



gembloux
faculté universitaire
des sciences agronomiques

Validation de méthodes analytiques

Une application classique

Stéphanie Heuskin, Bruno Godin

UNITE de CHIMIE ANALYTIQUE

Prof. Georges C. LOGNAY

Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux

Sommaire

- Introduction
- Objectif
- La validation
 - Matériel expérimental
 - Pureté
 - Optimisation de la méthode d'analyse chromatographique
 - Limite de détection – limite de quantification
 - Droites d'étalonnage : linéarité, justesse, robustesse
 - Fidélité : répétabilité, reproductibilité
 - Sélectivité
- Le recovery ou taux de recouvrement
- Performances analytiques de l'appareil

Introduction

Introduction

- **Validation classique la plus courante jusqu'à l'heure actuelle.**
- **Basée sur les normes VALIDANA (BPL – Beagx), ISO 5725 et AOAC 2006.**

Objectif

Objectif

Doser des sémiouchimiques dans diverses formulations (matrices) :

- Dosage de E- β -farnésène dans des huiles essentielles et dans des extraits de celles-ci.
- Détermination de taux de relargage de EBF au départ de billes d'alginate.
- Valider les techniques de mesure en vue d'application en routine.

Sémiochimiques

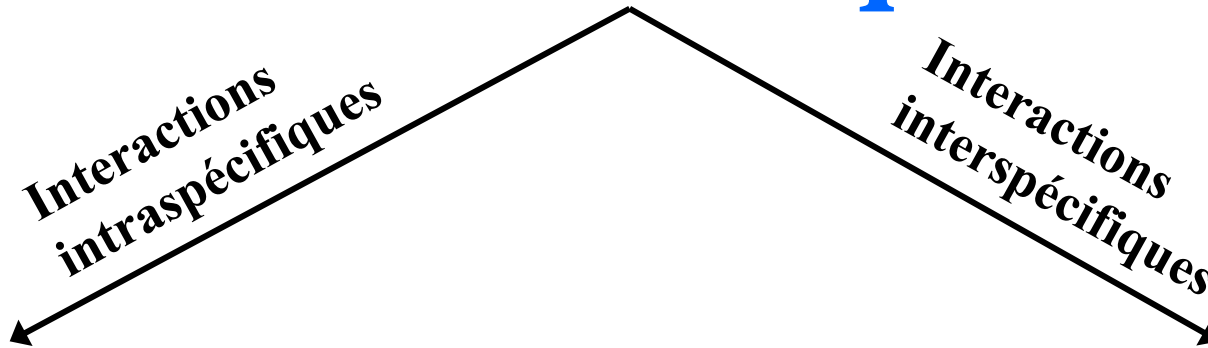
Définition : molécules naturelles produites par des organismes vivants et intervenant comme moyen de communication intra- ou interspécifique

(du grec *simeon* = signal)

→ molécules très diverses, volatiles ou non

→ stimuli émis par plantes et insectes

Sémiochimiques



Phéromones

- d'alarme
- sexuelles
- d'agrégation
- de piste

Substances allélochimiques

- Allomones : + émetteur
- Kairomones : + récepteur
- Synomones : + émetteur, + récepteur



Une même substance peut intervenir à la fois dans des interactions intra- et interspécifiques

