

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE
Union - Discipline - Travail

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR,
DE LA RECHERCHE ET DE L'INNOVATION TECHNOLOGIQUE



U.F.R. SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

ANNEE 1998 - 1999

N°

MEMOIRE

Pour le
Diplôme d'Etudes Supérieures Spécialisées (D.E.S.S.)
de contrôle de qualité

*Validation d'une méthode d'analyse
de la vitamine B₂ ou riboflavine par
chromatographie liquide haute performance*

Présenté par
Dr BONY François Nicaise
*Pharmacien
Ancien Interne des Hôpitaux*

Responsable du D.E.S.S.

Professeur agrégé MALAN KLA Anglade

Directeur de Mémoire

Professeur agrégé MALAN KLA Anglade

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	1
AVANT-PROPOS.....	2
INTRODUCTION	3

PREMIERE PARTIE : *GENERALITES*

I. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE.....	5
I-1. <i>Principe</i>	5
I-2 <i>Grandeurs fondamentales et données théoriques</i>	6
II. VALIDATION D'UNE METHODE D'ANALYSE.....	13
II-1. <i>Définition</i>	13
II-2 <i>Critères de validation</i>	13

DEUXIEME PARTIE : *NOTRE TRAVAIL*

I. MATERIEL.....	16
I-1. <i>Echantillonnage</i>	16
I-2. <i>Réactifs</i>	16
I-3. <i>Préparation des solutions</i>	17
I-4. <i>Chromatographe liquide haute performance</i>	18
II. METHODE D'ANALYSE.....	19
II-1. <i>Protocole d'extraction</i>	19
II-2. <i>Protocole de dosage</i>	20
III. VALIDATION DE LA METHODE D'ANALYSE.....	21
III-1. <i>Spécificité</i>	21
III-2. <i>Linéarité</i>	23
III-3. <i>Répétabilité</i>	23
III-4. <i>Exactitude</i>	23
III-5. <i>Limite de détection</i>	23
IV. RESULTATS ET DISCUSSION.....	24
IV-1. <i>Résultats</i>	24
IV.2. <i>Discussion</i>	31

CONCLUSION	34
-------------------------	----

BIBLIOGRAPHIE	35
----------------------------	----

REMERCIEMENTS

Au terme de notre stage au laboratoire de contrôle de qualité des aliments, médicaments et produits cosmétiques à l'U.F.R. des sciences pharmaceutiques et biologiques d'Abidjan Cocody, nous exprimons nos sincères remerciements à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réussite de ce stage.

Nos remerciements sont particulièrement accentués à l'endroit du Professeur agrégé MALAN KLA Anglade.

Professeur MALAN, votre disponibilité, votre cordialité et vos commentaires nous ont été d'un précieux concours au cours de notre stage de formation. Soyez assuré de notre respectueuse et profonde gratitude.

Mes sincères remerciements et ma reconnaissance s'adressent également :

- Au Docteur AKE Michèle (Assistant universitaire) dont les conseils et la disponibilité nous ont été très précieux tout au long de notre stage pratique et aussi pour la réalisation de notre mémoire.

- à Clémentine, à Vincent, et à tout le personnel du SYFED

- Au Personnel du département de Chimie Analytique, Bromatologie, toxicologie de l'U.F.R. des sciences Pharmaceutiques et biologiques

AVANT - PROPOS

Dans le but d'avoir des compétences en matière de contrôle de la qualité un Diplôme d'Etudes Supérieures Spécialisées (D.E.S.S.) de contrôle de qualité est créé à l'Unité de Formation et de Recherche (U..F.R.) des sciences pharmaceutiques et biologiques de l'université d'Abidjan Cocody.

La qualité peut être définie comme un ensemble de propriétés et caractéristiques d'un produit ou service qui lui confère l'aptitude à satisfaire un emploi prévu ou à satisfaire les besoins exprimés ou implicites.

En vue de l'obtention du D.E.S.S. de contrôle de qualité, nous avons effectué un stage pratique au laboratoire de contrôle de qualité des aliments, médicaments et produits cosmétiques à l'U..F.R. des sciences pharmaceutiques et biologiques d'Abidjan Cocody ; Ce laboratoire est supervisé par les Professeurs : ATINDEHOU Eugène, MALAN KLA Anglade, YOLOU Séry, et le Docteur AKE KOUAME Michèle (Assistant universitaire).

Le thème qui a retenu notre attention au cours de notre stage pratique porte sur *la validation d'une méthode d'analyse de la vitamine B₂ ou riboflavine par chromatographie liquide haute performance.*

INTRODUCTION

Les Responsables des laboratoires d'analyse et de contrôle doivent être préoccupés par la mise en place d'une politique efficace de contrôle de qualité en préconisant des mesures qui portent sur la validation des méthodes d'analyse, le renforcement permanent des calibrations et la garantie de fiabilité des résultats analytiques.

Les mesures portant sur la validation d'une méthode d'analyse de la vitamine B₂ ou riboflavine qui est le sujet de notre mémoire ont retenu notre attention.

La validation est une opération de contrôle destinée à démontrer que tout protocole, procédé ou procédure, système ou mécanisme utilisé pour la fabrication et pour le contrôle conduit aux résultats attendus.

Une bonne maîtrise de l'apport nutritionnel en vitamine et en particulier la vitamine B₂ qui sont des nutriments indispensables au développement, à l'entretien et au fonctionnement de l'organisme, nécessite la détermination de leur teneur dans les principaux aliments par des méthodes d'analyse précises, telle que la Chromatographie Liquide Haute Performance.

Notre étude se propose après quelques généralités sur les principes généraux de la Chromatographie Liquide Haute Performance et sur les paramètres de validation :

- De valider une méthode d'analyse de la vitamine B₂ dans les aliments par Chromatographie Liquide Haute Performance ;
- D'appliquer la méthode au dosage de la vitamine B₂ dans trois marques de farines industrielles destinées à l'alimentation des nourrissons.



PREMIERE PARTIE :
GENERALITES

I. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE **PERFORMANCE (C.L.H.P.)**

Les techniques chromatographiques dont l'origine remonte à 1903 à la suite des travaux du Botaniste russe TSWETT sont universellement employées au laboratoire et dans l'industrie, aussi bien pour l'analyse proprement dite que pour la préparation et la purification de constituants.

Les progrès récents ne portant que sur une amélioration de la rapidité et la spécificité des techniques ont abouti à la mise au point de la chromatographie liquide haute performance (CLHP) (6).

I-1. PRINCIPE

La *chromatographie* est une méthode d'analyse immédiate qui permet la séparation des constituants d'un mélange par leur migration différentielle sous l'influence du déplacement d'un fluide (phase mobile) sur un milieu poreux doué de propriétés d'adsorption, de partage, d'affinité, de filtration ou d'échange (phase stationnaire).

La *Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)* est une technique de Chromatographie Liquide sur colonne utilisant des phases stationnaires de fine granulométrie (améliorant la résolution) et des pompes capables de distribuer la phase mobile sous pression élevée sur la colonne (augmentant les vitesses d'élution et réduisant les temps d'analyse) (7, 9).

