

SAÉ 4.01

Développer une méthode d'analyse

I. Introduction

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

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

Le but de ce projet est de doser l'aspartame dans un échantillon de Coca-Cola Zéro®, 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 pourrons tracer le graphique $S=f(C)$. Ainsi, nous pouvons analyser notre échantillon et déterminer sa teneur en aspartame. Enfin, nous pourrons valider notre méthode en réalisant plusieurs fois l'injection de notre échantillon et vérifier si notre expérience est répétable.

IV. Réactifs, verrerie et appareillage

<u>Réactifs :</u> – Phosphate de monopotassium (Eluant B) – Méthanol (éluant A) – Aspartame – Bouteille de Coca Cola zéro – Eau Ultra Pure – Acide Chlorhydrique	<ul style="list-style-type: none"> • Pompe : 1,6 ml/min A : 30 ; B : 70 ; C : 0 ; D : 0 La pression de refoulement est comprise entre 150 et 180 bars. <ul style="list-style-type: none"> • Détecteur : 217 nm • Enregistreur-Intégrateur : ATTEN : 10 min RANGE : 0,2000
--	--

V. Mode opératoire

Préparation de la phase mobile

Préparer 500 mL d'une solution à 0,016 mol/L de KH_2PO_4 et ajuster le pH à 4,5 si nécessaire.

Préparation des solutions étalons d'aspartame :

La solution mère Sm est fournie. En revanche, pour l'obtenir, il convient de diluer 100mg d'aspartame dans une fiole jaugée de 100mL, puis de compléter au trait de jauge avec de l'eau ultra pure.

Préparer une gamme de 5 solutions étalons de 50 mL contenant respectivement 3 ; 5 ; 10 ; 15 et 25 mL de la solution Smd, puis compléter au trait de jauge avec de l'eau ultra pure.

Préparation de l'échantillons de Coca-Cola Zéro® :

Diluer 10mL de Coca-Cola Zéro® dans une fiole de 100mL d'eau ultra pure. Prendre soin de dégazer la solution dans le bac à ultrasons.

Analyse chromatographique :

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

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 $S(\mu V.s)$ 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 : $C = (S - b)/a$ avec C en mg/L

Ce qui nous permet d'obtenir la concentration de l'aspartame dans la solution échantillon (mg/L).

On obtient la droite d'étalonnage suivante :

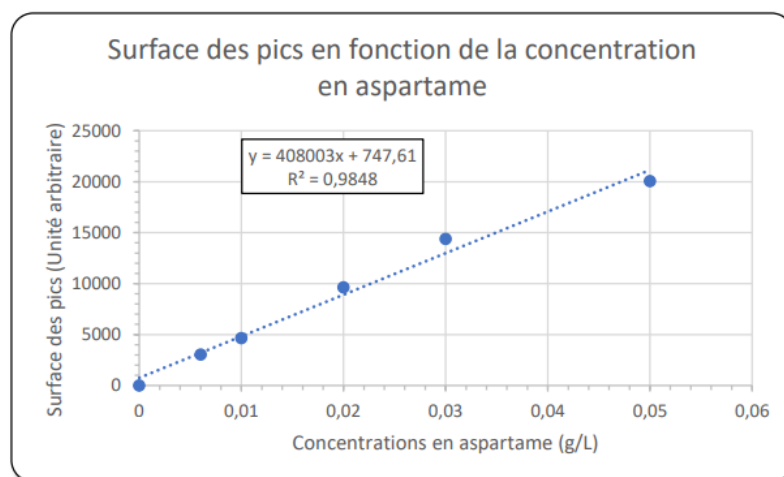


Figure 1 : Graphique des solutions étalons

1.1) Analyse du Coca-Cola Zero

D'après le site de Coca-Cola, nous devons trouver une concentration d'aspartame maximale d'environ 130 mg/L. D'après le Tableau 1 (cf Annexe) on trouve une concentration moyenne de :

$$C_{moy} = 0,0348g/L = 34,8mg/L$$

On peut conclure que la concentration en aspartame est inférieure à la valeur indiquée par Coca-cola, donc l'échantillon de Coca-Cola zéro ici testé est bien dans les normes.