Systeme tritrophique

Cas du puceron

Plante – Insecte phytophage

– Prédateur
– Parasitoïde



Vicia fabae



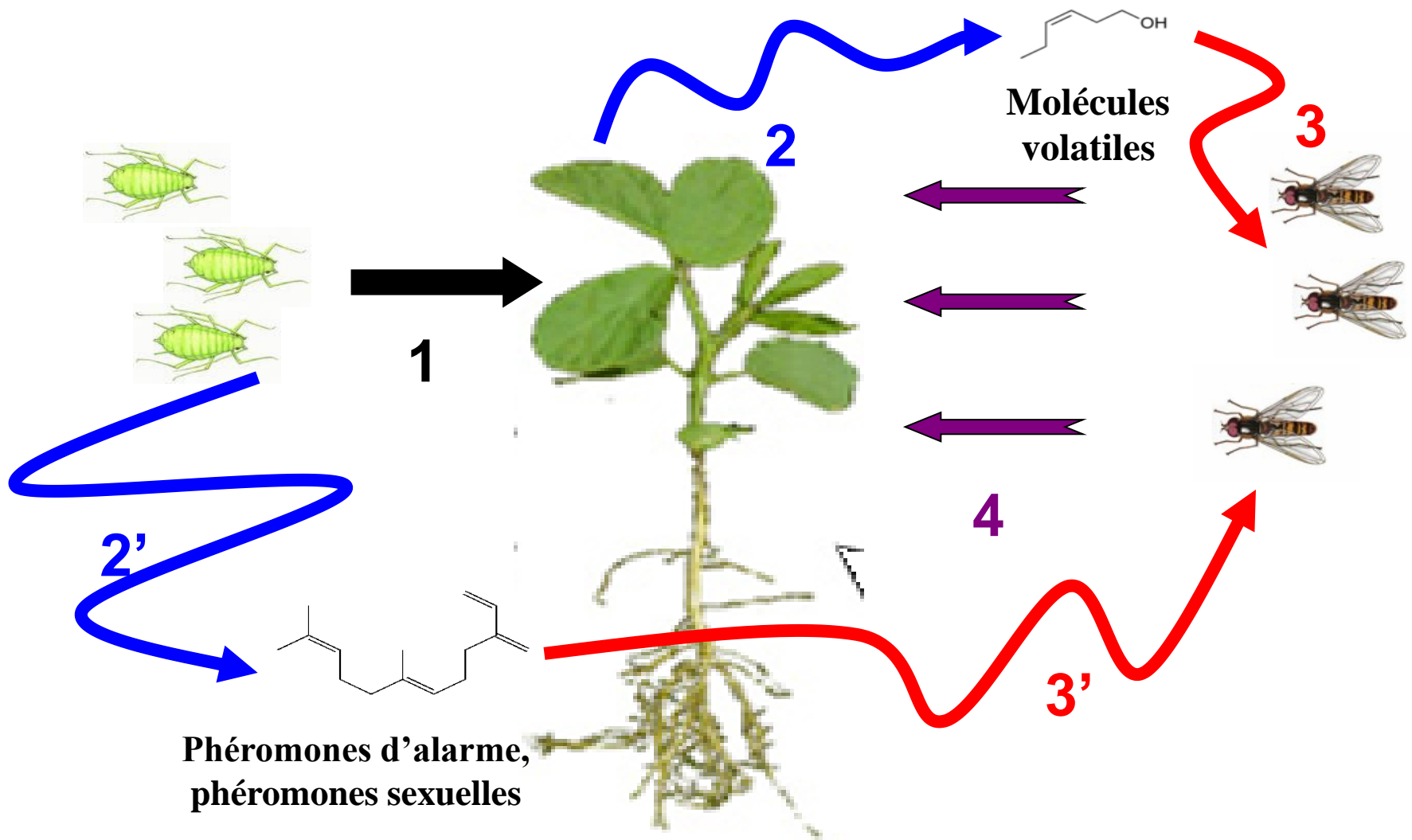
Megoura viciae



Larve d'*Episyrphus balteatus*



Aphidius ervi



La validation

Matériel expérimental

- **Substances de référence** : produits à doser
(E-β-farnésène, β-caryophyllène, limonène, α-pinène)
- **Standard (étalon) interne de référence** : attention au choix du SI
 - ➔ de préférence, même famille chimique que molécule à doser, de façon à obtenir un facteur de réponse proche de 1
$$F = (S_A \cdot C_{SI} / S_{SI} \cdot C_A)$$
 - ➔ SI sesquiterpènes : longifolène
 - ➔ SI monoterpènes : n-butyl-benzène

Pureté

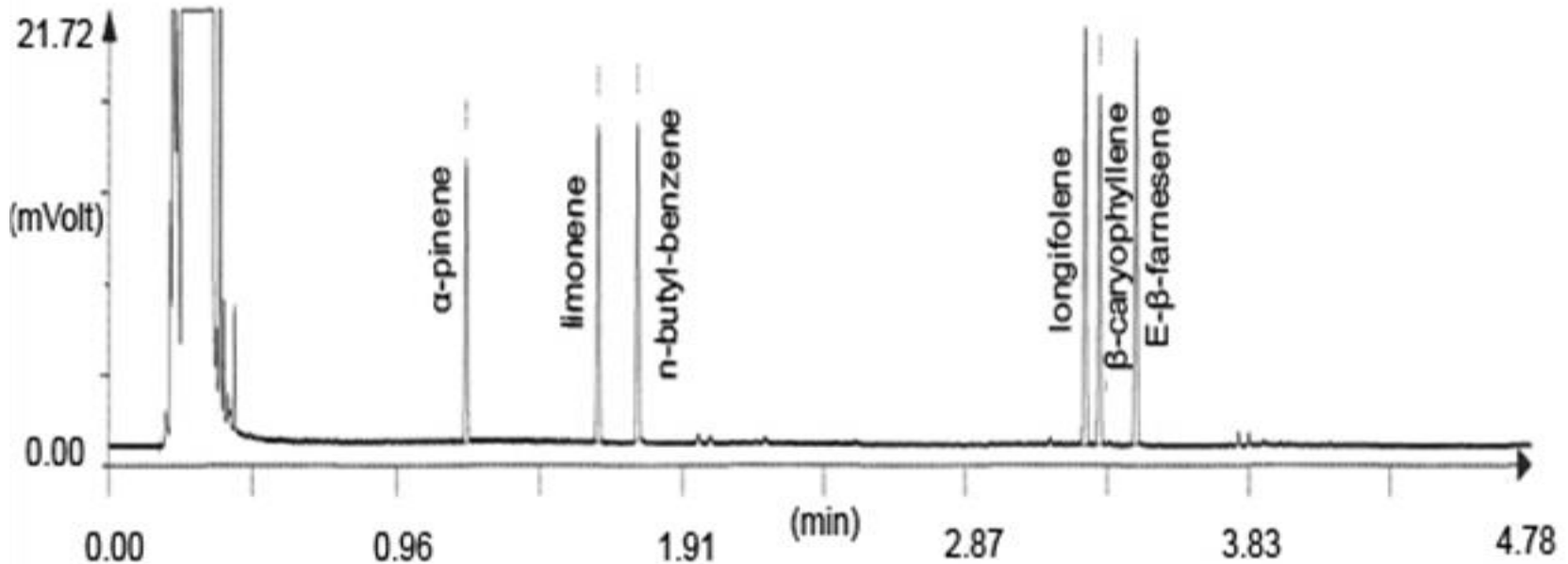
➤ Déterminer la pureté des composés de référence

- Analyse des solutions ($\sim 1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dans *n*-hexane) au GC Ultra Fast
- 3 répétitions

Compound	Mean purity (%)	SD	RSD (%)
E- β -farnesene	98.17	0.0009	0.10
β -caryophyllene	94.67	0.0071	0.75
Longifolene	98.01	0.0003	0.03
n-butyl-benzene	100.00	0.0000	0.00
Limonene	100.00	0.0000	0.00
α -pinene	100.00	0.0000	0.00

Optimisation de la méthode d'analyse chromatographique

➤ Optimiser la séparation et la résolution des pics



Limite de détection – limite de quantification

➤ **Limite de détection (LOD)** : définie selon le principe qu'une concentration est détectable si elle est plus grande que la dispersion du blanc. (*Chauveheid, 2007*)

$$LOD = f * s_0 ,$$

Avec : - $f = 3$

- s_0 , l'écart-type de répétabilité du blanc en concentration obtenu après 8 répétitions

➤ **Limite de quantification (LOQ) = 2 * LOD**

(*Chauveheid, 2007*)

