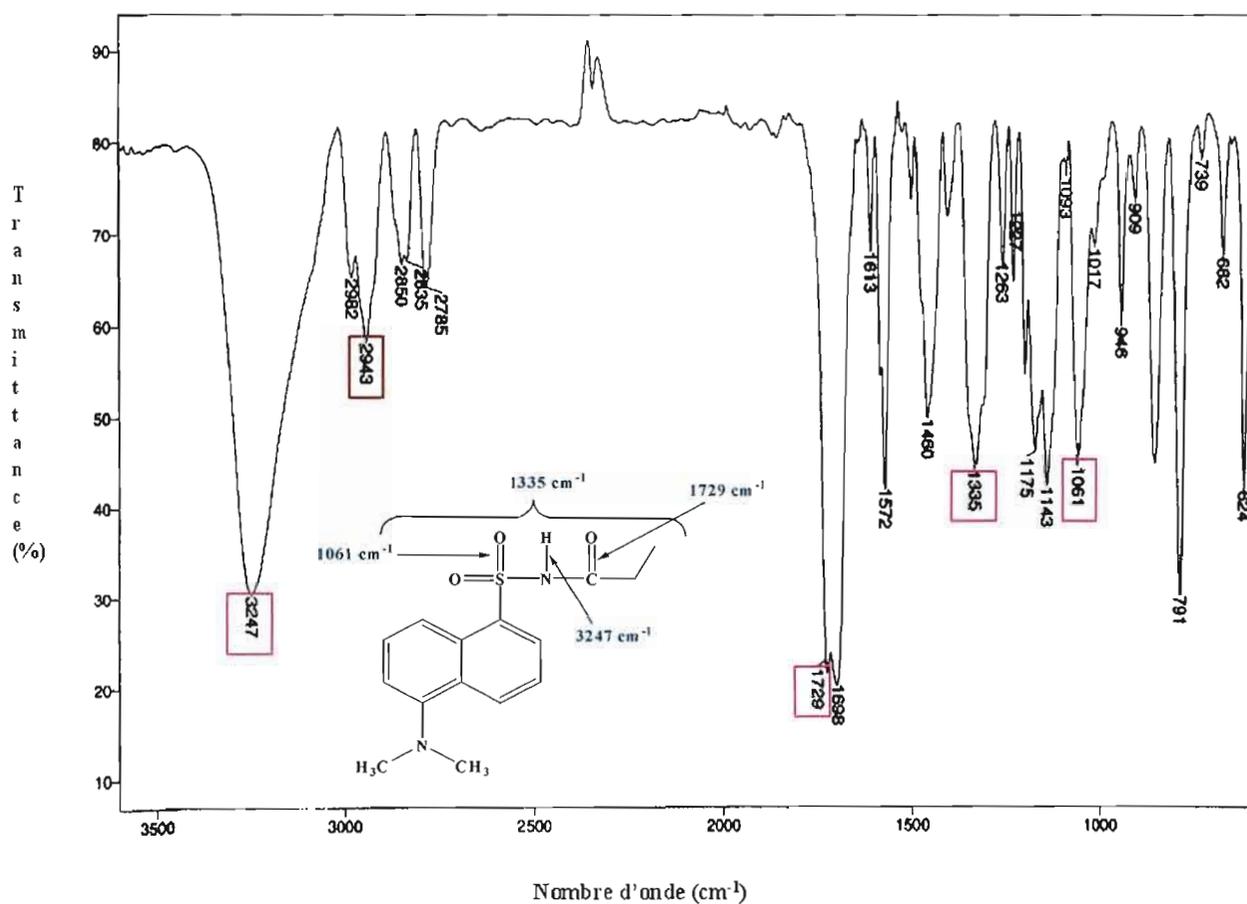


Figure 4.4 Spectre IR du dérivé DNS-propionamide

4.3 CARACTÉRISATION PAR LA MÉTHODE RMN DU PROTON (^1H) DES DÉRIVÉS DNS-AMIDES

Afin de compléter les informations obtenues par IR, l'analyse des dérivés standards DNS-amides par la méthode RMN ^1H en solution dans le CDCl_3 a été réalisée.

4.3.1 Analyse des données du spectre RMN ^1H du réactif DNS-Cl

Le spectre du réactif DNS-Cl (figure 4.5) montre une série de six signaux qui correspondent aux protons des deux noyaux aromatiques du DNS-Cl et un signal à 2,9 ppm qui correspond aux six protons méthyliques. L'interprétation des données du spectre RMN ^1H est présentée dans le tableau suivant.

Tableau 4.7 Interprétation du spectre RMN ^1H du réactif DNS-Cl

Position du signal (ppm) (déplacement chimique)	Multiplicité (apparence) et constante de couplage ; J (Hz)	Assignment
2,92	s	6 H (-N-(CH ₃) ₂)
7,27	d ($J = 7,4$)	1 H (DNS-aromatique)
7,59	dd ($J = 8,5$ et $7,7$)	1 H (DNS-aromatique)
7,70	dd ($J = 8,8$ et $7,7$)	1 H (DNS-aromatique)
8,37	dd ($J = 7,6$ et $1,2$)	1 H (DNS-aromatique)
8,44	d ($J = 8,8$)	1 H (DNS-aromatique)
8,73 à 8,70	d ($J = 8,5$)	1 H (DNS-aromatique)

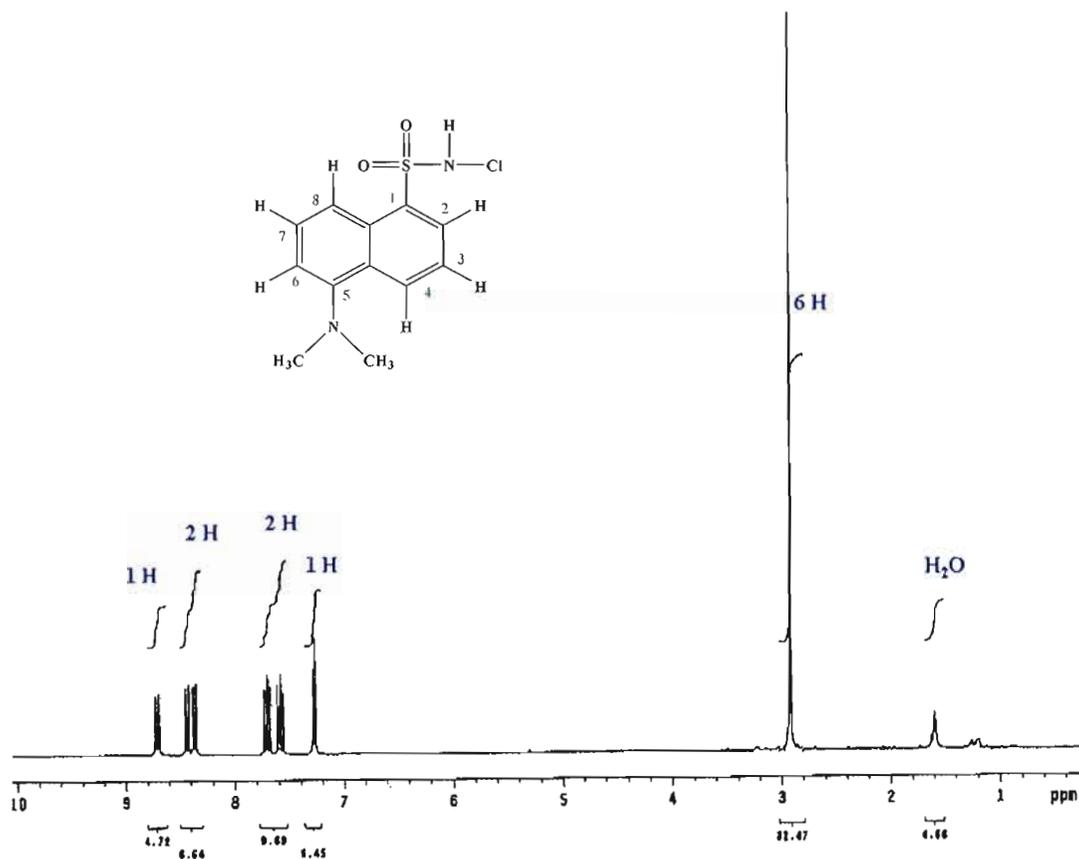


Figure 4.5 Spectre RMN ^1H du réactif DNS-Cl

4.3.2 Analyse des données du spectre RMN ^1H du dérivé standard DNS- benzamide

La comparaison du spectre RMN ^1H du réactif chlorure de dansyle (figure 4.5) avec celui du dérivé DNS-benzamide (figures 4.6 et 4.7) montre l'apparition de cinq protons aromatiques qui correspondent au benzamide et d'un proton à 9,4 ppm qui est caractéristique du groupe N-H amide secondaire. La description de la multiplicité et du nombre de protons selon leur position est présentée dans le tableau 4.8. Ces données supportent les résultats obtenus précédemment par l'analyse du spectre IR du dérivé DNS-benzamide.

Tableau 4.8 Interprétation du spectre RMN ^1H du DNS-benzamide

Position du signal (ppm) (déplacement chimique)	Multiplicité (apparence) et constante de couplage ; J (Hz)	Assignment
2,88	s	6 H (-N-(CH ₃) ₂)
7,16	d ($J = 7,4$)	1 H (DNS-aromatique)
7,35	t ($J = 7,7$)	2 H (en position meta du benzamide)
7,49	t ($J = 7,4$)	1 H (en position para du benzamide)
7,59	t ($J = 8,1$)	1 H (en position ortho du benzamide)
7,66	t ($J = 8,0$)	1 H (en position ortho du benzamide)
7,77	dd ($J = 7,4$ et $J = 1,6$)	2 H (DNS-aromatique)
8,44	d ($J = 8,8$)	1 H (DNS-aromatique)
8,65	dd ($J = 8,2$ et $J = 6,9$)	2 H (DNS-aromatique)
9,75	s ; large	1 H (N-H)

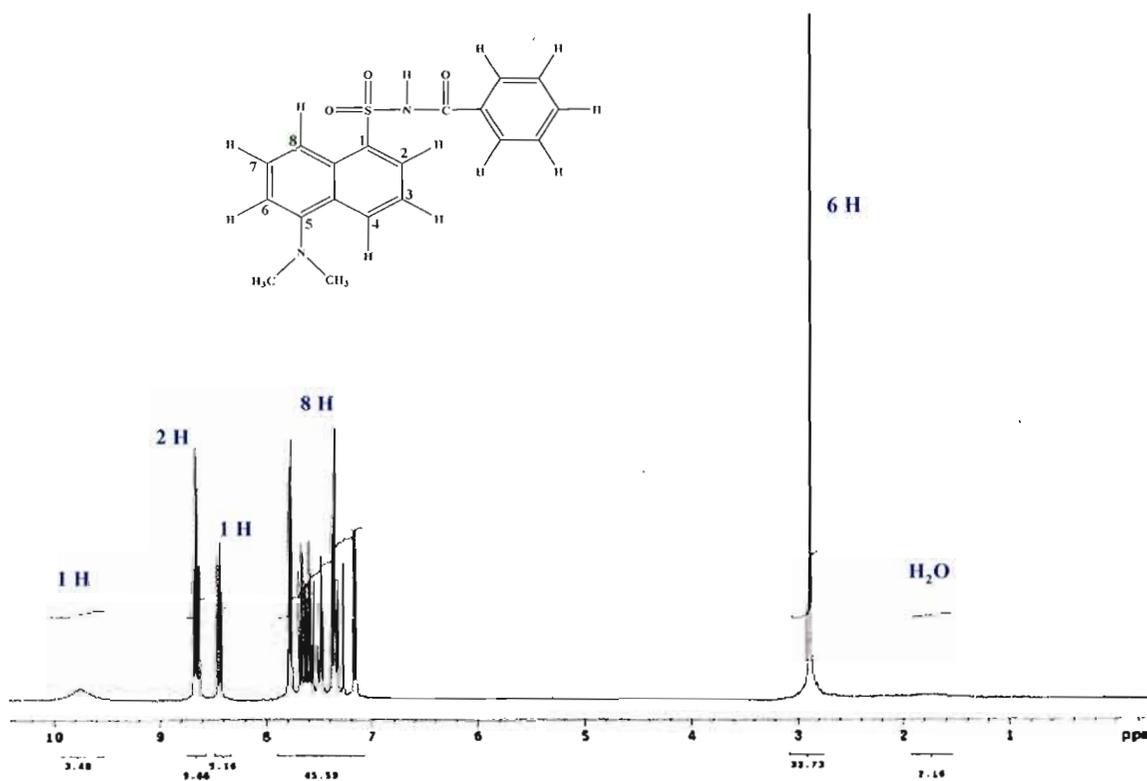


Figure 4.6 Spectre RMN ^1H du dérivé DNS-benzamide

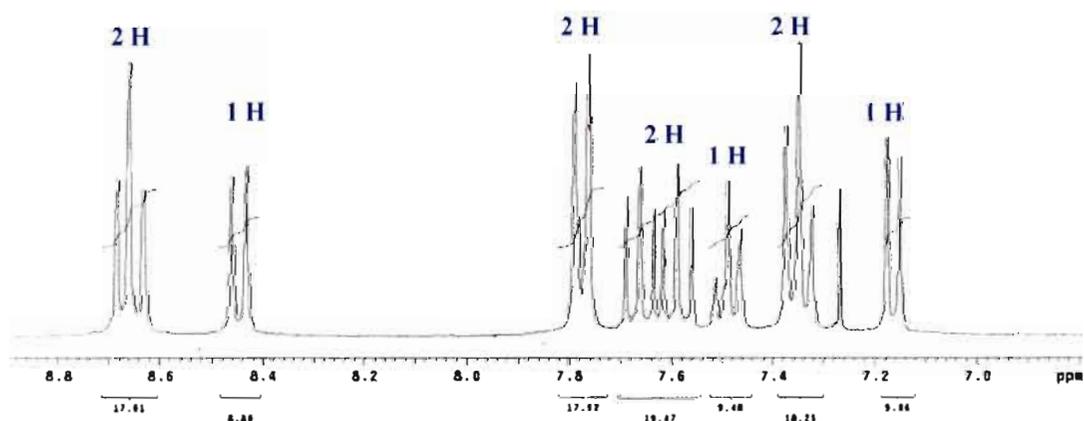


Figure 4.7 Expansion de la zone (5,5 ppm à 8,8 ppm) du spectre RMN ^1H du dérivé DNS-benzamide

4.3.3 Analyse des données du spectre RMN ^1H du dérivé standard DNS- acrylamide

L'interprétation du spectre RMN ^1H du dérivé DNS-acrylamide montre une série de 16 protons (figures 4.8 et 4.9). En comparant les données de ce spectre (tableau 4.9) avec celles du réactif de départ DNS-Cl (12 protons), trois nouveaux protons situés dans la zone entre 5,6 ppm et 6,5 ppm ont été constatés. Ces protons sont caractéristiques du groupement vinyle de l'acrylamide. De plus le spectre du dérivé DNS-acrylamide montre l'apparition d'un signal à 9,15 ppm. Ce dernier correspond au proton de la fonction (N-H).

