

Validation d'une méthode performante de dosage des steviols glycosides de *Stevia Rebaudiana*

J.M. Roussel, Consultant, Aix-en-Pce

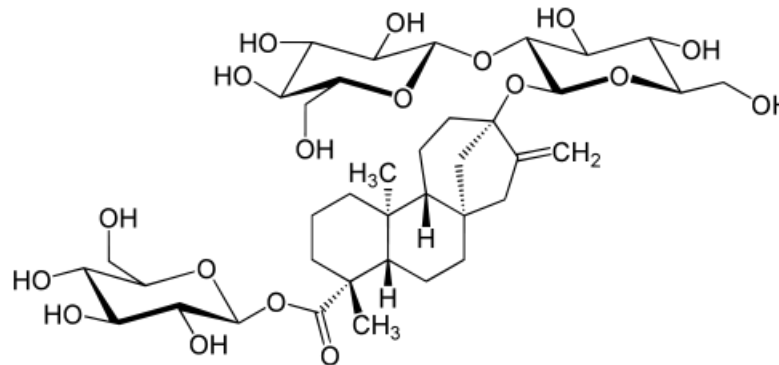
Prof. Dr. Gertrud Morlock, Chair of Food Science, JLU Giessen

S. Meyer, JLU Giessen



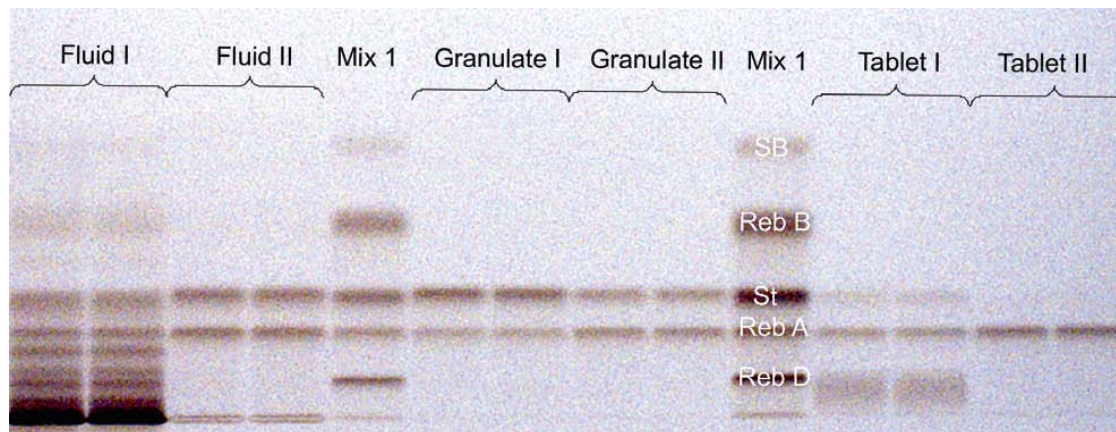
Introduction : la méthode de dosage

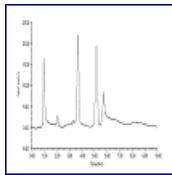
- Méthode de dosage rapide des édulcorants végétaux de *Stevia Rebaudiana*
 - Intervalle de mesure : 0,02 à 0,2 % en poids.
 - 2 matrices : yaourt et formulation industrielle
 - Yaourt : homogénéisation et dissolution de MeOH
 - F.I. : dissolution dans l'eau, dilution dans MeOH
 - Dépôt : ATS 4 (Camag)
 - Plaques : HPTLC silica gel 60 F₂₅₄ 20x10 cm (Merck)



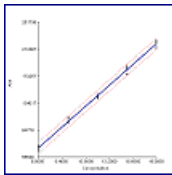
Introduction : la méthode de dosage

- Méthode de dosage rapide des édulcorants végétaux de *Stevia Rebaudiana*
 - Séparation : ADC 2 (Camag) avec acétate d'éthyle – méthanol – acide acétique (3:1:1, v/v/v)
 - Dérivatisation post chromatographique : TLC Immersion Device (Camag), dérivation au β -naphthol puis chauffage sur TLC Plate Heater (Camag).
 - Evaluation densitométrique : TLC Scanner 3/WinCATS (Camag) 500 nm.

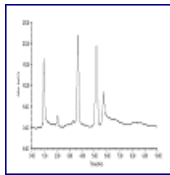




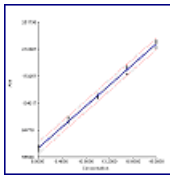
Validation : plan de travail selon NF V03-110



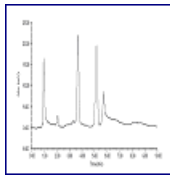
Critère	Nbe d'analyses	Commentaire
Plan d'étalonnage (Fonction de réponse)	<ul style="list-style-type: none"> - i séries d'essais obtenues dans des conditions de fidélité intermédiaire ($i \geq 3$) 5 séries (5 plaques HPTLC) - k niveaux de concentration par série, $k >$ nombre de coefficients du modèle choisi 4 niveaux de concentration - j répétitions par série à chaque niveau ($j \geq 2$) 3 répétitions par série 	<p>Une série représente un étalonnage complet obtenu dans des conditions de fidélité intermédiaire.</p> <p>Le plan doit couvrir l'intervalle de mesure, LQ comprise si nécessaire.</p> <p>Pas d'analyse statistique spécifique du plan d'étalonnage, il est utilisé pour obtenir les concentrations retrouvées du plan de caractérisation</p>



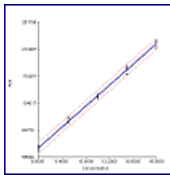
Validation : plan de travail selon NF V03-110



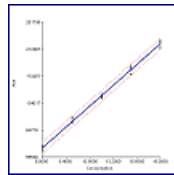
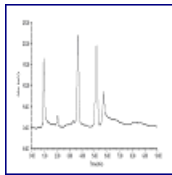
Critère	Nbe d'analyses	Commentaire
Plan de caractérisation (exactitude)	<ul style="list-style-type: none"> - i séries d'essais obtenues dans des conditions de fidélité intermédiaire (i = 5 pouvant être ramené à 3 ou 4 sur justification) 5 séries (5 plaques HPTLC) - k niveaux de concentration par série, (k ≥ 3) 3 niveaux de concentration - j répétitions par série à chaque niveau (j ≥ 2) 3 répétitions par série 	<p>Le nombre de niveaux est nécessairement ≥ 3 afin de vérifier la linéarité de la relation entre concentration vraie et concentration retrouvée</p> <p>Chaque série est traitée par rapport à l'étalonnage correspondant (même jour,...) pour obtenir les concentrations retrouvées</p>