Droites d'étalonnage

➤ **Pour chacune des substances à doser :**

- 2 gammes de concentrations (Range 1 : 0.008 – 0.100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$;
Range 2 : 0.080 – 1.000 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
- Pour chaque gamme :
 - * 5 concentrations + 1 blanco : [SI] la même pour toute [analyte]
 - * 3 répétitions d'analyse

Gamme de concentrations 1, de 0,008 à 0,100 µg/µl

	Concentration 0 (µg/µl)	Concentration 1 (µg/µl)	Concentration 2 (µg/µl)	Concentration 3 (µg/µl)	Concentration 4 (µg/µl)	Concentration 5 (µg/µl)
EBF	0,0000	0,0078	0,0245	0,0490	0,0784	0,0980
β-Caryophyllène	0,0000	0,0078	0,0242	0,0484	0,0775	0,0978
Longifolène (SI)	0,0000	0,0497	0,0497	0,0497	0,0497	0,0497
Limonène	0,0000	0,0083	0,0259	0,0517	0,0828	0,1035
α-pinène	0,0000	0,0085	0,0266	0,0531	0,0850	0,1063
n-butyl-benzène (SI)	0,0000	0,0534	0,0534	0,0534	0,0534	0,0534

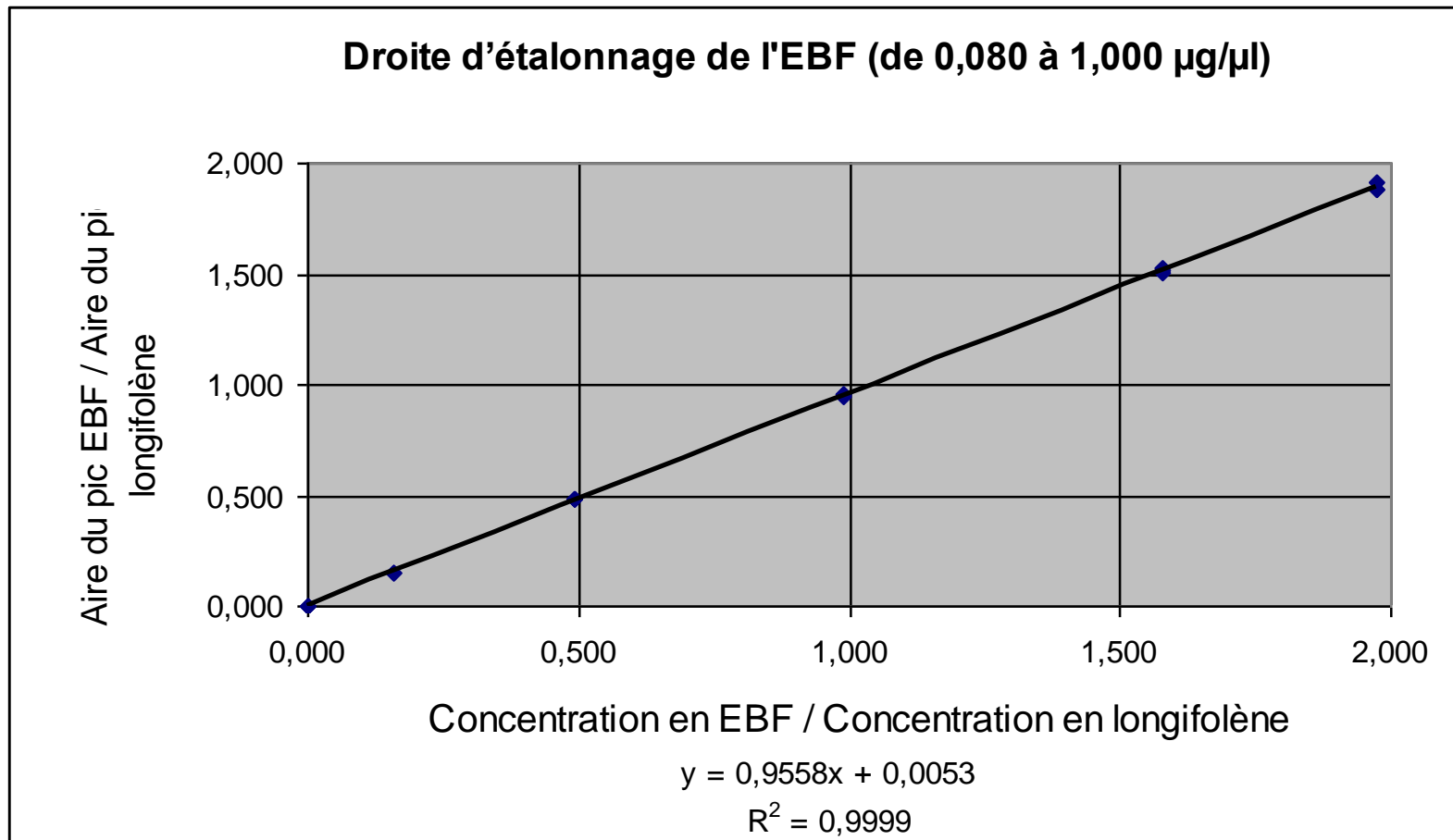
Gamme de concentrations 2, de 0,080 à 1,000 µg/µl

	Concentration 0 (µg/µl)	Concentration 1 (µg/µl)	Concentration 2 (µg/µl)	Concentration 3 (µg/µl)	Concentration 4 (µg/µl)	Concentration 5 (µg/µl)
EBF	0,0000	0,0784	0,2451	0,4901	0,7842	0,9803
β-Caryophyllène	0,0000	0,0775	0,2422	0,4845	0,7752	0,9775
Longifolène (SI)	0,0000	0,4966	0,4966	0,4966	0,4966	0,4966
Limonène	0,0000	0,0828	0,2586	0,5173	0,8276	1,0345
α-pinène	0,0000	0,5340	0,5340	0,5340	0,5340	0,5340
n-butyl-benzène (SI)	0,0000	0,5340	0,5340	0,5340	0,5340	0,5340