Tableau 4.9 Interprétation du spectre RMN ^1H du DNS-acrylamide

Position du signal (ppm) (déplacement chimique)	Multiplicité (apparence) et constante de couplage ; J (Hz)	Assignment
2,89	s	6 H (-N-(CH ₃) ₂)
5,75	dd ($J = 10,4$ et $1,0$)	1 H (position 11; cis)
6,12	dd ($J = 17,0$ et $10,4$)	1 H (position 10)
6,33	dd ($J = 17,0$ et $1,0$)	1 H (position 11; trans)
7,19	d ($J = 7,1$)	1 H (DNS-aromatique)
7,58	dd ($J = 8,5$ et $7,4$)	1 H (DNS-aromatique)
7,62	dd ($J = 8,5$ et $7,4$)	1 H (DNS-aromatique)
8,28	d ($J = 8,5$)	1 H (DNS-aromatique)
8,56	dd ($J = 7,4$ et $1,1$)	1 H (DNS-aromatique)
8,64	d ($J = 8,5$)	1 H (DNS-aromatique)
9,15	s ; large	1 H (N-H)

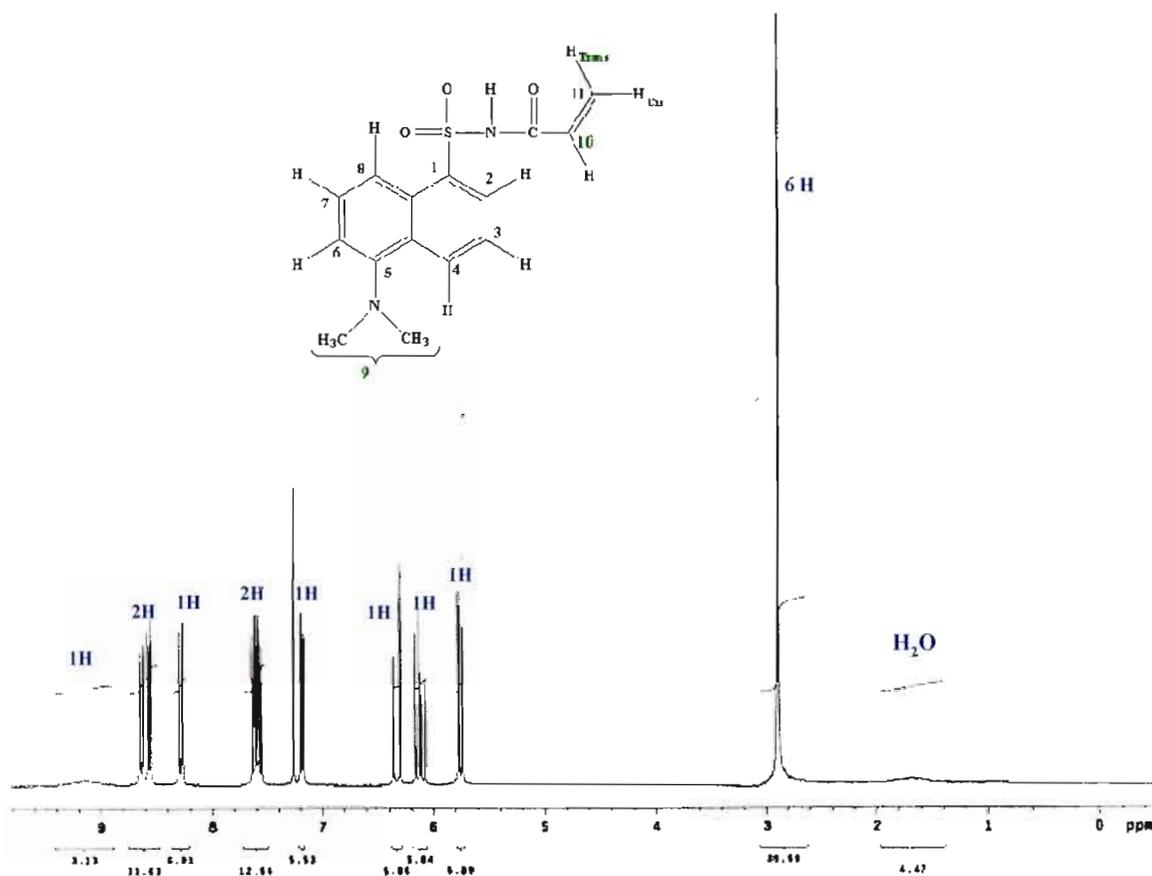


Figure 4.8 Spectre RMN ^1H du dérivé DNS-acrylamide

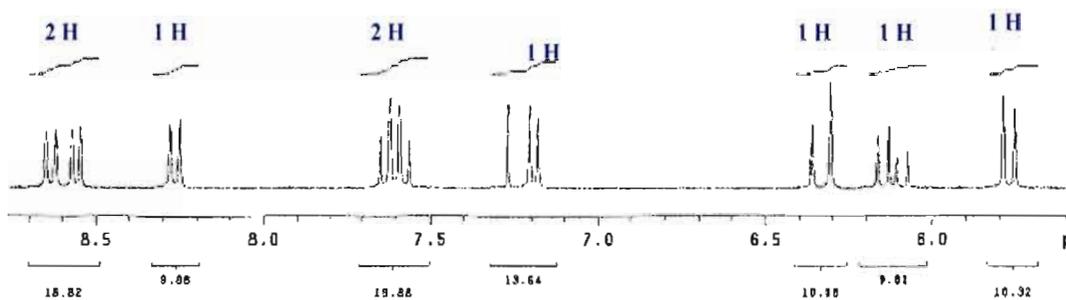


Figure 4.9 Expansion de la zone (5,6 ppm à 8,9 ppm) du spectre RMN ^1H du dérivé DNS-acrylamide

4.3.4 Analyse des données du spectre RMN ¹H du dérivé standard DNS- acétamide

Les données obtenues par l'analyse RMN ¹H du dérivé DNS-acétamide (tableau 4.10 et figure 4.10) sont en plein accord avec celles du chlorure de dansyle, à l'exception de deux signaux, un premier large à 8,30 ppm et un deuxième fin à 2,05 ppm. Ces deux signaux sont attribués respectivement au proton du groupement (N-H) amide secondaire et aux trois protons méthylique (-CH₃) de l'acétamide.

Tableau 4.10 Interprétation du spectre RMN ¹H du DNS-acétamide

Position du signal (ppm) (déplacement chimique)	Multiplicité (apparence) et constante de couplage ; J (Hz)	Assignment
2,05	s	3 H (CH ₃ acétamide)
2,91	s	6 H (-N-(CH ₃) ₂)
7,21	dd (J = 7,7 et 1,0)	1 H (DNS-aromatique)
7,60	dd (J = 8,6 et 7,7)	2 H (DNS-aromatique)
8,19	dd (J = 8,5 et 1,0)	1 H (DNS-aromatique)
8,30	s, large	1 H (N-H)
8,48	dd (J = 7,4 et 1,1)	1 H (DNS-aromatique)
8,63	d (J = 8,5)	1 H (DNS-aromatique)

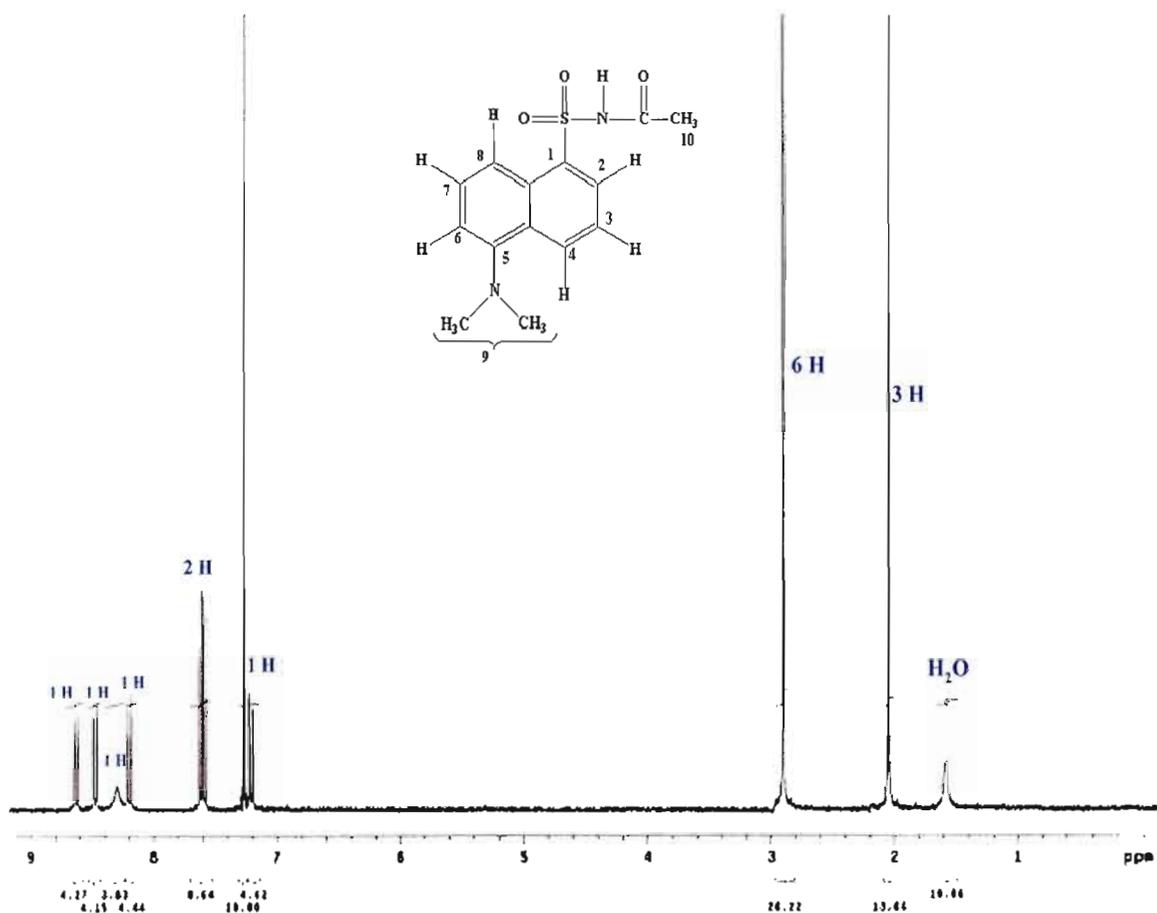


Figure 4.10 Spectre RMN ^1H du dérivé DNS-acétamide

4.3.5 Analyse des données du spectre RMN ^1H du dérivé standard DNS-propionamide

On remarque d'après l'analyse des données du spectre RMN ^1H du produit dérivé DNS-propionamide (tableau 4.11 et figure 4.11), la présence de deux nouveaux signaux situés dans la zone 1,03 à 0,98 ppm et 2,32 à 2,24 ppm, ce qui correspondent respectivement aux protons des groupements $-\text{CH}_3$ et $-\text{CH}_2-$ du propionamide. De plus, on constate l'apparition d'un signal large à 8,49 ppm (N-H, amide secondaire). Ces données

concordent avec celles du spectre RMN ^1H du DNS-Cl et avec les résultats obtenus précédemment par analyse IR du DNS-propionamide.

Tableau 4.11 Interprétation du spectre RMN ^1H du DNS-propionamide

Position du signal (ppm) (déplacement chimique)	Multiplicité (apparence) et constante de couplage; J (Hz)	Assignment
1,0	t ($J = 7,4$)	3 H (CH_3 propionamide)
2,26	q ($J = 7,4$)	2 H (CH_2 propionamide)
2,90	s	6 H ($-\text{N}-(\text{CH}_3)_2$)
7,20	d ($J = 6,9$)	1 H (DNS-aromatique)
7,58	dd ($J = 7,7$ et $3,6$)	1 H (DNS-aromatique)
7,62	dd ($J = 7,4$ et $3,3$)	1 H (DNS-aromatique)
8,22	d ($J = 8,8$)	1 H (DNS-aromatique)
8,49	s	1 H (N-H)
8,51	dd ($J = 7,4$ et $1,4$)	1 H (DNS-aromatique)
8,63	dd ($J = 7,4$ et $1,0$)	1 H (DNS-aromatique)

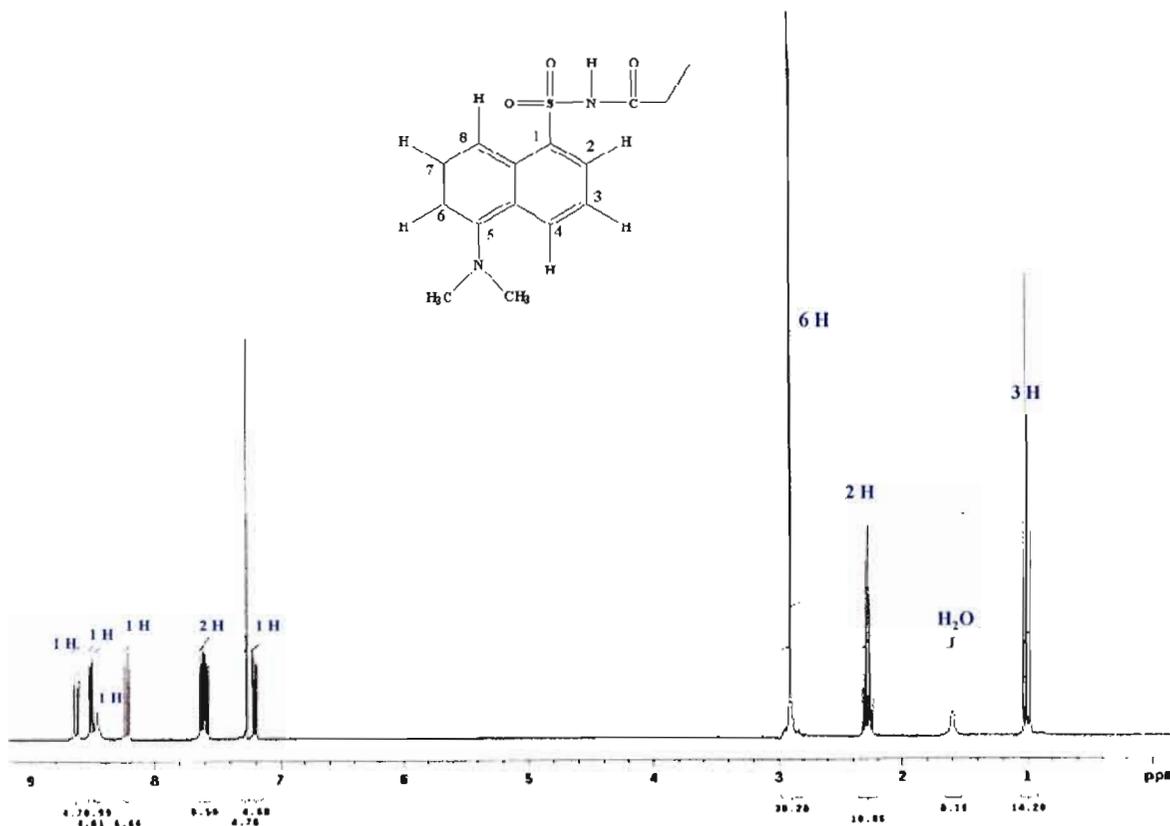


Figure 4.11 Spectre RMN ^1H du dérivé DNS-propionamide

Ces résultats montrent clairement la pureté des spectres RMN ^1H des quatre dérivés étudiés. Les données des spectres RMN ^1H (déplacement chimique) de chacun de ces produits coïncident avec sa structure chimique. Afin d'identifier le nombre de carbone constituant ces composés et de confirmer la pureté de ces produits, une caractérisation par RMN carbone 13 (RMN ^{13}C) s'est avérée nécessaire.

