

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ « MOULOU D MAMMERI » DE TIZI OUZOU

Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques

Département de Biochimie et Microbiologie



T H È S E DE DOCTORAT 3^{ème} cycle LMD

Présentée par

M. TIGHRINE Abderrahmane

Pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR EN SCIENCES BIOLOGIQUES

OPTION : BIOCHIMIE, MICROBIOLOGIE ET SCIENCES ALIMENTAIRES

THÈME

**Recherche et dosage de quelques additifs alimentaires sur les produits
dérivés de fruits, effet sur la santé et comparaison aux normes :
optimisation et validation des méthodes analytiques.**

Soutenue publiquement le 10 / 07 /2019

Devant le jury :

M.MOUSSAOUI Ramdane	Professeur / UMM de TiziOuzou	Président
M. AMIR Youcef	Professeur / UMM de TiziOuzou	Directeur de Thèse
M. MADANI Khodir	Professeur / UAMde Bejaia	Examineur
M. TAMANDJARI Abderezak	Professeur / UAMde Bejaia	Examineur
M. MEKIMENE Lakhdar	Professeur / ENSA EL- Harrach	Examineur
M. SADOUDI Rabah	MCA / UMM de TiziOuzou	Examineur

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier toutes les personnes qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à la réalisation de ce travail.

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse Monsieur AMIR Youcef, Professeur à l'UMM de Tizi Ouzou de m'avoir proposé ce sujet, de son soutien et sa compréhension. Je lui suis également reconnaissant de m'avoir donné la liberté dans l'orientation et de donner une touche personnelle à ce travail.

Qu'il me soit permis d'exprimer toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements à Monsieur MAMOU Marzouk, pharmacien Maître de Conférence Hospitalo Universitaire classe B à l'UMM de Tizi Ouzou de m'avoir accueilli et d'avoir mis à ma disposition tous les moyens disponibles dans son laboratoire et de sa disponibilité. Je crois qu'une solide amitié s'est construite entre nous et que les mots de remerciement seront toujours rares.

Je tiens à remercier profondément madame Isabel M.P.L.V.O. Ferreira, Professeur à l'Université de Porto (Portugal), laboratoire de Bromatologia e Hidrologia de m'avoir accueilli dans son laboratoire et d'avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires.

Je remercie vivement Monsieur Edgar PINTO, Professeur à l'Université de Porto (Portugal) et Monsieur Armindo MELO, Professeur à l'Université de Porto (Portugal) pour leur aide très précieuse, leurs conseils scientifiques pertinents et leurs qualités humaines. Ce fut un vrai plaisir de travailler au sein de leur équipe.

Un chaleureux remerciement à Madame Cristina NERÍN, Professeur à l'Université de Saragosse (Espagne), directrice de laboratoire Grupo Universitario de Investigación Analítica (GUIA), de m'avoir accueilli dans son laboratoire, de m'avoir fait confiance, encadré et consacré beaucoup de temps pour les explications et les orientations à chaque obstacle. Je la remercie énormément pour ses qualités humaines et sa gentillesse. Il m'est agréable de lui exprimer ma sincère gratitude.

Membres du jury:

Mes sincères remerciements pour Monsieur MOUSSAOUI Ramdane, Professeur à UMM de Tizi Ouzou pour m'avoir accordé l'honneur de présider le jury de soutenance et de délibération de cette thèse.

Ma reconnaissance, gratitude et mes sincères remerciements pour Monsieur MADANI Khodir, Professeur à l'UAM de Bejaia, Monsieur TAMANDJARI Abderezak, Professeur à l'UAM de Bejaia, Monsieur MEKIMENE Lakhdar, Professeur à l'ENSA EL Harrach et Monsieur SADOUDI Rabah, Maitre de Conférence Classe A à l'UMM de Tizi Ouzou d'avoir accepté sans hésitation d'examiner et de faire partie du jury de délibération de cette thèse.

Un chaleureux remerciement à tous mes amis médecins résidents Khaled, Redouane, Rabah et Adel mais je dois insister sur certains d'entre eux, particulièrement Mourad pour sa prédisposition toujours bonne.

Mes vifs remerciements à tous les membres du laboratoire de Chimie Analytique, de Biochimie et d'Hydrobromatologie de la faculté de Médecine, département de Pharmacie de l'UMM Tizi Ouzou qu'ils me soient permis de les remercier un à un pour l'excellente ambiance et environnement dans les quelles j'ai évolué tout au long de mon travail:

Par ordre alphabétique : M^{lle} AKLI, Mme BALLOUL, M. BEN SI SAID, Mme BERKOUNE, Mme CHEBALLAH, Mme FETHI, Mme LEKAM, Mme SAADA, Mme SLIMANI et M^{lle} TOUBAL.

Monsieur HOUALI Karim, qui ne m'a jamais refusé son aide à chaque fois que je l'ai sollicité pour des réactifs et autres matériels. Qu'il soit vivement remercié.

Je remercie vivement M. MEDJBEUR Djamel et M. TITOUCHE Yacine pour leurs encouragements et soutien.

DÉDICACES

Je dédie ce travail,

À mes parents et ma grande mère, je leur dois tout ce que je suis. À ma sœur et mon frère et toute ma famille particulièrement ma grande mère. A Sabrina, pour son soutien inconditionnel et sa compréhension.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS	I
LISTE DES FIGURES	III
LISTE DES TABLEAUX	VI
RÉSUMÉ	
ABSTRACT	
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
1. Généralités sur les additifs alimentaires	4
1.1. Aperçu et historique d'utilisation	4
1.2. Définition	4
1.3. Système de numérotation	4
1.4. Différentes catégories fonctionnelles	5
1.4.1. Conservateurs	5
1.4.1.1. Agents antimicrobiens	5
1.4.1.2. Antioxydants	5
1.4.1.3. Agents anti brunissement	6
1.4.2. Agents aromatisants	6
1.4.2.1. Édulcorants	7
1.4.2.2. Arômes naturels et synthétiques.....	7
1.4.2.3. Exhausteurs de goût	8
1.4.3. Colorants	8
1.4.3.1. Colorants naturels	8
1.4.3.2. Colorants synthétiques	9
1.4.3.3. Colorants synthétiques identiques aux colorants naturels.....	9
1.4.4. Agents texturants.....	9
1.4.4.1. Émulsifiants.....	10
a- Émulsifiants naturels	10
b- Émulsifiants synthétiques.....	10
1.4.4.2. Agents stabilisants.....	10
1.4.5. Agents divers.....	10
1.4.5.1. Agents chélatants.....	11

1.4.5.2. Enzymes	11
1.4.5.3. Agent anti moussants	11
1.5. Additifs alimentaires directs et indirects	12
1.5.1. Additifs alimentaires directs	12
1.5.2. Additifs alimentaires indirects	12
1.6. Effets bénéfiques et intérêt d'utilisation des additifs alimentaires.....	12
1.6.1. Conservateurs	13
1.6.1.1. Agents antimicrobiens.....	13
1.6.1.2. Antioxydants	14
1.6.2. Édulcorants.....	15
2. Réglementations sur l'utilisation des additifs alimentaires et leurs effets sur la santé	16
2.1. Définition de quelques termes	16
2.1.1. Limite maximale de résidu	16
2.1.2. Quantum Satis	16
2.1.3. Dose maximale sans effet néfaste observé.....	17
2.1.4. Approche de la dose Benchmark.....	18
2.1.5. Dose journalière admissible	18
2.2. Toxicité des additifs alimentaires artificiels.....	19
2.2.1. Conservateurs et antioxydants	19
2.2.1.1. Conservateurs	19
2.2.1.2. Antioxydants	20
2.2.2. Édulcorants artificiels.....	20
2.3. Nécessité d'étiquetage des additifs alimentaires	22
3. Méthodologie d'analyse	24
3.1. Méthodologie de préparation des échantillons.....	24
3.1.1. Introduction	24
3.1.2. Techniques d'extraction liquide- liquide miniaturisées.....	26
3.1.2.1. Microextraction liquide liquide par dispersion	26
3.1.2.2. Extraction liquide liquide par salting out	27
3.2. Méthodologie des plans d'expériences.....	28
3.2.1. Terminologie et définitions	28
3.2.1.1. Le domaine expérimental	28
3.2.1.2. Niveau d'une variable et domaine d'étude.....	28
3.2.1.3. Réponse ou variable dépendante	29

3.2.1.4. Facteur ou variables indépendante.....	29
3.2.1.5. Les valeurs résiduelles.....	29
3.2.1.6. La p-value.....	29
3.2.1.7. Codification des variables	29
3.2.2. Les étapes d'application et de la préparation d'une expérimentation	30
3.2.2.1. Criblage	30
3.2.2.2. Plan composite centré.....	30
3.2.2.3. Surfaces de réponses	31
3.2.3. Notions statistiques d'interprétation des résultats des plans d'expériences	31
3.2.4. Coefficient de détermination R^2 , $R^2_{\text{ajusté}}$ et $R^2_{\text{prévu}}$	32
3.3. Méthodologie de validation analytique	32
3.3.1. Introduction	32
3.3.2. Plan d'expérience	35
3.3.3. Critères de validations des méthodes analytiques	37
3.3.3.1. Fonction de réponse	37
3.3.3.2. Justesse et fidélité.....	38
a- Justesse	39
b- Fidélité	39
3.3.3.3. Exactitude et le profil exactitude.....	40
3.3.3.4. Limite de détection, limite de quantification et intervalle du dosage	41
3.3.3.5. Linéarité	42
3.3.3.6. Sélectivité	42

DEUXIÈME PARTIE : PARTIE EXPÉRIMENTALE

1. Validation des méthodes analytiques par la méthodologie du profil d'exactitude.....	45
2. Étapes de traitement des données analytiques de la méthodologie du profil d'exactitude ..	47

I. MATÉRIEL ET MÉTHODES

PARTIE EXPÉRIMENTALE 1

1.1. Matériel	49
1.1.1 Appareillage	49
1.1.2. Produits et réactifs.....	49
1.1.3. Standards	49

1.1.4. Échantillonnage	49
1.2. Méthodes	50
1.2.1. Mise au point des conditions chromatographiques pour la séparation d'AB, AS, BHA et BHT.....	50
1.2.2. Optimisation de la méthode d'extraction DLLME.....	50
1.2.2.1. Sélection du solvant d'extraction et de dispersion	51
1.2.2.2. Criblage	51
1.2.2.3. Optimisation par plan composite centré et surface de réponse	52
1.3. Méthodologie de préparation des échantillons et la microextraction par DLLME.....	54
1.4. Choix du protocole expérimental pour la validation analytique de la méthode DLLME-HPLC- DAD.....	55
1.5. Préparation des solutions.....	55
1.5.1. Solutions mères	55
1.5.2. Préparation des solutions de standards d'étalonnage et de validation	56
1.5.2.1. Préparation des solutions de standards d'étalonnage	56
1.5.2.2. Préparation des solutions des standards de validation	56

PARTIE EXPÉRIMENTALE 2

2.1. Matériel	57
2.1.1. Appareillage	57
2.1.2. Produits et réactifs	57
2.1.3. Standards	57
2.1.4. Échantillonnage	58
2.2. Méthodes	58
2.2.1. Mise au point des conditions chromatographiques pour la séparation d'ACE, SAC, APM, AB et AS.....	58
2.2.2. Optimisation de la méthode d'extraction SALLE.....	59
2.3. Méthodologie d'extraction et de préparation des échantillons par la méthode SALLE ...	60
2.4. Choix du protocole expérimental pour la validation analytique de la méthode SALLE-UPLC-UV.....	61
2.5. Préparation des solutions.....	62
2.5.1. Solutions mères	62

2.5.2. Préparation des standards d'étalonnage et de validation.....	62
2.5.2.1. Préparation des solutions de standards d'étalonnage	62
2.5.2.2. Préparation de solutions des standards de validation	63

II. RÉSULTATS ET DISCUSSION

PARTIE EXPÉRIMENTALE 1

1.1. Conditions chromatographiques pour la séparation des additifs alimentaires AB, AS, BHA et BHT	67
1.2. Optimisation de la procédure d'extraction DLLME	68
1.2.1. Sélection du solvant d'extraction et de dispersion	68
1.2.2. Criblage des différents facteurs.....	69
1.2.3. Plan d'optimisation composite centré et les surface de réponses.....	71
1.3. Validation de la méthode analytique DLLME- HPLC- DAD.....	75
1.3.1. Fonction de réponse	75
1.3.2. Traitement des résultats des standards de la validation obtenus par la méthode DLLME- HPLC-DAD.....	78
1.3.2.1. Alignement et prédiction inverse des résultats.....	78
1.3.3. Performances des critères de la méthode d'extraction DLLME- HPLC- DAD.....	80
1.3.3.1. Fidélité.....	80
1.3.3.2. Justesse	80
1.3.3.3. Linéarité	81
1.3.3.4. Profil d'exactitude	83
1.3.3.5. Limite de quantification	84
1.3.3.6. Limite de détection.....	85
1.4. Analyse des échantillons commerciaux et présence des additifs étudiés.....	85

PARTIE EXPÉRIMENTALE 2

2.1. Conditions chromatographiques de séparation des additifs alimentaires ACE, SAC, APM, AB et AS	88
2.2. Optimisation de la procédure d'extraction SALLE.....	89
2.2.1. Sélection du type et le volume du solvant d'extraction	89
2.2.2. Sélection du type et de la quantité de sel	92
2.2.3. Sélection du pH de l'échantillon.....	93

2.3. Validation de la méthode analytique SALLE- UPLC- UV	94
2.3.1. Fonction de réponse	94
2.3.2. Traitement des résultats des SV obtenus par la méthode SALLE- UPLC-UV	98
2.3.2.1. Alignement et prédiction inverse des résultats.....	98
2.3.3. Performances des critères de la méthode d'extraction SALLE- UPLC-UV	99
2.3.3.1. Fidélité.....	99
2.3.3.2. Justesse	100
2.3.3.3. Linéarité	101
2.3.3.4. Profil d'exactitude	105
2.3.3.5. Limite de quantification	107
2.3.3.6. Limite de détection.....	107
2.4. Analyse des échantillons commerciaux et présence des additifs étudiés.....	107
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	108
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	110
ANNEXES : PUBLICATIONS	

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AB	Acide benzoïque
ACE	Acésulfame
ADME	Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion
ALT	Alanine aminotransférase
ANOVA	Analyse de la variance
AS	Acide sorbique
APM	Aspartame
BEH	Ethylene bridged hybrid
BHA	Butylhydroxyanisole
BHT	Butylhydroxytoluène
BPF	Bonne pratique de fabrication
CCD	Plan composite centré
CMEAA	Comité mixte expert sur les additifs alimentaires
CMI	Concentration minimale inhibitrice
C _p	Point au centre
CV	Coefficient de variation
DAD	Détecteur barrette de diode
DJA	Dose journalière admissible
DL ₅₀	Dose létale médiane
DLLME	Microextraction liquide liquide par dispersion
DMENO	Dose minimale avec effets néfastes observés
DMSENO	Dose minimale sans effet néfastes observées
DRf	Dose de référence
EDTA	Ethylène diaminetétraacétique
EI	Etalon interne
FDA	Food Drug Administration
FPM	Force protomotrice
HF LPME	Microextraction liquide liquide assistée par une fibre creuse poreuse
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
HS- SDME	Microextraction liquide liquide par goutte unique en mode espace de tête
ICH	International conference on harmonization
ISO	International standard organization
LC-MS	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse
LDD	Limite de détection
LDQ	Limite de quantification
LDQI	Limite de quantification inférieure
LDQS	Limite de quantification supérieure
LLE	Extraction liquide liquide
LMR	Limite maximale de résidu
LPME	Microextraction en phase liquide

LISTE DES ABRÉVIATIONS

NF	Nombre de points factoriels
NA	Nombre de point axial
OMS	Organisation mondiale de la santé
PAL	phosphatase alcaline
SAC	Saccharine
SALLE	Extraction liquide liquide par salting out
SDME	Microextraction liquide liquide par goutte unique
SE	Standard d'étalonnage
SFSTP	Société Française des Science Technique et Pharmaceutique
SIN	Système international de numérotation
SPE	Extraction en phase solide
SV	Standard de validation
UNUAA	Union des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
UPLC	Chromatographie liquide ultra-haute performance
UV	Ultra-violet

LISTES DES FIGURES

Figure 1 : Illustration de la différence entre l'approche classique et l'approche "aptitude à l'usage" de validation analytique. Cercle discontinu représente la fidélité de la méthode et le cercle continu représente les limites d'acceptation	35
Figure 2 : Algorithme de sélection du protocole de validation analytique.	36
Figure 3 : Les principales approches proposées dans la littérature pour la détermination de la LDD.....	41
Figure 4 : Les étapes de la procédure de la méthode DLLME-HPLC-DAD	54
Figure 5 : Effet du sulfate d'ammonium sur les compositions en phase d'équilibre de l'éthanol (1) + (NH ₄) ₂ SO ₄ (2) + H ₂ O (3) ATPS à 298.15 K.....	60
Figure 6 : Les étapes de la méthode d'extraction SALLE -UPLC-UV	61
Figure 7 : Chromatogramme de la solution standard. Identification des pics : (1) AB, (2) AS, (3) EI, (4) BHA et (5) (BHT)	68
Figure 8 : Sélection du solvant d'extraction et de dispersion pour la méthode DLLME.	69
Figure 9 : Diagramme de Pareto des effets principaux normalisés pour le plan de criblage (la réponse est la somme des pics des composés analysés ; $\alpha = 0.05$). X1 (pH de l'échantillon), X2 (volume du solvant d'extraction), X3 (volume du solvant dispersion) et X4 (quantité de NaCl).	70
Figure 10 : Les réponses calculées en fonction des réponses réelles.	73
Figure 11 : Les graphes des surfaces de réponses 3D estimées pour l'optimisation du plan centré composite de la DLLME montrant l'effet de la quantité de NaCl et du pH (A), le volume de chloroforme et d'acétone (B) et la quantité de NaCl et le volume de chloroforme (C)	75
Figure 12 : Relation linéaire entre les concentrations introduites et calculées après prédiction inverse en utilisant le modèle sélectionné pour chaque additif alimentaire AB (A), AS (B), BHA (C) et BHT (D)	82
Figure 13 : Les profils linéaires de la méthode analytique DLLME- HPLC- DAD exprimés en valeurs des concentrations pour AB (A), AS (B), BHA (C) et BHT (D). La ligne continue est la ligne d'identité ($y = x$), les lignes discontinues correspondent aux limites de tolérance inférieures et supérieures du profil d'exactitude et les lignes pointillées représentent les limites d'acceptation λ fixées à $\pm 30\%$	83

LISTES DES FIGURES

- Figure 14 : Représentation schématique des profils d'exactitude obtenus pour AB (A), AS (B), BHA (C) et BHT (D). Les lignes discontinues sont les limites de tolérance inférieures et supérieures calculées au risque β de 80 %, les lignes pointillées sont les limites d'acceptation inférieures et supérieures λ fixées à ± 30 % et la ligne continue est le biais relatif. 84
- Figure 15 : Chromatogramme de la solution standard des additifs alimentaires étudiées ACE, SAC, APM, AB et AS 89
- Figure 16 : Influence du type de solvant d'extraction (A), du rapport acétone : éthanol (B) et de volume du solvant d'extraction (C) sur l'efficacité de la méthode SALLE. Conditions d'extraction : (A) volume du solvant d'extraction, 1 mL ; quantité de sulfate d'ammonium, 1.7-2.05 g/3 mL et pH, 2 ; (B) volume de solvant d'extraction, 1 mL ; quantité de sulfate d'ammonium, 1.7 g/ 3 ml et pH, 2 ; (C) ; solvant d'extraction, éthanol : acétone (50 :50 v/v) ; quantité de sulfate d'ammonium, 1.7 g/3 ml et pH, 2..... 91
- Figure 17 : Influence de la quantité de sel sur l'efficacité de la méthode SALLE. Conditions d'extraction : solvant d'extraction éthanol : acétone (50 :50 v/v) ; volume du solvant d'extraction 0.5 mL et pH, 2..... 93
- Figure 18 : Influence du pH sur l'efficacité de la méthode SALLE. Conditions d'extraction : solvant d'extraction, éthanol : acétone (50 :50 v/v) ; volume du solvant, 0.5 mL ; quantité de sulfate d'ammonium, 1.7 g/3 mL. 94
- Figure 19 : Relation linéaire entre les concentrations introduites et les concentrations calculées après prédiction inverse en utilisant le modèle mathématique sélectionné pour chaque additif alimentaire ACE (A), SAC (B), APM (C), AB (D) et AS (E) 102
- Figure 20 : Les profils linéaires de la méthode analytique SALLE- HPLC-UV exprimés en valeur de concentrations calculées et introduites pour ACE (A), SAC (B), APM (C), AB (D) et AS (E). La ligne continue est la ligne d'identité ($y = x$), les lignes discontinues correspondent aux limites de tolérance inférieures et supérieures du profil d'exactitude, les lignes pointillées représentent les limites d'acceptation λ fixées à ± 30 % 104
- Figure 21 : Représentation schématique des profils d'exactitude obtenus pour ACE (A), SAC (B), APM(C), AB(D) et AS (E). Les lignes discontinues sont les limites de tolérance inférieures et supérieures calculées au risque $\beta = 80$ %, Les lignes pointillées sont les limites d'acceptation inférieures et supérieures λ fixées à ± 30 % et la ligne continue est le biais relatif. 106

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Différentes fonctions de réponse testées selon l'approche du profil d'exactitude...	37
Tableau II. Structures chimiques et propriétés des additifs alimentaires étudiés.....	44
Tableau III. Le choix du nombre de SE et SV selon le protocole expérimental choisi	46
Tableau IV. Les noms des différentes marques, codification et le nombre d'unités des échantillons analysés.	50
Tableau V. La matrice du plan factoriel complet à deux niveaux (2^k) utilisé pour le criblage des différents facteurs qui ont une influence sur la méthode DLLME et les résultats analytiques obtenus pour les additifs alimentaires AB, AS, BHA et BHT étudiés.....	52
Tableau VI. La matrice du plan composite centré appliquée pour l'optimisation de la DLLME et les résultats analytiques obtenus.....	53
Tableau VII. Le protocole expérimental de la validation de la méthode analytique DLLME-HPLC-DAD.....	55
Tableau VIII. Les noms des différentes marques, codification et le nombre d'unités des échantillons analysés	58
Tableau IX. Le protocole expérimental de la validation de la méthode SALLE- UPLC-UV..	62
Tableau X. Le programme d'élution en mode gradient et les autres conditions chromatographiques appliqués pour l'analyse des additifs alimentaires AB, AS, BHA et BHT étudiés par la méthode DLLME- HPLC-DAD	67
Tableau XI. Les résultats de l'ANOVA pour le modèle quadratique des surfaces de réponse	72
Tableau XII. Les résultats analytiques obtenus pour les SE pour les additifs alimentaires AB, AS, BHA et BHT étudiés par DLLME-HPLC-DAD.....	76
Tableau XIII. Les différentes fonctions de réponse choisies pour les additifs alimentaires AB, AS, BHA et BHT étudiés par la méthode DLLME- HPLC- DAD	77
Tableau XIV. Les coefficients de détermination (R^2) obtenus pour les différentes courbes d'étalonnage des additifs alimentaires AB, AS, BHA et BHT étudiés par la méthode DLLME-HPLC- DAD.....	77