I-2. GRANDEURS FONDAMENTALES ET DONNEES THEORIQUES

Une bonne qualité de l'analyse chromatographique est obtenue si (6) :

- ❖ Les constituants à séparer ont des affinités différentes pour la phase stationnaire ;
- ❖ Les pics d'élution sont bien séparés, symétriques et gaussiens ;
- ❖ L'analyse est rapide.

I-2-1. COEFFICIENT DE DISTRIBUTION ENTRE DEUX PHASES

Dans toute méthode chromatographique, les séparations sont fondées sur la différence de distribution des espèces entre deux phases non miscibles (phase stationnaire et phase mobile).

Pour un système chromatographique donné, on caractérise la distribution de chaque soluté par le coefficient de distribution (ou coefficient de partage) (K) définie par la relation (6, 7, 9) :

$$K = \frac{C_S}{C_M}$$

- C_S et C_M désignent respectivement les concentrations du soluté à l'équilibre dans les phases stationnaire et mobile.

**I-2-2. GRANDEUR DE RETENTION ET D'AFFINITE DU SOLUTE POUR
LA PHASE STATIONNAIRE (6, 7, 9)**

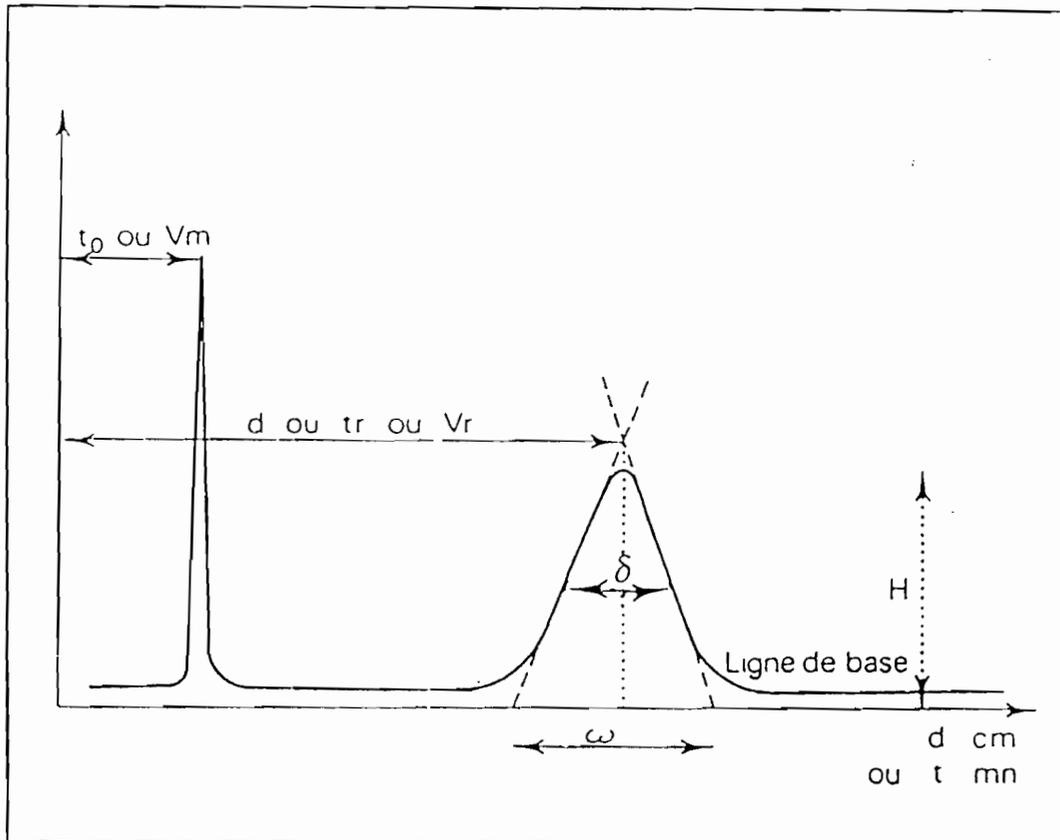


Figure 1: Chromatogramme illustrant les définitions (7)

d : distance entre le début de la chromatographie et le maximum du pic.

δ : largeur du pic à mi-hauteur

H : hauteur du pic.

Tr : Temps de rétention

To : Temps d'éluion de la phase mobile contenu dans la colonne (volume mort)

Vm : Volume de la phase mobile contenu dans la colonne

Vr : Volume de rétention

ω : largeur de pic à la base ;

- Le *temps de rétention* (t_R) est le temps d'élution au sommet du pic mesuré depuis l'injection de l'échantillon ;

- Le *volume de rétention* (v_R) est le volume de phase mobile nécessaire pour éluer le soluté de la colonne.

- Le *temps* (t_0) correspond au temps d'élution du volume de la phase mobile (V_M) contenu dans la colonne entre celle-ci et le détecteur (volume mort)

- Le *facteur de capacité* (K') caractérise la rétention d'une substance est défini par le rapport des quantités de soluté dans les phases stationnaire et mobile :

$$K' = \frac{C_S \cdot V_S}{C_M \cdot V_M} = K \frac{V_S}{V_M}$$

- C_S, C_M : concentration du soluté dans les phases stationnaire et mobile

- V_S, V_M : volume des phases stationnaire et mobile

- K : coefficient de partage.

Le facteur de capacité (K') peut être relié au temps de rétention (t_R) par la relation :

$$t_R = t_0 (1 + K') =$$

$$K' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Le temps de rétention et le volume de rétention sont des grandeurs caractéristiques d'un soluté pour un système chromatographique donné et servent comme moyen d'identification en analyse qualitative.

Aussi la durée d'une analyse peut être modifiée en intervenant sur les paramètres que sont la longueur de la colonne, le débit de la phase mobile et le facteur de capacité par le choix des différentes phases.

Une meilleure rétention des solutés est obtenue en chromatographie liquide pour le facteur de capacité (K') compris entre 2 et 5 (6, 7, 9).

I-2-3. GRANDEURS DE SEPARATION

❖ *Sélectivité d'une colonne (6, 7, 9)*

Le facteur de *sélectivité* (α) caractérise la distance séparant les sommets de deux pics successifs et il est défini par la relation:

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} = \frac{K'_2}{K'_1}$$

- $t_{R1} = t_R$ du composé le moins retenu

- $t_{R2} = t_R$ du composé le plus retenu

Pour avoir une bonne séparation il faut $\alpha > 1$.

❖ *Efficacité d'une colonne (6, 7, 9)*

L'*efficacité* d'une colonne dépend de l'élargissement des pics chromatographiques obtenus.

Par analogie aux phénomènes de distillation ou d'extraction, on exprime l'efficacité d'une colonne par son nombre de plateaux théoriques (N) calculé par la relation :

$$N = 16 \left(\frac{d}{w} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{d}{\delta} \right)^2$$

Ayant calculé (N) et connaissant d'autre part la longueur (L) de la colonne, on déduit la hauteur équivalente à un plateau théorique (H.E.P.T):

$$\text{HEPT} = \frac{L}{N} = h$$

Une colonne est d'autant plus efficace que le nombre de plateaux est plus grand et que, par conséquent, la HEPT est plus faible.