Validation : plan de travail selon NF V03-110



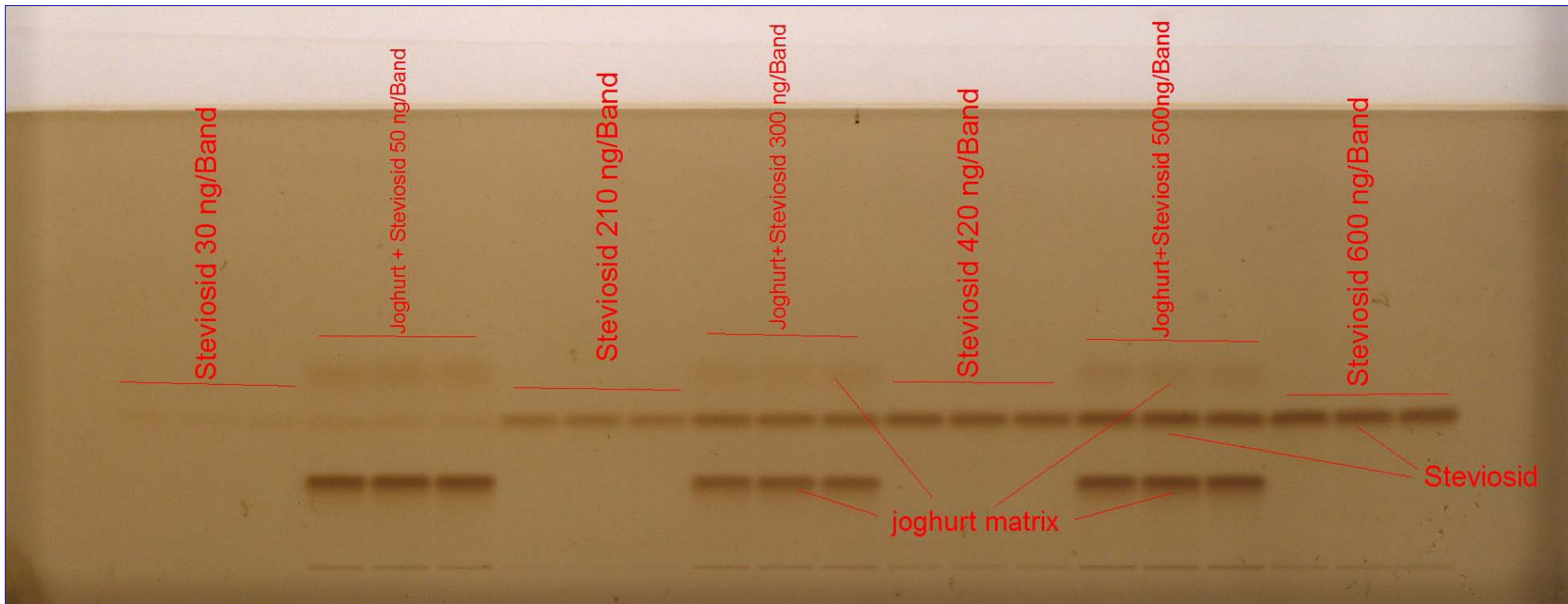
Critère	Nbe d'analyses	Commentaire
Estimation de la LD	Dépend du protocole choisi 10 points d'étalonnage 10 mesures du bruit de fond	La norme fait référence aux protocoles : <ul style="list-style-type: none"> - EURACHEM - ISO 11843 - ICH
Estimation de la LQ	Cf. plan de caractérisation, l'étude du profil d'exactitude permet l'estimation de la LQ 10 points d'étalonnage 10 mesures du bruit de fond	Protocole à utiliser lorsqu'elle est inconnue et que la validation a, entre autres, comme objectif de déterminer une quantité minimale quantifiable par l'étude de résultats analytiques La LQ est définie par l'intercept entre les limites d'acceptabilité et l'intervalle de tolérance

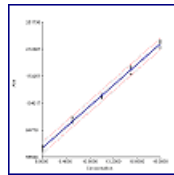
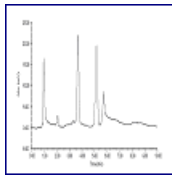


Spécificité de la méthode

- La spécificité de la méthode est démontrée par la comparaison des enregistrements obtenus à partir des différentes espèces analysées sur chaque plaque :
 - Etalons,
 - Echantillons supplémentés

Matrice 1 : Yaourt supplémenté

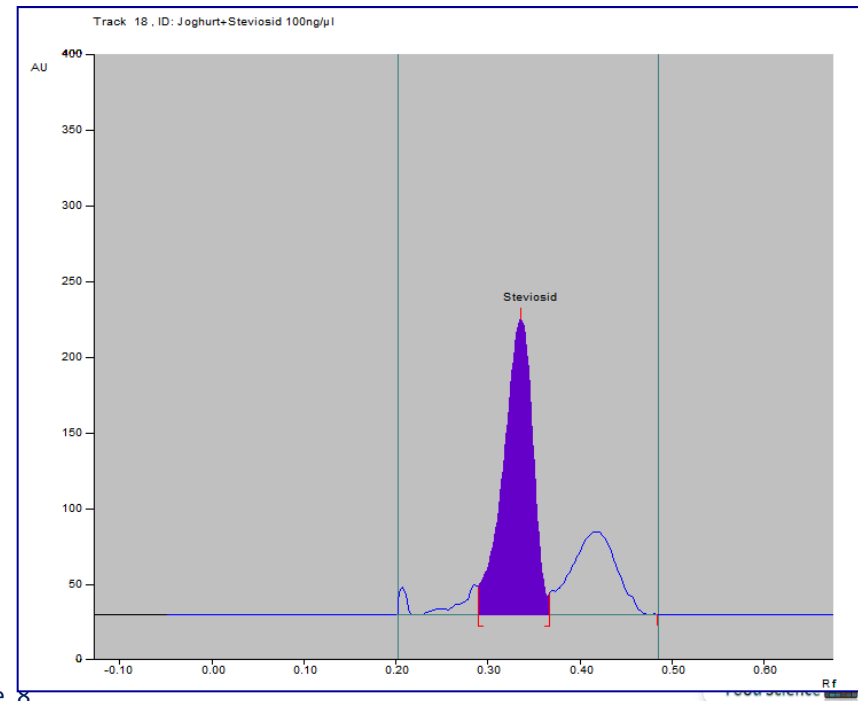
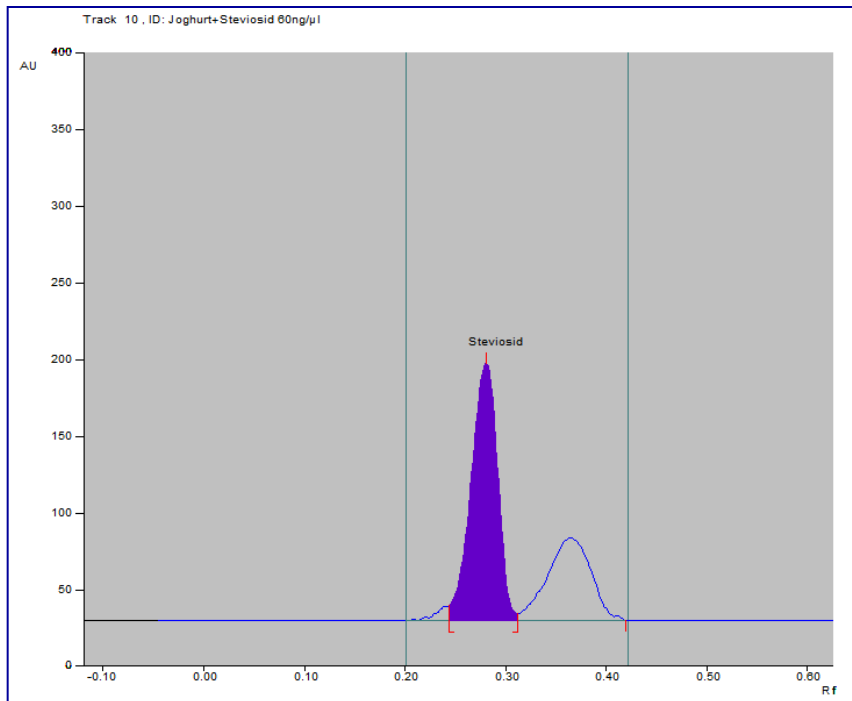


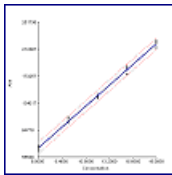
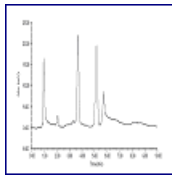


Spécificité de la méthode

- La spécificité de la méthode est démontrée par la comparaison des enregistrements obtenus à partir des différentes espèces analysées sur chaque plaque :
 - Etalons,
 - Echantillons supplémentés