(Godin B., 2008)

Droites d'étalonnage

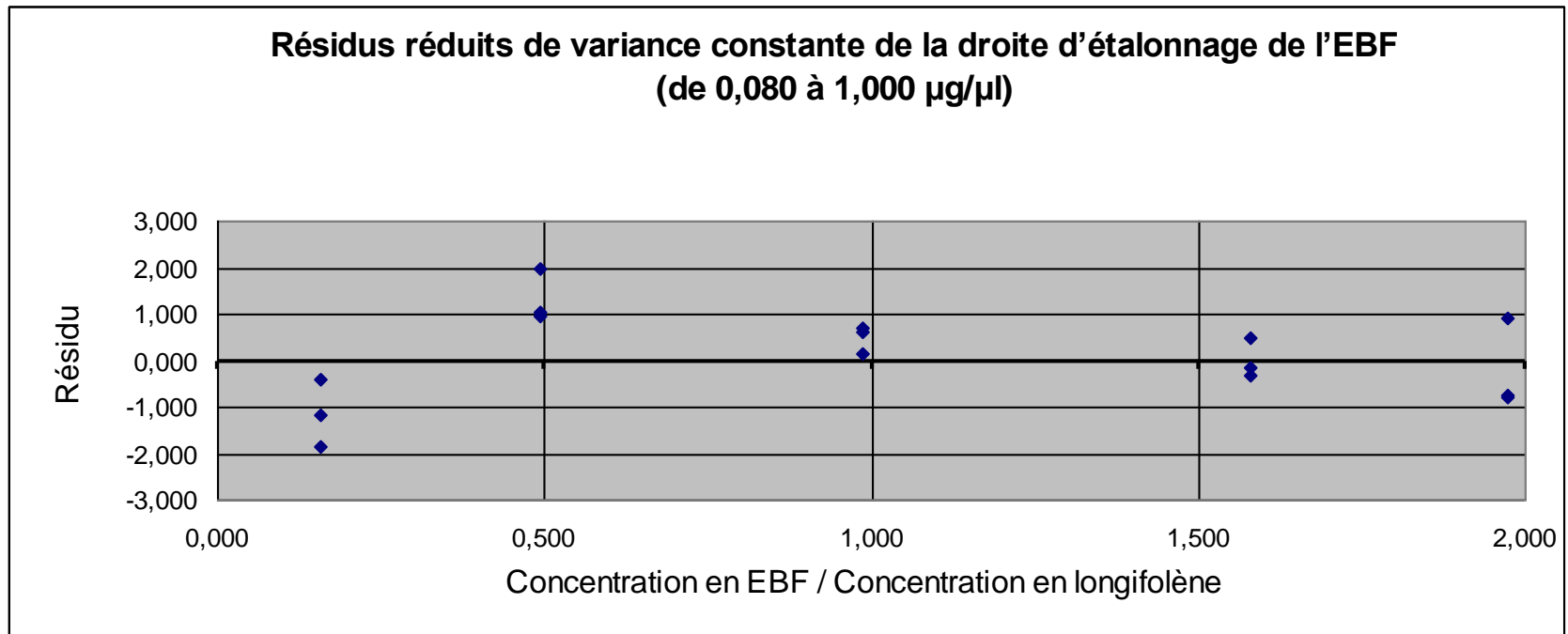
➤ **Droites d'étalonnage construites par régression linéaire au sens des moindres carrés**



Droites d'étalonnage

➤ **Linéarité** : satisfaisante si

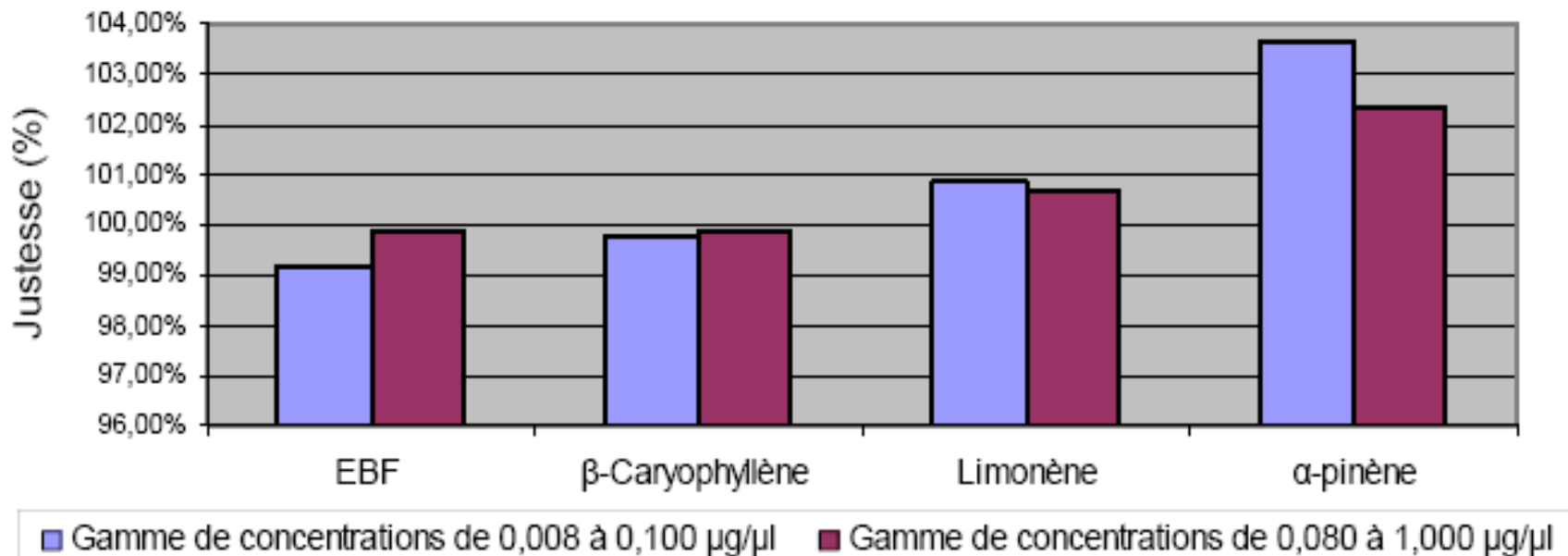
- $R^2 > 0.996$ (*Roland, 2002*)
- Test de Grubb : résidus réduits de variance constante < 2.754 en valeur absolue ($17DL : (3 \cdot 6pt) - 1; \alpha = 0.05$) (*Dagnelie, 2006*)