LISTE DES TABLEAUX

Tableau XV. Les résultats analytiques obtenus pour les SV des additifs alimentaires AB, AS, BHA et BHT étudiés par la méthode DLLME- HPLC-DAD	78
Tableau XVI. Les résultats de prédiction inverse obtenus sur les données analytiques des SV pour les additifs alimentaires AB, AS, BHA et BHT étudiés par la méthode DLLME- HPLC-DAD	79
Tableau XVII. La répétabilité et la fidélité intermédiaire obtenues pour les additifs alimentaires AB, AS, BHA et BHT étudiés par la méthode DLLME- HPLC- DAD	80
Tableau XVIII. La justesse obtenue pour les additifs alimentaires AB, AS, BHA et BHT étudiés par la méthode DLLME- HPLC- DAD	81
Tableau XIX. Les paramètres de régression obtenus pour les additifs alimentaires AB, AS, BHA et BHT étudiés par la méthode DLLME-HPLC- DAD.....	82
Tableau XX. Les LDD et les LDQ obtenus pour les additifs alimentaires AB, AS, BHA et BHT étudiés par la méthode DLLME- HPLC-DAD	85
Tableau XXI. Les résultats analytiques du dosage des additifs alimentaires AB, AS, BHA et BHT étudiés par la méthode DLLME-HPLC-DAD dans les échantillons commerciaux.....	87
Tableau XXII. Le programme d'élution en mode gradient et les autres conditions chromatographiques appliqués pour l'analyse des additifs alimentaires ACE, SAC, APM, AB et AS étudiés par la méthode SALLE- UPLC-UV.....	88
Tableau XXIII. Les résultats analytiques obtenus pour les SE des additifs alimentaires ACE, SAC, APM, AB et AS étudiés par la méthode SALLE- UPLC-UV.....	95
Tableau XXIV. Les différentes fonctions de réponse choisies pour les additifs alimentaires ACE, SAC, APM, AB et AS étudiés par la méthode SALLE- UPLC-UV.....	96
Tableau XXV. Les coefficients de détermination (R^2) obtenus pour les différentes courbes d'étalonnage des additifs alimentaires ACE, SAC, APM, AB et AS étudiés par la méthode SALLE- UPLC-UV.....	96
Tableau XXVI. Les résultats analytiques obtenus pour les SV des additifs alimentaires ACE, SAC, APM, AB et AS étudiés par la méthode SALLE- UPLC-UV.....	97

LISTE DES TABLEAUX

Tableau XXVII. Les résultats de prédiction inverse obtenus sur les données analytiques des SV des additifs alimentaires ACE, SAC, APM, AB et AS étudiés par la méthode SALLE- UPLC-UV	98
Tableau XXVIII. La répétabilité et la fidélité intermédiaire obtenues pour les additifs alimentaires ACE, SAC, APM, AB et AS étudiés par la méthode SALLE- UPLC-UV	100
Tableau XXIX La justesse obtenue pour les additifs alimentaires ACE, SAC, APM, AB et AS étudiés par la méthode SALLE- UPLC-UV	101
Tableau XXX. Les paramètres de régression obtenus pour les additifs alimentaires ACE, SAC, APM, AB et AS étudiés par la méthode SALLE- UPLC-UV	103
Tableau XXXI. Les LDD et les LDQ obtenues pour les additifs alimentaires ACE, SAC, APM, AB et AS étudiés par la méthode SALLE- UPLC-UV	107
Tableau XXXII. Les résultats analytiques du dosage des additifs alimentaires ACE, SAC, APM, AB et AS étudiés par la méthode SALLE- UPLC-UV dans les échantillons commerciaux...	109

RÉSUMÉ

Aujourd'hui, plus de 3000 additifs alimentaires classés en environ 25 catégories fonctionnelles sont utilisés dans l'industrie agroalimentaire pour leurs différents rôles organoleptiques et la conservation des aliments. Malgré tous les avantages que présentent ces additifs alimentaires, les risques sanitaires liés à ces composés tels que les hypersensibilités, les effets toxiques et cancérigènes sont également préoccupants.

L'objectif principal de cette thèse consiste en la recherche et la détermination des niveaux de concentrations d'utilisation de certains additifs alimentaires (l'acide benzoïque et l'acide sorbique ou leurs sels, le butylhydroxyanisole, le butylhydroxytoluène, l'acésulfame, la saccharine ou leurs sels et l'aspartame) dans les échantillons de jus de fruits commercialisés dans la région de Tizi Ouzou. Cela a été réalisé après optimisation et validation de méthodes analytiques rapides, simples et peu coûteuses qui sont la DLLME-HPLC-DAD et la SALLE-UPLC-UV. La validation de ces techniques s'est faite par la méthodologie statistique du profil d'exactitude basée sur l'erreur totale qui a été développée par la Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutique (SFSTP).

Les résultats de validation obtenus étaient satisfaisants et acceptables. Pour la DLLME-HPLC-DAD, une bonne fidélité est obtenue avec des CV de répétabilité et de fidélité intermédiaire de 1.97-10.7% et de 2.31-11.9%, respectivement et les recouvrements relatifs sont de 96.2- 105.4%. Pour la SALLE-UPLC-UV, les CV sont de 1.24 à 7.99% pour la répétabilité et de 1.69 à 9.16% pour la fidélité intermédiaire et les recouvrements relatifs sont de 84.97 à 122%.

Les résultats obtenus pour les échantillons commerciaux analysés montrent que seuls les deux conservateurs l'acide benzoïque et l'acide sorbique ou leurs sels ont été quantifiés dans certaines marques. En ce qui concerne le butylhydroxyanisole, le butylhydroxytoluène, l'acésulfame, la saccharine et l'aspartame, aucun de ces composés n'a été détecté ou quantifié dans les produits analysés. Les résultats obtenus pour l'acide benzoïque et l'acide sorbique ou leurs sels ne sont pas conformes à la législation Algérienne qui interdit leur utilisation dans les jus de fruits. Par ailleurs, ces résultats sont en accord avec la norme du *Codex Alimentarius* qui a fixé une limite maximale de résidu (LMR) de 1000 µg/mL pour ces deux conservateurs. De plus, ces résultats sont globalement, en accord avec les directives de la Commission Européenne excepté pour deux marques qui dépassent 200 µg/mL pour les deux composés.

Mots-clés : Additifs alimentaires, extraction, optimisation et validation des méthodes, jus de fruits, analyse, effets sur la santé.

ABSTRACT

Nowadays, more than 3000 food additives classified in 25 functional categories are used in the food industry for their different organoleptic roles and foods preservation. Despite all these benefits of food additives, the different health risks associated with these compounds such as hypersensitivity, toxic and carcinogenic effects are also of concern.

The main objective of this thesis is the search and the determination of the concentration levels of use of certain food additives (benzoic and sorbic acid or their salts, butylhydroxyanisole, butylhydroxytoluene, acesulfame, saccharin or their salts and aspartame) in the fruits juices samples marketed in the region of Tizi Ouzou. This is achieved after optimization and validation of a fast, simple, inexpensive analytical technique that are the DLLME-HPLC-DAD and the SALLE-UPLC-UV. The validation of this technique was carried out by the statistical methodology of the accuracy profile based on the total error which is developed by the French Society of Technical and Pharmaceutical Sciences (SFSTP).

The validation results obtained were satisfying and acceptable. In the case of DLLME-HPLC-DAD, a good precision is obtained with CV of repeatability and intermediate precision of 1.97-10.7 % and 2.31- 11.9 %, respectively and the relative recoveries are of 96.2 - 105.4 %. For SALLE-UPLC-UV, the CV are 1.24 to 7.99 % for repeatability and 1.69 to 9.16% for intermediate precision and relative recoveries are 84.97 to 122 %.

The results obtained for the analyzed commercialized samples showed that only the two preservatives benzoic and sorbic acid or their salts have been quantified in some brands. For butylhydroxyanisole, butylhydroxytoluene, acesulfame, saccharin and aspartame, none of these compounds were detected or quantified in the analyzed products. The results obtained for benzoic and sorbic acids or their salts do not comply with the Algerian legislation which prohibits their use in fruit juices. In addition, these results are in agreement with *Codex Alimentarius* standards which set a maximum residue limit (MRL) of 1000 µg / mL for these two preservatives. In addition, these results are globally in agreement with European Commission guidelines except for two brands those exceed 200 µg / mL for both compounds.

Keywords: Food additives, extraction, methods optimization and validation, fruits juices, analysis, health effects.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les aliments sont des composés organiques de sources animales et végétales considérés comme l'une des principales exigences pour la survie de l'homme. Généralement, les aliments ne sont pas consommés crus ; plutôt, ils nécessitent des traitements et des transformations technologiques.

Depuis les temps préhistoriques, les additifs alimentaires ont été utilisés et incorporés dans les aliments pour assurer différentes fonctions telles que la conservation et l'amélioration des caractéristiques organoleptiques des aliments. Ces composés, d'origine naturelle ou bien synthétique sont généralement sans valeur nutritive appréciable et sont ajoutés dans les aliments à des petites quantités pendant les processus technologiques de transformation (SILVA et LIDON, 2016).

Le développement et les progrès enregistrés dans le domaine des industries agroalimentaires et les technologies agroalimentaires vers le 20^{ème} siècle ont eu un impact positif sur l'augmentation d'utilisation des additifs alimentaires (PANDEY et UPADHYAY, 2012) et vice versa, le succès économique de ces composés a encouragé d'avantage l'avènement des nouvelles technologies agroalimentaires (MSAGATI, 2013).

Les additifs alimentaires sont généralement ajoutés intentionnellement dans les denrées alimentaires pour leurs différents rôles tels que l'augmentation de la durée de conservation d'un produit alimentaire et la modification ou l'amélioration de ses caractéristiques organoleptiques y compris l'apparence, le goût, la structure et sans modifier sa valeur nutritive. Il existe d'autres apports bénéfiques majeurs tels qu'un approvisionnement alimentaire, un choix important des produits alimentaires à des prix réduits (BRANEN et HAGGERTY, 2001).

Malgré tous les avantages et apports bénéfiques, il existe un danger lié à ces composés et aux métabolites de leur dégradation. Par conséquent, les recherches concernant les effets toxiques sur la santé et les méthodes de détection des additifs alimentaires ne cessent de croître. Les risques sanitaires et les effets toxiques de ces composés restent encore ambigus et ils font l'objet de beaucoup de spéculations, d'incohérences et de polémiques et d'un ample débat (CAROCHO *et al*, 2014). Cela est dû au fait qu'une comparaison entre les effets bénéfiques et les risques de chaque additif peut être difficile à réaliser et à estimer (SUMNER et EIFERT, 2001).

Ces composés doivent être utilisés à des concentrations de sécurité de manière à qu'ils ne présentent aucun effet néfastes sur la santé. Ainsi, il est important de règlementer

INTRODUCTION GÉNÉRALE

l'utilisation de ces composés dans les aliments. En d'autres mots, les industriels doivent veiller à respecter les seuils et les LMR d'utilisation des additifs alimentaires fixés par les organismes nationaux et internationaux et sans dépasser ces seuils pour s'assurer que la prise d'un additif donné de toutes les sources ne dépasse pas la dose journalière acceptable afin de protéger la santé des consommateurs.

Au vu de la grande diversité des additifs alimentaires qui présentent différentes propriétés physicochimiques et qui peuvent être utilisés simultanément dans les matrices alimentaires complexes, des méthodes d'extraction et de détection simultanées doivent être utilisées pour l'analyse simultanée de ces composés.

La présence des macromolécules telles que les protéines, les lipides, les glucides et les polysaccharides et d'autres composés notamment les sels, les surfactants, les pigments et les émulsions peuvent interférer dans l'analyse des composés d'intérêt. Ainsi, le prétraitement des échantillons d'aliments et l'application des méthodes d'extraction est primordiale avant l'analyse instrumentale, pour éliminer autant de composés interférents que possible, réduire l'effet matrice et concentrer les composés étudiés.

Le choix de la méthode adéquate pour la préparation et l'extraction des échantillons dépend de leur nature liquide ou solide. Ces composés sont souvent détectés par plusieurs méthodes analytiques notamment la chromatographie à haute et ultrahaute performance en phase inverse couplées aux différents détecteurs tels que le détecteur UV visible et barrette de diode. Les principaux avantages de ces techniques sont la grande diversité de phases stationnaires, la sensibilité élevée suite à l'utilisation de différents types de détecteurs et la résolution appropriée entre les composés analysés.

Les jus de fruits sont très consommés dans le régime alimentaire Algérien, ces boissons peuvent être une source importante de différents additifs alimentaires. Prenant en compte ces informations, l'objectif principal de ce travail consiste en la recherche et le dosage de certains additifs alimentaires pour estimer l'aspect qualité et de voir si les industriels respectent la réglementation en vigueur sur l'utilisation des additifs alimentaires dans les jus de fruits.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Selon le contexte général de la thématique traitée, nous avons axé la partie de synthèse bibliographique en différent chapitre :

- ✓ Généralités sur additifs alimentaires.
- ✓ Réglementations sur l'utilisation des additifs alimentaires et leurs effets sur la santé.
- ✓ Les différentes méthodologies d'analyse utilisées dans la partie expérimentale (Méthodologie de préparation des échantillons, d'optimisation et de validation des méthodes analytiques).

Pour la partie expérimentale de ce travail, deux méthodes analytiques : DLLME-HPLC-DAD et la SALLE-UPLC-UV rapides, simples et peu coûteuses sont optimisées et validées, ensuite appliquées pour l'analyse de quelques additifs alimentaires qui sont les conservateurs antimicrobiens, les antioxydants et les édulcorants dans les échantillons de jus de fruits commercialisés dans la région de Tizi Ouzou.

En effet, le travail expérimental de cette thèse est réparti en deux parties :

✓ Partie expérimentale 1

Cette première partie est consacrée à la recherche et dosage simultané de l'acide benzoïque et sorbique et leurs sels, le butylhydroxyanisole et le butylhydroxytoluène par la méthode de microextraction liquide liquide par dispersion couplée à la chromatographie liquide haute performance et détecteur barrette de diode (DLLME- HPLC-DAD).

✓ Partie expérimentale 2

Cette deuxième partie est consacrée à la recherche et dosage simultané de l'acésulfame, la saccharine, l'aspartame, l'acide benzoïque, l'acide sorbique et leurs sels par la méthode d'extraction liquide liquide par salting out couplée à la chromatographie liquide ultrahaute performance détecteur UV visible (SALLE- UPLC-UV).

PREMIÈRE PARTIE :
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités sur les additifs alimentaires

1.1. Aperçu et historique d'utilisation

Depuis les temps préhistoriques, l'homme recherche les meilleures méthodes et moyens pour préserver les aliments et améliorer leurs caractéristiques organoleptiques telles que l'apparence, l'odeur, le goût et la texture (CAROCHO *et al*, 2014). Depuis 5000 ans, le vinaigre était utilisé pour décorer les légumes, le salage et le fumage pour conserver la viande et le poisson, les herbes pour améliorer le goût, la coloration et l'apparence des aliments (TOMASKA et BROOKE-TAYLOR, 2012). En 1833, le chimiste Français Boussingault a recommandé l'addition d'iode au sel de table pour corriger les carences alimentaires en ce composé et prévenir le goître (BRANEN et HAGGERTY, 2001). L'acide borique a été largement utilisé comme conservateur entre les années 1870 et 1920 (PANDEY et UPADHYAY, 2012). Les édulcorants artificiels non nutritifs ont été très utilisés pendant la première et la deuxième guerre mondiale suite à la crise agricole et la diminution dans la production de sucre (MOORADIAN *et al*, 2017). Vers le 19^{ème} et la mi du 20^{ème} siècle, ces composés ont connu une large utilisation dans l'industrie agroalimentaire.

1.2. Définition

On entend par additif alimentaire, «Toute substance habituellement non consommée comme aliment en soi et non utilisée comme ingrédient caractéristique dans l'alimentation, possédant ou non une valeur nutritive, et dont l'adjonction intentionnelle aux denrées alimentaires, dans un but technologique, au stade de leur fabrication, transformation, préparation, traitement, conditionnement, transport ou entreposage a pour effet, ou peut raisonnablement être estimée avoir pour effet, qu'elle devient elle-même ou que ses dérivés deviennent, directement ou indirectement, un composant de ces denrées alimentaires» (ANONYME, 2008).

1.3. Système de numérotation

En Europe, depuis les années 1960, un système de numérotation de tous les additifs approuvés est mis en place. Ce système consiste en l'attribution pour chaque additif alimentaire d'une lettre «E» suivie d'un numéro (SALTMARSH, 2014). Au niveau international et à l'exception des pays européens, le comité exécutif de la commission du *Codex Alimentarius* a mis au point un système de numérotation inspiré de celui européen en remplaçant la lettre «E» par «SIN» qui est l'abréviation de système international du numérotation.

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Les plages (les intervalles) des numéros sont affectées aux additifs alimentaires ayant les mêmes rôles de sorte qu'elles donnent des informations sur le but principal de l'additif même sans connaître son nom (ANONYME¹, 1989 ; TOMASKA et BROOKE-TAYLOR, 2012). Il est à noter que certains pays tels que l'Australie, la Nouvelle-Zélande et l'Inde utilisent uniquement le numéro sans l'abréviation «SIN».

1.4. Différentes catégories fonctionnelles

Il existe environ 3000 additifs alimentaires, seulement ceux les plus importants et les plus utilisés sont décrits pour chaque catégorie fonctionnelle (CAROCHO *et al*, 2014). Ces catégories sont :

1.4.1. Conservateurs

Les conservateurs sont probablement la catégorie des additifs alimentaires la plus utilisée suite à leur rôle important dans la conservation des denrées alimentaires. Cette catégorie est divisée en trois principales sous-catégorie qui sont les agents antimicrobiens, les antioxydants et les agents anti brunissement (BRANEN et HAGGERTY, 2001 ; CAROCHO *et al*, 2015).

1.4.1.1. Agents antimicrobiens

Les agents antimicrobiens sont les conservateurs qui jouent un rôle en combinaison avec les bonnes pratiques de fabrication (BPF) pour assurer la sécurité sanitaire des produits alimentaires (SMITH, 1991). Ces agents sont de différentes sources animales, végétales et microbiennes (les bactériocine). Ces additifs comprennent les phosphates, les sulfites, le diméthyle dicarbamate, lysozyme, natamycine, lactoperoxidase, lactoferrine, la nisine, les nitrates et les nitrites, les acides organiques et leurs sels de sodium, potassium et calcium (acide acétique, lactique, benzoïque, propionique, sorbique, citrique, fumarique et d'autres. Les esters alkyliques (méthyle, éthyle, propyle, butyle et heptyle) de l'acide p-hydroxybenzoïque connus collectivement sous le nom de parabènes. Les huiles essentielles classées comme agents antimicrobiens sont notamment l'huile d'origan, le thymol, le carvacrol, l'huile de girofle, l'huile de cannelle sont parmi les plus importants (CAROCHO *et al*, 2015).

1.4.1.2. Antioxydants

Les antioxydants sont des additifs alimentaires qui proviennent de sources naturelles et synthétiques (MSAGATI, 2013). Les antioxydants naturels sont des composés endogènes

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

qu'on trouve principalement dans les végétaux (plantes, fruits et légumes) et dans les viandes. Les composés phénoliques constituent le groupe le plus intéressant des antioxydants naturels d'origine végétale tels que les acides phénoliques (acides hydroxybenzoïque ou hydroxy cinnamiques) et les flavonoïdes (les anthocyanes, les tanins, les lignanes, les stilbènes et les coumarines) (CAROCHO *et al*, 2015).

Les antioxydants synthétiques sont des composés qui contiennent une fonction phénolique avec diverses substitutions de cycle (MSAGATI, 2013). Les composés les plus utilisés sont principalement le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT) (BUCK, 1991). Ces composés synthétiques sont utilisés pour remplacer les composés naturels thermolabiles.

1.4.1.3. Agents anti brunissement

Le brunissement des aliments est une réaction qui se fait par deux voies, une voie enzymatique et une voie non enzymatique. La vitamine C (E300), l'acide citrique (E330) et le sulfite de sodium (E221) sont les additifs les plus couramment utilisés comme agents anti brunissement. Ces additifs sont classés comme antioxydants ou conservateurs dans le système SIN et ils gardent les mêmes numéros que ceux de système européen sans utilisation de la lettre E (BRANEN et HAGGERTY, 2001).

Les sulfites sont les additifs les plus utilisés pour contrôler le brunissement enzymatique et non enzymatique (SAPERS *et al*, 2001 ; CAROCHO *et al*, 2014). D'autres substituts des sulfites sont utilisés y compris l'acide kojique, les halogénures, les acides phénoliques, les agents chélatants (l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA)), les agents réducteurs (l'acide ascorbique, le dithiothréitol, quinoniques (cystéine) et les composés de liaison au substrat tels que polyvinylpolypyrrolidone et β -cyclodextrine) (SAPERS *et al*, 2001 ; CAROCHO *et al*, 2014).

1.4.2. Agents aromatisants

Les agents aromatisants constituent la catégorie qui comprend le plus grand nombre d'additifs alimentaires. Ils sont classés en trois principales sous-catégories qui sont les édulcorants, les arômes naturels et synthétiques et les exhausteurs de goût (MSAGATI, 2013 ; CAROCHO *et al*, 2014).

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.4.2.1. Édulcorants

Les édulcorants font partie de la catégorie des additifs alimentaires utilisés pour accomplir certaines fonctions telles que : l'amélioration de la saveur des aliments, leurs donner une sensation de douceur (MSAGATI, 2013). Cette catégorie est divisée en édulcorants nutritifs et non nutritifs.

La catégorie des édulcorants nutritifs comprend les monosaccharides, les disaccharides et les oligo et polysaccharides (MARIE, 1991 ; MSAGATI, 2013 ; EDWARDS *et al*, 2016). Les polyols ou bien les sucres alcools présentent un autre groupe des édulcorants nutritifs. Ces composés sont naturellement présents dans les fruits et les légumes et synthétisés par les champignons, les levures, les algues et par certaines bactéries lactiques (CHAN, 2014). La synthèse industriel de ces composés consiste à l'hydrogénation des mono ou disaccharides en remplaçant le groupement aldéhyde par un groupement hydroxyle.