Matrice 1 : Yaourt, échantillons supplémentés à 60 et 100 ng/dépot

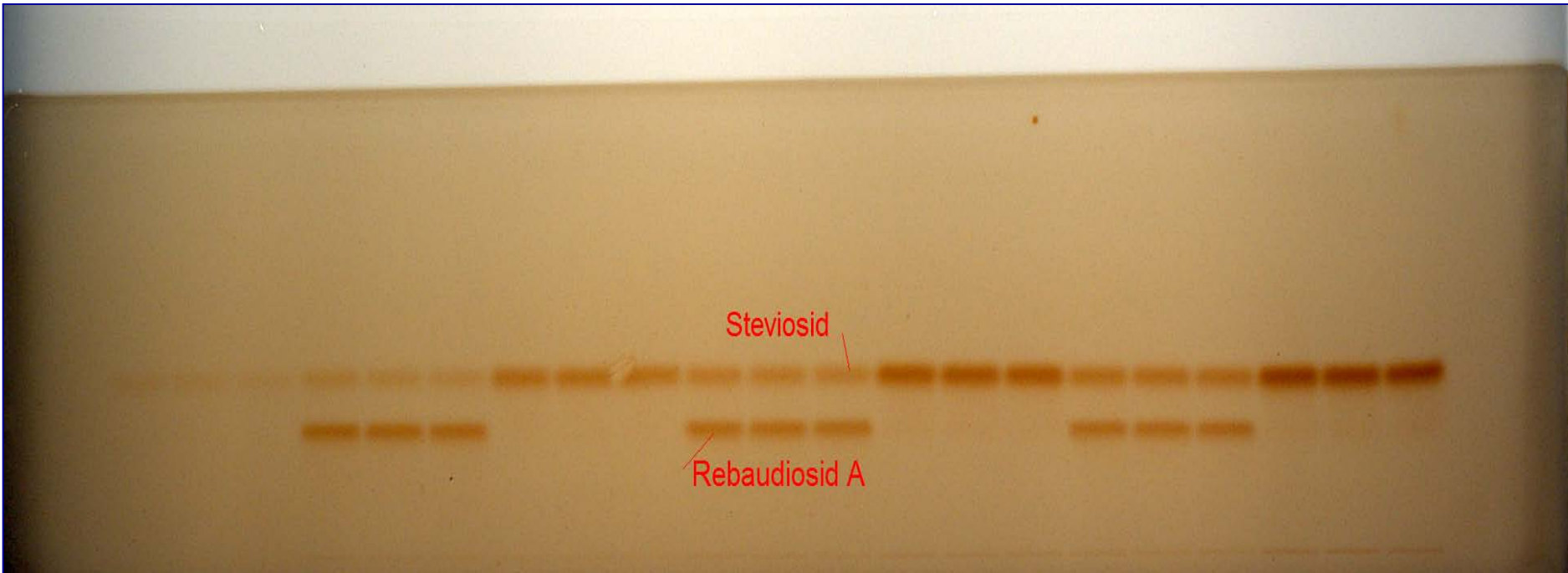


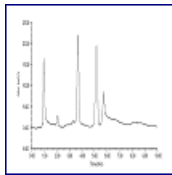


Spécificité de la méthode

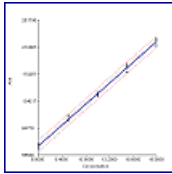
- La spécificité de la méthode est démontrée par la comparaison des enregistrements obtenus à partir des différentes espèces analysées sur chaque plaque :
 - Etalons,
 - Echantillons supplémentés

Matrice 2 : Formulation industrielle





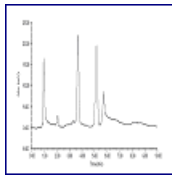
Estimation de la LD/LQ : rapport signal/bruit



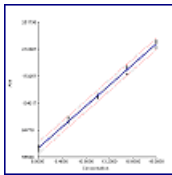
$$LD = 3,3 * R * N$$

$$LQ = 10 * R * N$$

- R : facteur de réponse du composé.
N : bruit moyen.



Estimation de la LD/LQ : courbe de calibrage



$$Y_i = a_0 + a_1 * X_i$$

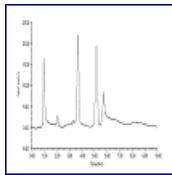
variance résiduelle, SR^2

$$LD = 3,3 * SR / a_1$$

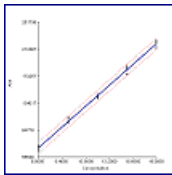
$$LQ = 10 * SR / a_1$$

a_0 : ordonnée à l'origine

a_1 : pente de la droite

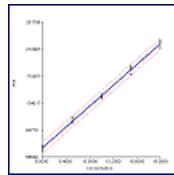
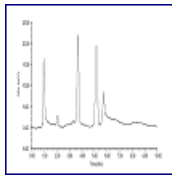


Estimation de la LD/LQ : résultats



- Estimations pour une quantification par la hauteur de pic :
 - Rapport signal/bruit
 - LD = 15,84 ng/dépôt LQ = 48,04 ng/dépôt
 - Etalonnage
 - LD = 4,41 ng/dépôt LQ = 13,36 ng/dépôt
- Estimations pour une quantification par la surface de pic :
 - Rapport signal/bruit
 - LD = 10,09 ng/dépôt LQ = 30,58 ng/dépôt
 - Etalonnage
 - LD = 6,56 ng/dépôt LQ = 19,88 ng/dépôt
 - **LQ choisie (matrices 1 et 2) = 30 ng/dépôt**

Etude de la fonction de réponse

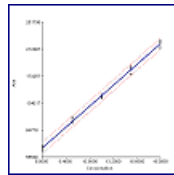
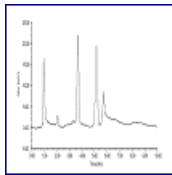


- Le modèle d'étalonnage choisi :

Modèle	Équation	Réf.	Concentration prédite inverse
Quadratique	$y = a_0 + a_1x + a_2x^2$	SFSTP NF V03-110 NF T90-210	$\hat{x} = \frac{-a_1 + \sqrt{a_1^2 - 4a_2(a_0 - y)}}{2a_2}$

- La norme NF T90-210 de 2009 propose, dans le domaine de l'analyse de l'eau, une évaluation de la fonction de réponse à l'aide de deux outils :
 - Comparaison entre les biais observés et les EMA (Ecart Maximal Acceptable)
 - Adéquation entre l'erreur du modèle mathématique et l'erreur expérimentale

Etude de la fonction de réponse



- Approche par les EMA_{étalonnage} (NF T90-210)
 - Il s'agit ici de vérifier que les biais observés (b_{ij}) entre les concentrations prédites inverses et les concentrations vraies sont acceptables par rapport à un EMA_{étalonnage} fixé par l'expérimentateur.
 - On fixe un EMA_{étalonnage} pour chaque niveau, il correspond au biais maximal admissible pour ce niveau.
- Approche statistique globale (NF T90-210)
 - Il s'agit ici de vérifier l'adéquation entre l'erreur expérimentale et l'erreur du modèle

$$SCE_{tot} = SCE_{exp} + SCE_{mod}$$

$$\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (\hat{x}_{ij} - x_{ij})^2 = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (\hat{x}_{ij} - \bar{\hat{x}}_{ij})^2 + \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (x_{ij} - \bar{\hat{x}}_{ij})^2$$

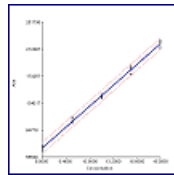
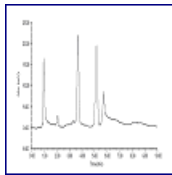
Etude de la fonction de réponse

- Approche statistique globale (NF T90-210)