Droites d'étalonnage

➤ **Justesse (accuracy of calibration curve)** : définie comme le biais (%) entre la pente mesurée de la droite (construite ultérieurement) et la pente théorique de la droite validée.
Comprise entre 90 % et 110 % (*Roland, 2002*)

Justesse des pentes des droites d'étalonnage en fonction des composés et de la gamme de concentrations



Droites d'étalonnage

➤ **Justesse (accuracy of calibration curve) :**

En pratique :

- construire la droite d'étalonnage de référence (5[], 3 répétitions)
- préparer à nouveau 5 [] et les analyser → 5 valeurs de signal
- reporter ces valeurs de signal sur la droite de référence
→ 5 [] calculées
- Tracer une nouvelle droite avec ces 5 [] calculées
- Comparer la pente de la nouvelle droite avec celle de la droite de référence

Droites d'étalonnage

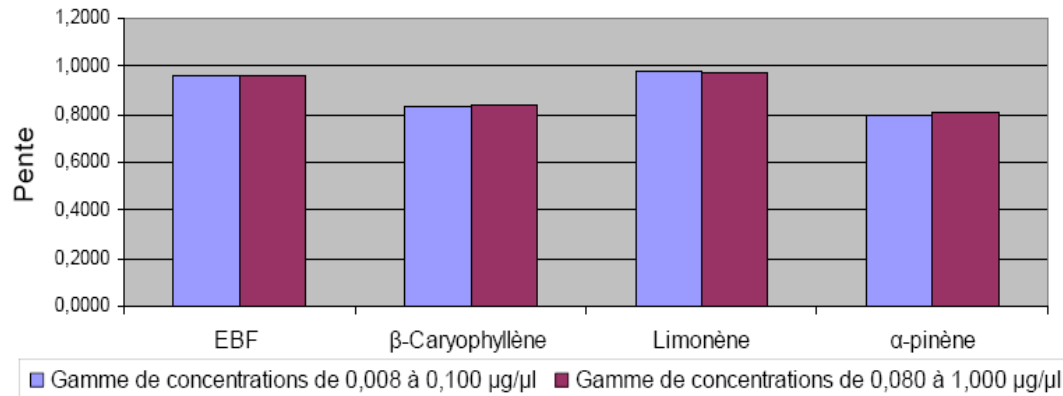
➤ **Robustesse** : estimée pour chaque analyte entre les deux gammes de concentrations par un test t de Student d'égalité des pentes et des ordonnées à l'origine (34 DL, $\alpha = 0,05$)

EBF							
Populations normales				p > 0,05			
Egalité des variances résiduelles	Fobs	1,247	Fthéo	2,768	Fobs ≤ Fthéo	α = 0,05	k ₁ =16, k ₂ =16
Egalité des pentes	tobs	0,840	tthéo	2,034	tobs ≤ tthéo	α = 0,05	dl = 32
Egalité des ordonnées à l'origine	tobs	1,789	tthéo	2,034	tobs ≤ tthéo	α = 0,05	dl = 32
β-Caryophyllène							
Populations normales				p > 0,05			
Egalité des variances résiduelles	Fobs	3,058	Fthéo	2,768	Fobs > Fthéo	α = 0,05	k ₁ =16, k ₂ =16
Egalité des pentes	tobs	0,512	tthéo	2,034	tobs ≤ tthéo	α = 0,05	dl = 32
Egalité des ordonnées à l'origine	tobs	0,457	tthéo	2,034	tobs ≤ tthéo	α = 0,05	dl = 32
Limonène							
Populations normales				p > 0,05			
Egalité des variances résiduelles	Fobs	2,754	Fthéo	2,768	Fobs ≤ Fthéo	α = 0,05	k ₁ =16, k ₂ =16
Egalité des pentes	tobs	0,126	tthéo	2,034	tobs ≤ tthéo	α = 0,05	dl = 32
Egalité des ordonnées à l'origine	tobs	0,116	tthéo	2,034	tobs ≤ tthéo	α = 0,05	dl = 32
α-pinène							
Populations normales				p > 0,05			
Egalité des variances résiduelles	Fobs	1,775	Fthéo	2,768	Fobs ≤ Fthéo	α = 0,05	k ₁ =16, k ₂ =16
Egalité des pentes	tobs	1,072	tthéo	2,034	tobs ≤ tthéo	α = 0,05	dl = 32
Egalité des ordonnées à l'origine	tobs	0,250	tthéo	2,034	tobs ≤ tthéo	α = 0,05	dl = 32

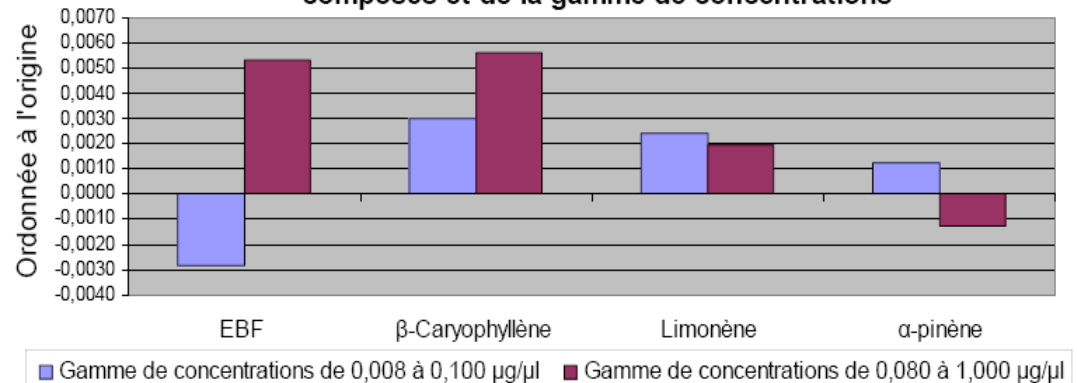
Droites d'étalonnage

Robustesse :