4.4 CARACTÉRISATION PAR LA MÉTHODE RMN DU CARBONE 13 (^{13}C) DES DÉRIVÉS DNS-AMIDES

La caractérisation par RMN ^{13}C du réactif DNS-Cl et des quatre dérivés standards DNS-amides synthétisés a été effectuée en solution dans le chloroforme deutéré avec une fréquence de 75 MHz.

4.4.1 Analyse des données du spectre RMN ^{13}C du réactif DNS-Cl

Les données du spectre RMN ^{13}C du réactif DNS-Cl montrent 10 carbones aromatiques entre 116,25 et 152,27 ppm et deux carbones aliphatiques à 45,67 ppm. Ces derniers sont dus au groupement $(-\text{N}-(\text{CH}_3)_2)$. L'interprétation des résultats est présentée dans le tableau suivant.

Tableau 4.12 Interprétation du spectre RMN ^{13}C du réactif DNS-Cl

Position du signal (ppm) (déplacement chimique)	Attribution
45,67	Deux carbones aliphatiques en position 11 ($-\text{N}-(\text{CH}_3)_2$)
116,25	Un carbone aromatique en position 7 (CH aromatique)
118,68	Un carbone aromatique en position 9 (CH aromatique)
123,06	Un carbone aromatique en position 2 (CH aromatique)
129,14	Un carbone aromatique en position 3 (CH aromatique)
129,58	Un carbone aromatique en position 8 (CH aromatique)
129,77	Un carbone aromatique en position 4 (CH aromatique)
130,30	Un carbone aromatique en position 5 (CH aromatique)
133,56	Un carbone aromatique en position 10 (CH aromatique)
139,92	Un carbone aromatique en position 1 ($-\text{C}-\text{SO}_2$)
152,27	Un carbone aromatique en position 6 ($-\text{C}-\text{N}-(\text{CH}_3)_2$)

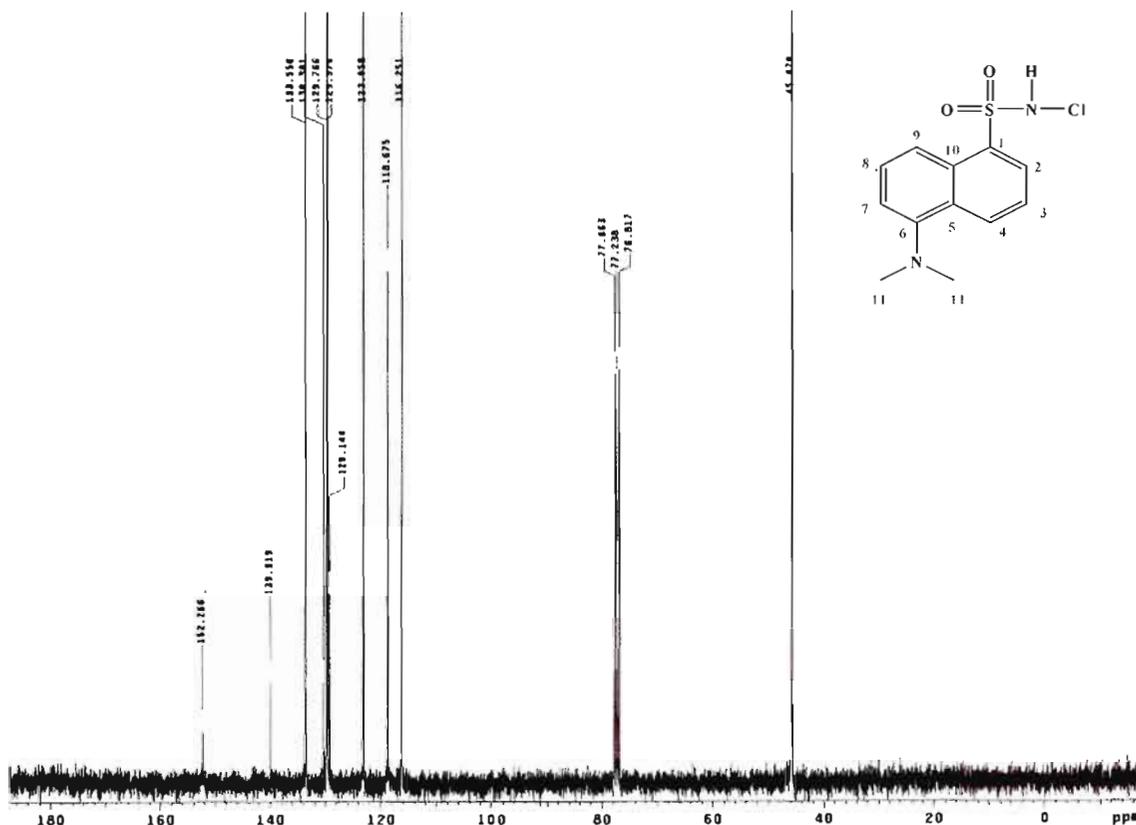


Figure 4.12 Spectre RMN ^{13}C du réactif DNS-Cl

4.4.2 Analyse des données du spectre RMN ^{13}C du dérivé standard DNS-benzamide

Les résultats fournis par le spectre RMN ^{13}C (figure 4.13) du dérivé DNS-benzamide montrent plusieurs signaux. La comparaison de ces derniers avec ceux observés pour le DNS-Cl permet d'identifier tous les carbones et de démontrer la pureté du produit synthétisé. Les données obtenues pour le DNS-benzamide, concordent avec celles déterminées par IR et RMN ^1H (tableau 4.13).

Tableau 4.13 Interprétation du spectre RMN ¹³C du DNS-benzamide

Position du signal (ppm) (déplacement chimique)	Attribution
45,37	Deux carbones aliphatiques (position 11, -N-(CH ₃) ₂)
115,19	Un carbone aromatique en position 7 (CH aromatique)
117,90	Un carbone aromatique en position 9 (CH aromatique)
123,32	Un carbone aromatique en position 2 (CH aromatique)
127,80	Un carbone aromatique en position 3 (CH aromatique)
128,80	Un carbone aromatique en position 8 (CH aromatique)
128,94	Deux carbones aromatiques en position 14 (CH aromatique)
129,62	Un carbone aromatique en position 4 (CH aromatique)
129,79	Deux carbones en position 15 (CH aromatique)
131,12	Un carbone aromatique en position 5 (CH aromatique)
132,03	Un carbone aromatique en position 16 (CH aromatique)
132,80	Un carbone aromatique en position 10 (CH aromatique)
133,03	Un carbone aromatique en position 13 (C aromatique)
133,32	Un carbone aromatique en position 1 (C-SO ₂ aromatique)
152,25	Un carbone aromatique en position 6 (-C-N-(CH ₃) ₂)
164,34	Un carbone carbonyle en position 12 (C=O)

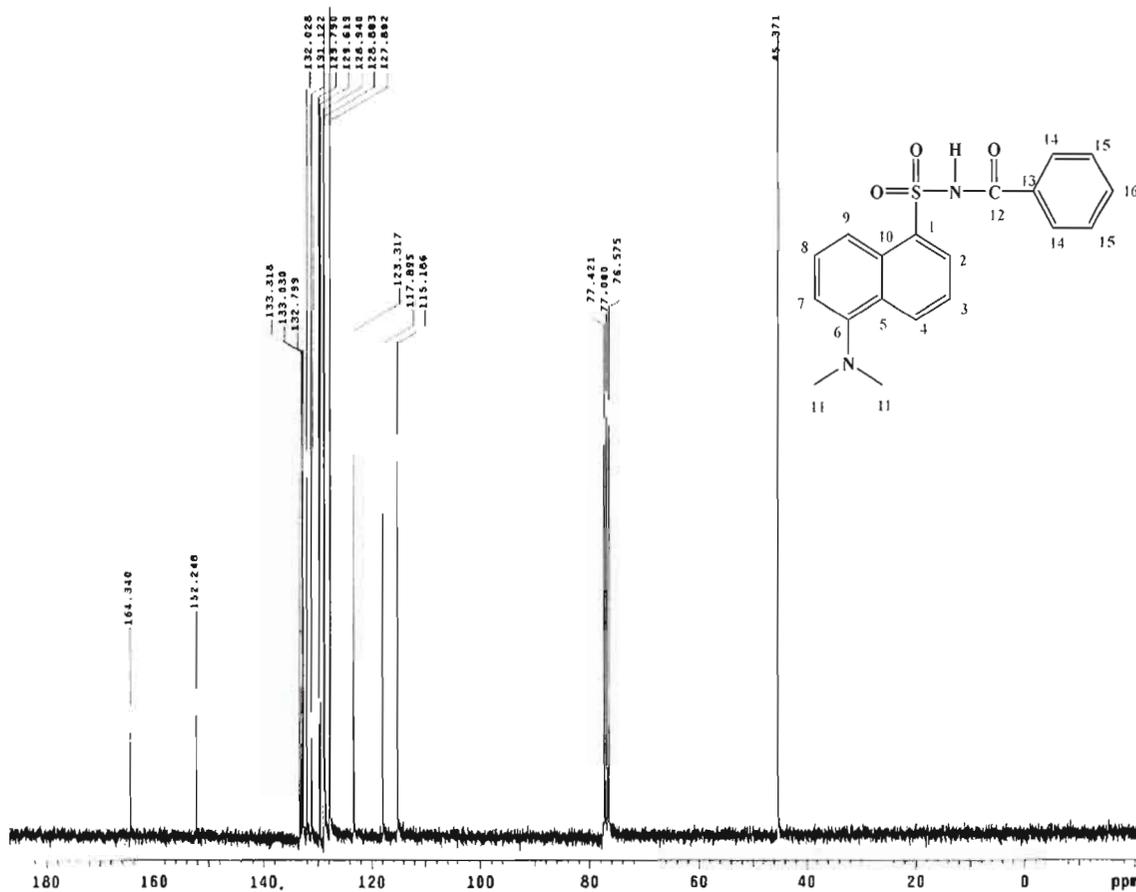


Figure 4.13 Spectre RMN ^{13}C du dérivé DNS-benzamide

4.4.3 Analyse des données du spectre RMN ^{13}C du dérivé standard DNS-acrylamide

L'interprétation des données du spectre RMN ^{13}C (figure 4.14) du dérivé DNS-acrylamide (tableau 4.14) a permis de montrer que le nombre de carbones déterminés pour ce produit coïncide avec sa structure chimique. Ceci a permis également de réaffirmer que sa pureté est très élevée. Ces données concordent avec les résultats obtenus précédemment par analyse IR et RMN ^1H de ce dérivé.

Tableau 4.14 Interprétation du spectre RMN ^{13}C du DNS-acrylamide

Position du signal (ppm) (déplacement chimique)	Attribution
45,39	Deux carbones aliphatiques (position 11, -N-(CH ₃) ₂)
115,26	Un carbone aromatique en position 7 (CH aromatique)
117,88	Un carbone aromatique en position 9 (CH aromatique)
123,24	Un carbone aromatique en position 2 (CH aromatique)
128,34	Un carbone aromatique en position 3 (CH aromatique)
128,97	Un carbone aromatique en position 8 (CH aromatique)
129,51	Un carbone aromatique en position 4 (CH aromatique)
129,78	Un carbone aromatique en position 14 (CH ₂ vinyle)
131,48	Un carbone aromatique en position 13 (CH vinyle)
132,09	Un carbone aromatique en position 5 (CH aromatique)
132,37	Un carbone aromatique en position 10 (CH aromatique)
132,99	Un carbone aromatique en position 1 (-C-SO ₂)
152,23	Un carbone aromatique en position 6 (-C-N-(CH ₃) ₂)
162,84	Un carbone en position 12 (-C=O)

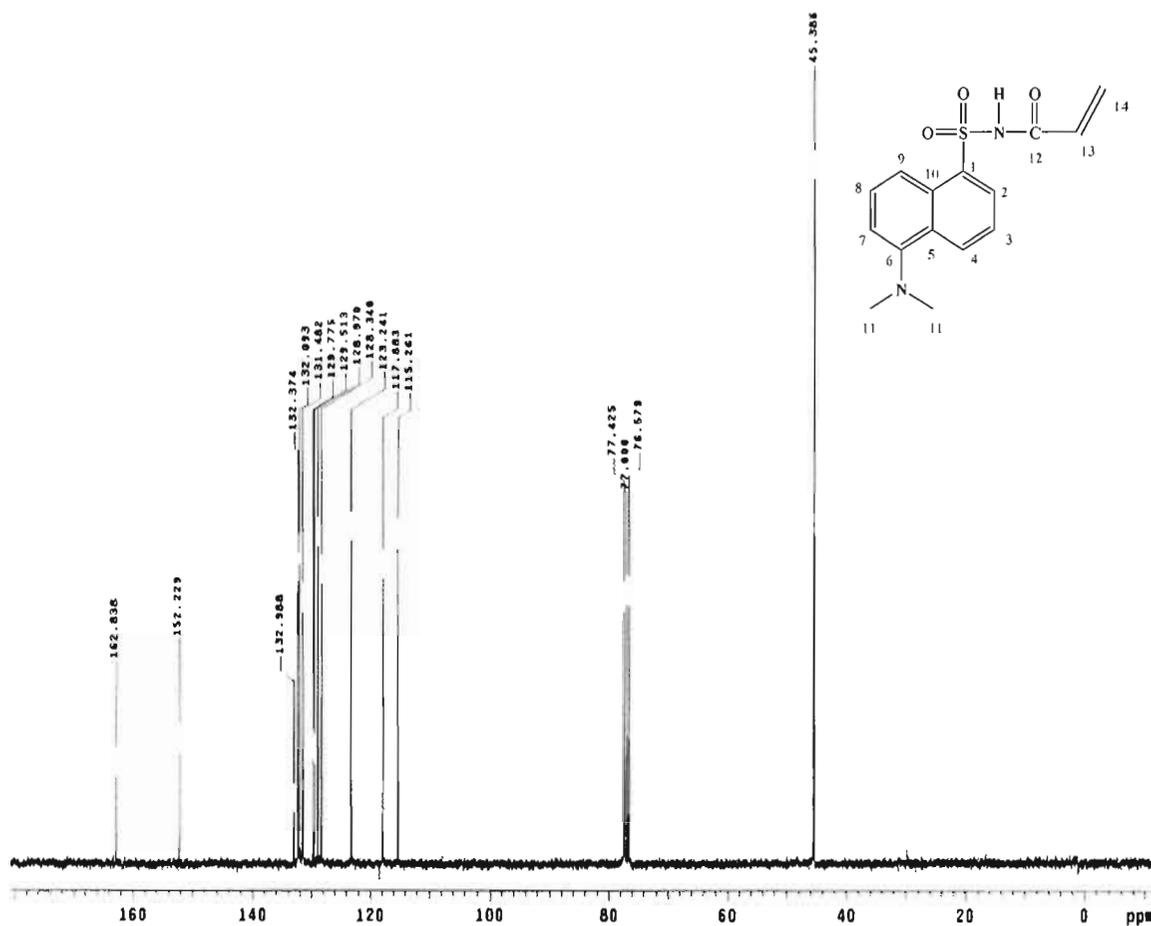


Figure 4.14 Spectre RMN ^{13}C du dérivé DNS-acrylamide

4.4.4 Analyse des données du spectre RMN ^{13}C du dérivé standard DNS-acétamide

Les résultats d'interprétation du spectre RMN ^{13}C du dérivé DNS-acétamide (figure 4.15) ont permis d'identifier tous les carbones constituant ce composé, ce qui supporte les résultats obtenus par analyse IR et RMN ^1H . Les signaux sont attribués comme suivant (tableau 4.15).