D'autres édulcorants non nutritifs plus sucrés que le saccharose ont été synthétisés et utilisés en petite quantité pour remplacer les édulcorants nutritifs utilisés en grandes quantités (MSAGATI, 2013). Ces édulcorants sont d'origine synthétique ou bien extrait à partir de différentes plantes. Les composés synthétiques comprennent principalement la saccharine, le cyclamate, l'aspartame, l'acésulfame et le sucralose. Les composés naturels comprennent la monelline, la miraculine, la glycyrrhizine, la phyllo dulcine, la thaumatine et la stevia extrait de la plante *Stevia rebaudiana* (SALMINEN et HALLIKAINEN, 2001 ; MSAGATI, 2013 ; CAROCHO *et al*, 2014 ; EDWARDS *et al*, 2016).

1.4.2.2. Arômes naturels et synthétiques

La Society of Flavor Chemists (ANONYME, 1969) a défini «Un arôme comme étant une entité chimique unique ou un mélange de produits chimiques d'origine naturel ou synthétique, dont le but principal de leur utilisation est de fournir tout ou une partie de l'effet particulier à tout aliment ou autre produit pris dans la bouche ».

Il existe six catégories d'arômes : composés aromatisants naturels d'origine végétales, composés aromatiques synthétique identiques à ceux naturels, les arômes synthétiques, arômes de fumée et les préparations aromatisantes (SINKI et GORDON, 2001 ; MSAGATI, 2013). Les composés aromatiques naturels sont d'origine végétales extraits à partir des fruits, légumes,

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

épices et d'origine animales extraits à partir de la viande et du lait (SINKI et GORDON, 2001 ; MSAGATI, 2013).

Ces composés peuvent être utilisés comme substituts en cas de perte de saveur pendant le traitement de production ou pour masquer les arômes indésirables dans certains produits alimentaires (MSAGATI, 2013).

1.4.2.3. Exhausteurs de goût

Les exhausteurs de goût sont des additifs alimentaires qui n'ont pas leur propre et spécifique goût, ils sont utilisés pour amplifier, compléter l'effet d'autres arômes et pour améliorer le goût original des aliments (SUGITA, 2001 ; CAROCHO *et al*, 2014; CHAN, 2014).

Il existe plusieurs composés exhausteurs du goût principalement : les acides organiques et leurs sels, les acides aminés (l'aspartame de sodium et l'acide glutamique et ses sels) (SUGITA, 2001 ; CAROCHO *et al*, 2014).

1.4.3. Colorants

Les colorants (SIN 100- 182) jouent incontestablement un rôle clé dans le choix d'un aliment, son identification, la perception de sa fraîcheur/maturité et de sa qualité sanitaire. Les colorants sont utilisés dans les aliments comme additif depuis longtemps pour améliorer l'attractivité, masquer les variations de couleur naturelle et pour compenser les pertes causées lors de traitement, de stockage et de transport des aliments (MSAGATI, 2013 ; CAROCHO *et al*, 2014 ; SOLYMOSI *et al*, 2015).

Les colorants alimentaires sont classés en trois principales sous catégories : les colorants alimentaires naturels, synthétiques identiques aux colorants naturels et les colorants artificiels synthétiques (MSAGATI, 2013).

1.4.3.1. Colorants naturels

Les colorants naturels sont des composés extraits à partir des fruits, des végétaux, des insectes, des algues ou bien synthétisés par les microorganismes (bactéries et les champignons) (MSAGATI, 2013 ; RODRIGUEZ-AMAYA, 2015).

Ces composés comprennent les flavonoïdes, le caramel obtenu par cristallisation des sucres après chauffage et l'acide carminique. Les caroténoïdes sont des colorants allant du jaune

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

à orange. D'autres colorants comprennent les pigments verts naturels tels que la chlorophylle, la chlorophylline et la chlorophylle de cuivre (SOLYMOSI *et al*, 2015).

Les colorants naturels sont extraits à partir des microorganismes tels que monascus, les plus connues sont ceux produites par *Monascus anka* et de *Monascus purpureus*. Les pigments des algues sont extraits principalement à partir des algues rouges (Rhodophycées), les algues bleus-vertes (Cyanophycées) et les algues Cryptomonadales (Cryptophycées) (RAYNER, 1991). Ces colorants sont instables vis-à-vis de l'acidité de milieu, de la chaleur et de la lumière (RAYNER, 1991 ; MSAGATI, 2013 ; RODRIGUEZ-AMAYA, 2015).

1.4.3.2. Colorants synthétiques

Les colorants synthétiques qui présentent certains avantages tels que la stabilité vis à vis de l'acidité de milieu et de la lumière ont été utilisés pour remplacer les colorants naturels instables (RAYNER, 1991). Il existe cinq sous catégories de colorants synthétiques qui sont les composés azoïques, les dérivés de chinophtalone, de jaune de quinoléine, les triarylméthane, les xanthènes et les colorants indigo (CAROCHO *et al*, 2014).

Les composés azoïques comprennent la tartrazine, jaune soleil, rouge allura, amarante, carmoisine. Les dérivés de chinophtalone tels que jaune quinoline. Les triarylméthane comprennent le bleu brillant, vert vif, vert brillant, vert S, noir brillant, le bleu patenté V. Les xanthènes comprennent l'érythrosine, la fluorescéine, l'éosine et la rhodamine et les colorants indigo connu sous le nom de FD & C Blue (RAYNER, 1991 ; CAROCHO *et al*, 2014 ; KÖNIG, 2015).

1.4.3.3. Colorants synthétiques identiques aux colorants naturels

Cette sous-catégorie de colorants inclut quelques exemples tels que le β -carotène, la canthaxanthine et la riboflavine (MSAGATI, 2013).

1.4.4. Agents texturant

Les agents texturants sont divisés en deux sous catégories : les émulsifiants et les stabilisants. Ces composés sont utilisés en grande quantité par rapport aux autres additifs alimentaires pour modifier la texture globale ou donner une sensation aux produits alimentaires dans la bouche (BRANEN *et al*, 2001 ; CAROCHO *et al*, 2014).

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.4.4.1. Émulsifiants

Les émulsifiants sont des agents tensio-actifs utilisés principalement pour stabiliser une émulsion hétérogène constituée d'au moins un liquide immiscible dispersé dans un autre liquide sous forme de gouttelettes ou de cristaux liquides de diamètre qui dépasse généralement 0.1 µm. Ces agents entourent les substances non miscibles telles que les huiles présentes dans la denrée alimentaire pour éviter leur agglomération (MAHUNGU et ARTZ, 2001; MSAGATI, 2013 ; CAROCHO *et al*, 2013). Ces additifs sont divisées en émulsifiants naturels et synthétiques.

a- Émulsifiants naturels

Les premiers émulsifiants alimentaires utilisés comme composés majeurs dans l'industrie alimentaire étaient des substances naturelles telles que les gommes, les polysaccharides et la lécithine.

b- Émulsifiants synthétiques

Les émulsifiants alimentaires chimiquement synthétisés sont les plus utilisés par rapport aux émulsifiants naturels (KAMEL, 1991). Cette catégorie comprennent les mono et di glycérides, les esters d'acides gras, les dérivés éthoxylés de monoglycérides et les esters de sorbitan connus comme polysorbate 20, 60 et 80 (MAHUNGU et ARTZ, 2001 ; KAMEL, 1991 ; CAROCHO *et al*, 2014).

1.4.4.2. Agents stabilisants

Les agents stabilisants sont des composés ajoutés dans les denrées alimentaires pour donner ou maintenir la texture souhaitée pour un aliment et pour empêcher l'évaporation et la détérioration des huiles aromatiques volatiles (BRANEN *et al*, 2001 ; CAROCHO *et al*, 2014). Les stabilisants les plus répandus sont l'acide alginique et ses sels, le carraghénane, la gomme de caroube et la pectine (CAROCHO *et al*, 2014).

1.4.5. Agents divers

Il existe de nombreux autres additifs alimentaires utilisés comme agents divers. Ces composés appartiennent à plusieurs autres catégories principalement : les agents chélatants, les enzymes et les agents anti-mousses. Il existe d'autres catégories telles que les agents de finition de la surface, les catalyseurs, les solvants, les lubrifiants et les agents propulseurs, ces composés

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

sont utilisés pour obtenir des résultats spécifiques (BRANEN *et al*, 2001 ; CAROCHO *et al*, 2014).

1.4.5.1. Agents chélatants

Les agents chélatants principalement l' EDTA et l'acide citrique sont des composés utilisés dans les aliments essentiellement pour former des complexes ou des chélates solubles dans l'eau pour éliminer certains effets indésirables des composés qui proviennent de la dégradation des denrées alimentaires et qui entraînent la précipitation, la décoloration, le rancissement ou la perte de qualité nutritionnelle d'un produit alimentaire (NAUTA, 1991).

1.4.5.2. Enzymes

Les enzymes sont considérées comme des additifs alimentaires ou des auxiliaires technologiques (KILARA et DESAI, 2001 ; TEREFE *et al*, 2014). Ces composés sont utilisés principalement dans les industries alimentaires traditionnelles pour l'amélioration de la qualité et les caractéristiques des produits traditionnels ou dans la production de nouveaux aliments (KILARA et DESAI, 2001).

1.4.5.3. Agents antimoussants

Dans l'industrie agroalimentaire, la production de certains produits en particulier les boissons gazeuses et les sucres à partir de la betterave sont accompagnées par la formation des mousses (MSAGATI, 2013). Ces derniers sont des dispersions gaz-liquide avec une teneur en gaz (CO₂) supérieure à 90 % et qui s'accumule à la surface de la phase liquide en tant que matière visqueuse stable (KOUGIAS *et al*, 2013). Pour corriger ces problèmes, des agents antimoussants sont utilisés pour diminuer la tension superficielle et la destruction des mousses soit rapidement en quelques secondes pour les antimoussants rapides ou par un processus long pour les antimoussants lents (DENKOV, 2004).

Il existe deux types d'agents antimoussants : les agents naturels et synthétiques.

Les antimoussants naturels sont principalement les extraits de quillaia composés par les saponines, les tanins et les polyphénols (MSAGATI, 2013). Les composés synthétiques sont synthétisés à partir de différents types d'huiles (huile de colza et de tournesol...) et d'acides gras (MSAGATI, 2013 ; KOUGIAS *et al*, 2013 ; KARAKASHEV et GROZDANOVA, 2012 ; DENKOV, 2004).

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.5. Additifs alimentaires directs et indirects

Les additifs alimentaires sont des substances qui par leurs utilisations prévues peuvent devenir des composants directs ou indirects d'une denrée alimentaire (SUMNER et EIFERT, 2001).

1.5.1. Additifs alimentaires directs

Les additifs alimentaires directs sont des composés ajoutés à des petites quantités dans les aliments pour leurs rôles fonctionnels spécifiques et techniques, ces composés doivent figurer sur les étiquettes d'ingrédients des aliments (ABDULMUMEEN *et al*, 2012 ; YOKEL, 2012 ; INETIANBOR *et al*, 2015). Ces composés sont généralement reconnus comme sûrs après leur approbation par le FDA et par les experts qualifiés suite à des études expérimentales, de plus, ils doivent être utilisés conformément aux BPF (SUMNER et EIFERT, 2001 ; PRESSMAN *et al*, 2017). Les additifs alimentaires les plus utilisés et qui représentent 93% du poids de tous les additifs alimentaires directs sont le saccharose, le sel, le sirop de maïs et le dextrose (SUMNER et EIFERT, 2001).

1.5.2. Additifs alimentaires indirects

Les additifs alimentaires indirects sont des composés qui font partie d'un aliment et qui comprennent les substances utilisées dans la production, la fabrication, le traitement, le transport, le conditionnement et l'emballage des denrées alimentaires (EMERTON et CHOI, 2008 ; ABDULMUMEEN *et al*, 2012 ; YOKEL, 2012 ; INETIANBOR *et al*, 2015 ; PRESSMAN *et al*, 2017). Un exemple d'additif alimentaire indirect est l'acide citrique qui peut être utilisé en tant que plastifiant dans les revêtements résineux et les polymères (DOORES, 2001). Il existe d'autres composés tels que les pesticides et les fumigants qui peuvent entrer en contact avec les graines pendant la croissance, la récolte et l'entreposage et les produits de contamination des aliments par l'environnement tels que le biphényle poly chloré et les métaux lourds (plomb et le mercure) (SUMNER et EIFERT, 2001).

1.6. Effets bénéfiques et intérêt d'utilisation des additifs alimentaires

Idéalement, les denrées alimentaires ne doivent pas contenir aucun additif alimentaire. Par ailleurs, l'exposition environnementale de ces denrées dérivées présente une cause de leur dégradation. De plus, ces produits présentent certaines défaillances dans leurs caractéristiques organoleptiques. Ainsi, les additifs alimentaires qui remplissent diverses fonctions utiles dans

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

les aliments sont souvent pris pour acquis pour augmenter la durée de conservation des aliments et améliorer leurs caractéristiques organoleptiques telles que : le goût, l'odeur, la texture et la couleur (ABDULMUMEEN *et al*, 2012).

1.6.1. Conservateurs

1.6.1.1. Agents antimicrobiens

Les microorganismes qui peuvent être à l'origine de dégradation et de détérioration des aliments sont omniprésents. Depuis les temps préhistoriques, l'homme a tenté de prolonger la durée de conservation des denrées alimentaires de leur dégradation par ces micro-organismes en utilisant différents procédés tels que le chauffage, le séchage, la fermentation. Certains agents antimicrobiens chimiques tels que le sel, les nitrites et les sulfites sont utilisés depuis plusieurs années (DAVIDSON *et al*, 2001). Ces conservateurs présentent des effets bactériostatiques ou fongistatiques et sont principalement utilisés pour protéger les denrées alimentaires fraîches qui ont une faible charge microbienne contre la détérioration (BLEKAS, 2016).

Pour le choix d'un conservateur adéquat, plusieurs facteurs doivent être connus et pris en considération. Ces facteurs sont le spectre antimicrobien du conservateur, la charge microbiologique du produit alimentaire et les propriétés physicochimiques du conservateur et du produit alimentaire. Certaines propriétés telles que le pKa, la solubilité du conservateur et le pH de l'aliment facilitent l'utilisation adéquate et efficace de l'agent de conservation. Les acides organiques tels que l'acide benzoïque et l'acide sorbique, les parabènes et leurs sels sont très utilisés dans divers produits alimentaires. Ces composés sont utilisés en fonction du pH de l'aliment qui conditionne la forme non dissociée de l'acide qui est responsable de son activité antimicrobienne (DAVIDSON *et al*, 2001).

L'acide benzoïque et le benzoate de sodium sont les premiers composés antimicrobiens autorisés dans les aliments par la FDA (DAVIDSON *et al*, 2001). Ces composés se trouvent naturellement dans les pommes, la cannelle, les clous de girofle, les prunes, les fraises et autres produits (DAVIDSON *et al*, 2001). Ces conservateurs présentent une activité antimicrobienne contre les moisissures, les levures et les bactéries aérobies (BLEKAS, 2016). L'acide sorbique est utilisé comme agent fongistatique efficace contre les champignons, y compris ceux qui produisent les mycotoxines et comme agent bactériostatique pour inhiber la croissance de certaines bactéries (DAVIDSON *et al*, 2001).

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Les mécanismes généraux par les quels les acides organiques exercent leurs effets bactériostatique et fongistatique sur les microorganismes ont été étudiés d'une manière approfondie. Ces agents agissent plus probablement au niveau de la membrane cytoplasmique des microorganismes. La forme non dissociée de l'acide rentre dans la bicouche lipidique de la membrane cellulaire de microorganisme, une fois à l'intérieur de la cellule ou le pH est élevé par rapport à l'extérieur, l'acide se dissocie avec une libération des protons. Ainsi ces protons sont éliminés de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur avec un transport actif et consommation d'énergie pour maintenir un pH interne proche de la neutralité, par conséquent leur apport constant finira par épuiser l'énergie de la cellule bactérienne (DAVIDSON *et al*, 2001).

Le mécanisme par lequel l'acide sorbique inhibe la croissance des microorganismes peut être dû en partie à son effet sur les enzymes déshydrogénases impliquées dans l'oxydation des acides gras. L'acide sorbique est un inhibiteur de différentes enzymes telles que la fumarase hydratase, l'aspartase, la succinate déshydrogénase et l'alcool déshydrogénase.

D'autres mécanismes suggérés pour l'effet inhibiteur des sorbates impliquent leur interférence avec l'énolase, la protéinase et la catalase ou l'inhibition de la respiration mitochondriale de la cellule par l'inhibition compétitive de l'acétate qui rentre dans la formation d'acétyl- CoA. L'acide sorbique interfère avec le transport membranaire par élimination de Δ pH composante de la force protomotrice (FPM) dans les vésicules membranaires des microorganismes avec la réduction du gradient de protons de la membrane cytoplasmique et par conséquent de la FPM. Ainsi, la réduction ou la perte de cette FPM inhibe le transport des acides aminés à travers la membrane ce qui pourrait entraîner l'inhibition de nombreux systèmes enzymatiques cellulaires (DAVIDSON *et al*, 2001).

1.6.1.2. Antioxydants

Il est bien énuméré que les antioxydants naturels sont des composés thermolabiles. Depuis longtemps, les antioxydants de qualité alimentaire tels que le BHA et le BHT sont utilisés fréquemment en association dans les aliments pour leur action synergique (GERMAN, 2001 ; EMERTON et CHOI, 2008). Ces composés sont utilisés pour retarder ou inhiber l'oxydation des aliments. Les mécanismes des antioxydants peuvent être divisés en antioxydants qui cassent la réaction d'oxydation en chaîne, en antioxydants préventifs, en agents réducteurs et en piègeurs d'oxygène (BLEKAS, 2016). Plusieurs autres rôles sont attribués à ces composés, il a été démontré que ces additifs jouent un rôle de conservateurs antimicrobiens contre certaines bactéries telles que *Staphylococcus aureus* à des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

d'environ 200 à 400 µg/mL pour le BHA et de 1600 µg/mL pour le BHT (RUA *et al*, 2011 ; GUTIÉRREZ- LARRAÍNZA *et al*, 2013). Ces additifs sont également utilisés pour la préservation de la couleur des aliments (BLEKAS, 2016).

L'utilisation technologique de ces additifs dans les aliments se fait par leur dissolution dans un solvant de qualité alimentaire tel que les huiles végétales, le propylène glycol, l'éthanol et les mono glycérides acétylés. Des combinaisons de solvants sont également utilisées pour améliorer la solubilité et la dispersion de ces antioxydants (BUCK, 1991). Les solvants sont ensuite éliminés par des traitements technologiques.

Ces antioxydants peuvent être solubilisés pour des applications alimentaires telles que dans les jus et les boissons par leur émulsifiations avec des stabilisants autorisés tels que sodium lauryl sulfate, acétate iso butyrate de saccharose et le citrate de stéaryle. À noter que cette technique est très utilisée dans la solubilisation des caroténoïdes, colorants insolubles dans l'eau (RAYNER, 1991).

1.6.2. Édulcorants

Depuis les années 1950, les effets néfastes de l'alimentation sur la santé humaine suscitent des inquiétudes. Un apport élevé en sucre en particulier en glucides a été impliqué dans plusieurs maladies notamment l'obésité, les maladies cardiovasculaires, le diabète sucré, les troubles métaboliques et l'incidence des caries dentaires (MARIE, 1991). Des études récentes de l'organisation mondiale de la santé (OMS) ont conclu que la limitation des quantités de sucre ajoutées aux aliments et la diminution de la consommation des aliments et des boissons riches en sucres contribuent à la promotion de la santé publique, en particulier pour réduire les risques des caries dentaires, de diabète type 2 et des maladies cardiovasculaires (EDWARDS *et al*, 2016). Ainsi, un certain nombre d'édulcorants intenses plusieurs fois plus sucrés que le saccharose tels que la saccharine, l'acésulfame et l'aspartame ont été synthétisés.

Ces composés procurent une sensation de goût sucré suite à la formation d'une liaison hydrogène intermoléculaire entre l'unité glycol de l'édulcorant et les récepteurs de la papille dans la langue. Cette liaison déclenche un stimulus chimique ou un relais électrique de cerveau pour l'interprétation de la sensation (MSAGATI, 2013 ; EMERTON et CHOI, 2008).

L'acésulfame et son sel de potassium sont des édulcorants synthétisés pour la première fois en 1967 par Hoechst Company en Allemagne de l'Ouest (SALMINEN et HALLIKAINEN, 2001). Cet additif alimentaire possède un pouvoir sucrant entre 150 et 200 fois que le

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

saccharose. Ce composé a été trouvé stable à la chaleur et utilisé dans les denrées alimentaires destinées à la cuisson (MOORADIAN *et al*, 2017).

La saccharine et la saccharine de sodium sont des composés 300 fois plus sucrés que le saccharose. Ces composés ont été synthétisés en 1879 par deux chimistes, Remsen et Fahlberg (SALMINEN et HALLIKAINEN, 2001). Une caractéristique importante de ces édulcorants est que leur pouvoir sucrant n'est pas réduit lorsqu'ils sont chauffés, ce qui fait d'eux d'excellents additifs dans les produits de faibles calories et sans sucre (SHANKAR *et al*, 2013). Ces additifs présentent les substituts des sucres les plus utilisés au monde, probablement en raison de leur grande stabilité, faible coût et disponibilité dans certains pays depuis de nombreuses années (MARIE, 1991).

L'aspartame est un additif alimentaire qui se compose de deux acides aminés, la phénylalanine et l'acide L-aspartique liés à un squelette de méthanol. Ce composé est découvert accidentellement au début des années 1960 ; il présente un pouvoir sucrant entre 150 à 200 fois que celui de saccharose (SALMINEN et HALLIKAINEN, 2001).

2. Réglementations sur l'utilisation des additifs alimentaires et leurs effets sur la santé

Au cours des dernières décennies, suite aux développements socioéconomiques et des technologies alimentaires, l'homme est souvent exposé à un nombre croissant d'additifs. Les organismes réglementaires ont établi des normes pour réduire au maximum les dangers potentiels de ces additifs alimentaires sur la santé des consommateurs.

2.1. Définition de quelques termes

2.1.1. Limite maximale de résidu

La limite maximale de résidu d'un additif alimentaire, exprimée en mg d'additif alimentaire par kg d'un aliment, représente la concentration la plus élevée qui est ajoutée dans une denrée alimentaire pour être efficace (ANONYME₁, 1995). Son établissement vise essentiellement à garantir que la quantité de l'additif ingérée à partir de toutes sources confondues ne dépasse pas la dose journalière admissible (DJA) pour être sans danger sur la santé de consommateur (ANONYME₁, 1995).

2.1.2. Quantum Satis

Avant l'introduction de concept *Quantum Satis*, le terme de BPF qui a la même utilisation que l'expression *Quantum Satis* était régulièrement utilisé et employé pour les

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

additifs alimentaires qui présentent une DJA non numérique (BRANEN *et al*, 2001 ; VERBRUGGEN, 2001). En d'autre terme, le concept de *Quantum Satis* indique qu'il n'y a pas de concentration numérique maximale spécifiée pour l'utilisation de ces composés et ils doivent être utilisés conformément aux BPF qui correspond à un niveau qui ne doit pas être supérieur à celui nécessaire pour atteindre l'objectif recherché (CAROCHO *et al*, 2014 ; EMERTON et CHOI, 2008).