I-2-4. GRANDEURS DE RESOLUTION

La *résolution* (R_S) est le facteur qui indique le degré de séparation entre deux pics chromatographiques voisins (6, 7, 9).

Le degré de résolution (R_S) dépend de deux grandeurs :

- la distance séparant les sommets des deux pics;
- la largeur de chacun des pics.

$$R_S = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_2 + w_1}$$

$R_S \geq 1$, les pics sont séparés

$R_S < 1$ les pics se chevauchent

On démontre que:

$$R_S = \frac{1}{4} (\alpha - 1 / \alpha) \cdot (K'_2 / 1 + K'_2) \cdot N_2^{1/2}$$

N_2 : composé le plus retenu

La résolution apparaît donc influencée par α (sélectivité), par K'_1 et K'_2 (facteurs de capacité) et par N (nombre de plateaux théoriques).

I-3. APPAREILLAGE

La figure 4 représente le schéma du principe d'un chromatographe liquide haute performance. Il comprend essentiellement (7) :

- un ou plusieurs réservoirs de phase mobile;
- un système de pompe;
- un système d'introduction des échantillons (système d'injection);
- un système de détection et d'enregistrement.

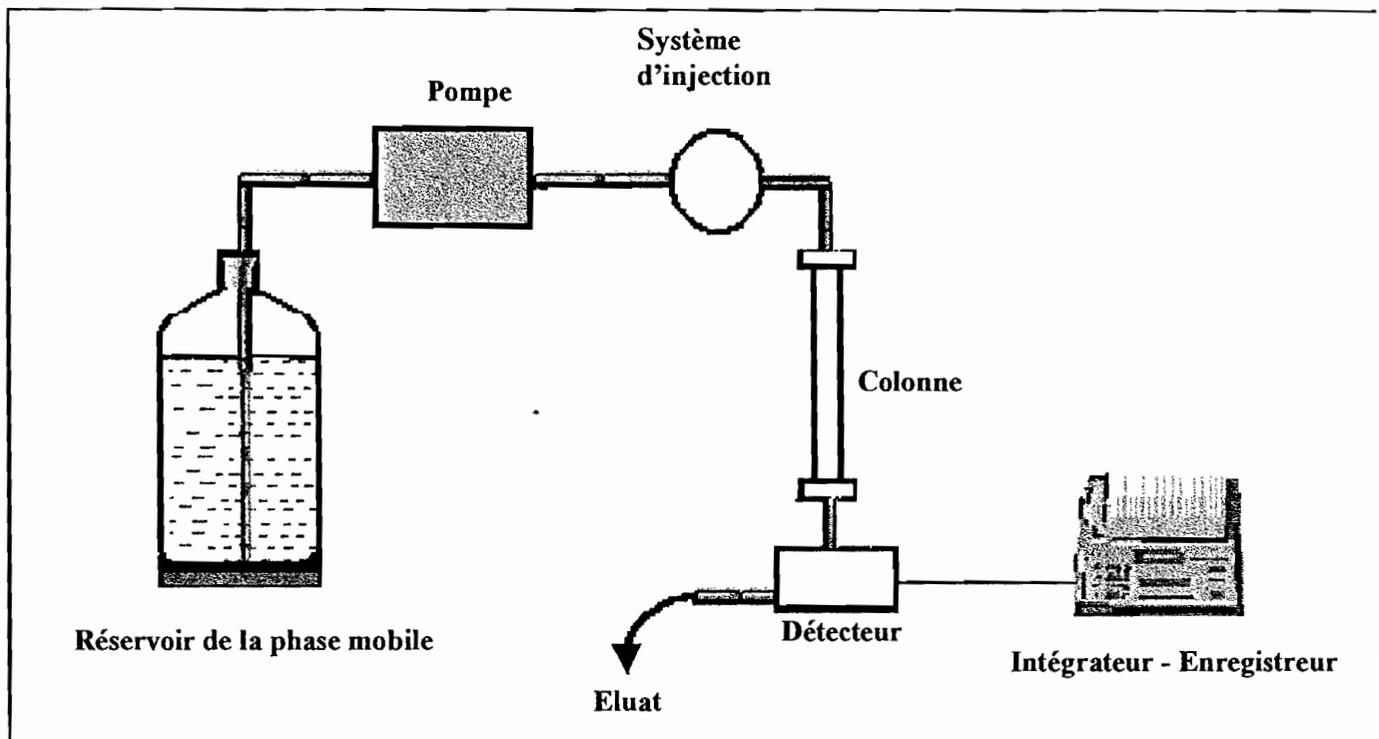


Figure.2: Schéma d'un chromatographe liquide haute performance

II. VALIDATION D'UNE METHODE D'ANALYSE

II-1. DEFINITION

La validation d'une méthode d'analyse a pour but de démontrer qu'elle conduit à des résultats attendus fiables et précis.

II-2. CRITERES DE VALIDATION (2)

II-2-1. SPECIFICITE DE LA METHODE

La *spécificité* est la capacité d'une procédure à analyser effectivement la substance considérée.

II-2-2. LINEARITE DE LA METHODE

La *linéarité* est la capacité d'une procédure à obtenir à l'intérieur d'un certain intervalle défini des résultats directement proportionnels à la quantité de substance à examiner dans l'échantillon;

II-2-2-3. FIDELITE DE LA METHODE

La *fidélité* est l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites.

Elle est évaluée à partir de deux types de mesures :

- *Répétabilité* qui se rapporte à des essais de même grandeur effectués est évaluée dans des conditions opératoires identiques et dans un court intervalle de temps au sein d'un même laboratoire, par un même opérateur employant le même équipement.
- *Reproductibilité* qui se rapporte à des essais effectués dans des conditions extrêmement variables, dans des laboratoires différents, par des opérateurs différents, sur des équipements différents.

La fidélité est évaluée par le calcul du coefficient de variation (CV) qui équivaut au pourcentage de l'écart entre une série de valeurs et la valeur moyenne :

$$CV = \frac{\sigma_{n-1}}{X} \cdot 100$$

- X : moyenne

- σ_{n-1} : écart-type

- n : nombre de mesure

$$X = \frac{\sum X_i}{n}$$

$$\sigma_{n-1} = \frac{\sum (X_i - X)^2}{n - 1}$$

II-2-2-4. EXACTITUDE DE LA METHODE

L'*exactitude* encore appelée justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre une valeur exacte ou acceptée comme telle, et la valeur (ou la moyenne des valeurs) obtenue en appliquant la procédure d'analyse un certain nombre de fois. L'*exactitude* de la méthode est évaluée par le calcul du pourcentage de récupération.

II-2-2-5. LIMITE DE DETECTION DE LA METHODE

La limite de détection équivaut à la plus faible concentration détectable mais pas nécessairement quantifiée comme valeur exacte.

