

I. Introduction (Baptiste Quilez)

A travers ce projet d'étude, notre objectif est de mettre en place une analyse statistique permettant de valider la méthode de dosage de l'aspartame dans le Coca-Cola Zéro®, par la technique d'analyse chromatographique HPLC. La validation de la méthode est essentiellement basée sur sa répétabilité.

II. Etat de l'art (Baptiste Quilez)

La validation d'une méthode d'analyse est incontournable dans un rapport d'étude, puisqu'elle garantit aux autres opérateurs une fiabilité du protocole en question. Il existe divers paramètres à vérifier pour valider une méthode, parmi lesquels : la répétabilité, la reproductibilité, la spécificité, la limite de quantification, le domaine de linéarité ou encore la robustesse. Dans ce rapport, nous focalisons la validation de la méthode sur sa répétabilité. Pour se faire, un même opérateur doit suivre la même procédure de mesure, avec le même système de mesure, dans les mêmes conditions de fonctionnement et de lieu, et ce sur une courte période de temps. D'après le Guide de validation des méthodes d'analyses^[1] de l'ANSES, la répétabilité est un paramètre intra-série qui correspond au premier niveau de validation de la fiabilité. Après validation de la répétabilité, il convient de s'intéresser au paramètre de fidélité intermédiaire, définit de façon intra laboratoire, puis au paramètre de reproductibilité, définit de façon inter laboratoire. En s'inspirant de ce guide, nous procédons alors à un minimum de trois répétitions d'analyse du même échantillon, au sein d'une même série de mesures, pour garantir la fiabilité de nos résultats. Néanmoins, selon les travaux du Dr BOUTARAA, intitulés Notions de répétabilité et reproductibilité de la mesure Justesse et de Fidélité^[2], il est préférable de réaliser dix injections successives d'un même échantillon afin de mesurer la répétabilité d'une manipulation en HPLC. De ce fait, nous fixons un seuil minimal de mesure de trois injections, ainsi qu'un seuil maximal de dix injections, afin d'estimer de façon la plus optimale la répétabilité de notre étude. D'après EUROLAB, qui est une institution d'accréditation à échelle internationale, la détermination de la présence d'aspartame dans divers édulcorants, par méthode d'analyse HPLC, doit être conforme à la norme TS EN 1378 Denrées alimentaires^[3]. Afin de vérifier si nos échantillons sont conformes à cette norme et de conclure quant à sa commercialisation, il est absolument de rigueur de confier nos résultats d'analyse à une telle institution d'accréditation.

III. Principe (Lisa Couette)

Le but de ce projet est de doser l'aspartame dans un échantillon en utilisant la chromatographie en Phase Liquide Haute Performance (HPLC). Pour cela, nous allons faire une gamme d'étalonnage puis grâce aux mesures obtenues de la HPLC, nous pourrions tracer le graphique $S=f(C)$. Ainsi, nous pouvons analyser notre échantillon et déterminer sa teneur en aspartame. Enfin, nous pourrions valider notre méthode en réalisant plusieurs fois l'injection de notre échantillon et vérifier si notre expérience est répétable.

IV. Réactifs, verrerie et appareillage (Théo Postel)

Réactifs :

- Phosphate de monopotassium (Eluant B)
- Méthanol (éluant A)
- Aspartame
- Bouteille de Coca Cola zéro
- Eau Ultra Pure
- Acide Chlorhydrique

- Pompe : 1,3 ml/min
A : 30 B : 70 C : 0 D : 0
La pression de refoulement est comprise entre 150 et 180 bars.
- Détecteur : 217 nm
- Enregistreur-Intégrateur :
ATTEN : 20 min
RANGE : 0,2000

V. Mode opératoire (Eliza Georgos)

Préparation de la phase mobile

Préparer 300 mL d'une solution à 0,02 mol/L de KH_2PO_4 et ajuster le pH si nécessaire.

Préparation des solutions étalons d'aspartame pure à 99% :

Diluer la solution mère Sm fournie en mélangeant 100g d'aspartame pure dans une fiole jaugée de 100mL pour obtenir la solution Smd.

Préparer une gamme de 5 solutions étalons de 50 mL contenant respectivement 1, 2, 3, 4, 5 mL de la solution Smd.

Préparation de l'échantillons de coca cola :

Placer l'échantillon dans un bac à ultrasons et la diluer dans 100 mL en ajoutant 20 mL de Coca Cola.

Analyses chromatographiques :

Réaliser un chromatogramme de notre échantillon dilué et de Smd. Puis enregistrer les chromatogrammes de notre gamme d'étalon en respectant l'ordre des teneurs croissantes.

Validation de méthode : la répétabilité

En considérant qu'après avoir injecté la solution, une analyse dure 9 min, injecter entre 4 et 6 fois notre solution échantillon. L'injection se fera par une même personne de façon successive avec les mêmes paramètres de l'appareil et dans un délai le plus court possible en utilisant la même verrerie. [4]

VI. Exploitation des résultats (Raphaël Groulier)

1. Détermination de la concentration en aspartame

Pour déterminer la teneur d'un composé en mg/L on réalise d'abord une droite d'étalonnage à partir des chromatogrammes :

On trace la droite d'étalonnage à partir des surfaces $S(\mu\text{V.s})$ des pics en fonction des concentrations (mg/L) des solutions étalons d'aspartame.