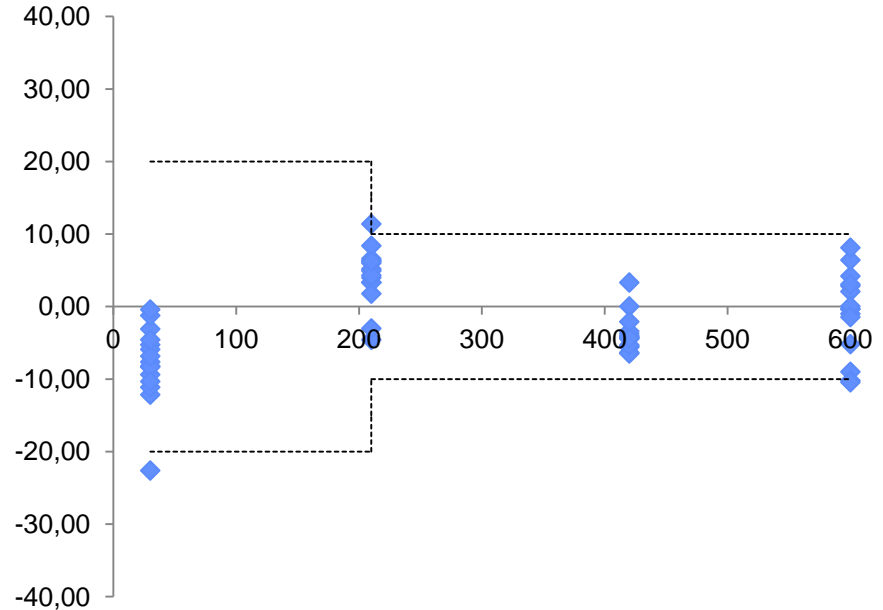
Source de variation	Somme des carrés des écarts	Degrés de liberté	Variances	Critère calculé	Valeur critique au risque $\alpha=1\%$
Modèle	SCE_{mod}	I	$S_{mod}^2 = \frac{SCE_{mod}}{I}$	$C_{mod} = \frac{S_{mod}^2}{S_{exp}^2}$	$VC_{mod} = F(I, I(J-1), 1-\alpha)$
Expérimentale	SCE_{exp}	$I(J-1)$	$S_{exp}^2 = \frac{SCE_{exp}}{I(J-1)}$		
Totale	SCE_{tot}	IJ			

- La valeur critique est la valeur de Fisher, pour un risque α et un nombre I et $I(J-1)$ degrés de libertés. Ce test est effectué avec un risque α de 1%
- Si C_{mod} est inférieur à VC_{mod} , alors l'erreur du modèle n'est pas significativement différente de l'erreur expérimentale et le modèle est accepté

Etude de la fonction de réponse



- 30 à 600 ng/dépôt
 - Analyse sur la hauteur de pic
 - EMA_{étalonnage} fixé à 20 % puis à 10 % en valeur relative

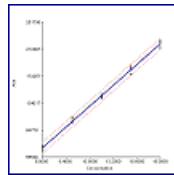
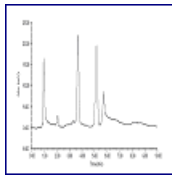


# levels	4
# series	5
# repetitions	3

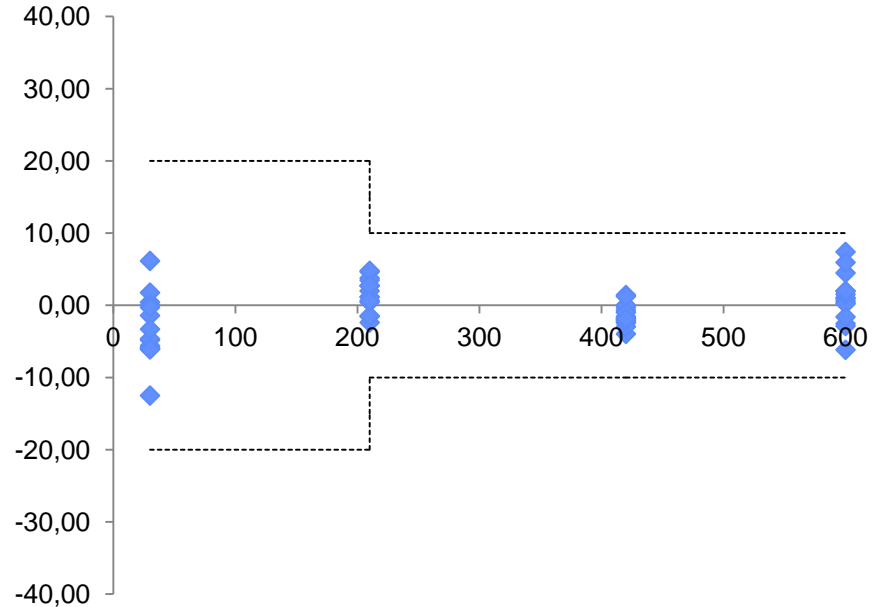
Analyse sur la hauteur de pic

Variation source	SSD	df	Variance	Calc F value	Risk level (%)	Tabulated F value	Conclusion
Model	5325,0498	4	1331,262	3,866502	0,01	3,6740446	KO
Experimental	19281,176	56	344,3067				
Total	24606,226	60					

Etude de la fonction de réponse



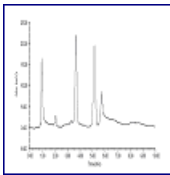
- 30 à 600 ng/dépôt
 - Analyse sur la **surface** de pic
 - EMA_{étalonnage} fixé à 20 % puis à 10 % en valeur relative



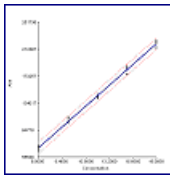
# levels	4
# series	5
# repetitions	3

Analyse sur la surface de pic

Variation source	SSD	df	Variance	Calc F value	Risk level (%)	Tabulated F value	Conclusion
Model	1102,0022	4	275,50054	2,250365	0,01	3,6740446	OK
Experimental	6855,7912	56	122,42484				
Total	7957,7934	60					



Fidélité



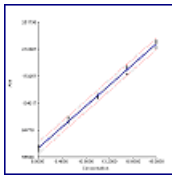
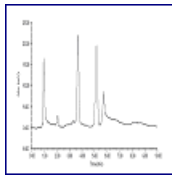
- Pour chacun des k niveaux de concentration issus de l'étude d'exactitude :
 - La variance de répétabilité des I séries de valeurs de $R_{Z_{ij}}$ s'écrit alors :

$$S_W^2 = \frac{\sum_{i=1}^I ((J_i - 1) \times S_i^2)}{\left(\sum_{i=1}^I (J_i) \right) - I} \quad \text{avec, pour chaque série : } S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{J_i} (R_{Z_{ij}} - \bar{R}_{Z_i})^2}{J_i - 1}$$

Si le nombre de valeurs par série est identique, la formule se résume à la simple moyenne des variances:

La variance de répétabilité de I séries est la moyenne des variances de répétabilité, pondérée des différents nombres de valeurs par série.

$$\longrightarrow S_W^2 = \frac{\sum_{i=1}^I (S_i^2)}{I}$$



Fidélité

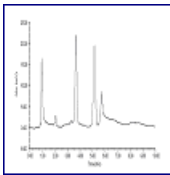
- Pour chacun des k niveaux de concentration issus de l'étude d'exactitude :
 - La variance inter-séries s'écrit alors :

$$S_B^2 = \frac{\sum_{i=1}^I \left(J_i \times \left(\bar{R}_{Z_i} - \bar{\bar{R}}_Z \right)^2 \right)}{I - 1} - S_W^2$$

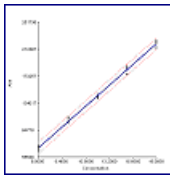
avec J_I , le nombre moyen de valeurs par série

C'est-à-dire : $S_B^2 = S(\bar{R}_{Z_i})^2 - \frac{S_W^2}{J}$

Si le nombre de mesures dans chaque série est identique ($J_i = J_I$)