QUILEZ Baptiste

1.2) Analyse des sucrettes

Lors du dosage de l'aspartame dans les sucrettes, nous avons dilué une sucrette dans une fiole jaugée de 50 mL d'eau ultrapure. Lors de la mesure de la concentration, nous avons remarqué que nous ne pouvions pas la calculer car le pic de l'aspartame (cf. Chromatogramme Echantillon Sucrète) présent sur le chromatogramme était saturé.

Ainsi, il aurait fallu diluer la sucrète dans un volume d'eau plus important.

Si l'on avait obtenu des résultats corrects, nous aurions pu calculer la teneur d'aspartame dans une sucrète à partir de la formule suivante :

$$t_{\text{aspartame}} = \frac{C_{\text{aspartame}} \times M(\text{aspartame})}{m(\text{sucrète})} \times 100 = \frac{C_{\text{aspartame}} \times 294,3}{0,052} \times 100 = x \%$$

Sachant que d'après le vendeur l'aspartame est présent à hauteur de 12% dans une sucrète.

2. Test de Grubb

On peut réaliser un test de Grubb qui nous permet de voir si les résultats que l'on a obtenu sont corrects.

A partir de la formule suivante on a calculé les différentes valeurs pour le test de Grubb (cf. Tableau 1) :

$$\frac{|x_i - x_m|}{\sigma}$$

Avec :

- x_i la concentration en aspartame du test réalisé
- x_m la concentration moyenne en aspartame
- σ l'écart-type des concentrations en aspartame

Ainsi on peut voir pour les 6 mesures réalisées (Tableau 1 en annexe) qu'à partir de la table du test de Grubb (tableau 2 en annexe) on n'a pas de valeurs aberrantes.

3. Calcul de répétabilité

On peut ainsi déterminer la répétabilité « r » qui correspond à l'écart maximal acceptable entre deux mesures [5] & [6] :

$$r = \sqrt{2} \times \sigma_r \times t \approx 2,83 \times \sigma_r$$

Avec :

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

On obtient :

$$r = 2,83 \times 0,0013 \approx 0,0037 \text{ g/L}$$

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%.

Ainsi :

$$U(x) = \frac{2 \times 0,00127}{\sqrt{6}} \approx 0,0011 \text{ g/L}$$

Soit une répétabilité :

$$r = (0,0037 \pm 0,0011) \text{ g/L}$$

La répétabilité est un facteur qui est considéré comme valide à la condition que la plus petite concentration à laquelle on ajoute la valeur de la répétabilité, dépasse la valeur de la concentration la plus élevée. En l'occurrence, ce facteur n'est pas valide avec un écart de 0,002g/L (cf Tableau 1 en Annexe). Cependant on remarque que cet écart est infime, et qu'un simple arrondi pourrait valider ce paramètre, on considère donc que la répétabilité est valide. On suppose alors que la mesure de la concentration la plus élevée est à considérer comme une valeur aberrante, ou du moins non représentative de la concentration réelle en aspartame de notre échantillon.

VII. Remarques

Lors de ces manipulations, nous avons rencontré un problème de mise en route de l'appareil HPLC. En effet, lors de nos deux premières injections, le chromatographe ne traçait aucun chromatogramme. Nous avons donc vérifié que la longueur d'onde de détection soit correctement réglée et nous permette de repérer l'aspartame. Nous avons ensuite, passé en revue l'ensemble des autres paramètres d'étude tels que le range et le débit, mais tout était réglé de façon optimale pour l'analyse. Finalement, il s'avère que notre responsable de projet a effectué une purge de l'appareil sans avoir fermé la vanne de vidange. Après nous en être rendu compte, et avoir réagi en conséquence, le reste des manipulations se sont faites sans accroc.