DEUXIEME PARTIE :

NOTRE TRAVAIL

I. MATERIEL

I-1. ECHANTILLONNAGE

Notre étude a été appliquée à trois marques de farines industrielles à base de céréales destinées à l'alimentation des nourrissons :

Ce sont des farines industrielles vendues en Officine de pharmacie et dont les teneurs en Vitamine B₂ sont indiquées par le fabricant sur le conditionnement :

- *A* - Farine de céréales lactée biscuitée pour nourrissons dès 4 mois dosée à 800µg de Vitamine B₂ pour 100 g de Farine.
- *B* - Farine 7 céréales pour nourrissons dès 4 mois dosée à 600µg de Vitamine B₂ pour 100 g de farine.
- *C* - Farine de maïs au SOJA pour nourrissons dès 4 mois dosée à 300µg de Vitamine B₂ pour 100 g de farine.

La farine commerciale *A* a été choisie pour les différents essais.

I-2. REACTIFS

- Acétate de sodium
- Acide acétique 99%-100%
- Acide chlorhydrique 35%
- Acide trichloroacétique
- α -Amylase : Takadiastase
- Carbonate d'Amonium pur (NH₄)₂CO₃
- Méthanol pour CLHP
- Riboflavine

I-3. PREPARATION DES SOLUTIONS

- *Acétate de sodium 2N* : Dissoudre dans une fiole jaugée de 1000ml, 272g d'acétate de sodium par de l'eau distillée.
- *Acide chlorhydrique 0,1N* : Diluer dans une fiole jaugée de 1000ml, 8.83ml d'acide chlorhydrique 35% par de l'eau distillée.
- *Acide trichloroacétique 50% (m/v)*: Dissoudre dans une fiole jaugée de 100ml, 50mg d'acide trichloroacétique par de l'eau distillée
- *α -Amylase 6% (m/v)* : Préparation extemporanée de la quantité suffisante pour l'analyse à raison de 0,06mg pour 1 ml d'eau distillée.
- *Carbonate d'ammonium 1% (m/v)* : Dissoudre dans une fiole jaugée de 1000ml, 10mg de carbonate d'ammonium par de l'eau distillée.
- *Dihydrogénophosphate de potassium 1% (m/v)*: Dissoudre dans une fiole jaugée de 1000ml, 10mg de dihydrogénophosphate de potassium par de l'eau distillée.
- *Solutions de référence* :
 - *Solution mère de Riboflavine (100 μ g/ml)* : Dans une fiole jaugée de 100ml suspendre 10mg de Riboflavine dans 60ml d'acide chlorhydrique 0,1N ; chauffer sous agitation permanente au Bain-Marie 100°C jusqu'à dissolution totale ; Refroidir et compléter à 100ml par l'acide chlorhydrique 0,1N. Conserver dans un flacon teinté au réfrigérateur (+4°C).
 - *Solution standard de Riboflavine (1 μ g/ml)* : Diluer au 1/100^{ème} la solution mère dans de l'acide chlorhydrique 0,1N

I-4. CHROMATOGRAPHE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

- *Réservoir de phase mobile* (vase clos en matière plastique de 2 litres)
réservoir unique pour un régime isocratique

- *Pompe* (PERKIN ELMER * série200LC pump)

- *Système d'injection à vanne* : Système à boucle de 20 μ l. avec une
Microseringue en verre (25 μ l)

- *Précolonne* (HS-3 Silica)

- *Colonne de phase inverse* Zorbax ODS (OctoDodecylSylane)5 μ m 100A
(150 x 4.6 mm i. d.)

- *Détecteur UV-Visible* (Applied Biosystems 785 A)

- *Intégrateur* (HEWLETT PACKARD HP 3395).

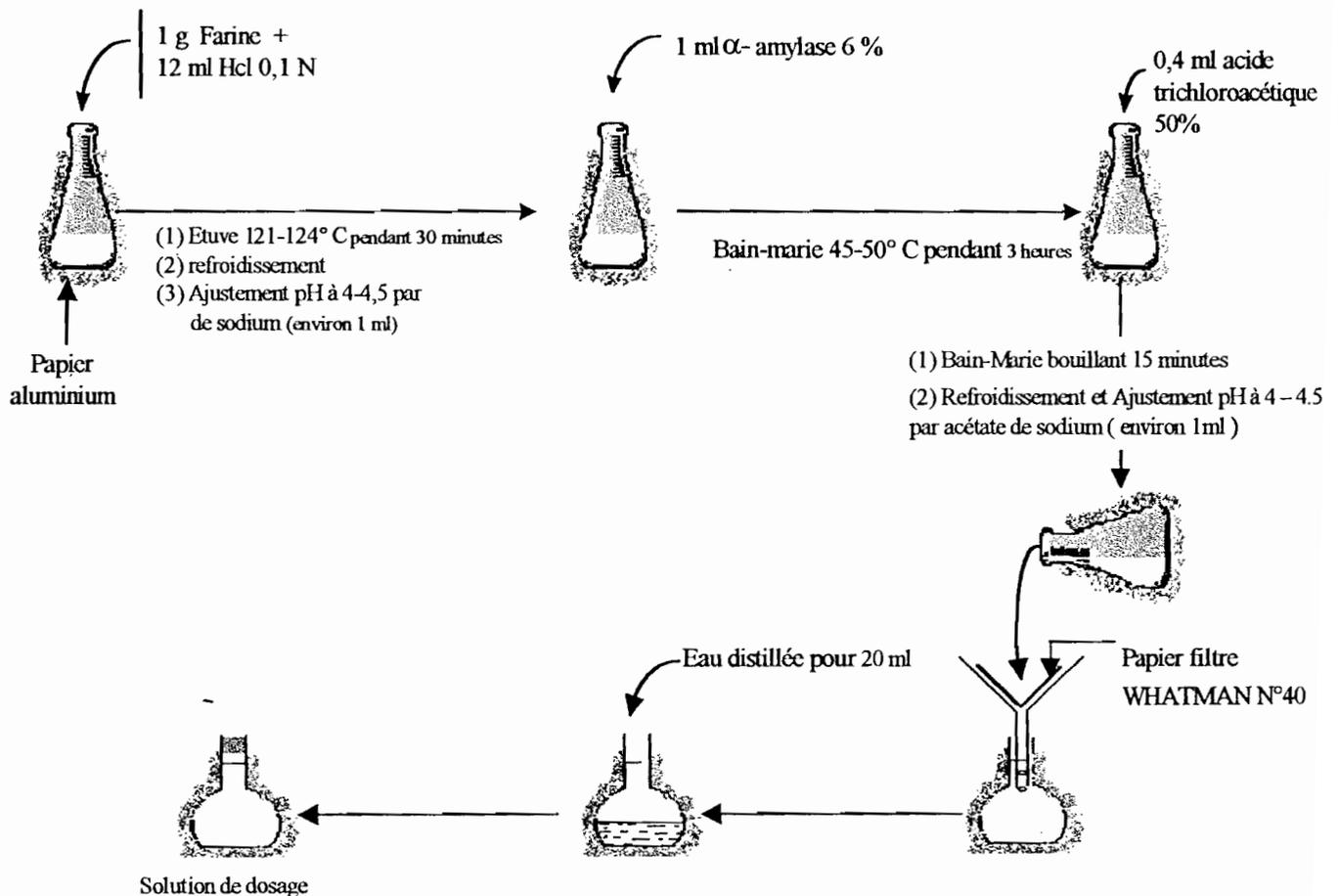
II. METHODE D'ANALYSE

L'analyse de la vitamine B₂ est basée sur le principe suivant :

La vitamine B₂ est libérée des complexes protéiques et des systèmes enzymatiques par une hydrolyse acide chlorhydrique, suivie d'une déphosphorylation des esters par une hydrolyse enzymatique (α -amylase).