Fidélité



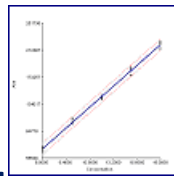
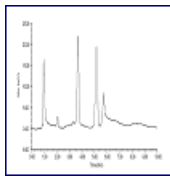
- Pour chacun des k niveaux de concentration issus de l'étude d'exactitude :
 - L'écart-type de fidélité intermédiaire est alors :

$$S_{FI} = \sqrt{S_B^2 + S_W^2} \quad \text{si} \quad S_B^2 = S(\bar{R}_{Z_i})^2 - \frac{S_W^2}{J} \geq 0$$

$$S_{FI} = \sqrt{S_W^2} \quad \text{si} \quad S_B^2 = S(\bar{R}_{Z_i})^2 - \frac{S_W^2}{J} < 0$$

- Et le Coefficient de Variation de fidélité intermédiaire de l'échantillon considéré est :

$$CV_{FI} = 100. \frac{S_{FI}}{\bar{R}_Z}$$



Fidélité : résultats

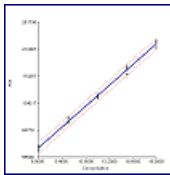
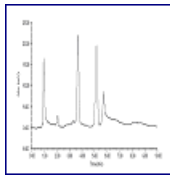
- La fidélité de la méthode peut s'exprimer sur l'ensemble de l'intervalle de mesure, à l'aide des dispersions mesurées sur les recouvrements d'exactitude

Matrice 1 : Yaourt

Hauteur de pic			Surface de pic		
Conc. (ng/ml)	CV % Répétabilité	CV % Fid. Inter.	Conc. (ng/ml)	CV % Répétabilité	CV % Fid. Inter.
50	4,15	8,44	50	4,05	6,32
300	3,12	4,00	300	2,32	3,92
500	5,36	5,36	500	3,47*	3,47*

Matrice 2 : Formulation

Hauteur de pic			Surface de pic		
Conc. (ng/ml)	CV % Répétabilité	CV % Fid. Inter.	Conc. (ng/ml)	CV % Répétabilité	CV % Fid. Inter.
75	3,54	4,75	75	2,81	3,38
150	2,81	4,55	150	3,40	3,71
225	2,85	3,29	225	3,69	3,99

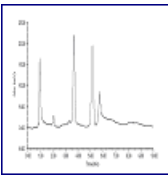


Fidélité : résultats

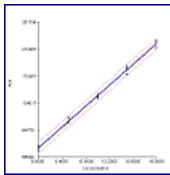
- La fidélité de la méthode peut s'exprimer sur l'ensemble de l'intervalle de mesure, à l'aide des dispersions mesurées sur les recouvrements d'exactitude obtenus dans chaque série de mesures

Matrice 1 : Yaourt			
Hauteur de pic		Surface de pic	
CV % Répétabilité	CV % Fid. Inter.	CV % Répétabilité	CV % Fid. Inter.
4,31	6,19	3,41*	7,63*
Matrice 2 : Formulation			
Hauteur de pic		Surface de pic	
CV % Répétabilité	CV % Fid. Inter.	CV % Répétabilité	CV % Fid. Inter.
3,09	4,60	3,31	4,67

* : après rejet de la série aberrante



Profil d'exactitude : Démarche SFSTP / NF V03-110



- A chaque niveau de concentration, k , les paramètres suivants sont estimés :

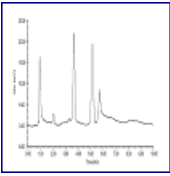
μ_k le biais du niveau

$S^2_{B, k}$ la variance inter-série du niveau

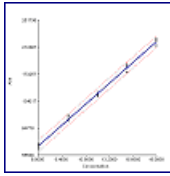
$S^2_{W, k}$ la variance intra-série du niveau

un niveau k (k varie de 1 à K) est composé de i séries (i varie de 1 à I) de j répétitions (j varie de 1 à J)

- **Dans notre étude : 3 niveaux (k varie de 1 à 3) composés chacun de 5 séries (5 plaques HPTLC, i varie de 1 à 5) de 3 répétitions (j varie de 1 à 3)**



Profil d'exactitude : Démarche SFSTP / NF V03-110



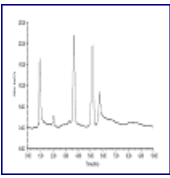
- Exprimé en échelle relative, cet intervalle est, pour un niveau k :

$$\bar{R}_{Z_k} \pm t_{\left(\nu; \frac{1+\beta}{2}\right)} \sqrt{1 + \frac{1}{I.J.B_k^2} CV_{F.I.,k}^2}$$

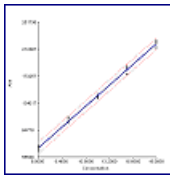
– Avec :

$$CV_{F.I.,k} \text{ provenant de } \hat{S}_{F.I.,k}^2 = \hat{S}_{W,k}^2 + \hat{S}_{B,k}^2$$

$$R_k = \frac{\hat{\sigma}_{B,k}^2}{\hat{\sigma}_{W,k}^2} \quad B_k = \sqrt{\frac{R_k + 1}{J.R_k + 1}}$$



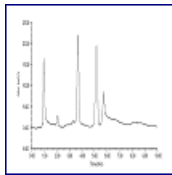
Profil d'exactitude : Démarche SFSTP / NF V03-110



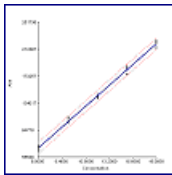
$t_{\left(\nu; \frac{1+\beta}{2}\right)}$ est le quantile de la distribution de Student à ν degrés de liberté :

$$\nu = \frac{(R_k + 1)^2}{\frac{\left(R_k + \frac{1}{J}\right)^2}{I-1} + \frac{1 - \frac{1}{J}}{IJ}}$$

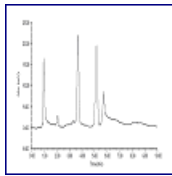
ν est rarement une valeur entière, si on ne dispose pas de tables utilisant les valeurs non entières de degrés de liberté on peut approcher la valeur du quantile par interpolation linéaire entre les deux valeurs de degrés de liberté entiers qui encadrent ν .



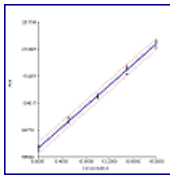
Profil d'exactitude : Démarche ISO-16269



- La norme ISO-16269 définit dans son chapitre 6 l'intervalle statistique de dispersion comme étant l'intervalle estimé, d'après un échantillon, pour lequel il est possible d'affirmer avec un niveau de confiance $1-\alpha$ (par exemple, 95 %) qu'il contient au moins une proportion donnée, p , d'individus de la population. Ses limites en sont les limites statistiques de dispersion.



Profil d'exactitude : Démarche ISO-16269



- Dans le cadre de la validation d'une méthode d'analyse :
 - n , le nombre d'observations dans un échantillon de référence.
 - p , la proportion minimale de la population déclarée comme se trouvant dans l'intervalle statistique de dispersion.
- L'écart type de l'échantillon peut être l'écart-type de fidélité intermédiaire du niveau de concentration ou bien tout simplement :

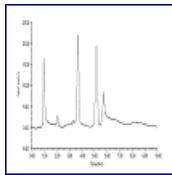
$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

- L'intervalle statistique de dispersion bilatéral avec un élargissement p à un niveau de confiance $1-\alpha$ a alors les limites :