2.1.3. Dose maximale sans effet néfaste observé

La dose maximale sans effets néfastes observés (DMSENO) d'un composé est une dose déterminée par observation ou expérimentation par des études toxicologiques chez les espèces animales les plus sensibles (ANONYME, 2012 ; TOMASKA et BROOKE-TAYLOR, 2012). La DMSENO correspond à une dose inférieure par rapport à la dose minimale avec effets néfastes observés (DMENO) qui produit un effet néfaste d'une intensité ou d'une fréquence statistiquement significative par rapport à un témoin sain (BONVALLOT *et al*, 2009).

La DMSENO est exprimée habituellement en mg/kg de poids corporel par jour (TOMASKA et BROOKE-TAYLOR, 2014). Les études toxicologiques de chaque produit chimique impliquent une exposition multi doses des sujets testés et des études de toxicité chronique à long terme ou multi générationnelles pour représenter la consommation de composé d'intérêt durant toute la vie des êtres humains (HERRMAN et YOUNES, 1999 ; EMERTON et CHOI, 2008). Pour certains produits chimiques, les DMSENO sont déterminées par des études spéciales à court terme au lieu d'études à long terme (LU, 1998).

La détermination expérimentale d'une DMSENO dépend principalement de la bonne sélection des doses de sorte que la dose la plus élevée provoque un effet indésirable qui n'est pas observé à la dose la plus faible et sans causer une mortalité excessive ou un effet pharmacologique exagéré (HERRMAN et YOUNES, 1999). Ensuite cette dose déterminée est corrigée par deux facteurs de sécurité pour calculer la DJA qui est une norme de sécurité chez l'être humaine, le premier facteur correspond à une extrapolation de l'animal à l'homme et l'autre pour expliquer la variabilité interindividuelle chez les êtres humains (CAROCHO *et al*, 2014 ; EMERTON et CHOI, 2008). Dans certains pays, la réglementation en vigueur sur les additifs exige l'utilisation systématique de facteurs de sécurité supplémentaires pour protéger les nourrissons et les enfants qui sont plus sensibles (HERRMAN et YOUNES, 1999).

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1.4. Approche de la dose Benchmark

La détermination de la DMSENO présente certains inconvénients tels que l'utilisation par protocole d'une seule dose qui est dépendante de choix initial de l'expérimentateur et sans exploiter l'ensemble de la relation dose-réponse ; cela peut conduire à une grande variabilité d'une étude à l'autre (BONVALLOT *et al*, 2009). Une autre approche alternative nommée la dose Benchmark (dose de repère) a été développée et introduite par CRUMP en 1984 pour déterminer les doses de références (DRf) admissibles des composés chimiques évalués. Cette dose est ensuite divisée par des facteurs de sécurité pour obtenir une exposition admissible des êtres humains aux produits chimiques.

Le principe de cette approche repose sur une modélisation mathématique des données expérimentales, en prenant en compte la relation dose-réponse, pour la détermination d'une dose qui produit un effet non nul par rapport à un autre groupe témoin et qui correspond à la limite inférieure de son intervalle de confiance à 95 % (DAKEISHI *et al*, 2006 ; BONVALLOT *et al*, 2009 ; SUWAZONO *et al*, 2010 ; ANONYME, 2012 ; NOGAWA *et al*, 2013).

2.1.5. Dose journalière admissible

Le concept de la DJA a été introduit par la FDA dans les années 1950 (THORNGATEIII, 2001). En 1961, le Comité mixte de l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture et l'organisation mondiale de la santé (UNUAA/OMS) ont appliqué ce concept pour l'évaluation de la toxicité des résidus de pesticides ensuite sur les additifs alimentaires (HERRMAN et YOUNES, 1999).

La DJA est définie comme étant la quantité d'une substance chimique exprimée en mg par Kg de poids corporel pouvant être ingérée par un homme ou un animal par jour, au cours de sa vie, sans risque appréciable sur la santé de consommateurs (ANONYME₁, 1995; SALMINEN et TAHVONEN, 2001 ; VERBRUGGEN, 2001). L'évaluation de ce concept est basé sur l'approche de DMSENO ou bien de Benchmark, suivie de l'extrapolation des résultats obtenus sur l'animal à l'homme par l'application de facteur de sécurité souvent de 100 (HERRMAN et YOUNES, 1999 ; SUMNER et EIFERT, 2001 ; TRUHAUT, 1991). D'autres facteurs de sécurité sont utilisés selon la nature de l'effet toxique obtenu et si les études à long terme ne sont pas disponibles ou bien la sensibilité des tests est réduite (LU, 1998 ; HERRMAN et YOUNES, 1999).

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

2.2. Toxicité des additifs alimentaires artificiels

Les études épidémiologiques de l'évaluation de la toxicité des additifs alimentaires sur la santé de consommateur stipulent que les effets néfastes de ces composés sont controversés et que tout additif alimentaire doit être interdit à l'utilisation même s'il provoque des effets néfastes modérés (SUMNER et EIFERT, 2001). De plus, l'utilisation de ces composés n'est justifiée que s'ils présentent des avantages et sont sans risques sur la santé de consommateurs (EMERTON et CHOI, 2008). Ces composés sont généralement considérés sûrs et sans effets néfastes lorsqu'ils sont ajoutés dans les aliments à des concentrations inférieures aux LMR.

2.2.1. Conservateurs et antioxydants

2.2.1.1. Conservateurs

De nombreux aliments disponibles sur le marché contiennent différents types de conservateurs. L'acide benzoïque, sorbique et les parabènes ou leurs sels sont parmi les conservateurs les plus utilisés.

L'acide benzoïque et ses sels (les benzoates) sont très utilisés dans les denrées alimentaires. Le comité mixte d'experts sur les additifs alimentaires (CMEAA) a fixé leur DJA à 5mg/kg poids corporel par jour (ANONYME, 1974). Ces composés sont catabolisés dans l'organisme en acide hippurique qui est ensuite éliminé de l'organisme, cette voie est considérée comme la voie principale de leur élimination (PENNER *et al*, 2010 ; LENNERZ *et al*, 2015). Par ailleurs, plusieurs études épidémiologiques ont conclu que ces conservateurs sont à l'origine de plusieurs effets néfastes sur la santé s'ils sont consommés à des concentrations très élevées (MSAGATI, 2013).

Ces effets néfastes sont principalement l'urticaire, l'œngiodème et l'asthme et ils sont directement liés à l'hyperactivité chez l'enfant (TUORMAA, 1994 ; ZENGIN *et al*, 2011 ; DEL OLMO *et al*, 2015 ; JAIN et MATHUR, 2015). D'autres effets néfastes sont cités tels que la dermatite exfoliative, l'érythème, la rhinite, les nausées, les céphalées, la bronchospasme migraineux, la brûlure de l'œsophage, les vomissements, les diarrhées, la faiblesse musculaire, l'acidose métabolique, les convulsions, et les émaciations (ZENGIN *et al*, 2011, DEL OLMO *et al*, 2015).

De plus, ces composés sont suspectés d'être neurotoxique, carcinogène et tératogène (INETIANBOR *et al*, 2015 ; SILVA et LIDON, 2016 ; AMIT *et al*, 2017). En effet, l'étude *in vitro* de ZENGIN *et al*, (2011) sur les lymphocytes humains a conclu que ces composés sont

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

clastogènes en provoquant des aberrations chromosomiques (ZENGIN *et al*, 2011 ; ATRI *et al*, 2013).

L'acide sorbique et ses sels (les sorbates) ont une DJA de 25 mg/kg poids corporel par jour (ANONYME, 1997). Ces composés présentent une très faible toxicité chez les mammifères, y compris l'homme. Cette faible toxicité s'explique par le fait que ces composés sont catabolisés rapidement dans l'organisme par les voies similaires à celles de catabolisme des acides gras (WALKER, 1990). Par ailleurs, il est reporté que ces composés ont des effets néfastes similaires à ceux des benzoates (ZENGIN *et al*, 2011, DEL OLMO *et al*, 2015).

2.2.1.2. Antioxydants

Les antioxydants synthétiques essentiellement le BHA et le BHT sont des composés très utilisés dans les denrées alimentaires, cela présente un sujet d'une importance préoccupante en raison des différents risques qu'ils provoquent sur la santé des consommateurs (MSAGATI, 2013).

Le CMEAA a fixé des DJA de 0.5 pour le BHA (ANONYME₂, 1989) et 0.3 mg/kg de poids corporel par jour pour BHT (ANONYME₂, 1995). L'ingestion de ces composés à des concentrations importantes peut provoquer des effets néfastes sur la santé et la reproduction de l'être humain. En effet, ces additifs sont associés à l'urticaire et l'asthme chez l'homme (BOSSO et SIMON, 2003 ; ANAND et SATI, 2013) et sont suspectés d'être cancérogène en provoquant des carcinomes épidermoïdes d'estomac chez les rongeurs à des concentrations supérieures à 3000 ppm (INETIANBOR *et al*, 2015).

2.2.2. Édulcorants artificiels

Les édulcorants artificiels tels que l'acésulfame, la saccharine, leurs sels et l'aspartame sont très utilisés dans les denrées alimentaires. Le Comité mixte UNUAA/OMS d'experts sur les additifs alimentaires (CMEAA) a fixé les DJA de ces composés dans l'intervalle de 0-15, 0-5, 0-40 mg/kg de poids corporel par jour pour l'acésulfame, la saccharine et l'aspartame, respectivement (ANONYME₁, 1999).

L'acésulfame de potassium est un édulcorant non métabolisé et excrété directement de l'organisme dans les urines tel qu'il est (ARBELÁEZ *et al*, 2015). Ce composé est soupçonné d'être hypoglycémiant, hypocholestérolémiant et peut provoquer la leucémie et l'obésité (INETIANBOR *et al*, 2015). Ce composé contient le chlorure de méthylène dont une exposition

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

prolongée à ce dernier peut causer des céphalées, des dépressions, des effets toxiques sur le foie et les reins et des troubles visuels (INETIANBOR *et al*, 2015).

La saccharine de sodium est un édulcorant non métabolisé et non stocké dans l'organisme et il est excrété de l'organisme dans les urines sous la forme inchangée (O'MULLANE *et al*, 2014 ; ARBELÁEZ *et al*, 2015). La FDA a tenté d'interdire l'utilisation de la saccharine en 1977 suite à des études toxicologiques sur des animaux qui ont conclu que cet additif peut provoquer le cancer chez le rat. D'autres études ont conclu que ce composé est mutagène, tératogène et inhibiteur de la croissance (TUORMAA, 1994). En effet certaines études ont conclu que cet additif est cancérigène avec existence d'une corrélation entre sa consommation et l'incidence du cancer de l'utérus, de l'ovaire, de la peau (INETIANBOR *et al*, 2015) et du cancer de la vessie chez les animaux (PANDEY et UPADHYAY, 2012).

La saccharine est associée probablement à certains déséquilibres biologiques tels que l'augmentation significative de taux de la créatinine, par ailleurs, l'activité de l'alanine aminotransférase (ALT), de l'aspartate aminotransférase (AST) et de la phosphatase alcaline (PAL) augmentent significativement après son administration chez le rat. En ce qui concerne les paramètres hématologiques, les effets les plus évidents sont l'augmentation de nombre de leucocytes, le nombre de plaquettes, la diminution de l'hématocrite et d'hémoglobine (PANDEY et UPADHYAY, 2012).

L'aspartame est un édulcorant catabolisé dans l'organisme en acides aminés (phénylalanine et acide aspartique) ainsi qu'en méthanol (ANONYME, 2013 ; MSAGATI, 2013). La phénylalanine présente un risque sur la santé des patients qui souffrent d'un trouble génétique du gène homozygote pour la phénylcétonurie. Cela, est associé à un manque de phénylalanine hydroxylase qui hydrolyse la phénylalanine en tyrosine ce qui entraîne son accumulation dans le sang et le cerveau provoquant ainsi des convulsions (MSAGATI, 2013 ; SHANKAR *et al*, 2013 ; INETIANBOR *et al*, 2015). L'acide aspartique endommage le cerveau et son développement, par ailleurs, le méthanol peut être converti en formaldéhyde considéré comme toxique (PANDEY et UPADHYAY, 2012 ; INETIANBOR *et al*, 2015).

Une étude de cancérogénicité à long terme sur des souris qui ont subi une exposition transplacentaire à l'aspartame a conclu une incidence importante des carcinomes hépatocellulaires et alvéolaires/bronchiolites (MARINOVICH *et al*, 2013). D'autres effets indésirables tels que la sclérose en plaques, l'alzheimer et le lupus peuvent être également associés suite à l'exposition à ce composé (O'MULLANE *et al*, 2014). D'autres effets

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

indésirables tels que les étourdissements et les troubles de la vision, les maux de tête, les problèmes gastro-intestinaux, les changements d'humeur, les vomissements et les nausées, les douleurs abdominales et les crampes, les diarrhées, les convulsions et la perte de mémoire sont considérés (SHANKAR *et al*, 2013 ; INETIANBOR *et al*, 2015). L'étude de cohorte de BRUYÈRE *et al* en (2015) a conclu un risque accru des lymphomes non hodgkiniens et de myélomes multiples chez les hommes consommant des grandes quantités de boissons édulcorées contenant l'aspartame.

2.3. Nécessité d'étiquetage des additifs alimentaires

Les normes et la réglementation sur l'utilisation des additifs alimentaires dans les denrées alimentaires visent principalement à prévenir la tricherie et à protéger le consommateur vis-à-vis des effets néfastes de ces composés. L'étiquetage des additifs alimentaires est utilisé comme une clé de mise en garde et d'alerte pour les consommateurs pour protéger leur santé (EMERTON et CHOI, 2008 ; SUMNER et EIFERT, 2001 ; HUTT et GONZALEZ, 2014). Par exemple suite aux allergies qui peuvent être provoquées par les sulfites, la FDA a interdit en 1986 leur utilisation dans les aliments frais et a exigé que tout aliment ou boisson contenant plus de 10 ppm de sulfites doivent être déclarés sur l'étiquette de produit (WILSON et BAHNA, 2005).

L'étiquetage est défini comme tout texte écrit ou imprimé ou toute représentation graphique qui figure sur l'étiquette, accompagne le produit ou est placé à proximité de celui-ci pour en promouvoir la vente (ANONYME₁, 2005). Le système d'étiquetage des additifs alimentaires est largement utilisé dans le monde entier mais il varie d'un pays à l'autre, et il est basé principalement sur l'expression de la teneur de l'élément en pourcentage ou en ppm (PEACE et DOLFINI, 1991).

La réglementation Algérienne en vigueur via le ministère du commerce : le décret exécutif N° 05-484 de (2005) modifiant et complétant le décret exécutif N° 90-367 ont exigé l'étiquetage des additifs alimentaires. En Algérie, les additifs alimentaires qui doivent être étiquetés sont les acides organiques, les agents de traitement de la farine, les régulateurs d'acidité, les gélifiants, les agents anti agglomérants, les agents de glaçage, les agents anti moussants, les agents humidifiants, les antioxydants, les amidons chimiquement modifiés, les agents de charge, les conservateurs, les colorants, les gaz propulseurs, les émulsifiants, les poudres à lever, les sels émulsifiants, les stabilisants, les agents affermissant, les édulcorants, les exhausteur du goût, les épaississants, les agents de rétention de couleur et les sels de fonte

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

(ANONYME₁, 2005). Certains additifs ajoutés indirectement aux aliments tels que les arachides doivent être mentionnés sur l'étiquette comme "peut contenir des arachides" (SUMNER et EIFERT, 2001).

Au niveau international, plusieurs règles régissent le système d'étiquetage des additifs alimentaires utilisés dans la liste des ingrédients. Ces composés, utilisés dans un aliment pour remplir la fonction d'une des catégories principales des additifs alimentaires, doivent être identifiés dans la liste des ingrédients par le nom de la catégorie suivi par le nom ou par le numéro E ou SIN spécifique de l'additif (VERBRUGGEN, 2001 ; EMERTON et CHOI, 2008). Si un additif sert à plusieurs fonctions, il suffit d'indiquer la catégorie qui représente la fonction principale desservie dans l'aliment et s'il ne remplit aucune fonction, il doit être déclaré par son nom spécifique dans la liste des ingrédients (EMERTON et CHOI, 2008).

Selon la réglementation Algérienne via le décret exécutif n° 12-214, (ANONYME₂, 2012) fixant les conditions et les modalités d'utilisation des additifs alimentaires dans les denrées alimentaires destinées à la consommation humaine, l'étiquetage des additifs alimentaires incorporés dans ces denrées alimentaires doit être comme suit :

- le nom de chaque additif alimentaire doit être spécifique et non générique et/ou son numéro SIN suivi de sa (ses) fonction (s) technologique (s) ;
- l'expression "à des fins alimentaires" ou toute autre indication de sens analogue ;
- la quantité maximale de chaque additif alimentaire ou groupe d'additifs alimentaires exprimée soit par :
 - mesures de poids pour les aliments solides ;
 - mesures de poids ou de volume pour les aliments liquides ;
 - mesures de poids ou de volume pour aliments pâteux ou visqueux.
- selon le principe de bonne pratique de fabrication (BPF) ;
- lorsque deux additifs ou plus sont ajoutés dans une denrée alimentaire, leurs noms doivent figurer dans une liste où ils seront énumérés par ordre décroissant selon leur pourcentage par rapport à la denrée alimentaire ;
- dans le cas d'utilisation d'un mélange d'aromatisants, il n'est pas nécessaire d'indiquer le nom de chaque agent aromatisant et l'expression générique "arôme" ou "aromatisant" peut être employée à condition qu'elle soit accompagnée d'une indication de la nature de l'arôme ;

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

- l'expression "arôme" ou "aromatisant" peut être suivie de différents adjectifs notamment "naturel" ou "artificiel" ou des deux, selon le cas ;
- polyols : "une consommation excessive peut avoir des effets laxatifs" ;
- aspartame/sel d'aspartame-acésulfame:"contient une source de phénylalanine" ;
- la mention "déconseillé aux enfants" pour les édulcorants de table ;
- l'expression "déconseillé aux individus allergiques et/ou à ceux qui présentent une intolérance aux additifs alimentaires" ;
- pour les additifs alimentaires destinés aux industries agroalimentaires, les mentions "hallal" et "nature de l'additif alimentaire" peuvent figurer soit sur l'emballage ou dans les documents d'accompagnement de produit.

Les composés parfois utilisés comme additifs alimentaires et qui peuvent être également un sous-produit des processus technologiques de fabrication tels que les produits de fermentation (benzoates, propionates...), ne doivent pas être étiquetés comme ingrédients car ils ne sont pas ajoutés directement ou intentionnellement dans les denrées alimentaires.

3. Méthodologie d'analyse

3.1. Méthodologie de préparation des échantillons

3.1.1. Introduction

La préparation des différents types d'échantillons (biologiques, pharmaceutiques, environnementales et alimentaires) pour l'analyse est l'étape la plus longue de la procédure analytique et qui prend généralement 80% du temps total de l'analyse (SZULTKA *et al*, 2014). Cette procédure dépend du type de la matrice et des concentrations des composés d'intérêt à analyser (RIDGWAY *et al*, 2007).

Selon TANG et WENG (2013), une procédure idéale de préparation des échantillons doit présenter les caractéristiques suivantes :

- les composés à analyser doivent être chimiquement stables pendant la préparation de l'échantillon et il ne doit pas y'avoir la dégradation des autres composés de la matrice en ceux à analyser ;
- absence de contamination croisée de l'échantillon ;
- pas de perte de composé à analyser suite à une évaporation non spécifique ;
- obtention une répétabilité, une fidélité intermédiaire et des recouvrements, acceptables pour les composés à analyser et l'étalon interne (EI) ;

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

- élimination de maximum de macro et microéléments de la matrice pouvant causer des effets matrices ;
- la méthode doit être simple, non fastidieuse, rapide, sensible et économique.

Plusieurs procédures simples de préparation des échantillons telles que la dilution, la précipitation, la filtration et la centrifugation sont utilisées avant toute analyse. Néanmoins, ces procédures peuvent être sous-estimées car toutes les erreurs qui se produisent lors de l'étape de préparation ne peuvent pas être corrigées même par la meilleure méthode de séparation et de détection (SZULTKA *et al*, 2014). Ainsi, les extractions sont typiquement nécessaires dans la préparation des échantillons et leur intérêt réside dans :

- l'élimination des interférences de la matrice telles que les protéines, les lipides et les sucres afin d'obtenir des échantillons clairs à analyser pour ne pas endommager l'instrument d'analyse et réduire le temps de son entretien ;
- la pré-concentration des composés autorisés pour leur détection et quantification et comparer leur niveau d'utilisation aux limites autorisées mais aussi les composés interdits qui peuvent être trouvés dans les échantillons suite à une fraude ou à une contamination intentionnelle, spécifiquement les composés génotoxiques et cancérigènes (RIDGWAY *et al*, 2007).

Ces méthodes d'extraction doivent être simples, rapides, économiques et écologiques (SZULTKA *et al*, 2014). Le choix d'une méthode adéquate pour la préparation des échantillons est une étape importante et dépend selon SZULTKA *et al* (2014) :

- des propriétés physicochimiques des composés (hautement lipophiles à modérément polaires, basiques, acides ou neutres) ;
- de type de la matrice (denrées alimentaires, échantillons biologiques, l'eau, sol et l'air...);
- de la méthode de détection utilisée.

L'extraction liquide-liquide est très utilisée pour la préparation des échantillons. Son principe est basé sur le phénomène de partage et la solubilité des composés à extraire entre deux phases non miscibles qui sont l'échantillon liquide et un solvant d'extraction non miscible avec cet échantillon. D'autres extractions sont très utilisées telles que l'extraction en phase solide (SPE) en utilisant des cartouches d'extraction. Cette extraction est basée sur le partage des analytes entre deux phases, une phase solide et une autre phase liquide.

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Les principaux inconvénients de l'extraction liquide-liquide sont dans le temps nécessaires pour la procédure et l'utilisation de grandes quantités desolvants coûteux et néfastes sur la santé de l'analyste (VIÑAS *et al*, 2014). Cette technique présente une sensibilité et une sélectivité limitées particulièrement pour l'analyse des composés présents en trace dans les échantillons (RIDGWAY *et al*, 2007).

La SPE présente également certains inconvénients, tels que l'utilisation des cartouches d'extraction coûteuses, de grande quantité desolvants et une génération importante des déchets. Par conséquent, ces dernières décennies, les efforts des chercheurs sont menés dans le but de développer des techniques de micro extraction sensibles et efficaces, rapides, simples, peu coûteuses et écologiques qui permettent l'utilisation de faible volume du solvant d'extraction, obtention des facteurs de pré concentration élevés, simplicité de manipulation, une rapidité et un couplage direct à l'instrument d'analyse. Ces avantages ont fait de ces méthodes des avancées révolutionnaires dans le domaine de l'analyse physicochimique.