L'extrait est purifié par une déprotéinisation et le dosage de la vitamine B₂ est ensuite réalisé par Chromatographie liquide haute Performance en phase inverse.

II-1. PROTOCOLE D'EXTRACTION



II-2. PROTOCOLE DE DOSAGE

❖ *Préparation de la phase mobile*

La phase mobile est préparée par simple mélange, puis filtrée sur un dispositif de filtration büchner et dégazée sous vide, le vide étant maintenu jusqu'à l'absence de dégagement de bulles d'air. La phase mobile est ensuite disposée dans le réservoir de la phase mobile en évitant la formation de bulles d'air .

❖ *Conditions opératoires*

Les conditions d'analyse sont les suivantes :

- Phase mobile : - Méthanol (30 %)
 - Acide acétique (0.75 %)
 - $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 1% (69.25 %) pH = 5.8
- Débit = 1ml/mn
- Longueur d'onde = 266nm
- Volume d'injection = 20 μ l

Le conditionnement de la colonne est réalisé à faible débit (0.2 ml/mn) pendant 90 minutes. Après le conditionnement on remonte progressivement le débit jusqu'au débit d'analyse.

L'injection de la solution standard (1 μ g/ml) permet d'identifier le pic chromatographique de la vitamine B₂ au temps de rétention $T_r=8,5$ mn.

L'intégrateur donne des résultats qui sont exprimés en surface de pic.

III. VALIDATION DE LA METHODE D'ANALYSE

III-1. SPECIFICITE DE LA METHODE

L'étude de la spécificité a été réalisée par comparaison du spectre d'absorption des fractions d'éluat du pic au $T_r = 8.5$ mn (figure 3, page 22) d'un extrait de farine *A* au spectre d'absorption de la solution standard de vitamine B₂ à 1µg/ml.

Le recueillement des fractions d'éluat de l'extrait de farine *A* se fait manuellement partir de la 9^{ème} goutte qui suit le début de la monte du stylet enregistreur du pic au temps de rétention de 8.5 minutes (Figure 3, page 22).

Quatre fractions de deux extraits sont collectées dans un tube à essai puis évaporé à l'étuve à 121-124°C jusqu'au volume d'environ 0.2 ml et ensuite le concentré est repris par 1ml d'Hcl 0.1N.

Cette solution ainsi obtenue est analysée au spectrophotomètre Ultraviolet - Visible.

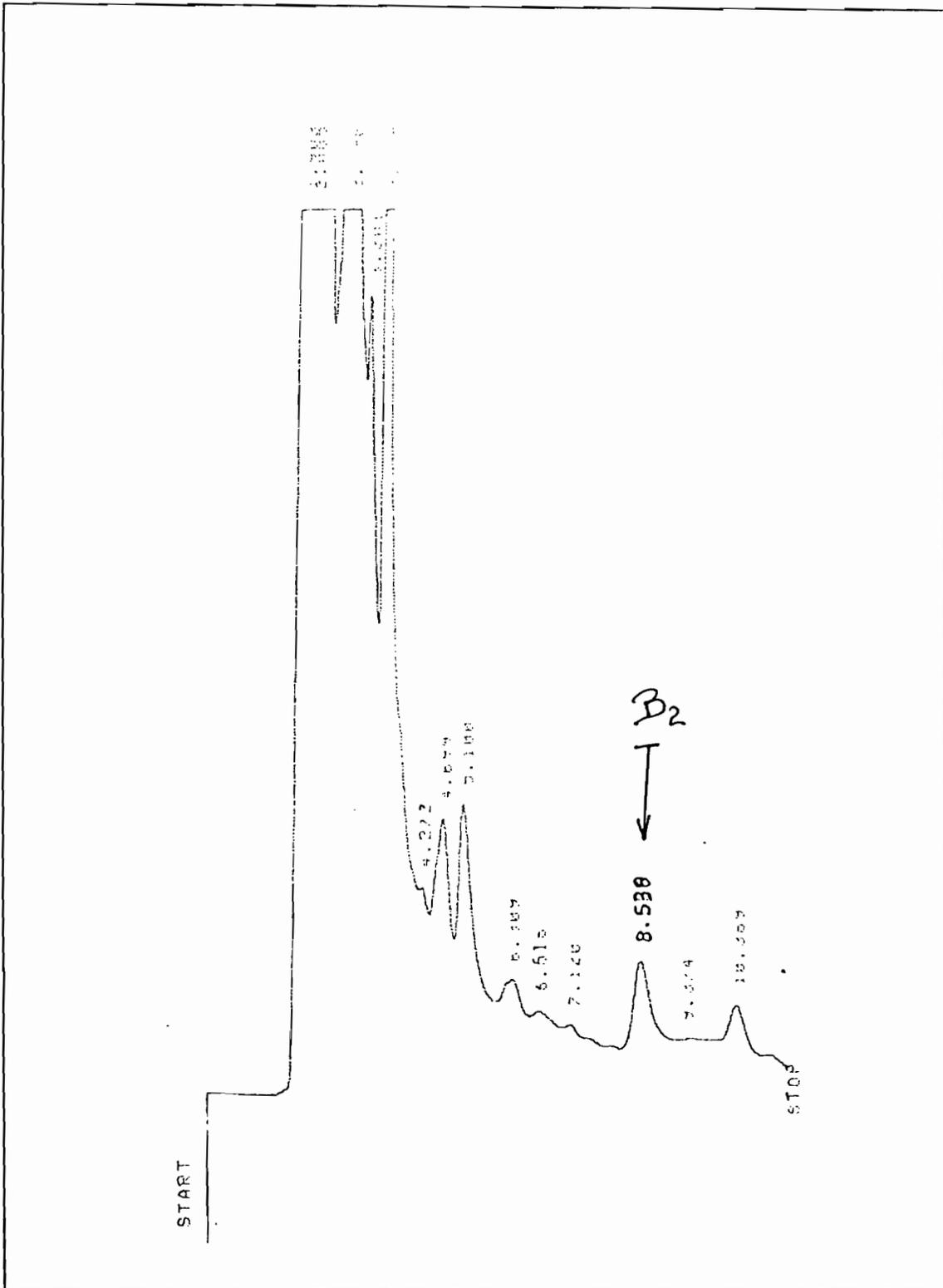


Figure 3 : Chromatogramme d'un extrait de farine A

III-2. LINEARITE DE LA METHODE

L'étude de la linéarité a été faite sur une gamme étalon obtenu par dilution progressive de la solution mère et en déterminant les coefficients de corrélation et de détermination exprimant la relation entre les surfaces des pics obtenus et les concentrations en vitamine B₂. L'équation de la droite de régression et le domaine de linéarité seront ainsi définis.