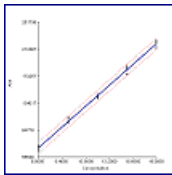
$$x_L = \bar{x} - k_{(n;p;1-\alpha)} \times S$$

$$x_U = \bar{x} + k_{(n;p;1-\alpha)} \times S$$

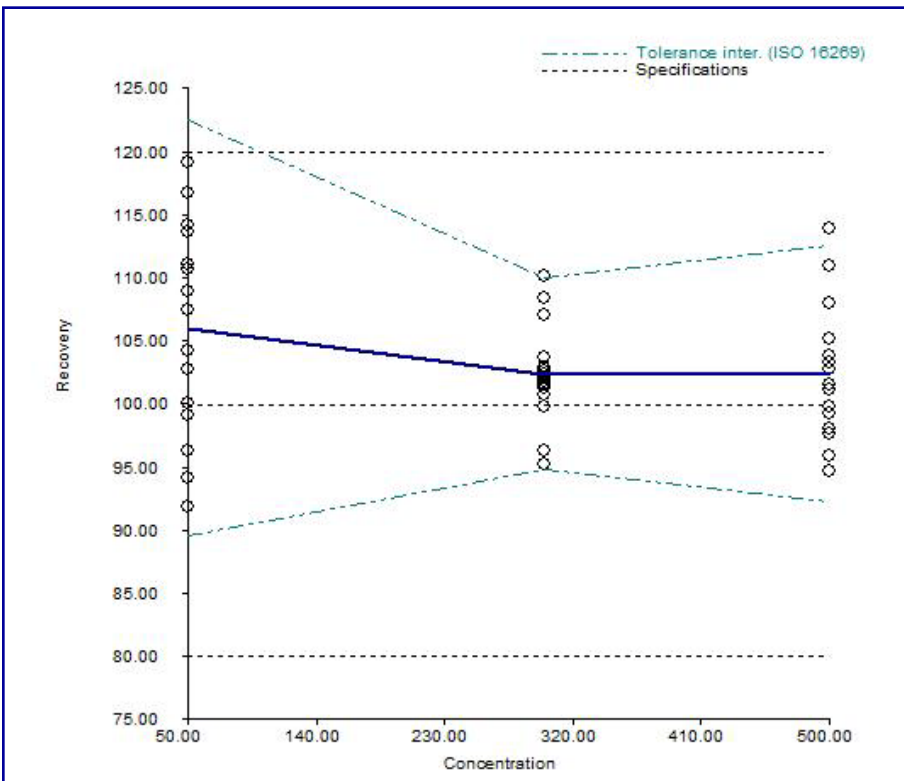
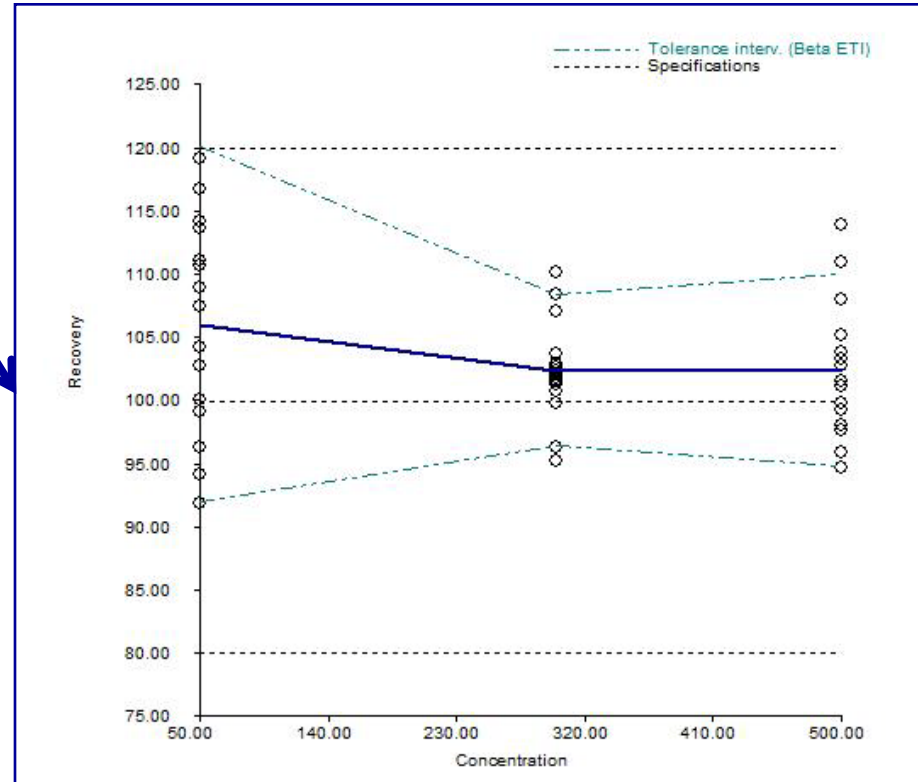
- k est le facteur d'élargissement donné par la norme en fonction de $1-\alpha$, de n et de p .



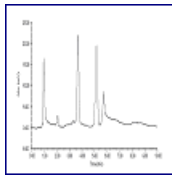
Profil d'exactitude : Matrice 1 : Yaourt



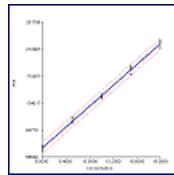
Profil d'exactitude selon
NF V03-110, calcul sur la
hauteur de pic



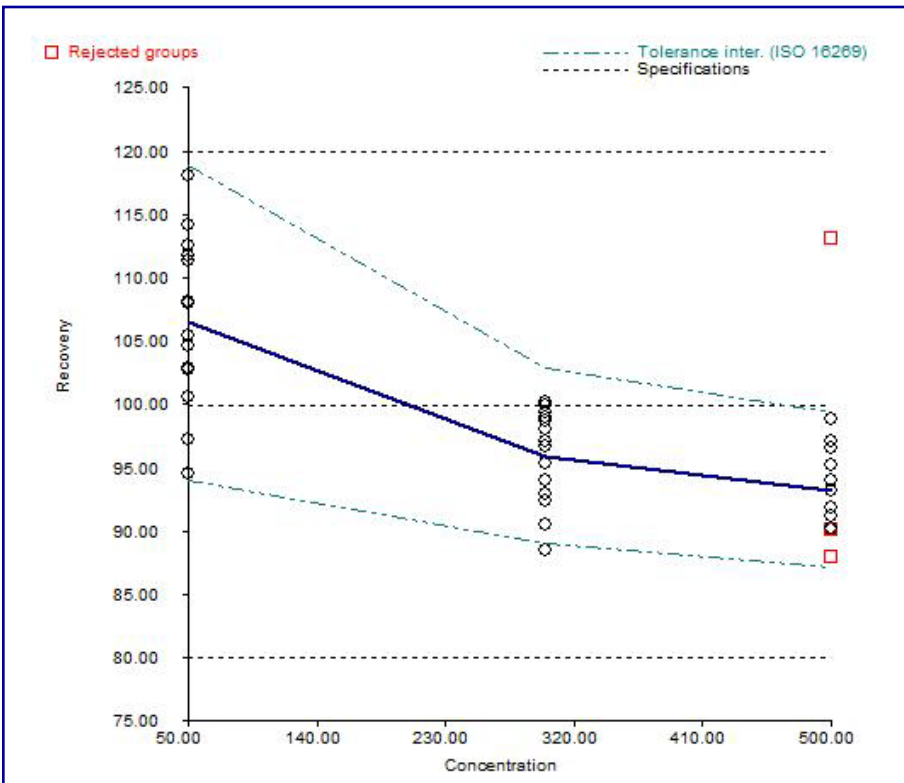
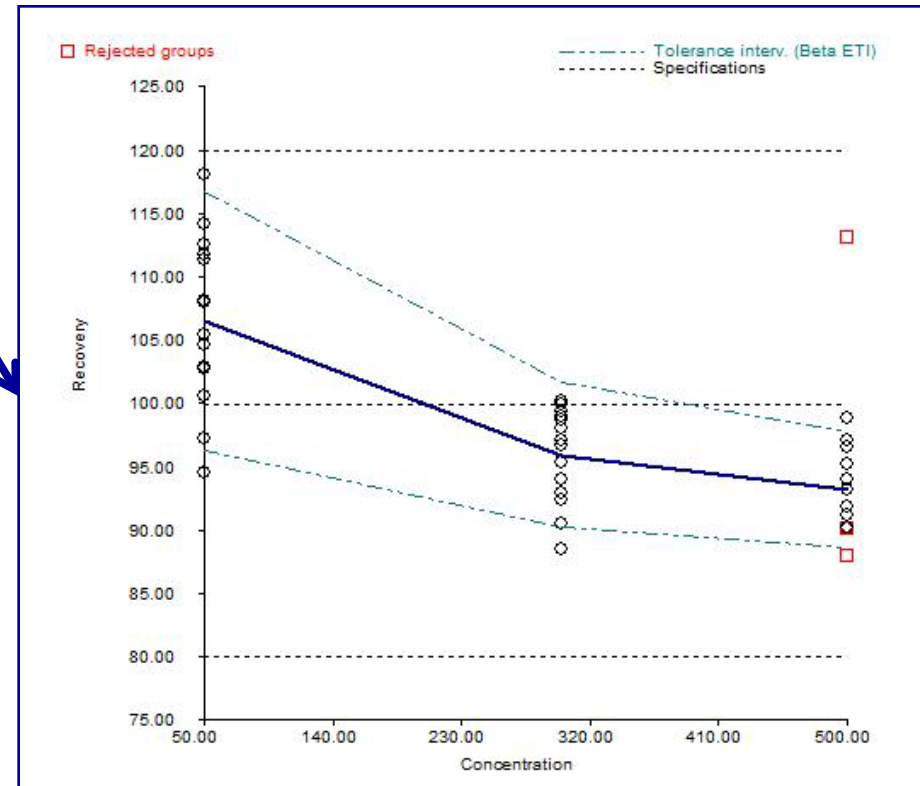
Profil d'exactitude selon
ISO 16269-6, calcul sur la
hauteur de pic