Plusieurs méthodes de microextraction en phase liquide (LPME) innovantes et utilisent quelques microlitres du solvant d'extraction ont été développées vers les années 1990 et elles ont connu de nombreuses applications dans le domaine alimentaire, pharmaceutique et environnemental. Ces méthodes sont classées en différents modes tels que la microextraction liquide liquide par goutte unique (SDME), la microextraction liquide liquide par goutte unique en mode espace de tête (HS-SDME), la microextraction liquide liquide assistée par une fibre creuse poreuse (HF LPME) et la microextraction liquide liquide par dispersion (DLLME) (KOKOSA *et al*, 2009).

3.1.2. Techniques d'extraction liquide- liquide miniaturisées

3.1.2.1. Microextraction liquide liquide par dispersion

La microextraction liquide liquide par dispersion est une méthode développée et décrite pour la première fois par REZAEI *et al*, (2006). Cette méthode a rapidement fait l'objet de beaucoup d'attention et a été utilisée dans l'analyse de différents types de composés organiques dans différents matrices alimentaires (VIÑAS *et al*, 2014). Cette méthode présente plusieurs avantages tels que l'obtention des facteurs de pré concentration élevés dus au transfert instantané des analytes dans le solvant d'extraction suite à la formation d'une très fine émulsion qui permet une surface de contact importante et l'atteinte rapide de l'équilibre (PROSEN, 2014 ; OCAÑA-

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

GONZÁLEZ *et al*, 2015). De plus, elle permet un nettoyage des échantillons pour éliminer les impuretés et les interférences (LEONG *et al*, 2014).

La configuration de cette méthode est basée sur un système ternaire qui implique trois phases, une phase aqueuse (échantillon), un solvant non polaire utilisé comme phase d'extraction et un solvant de dispersion permettant la dispersion du solvant d'extraction dans l'échantillon liquide (ZULOAGA *et al*, 2015).

Le solvant d'extraction utilisé doit répondre à certains critères tels que : sa densité doit être plus élevée que celle de l'eau pour faciliter la séparation et sa récupération, il doit être peu soluble dans l'eau, il doit avoir une bonne solubilisation, une bonne capacité d'extraction des analytes à analyser, une bonne capacité à former une solution trouble stable et un bon comportement chromatographique (VIÑAS *et al*, 2014). Les solvants qui remplissent ces conditions sont les solvants chlorés (chloroforme, tétrachlorure de carbone, dichlorométhane et le tétrachloréthane). Par ailleurs, ils présentent généralement un mauvais comportement chromatographique. Le solvant de dispersion doit avoir une bonne solubilité dans le solvant d'extraction et l'échantillon aqueux et la plupart de ces solvants utilisés sont l'acétonitrile, le méthanol, l'éthanol et l'acétone. Différents paramètres tels que le volume du solvant d'extraction et de dispersion, le volume de l'échantillon, la force ionique et le pH de l'échantillon et qui ont une influence sur les recouvrements et la sensibilité de cette méthode doivent être optimisés.

3.1.2.2. Extraction liquide liquide par salting out

Les méthodes d'extraction liquide liquide sont appliquées pour l'extraction des composés apolaires. Par ailleurs, le rendement d'extraction des composés polaires par ces techniques reste très limité en raison de la faible constante diélectrique des solvants apolaires utilisés.

L'extraction et la pré concentration des composés polaires est très importante en utilisant des solvants miscibles avec l'eau et qui ont une constante diélectrique élevée tels que l'acétone, l'acétonitrile, le 1,4 dioxane, le tétrahydrofurane, le 1-propanol et le 2-propanol (TABATA *et al*, 1994 ; TANG et WENG, 2013). Par ailleurs, le principal inconvénient de l'utilisation de ces solvants est la difficulté de leur recouvrement de la phase aqueuse. Ainsi, une technique d'extraction liquide liquide en utilisant l'effet de relargage au sel de ces solvants et la formation de deux phases *in situ* par l'ajout des sels organiques ou inorganiques à des concentrations

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

saturantes a été développée pour l'extraction des composés polaires et hydrophiles à partir de diverses matrices aqueuses (TANG et WENG, 2013).

Différents facteurs tels que le type et le volume du solvant d'extraction, le type et la quantité de sel et le pH de l'échantillon pouvant avoir une influence sur le rendement d'extraction de la méthode doivent être optimisés. Le sel est le paramètre le plus important, il doit avoir certaines propriétés telles qu'une solubilité élevée dans la phase aqueuse et négligeable dans le solvant d'extraction et il doit réduire la solubilité des composés à extraire dans la phase aqueuse et augmente leur transfert vers la phase organique d'extraction (TANG et WENG, 2013).

Cette méthode présente d'autres avantages, en plus de l'utilisation des petits volumes du solvant d'extraction et d'échantillon ; elle permet la précipitation de la plupart des sels de la matrice et les particules pouvant être retenues dans la solution aqueuse obtenant ainsi une phase claire non chargée (RUSTUM *et al*, 1987 ; MYASEIN *et al*, 2009, TANG et WENG, 2013).

3.2. Méthodologie des plans d'expériences

La méthodologie des plans d'expériences et les surfaces de réponses est un moyen utile pour résoudre les problèmes des processus dans les différentes industries (MYERS *et al*, 2009). Cette méthodologie permet d'obtenir les conditions expérimentales avec une meilleure précision possible, un nombre d'essais minimale et sans sacrifier la qualité des résultats.

3.2.1. Terminologie et définitions

3.2.1.1. Le domaine expérimental

Le domaine expérimental représente l'intervalle défini pour l'étude expérimental et pour lequel toutes les valeurs sont possibles pour les variables étudiées (BEZERRA *et al*, 2008).

3.2.1.2. Niveau d'une variable et domaine d'étude

Le niveau d'une variable est la valeur qu'on donne à un facteur pour réaliser une expérience. L'étude de l'influence d'un facteur est fixée entre deux niveaux (niveaux bas et niveaux haut (GOUPY et CREIGHTON, 2006). L'ensemble de toutes les valeurs que peut prendre un facteur entre le niveau bas et le niveau haut s'appelle le domaine de variation de facteur. L'ensemble des domaines de variations des différents facteurs représente le domaine d'étude (GOUPY et CREIGHTON, 2006).

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

3.2.1.3. Réponse ou variable dépendante

La réponse est le résultat ou la grandeur d'intérêt au quel s'intéresse l'expérimentateur, elle est généralement notée Y (GOUPY et CREIGHTON, 2006).

3.2.1.4. Facteur ou variables indépendante

Un facteur est la variable expérimentale à étudier et qui peut avoir une influence et modifie une réponse Y , cette variable est notée X_i (GOUPY et CREIGHTON, 2006).

3.2.1.5. Les valeurs résiduelles

Une valeur résiduelle représente la différence entre le résultat calculé par le modèle mathématique et le résultat expérimental pour un ensemble de conditions d'un plan d'expérience (BAZZERA *et al*, 2008). Ces valeurs sont de deux types les manque d'ajustement et l'erreur expérimentale (GOUPY et CREIGHTON, 2006). La première erreur est due au modèle mathématique choisi et qui n'est qu'une représentation plus ou moins bonne du phénomène étudié et la deuxième erreur expérimentale est celle commise sur chaque réponse et estimée par les points au centre (GOUPY et CREIGHTON, 2006).

3.2.1.6. La p-value

Pour les plans d'expérience, la *p-value* donne une mesure de la probabilité qu'un évènement soit rare (GOUPY et CREIGHTON, 2006). En effet, si la *p-value* est inférieure à 0.05, l'évènement est significatif et si elle est supérieure à 0.05, l'évènement est non significatif (GOUPY et CREIGHTON, 2006).

3.2.1.7. Codification des variables

La codification d'une variable consiste à transformer chaque valeur réelle étudiée en une valeur sans dimension et qui doit être proportionnelle à sa localisation dans le domaine expérimental (BEZZERA *et al*, 2008). Ces valeurs codifiées sont -1 au niveau bas et une valeur +1 au niveau haut. L'intérêt de la codification est de pouvoir présenter les plans d'expériences de la même manière quels que soient les domaines expérimentaux d'études et les facteurs étudiés (GOUPY et CREIGHTON, 2006).

L'équation suivante peut être appliquée pour transformer une valeur réelle (z_i) en une valeur codée (x_i), $x_i = \frac{z_i - z_i^0}{\Delta z_i} \beta_d$

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Δz_i : appelé le pas est la distance entre la valeur réelle dans le point au centre et la valeur réelle dans le niveau supérieur ou inférieur d'une variable, βd est la valeur limite codée principale dans la matrice pour chaque variable, et z^0 est la valeur réelle dans le point au centre.

3.2.2. Les étapes d'application et de la préparation d'une expérimentation

La préparation d'une expérimentation se fait selon plusieurs étapes (BEZERRA *et al*, 2008) :

- 1- un criblage pour la sélection des variables indépendantes qui ont une influence sur le processus et pour la délimitation de domaine d'étude de chaque facteur en fonction de l'objectif de l'étude ;
- 2- le choix du type du plan d'expérience, la génération de la matrice expérimentale et la réalisation des expériences ;
- 3- le traitement mathématique-statistique des résultats obtenus par l'ajustement d'un modèle polynomiale de second degré ;
- 4- l'évaluation de la qualité du modèle ajusté ;
- 5- obtention des conditions optimales pour chaque variable étudiée.

3.2.2.1. Criblage

Le criblage est une étape très importante à réaliser avant toute analyse pointue, notamment avant l'optimisation par les surfaces de réponses, son but est d'identifier les facteurs d'un processus qui ont une influence (MYERS *et al*, 2009).

Les plans factoriels tels que les plans d'expériences complet 2^k avec k nombre de facteurs qui prend deux valeurs (niveau haut et bas) pour chaque facteur et les plans fractionnaires 2^{k-r} avec k nombre de facteurs et r le nombre de facteurs de réduction appliqué au plan initiale sont largement utilisés pour le criblage. Il existe d'autres plans très utilisés tels que la matrice de Plackett-Burman et le plan de Taguchi.

3.2.2.2. Plan composite centré

Le plan composite centré (CCD) complet ou fractionnaire est présenté pour la première fois par Box et Wilson (1951). Ce plan est réalisé avec 5 niveaux pour chaque facteur et un nombre d'essais de $N = K^2 + 2K + C_p$ (BEZERRA *et al*, 2008 ; MYERS *et al*, 2009).

- K est le nombre de facteur ;
- K^2 est le nombre de points factoriels (NF), $2K$ est le nombre de points axiaux (NA) qui se trouvent à une distance $\alpha = (NF)^{1/4}$ de centre du plan ;

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

- Cp est le nombre de points au centre répétés.

Les points factoriels sont utilisés pour l'estimation des effets des interactions $\sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j+1}^k \beta_{ij} X_i X_j$, les points axiaux contribuent à l'estimation des effets quadratiques $\sum_{i=1}^k \beta_{ii}$ et les points au centres sont utilisés pour l'estimation de l'erreur pure, contribuent à l'estimation des termes quadratiques et l'évaluation des courbures dans le cas du plan factoriel à deux niveaux.

3.2.2.3. Surfaces de réponses

La méthodologie des surfaces de réponses est un ensemble de techniques mathématiques et statistiques basées sur l'ajustement d'une équation polynomiale de second degré (équation1) aux données expérimentales obtenues pour un plan expérimental (BEZERRA *et al*, 2008). Autrement dit, pour tous les points de domaine d'étude correspond un ensemble de réponses qui se localisent sur une surface appelée surface de réponse et qui représente les réponses expérimentales connues et inconnues qui sont calculées à l'aide de modèle mathématique ajusté (GOUPY et CREIGHTON, 2006).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i+1}^{k-1} \sum_{j+1}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \dots \dots \dots (\text{équation1})$$

Y est la réponse, X_i et X_j sont les variables indépendantes codifiées. β_0 : ordonnée à l'origine de polynôme, β_i ($i=1, 2, \dots, k$) : coefficients des effets linéaires (régression linéaire), β_{ii} ($i=1, 2, \dots, k$) : coefficients des effets au carré (régression quadratique) et β_{ij} ($i=1, 2, \dots, k-1$; $j = 2, 3, \dots, k$) coefficients des effets des interactions et ε représente l'erreur associée au modèle. Ces coefficients de régression fournissent une mesure quantitative de la signification des effets linéaires, curvilinéaires et les interactions entre les facteurs. Les plans d'expériences adéquats pour les surfaces de réponses sont : le plan CCD, le plan Box-Behnken, et le plan Dohler. La différence entre ces différents plans d'expériences est au niveau de nombre de blocs et de nombre de niveaux pour chaque variable (BEZZERA *et al*, 2008).

3.2.3. Notions statistiques d'interprétation des résultats des plans d'expériences

L'évaluation de la qualité d'un modèle mathématique ajusté pour un plan d'expérience se fait par le test de l'analyse de la variance ANOVA. Son intérêt est de savoir si ce modèle décrit d'une manière satisfaisante la relation qui existe entre les résultats obtenus et les variables indépendantes étudiées et de pouvoir tester d'une manière absolue l'effet des facteurs sur la variation d'une réponse donnée dans un domaine expérimentale.

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

D'autres paramètres évalués sont les coefficients de détermination R^2 , $R^2_{\text{ajusté}}$ et le $R^2_{\text{prévu}}$.

3.2.4. Coefficient de détermination R^2 , $R^2_{\text{ajusté}}$ et $R^2_{\text{prévu}}$

L'analyse de la variance permet de calculer une statistique très utile le R^2 qui est une mesure de la qualité du modèle ajusté (GOUPY et CREIGHTON, 2006). Cette statistique représente le rapport de la somme des carrés des réponses calculées (corrigées de la moyenne) par rapport à la somme des carrés des réponses mesurées (corrigées de la moyenne) (GOUPY et CREIGHTON, 2006). En effet, plus R^2 est proche de 1, plus le modèle mathématique ajusté est adéquat pour représenter les réponses mesurées et prédire les réponses inconnues

Si les variances (carrés moyens) des réponses sont utilisées à la place de la somme des carrés, une nouvelle statistique est définie comme $R^2_{\text{ajusté}}$. Cette statistique est considérée comme la réduction proportionnelle de la variance résultant de l'ajustement d'un modèle. Une autre statistique $R^2_{\text{prévu}}$ est calculé en utilisant la différence entre les valeurs observées Y et les valeurs calculées Y_{i-1} appelée somme des erreurs de prédiction résiduelle des carrés. Cette notion indique la capacité d'un modèle à prédire de nouvelles observations.

3.3. Méthodologie de validation analytique

3.3.1. Introduction

La mise en œuvre d'une procédure du dosage dans les différents domaines (agro-alimentaire, chimie, pharmacie, environnement, cosmétologie, etc...), peut être décomposée essentiellement en quatre phases successives (HUBERT *et al*, 2007a) :

- une phase de sélection pour définir les objectifs et les conditions expérimentales initiales de la méthode ;
- une phase de développement, avec ou sans optimisation au moyen d'une conception expérimentale ;
- une phase de validation la méthode qui peut être précédée d'une phase de pré-validation;
- une phase d'application en routine comprenant le plus souvent une validation en routine et parfois une validation partielle.

Chaque procédure analytique du dosage est caractérisée par deux erreurs principales : une erreur systématique et une erreur aléatoire. Ces deux erreurs sont toujours inconnues, de

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

même que la concentration réelle de composé à déterminer dans l'échantillon (HUBERT *et al*, 2004).

La phase de validation est une étape ultime requise par les autorités réglementaires et elle est décisive avant l'exploitation et l'utilisation courante d'une méthode analytique. Son objectif consiste à démontrer que la méthode analytique convient à l'usage auquel elle est destinée, c'est-à-dire de prouver la fiabilité des résultats obtenus par la méthode selon les limites définies par l'analyste en fonction du type de l'analyse et de la matrice (HUBERT *et al*, 2007a). En d'autres termes, la validation est "une confirmation par un examen et la fourniture de preuves objectives que les exigences particulières d'une utilisation prévue et spécifiée de la méthode analytique sont remplies" (FEINBERG, 2007, ARAUJO, 2009).

L'étape de pré-validation peut précéder l'étape de validation, elle permet de déterminer la fonction de réponse, l'intervalle de dosage à utiliser dans la phase de validation, la limite de détection (LDD) et la limite de quantification (LDQ) (HUBERT *et al*, 1999).

Dans un contexte général, la validation d'une méthode analytique est un processus qui comprend au moins cinq étapes distinctes, à savoir : la qualification du système, l'échantillonnage, la préparation des échantillons, l'analyse et l'évaluation statistique des données obtenues (ARAUJO, 2009) :

- la qualification du système : elle consiste à une évaluation générale du système pour vérifier si l'instrument et le matériel utilisés conviennent à l'analyse envisagée. Dans le cas où cette étape est ignorée et qu'un problème se pose, il sera difficile d'identifier sa source ;
- l'échantillonnage : il consiste à sélectionner une fraction représentative de l'ensemble de l'échantillon à analyser pour permettre des déductions statistiques significatives ;
- la préparation des échantillons : la préparation des échantillons est un élément clé lors de la validation d'une méthode analytique et qui représente 60 à 80% de la totalité de la procédure d'analyse. Le choix d'une procédure de préparation dépend du type et des concentrations des analytes, de la matrice et de la taille de l'échantillon et de l'instrumentation d'analyse ;
- l'analyse : elle permet d'extraire des informations qualitatives ou quantitatives à partir des échantillons avec un niveau d'incertitude acceptable ;
- le traitement statistique et l'évaluation des données analytiques : cette étape d'évaluation des données, basée sur l'utilisation des approches mathématiques

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

et statistiques pour extraire des informations utiles et de tirer des conclusions sur la validité de la méthode.

Les différentes stratégies de validation décrites dans la littérature sont classées principalement en deux approches : l'approche traditionnelle et l'approche «aptitude à l'usage» basée sur l'erreur totale ; la différence entre ces approches est résumée dans la figure 1 (FEINBERG, 2007) :

1. La première approche classique repose sur l'évaluation séparément et l'attribution de valeurs numériques aux critères de performances de la méthode analytique tels que la justesse et la fidélité (FEINBERG, 2007). Ainsi, si seulement un de ces deux critères n'est pas satisfaisant, cela peut conduire à des conclusions ambiguës sur l'acceptation ou le rejet de la méthode (ROZET *et al*, 2007a).

La terminologie utilisée dans les différents documents officiels telle que les directives de Food and Drug Administration (FDA), ICH Q2R1, ISO, IUPAC et AOAC sur la validation des méthodes analytiques selon cette approche est différente (ROZET *et al*, 2007a). De plus, les paramètres recommandés par ces organismes sont souvent estimés et calculés d'une manière incorrecte en raison de la mauvaise application des approches mathématiques et statistiques proposées dans la littérature. En conclusion, cette approche permet une estimation des critères de validation sans évaluation de l'incertitude de la méthode analytique, ainsi, le risque de rejeter un résultat approprié et d'accepter un résultat inapproprié est inconnu (HUBERT *et al*, 2007a).

2. La seconde approche «aptitude à l'usage» développée par la SFSTP est basée sur l'erreur totale qui est la somme de la fidélité et de la justesse de la méthode analytique (HUBERT *et al*, 2007a). Cette approche utilise une statistique nommée le profil d'exactitude appliquée initialement dans le domaine pharmaceutique et qui a connu ensuite une large application dans d'autres domaines tels que l'agroalimentaire, l'environnement, etc.... (HUBERT *et al*, 1999).

La SFSTP a traduit le concept «aptitude à l'usage» à un critère de limite d'acceptabilité noté λ avec $|z - x| < \lambda$ et qui est choisi par l'analyste en fonction des objectifs de la méthode analytique avec z la valeur inconnue mesurée et x la valeur cible

Cette approche s'appuie sur les principales références :

- les documents ISO 5725 (ANONYME₂, 1994) ;
- les documents ISO 17025 (ANONYME₂, 1999) ;
- les documents ICH (ANONYME₃, 1995 ; ANONYME₂, 1997) ;

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

- les documents FDA (ANONYME, 2000 ; ANONYME, 2001) ;
- les articles relatifs à la conférence de Washington (SHAH *et al*, 1992).

Cette procédure sert à démontrer que la différence entre la valeur mesurée (z) et la vraie valeur (x) est aussi faible que possible ou au moins inférieure aux valeurs des limites acceptables λ . Cette exigence peut être exprimée comme suit :

$-\lambda < z - x < \lambda \Leftrightarrow |z - x| < \lambda$. En d'autres termes, il suppose que la différence entre chaque mesure (z) et la vraie valeur (x) se situe à l'intérieur des limites d'acceptation. Ce concept peut être décrit par l'expression suivante : $P(|z - x| < \lambda) \geq \beta$, avec β : la proportion des mesures dans les limites d'acceptation λ .

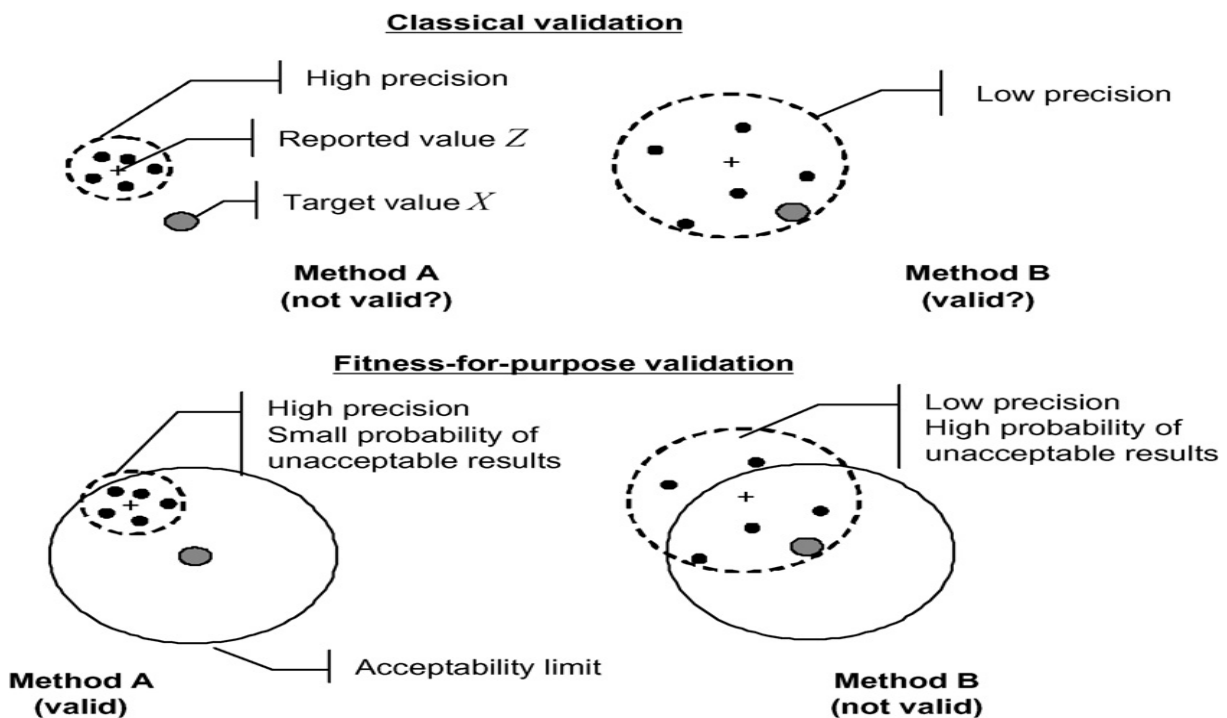


Figure 1 : Illustration de la différence entre l'approche classique et l'approche "aptitude à l'usage" de validation analytique. Cercle discontinu représente la fidélité de la méthode et le cercle continu représente les limites d'acceptation (FEINBERG, 2007).