Par ailleurs, notre étude a été menée avec une solution mère d'aspartame réalisée avec des sucettes et non de l'aspartame pur. Ceci explique la présence de nombreux pics supplémentaires présents sur les chromatogrammes, qui correspondent au reste des molécules qui composent les sucettes. Il convient alors de ne pas s'y intéresser et de focaliser notre étude sur le pic représentatif de la molécule d'aspartame qui sort aux alentours de 5,7 min.

VIII. Conclusion

Cette seconde séance de manipulation nous a permis de valider la méthode de dosage de l'aspartame présent dans le Coca-Cola Zéro®, par la technique d'analyse chromatographique HPLC. Pour ce faire nous avons réalisé une gamme d'étalonnage qui nous a permis de conclure quant à la concentration d'aspartame présente dans l'échantillon de Coca-Cola Zéro analysé, qui est de **34,8±3,7 mg/L**. Or, la concentration maximale d'aspartame annoncée par cette firme est de 130mg/L, par conséquent l'échantillon respecte scrupuleusement la norme.

Par ailleurs, dans le souci d'enrichir notre étude, nous avons cherché à vérifier la teneur en aspartame des sucrettes utilisées pour la mise au point de la solution mère qui nous a permis d'établir la gamme d'étalonnage. En revanche, nous avons manqué de temps de pratique pour mener l'analyse. avec un échantillon suffisamment dilué. Pour autant, nous avons établi l'équation nous permettant d'y aboutir.

Enfin, la validité de notre étude repose sur le facteur de répétabilité. Ce paramètre exige d'être vérifié par un seul et même opérateur, à travers un minimum de trois répétitions de la manipulation. En l'occurrence, ces conditions ont bien été respectées et nous avons procédé à six répétitions de la manipulation afin d'obtenir une meilleure répétabilité. L'étude statistique de la répétabilité s'avère concluante. Ce paramètre étant valide, il assure la fiabilité de notre étude. Par ailleurs, le test de Grubb s'avère concluant ce qui confirme le fait que la répétabilité de notre étude est valide. Enfin l'étude complémentaire concernant l'incertitude sur la répétabilité est élevée et n'est pas forcément représentative dans l'exploitation des résultats de notre étude.

IX. Risques et données de sécurité

Réactifs Solvants Produits	Aspect	T _f (°C)	T _{eb} (°C)	Mass e vol (si liq)	Solubilité Eau Solvants	N°SGH	Principaux dangers	Prudenc es associé es
Aspartame N°CAS: 22839-47-0	Sol	24 9	300		Soluble dans les acides mais peu dans l'eau et l'éthanol		Mélange non dangereux conformé me nt au règlement (CE)	Port des EPI
Méthanol N°CAS: 67-56-1	Liq	-98	64.7	0.79	Soluble dans l'eau	02:inflamma ble 06 : Toxicité aigue 08 : CMR	H225, H301, H311, H331, H370	P210, P233, P280
Phosphate de monopotassiu m N°CAS : 7778-77-0	Sol	25 2	450		Soluble dans l'eau		Mélange non dangereux conformé me nt 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

Test pour le Coca-cola Zero						
Echantillons	Volume prélevé (mL)	Concentration en aspartame (g/L)	Aire sous la courbe	Test de Grubb	Ecart-type (g/L)	Concentration moyenne
1	10	0,0348	14926	0,021	0,0013	0,0348
2	10	0,0351	15069	0,254		
3	10	0,0325	13991	1,820		
4	10	0,0364	15588	1,252		
5	10	0,0350	15024	0,167		
6	10	0,0350	15025	0,169		