Pour cela on réalise un étalonnage externe, et on obtient une équation de droite du type : $S = a * C + b$
Ainsi on obtient : $C = (S - b)/a$ avec C en mg/L

Ce qui nous permet d'obtenir la concentration de l'aspartame dans la solution échantillon (mg/L). D'après le site de Coca-Cola, nous devons trouver une concentration d'aspartame d'environ 130 mg/L.

(On peut aussi remplacer la surface du pic par sa hauteur pour réaliser ces calculs.)

2. Calcul de répétabilité

Pour calculer la répétabilité qui correspond à la variation due à l'appareil de mesure [5] on a la formule suivante [6] :

$$\text{Répétabilité} = \sigma r^2 = \frac{SCEr}{I(k-1)}$$

Avec :

- SCEr la somme des écarts au carré, soit où la variable x correspond à la concentration (en mg/L) en aspartame dans le coca-cola zéro.
- I le nombre de séries
- k le nombre de mesures effectuées

On peut ainsi déterminer la limite de répétabilité « r » qui correspond à l'écart maximal acceptable entre deux mesures [7] & [8] :

$$r = 2 - \sqrt{x} \sigma r \times t \approx 2,83 \times \sigma r \quad \text{Avec :}$$

- σr l'écart-type de répétabilité
- t le coefficient de Student-Fischer (arrondi à 2 pour une probabilité de 95%).

On peut aussi calculer l'incertitude de répétabilité $U(x)$ [9] :

$$U(x) = \frac{k \times \sigma}{\sqrt{n}}$$

Où :

- k est le facteur d'élargissement
- σ l'écart-type de formule : $\sigma = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{\sqrt{n-1}}$
- n le nombre de mesures réalisées

Pour le facteur d'élargissement « k » on sait que sa valeur est environ égale à 2 si l'on veut un résultat avec un intervalle de confiance à 95%.

VII. Risques et données de sécurité (Lisa Couette)

Réactifs Solvants Produits	Aspect	T _f (°C)	T _{eb} (°C)	Masse vol (si liq)	Solubilité Eau Solvants	N°SGH	Principaux dangers	Prudences associées
Aspartame N°CAS: 22839-47-0	Sol	249	300		Soluble dans les acides mais peu dans l'eau et l'éthanol		Mélange non dangereux conformément au règlement (CE)	Port des EPI
Méthanol N°CAS: 67-56-1	Liq	-98	64.7	0.79	Soluble dans l'eau	02:inflammable 06 : Toxicité aigue 08 : CMR	H225, H301, H311, H331, H370	P210, P233, P280
Phosphate de monopotassium N°CAS : 7778-77-0	Sol	252	450		Soluble dans l'eau		Mélange non dangereux conformément au règlement (CE)	Port des EPI
Acide Chlorhydrique N°CAS : 7647-01-0	Liq	-30	108	1.17	Soluble dans eau Soluble dans l'acétone, acide acétique	05 : corrosif 07 : nocif ou irritant	H290, H314, H335	Port des EPI

ANNEXE

Bibliographie

- [1] Guide de validation des méthodes d'analyses, ANSES. Consulté le 24 janvier 2023, à l'adresse : https://www.anses.fr/fr/system/files/ANSES_GuideValidation.pdf
- [2] Notions de répétabilité et reproductibilité de la mesure Justesse et de Fidélité, Dr BOUTARAA. Consulté le 27 janvier 2023, à l'adresse : <https://www.univ-chlef.dz/FGCA/wp-content/uploads/2020/02/Chapitre-IV.pdf>
- [3] Norme TS EN 1378 Denrées alimentaires, EUROLAB. Consulté le 27 janvier 2023, à l'adresse : <https://www.eurolab.com.tr/fr/sektorel-test-ve-analizler/gida-testleri/ilave-seker-analizi>
- [4] Poirier, C. (s. d.). Métrologie BUT Chimie Première année IUT Aix-Marseille Saint Jérôme.
- [5] Formule de la répétabilité. Consulté le 29 Janvier 2023 : <https://www.ummo.dz/dspace/bitstream/handle/ummo/13939/Optimisation%20et%20validation%20d'un%20méthode%20de%20dosage%20simultané%20du%20Paracétamol%20et%20de%20la%20Caféine%20dans.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (page 65)
- [6] Informations sur la répétabilité. Consulté le 29 janvier 2023 : <https://support.minitab.com/fr-fr/minitab/20/help-and-how-to/quality-and-process-improvement/measurement-system-analysis/supporting-topics/gage-r-r-analyses/what-is-a-gage-r-r-study/>
- [7] Formule et informations sur la répétabilité et la limite de répétabilité. Consulté le 29 janvier 2023 : <https://flarnal.e-monsite.com/medias/files/repet-1.pdf>
- [8] Informations sur la répétabilité provenant de la bibliographie du TP 1 de la deuxième série des TP d'analyses. (Page 11). Consulté le 29 janvier 2023 : https://ametice.univ-amu.fr/pluginfile.php/6674822/mod_resource/content/1/TP1-CPG.pdf
- [9] Informations sur l'incertitude de répétabilité. Consulté le 29 janvier 2023 : <https://www.youtube.com/watch?v=XTy7kByvc3g>