3.3.2. Plan d'expérience

Deux différents types de standards doivent être préparés pour la validation d'une méthode analytique selon l'approche du profil d'exactitude (HUBERT *et al*, 2007a) :

- 1- Les standards d'étalonnage (SE) sont préparés à des concentrations connues avec ou sans la matrice et sont utilisés pour tracer les courbes d'étalonnage pour la prédiction inverse et la transformation en concentration des résultats analytiques obtenus sur les standards de validation (SV).

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

2- Les SV sont préparés dans la matrice ou bien dans d'autres matériels de références à des concentrations connues et utilisés pour l'évaluation de différents critères de validation de la méthode analytique. Ils sont traités comme étant les futurs échantillons que la méthode analytique aura à quantifier.

Selon la figure 2, la sélection d'un plan d'expérience dépend de l'effet matrice et de nombre de niveaux de concentration à utiliser. Le protocole V1 (un seul niveau de concentration) et V2 sont sélectionnés dans le cas où il n'y a pas d'effet matrice. Dans le cas où l'effet matrice est évident, le protocole V5 est sélectionné. Dans le cas où l'effet matrice est inconnu, le protocole V3 ou V4 sont sélectionnés.

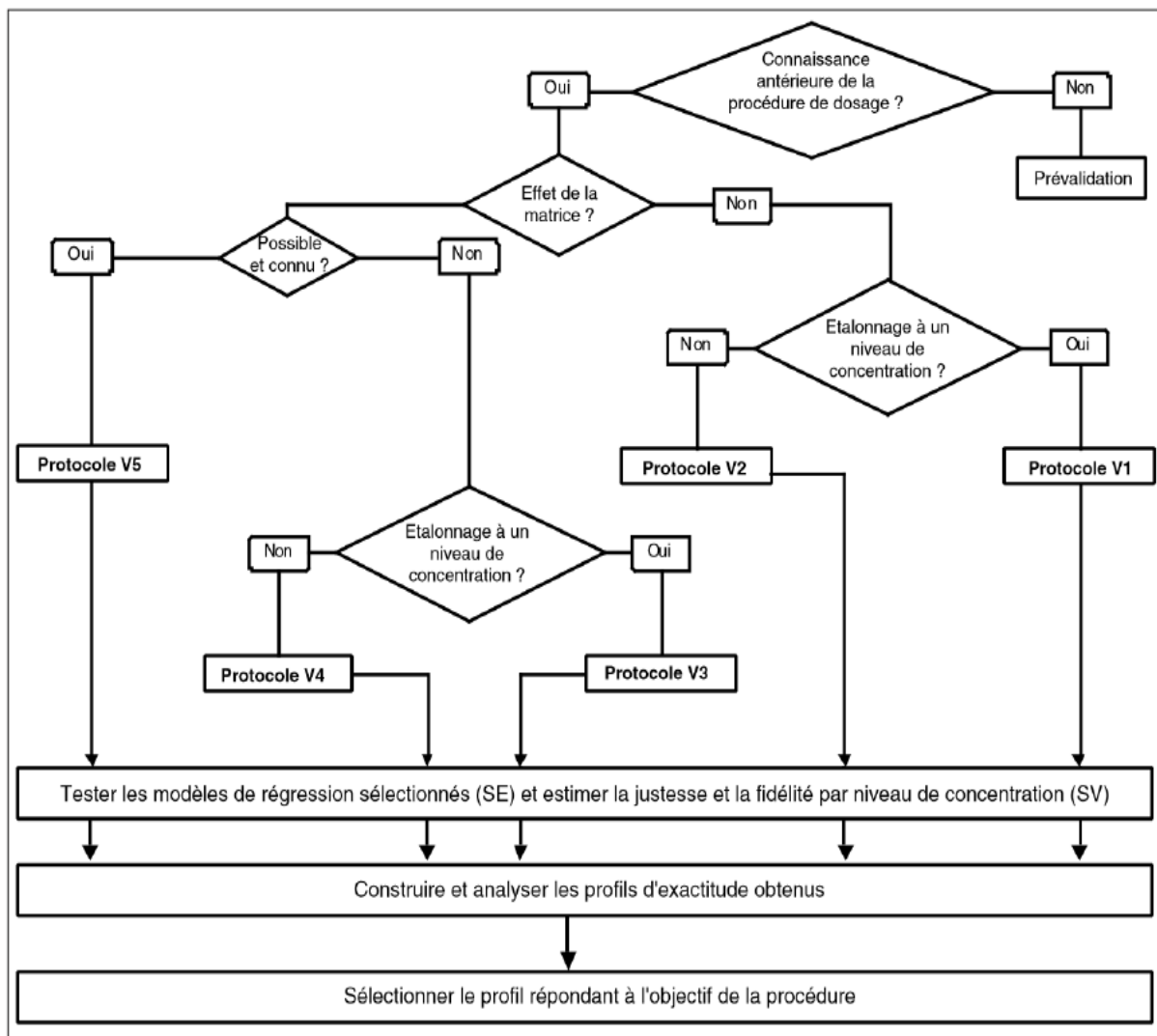


Figure 2 : Algorithme de sélection du protocole de validation analytique (HUBERT *et al*, 2007a).

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

3.3.3. Critères de validations des méthodes analytiques

Plusieurs critères sont évalués pour la validation d'une méthode analytique, ces critères sont : la fonction de réponse (courbe d'étalonnage), la justesse, la fidélité (la répétabilité et la fidélité intermédiaire), l'exactitude, la linéarité, la LDD, la LDQ et l'intervalle de dosage.

3.3.3.1. Fonction de réponse

La fonction de réponse d'une méthode analytique correspond à l'existence d'une relation entre la réponse mesurée et la concentration de l'analyte dans l'échantillon (SHAH *et al*, 1992 ; HUBERT *et al*, 1999 ; HUBERT *et al*, 2007 a). La fonction de réponse doit être décrite préférentiellement par une fonction monotone (strictement croissante ou décroissante) (HUBERT *et al*, 1999 ; ROZET *et al*, 2007a). Le tableau I montre qu'en utilisant l'approche du profil d'exactitude pour la validation analytique, différentes fonctions linéaires ou non linéaires en leur paramètres peuvent être considérées (HUBERT *et al*, 1999 ; HUBERT *et al*, 2007 ; ROZET *et al*, 2007a).

Il est à noter que la fonction quadratique même si sa représentation graphique n'est pas une droite, mais elle est linéaire en ses paramètres (HUBERT *et al*, 2007a). Des transformations mathématiques telles que le logarithme népérien et la racine carrée peuvent être appliquées sur les concentrations X et les réponses Y pour éliminer l'hétéroscédasticité ou l'hétérogénéité des variances des résultats qui peuvent être obtenues sur les faibles niveaux de concentrations et dans le cas de validation des méthodes sur les larges intervalles de dosage (HUBERT *et al*, 1999 ; ROZET *et al*, 2007a).

Tableau I. Différentes fonctions de réponse testées selon l'approche du profil d'exactitude (HUBERT *et al*, 2007b).

Type	Equation	Paramètres	linéarité
Droite passant par 0	$Y = \alpha X$	α	Oui
Droite simple	$Y = \alpha X + \beta$	α, β	Oui
Fonction quadratique	$Y = \gamma X^2 + \beta X + \alpha$	γ, β, α	Oui
Fonction logistique à 4 paramètres	$Y = \frac{\delta - \alpha}{1 + (\frac{X}{\gamma})^\beta}$	$\gamma, \beta, \alpha, \delta$	Non
Fonction logistique à 5 paramètres	$Y = \frac{\gamma - \alpha}{(1 + (\frac{X}{\gamma})^\psi)}$	$\gamma, \beta, \alpha, \delta, \psi$	Non

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

3.3.3.2. Justesse et fidélité

Le calcul de la justesse et la fidélité intermédiaire d'une méthode analytique s'effectue sur les résultats obtenus sur les SV à chaque niveau j de concentration considéré à l'aide du modèle statistique suivant :

$$x_{ijk} = \mu_j + \alpha_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Où

- x_{ijk} est la k^{ième} concentration calculée du niveau j de la i^{ème} série,
- μ_j est la moyenne des concentrations calculées au niveau de concentration j,
- α_{ij} est au niveau j l'écart entre la moyenne de la i^{ème} série et la moyenne μ_j ; α_{ij} est considéré comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance $\sigma^2_{B,j}$.
- ε_{ijk} est l'erreur expérimentale considérée comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance $\sigma^2_{W,j}$.

L'erreur expérimentale est supposée indépendante de la série.

Les variances $\sigma^2_{B,j}$ et $\sigma^2_{W,j}$ représentent les variances inter-série et intra-série, respectivement. La méthode du maximum de vraisemblance restreint est utilisée pour estimer à chaque niveau de concentration j les paramètres μ_j , $\sigma^2_{B,j}$ et $\sigma^2_{W,j}$ du modèle.

$$\hat{\mu}_j = \bar{x}_{j,calc} = \frac{1}{\sum_{j=1}^p n_{ij}} \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^{n_j} x_{ijk,calc}$$

$$MSM = \frac{1}{p-1} \sum_{j=1}^p n_{ij} \times (\bar{x}_{ij,calc} - \bar{x}_{j,calc})^2$$

$$MSE = \frac{1}{\sum n_{ij} - p} \sum_{i=1}^p \sum_{k=1}^n (x_{ijk,calc} - \bar{x}_{ij,calc})^2$$

p: indice de série et n : indice de répétition

Dans le cas d'un plan d'expérience équilibré (le nombre de répétitions est identique pour tous les niveaux de concentrations dans chaque série), les composantes de la variance pour chaque niveau sont estimées comme suit (n étant le nombre de répétition dans chaque série) :

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Si $MSE < MSM$ alors

$$\hat{\sigma}_{w,j}^2 = MSE_J$$

$$\hat{\sigma}_{B,j}^2 = \frac{MSM_J - MSE_J}{n}$$

Si non

$$\hat{\sigma}_{w,j}^2 = \frac{1}{pn - 1} \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^k (x_{ijk,calc} - \bar{x}_{ij,calc})^2$$

$$\hat{\sigma}_B^2 = 0$$

a- Justesse

La justesse ou l'erreur systématique d'une méthode analytique exprime l'étroitesse de l'accord entre la moyenne des résultats obtenus à partir d'une série de mesures et la valeur de référence acceptée comme conventionnelle (ANONYME₂, 1994 ; HUBERT *et al*, 2007a). La justesse est obtenue par le calcul de la différence entre les concentrations introduites et la moyenne des concentrations prédites pour chaque niveau j. Ce critère est exprimé en termes de recouvrement ou bien de biais absolu ou relatif.

Si pour un niveau de concentration, $\hat{\mu}$ est la moyenne des concentrations introduites et \bar{x} est l'estimation de la moyenne des concentrations obtenues à partir des concentrations calculées ainsi on aura :

$$\text{Justesse absolue}_j = \hat{\mu}_j - \bar{x}_j$$

$$\text{Justesse relative (\%)}_j = \frac{\hat{\mu}_j - \bar{x}_j}{\bar{x}_j} \times 100$$

$$\text{Recouvrement (\%)}_j = \frac{\hat{\mu}_j}{\bar{x}_j} \times 100$$

b- Fidélité

La fidélité représente l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus à partir d'une série de mesures obtenues sur un échantillon homogène dans des conditions recommandées et de leur valeur moyenne. Ce critère donne des informations sur l'erreur de randomisation qui peut être évaluée à deux niveaux : la répétabilité et la fidélité intermédiaire.

Pour les documents référentiels ICH Q2 R1 et ISO, la répétabilité exprime la fidélité sous les mêmes conditions opératoires et sur un petit intervalle du temps. Par ailleurs, la fidélité

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

intermédiaire exprime une variation intralaboratoire sous différentes conditions : différents jours, différents analystes et différents équipements. Ce paramètre est exprimé par l'écart type, la variance ou par le coefficient de variation (CV).

$$\text{Répétabilité} : \hat{\sigma}_{Re} = \hat{\sigma}_{w,j}^2$$

$$\text{Fidélité intermédiaire du niveau } j : \hat{\sigma}_{FI} = \sqrt{\hat{\sigma}_{w,j}^2 + \hat{\sigma}_{b,j}^2}$$

3.3.3.3. Exactitude et le profil exactitude

L'exactitude d'une méthode analytique exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur x trouvée et la valeur de référence μ acceptée comme conventionnelle (ANONYME₂, 1994 ; ANONYME₃, 1995 ; HUBERT *et al*, 2007a ; HUBERT *et al*, 2007b).

$$\text{Exactitude} = x_i - \mu$$

L'erreur totale permet de juger la validité d'une méthode analytique et d'évaluer sa capacité à produire des résultats exacts (HUBERT *et al*, 2007b). L'erreur totale comme donné ci-dessous est une somme de la justesse et de la fidélité intermédiaire.

$$x_i - \mu = |\text{justesse}| + \text{fidélité}$$

$$x_i - \mu = |\text{justesse}| + \text{fidélité intermédiaire}$$

$$x_i - \mu = \text{erreur totale}_{\text{procédure}}$$

Le profil d'exactitude est une conception graphique qui est obtenu par la liaison d'une part, entre les limites inférieures et, d'autre part entre les limites supérieures des intervalles de tolérance calculés à chaque niveau de concentration (équation 2). On considère une méthode comme valide sur un intervalle du dosage si le profil d'exactitude est inclus à l'intérieur des limites d'acceptations fixées.

$$\text{Biais}_j (\%) - Q_t \left(v ; \frac{1 + \beta^2}{2} \right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2}} \text{ CV}_{FI,j} ; \text{Biais}_j (\%) + Q_t \left(v ; \frac{1 + \beta^2}{2} \right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2}} \text{ CV}_{FI,j}$$

.....(équation 2)

$$R_j = \frac{\hat{\sigma}_{B,j}^2}{\hat{\sigma}_{w,j}^2}; B_j = \sqrt{\frac{R_j + 1}{nR_j + 1}}; v = \frac{(R+1)^2}{\frac{(R+\frac{1}{n})^2}{p-1} + \frac{1}{pn}}$$

$Q_t \left(v ; \frac{1 + \beta^2}{2} \right)$, β est le quantile de la distribution Student t avec v degré de liberté.

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

3.3.3.4. Limite de détection, limite de quantification et intervalle de dosage

La LDD est définie comme étant la plus petite quantité d'un composé qui peut être détectée et non quantifiée avec précision. Elle peut être calculée selon plusieurs méthodes (Figure 3).

En utilisant l'approche du profil d'exactitude, deux méthodes de calcul sont utilisées :

- la $LDD = LDQ/3.3$;
- la méthode de MILLER et MILLER (non appliquée dans le cas d'un seul niveau de concentration et sans répétition) consiste à calculer par séries la $Y_{LDD} =$ l'ordonnée à l'origine (0 si négative) + 3 x l'écart type résiduel obtenu par l'ANOVA, ensuite on procède à la prédiction inverse de X_{LDD} pour chaque série en utilisant le modèle de régression sélectionné. La moyenne des différentes X_{LDD} calculées donnera la LDD de la méthode analytique.

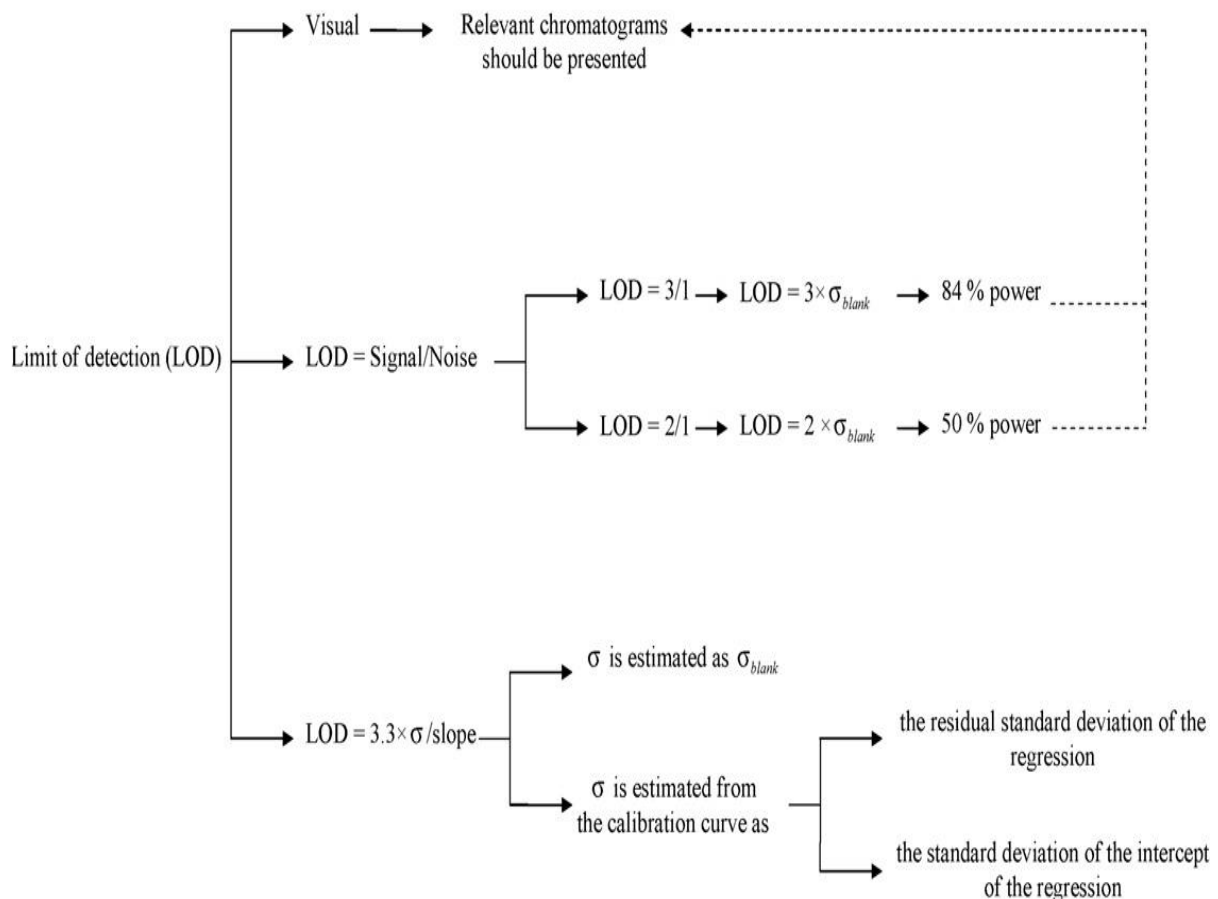


Figure 3 : Les principales approches proposées dans la littérature pour la détermination de la LDD (ARAUJO, 2009).

PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

L'application de l'approche du profil d'exactitude permet de considérer deux différentes limites de quantification : la limite de quantification inférieure (LDQI) et supérieure (LDQS). La LDQI est la plus petite quantité d'un composé dans un échantillon qui peut être quantifiée avec exactitude sous les conditions expérimentales. Cette définition est appliquée également à la LDQS qui est la plus grande quantité d'un composé dans un échantillon qui peut être quantifiée avec exactitude sous les conditions expérimentales. Ces limites sont obtenues graphiquement par l'intersection des intervalles de tolérance et les limites d'acceptation fixées.

L'intervalle du dosage est défini comme étant l'intervalle délimité entre la LDQI et LDQS de composé dans l'échantillon pour lequel il a été démontré que la procédure analytique présente un niveau de justesse, de fidélité, d'exactitude acceptables et une linéarité appropriée (ANONYME₂, 2005).

3.3.3.5. Linéarité

La linéarité d'une méthode analytique est l'aptitude d'obtenir sur un intervalle de dosage des résultats exprimés en terme de concentrations qui sont directement proportionnels aux concentrations introduites (ANONYME₃, 1995 ; HUBERT *et al.*, 1999 ; HUBERT *et al.*, 2007a). Elle exprime l'hypothèse qu'il y'a une relation linéaire entre les concentrations introduites (x) et celles retrouvées (y) et exprimée mathématiquement par $y = f(x)$ si la droite passe par l'origine ou bien par $y = f(x) + \varepsilon$, si la droite ne passe pas par l'origine (ARAUJO, 2009).

3.3.3.6. Sélectivité

La sélectivité d'une méthode est sa capacité à discriminer le composé à analyser des autres composants interférents de la matrice. En d'autre terme c'est la capacité d'une méthode à évaluer sans équivoque le composé à analyser en présence d'autres composants tels que les impuretés, les composés de dégradation de la matrice, etc...susceptibles d'interférer dans l'analyse. Ce critère est confusément exprimé depuis de nombreuses années par la spécificité.

DEUXIÈME PARTIE :
PARTIE EXPÉRIMENTALE

DEUXIÈME PARTIE : PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les différentes parties expérimentales de cette thèse ont été réalisées dans plusieurs laboratoires de recherches et pédagogiques :

- laboratoire de qualité et sécurité des aliments (LQFS), Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Algérie ;

- laboratoire de Grupo Universitario de Investigación Analítica (GUIA), Département de Chimie Analytique, Campus Rio Ebro, Maria de Luna, EINA, Université de Saragosse, Espagne ;

- laboratoire de Bromatologia e d'Hidrologia, LAQV-REQUIMTE/Département des Sciences Chimiques, Faculté de Pharmacie, Université de Porto, Portugal ;

- laboratoire de chimie analytique, Département de Pharmacie, Faculté de Médecine, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Algérie.

Le travail expérimental est divisé en deux parties consacrées au développement, optimisation et validation des méthodes analytiques appliquées à la recherche et dosage de différents types d'additifs alimentaires dans les jus. Ces additifs sont les conservateurs antimicrobiens (acide benzoïque et sorbique et leurs sels), les antioxydants (butylhydroxyanisole et le butylhydroxytoluène) et les édulcorants (l'acésulfame, la saccharine et leurs sels et l'aspartame) (tableau II). Les niveaux de concentrations d'utilisation de ces additifs alimentaires sont calculés comme équivalent à leurs formes moléculaires.