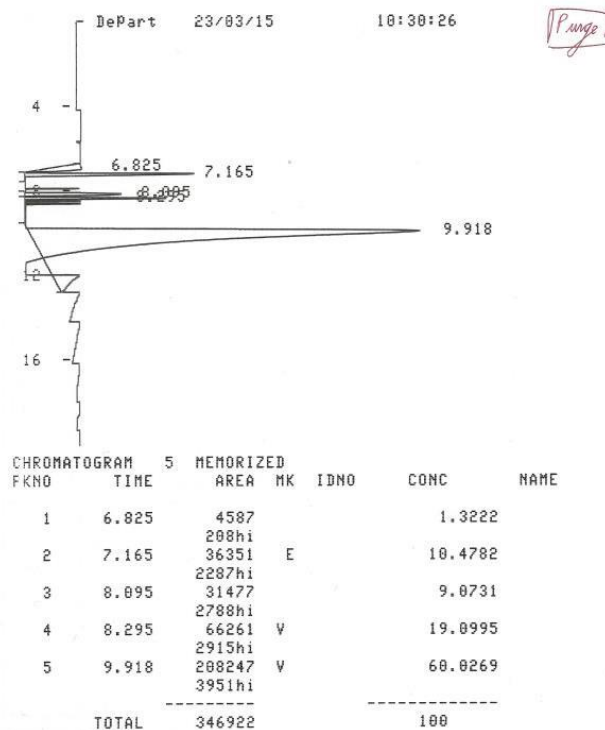
Tableau 1 : Résultats des analyses pour le Coca-Cola Zero

<u>TABLEAU 2-2</u>	
Valeurs du paramètre G (pour P = 0,95)	
n	G
3	1,155
4	1,481
5	1,715
6	1,887
7	2,020
8	2,126
9	2,215
10	2,290
11	2,355
12	2,412
13	2,462
14	2,507

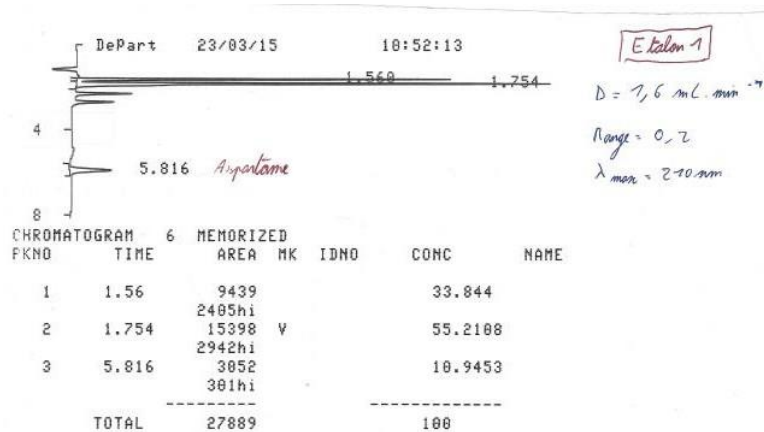
Tableau 2 : Test de Grubb

Chromatogrammes

Purge :

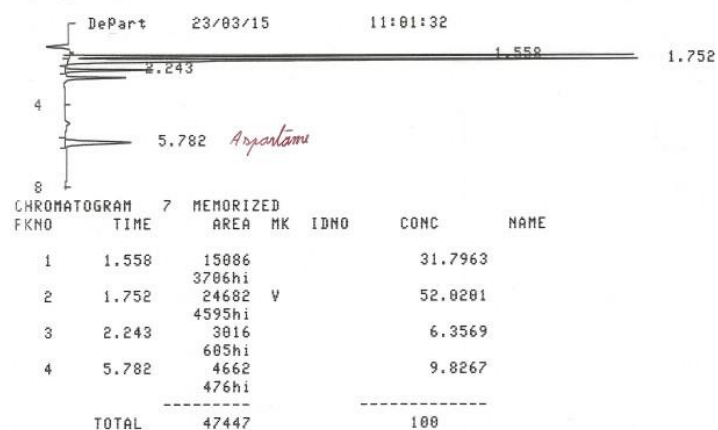


Etalon 1 :