Tableau 4.15 Interprétation du spectre RMN ^{13}C du DNS-acétamide

Position du signal (ppm) (déplacement chimique)	Attribution
23,35	Un carbone position 12 (-CH ₃ acétamide)
45,37	Deux carbones aliphatiques en position 11 (-N-(CH ₃) ₂)
115,32	Un carbone aromatique en position 7 (CH aromatique)
117,93	Un carbone aromatique en position 9 (CH aromatique)
123,17	Un carbone aromatique en position 2 (CH aromatique)
128,94	Un carbone aromatique en position 3 (CH aromatique)
129,48	Un carbone aromatique en position 8 (CH aromatique)
129,83	Un carbone aromatique en position 4 (CH aromatique)
131,95	Un carbone aromatique en position 5 (CH aromatique)
132,02	Un carbone aromatique en position 10 (CH aromatique)
133,18	Un carbone aromatique en position 1 (-C-SO ₂)
152,28	Un carbone aromatique en position 6 (-C-N-(CH ₃) ₂)
168,20	Un carbone carbonyle en position 12 (C=O)

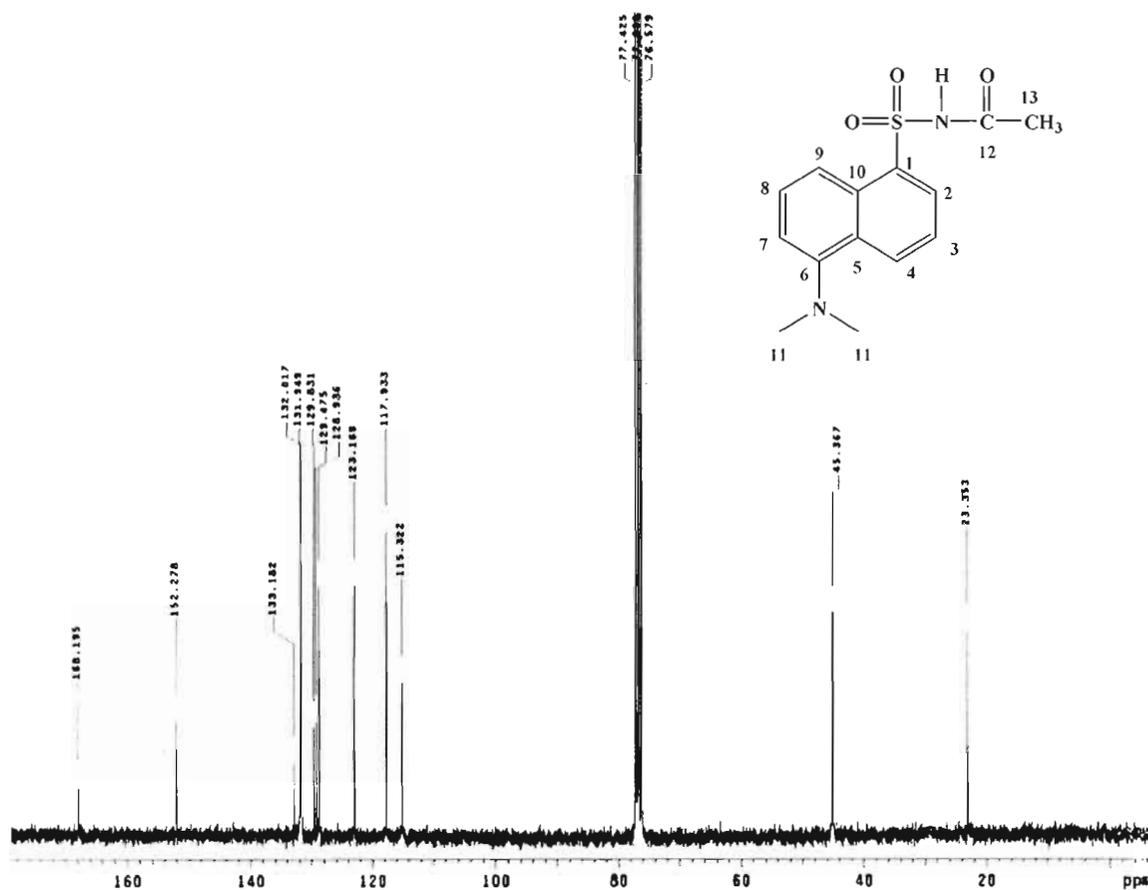


Figure 4.15 Spectre RMN ^{13}C du dérivé DNS-acétamide

4.4.5 Analyse des données du spectre RMN ^{13}C du dérivé standard DNS-propionamide

L'analyse des données du spectre RMN ^{13}C du dérivé DNS-propionamide (figure 4.16) permet de déterminer 14 carbones, ce qui concorde avec la structure chimique de ce composé. Ceci permet d'évaluer la grande pureté de ce produit (tableau 4.16).

Tableau 4.16 Interprétation du spectre RMN ^{13}C du DNS-propionamide

Position du signal (ppm) (déplacement chimique)	Attribution
8,10	Un carbone en position 13 (-CH ₃ propionamide)
29,37	Un carbone en position 12 (-CH ₂ - propionamide)
45,39	Deux carbones aliphatiques en position 11 (-N-(CH ₃) ₂)
115,24	Un carbone aromatique en position 7 (CH aromatique)
117,92	Un carbone aromatique en position 9 (CH aromatique)
123,26	Un carbone aromatique en position 2 (CH aromatique)
128,87	Un carbone aromatique en position 3 (CH aromatique)
129,50	Un carbone aromatique en position 8 (CH aromatique)
129,80	Un carbone aromatique en position 4 (CH aromatique)
131,96	Un carbone aromatique en position 5 (CH aromatique)
132,19	Un carbone aromatique en position 10 (CH aromatique)
133,18	Un carbone aromatique en position 1 (-C-SO ₂)
152,26	Un carbone aromatique en position 6 (-C-N-(CH ₃) ₂)
171,64	Un carbone carbonyle en position 12 (C=O)

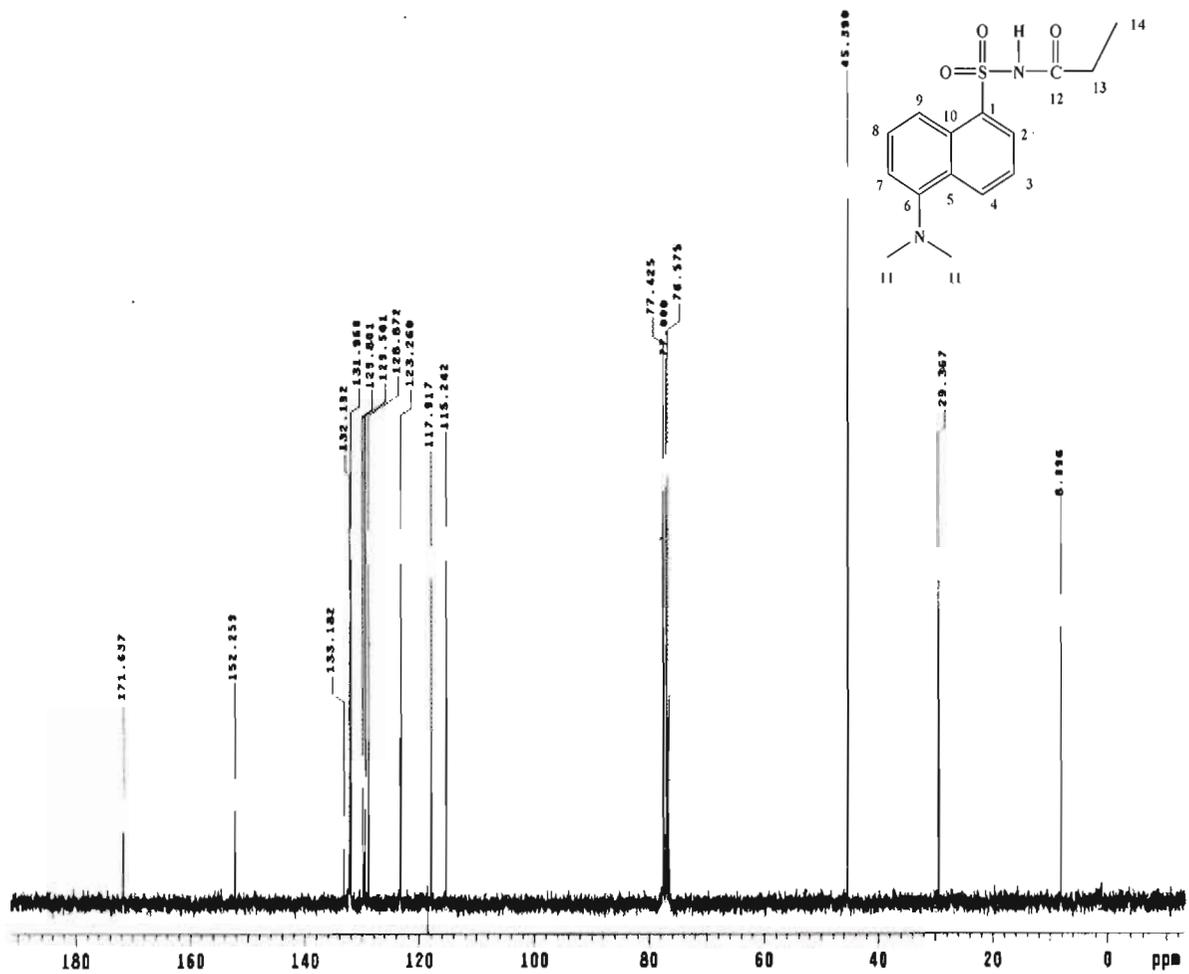


Figure 4.16 Spectre RMN ^{13}C du dérivé DNS-propionamide

Étant donné que les résultats de la caractérisation par IR, RMN ^1H et RMN ^{13}C des standards dérivés DNS-amides synthétisés ont réaffirmé l'exactitude de la structure de ces produits ainsi que leur pureté, la performance de la technique analytique a été par conséquent évaluée.

4.5 DÉVELOPPEMENT DE LA MÉTHODE ANALYTIQUE

Comme il est mentionné auparavant dans la section instrumentation d'analyse, la méthode analytique adoptée lors de cette étude est basée sur la chromatographie liquide à haute performance à phase inverse dotée respectivement de deux détecteurs (UV et fluorescence). Le couplage HPLC-UV/FLUO a été utilisé pour la séparation, la détection et la quantification des standards dérivés DNS-amides synthétisés.

4.5.1 Détermination des longueurs d'ondes d'absorption, d'excitation et d'émission des dérivés standards DNS-amides

La longueur d'onde d'absorption en UV de 254 nm a été choisie en se référant à des études qui ont déjà été élaborées auparavant sur les amines [Tranchand, S., 2002 et Fournier, M., 2006]. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission employées en fluorescence et qui sont de 345 nm et 535 nm ont été déterminées respectivement par le spectromètre UV et le spectrofluorimètre.

La figure suivante (figure 4.17) montre les spectres superposés des quatre dérivés standards DNS-amides (DNS-benzamide, DNS-acrylamide, DNS-acétamide et DNS-propionamide). Ces produits donnent des spectres de fluorescence avec un profil identique pour une même longueur d'onde d'émission (535 nm). Cette caractéristique spectroscopique permet d'utiliser les mêmes longueurs d'onde d'excitation et d'émission pour la détection d'un mélange des dérivés amides, ce qui permet de développer une méthode d'analyse globale des amides.

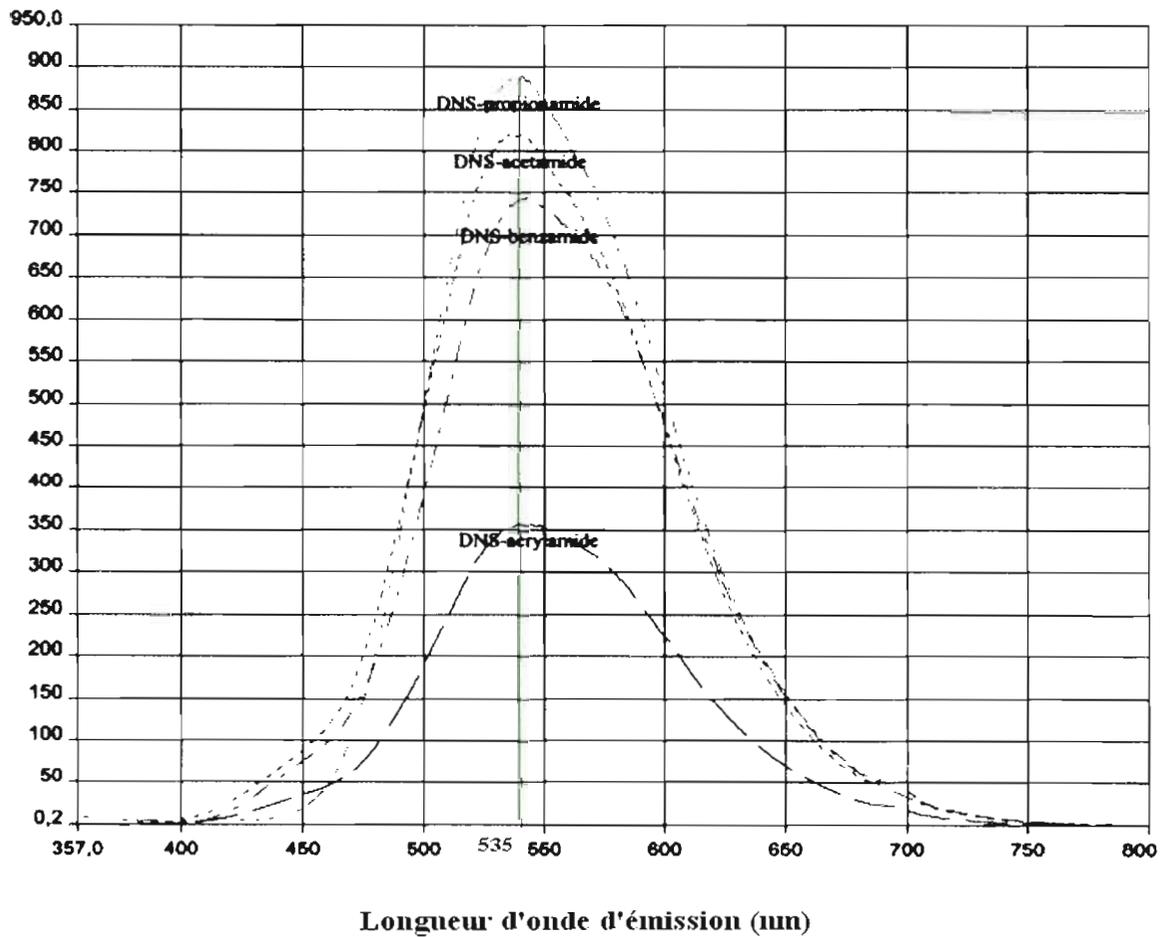


Figure 4.17 Spectres d'émission des quatre standards dérivés DNS-amides (longueur d'excitation 345 nm)

4.5.2 Interprétation des chromatogrammes HPLC-UV / FLUO des dérivés standards DNS-amides

Les figures 4.18 et 4.19, montrent les chromatogrammes des quatre dérivés standards (DNS-benzamide, DNS-acrylamide, DNS-acétamide et DNS-propionamide) obtenus par le couplage HPLC-UV/FLUO pour une même concentration (50 ppm). Les

chromatogrammes confirment la pureté des quatre produits standards synthétisés, qui est supérieure à 98%.