➤ **Partie expérimentale 1**

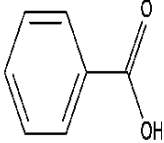
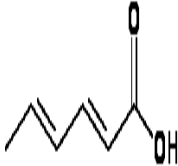
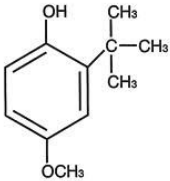
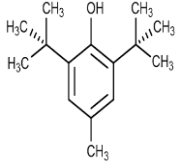
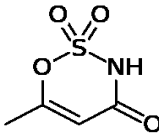
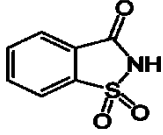
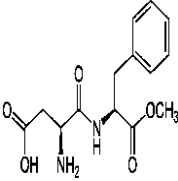
Cette première partie est consacrée en la recherche et le dosage simultané de l'acide benzoïque, l'acide sorbique et leurs sels, le butylhydroxyanisole et le butylhydroxytoluène par la méthode de microextraction liquide liquide par dispersion couplée à la chromatographie liquide haute performance et détecteur barrette de diode (DLLME- HPLC-DAD).

➤ **Partie expérimentale 2**

Cette deuxième partie est consacrée en la recherche et le dosage simultané de l'acésulfame, la saccharine, l'aspartame, l'acide benzoïque et l'acide sorbique et leurs sels par la méthode d'extraction liquide liquide par salting out couplée à la chromatographie liquide ultrahaute performance et détecteur UV visible (SALLE- UPLC-UV).

DEUXIÈME PARTIE : PARTIE EXPÉRIMENTALE

Tableau II. Structures chimiques et propriétés des additifs alimentaires étudiés.

Additif alimentaire	Abréviation	Structure moléculaire	Catégorie fonctionnelle	Propriétés		
				Masse molaire g/mol	Log P	pKa
Acide benzoïque	AB		Conservateur antimicrobien	122.12	1.87	4.19
Acide sorbique	AS		Conservateur antimicrobien	112.13	1.33	4.76
Butylhydroxyanisole	BHA		Antioxydant	360.49	3.50	11.82
Butylhydroxytoluène	BHT		Antioxydant	220.35	5.10	12.75
Acésulfame	ACE		Edulcorant	163.15	-1.33	2
Saccharine	SAC		Edulcorant	183.18	0.91	2
Aspartame	APM		Edulcorant	294.31	-0.1	3.1 7.9

DEUXIÈME PARTIE : PARTIE EXPÉRIMENTALE

1. Validation des méthodes analytiques par la méthodologie du profil d'exactitude

Lors de la validation d'une méthode analytique, plusieurs difficultés peuvent être rencontrées telles que :

- le choix et l'interprétation des directives réglementaires;
- la définition d'un protocole expérimental à utiliser ;
- le laboratoire doit définir ses propres règles de validation : procédures internes harmonisées quel que soit le type de la méthode.

Dans le secteur agroalimentaire, différentes directives règlementaires de l'AOAC ou de l'IUPAC pour la validation des méthodes analytiques peuvent être utilisées. Dans cette thèse, une démarche de validation harmonisée, développée par la SFSTP a été sélectionnée et appliquée pour ces nombreuses avantages pour la validation des méthodes analytiques selon la méthodologie du profil d'exactitude :

- selon les publications de la SFSTP, ces directives de validation analytiques peuvent être utilisées dans différents domaines autres que le domaine pharmaceutique tels que les domaines de l'alimentation et de l'environnement ;
- les directives de cette méthodologie statistique sont basées sur plusieurs documents, les documents ISO 5725, ISO 17025, ICH et FDA et l'article faisant référence à la Conférence de Washington 1990 ;
- cette démarche utilise une méthodologie statistique performante du profil d'exactitude basée sur l'erreur totale. En fait, les approches classiques proposées par AOAC et IUPAC sont généralement utilisées pour évaluer individuellement la justesse et la fidélité de la méthode analytique. Ainsi, dans le cas où un seul de ces deux critères est satisfaisant et qu'un écart par rapport à la valeur réelle est dû à une erreur systématique (manque de justesse) ou à une erreur aléatoire (manque de fidélité), ceci conduit à des conclusions ambiguës quant à l'acceptation de la validité de la méthode. La commission de la SFSTP a résolu cette confusion par le développement de la méthodologie graphique et flexible du profil d'exactitude utilisé comme une statistique une décision et appliqué comme indicateur pour évaluer l'exactitude de la méthode et sa capacité à produire des résultats exacts (HUBERT *et al*, 2004 ; HUBERT *et al*, 2007a, b).

DEUXIÈME PARTIE : PARTIE EXPÉRIMENTALE

Pour la validation d'une méthode analytique, différents protocoles de validation peuvent être utilisés (tableau III). Pour chaque protocole, trois séries au minimum sont préparées. Pour chaque série, deux différentes gammes de solutions standards SE et SV sont préparées indépendamment. Le choix de nombre de SE et de SV dépend du protocole expérimental sélectionné.

Tableau III. Le choix du nombre de SE et SV selon le protocole expérimental choisi (HUBERT *et al*, 2007a).

Standards	Niveau de concentration	Protocole				
		V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₅
SE sans matrice	Bas		2		2	
	Médian	2	(2) ^a	2	(2) ^a	
	Haut	(2) ^b	2	(2) ^b	2	
SE avec matrice	Bas				2	2
	Médian			2	(2) ^a	(2) ^a
	Haut			(2) ^b	2	2
	Additionnel					(2) ^c
SV sans matrice	Bas	3	3	3	3	3
	Médian	3	3	3	3	3
	Haut	3	3	3	3	3
Nombre de série minimale		3	3	3	3	3

^a En considérant le modèle de régression sélectionné (exemple : régression linéaire simple), possibilité de suppression du niveau de concentration moyen, en fonction du modèle de régression considéré pour exprimer la fonction de réponse (exemple : régression linéaire simple).

^b Sélection d'un niveau de concentration supérieur à la concentration cible afin de procéder à l'étalonnage (par exemple : 120 % de la concentration cible).

^c Ajout d'un niveau de concentration pour une fonction de réponse plus complexe (par exemple : régression logistique à 4 paramètres).

Lors de la validation d'une méthode analytique, la linéarité de la courbe d'étalonnage qui donne la relation entre les réponses obtenues en fonction des concentrations introduites et qui est généralement obtenue en utilisant le modèle de régression des moindres carrés simple $Y = aX + b$, est le premier paramètre à vérifier en utilisant le coefficient détermination R^2 . Si $R^2 \geq 0.99$, le modèle de régression simple est considéré comme étant approprié pour calculer et déterminer la quantité inconnue dans l'échantillon. Cependant, il a été démontré qu'un modèle

DEUXIÈME PARTIE : PARTIE EXPÉRIMENTALE

de régression simple avec $R^2 \geq 0.99$ ne pouvait pas être un indicateur fiable de la linéarité de la courbe d'étalonnage (SHEWIYO *et al*, 2012) et qu'il ne pouvait pas convenir en raison de la présence des manques d'ajustement possibles et important du modèle (ARAUJO, 2009 ; SONNERGAARD, 2006). Il est à noter que la condition "si c'est linéaire donc $R^2 = 1$ " n'est pas équivalente à "si $R^2 = 1$ donc c'est linéaire" (ARAUJO, 2009). De même il a été démontré que R^2 proche de 1 peut être également obtenu pour les fonctions non linéaires (SHEWIYO *et al*, 2012). Ainsi, en utilisant les directives de SFSTP, différentes fonctions de réponses linéaires et non linéaires (linéaire et quadratique avec des transformations logarithmique, racine carrée, pondérée $1/X$ et $1/X^2$) peuvent être testées (HUBERT *et al*, 2007 a, b). Ainsi, la meilleure fonction de réponse pour laquelle les intervalles de tolérance calculés au risque fixé sont inclus dans les limites λ fixées et pour laquelle la valeur de l'indice d'exactitude est plus élevée sera sélectionnée.

2. Étapes de traitement des données analytiques de la méthodologie du profil d'exactitude

1- définir les niveaux de concentrations de l'intervalle du dosage et l'objectif de la méthode selon les limites d'acceptation. Dans le cas de validation des méthodes analytiques dans le domaine agroalimentaire en utilisant l'approche du profil d'exactitude, il existe peu de références disponibles dans la littérature normative concernant les critères de décision acceptés (limite d'acceptation λ et le risque β). Ainsi, à partir des travaux récents, différents critères ont été utilisés tels que $\lambda = \pm 10\%$, $\beta = 80\%$ (FEINBERG *et al*, 2009), $\lambda = \pm 30$ et $\pm 40 \%$, $\beta = 85\%$ (CHEVALLIER *et al*, 2015) et $\lambda = \pm 40 \%$, $\beta = 70 \%$ (DELOSIERE *et al*, 2016). Dans cette thèse, les limites d'acceptation ont été fixées à $\pm 30 \%$, avec un risque β de 80% ;

2-définir le protocole de validation selon le nombre de séries à réaliser, le nombre de niveau des SE et SV par série et le nombre de répétition par chaque niveau des SE et SV ;

3- préparation des solutions de SE et SV ;

4- analyser les données analytiques des SE et tracer une courbe d'étalonnage pour chaque série ;

5-analyser des données et prédiction inverse des concentrations sur les résultats des SV en utilisant les courbes d'étalonnage obtenues sur les SE :

5.1. alignement des données analytique des SV, lorsque les valeurs introduites à chaque niveau de SV ne sont pas identiques pour chaque série, il est nécessaire d'aligner les observations ou les réponses obtenues sur la concentration moyenne à ce même niveau. Cet alignement s'effectue par l'interpolation en ajoutant à la réponse observée, la différence entre la valeur de la fonction de réponse considérée à la concentration moyenne et la valeur à la concentration introduite.

DEUXIÈME PARTIE : PARTIE EXPÉRIMENTALE

5.2. prédiction inverse des données analytiques obtenues sur les SV en concentrations en utilisant la fonction de réponse choisie.

6- calculer et déterminer la justesse, la fidélité, l'exactitude, la LDD, la LDQ et l'intervalle du dosage ;

7- dessiner le profil d'exactitude en utilisant les valeurs relatives de biais moyen, les intervalles de tolérances et les limites d'acceptation en fonction des concentrations ;

8- déterminer la linéarité de la méthode en traçant la droite qui donne la relation entre les concentrations calculées sur les SV et les concentrations théoriques introduites.

Toutes les analyses statistiques et les calculs ont été effectués à l'aide de la version d'essais des logiciels en ligne E-noval V3.0 et E-noval back-predicter (arlenda, Liège, Belgique).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. MATÉRIEL ET MÉTHODES

PARTIE EXPÉRIMENTALE 1

Le travail expérimental de cette première partie a été réalisé au sein du laboratoire de Bromatologia e Hidrologia, LAQV-REQUIMTE/Département des Sciences Chimiques, Faculté de Pharmacie, Université de Porto, Portugal.

1.1. Matériel

1.1.1 Appareillage

La séparation et l'analyse chromatographique de l'acide benzoïque et l'acide sorbique, BHA et BHT ont été effectuées à l'aide d'une chaîne de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) équipée de deux pompes (305 et 306, Gilson, France), d'un injecteur automatique réfrigéré (AS-2057 Plus, Jasco, Japon), d'un chauffe-colonne (Modèle 7981, Jones Chromatography) et un détecteur à barrette de diode (Prostar 335, Varian, USA). L'analyse a été effectuée sur une colonne YMC-Triart C18 (250 mm x 4,6 mm, 3 μm ϕ particule, YMC, Kyoto, Japon). Le logiciel de traitement des données Varian Star Workstation a été utilisé pour contrôler le système et l'acquisition des données.

Purificateur d'eau Milli-Q gradient system (Millipore, Milford, MA).

1.1.2. Produits et réactifs

Acétone, acétonitrile, méthanol et le formate de sodium sont achetés auprès de Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). L'éthanol, le chloroforme, carbone tétrachlorure, chlorure de sodium ($\geq 99.0\%$), acide hydrochlorique (37%), acide formique ($\geq 98.0\%$) sont obtenus auprès de Merck (Darmstadt, Germany), eau ultra pure (18.2 M Ω .cm) utilisée pour la préparation des échantillons est purifiée au laboratoire.

1.1.3. Standards

Benzoate de sodium ($\geq 99\%$), sorbate de potassium ($\geq 99\%$), butylhydroxyanisole ($\geq 98.5\%$), Butylhydroxytoluène ($\geq 99.0\%$), acide cinnamique ($\geq 99\%$) sont achetés auprès de Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

1.1.4. Échantillonnage

Un nombre de 41 échantillons de jus de fruits appartenant de neuf différentes marques ont été collectés en Octobre- Novembre 2016 aux niveaux des différents supermarchés de la

région de Tizi Ouzou. Toutes les unités analysées sont prélevées aléatoirement et les étiquettes sont vérifiées quant à la mention ou non des additifs alimentaires analysés. Tous les échantillons ont été stockés dans des conditions réfrigérées (4 °C) jusqu'à l'analyse. Les noms, la codification et le nombre d'unité pour toutes les marques analysées sont donnés dans le tableau IV.

Tableau IV. Les noms des différentes marques, codification et le nombre d'unités des échantillons analysés.

Code de la marque	Nom de la marque	Nombre d'unité
A	jus Assiri, orange	10
B	Ngaous, multifruits	3
C	Ramy gazéifié, orange	5
D	Plus Fares, orange	4
E	Ngaous, cocktail	3
F	Plus Fares, orange - ananas	3
G	Ramy gazéifié, ananas	3
H	O'jus, orange	5
I	Safir, orange-ananas	5

1.2. Méthodes

1.2.1. Mise au point des conditions chromatographiques pour la séparation d'AB, AS, BHA et BHT

Différentes conditions chromatographiques ont été testées pour une séparation avec une meilleure résolution des 5 composés AB, AS, EI, BHA et BHT .

1.2.2. Optimisation de la méthode d'extraction DLLME

La microextraction DLLME est une technique affectée par plusieurs facteurs tels que le type et le volume du solvant d'extraction et de dispersion, le pH de l'échantillon et la quantité de sel.

Dans cette partie de la thèse, l'optimisation de la méthode de microextraction est réalisée en utilisant la méthodologie des plans d'expériences. Trois plans d'expériences ont été utilisés pour le choix du solvant d'extraction et de dispersion, le criblage des différents facteurs cités pouvant avoir une influence sur la méthode de microextraction, le plan centré composite et les surfaces de réponses pour optimiser les facteurs ayant une influence pour avoir les meilleures conditions optimales permettant de meilleurs recouvrements et sensibilité de la microextraction.

Tous les plans d'expériences de cette partie sont réalisés en utilisant un mélange des standards préparé à une concentration de 10 µg/mL. La réponse utilisée est la somme des surfaces de pics des quatre composés étudiés.

1.2.2.1. Sélection du solvant d'extraction et de dispersion

Un plan expérimental (4×2) de deux facteurs a été réalisé pour la sélection du solvant d'extraction et de dispersion. Ce plan expérimental consiste en huit expériences réalisées en double.

1.2.2.2. Criblage

Un plan factoriel complet à deux niveaux (2^k) est utilisé pour le criblage et la sélection des facteurs qui ont une influence (tableau V). Ce plan expérimental consiste en 21 essais obtenus selon la matrice 2^{4-1} réalisés en double avec cinq points au centre utilisés pour estimer l'erreur expérimentale (erreur pure). Il est utilisé pour évaluer l'effet significatif des variables suivantes : pH de l'échantillon (X1), volume du solvant d'extraction (X2), volume du solvant de dispersion (X3) et la concentration de NaCl (X4). Les expériences ont été effectuées au pH (2-4), volume du solvant d'extraction (50-350 µL), volume du solvant de dispersion (400-1200 µL) et quantité de NaCl (0.25-1 g/ 5 mL).

Tableau V. La matrice du plan factoriel complet à deux niveaux (2^k) utilisé pour le criblage des différents facteurs qui ont une influence sur la méthode DLLME et les résultats analytiques obtenus pour les additifs alimentaires AB, AS, BHA et BHT étudiés.

Standards	Ordre des essais	pH	Solvant d'extraction (µL)	Solvant de dispersion (µL)	NaCl (mg)	AB	AS	BHA	BHT	somme
5	1	2	350	400	1000	47355384	61075604	19929918	2424390	130785296
14	2	2	350	1200	250	13788463	18831754	8211191	478217	41309625
2	3	2	50	400	250	45614	25521	169356	13400	253891
19	4	3	200	800	625	24473294	28440404	13936391	957653	67807742
6	5	2	350	400	1000	55397932	70799944	21690430	3511331	151399637
4	6	4	50	400	1000	1851839	1342570	4583113	93604	7871126
11	7	4	50	1200	250	1208551	1185826	6508079	484627	9387083
1	8	2	50	400	250	9511581	10783230	17378968	3178045	40851824
9	9	2	50	1200	1000	0	0	0	0	0
16	10	4	350	1200	1000	41139840	61785356	17136180	1255618	121316994
12	11	4	50	1200	250	997087	927948	5212969	471630	7609634
13	12	2	350	1200	250	46586720	58661232	25789738	3758261	134795951
8	13	4	350	400	250	17392488	18496110	15179348	1342187	52410133
15	14	4	350	1200	1000	42994660	58134888	18243822	1445528	120818898
10	15	2	50	1200	1000	0	0	0	0	0
21	16	3	200	800	625	19470960	20974178	12729503	887722	54062363
7	17	4	350	400	250	11038992	14273028	9340006	613853	35265879
3	18	4	50	400	1000	26515	24611	0	0	51126
18	19	3	200	800	625	24715788	29489798	12719331	857107	67782024
20	20	3	200	800	625	37900416	43517952	19851536	2523526	103793430
17	21	3	200	800	625	27586586	30130748	15843935	1254191	74815460

1.2.2.3. Optimisation par plan composite centré et surface de réponse

Un plan CCD et les surfaces de réponses sont utilisés pour optimiser les facteurs significatifs sélectionnés lors de l'étape de criblage (tableau VI). Ce plan factoriel complet à 2 niveaux est réalisé avec un nombre d'expériences total de 30 obtenues selon $N = 2^k + 2k + C_p$ avec k étant le nombre de facteurs et $2^k = 16$ points factoriels, $2k = 8$ points axiaux et $C_p = 6$ points au centre. Les expériences ont été réalisées comme suit : pH (2- 3), le volume du solvant d'extraction (150- 350 µL), le volume du solvant de dispersion (400- 800 µL) et la quantité de NaCl (0.50- 0.85 g / 5 mL). Tous les essais ont été randomisés pour minimiser l'effet des facteurs externes incontrôlables.

Tableau VI. La matrice du plan composite centré appliquée pour l'optimisation de la DLLME et les résultats analytiques obtenus.

Standards	Ordre des essais	pH	Solvant d'extraction (µL)	Solvant de dispersion (µL)	NaCl (mg)	AB	AS	BHA	BHT	Somme
16	1	3	350	800	850	57343924	75787936	25427618	7027919	165587397
21	2	2.5	250	200	675	36932256	45426688	21535206	2722533	106616683
4	3	3	350	400	500	42159044	50948696	19588946	4080650	116777336
9	4	2	150	400	850	25459648	29924260	14392907	2639107	72415922
8	5	3	350	800	500	54944872	70209680	24230304	6021884	155406740
24	6	2.5	250	600	1025	56738848	70640616	25437458	4404156	157221078
25	7	2.5	250	600	675	59299228	73499568	28271188	5146939	166216923
23	8	2.5	250	600	325	36497028	42585552	24381840	4194264	107658684
29	9	2.5	250	600	675	56045660	72205360	26604248	5287095	160142363
11	10	2	350	400	850	58512316	74332304	24204488	5108483	162157591
15	11	2	350	800	850	63167280	82524920	25105852	5812105	176610157
7	12	2	350	800	500	54097680	70140600	25019888	5772426	155030594
13	13	2	150	800	850	31701952	34668428	17162068	2896117	86428565
28	14	2.5	250	600	675	45241596	52258416	24852674	4176041	126528727
26	15	2.5	250	600	675	40115792	47474212	22809036	3499698	113898738
20	16	2.5	450	600	675	62027820	80013784	28219188	4883331	175144123
18	17	3.5	250	600	675	12269974	24917490	20137234	2585847	59910545
12	18	3	350	400	850	56812416	69519528	24355928	5269942	155957814
5	19	2	150	800	500	30308086	30057132	21739146	3651268	85755632
30	20	2.5	250	600	675	45900004	53115120	25557190	4320054	128892368
19	21	2.5	50	600	675	1860345	1266527	6014567	280781	9422220
10	22	3	150	400	850	35627320	38397952	20520898	3935216	98481386
3	23	2	350	400	500	51425388	61728772	26588708	4392905	144135773
27	24	2.5	250	600	675	41950980	46737728	24191154	2858906	115738768
1	25	2	150	400	500	24238668	23884848	18843344	3010532	69977392
2	26	3	150	400	500	22039938	21113530	18845906	2812669	64812043
17	27	1.5	250	600	675	46404684	56913848	24847550	3633646	131799728
22	28	2.5	250	1000	675	47122060	54827048	23360708	3108611	128418427
14	29	3	150	800	850	34691628	37264060	19607574	3198523	94761785
6	30	3	150	800	500	22140828	21584278	17608764	2678519	64012389

Les analyses statistiques des plans d'expériences traités ont été réalisées en utilisant la version d'essai du logiciel design expert 10.0.3 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN).

1.3. Méthodologie de préparation des échantillons et la microextraction par DLLME

Les échantillons commerciaux sont centrifugés à 3500 rpm pendant 3 min, puis dilués 100 fois avec l'eau ultra pure pour minimiser l'effet matrice en ajustant le pH à 2 avec une solution de HCl (0.7 M v/v).

Pour la microextraction DLLME, un volume de 5 mL de l'échantillon de jus est placé dans un tube conique à essai de 10 mL contenant 0.85 g de NaCl et 50 μ L de la solution EI (100 μ g/mL). La figure 4 montre les différentes étapes de la microextraction. Après agitation du mélange vigoureusement à la main jusqu'à la dissolution totale de NaCl, un mélange de 625 μ L d'acétone (solvant de dispersion) et 350 μ L de chloroforme (solvant d'extraction) est injecté rapidement dans l'échantillon pour former une solution trouble. Le mélange est agité délicatement à la main pendant 10 secondes ensuite au vortex pendant 1 minute pour extraire les additifs alimentaires dans des fines gouttelettes de chloroforme.

Le mélange est centrifugé à 4500 rpm pendant 10 min, la phase organique sédimentée est récupérée dans une vialle de 2 mL en utilisant une microseringue Hamilton de 100 μ L. Cette phase organique est évaporée sous un léger courant d'azote (N_2), ensuite reconstituée dans 200 μ L de la phase mobile (acétonitrile + tampon formique (40 + 60) %, pH 4.4). Enfin, 20 μ L de la solution reconstituée ont été injectés dans le système HPLC pour analyse.