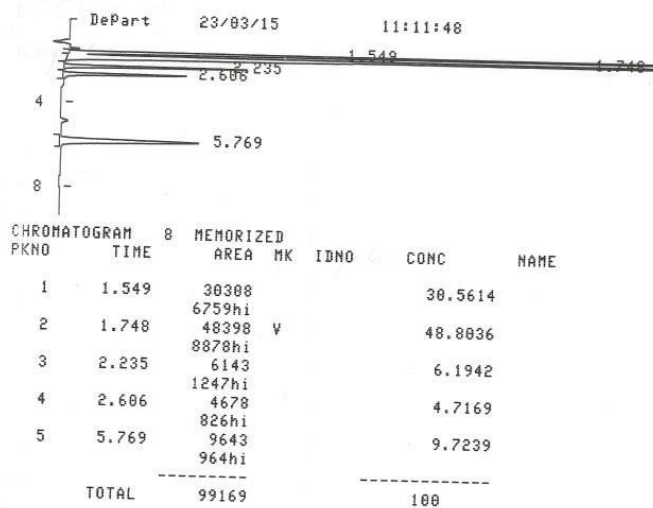


Etalon 2 :Etalon 2 $D = 1,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$

Range: 0, 2

 $\lambda_{\text{max}} = 270 \text{ nm}$ **Etalon 3 :**Etalon 3 $D = 1,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$

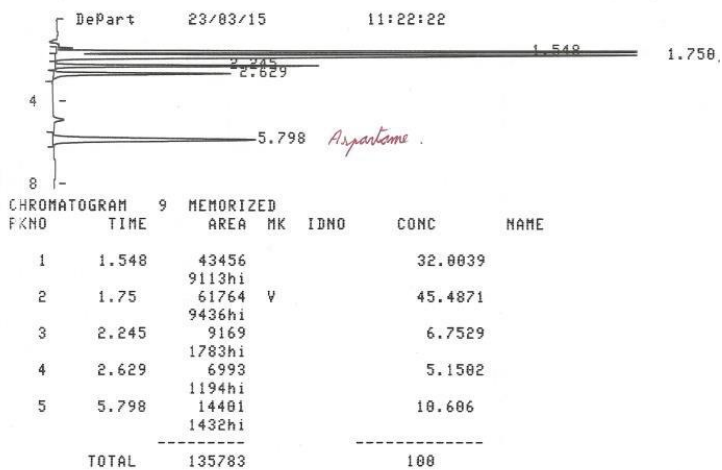
Range: 0, 2

 $\lambda_{\text{max}} = 270 \text{ nm}$ **Etalon 4 :**

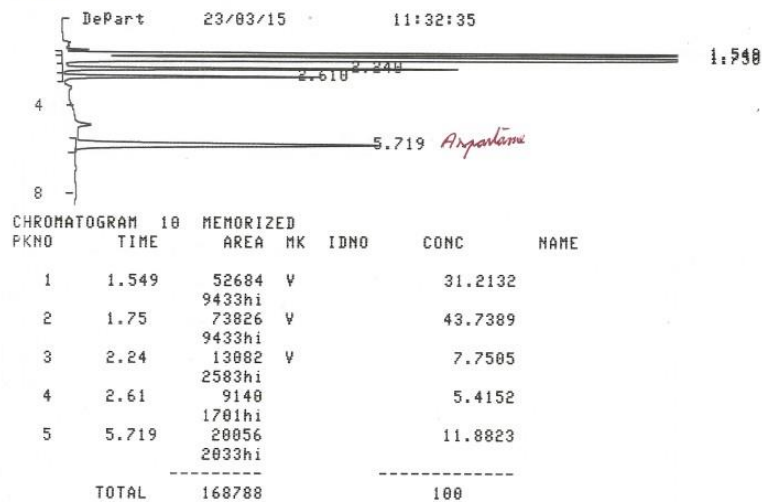
QUILEZ Baptiste

Etalon 4 $D = 1,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$

Range = 0,2

 $\lambda_{\text{max}} = 270 \text{ nm}$ Etalon 5 :Etalon 5 $D = 1,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$

