

# CHIMIOMÉTRIE 2016

17-20 Janvier 2016, Namur, Belgique

---

## **Application de la méthodologie des surfaces de réponse pour optimiser les préparations d'échantillons en laboratoire**

### *Use of response surface methodology to optimize samples preparations in laboratory*

**Frédéric Daems<sup>1</sup>, Jean-Michel Romnee<sup>2</sup>, Georges Lognay<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Département de Valorisation des Productions, Unité 14  
Centre wallon de Recherches Agronomiques  
Chaussée de Namur 24, 5030 Gembloux, Belgique  
e-mail : [f.daems@cra.wallonie.be](mailto:f.daems@cra.wallonie.be)

<sup>2</sup> Département de Valorisation des Productions, Unité 14  
Centre wallon de Recherches Agronomiques  
Chaussée de Namur 24, 5030 Gembloux, Belgique  
e-mail : [romnee@cra.wallonie.be](mailto:romnee@cra.wallonie.be)

<sup>3</sup> Département AgroBioChem, Chimie Analytique  
Université de Liège-Gembloux Agro-Bio Tech  
Passage des déportés 2, 5030 Gembloux, Belgique  
e-mail : [georges.lognay@ulg.ac.be](mailto:georges.lognay@ulg.ac.be)

La mise en place d'une méthode d'analyse est généralement perçue comme un processus dynamique qui passe par plusieurs étapes successives. Une méthode d'analyse naît, évolue et, après un certain temps, peut être modifiée ou finit tout simplement par être abandonnée [1]. Bien souvent, une grande importance est accordée à l'étape de validation. Mais, il ne faut pas pour autant, oublier les autres étapes qui ont également toutes leur importance dans la qualité de la méthode d'analyse qui sera proposée. L'étape de développement d'une méthode est située avant celle de la validation et peut impacter de façon importante le reste du cycle de vie de celle-ci. Dans le cas de la préparation des échantillons, par exemple, certaines études utilisent des méthodes précédemment optimisées pour réaliser leurs analyses mais, ils ne tiennent pas toujours compte du type de matrice ni, des composés ciblés. Avec le risque, de ne pas être certains d'extraire la totalité des composés ciblés ou de détériorer ceux-ci durant la préparation des échantillons. D'autres optimisent leur méthode en faisant varier une seule variable à la fois. Avec comme inconvénients, de ne pas observer les éventuelles interactions entre les variables étudiées et se retrouver avec un nombre d'essais important à réaliser. Cette approche implique une consommation importante de réactifs et matériaux et est, également, souvent longue à mettre en œuvre, ce qui se répercute sur le coût de l'analyse [2]. Afin d'éviter ces inconvénients, l'optimisation des procédures analytiques se réalise de plus en plus souvent à l'aide de la méthodologie des surfaces de réponse [2, 3].

Cette approche chimiométrique a pu être utilisée avec succès durant le développement d'une méthode d'analyse quantitative constituée d'une étape d'extraction à l'aide d'un bain à ultrasons, suivi d'une hydrolyse enzymatique et d'une analyse par UPLC<sup>®</sup>-MS/MS, destinée à doser quatre phyto-œstrogènes dans les fourrages. Deux plans d'expérience de type Box-Behnken, avec 3 facteurs et comportant 16 essais chacun, ont été appliqués aux étapes

d'extraction et d'hydrolyse. Pour l'extraction, les 3 variables retenues étaient : la température, la durée et la concentration du solvant. Dans le cas de l'hydrolyse, c'est la durée, la température et le pH de la solution enzymatique qui ont été prises en compte.

L'impact de la concentration du solvant a clairement pu être mis en évidence lors de l'extraction des divers composés, alors que pour l'étape d'hydrolyse, c'est plutôt la température qui s'est montrée être la variable ayant le plus d'impact sur le processus. Outre l'observation des différents effets de ces variables, l'ensemble des données générées a également permis de définir des conditions optimales d'extraction et d'hydrolyse pour chacun des composés. Ces conditions n'étant pas identiques pour chacun d'entre eux, un compromis a du être trouvé afin de pouvoir analyser l'ensemble des composés simultanément. La méthode ainsi développée a ensuite été validée selon les recommandations de l'EMA [4] pour confirmer sa fiabilité et sa robustesse, et utilisée avec succès lors du suivi de l'évolution des phyto-œstrogènes lors de la conservation de fourrages dans des ensilages.

Cette étude a permis d'illustrer concrètement l'intérêt d'utiliser la méthodologie des surfaces de réponses lors du développement de protocoles d'analyse, principalement, lorsque les informations méthodologiques sur la thématique sont nombreuses et divergentes.

#### **Références**

- [1] M. Feinberg, « Validation of analytical methods based on accuracy profiles ». *J. Chromatogr. A*, 1158, pp. 174-183, 2007.
- [2] M.A. Bezerra, R.E. Santelli, E.P. Oliveira, L.S. Villar, L.A. Escaleira, « Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry ». *Talanta*, 76, pp. 965-977, 2008.
- [3] S.L.C. Ferreira, R.E. Bruns, H.S. Ferreira, G.D. Matos, J.M. David, G.C. Brandão, E.G.P. da Silva, L.A. Portugal, P.S. dos Reis, A.S. Souza, W.N.L. dos Santos, « Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods ». *Anal. Chim. Acta*, 597, pp. 179-186, 2007.
- [4] EMA VICH GL49: Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food-producing animals: validation of analytical methods used in residue depletion studies. 2015.  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/04/WC500105053.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/04/WC500105053.pdf) (Accessed February 2015)