III-3. REPETABILITE DE LA METHODE

La répétabilité a été étudiée :

- D'une part sur l'analyse chromatographique en l'appliquant dix fois à deux concentrations du standard (0.5 et 1µg/ml) et à un extrait de farine A ;
- Et d'autre part sur l'ensemble de la procédure ("Whole test procedure ") en appliquant toute la procédure d'analyse à six prises de la farine A.

III-4. EXACTITUDE DE LA METHODE

L'exactitude de la méthode est évaluée par le calcul du pourcentage de récupération.

La détermination du pourcentage de récupération est réalisée par la méthode des ajouts dosés en procédant à quatre extractions de la farine A après ajout de quantité croissante de vitamine B₂. Le pourcentage de récupération des ajouts est déterminé par rapport à un extrait de farine A sans ajout.

Le rendement de la méthode d'extraction est égal à la moyenne des pourcentages de récupération des ajouts.

III-5. LIMITE DE DETECTION DE LA METHODE

Cette limite est déterminée en appliquant l'analyse chromatographique à des dilutions successives de la solution mère du standard.

IV. RESULTATS ET DISCUSSION

IV-1. RESULTATS

IV-1-1. VALIDATION DE LA METHODE D'ANALYSE

IV-1-1-1.. Spécificité la méthode

L'interprétation du tableau I et des spectres d'absorption de la figure 4 (page 25) montre qu'on retrouve au niveau du spectre du pic au $T_r = 8.5mn$ (figure 3 page 22) les points caractéristiques de la vitamine B₂, avec deux maxima d'absorption à 230nm et 269nm.

Tableau I : Absorbances du standard (1 μ g/ml) et des fractions d'éluat d'un extrait de farine A en fonction de la longueur d'onde

Longueur d'onde (nm)	Absorbances du Standard (1 μ g/ml)	Absorbances "Extrait de Farine A"
215	0.035	--
220	0.058	--
224	0.059	--
225	0.058	0.054
235	0.015	0.087
240	0.007	0.064
245	0.012	0.035
250	0.023	0.027
255	0.036	0.026
260	0.050	0.027
265	0.062	0.028
275	0.038	0.029
280	0.023	0.029
285	0.015	0.026
290	0.011	0.025
300	0.021	0.022

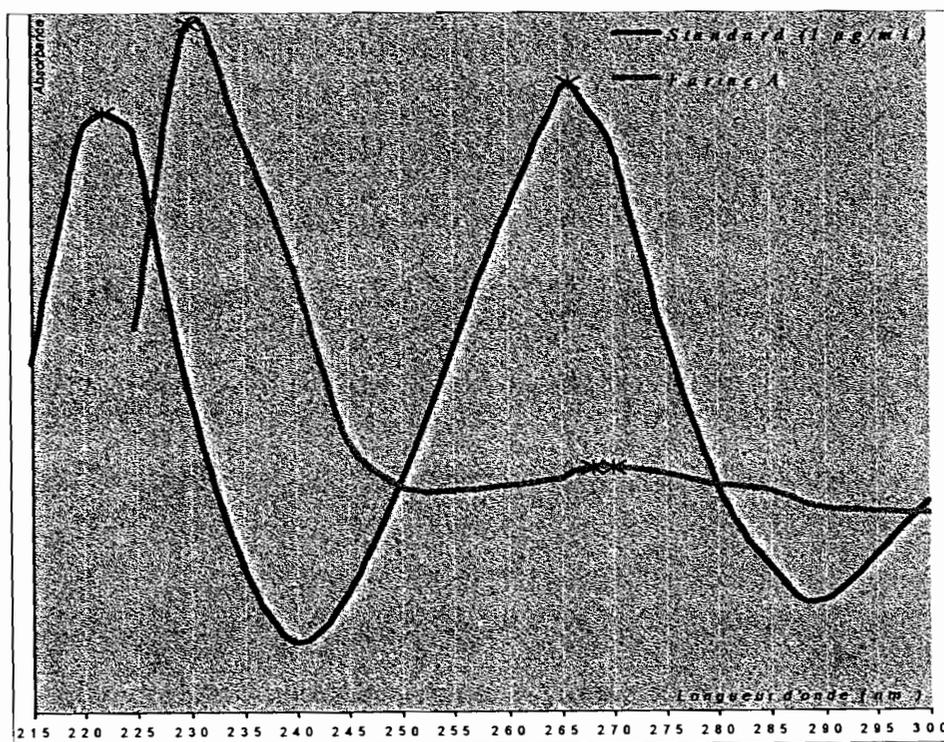


Figure 4 : Spectres d'absorption du standard (1 μ g/ml) et des fractions d'éluat d'un extrait de farine A

IV-1-1-2. Linéarité de la méthode

- Coefficient de corrélation : $r_{B_2} = 0.9998$
- Coefficient de détermination : $r^2_{B_2} = 0.9996$
- Equation de la droite de régression :

$$y = 745118.74 x - 8715.73 \quad \begin{array}{l} x: \text{concentration en } \mu\text{g/ml} \\ y: \text{surface des pics} \end{array}$$

Les coefficients de corrélation et de détermination entre les concentrations et les surfaces des pics correspondantes respectivement 0.9998 et 0.9996 sont proches de 1 donc satisfaisants, ce qui indique qu'il existe une proportionnalité entre la surface des pics et la concentration en vitamine B₂.

Cette proportionnalité est représentée par la droite d'étalonnage (figure 5 page 27) dont l'équation est : $y = 745118.74.x - 8715.73$

On déduit de cette équation que le domaine de linéarité est compris entre 0.05 $\mu\text{g/ml}$ et 1.25 $\mu\text{g/ml}$

Tableau II : Gamme étalon de la vitamine B₂

CONCENTRATION ($\mu\text{g/ml}$)	SURFACE
0.02	1328
0.04	13691
0.05	30957
0.08	60377
0.2	140102
0.5	361799
1	747131
1.25	914562