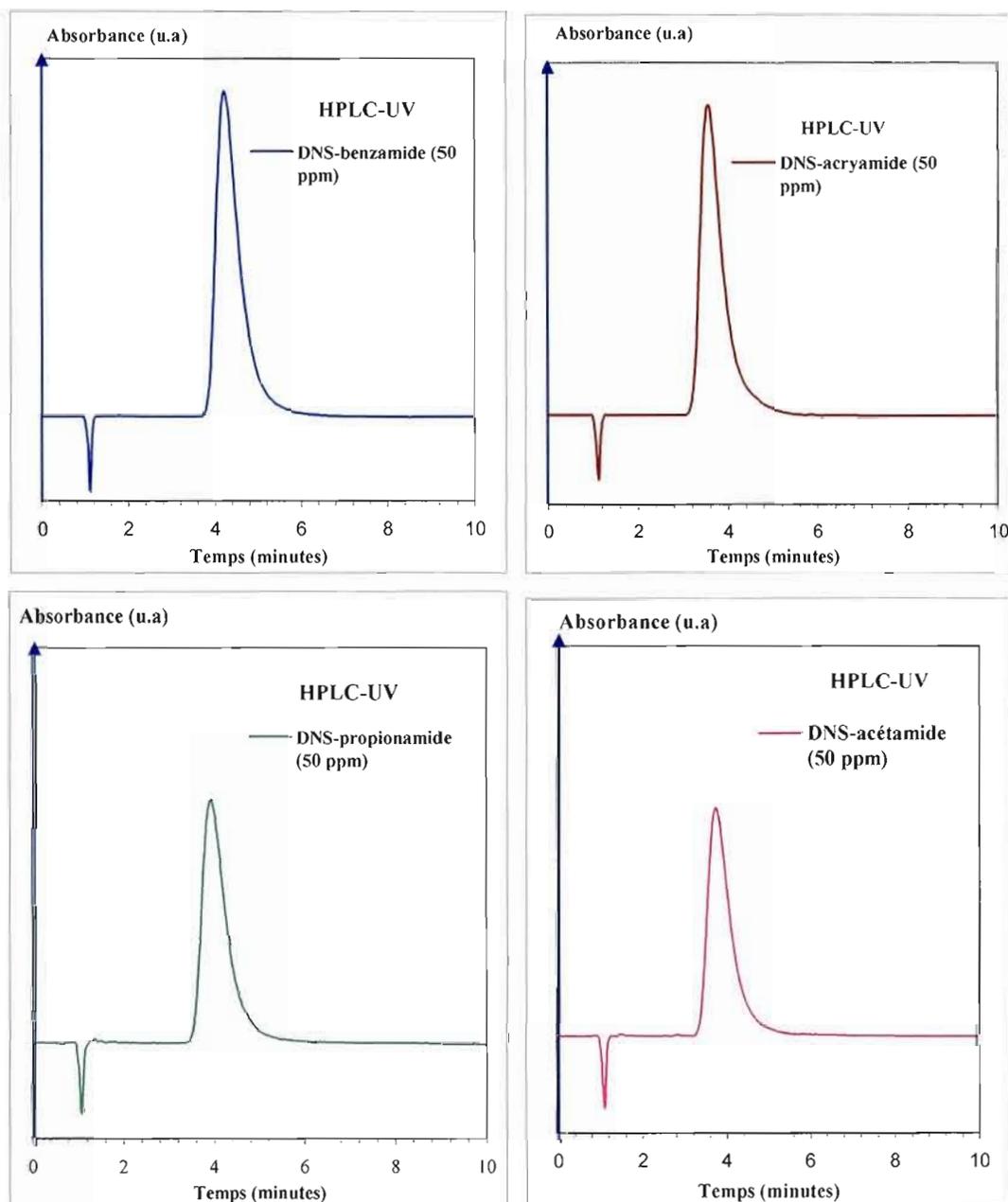


Figure 4.18 Chromatogrammes HPLC-UV des dérivés standards DNS-amides (détecteur UV modèle; VARIAN 9050)

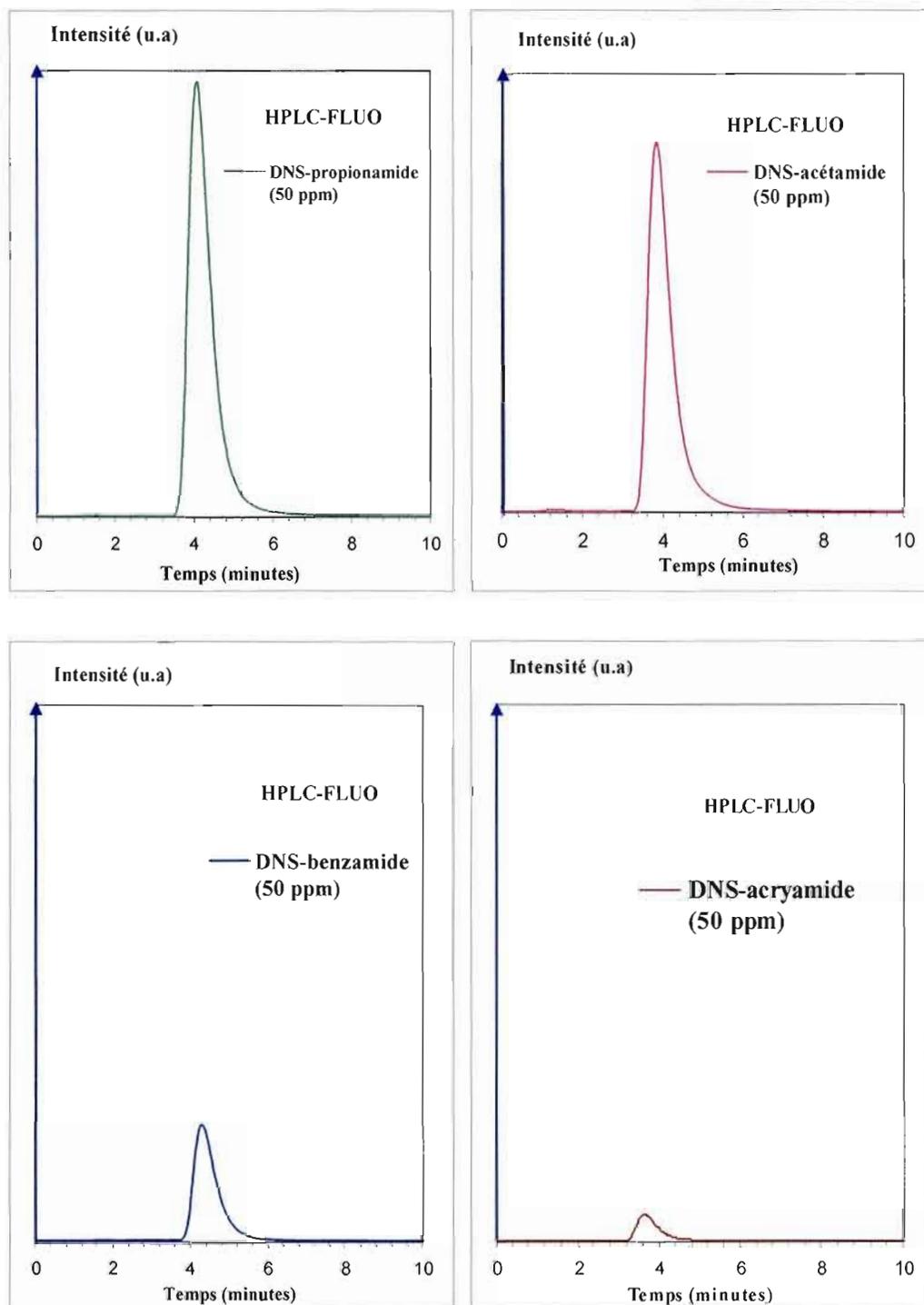


Figure 4.19 Chromatogrammes HPLC-FLUO des dérivés standards DNS-amides (détecteur fluorescence modèle ; HITACHI L-7480)

Les chromatogrammes obtenus par la méthode HPLC-UV (détecteur UV modèle VARIAN 9050 ; figure 4.18) montrent que l'intensité d'absorbance varie d'un composé à l'autre pour une même concentration (50 ppm). L'absorbance du dérivé DNS-benzamide est légèrement plus intense que celle du dérivé DNS-acrylamide. Ce dernier montre à son tour une absorbance élevée par rapport aux deux dérivés standards DNS-acétamide et DNS-propionamide. Ceci est dû à la structure conjuguée des deux amides le benzamide et l'acrylamide, qui favorise la délocalisation des électrons des deux noyaux aromatiques composant le groupement dansyle (DNS) à travers la liaison suivante : $O=C-N-SO_2$ (figure 4.20).

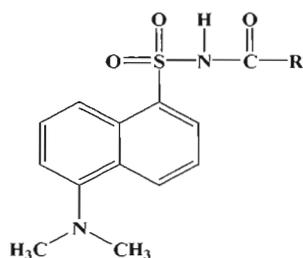


Figure 4.20 Structure chimique générale des dérivés DNS-amides

De même, les chromatogrammes obtenus par la méthode HPLC-FLUO (détecteur fluorescence modèle HITACHI L-7480, figure 4.19) montrent que les quatre dérivés DNS-amides sont fluorescents. Comme cité précédemment, le réactif DNS-Cl absorbe en UV grâce à ses deux noyaux aromatiques, mais ne fluoresce pas (section 2.2). De plus les amides étudiés (benzamide, acrylamide, acétamide et propionamide) ne sont pas eux même fluorescents. Cependant, ces amides deviennent fluorescents une fois réagis avec le DNS-Cl. Donc c'est la délocalisation électronique supplémentaire apporté par la liaison $O=C-N-SO_2$ qui procréé la fluorescence des dérivés DNS-amides.

Les chromatogrammes HPLC-FLUO montrent que les deux dérivés DNS-benzamide et DNS-acrylamide sont beaucoup moins fluorescents que les dérivés DNS-propionamide et DNS-acétamide. Ceci est expliqué par la structure chimique de chaque amide. Le groupement $-CH_2-CH_3$ du propionamide et le groupement $-CH_3$ de l'acétamide agissent

comme des groupements électrodonneurs des électrons, ce qui accentue la densité électronique dans les noyaux aromatiques des dérivés DNS-propionamide et le DNS-acétamide. Par contre, le noyau aromatique du benzamide et le groupement vinyle de l'acrylamide se comportent comme des groupements électroattracteurs des électrons, ce qui diminue la densité électronique dans les noyaux aromatiques des dérivés standards DNS-benzamide et DNS-acrylamide. Ce phénomène est plus important dans le cas du dérivé DNS-acrylamide dont l'intensité du pic en fluorescence diminue amplement par rapport à celles des autres dérivés standards DNS-amides. Ceci démontre également que la non fluorescence du DNS-Cl est due au groupement chlorure de sulfonyle qui agit comme un groupement électroattracteur et diminue la densité électronique dans les deux noyaux aromatiques et empêche ainsi la fluorescence de ce composé. La figure 4.19 montre aussi que l'intensité de fluorescence des dérivés standards DNS-amides dépend fortement de chaque amide, ce qui signifie que la méthode d'analyse HPLC-FLUO est très sélective par rapport à la méthode HPLC-UV.

Les chromatogrammes obtenus par les deux techniques HPLC-UV et HPLC-FLUO (figures 4.18 et 4.19) montrent que le temps de rétention des dérivés standards DNS-amides varie légèrement d'un produit à l'autre. Il est donc possible d'envisager de séparer le mélange de ces composés dérivés par l'optimisation des conditions chromatographiques (la colonne et la phase mobile), puisque la séparation des dérivés DNS-amides par le couplage HPLC-UV/FLUO dépend de la polarité et de l'affinité de ces produits par rapport à la phase mobile et la phase stationnaire constituant la colonne.

4.5.3 Analyse d'un mélange des dérivés DNS-amides par HPLC-UV/FLUO

Considérant l'intérêt d'analyser les amides dans des vrais échantillons d'origine alimentaires par le couplage HPLC-UV/FLUO et d'avoir une bonne séparation des pics correspondant aux dérivés DNS-amides étudiés, il s'est avéré nécessaire de déterminer les conditions chromatographiques qui permettent ceci. Une étude de séparation d'une solution constituée d'un mélange de quatre produits dérivés standards DNS-amides

(DNS-benzamide, DNS-acrylamide, DNS-acétamide et DNS-propionamide) en utilisant une phase mobile en mode gradient a été réalisée. La concentration des solutions individuelles DNS-amides composant le mélange à séparer est de 50 ppm. L'optimisation de la phase mobile a permis de séparer trois des quatre dérivés standards DNS-amides. Ainsi après plusieurs essais, la phase mobile trouvée optimale et qui a permis d'avoir une séparation considérable est composée d'un mélange de ACN +2 % HCO₂H / H₂O en mode gradient : 0 à 40 min → 40% à 60% ACN (équilibre : 5 min). Cependant, ce gradient ne permet pas la séparation des deux produits DNS-acrylamide et DNS-propionamide qui ont un temps de rétention très approché. Ceci est dû au fait que ces deux dérivés contiennent le même nombre de carbones, par conséquent ils ont une polarité très semblable et présentent approximativement la même affinité pour la phase mobile et la phase stationnaire (voir figures 4.21 et 4.22).

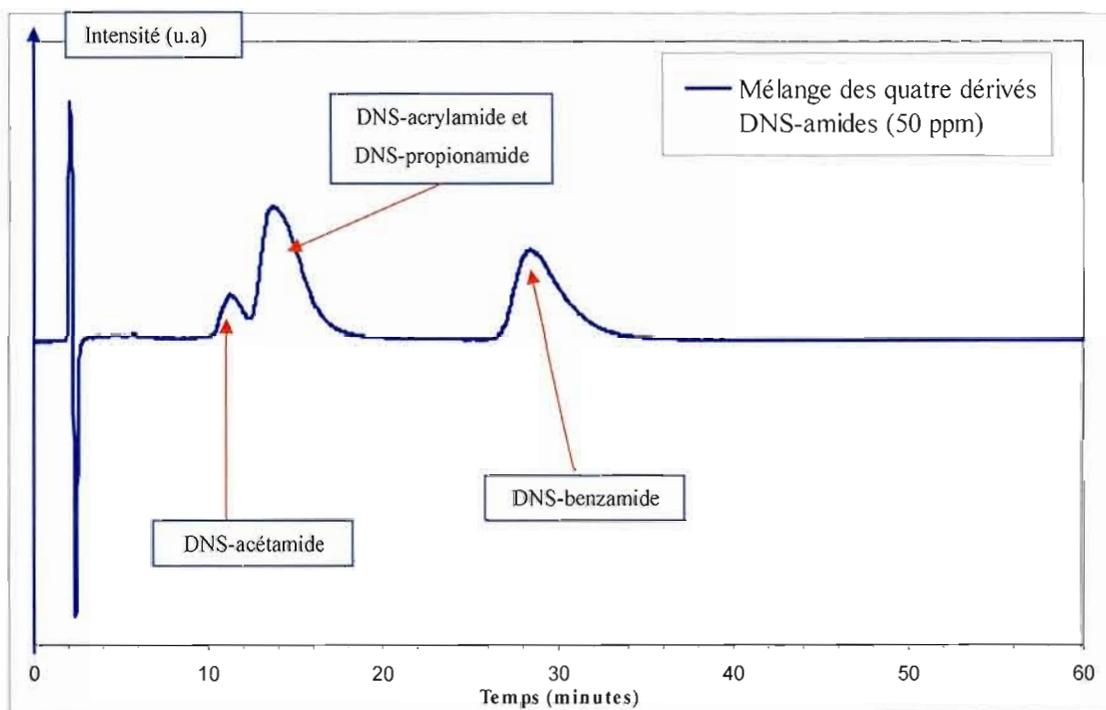


Figure 4.21 Chromatogrammes de séparation du mélange DNS-amides en mode gradient par la méthode HPLC-UV (détecteur UV modèle ; VARIAN 9050)