Range = 0,2

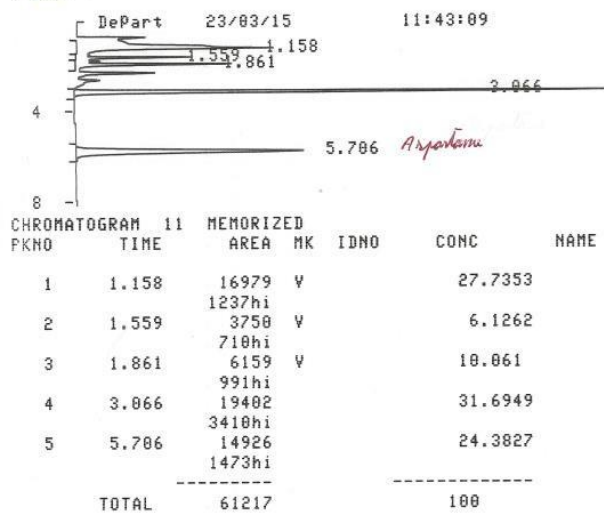
 $\lambda_{\text{max}} = 270 \text{ nm}$ Echantillon 1 Coca-Cola Zéro :

Echantillon 1

$$D = 1,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$$

$$\text{Range} = 0,2$$

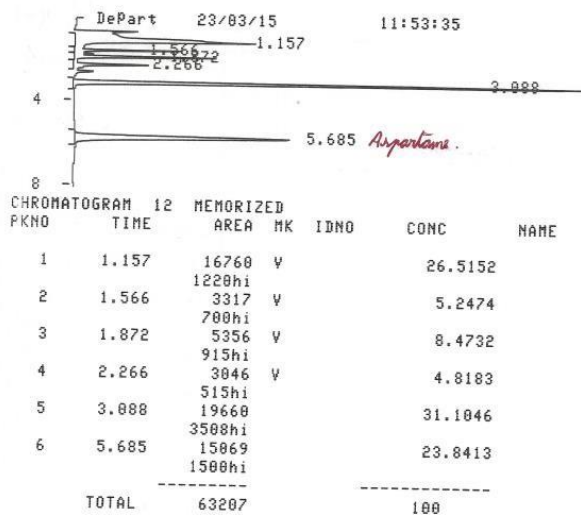
$$\lambda_{\text{max}} = 210 \text{ nm}$$

Echantillon 2 Coca-Cola Zéro :Echantillon 2

$$D = 1,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$$

$$\text{Range} = 0,2$$

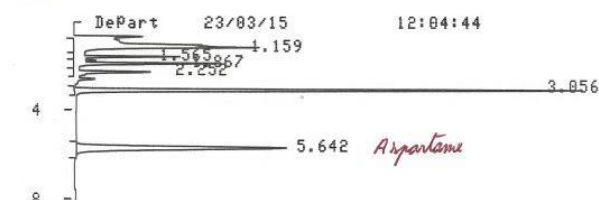
$$\lambda_{\text{max}} = 210 \text{ nm}$$

Echantillon 3 Coca-Cola Zéro :

QUILEZ Baptiste

Echantillon 3 $D = 1,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$

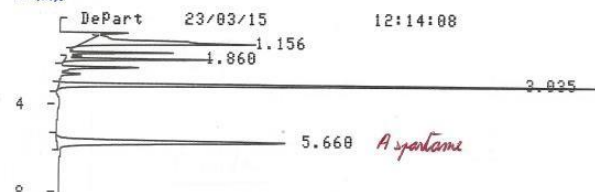
Range = 0,2

 $\lambda_{\text{max}} = 210 \text{ nm}$ 

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.159	16250	V		26.6675	
2	1.565	1188hi			5.6929	
3	1.867	681hi	V		9.2281	
4	2.252	5618			5.1282	
5	3.856	931hi			38.3384	
6	5.642	3125	V		22.9689	
		477hi				
		18482				
		3234hi				
		13991				
		1391hi				
TOTAL		60935			100	