Pente des droites d'étalonnage en fonction des composés et de la gamme de concentrations



Ordonnée à l'origine des droites d'étalonnage en fonction des composés et de la gamme de concentrations



Droites d'étalonnage

	E-β-farnesene		β-caryophyllene	
Range (µg/µl)	0.008 – 0.100	0.080 – 1.000	0.008 – 0.100	0.080 – 1.000
Equation of calibration curve	$y = 0.9592x - 0.0028$	$y = 0.9558x + 0.0053$	$y = 0.8381x + 0.0030$	$y = 0.8408x + 0.0056$
R²	0.9998	0.9999	0.9998	0.9999
Reduced residual (Grubb's test)	2.668	1.866	2.147	1.880
Accuracy of calibration curve (%)	99.19	99.86	99.77	99.90
Internal standard	Longifolene	Longifolene	Longifolene	Longifolene
LOD (pg)	2.38	2.40	1.79	0.74
LOQ (pg)	4.76	4.80	3.58	1.48

Droites d'étalonnage

	Limonene		α -pinene	
Range ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	0.008 – 0.100	0.080 – 1.000	0.008 – 0.100	0.080 – 1.000
Equation of calibration curve	$y = 0.9767x + 0.0024$	$y = 0.9690x + 0.0019$	$y = 0.8004x + 0.0012$	$y = 0.8097x - 0.0013$
R²	0.9998	0.9999	0.9988	0.9993
Reduced residual (Grubb's test)	2.394	1.826	2.134	2.276
Accuracy of calibration curve (%)	100.85	100.67	103.65	102.36
Internal standard	n-butyl-benzene	n-butyl-benzene	n-butyl-benzene	n-butyl-benzene
LOD (pg)	2.43	1.37	2.11	2.05
LOQ (pg)	4.86	2.74	4.22	4.10

Fidélité

➤ **La fidélité** est définie par la répétabilité et la reproductibilité de la méthode.

➤ **Répétabilité:** pour chaque analyte et chaque gamme de concentration, 10 répétitions d'analyse d'un échantillon de concentration définie, le même jour, par une seule personne (n=10). (Range 1 : 0.05 µg/µl ; Range 2 : 0.50 µg/µl)

➤ **Reproductibilité:** pour chaque analyte et chaque gamme de concentration, 10 répétitions d'analyse d'un échantillon de concentration définie, pendant 5 jours différents, par une seule personne (n=50). (Range 1 : 0.05 µg/µl ; Range 2 : 0.50 µg/µl)

Fidélité

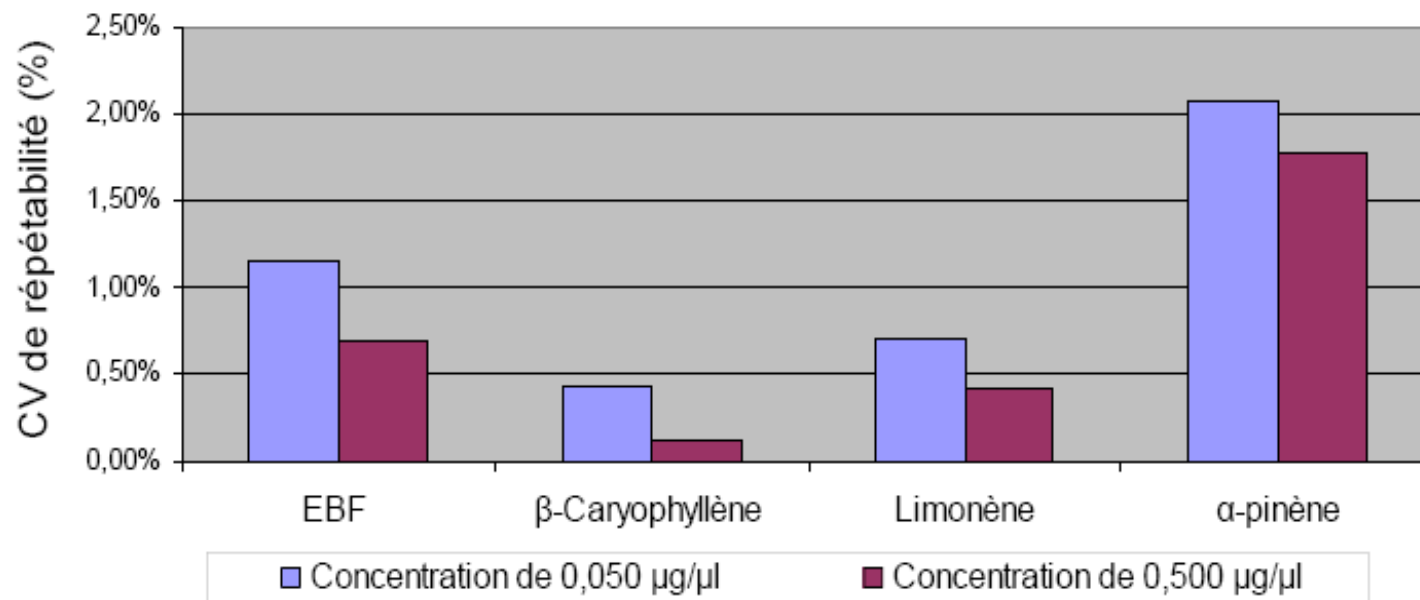
➤ **Les valeurs limites** acceptables des coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité dépendent de la concentration des solutions analysées.