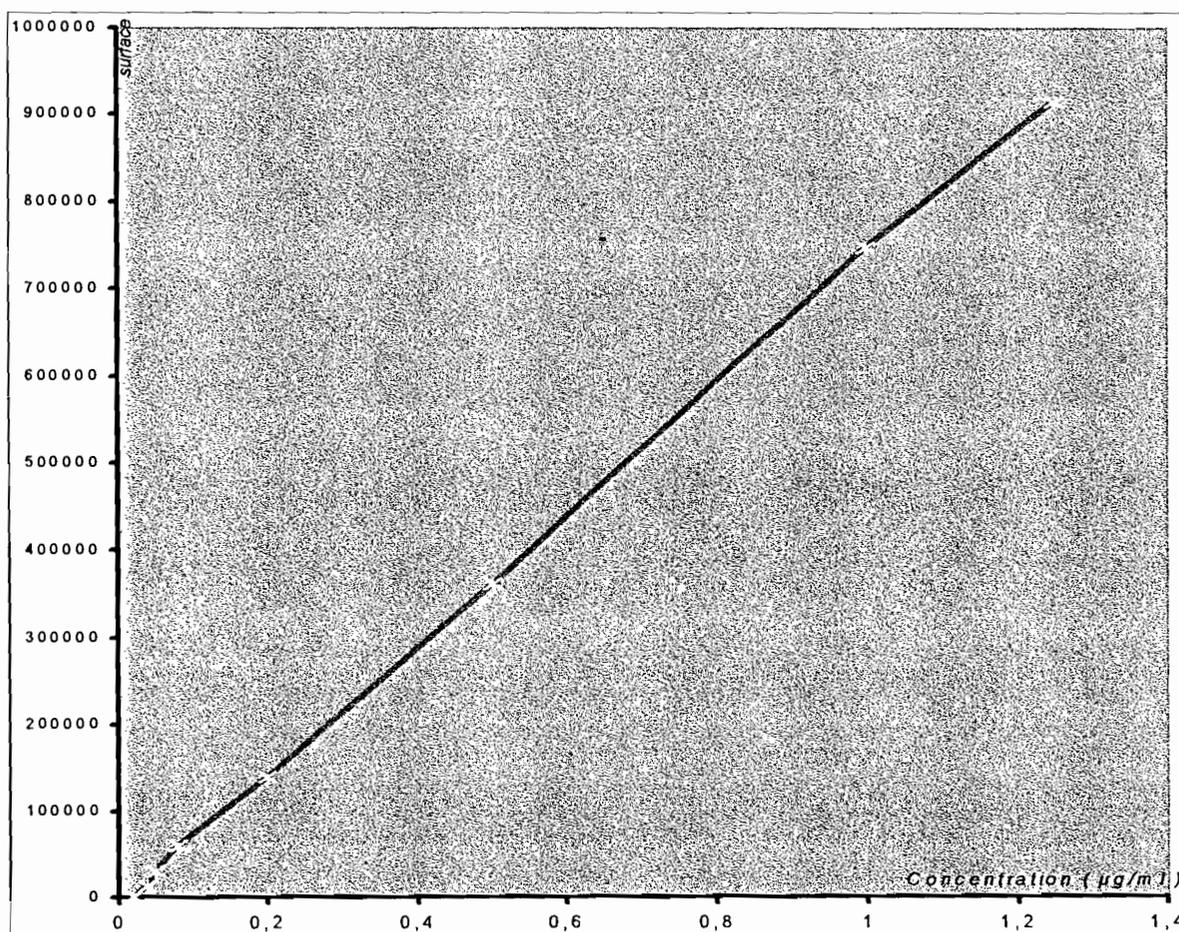


Figure 5 : Droite d'étalonnage

IV-1-1-3 Repétabilité de la méthode

IV-1-1-3-1 Repétabilité de l'analyse chromatographique

❖ *Repétabilité du standard*

Tableau III: Repétabilité du Standard (0.5 μ g/ml)

	SURFACE	MOYENNE (μg/ml)	σ_{n-1} (μg/ml)	CV (%)
1	364429	360206	5435.49	1.51
2	363123			
3	353475			
4	360511			
5	370875			
6	356542			
7	364934			
8	357802			
9	358175			
10	352194			

Tableau IV : Repétabilité du standard (1 μ g/ml)

	SURFACE	MOYENNE (μg/ml)	σ_{n-1} (μg/ml)	CV (%)
1	746613	735309	13130.63	1.78
2	735024			
3	739972			
4	715015			
5	746865			
6	711753			
7	751259			
8	745701			
9	736124			
10	724764			

Les coefficients de variation obtenus pour les concentrations 0.5 μ g/ml et 1 μ g/ml respectivement 1.51% et 1.78% sont inférieurs à 2%, valeur généralement admise en analyse quantitative des solutions de références.

❖ *Répétabilité d'un extrait de farine A*

Tableau V : Répétabilité d'un extrait de farine A

	SURFACE	CONCENTRATION ($\mu\text{g/ml}$)	MOYENNE ($\mu\text{g/ml}$)	σ_{n-1} ($\mu\text{g/ml}$)	CV (%)
1	536720	0.732	0.6860	0.020	2,9
2	494767	0.676			
3	498284	0.680			
4	491093	0.671			
5	505035	0.689			
6	481413	0.658			
7	514397	0.702			
8	489897	0.669			
9	504035	0.688			
10	509880	0.696			

Le coefficient de variation (2.9%) de l'extrait de farine A est inférieur à 5%, valeur généralement admise dans les tests de répétabilité d'une analyse chromatographique d'un extrait.

II-1-1-3-2 Répétabilité de l'ensemble de la procédure" Whole test procedure "

Tableau VI : Répétabilité l'ensemble de la procédure

	SURFACE	CONCENTRATION ($\mu\text{g/ml}$)	MOYENNE ($\mu\text{g/ml}$)	σ_{n-1} ($\mu\text{g/ml}$)	CV (%)
1	502552	0.686	0.679	0.036	5.3
2	483724	0.661			
3	460841	0.630			
4	498567	0.681			
5	489541	0.669			
6	549399	0.749			

Le coefficient de variation (5.3%) de l'ensemble de la procédure, "whole test procédure" est inférieur à 10%, valeur généralement recommandée en analyse alimentaire.

II-1-1-4. Exactitude de la méthode

Tableau VII : Pourcentage de récupération

Quantité ajoutée (μg)	Quantité totale trouvée ($\mu\text{g/g}$)	Quantité d'ajout trouvée (μg)	Pourcentage d'ajout récupéré (%)
0	15.26	--	--
2	17.04	1.78	89
4	18.88	3.62	90.5
5	19.72	4.46	89.2
6	20.96	5.7	95
Pourcentage de récupération = $91 \pm 2.42\%$			

Le rendement 91% est compris entre 90 et 100%, valeurs généralement recommandées en analyse quantitative.

IV-1-1-5. Limite de détection de la méthode

Tableau VIII : Evaluation de la limite de détection

DILUTION	CONCENTRATION ($\mu\text{g/ml}$)	SURFACE
1/100	0.10	747131
1/200	0.50	361799
1/500	0.20	140102
1/2000	0.05	30957
1/5000	0.02	1328
1/10000	0.01	--

La limite de détection de la vitamine B₂ est égale à 0.02 $\mu\text{g/ml}$

IV-1-2. APPLICATIONS AU DOSAGE DE LA VITAMINE B₂ DANS LES FARINES A BASE DE CEREALES

Tableau IX : Teneurs en vitamine B₂ des farines

ECHANTILLON	TENEUR DETERMINEE (mg/100g)	TENEUR AFFICHEE (mg/100g)	RAPPORT (R)
A	1.358	0.800	1.7
B	9.542	0.600	15.9
C	0.400	0.300	1.33

La teneur en vitamine B₂ des farines industrielles *A*, *B* et *C* sont supérieures aux valeurs indiquées par le fabricant sur le conditionnement.