Profil d'exactitude : Matrice 1 : Yaourt

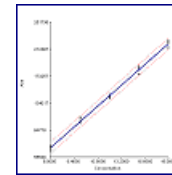
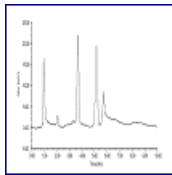


Profil d'exactitude selon
NF V03-110, calcul sur la
surface de pic

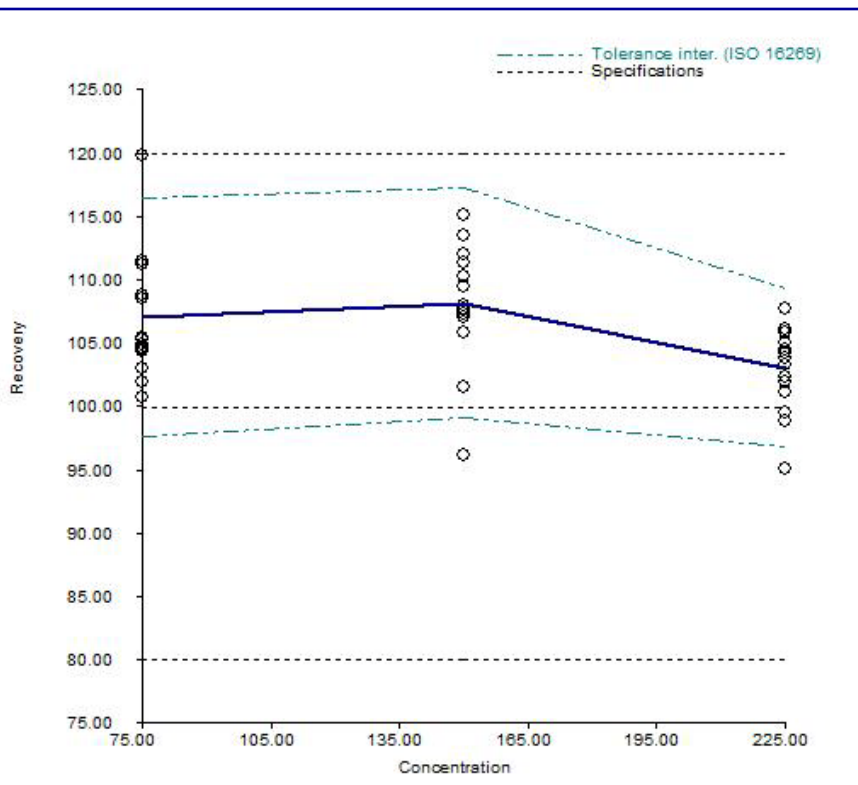
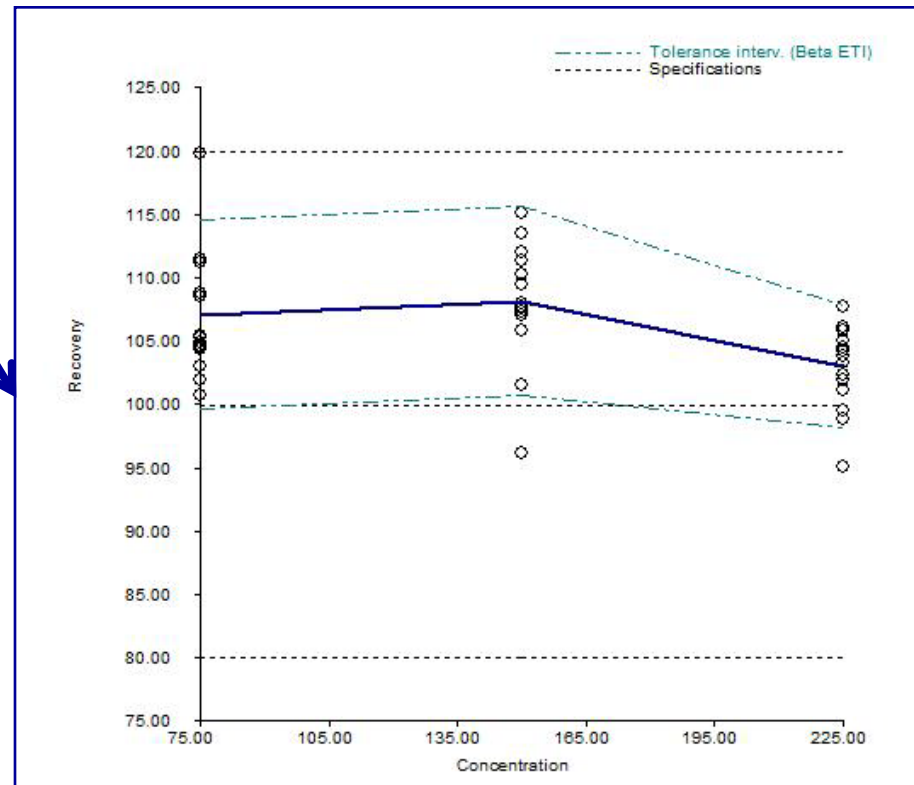


Profil d'exactitude selon
ISO 16269-6, calcul sur la
surface de pic

Profil d'exactitude : Matrice 2 : formulation

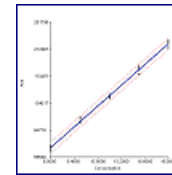
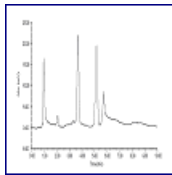