Selon la norme AOAC (2006) :

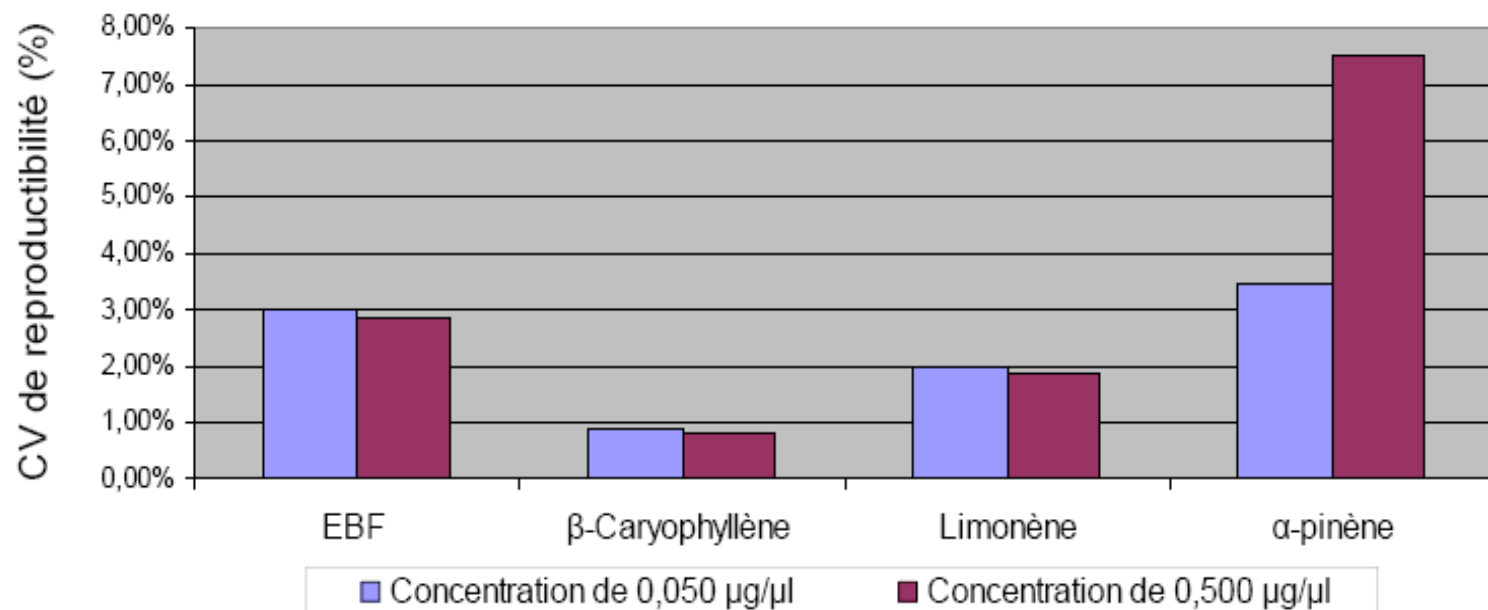
- Range 1 : $CV_{\text{répétabilité}}$: 8% ; $CV_{\text{reproductibilité}}$: 16%
- Range 2 : $CV_{\text{répétabilité}}$: 6% ; $CV_{\text{reproductibilité}}$: 12%

	E-β-farnesene		β-caryophyllene		Limonene		α-pinene	
Concentration (µg/µl)	0.050	0.500	0.050	0.500	0.050	0.500	0.050	0.500
Repeatability (RSD, %)	1.16	0.70	0.43	0.12	0.70	0.42	2.07	1.78
Reproducibility (RSD, %)	3.00	2.82	0.89	0.81	1.98	1.89	3.48	7.51

Répétabilité en fonction des composés et de la concentration



Reproductibilité en fonction des composés et de la concentration



Sélectivité

➤ **La sélectivité** de la méthode est définie par le facteur de sélectivité (α) entre les pics chromatographiques les plus proches (longifolène et β -caryophyllène)

Pour que la méthode soit sélective, α doit être supérieur à 1.

$$\alpha = (t'_{R \beta\text{-caryophyllène}} / t'_{R \text{Longifolène}}),$$

où t'_{R} = temps de rétention réduit

	Concentration range : 0.008 – 0.100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Concentration range : 0.080 – 1.000 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
α	1.016	1.016

Le recovery ou taux de recouvrement

Recovery

➤ **Le recovery ou taux de recouvrement (%)** se définit comme le pourcentage d'analyte récupéré après toute manipulation de celui-ci. Le taux de récupération limite est fonction de la concentration (AOAC, 2006).

Concentration	Recovery limits
100 %	98-101%
10 %	95-102%
1 %	92-105%
1000 µg/g (ppm)	90-108%
100 µg/g (ppm)	85-110%
10 µg/g (ppm)	80-115%
1 µg/g	75-120%
10 µg/kg (ppb)	70-125%