IV-2. DISCUSSION

IV-2-1. VALIDATION DE LA METHODE D'ANALYSE

La validation de la méthode d'analyse à été menée avec des critères du guide de validation analytique établis par une commission de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (S.F.S.T.P) dans le but d'aider les industriels à valider leur procédure d'analyse (2).

IV-2-1-1. Spécificité de la méthode

Les résultats de l'étude de la spécificité (tableau I et figure 4, page 25) ont montré que le pic au Tr = 8.5mn (figure 3 page 22) possède les points caractéristiques de la vitamine B₂.

Cependant l'absence de symétrie autour des maximums d'absorption pourrait être imputable à la présence d'impureté due au mode de prélèvement et aussi à la composition complexe des farines qui sont des dérivés biologiques naturels.

La méthode d'analyse possède une spécificité d'analyse de la vitamine B₂.

IV-2-1-2. Linéarité de la méthode

Les coefficients de corrélation (0.9998) et de détermination (0.9996) étant proches de 1 (page 26) et la figure 5 (page 27) indiquent que la méthode d'analyse possède une linéarité de réponse dans un large domaine de concentrations allant de 0.05 à 1.25µg/ml.

IV-2-1-3. Répétabilité de la méthode

Le coefficient de variation 5.3% (Tableau VI page 29) de l'ensemble de la procédure inférieur à 10% indique que la méthode d'analyse possède une bonne Répétabilité des mesures.

IV-2-1-4. Exactitude de la méthode

La méthode d'extraction donne un pourcentage moyen de récupération de 91% (Tableau VII page 30) supérieur à 90%. Ce pourcentage est supérieur à ceux obtenus par ANG C. Y. et Coll et HAGG M respectivement 89.3% et 88% (1, 4)

La méthode d'analyse donne donc des valeurs exactes.

IV-2-1-6. Limite de détection de la méthode

La méthode d'analyse a une limite de détection de $0.02\mu\text{g/ml}$ (tableau VIII page 30) soit $0.04\text{mg}/100\text{g}$ d'aliment.

Cette limite est satisfaisante car proche des faibles teneurs en vitamine B₂ des aliments, environ $0.02\text{mg}/100\text{g}$ d'aliment (5, 8).

IV-2-2. APPLICATIONS AU DOSAGE DE LA VITAMINE B₂ DANS LES FARINES A BASE DE CEREALES

Les différents résultats de l'étude de validation montrent que la méthode d'analyse est performante.

L'application au dosage de la vitamine B₂ dans trois marques de farines à base de céréales destinées à l'alimentation des nourrissons montre que les trois farines industrielles (A, B, C) ont les teneurs déterminées (1.358 , 9.542 , et $0.400\text{mg}/100\text{g}$) (Tableau IX page 31) supérieures aux teneurs indiquées par le fabricant sur le conditionnement respectivement 0.800 , 0.600 , $0.300\text{mg}/100\text{g}$.

Des résultats similaires ont été obtenus par CHASE G. W. et Coll (3).

En effet, dans l'industrie on procède à la supplémentation en vitamine, afin d'obtenir à la fin du process des produits diététiques à teneur garantie en vitamine ; généralement cette supplémentation se fait dans une proportion comprise entre 80 et 200%, exception faite pour les vitamines D et K (10).

Les farines A et C sont donc supplémentées respectivement à 186% et 135%, alors que la farine B est très fortement supplémentée 1600%.

CONCLUSION

La validation de la méthode d'analyse de la vitamine B₂ par Chromatographie Liquide Haute Performance après extraction par une hydrolyse acide et enzymatique a été réalisée par l'étude de divers critères : spécificité, linéarité, Répétabilité, exactitude et limite de détection.

Les résultats obtenus sont les suivants :

- ❖ Coefficient de corrélation = 0.9998 et Coefficient de détermination = 0.9996
- ❖ Coefficient de variation de l'analyse = 5.3 %
- ❖ Exactitude = 91 %
- ❖ Limite de détection = 0.02 µg/ml (0.04 mg/100g d'aliment).

Ces résultats montrent que la méthode d'analyse est performante.

L'application au dosage de la vitamine B₂ dans trois marques de farines industrielles destinées à l'alimentation des nourrissons montre que leur teneur en vitamine B₂ déterminée (1.358, 9.542, et 0.400mg/100g) sont supérieures aux teneurs indiquées par le fabricant sur le conditionnement respectivement 0.800, 0.600, 0.300mg/100g.

Ces teneurs élevées sont dues à une supplémentation réalisée en industrie, mais dans une proportion comprise entre 80 et 200%. On note donc une supplémentation excessive de la deuxième farine (1600%).

La méthode d'analyse de la vitamine B₂ donnant des résultats fiables et précis peut donc être utilisée pour le contrôle de qualité des produits pharmaceutiques et agro-alimentaires.

BIBLIOGRAPHIE

1 - ANG C.Y.W. AND MOSELEY F.A.

Détermination of thiamin and riboflavin in meat and meat products by High-Pressure Liquid Chromatography.

J.Agric. Food chem 1980 ;**28** :486-489.

2 - CHAMINADE P. , FERAUD S. , BAILLET A. , FERRIER D.

Validation d'une méthode analytique de dosage par CLHP : Test de robustesse et validation de la méthode.

S.T.F. Pharma. Pratiques. 1995; **5**(1):17-35

3 - CHASE G.W., LANDER W.D., SOLIMAN A.M.AND J.R., EITENMILLER RR.

Method modification for Liquid Chromatographic determination of thiamme, riboflavin, and Pyridoxine in medical foods.

Journal of AOAC international. 1993 ; **76**(6): 1276 1280.

4 - HÄGG M.

Effect of various commercially available enzymes in the Liquid Chromatographic determination with external standardization of thiamine and riboflavin in foods.

Journal of AOAC International 1994 ; **77**(3) :681 - 686.

5 - LEBOULANGER J.

Les Vitamines : Biochimie - Mode d'action - intérêt thérapeutique.

France Roche :1984

6 - LINDEN G.

Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires :
Principes des techniques d'analyse.

Paris :Technique et Documentation - APRIA 1981 **2**: 59 - 95

7 - MAHUZIER G. , HAMON M.

Abrégé de chimie analytique : Méthodes de séparation.

2^e édition : Paris : MASSON 1986 ; tome II : 262

8 - MUNNICH A. , OGIER H. , SAUDUBRAY J.M.

Les vitamines : Aspects métaboliques, génétiques, nutritionnels et thérapeutiques.

Paris : ROCHE et MASSON 1987 :428

9 - ROSSET R. , CAUDE M. , JARDY A.

Manuel pratique de chromatographie en phase liquide.

2^e Edition : Paris : MASSON, 1982 : 374

10 - SOMMAIRE P. A. , BOURRINET P.

Les produits diététiques.

Les actualités pharmaceutiques 1976, (120):38-45.