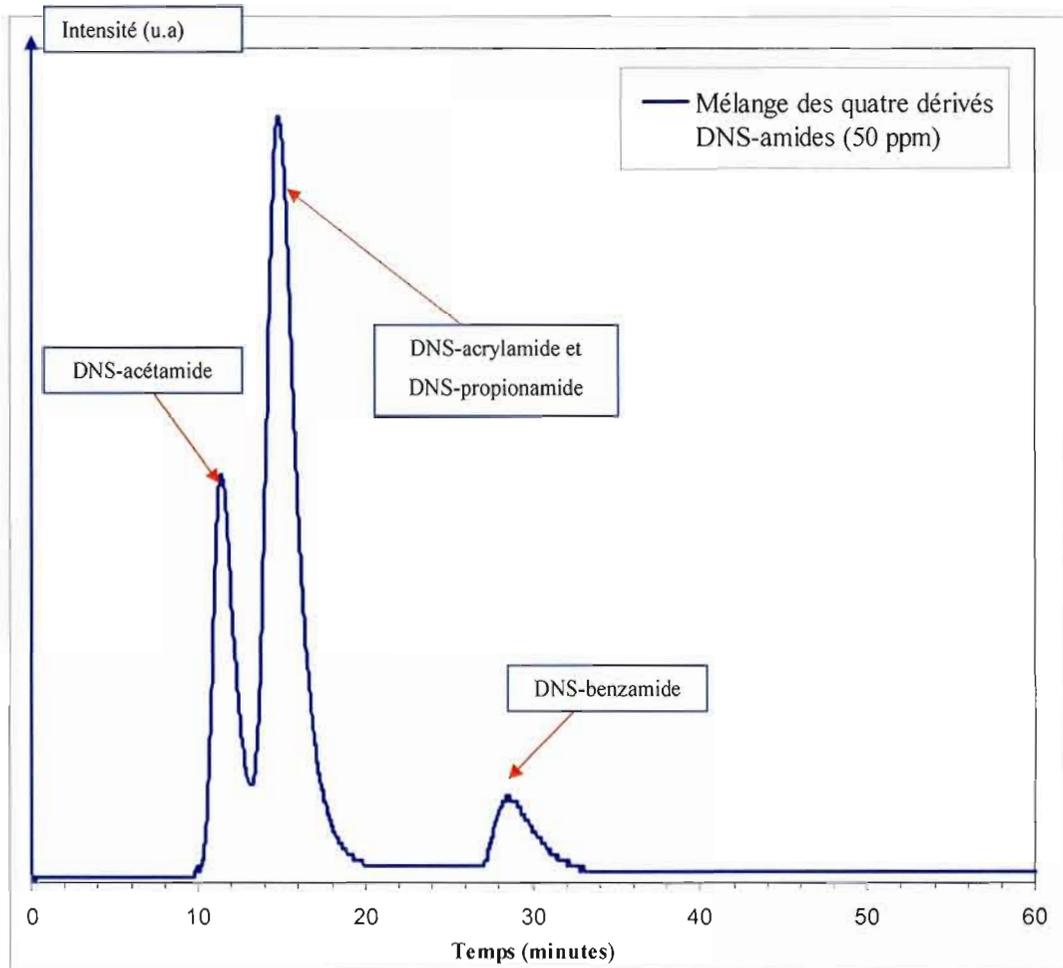


Figure 4.22 Chromatogrammes de séparation du mélange DNS-amides en mode gradient par HPLC-FLUO (détecteur fluorescence, modèle ; HITACHI L-7480)

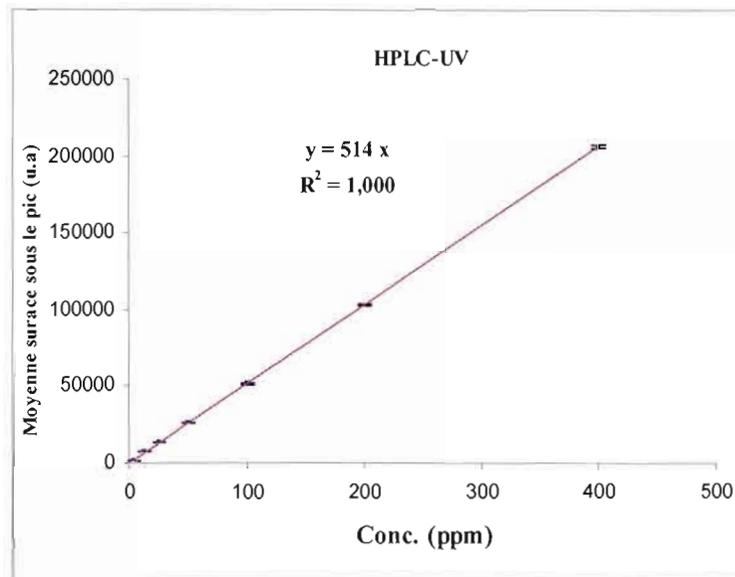
Donc, afin d'avoir une séparation complète des quatre dérivés standards DNS-amides, notamment le DNS-acrylamide et DNS-propionamide, il aurait été nécessaire de changer la colonne et de modifier la composition de la phase mobile en mode isocratique et gradient. Cependant dues aux contraintes de temps, la faisabilité de séparer le mélange des quatre dérivés standards DNS-amides n'a pas été réalisée.

4.5.4 Analyse des courbes d'étalonnage des quatre dérivés standards DNS-amides

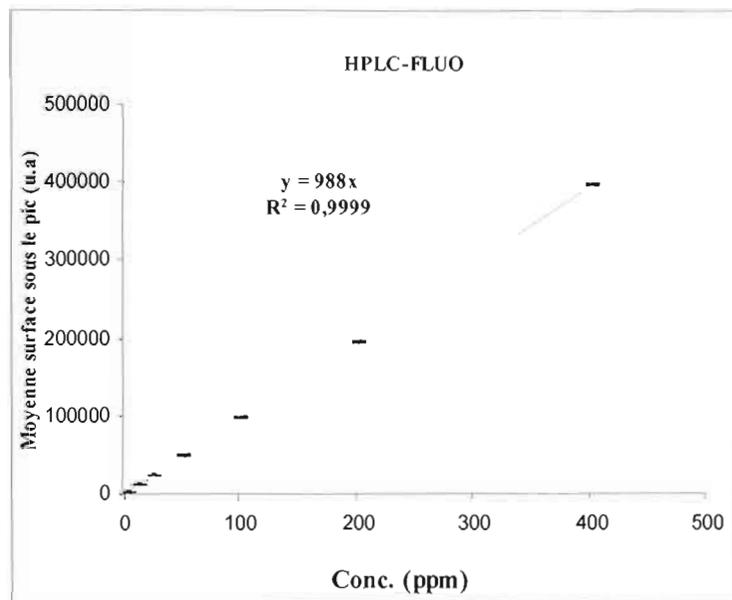
L'analyse des courbes d'étalonnage des quatre dérivés standards DNS-amides montre une très bonne linéarité pour une gamme de concentration de 2,5 ppm à 400 ppm, pour les deux techniques d'analyse HPLC-UV et HPLC-FLUO. Ceci est reflété par la valeur des coefficients de corrélation qui est supérieur et égale à 0,999. Cependant, la relation entre la concentration et la surface sous le pic des deux dérivés DNS-propionamide et DNS- acétamide montre une perte de linéarité pour la méthode HPLC-FLUO à une concentration supérieure à 400 ppm.

D'autre part, la barre d'erreur (Y) calculée pour les deux méthodes HPLC-UV et HPLC-FLUO est très faible dans le domaine de concentration étudiée (2,5 ppm à 400 ppm). Ceci est confirmé par les valeurs de la répétabilité obtenue pour les dérivés standards DNS- amides synthétisés et qui sont supérieur à 98 %. La répétabilité moyenne est calculée à partir des valeurs moyennes obtenues pour chaque concentration pour une moyenne d'injection $n = 4$ (figures 4.23, 4.24, 4.25 et 4.26). La répétabilité moyenne est calculée selon l'équation [2] :

$$\text{Répétabilité}_{\text{moyenne}} = \text{Moyenne} \left[1 - \frac{\left(\frac{\text{[écart-type de chaque concentration]}_{(n=4)}}{\text{Moyenne [(surface sous le pic de chaque concentration)]}_{(n=4)}} \right)}{\left(\frac{\text{[écart-type de chaque concentration]}_{(n=4)}}{\text{Moyenne [(surface sous le pic de chaque concentration)]}_{(n=4)}} \right)} \right] \times 100 \quad [\text{Équation 2}]$$

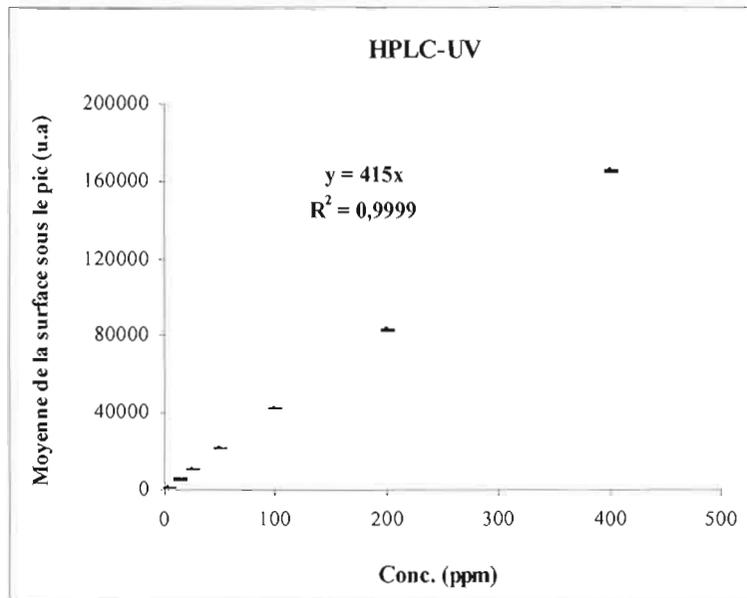


Répétabilité moyenne (HPLC-UV) = 99 % (n = 4)

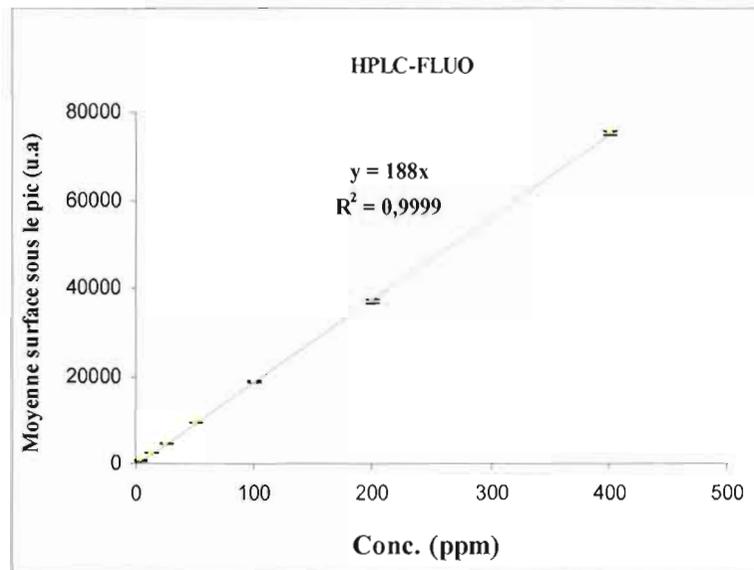


Répétabilité moyenne (HPLC-FLUO) = 99 % (n = 4)

Figure 4.23 Courbes d'étalonnage du dérivé DNS-benzamide

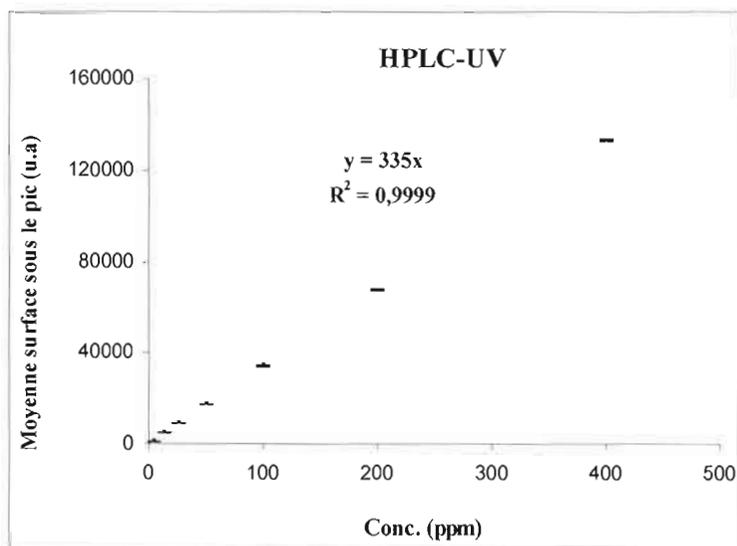


Répetabilité moyenne (HPLC-UV) = 99 % (n = 4)

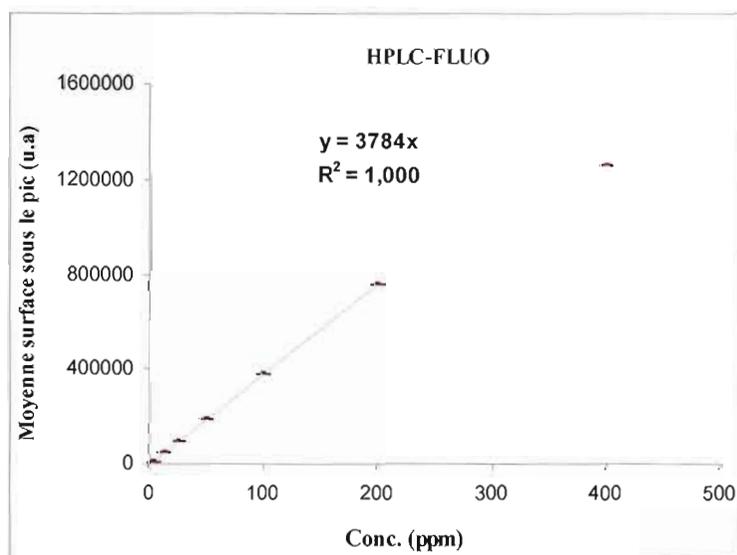


Répetabilité moyenne (HPLC-FLUO) = 99% (n = 4)

Figure 4.24 Courbes d'étalonnage du dérivé DNS-acrylamide

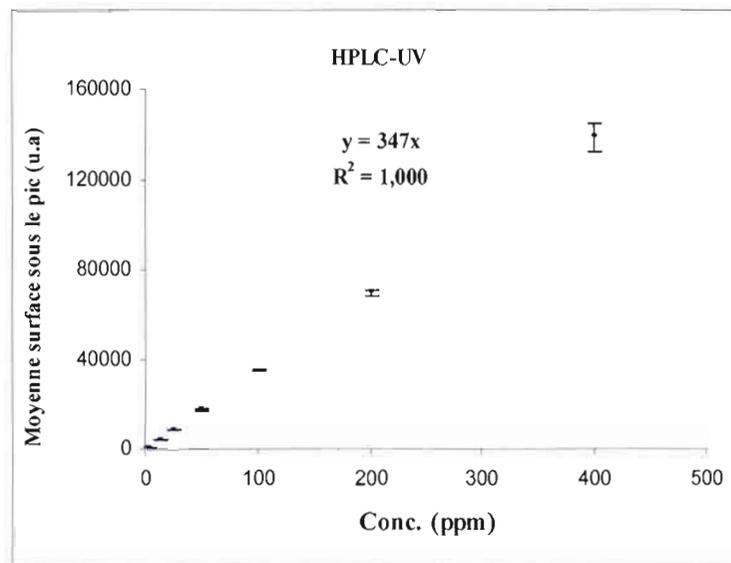


Rétabilité moyenne (HPLC-UV) = 99 % (n = 4)