Profil d'exactitude selon
NF V03-110, calcul sur la
hauteur de pic

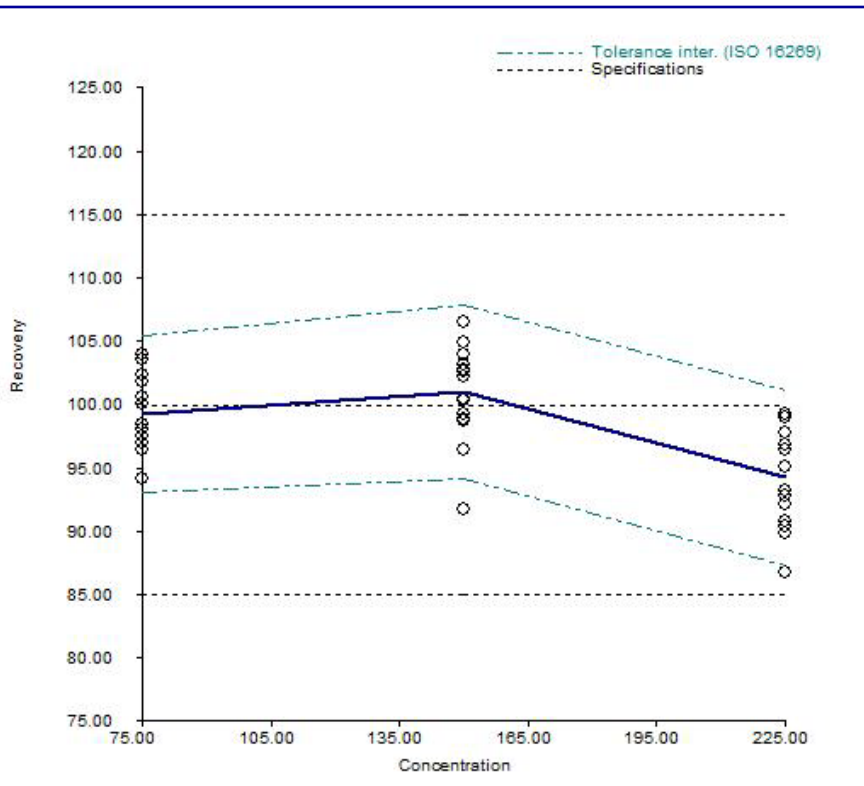
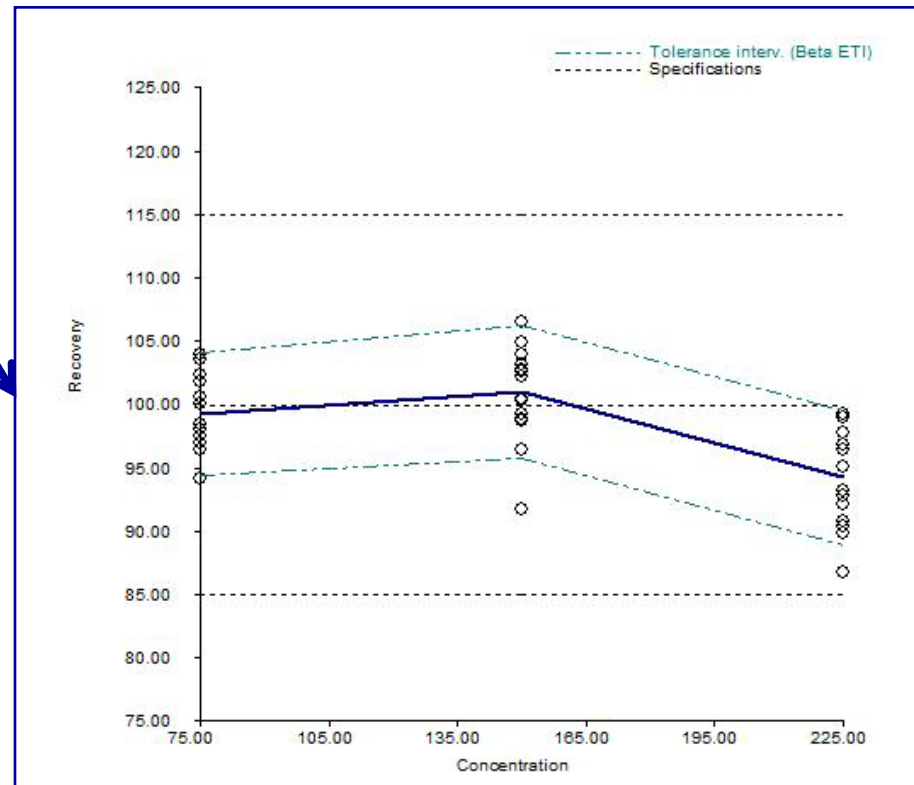


Profil d'exactitude selon
ISO 16269-6, calcul sur la
hauteur de pic

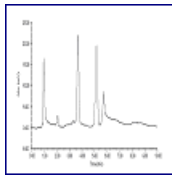
Profil d'exactitude : Matrice 2 : formulation



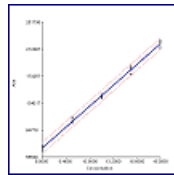
Profil d'exactitude selon
NF V03-110, calcul sur la
surface de pic



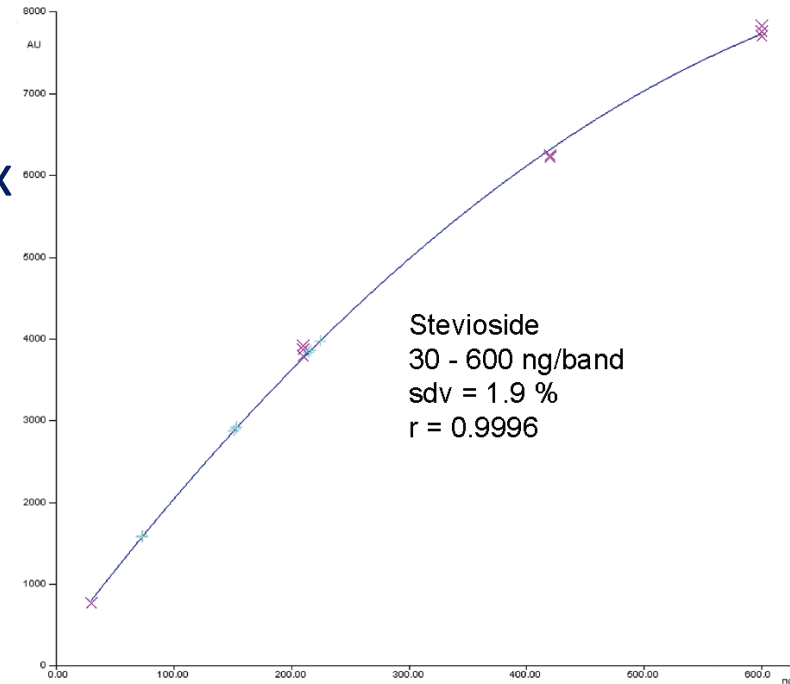
Profil d'exactitude selon
ISO 16269-6, calcul sur la
surface de pic

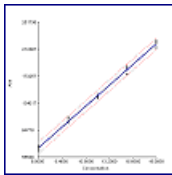
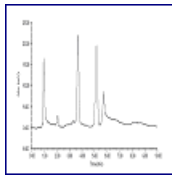


Conclusion



- Grande spécificité par la dérivation post chromatographique,
- Intervalle de mesure adapté aux produits alimentaires,
- Fidélité adéquate pour ce type de matrices,
- Tolérance sur les résultats adaptée aux faibles teneurs rencontrées dans les matrices alimentaires (0.02 à 0.2% en poids).

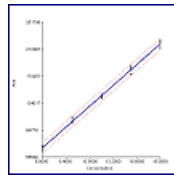
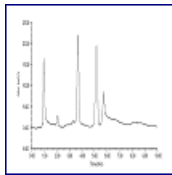




Conclusion

- Des perspectives intéressantes :
 - Adaptation de la méthode pour les matrices chargées en sucres, non analysables facilement par HPLC/UV
 - Modification de la phase mobile (acétate d'éthyle – méthanol – acide acétique (6:1:1, v/v/v))





Conclusion

- Et pour finir :
 - Des protocoles efficaces de validation des méthodes existent et sont, pour certains, normalisés,
 - Ces protocoles permettent de caractériser les performances des méthodes HPTLC

Qui peut encore dire que l'HPTLC n'est pas une technique quantitative ?