Echantillon 4 Coca-Cola Zéro :Echantillon 4 $D = 1,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$

Range = 0,2

 $\lambda_{\text{max}} = 210 \text{ nm}$ 

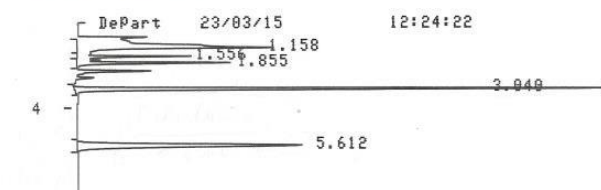
PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.156	11368			21.8929	
2	1.86	1126hi			9.7654	
3	3.835	5071	V		38.3215	
4	5.66	965hi			30.8201	
		19898				
		3559hi				
		15588				
		1535hi				
TOTAL		51924			100	

Echantillon 5 Coca-Cola Zéro :

QUILEZ Baptiste

Echantillon 5 $D = 1,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$

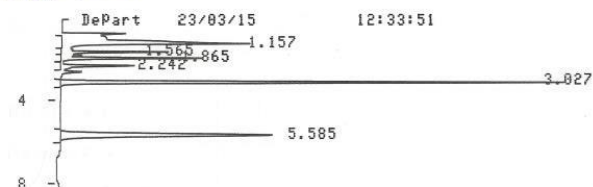
Range = 0,2

 $\lambda_{\text{max}} = 210 \text{ nm}$ 

CHROMATOGRAM	15	MEMORIZED				
PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.158	17973	V		28.7046	
		1285hi				
2	1.556	3874	V		6.1875	
		693hi				
3	1.855	5871	V		9.3762	
		968hi				
4	3.04	19872			31.7372	
		3525hi				
5	5.612	15024			23.9946	
		1518hi				
TOTAL		62614			100	

Echantillon 6 Coca-Cola Zéro :Echantillon 6 $D = 1,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$

Range = 0,2

 $\lambda_{\text{max}} = 210 \text{ nm}$ 

CHROMATOGRAM	16	MEMORIZED				
PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.157	16726	V		26.0461	
		1302hi				
2	1.565	3900	V		6.0727	
		739hi				
3	1.865	5719	V		8.9048	
		993hi				
4	2.242	3234	V		5.0357	
		524hi				
5	3.027	19615			30.5443	
		3384hi				
6	5.585	15025			23.3965	
		1512hi				
TOTAL		64219			100	

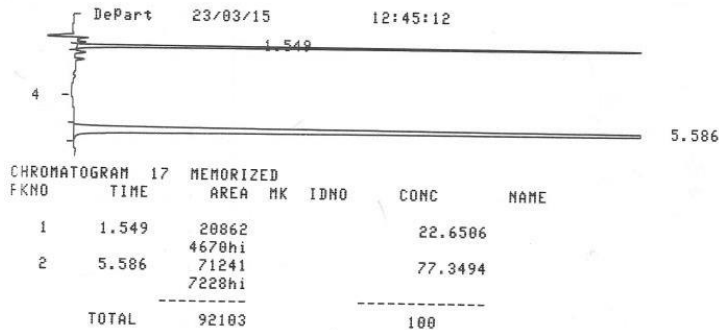
Echantillon Sucrette :

Echantillon sucré

D = 7,6 mL

Range = 0,2

$\lambda_{max} = 270 \text{ nm}$



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-MarseilleSaint Jérôme.
5. Formule de la répétabilité. Consulté le 29 Janvier 2023 : <https://www.ummtto.dz/dspace/bitstream/handle/ummtto/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 provenant de la bibliographie du TP 1 de la deuxième série des TP d'analyses. (Page 11). Consulté le 29 janvier 2023 : https://ameticce.univ-amu.fr/pluginfile.php/6674822/mod_resource/content/1/TP1-CPG.pdf
7. Informations sur l'incertitude de répétabilité. Consulté le 29 janvier 2023 : <https://www.youtube.com/watch?v=XTy7kByvc3g>