Recovery


➤ Taux de récupération du E- β -farnésène sur cartouches d'adsorbant

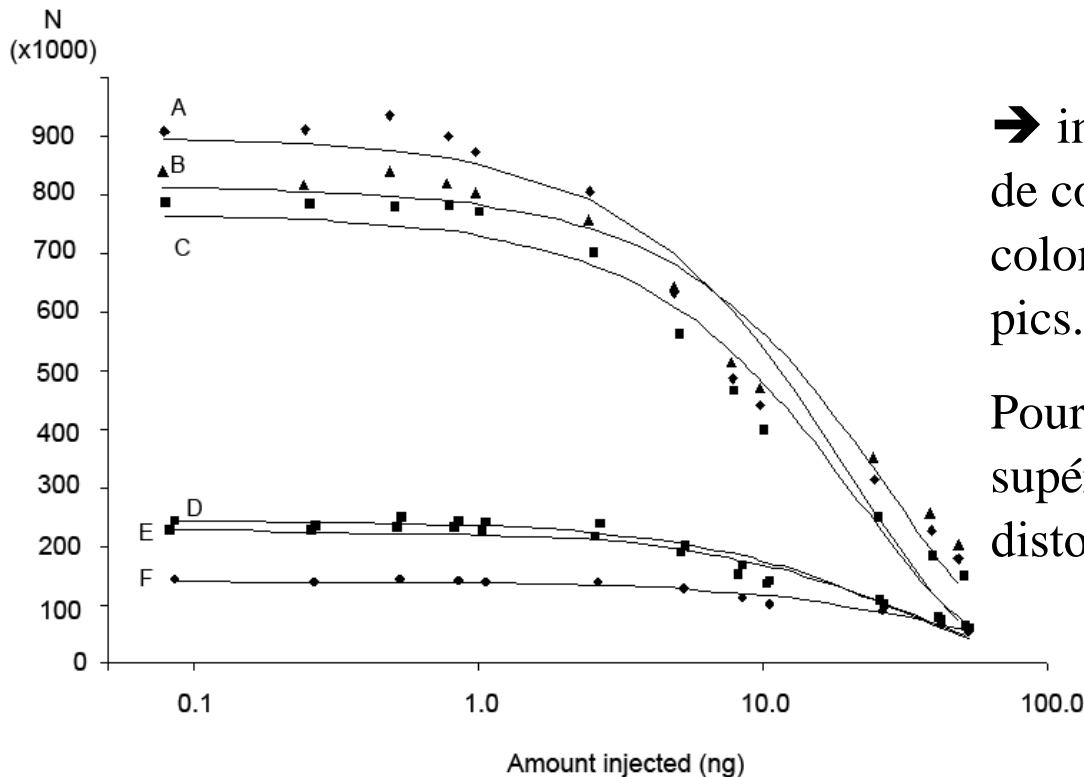
- 3 quantités testées (1;5 et 14 μ g) : 10 μ l de solution déposés sur une cartouche ; 5 répétitions par quantité
- Elution des cartouches au *n*-hexane (500; 700 et 900 μ l)
- Ajout de SI longifolène à l'éluat
- Analyse et quantification de la quantité récupérée dans l'éluat grâce à la droite d'étalonnage
- Détermination du recovery (%) :

$$R(\%) = (Q_f / Q_i) * 100$$

Les performances analytiques de l'appareil

Performances analytiques


Nombre de plateaux théoriques en fonction de la quantité de composé injectée sur la colonne (Ultra Fast Module)




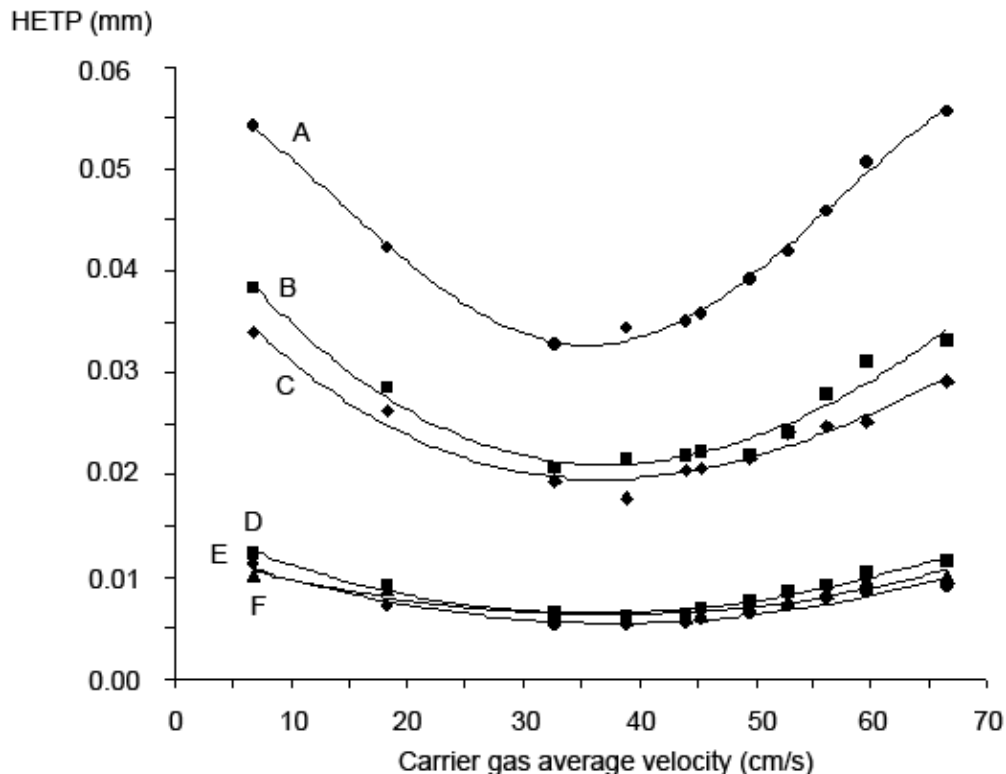
→ indication sur la quantité maximale de composé pouvant être injectée sur la colonne sans affecter la résolution des pics.

Pour les sesquiterpènes, une quantité supérieure à 1 ng engendre une distorsion des pics (“fronting”)

A : E- β -farnésène, B : β -caryophyllène, C : Longifolène,
 D : n-butyl-benzène, E : Limonène, F : α -pinène

Performances analytiques


Courbes de Golay : évolution de la hauteur d'un plateau théorique en fonction de la vitesse du gaz vecteur



La hauteur optimale d'un plateau théorique correspond à la valeur minimale de H sur la courbe : H_{min} .

H_{min} pour les mono- et les sesquiterpènes est obtenue à une vitesse du gaz vecteur de 35.86 cm/s.

A : α -pinène, B : Limonène, C : n-butyl-benzène, D : longifolène,
 E : β -caryophyllène, F : E- β -farnésène

Questions?