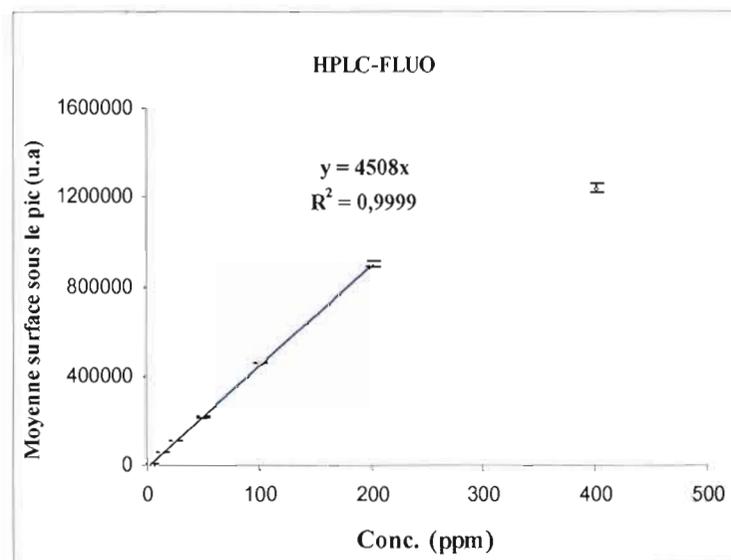


Rétabilité moyenne (HPLC-FLUO) = 99% (n = 4)

Figure 4.25 Courbes d'étalonnage du dérivé DNS- acétamide



Répétabilité moyenne (HPLC-UV) = 98 % (n = 4)



Répétabilité moyenne (HPLC-FLUO) = 98 % (n = 4)

Figure 4.26 Courbes d'étalonnage du dérivé DNS-propionamide

4.5.5 Limitations de la méthode HPLC-UV/FLUO

Afin de déterminer les limitations du couplage HPLC-UV/FLUO, un calcul des limites de détection des dérivés standards DNS-amides analysés (DNS-acrylamide, DNS-benzamide, DNS-acétamide et DNS-propionamide) a été réalisé, en injectant plusieurs fois ($n = 10$) une solution d'une concentration de 12,5 ppm. Les résultats sont présentés dans les tableaux suivants (tableaux 4.17 et 4.18). Les limites de détection ont été calculées à partir des courbes d'étalonnage, selon les équations suivantes :

$$LDD = 3 \times (\text{écart -type}) / \text{sensibilité} \quad [\text{Équation 3}]$$

$$LDQ = 10 \times (\text{écart -type}) / \text{sensibilité} \quad [\text{Équation 4}]$$

où la sensibilité = la pente de la courbe d'étalonnage

Tableau 4.17 Limites de détection des dérivés standards DNS-amides obtenues par HPLC-UV

HPLC- UV (concentration = 12,5 ppm et n = 10)				
DNS- amides	Moyenne (surface sous le pic)	Écart- type	Répétabilité (%)	LDD (ppm)
<i>DNS-benzamide</i>	1350	11	99	0,07
<i>DNS-acrylamide</i>	1254	14	99	0,11
<i>DNS- acétamide</i>	947	18	99	0,16
<i>DNS-propionamide</i>	939	14	98	0,12

Tableau 4.18 Limites de détection des dérivés standards DNS-amides obtenues par HPLC-FLUO

HPLC- FLUO (concentration = 12,5 ppm et n = 10)				
<i>DNS- amides</i>	Moyenne (surface sous le pic)	Écart- type	Répétabilité (%)	LDD (ppm)
<i>DNS-benzamide</i>	2453	14	99	0,04
<i>DNS-acrylamide</i>	654	12	98	0,19
<i>DNS- acétamide</i>	8546	22	99	0,02
<i>DNS-propionamide</i>	10350	15	99	0,01

Les limites de détection et de quantification des amides étudiés (benzamide, acrylamide, acétamide et du propionamide) ont été calculées à partir des valeurs des limites de détection et de quantification des dérivés standards DNS-amides présentées les tableaux 4.17 et 4.18. Les résultats montrent que les limites de détection des amides étudiés, obtenues par la méthode HPLC-FLUO sont plus basses que celles obtenues par la méthode HPLC-UV, excepté pour l'acrylamide (tableaux 4.19 et 4.20). Ceci peut être dû à la structure conjuguée de l'acrylamide qui comme expliqué précédemment engendre une faible intensité de fluorescence du dérivé DNS-acrylamide par rapport aux autres dérivés DNS-amides étudiés.

Tableau 4.19 Limites de détection des amides étudiés obtenues par HPLC-UV

HPLC- UV (concentration = 12,5 ppm et n = 10)		
<i>Amides</i>	<i>LDD (ppm)</i>	<i>LDQ (ppm)</i>
<i>Benzamide</i>	0,02	0,07
<i>Acrylamide</i>	0,02	0,07
<i>Acétamide</i>	0,03	0,10
<i>Propionamide</i>	0,03	0,10

Tableau 4.20 Limites de détection des amides étudiés obtenues par HPLC-FLUO

HPLC-FLUO (concentration = 12,5 ppm et n = 10)		
<i>Amides</i>	<i>LDD (ppm)</i>	<i>LDQ (ppm)</i>
<i>Benzamide</i>	0,01	0,03
<i>Acrylamide</i>	0,04	0,13
<i>Acétamide</i>	0,004	0,01
<i>Propionamide</i>	0,003	0,009

Les résultats de cette étude montrent que les valeurs de la limite de détection et de quantification obtenues pour l'acrylamide par le couplage HPLC-UV/FLUO sont en plein accord avec celles obtenus par les autres méthodes analytiques actuellement utilisées, notamment la méthode GC-MS qui est une méthode validée et très sensible (tableau 4.21).

Tableau 4.21 Comparaison de la limite de détection et de quantification de l'acrylamide avec les autres méthodes analytiques

Méthodes d'analyses d'acrylamide	LDD (ppm)	LDQ (ppm)
HPLC-FLUO	0,04	0,13
HPLC-UV	0,02	0,07
HPLC -UV [Barber, DS. et al. 2001 J. Chromatogr. B, 758 : 289-293.]	0,05	0,17
GC-MS [Jezussek, M. et Schieberle, P. 2003]	0,04	0,13
HPLC -MS [Jezussek, M. et Schieberle, P. 2003]	0,07	0,2
GC-MS/MS [Hoenicke, K., et al., 2004]	0,003	0,01
HPLC- MS/MS [Hoenicke, K., et al., 2004]	0,02	0,06

4.5.6 Stabilité des quatre dérivés standards DNS-amides

Considérant l'importance de la stabilité des produits dérivés standards DNS-amides dans l'analyse des vrais échantillons, une étude permettant de vérifier la stabilité des produits (DNS-benzamide, DNS-acrylamide, DNS-acétamide et DNS-propionamide) en solution dans l'acétonitrile (ACN) a été réalisée sur une période de deux semaines. Les solutions analysées ont été conservées à une température de -12 °C.

La variation de la surface sous le pic en fonction du temps des deux concentrations 12,5 ppm et 100 ppm pour une moyenne d'injection (n = 3) montre que les quatre produits dérivés standards DNS-amides étudiés sont très stables en solution dans l'acétonitrile pendant 15 jours à basses et à concentrations élevées (figures 4.27 et 4.28). Ces résultats

démontrent la possibilité de conserver les solutions des dérivés standards DNS-amides pendant deux semaines à une température de -12 °C et la reproductibilité des deux appareils HPLC-UV et HPLC-FLUO.

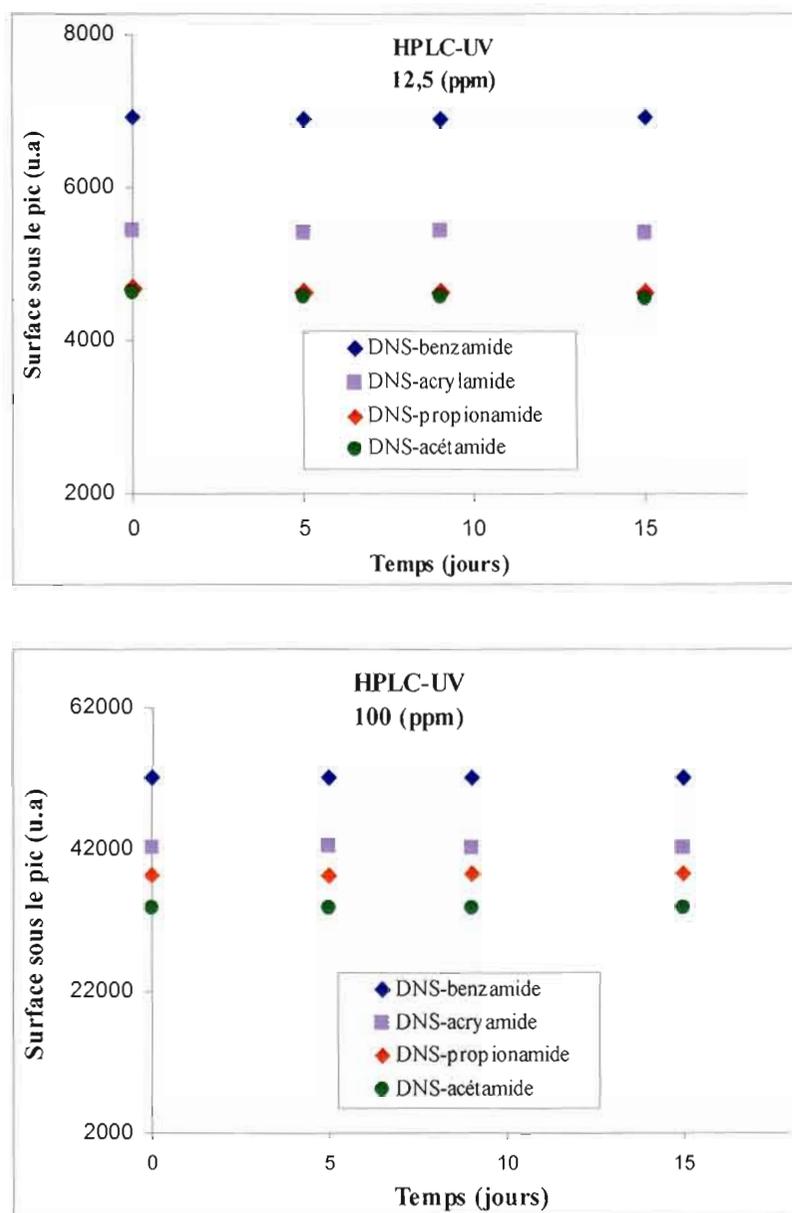


Figure 4.27 Stabilité des dérivés standards DNS-amides en solution dans ACN, analysés par la méthode HPLC-UV ($n = 3$)

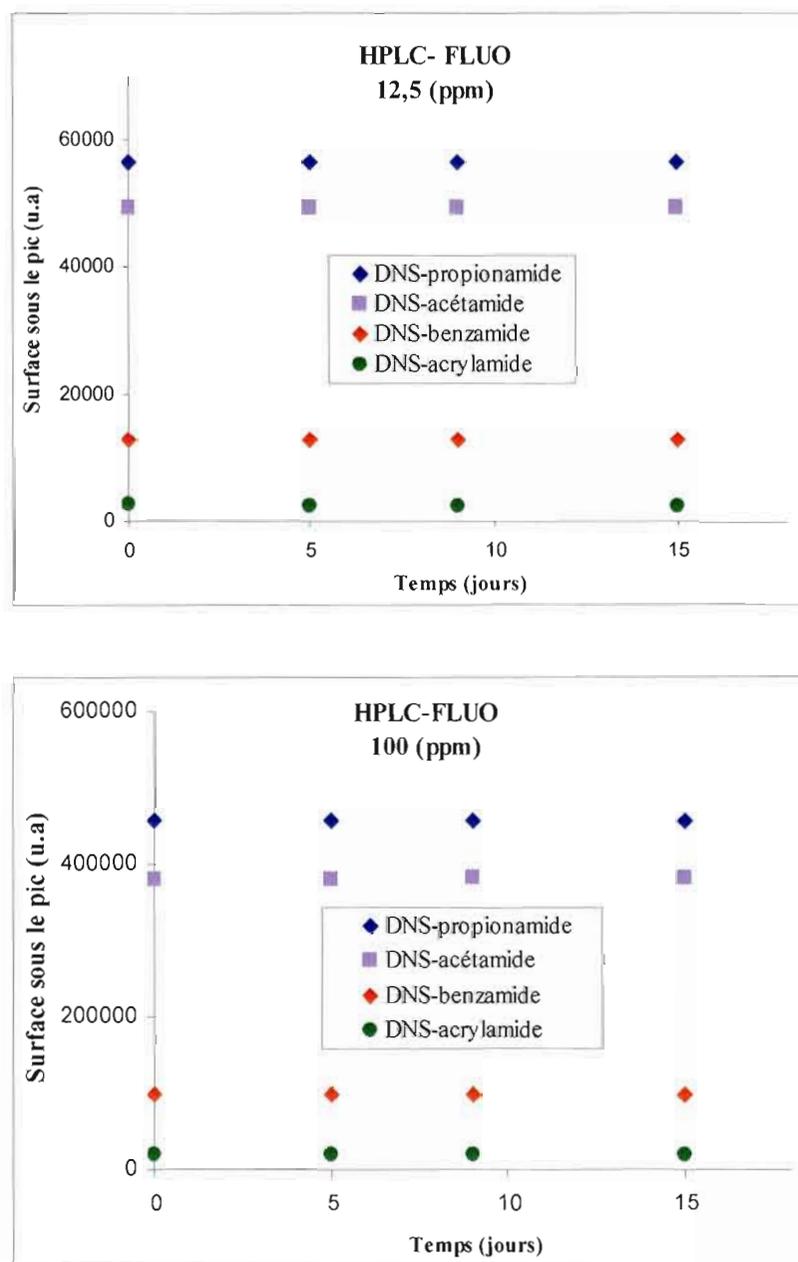


Figure 4.28 Stabilité des dérivés standards DNS-amides en solution dans ACN, analysés par la méthode HPLC-FLUO ($n = 3$)

Chapitre V

5 CONCLUSION

La présente étude a permis de développer une méthode de synthèse et d'analyse simultanée de quatre dérivés standards DNS-amides. Ces nouveaux produits résultent de la dérivatisation des amides (benzamide, acrylamide, acétamide et propionamide) par le réactif DNS-Cl en solution dans le dichlorométhane, suivie d'un parachèvement rapide en milieu acide (HCl 0,1 N). Le rendement moyen obtenu est de 55 % non optimisé.

La caractérisation des dérivés standards DNS-amides par IR et RMN ^1H et RMN ^{13}C a permis de confirmer la structure et la pureté de ces produits. Les dérivés sulfonamides aromatiques synthétisés sont à la fois fluorescents et absorbent en UV, ce qui a permis leur analyse simultanée par le couplage HPLC-UV/FLUO.

L'étude montre également que la méthode de synthèse développée a permis de former des standards DNS-amides stables en solution dans l'acétonitrile sur une période de deux semaines à une température de $-12\text{ }^\circ\text{C}$. De même, les valeurs des limites de détection et de quantification obtenus par le couplage HPLC-UV/FLUO pour les quatre amides étudiés et qui sont respectivement de 0,02 ppm, 0,02 ppm, 0,03 ppm et 0,03 ppm et de 0,01 ppm, 0,04 ppm, 0,004 ppm et 0,003 ppm montrent que la méthode d'analyse développée pour une détermination globale des amides est sensible, simple et fiable. Ces résultats montrent que la méthode d'analyse HPLC-FLUO est plus sélective que la méthode d'analyse HPLC-UV.

L'étude montre également que les limites de détection et de quantification obtenues pour l'acrylamide par le couplage HPLC-UV/FLUO sont conformes à celles obtenues par les méthodes d'analyse actuelles, notamment la méthode d'analyse validée (GC-MS), de plus que la méthode d'analyse HPLC-UV/FLUO est moins coûteuse et est à la

portée de tous les laboratoires. L'étude montre aussi que la dérivation et l'analyse globale des quatre amides primaires étudiés (aromatique, aliphatique insaturé et saturé) permettent d'établir la généralité de ces méthodes à d'autres classes d'amides mono- et disubstitués et la possibilité d'analyse d'un mélange des dérivés DNS-amides par le couplage HPLC-UV/FLUO.

Les valeurs des limites de détection et de quantification obtenues pour les quatre amides étudiés montrent également la possibilité d'analyser les traces d'amides d'une manière efficace, simple et rapide dans différents milieux de travail et dans les échantillons complexes (aliments, eaux usées, sang...). Ceci peut être réalisé en adaptant la méthode de synthèse développée dans la présente étude à la dérivation des amides en solution et en utilisant comme étalon les dérivés standards DNS-amides synthétisés.

6 PERSPECTIVE

Cette étude a permis de développer une nouvelle méthode pour une détermination globale de quatre amides primaires (benzamide, acrylamide, acétamide et propionamide). La méthode présente plusieurs avantages tels que ; le coût, la disponibilité, la sélectivité, la sensibilité et l'analyse simultanées par le couplage HPLC-UV/FLUO des dérivés standards DNS-amides.

Les travaux futurs porteront sur l'optimisation des conditions chromatographiques afin d'avoir une séparation complète des pics des dérivés standards DNS-amides présents dans le même mélange. Ces travaux consisteront également à la dérivation par le DNS-Cl de d'autres classes d'amides mono- et disubstitués (aromatiques, aliphatiques saturés et insaturés).

Cette étude a été développée dans des conditions idéales de laboratoire en absence de contaminants, ce qui nécessite la validation de la méthode en utilisant simultanément d'autres procédures et d'autres techniques d'analyses validées telles que la bromation de l'acrylamide et l'analyse des dérivés bromés par GC-MS.

Les travaux futurs visent ensuite à appliquer la méthode de dérivation et d'analyses par le couplage HPLC-UV/FLUO validée, pour le développement d'une méthode d'analyse des traces d'amides dans les différents milieux de travail et dans les échantillons complexes.

RÉFÉRENCES

A.T. Rhys Williams, 1980, «Fluorescence detection in liquid chromatography», published by Pekin- Elmer, p. 3-7.

Ascherio, A., Chen, H., Weisskopf, M.G., O'Reilly, E., McCullough, M.L., Calle, E.E., Schwarzschild, M.A. et Thun, M.J. 2006. Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease, *Annals of Neurology*, 60 (2): 197-203.

Barber, D. S., Hunt, J., LoPachin, R. M. et Ehrich, M. 2001. «Determination of acrylamide and glycidamide in rat plasma by reversed-phase high performance liquid chromatography», *J. Chromatogr. B*, 758 : 289–293.

Barber, D.S., Hunt, J.R., Ehrich, M.F., Lehning, E.J. et LoPachin, R.M. 2001. Metabolism, toxicokinetics and hemoglobin adduct formation in rats following subacute and subchronic acrylamide dosing, *Neurotoxicology*, 22 (3) : 341–353.

Beesley, T. E., Buglio, B. et Scott, R. P. W. 2001. «Quantitative Chromatographic Analysis», édition Marcel Dekker Inc, New York, p. 71.

Benedetti, J. L. et Weber, J. P. 2003. Le point sur l'acrylamide dans les aliments, Institut national de santé public, Québec, toxicologie humaine, Communiqué de veille toxicologique, 10 février 2003.

Benoît, M., Bonicelli, B., Guichard, L., Delorme, R., Faloya, V. et Ruelle, B. 2005. Rapport de l'expertise réalisée par l'INRA et le Cemagref, «Pesticides, agriculture et environnement», chapitre 2, Connaissance de l'utilisation des pesticides.

Bertolini, A., Ferrari, A., Ottani, A., Guerzoni, S. et Tacchi, R., Leone, S. 2006. Paracetamol: New Vistas of an Old Drug, *CNS Drug Reviews*, 12(3-4) : 250-275.

Bjellaas, T., Olesen, P. T., Frandsen, H., Haugen, M., Stølen, L. H., Paulsen, J. E., Alexander, J., Lundanes, E. et Becher, G. 2007. Comparison of estimated dietary intake of acrylamide with haemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide; *Toxicological Sciences*, Published by Oxford University Press on behalf of the Society of Toxicology, April 21, 2007.

Bonaccorsi, S., Pisano, C., Puoti, F. et Gatti, M. 1988. «Y Chromosome Loops in *Drosophila melanogaster*», (Centro di Genetica Evoluzionistica del CNR e Dipartimento di Genetica e Biologia Molecolare, Università di Roma "La Sapienza," P. Aldo Moro 5, 00185 Roma, Italy), *Genetics Society of America*, 120: 1015-1034.

Castle, L., Campos, M. J. et Gilbert, J. 1991. Determination of acrylamide monomer in hydroponically grown tomato fruits by capillary gas chromatography - mass spectrometry, *J. Sci. Food Agric.*, 54 : 549-555.

Cecchini, A., Luun, G. et Hellwig, L.C. 1998. «*Hand book of derivatisation reactions for HPLC*», Interscience, Publication J. Wiley et Sons Inc., p. 252.

Chen, P., Zhang, W., Luo, W. et Fang, Y. 2004. Synthesis of Superabsorbent Polymers by Irradiation and Their Applications in Agriculture, *Journal of Applied Polymer Science*, 93: 1748–1755.

Chevolleau, S., Jacques, C., Canlet, C., Tulliez, J. et Debrauwer, L. 2007. Analysis of hemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry, as exposure biomarkers in French population, *Journal of Chromatography A*, 1167 (2) : 125–134.

Costa, L. G., Giordano, G., Guizzetti, M. et Vitalone, A. 2008. Neurotoxicity of pesticides, *Frontiers in Bioscience*, 13: 1240-1249.

Day, R.O. et Graham, G.G. 2005. Paracetamol should be first-line therapy in osteoarthritis, *Medical Journal of Australia*, 182 (4): 198-199.

Dünges, W. Naundorf, G. et Seiler, N. 1974. «High pressure liquide chromatographic analysis of barbiturates in the picomole range by fluorometry of their DNS-derevatives», *J. Chromagtoqr. Sci.*, 12: 655 – 657.

Duxbury, D. 2004. « Acrylamide in Food: Cancer Risk or Mystery? », *Food Technology*, 58(12): 91 - 93.

Eddleston, M., Bateman, D.N. 2007. Pesticides, *Medicine*, 35 (12) : 646-648.

Eerola, S., Hollebekkers, K, Hallikainen, A. et Peltonen, K. 2007. Acrylamide levels in Finnish foodstuffs analysed with liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Molecular Nutrition and Food Research*, 51 (2) : 239-247.

Ferretti, A. et Flanagan, V. P. 1971. « The Lactose-Casein (Maillard) Browning System: Volatile Components», *J. Agr. Food Chem.*, 19(2) : 245-249.

Fournier, M. 2006. « Développement et validation d'une méthode d'échantillonnage et d'analyse pour l'évaluation globale des amines en milieu de travail », Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Montréal, Montréal.

Garey, J. et Paule, M.G. 2007. Effects of chronic low-dose acrylamide exposure on progressive ratio performance in dolescent rats, *NeuroToxicology*, 28 (5) : 998-1002.

Gaudy, J. F. et Arreto, C. D. 2005. Manuel d'analgésie en odontostomatologie, «la lidocaïne», 2ed. Masson, p. 171.

Hand Book of fine chemicals, Aldrich Chemical Company, Inc, édition 2007-2008, p. 73, 111, 269 et 2112 .

Hoenicke, K., Gatermann, R., Harder, W. et Hartig, L. 2004. « Analysis of acrylamide in different foodstuffs using liquid chromatography–tandem mass spectrometry and gas chromatography–tandem mass spectrometry », *Analytica Chimica Acta*, 520 (2) : 207-215.

International Labour Organization, Publication and research, ILO library, Online information resources, «Encyclopaedia of Occupational Health and Safety, Fourth edition», 1998, Vol.4, Part XVIII, [104, Guide to Chemicals, Amides].
http://www.ilo.org/safework_bookshelf/english?

Ishizuka, N., Matsumura, K., Hayashi, K., Sakai, K. et Yamamori, T. 2000. «An efficient method for the preparation of enantiomerically pure N-acylarylsulfonamides having an asymmetric center at the α -position:Condensation of acid chlorides and arylsulfonamides under solid-liquid two-phase conditions», *Synthesis*, 6 : 784-788.

Jezussek, M. et Schieberle, P. 2003. «A new LC/MS-method for the quantitation of acrylamide based on a stable isotope dilution assay and derivatization with 2-

mercaptobenzoic acid. Comparison with two GC/MS-methods», *J Agric Food Chem.*, 51 (27): 7866-7871.

Jo, C. et Ahn, D. U. 2000. «Production of volatile compounds from irradiated oil emulsion containing amino acids or proteins», *J. Food Sci.*, vol. 65(4), p. 612–616.

Laezza, C., Notarnicola, M., Caruso, M.G., Messa, C., Macchia, M., Bertini, S., Minutolo, F., Portella, G., Fiorentino, L., Stingo, S. et Bifulco, M. 2006. N6-isopentenyladenosine arrests tumor cell proliferation by inhibiting farnesyl diphosphate synthase and protein prenylation, *J. FASEB.*, 20: 412-418.

Liu, J., Zhao, G., Yuan, Y., Chen, F. et Hu, X. 2008. Quantitative analysis of acrylamide in tea by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Food Chemistry*, 108 (2): 760–767.

Machiels, D. et Istasse, L. 2002. «La réaction de Maillard : importance et applications en chimie des aliments», *Ann. Méd. Vét.*, 146 : 347-352.

Material Safety Data Sheet for Dansyl chloride, Company Identification: Fisher Scientific, MSDS creation date: 3/02/1998, Revision#10 date: 6/29/2007.
<https://fscimage.fishersci.com/msds/06205.htm>

Montiel, A. 2005. Une législation nouvelle pour les eaux destinées à la consommation humaine, *Comptes Rendus Geosciences*, 337 : 269–276.

Pavia, D. L., Lampman, G. M., et Kriz, S. G. 1979. « Introduction to spectroscopy», , édition Philadelphia : Saunders College, c1979, p. 68-69.

Pérez, H.L., Cheong, H. K., Yang, J. S. et Osterman-Golkar, S. 1999. Simultaneous Analysis of Hemoglobin Adducts of Acrylamide and Glycidamide by Gas Chromatography±Mass Spectrometry, *Analytical Biochemistry*, 274 (1): 59–68.

Pest Management Regulatory Agency and Health Canada, (Discussion Document, DIS2006-01), «Revocation of 0.1 ppm as a General Maximum Residue Limit for Food Pesticide Residues», [Regulation B.15.002 (1)], 23 June 2006.

Report of a Joint FAO/WHO Consultation, WHO Headquarters, «Health implications of acrylamide in food», Geneva, Switzerland, 25-27 June 2002.

Rice, J. M. 2005. The carcinogenicity of acrylamide; *Mutation Research*; 580: 3–20

Rogers, D.W. et Poling, G.W. 1978. Compositions and Performance Characteristics of Some Commercial Polyacrylamide Flocculants, *CIM Bulletin*, 71: 152-158.

Sakamoto, J. et Hashimoto, K. 1986. Reproductive toxicity of acrylamide and related compounds in mice – effects on fertility and sperm morphology, *Archives of Toxicology*, 59 (4): 201-205.

Semih Ötles et Serkan Ötles. 2004. « ACRYLAMIDE IN FOOD, Chemical Structure of Acrylamide», *J. Environ. Agric. Food Chem.*, 3(5) : 1579 – 4377.

Silverstein, R. M., Bassler, G. C. et Cauquis, G. .1968. «Identification spectrométrique des composés organiques», édition Paris : Masson, p. 88-90 et 93-940.

Skoog, D. A., Holler, F. J. et Nieman, T. A. 2003. «Principe d'analyse instrumentale; édition de Boeck Université, p. 740 et 746.

Stevens, J.F. et Maier, C.S. 2008. Acrolein: Sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease, *Mol. Nutr. Food Res.*, 52: 7 -25.

Sublet, V.H., Zenick, H. et Smith, M.K. 1989. Factors associated with reduced fertility and implantation rates in females mated to acrylamide-treated rats, *Toxicology* 55(1-2): 53-67.

Swedish Food Federation, Report from Swedish Scientific Expert Committee, «ACRYLAMIDE IN FOOD, Mechanisms of formation and influencing factors during heating of foods», 30 june 2002.

Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S. et Törnqvist, M. 2002. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (17): 4998-5006.

Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S. et Törnqvist, M. 2000. Acrylamide : a cooking carcinogen? *Chem. Res. Toxicol.*, 13(6): 517-522.

Tateo, F. et Bononi, M. 2003. A GC/MS method for the routine determination of acrylamide in food, *ita J. Food Sci.*, 15 (1): 149-151.

Tezer, N. et Ozkan, R. 2001. «Mechanisms and transition structures for conjugate and carbonyl addition of ammonia to three small alpha, beta-unsaturated carbonyl compounds: An ab initio molecular orbital study», *J. of Molecular Structure Theochemistry*, 546: 79-88.

Tranchand, S. 2002. «Développement d'une méthode pour la détermination globale des amines dans l'air du milieu de travail», Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Montréal, Montréal.

Trellakis, S., Lautermann, J. et Lehnerdt, G. 2007. Lidocaine: neurobiological targets and effects on the auditory system, *Progress in Brain Research*, 166: 303-322.

Tron, I., Piquet, O. et Cohuet, S. 2001. Effets chroniques des pesticides sur la santé : état actuel des connaissances, (Version diffusée sur Internet, document téléchargé), Observatoire régional de santé de Bretagne, janvier 2001.

Umano, K. et Shibamoto, T. 1987. Analysis of Acrolein from Heated Cooking Oils and Beef Fat, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35 (6): 909-912.

Weisshaar, R. 2004. Acrylamide in heated potato products-analytics and formation routes, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106 (11): 786-792.

WORLD health organization, (WHO), 2006, «Guidelines for drinking-water quality» (electronic resource): Incorporating first addendum. Vol. 1, Recommendations, 3rd ed.