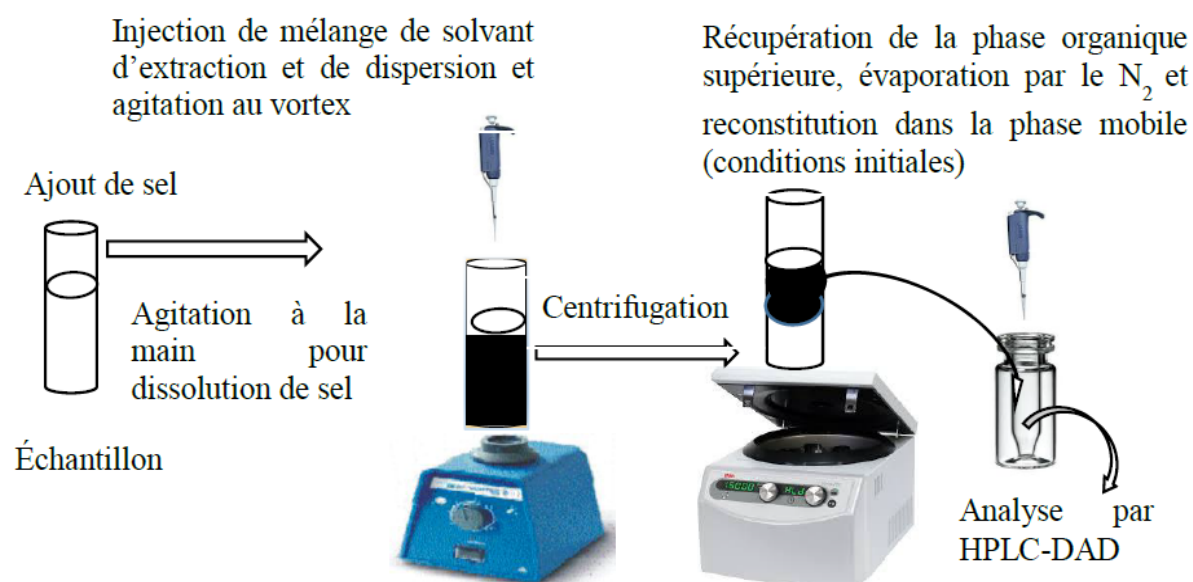


Figure 4 : Les étapes de la procédure de la méthode DLLME-HPLC-DAD (ORIGINALE, 2019) .

1.4. Choix du protocole expérimental pour la validation analytique de la méthode DLLME-HPLC- DAD

Dans cette partie on a choisi le protocole V2 modifié en ajoutant un seul niveau de concentration. Ainsi, la validation de la méthode est réalisée en effectuant 60 mesures indépendantes réparties en trois séries réalisées indépendamment. Pour chaque série, quatre niveaux de concentration avec deux répétitions pour SE et trois répétitions pour SV pour chaque niveau ont été préparés (tableau VII). Tous les résultats ont été calculés en utilisant le rapport entre la surface de pic de l'additif alimentaire et la surface de pic de EI.

Tableau VII. Le protocole expérimental de la validation de la méthode analytique DLLME-HPLC-DAD.

Série	SE		SV	
	Niveau de concentration mg/mL	Nombre de répétitions	Niveau de concentration mg/mL	Nombre de répétitions
1	1	2	1	3
1	2	2	2	3
1	3	2	3	3
1	4	2	4	3
2	1	2	1	3
2	2	2	2	3
2	3	2	3	3
2	4	2	4	3
3	1	2	1	3
3	2	2	2	3
3	3	2	3	3
3	4	2	4	3

1.5. Préparation des solutions

1.5.1. Solutions mères

Les solutions mères des différents standard (benzoate de sodium, sorbate de potassium, BHA et BHT) ont été préparées individuellement à des concentrations de 1000 µg/mL dans l'eau ultra pure pour le benzoate de sodium et le sorbate de potassium et dans le méthanol pour BHA et le BHT.

La solution mère de l'acide cinnamique utilisé comme EI est préparée à une concentration de 1000 µg/mL dans le méthanol. Une solution intermédiaire d'EI a été préparée par la dilution appropriée de la solution mère à une concentration de 100 µg/mL.

1.5.2. Préparation des solutions de standards d'étalonnage et de validation**1.5.2.1. Préparation des solutions de standards d'étalonnage**

Quatre solutions intermédiaires de SE sont préparées pour chaque additifs alimentaires à partir des solutions mères à des concentrations de 0.1, 5, 10 et 20 µg/mL en mesurant un volume connu de la solution mère dans une fiole jaugée de 50 mL et en ajustant le pH à 2 avec une solution de HCl (0.7 M v/v).

1.5.2.2. Préparation des solutions de standards de validation

Les solutions de SV sont préparées aux mêmes niveaux de concentrations que les SE et en présence de la matrice de jus choisi. En effet, l'absence de matériaux de références nous a conduit à utiliser un jus cocktail qui ne contient pas les additifs alimentaires analysés et qui est choisi comme la matrice la plus complexe et représentative de toutes les marques analysées.

PARTIE EXPÉRIMENTALE 2

Le travail expérimental de cette deuxième partie a été réalisé au laboratoire de Grupo Universitario de Investigación Analítica (GUIA), Département de Chimie Analytique, Campus Rio Ebro, Maria de Luna, EINA, Université de Saragosse, Espagne.

2.1. Matériel

2.1.1. Appareillage

L'analyse et la détection chromatographique des composés (l'acésulfame, la saccharine, l'aspartame, l'acide benzoïque et l'acide sorbique) ont été effectuées à l'aide d'une chaîne de chromatographie liquide à ultrahaute performance Acquity UPLC couplée à un détecteur UV visible (Waters, Milford, MA).

La séparation de tous les composés a été effectuée avec une colonne analytique Bridged Ethylene Hybrid (BEH) C18 (100 mm x 2.1 mm d.i. x 1.7 μm ϕ particules) couplée à une colonne de garde Acquity UPLC (BEH C 18, 1.7 μm ϕ particules).

L'eau ultrapure a été préparée au laboratoire par un ultrapurificateur d'eau, Millipore system (Milli-Q plus 185).

Le flux de nitrogène (N_2) (ALPHAGAZI, pureté globale de 99.999%, Air Liquide Saragosse- Espagne) a été utilisé pour l'évaporation du solvant d'extraction.

2.1.2. Produits et réactifs

L'acétonitrile, l'acétone, l'éthanol anhydre, l'isopropanol, le méthanol (grade HPLC ou LC-MS), l'acide chlorhydrique (37%), le chlorure de sodium ($\geq 99.5\%$) et le sulfate de sodium ($\geq 99\%$) ont été achetés auprès de (Scharlau, Espagne). L'eau ultrapure est purifiée au laboratoire. L'acétate d'ammonium ($\geq 98\%$), le sulfate de magnésium heptahydraté et le chlorure d'ammonium ($\geq 99.8\%$) ont été achetés auprès de (Merck, Allemagne). Le sulfate d'ammonium (99%) a été acheté auprès de (Pancreac Appli Chem Barcelone, Espagne) et l'acide trifluoroacétique (99%) a été acheté auprès (Fluka, Suisse).

2.1.3. Standards

Tous les standards : l'acésulfame de potassium ($\geq 99\%$), la saccharine de sodium ($\geq 99\%$), l'aspartame ($\geq 99\%$), le benzoate de sodium ($\geq 99\%$) et le sorbate de potassium ($\geq 99\%$) ont été obtenus auprès de (Sigma Aldrich, Allemagne).

2.1.4. Échantillonnage

Les échantillons ont été achetés en période Octobre-Novembre 2017 aléatoirement de toutes les marques de jus de fruits disponibles sur les marchés de la région de Tizi Ouzou. Il est à noter que nous ne pouvons pas être sûrs si les échantillons achetés contiennent ou pas les édulcorants ou les conservateurs, car ces composés analysés ne sont pas mentionnés sur les étiquettes des différentes unités, à l'exception de sorbate de potassium mentionné uniquement sur les étiquettes de deux marques. Ainsi, nous avons uniquement sélectionné ces échantillons pour vérifier la présence et l'utilisation de ces additifs comme adultérant dans les boissons de jus de fruits.

Pour cette étude, un nombre de 47 échantillons appartenant à neuf différentes marques ont été collectés dans les différents supermarchés. Les différentes marques, le nombre d'unités et leur codification sont donnés dans le tableau VIII. Tous les échantillons ont été conservés dans des conditions réfrigérées (4 °C) jusqu'à leur analyse.

Tableau VIII. Les noms des différentes marques, codification et le nombre d'unités des échantillons analysés.

Code de la marque	Nom de la marque	Nombre d'unité
A	Ngaoues Gazéifié, Orange	6
B	Ramy, cocktail	5
C	Rouiba, orange	6
D	Ifruit Raisin et Mûre	5
E	Ramy Kids, pêche	6
F	Ngaoues, orange	5
G	Ngaoues Gazéifié	5
H	Ramy Kids, Cocktail	4
I	Ifruit, Peche- Abricot	4

2.2. Méthodes

2.2.1. Mise au point des conditions chromatographiques pour la séparation d'ACE, SAC, APM, AB et AS.

Plusieurs conditions chromatographiques ont été testées pour obtenir une résolution adéquate et une meilleure séparation entre les différents additifs alimentaires étudiés ACE, SAC, APM, AB et AS.

2.2.2. Optimisation de la méthode d'extraction SALLE

Dans cette partie, différents composés ayant différentes polarités (groupements amines et carboxyliques) sont analysés. L'extraction simultanée de ces composés par les solvants organiques apolaires non miscibles à l'eau est très difficile. Les faibles constantes diélectriques de ces solvants et la nature polaire de l'ACE, la SAC et l'APM qui sont très peu solubles dans ces solvants rendent le rendement d'extraction assez médiocre. Cependant, tous les composés analysés sont solubles dans les solvants polaires qui ont des constantes diélectriques élevées et qui sont miscibles avec l'eau tels que l'éthanol, l'acétone, l'acétonitrile et l'isopropanol.

La formation *in situ* de deux phases en utilisant les solvants polaires n'est pas facile en raison des interactions des molécules de ces solvants et les molécules d'eau par les liaisons hydrogènes. Cependant, un système de deux phases est généré *in situ* avec l'ajout d'une quantité appropriée d'un électrolyte, tel que le sel, qui diminue la miscibilité des deux solvants et les analytes passent sélectivement de la phase aqueuse à la phase organique polaire (TABATA *et al.*, 1996). Ce procédé d'extraction s'appelle le salting out est appliqué à l'extraction liquide-liquide ou à l'extraction par di mélange (NERÍN *et al.*, 1996). Ainsi, dans cette partie de travail, la méthode de SALLE a été utilisée pour l'extraction simultanée des composés étudiés.

La figure 5 montre les diagrammes de phase de solubilité de l'éthanol dans l'eau en présence de différentes concentrations en sulfate d'ammonium. Comme il est constaté, l'augmentation des quantités de sulfate d'ammonium dans une solution aqueuse contenant l'éthanol entraîne le phénomène de salting out et la migration des molécules d'eau de celles d'éthanol vers les ions de sels en formant ainsi une couche autour de ces ions de sels, et la fraction massique d'éthanol augmente dans la phase supérieure formée (WANG *et al.*, 2010). À une concentration saturante en sulfate d'ammonium deux phases distinctes seront formées *in situ*.

Le rendement d'extraction et le débit de transfert des composés étudiés de la phase aqueuse vers la phase organique peuvent être influencés par plusieurs facteurs tels que le type et le volume du solvant d'extraction, le pH de l'échantillon, le type et la quantité de sel utilisé pour le salting out. Par conséquent, ces facteurs ont été étudiés minutieusement pour déterminer les conditions expérimentales optimales qui permettent les meilleurs rendements d'extraction de tous les composés étudiés.

En effet, 3 mL d'eau ultra pure sont enrichies à des concentrations de 20 µg/mL pour l'acésulfame de potassium, l'aspartame, le benzoate de sodium et le sorbate de potassium et à

4 $\mu\text{g/mL}$ pour la saccharine de sodium. Cette solution est utilisée pour l'optimisation de la méthode d'extraction par la méthodologie uni variée qui consiste à la variation à chaque fois des niveaux d'un seul facteur tout en maintenant les autres facteurs à des niveaux constants.

Toutes les expériences ont été effectuées en triplet et la moyenne des surfaces des pics ou bien la somme des surfaces de pics des additifs sont utilisées comme réponses.

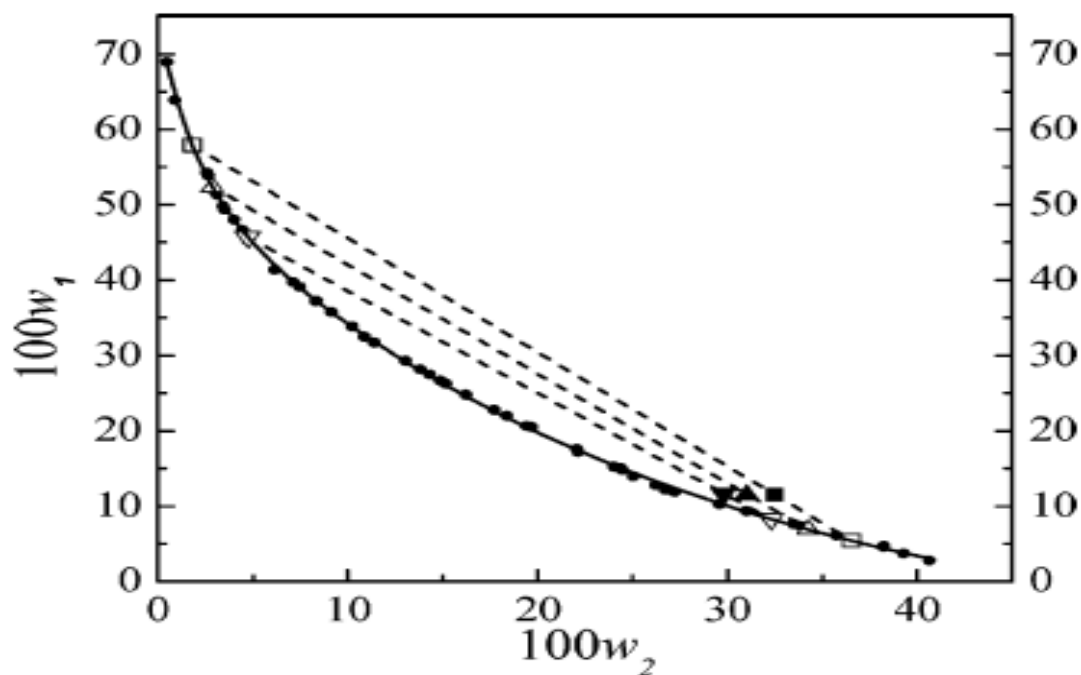


Figure 5 : Effet du sulfate d'ammonium sur les compositions en phase d'équilibre de l'éthanol (1) + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2) + H_2O (3) ATPS à 298.15 K (WANG *et al*, 2010).

2.3. Méthodologie d'extraction et de préparation des échantillons par la méthode SALLE

Les échantillons commerciaux sont centrifugés à 4000 rpm deux fois pendant 20 min à chaque fois pour éliminer toutes les particules, puis dilués 20 fois pour réduire l'effet matrice tout en ajustant le pH à 3 avec une solution de HCl (0.7 M v/v).

Les différentes étapes de la procédure d'extraction SALLE sont montrées dans la figure 6. Un volume de 3 mL de l'échantillon ou de mélange des standards préparé est placé dans un tube à essai en polyéthylène de 15 mL à bouchon à vis contenant 1.7 g de sulfate d'ammonium. Ensuite le mélange est agité vigoureusement à la main jusqu'à la dissolution complète de sulfate d'ammonium. Un volume de 0.5 mL du mélange acétone : éthanol (50:50 v/v) est injecté dans la solution à l'aide d'une micropipette de 1 mL. Le mélange est agité au vortex pendant 1 min à

3000 rpm, puis centrifugé pendant 12 min à 4000 rpm pour la formation de deux phases *in situ* dont la phase supérieure est le solvant d'extraction.

La phase supérieure (solvant organique d'extraction) est récupérée soigneusement par une micropipette de 100 μL , transférée dans une vial de 2 mL ensuite évaporée sous un léger courant d'azote à 60 °C. Pour éviter le chevauchement des pics des composés étudiés suite au facteur de concentration élevé et important de la méthode obtenu pour l'acide benzoïque et l'acide sorbique notamment au niveau de 100 $\mu\text{g/mL}$, les résidus sont reconstitués avec 1.5 mL de la solution tampon de la phase mobile, agité au vortex pendant 2 min et injecté pour l'analyse par l'UPLC-UV.

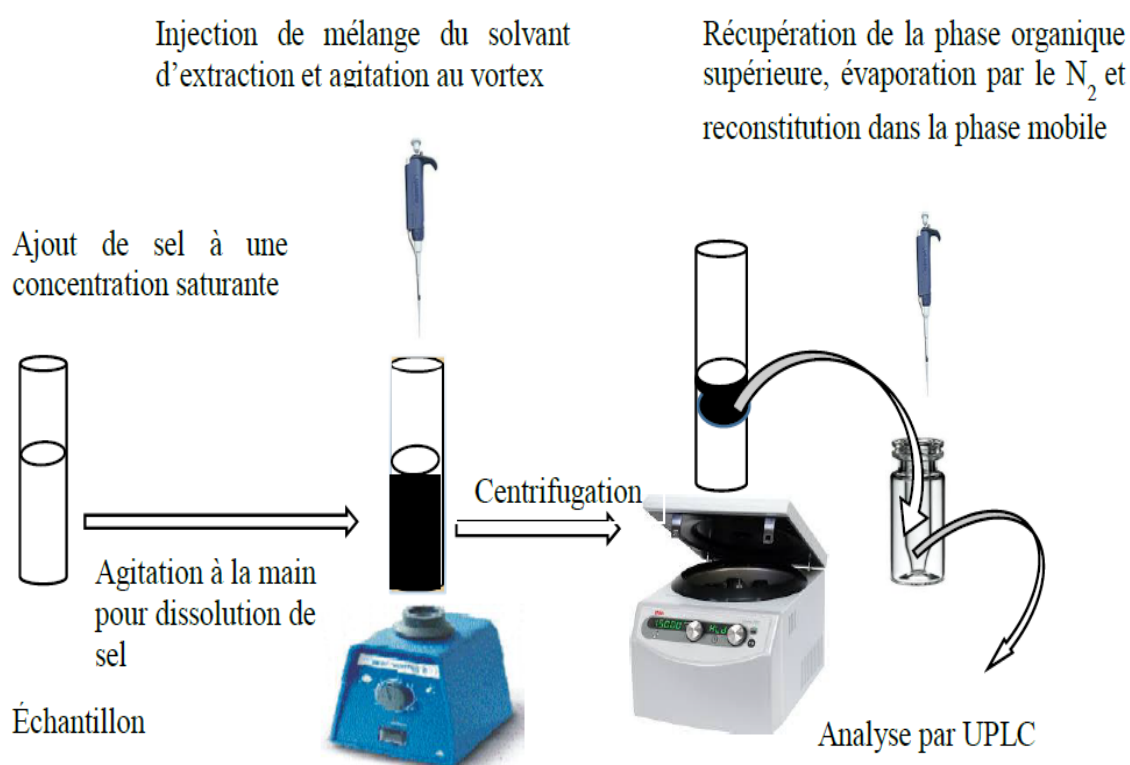


Figure 6 : Les étapes de la méthode d'extraction SALLE -UPLC-UV (ORIGINALE, 2019).

2.4. Choix du protocole expérimental pour la validation analytique de la méthode SALLE-UPLC-UV

Dans cette partie de travail on a choisi le protocole V2 modifié avec ajout de deux niveaux de concentrations. Ainsi, la validation de la méthode est réalisée en effectuant 75 mesures indépendantes réparties en trois séries réalisées indépendamment. Pour chaque série, cinq niveaux de concentrations sont préparés avec deux répétitions pour SE et trois répétitions pour SV pour chaque niveau (tableau IX).

Tableau IX. Le protocole expérimental de la validation de la méthode SALLE- UPLC-UV.

Série	SE		SV	
	Niveau de concentration mg/mL	Nombre de répétitions	Niveau de concentration mg/mL	Nombre de répétitions
1	1	2	1	3
1	2	2	2	3
1	3	2	3	3
1	4	2	4	3
1	5	2	5	3
2	1	2	1	3
2	2	2	2	3
2	3	2	3	3
2	4	2	4	3
2	5	2	5	3
3	1	2	1	3
3	2	2	2	3
3	3	2	3	3
3	4	2	4	3
3	5	2	5	3

2.5. Préparation des solutions

2.5.1. Solutions mères

Les solutions mères des différents standards sont préparées individuellement à des concentrations de 1000 µg/mL dans l'eau ultrapure pour l'acésulfame de potassium, la saccharine de sodium, le benzoate de sodium et le sorbate de potassium et dans un mélange eau : méthanol (50: 50 v/v) pour l'aspartame.

2.5.2. Préparation des standards d'étalonnage et de validation

2.5.2.1. Préparation des solutions de standards d'étalonnage

Cinq solutions intermédiaires de standards d'étalonnage sont préparées à des concentrations de 1, 2, 5, 10 et 20 µg/mL pour la saccharine de sodium, 2.5, 5, 15, 25 et 50 µg/mL pour l'acésulfame de potassium et l'aspartame et 5, 10, 25, 50 et 100 µg/mL pour benzoate de sodium et sorbate de potassium en mesurant un volume connu de la solution mère dans une fiole jaugée de 50 mL et en ajustant le pH à 2 avec une solution de HCl (0.7M v / v).

2.5.2.2. Préparation de solutions des standards de validation

Les solutions de SV sont préparées en présence de la matrice jus et aux mêmes niveaux de concentrations que les SE. Comme dans la première partie de cette thèse, l'absence de matériaux de références nous a conduit à utiliser un jus cocktail qui ne contient pas les additifs alimentaires analysés et qui est choisi comme la matrice la plus complexe et représentative de toutes les marques analysées.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

II. RÉSULTATS ET DISCUSSION

PARTIE EXPÉRIMENTALE 1

1. 1. Conditions chromatographiques pour la séparation des additifs alimentaires AB, AS, BHA et BHT

La séparation chromatographique de ces composés a été réalisée par une élution en mode gradient en utilisant un mélange de deux solvants A et B (tableau X).

- Le solvant A est une solution aqueuse de tampon formate de sodium/acide formique préparé à 25 mM et au pH 4.4. Un volume d'un litre de la solution tampon est préparé par un mélange d'une quantité de 0.52 g de formate de sodium et un volume de 0.66 mL de l'acide formique dans une fiole de 1 L, le pH de la solution est ensuite ajusté délicatement par l'acide formique par un pH mètre à 4.4.
- Le solvant B est l'acétonitrile.

Tableau X. Le programme d'élution en mode gradient et les autres conditions chromatographiques appliqués pour l'analyse des additifs alimentaires AB, AS, BHA et BHT étudiés par la méthode DLLME- HPLC-DAD.

	Temps	A %	B %
Phase mobile	0	100	0
	3	60	40
	11	2	98
	17	2	98
	20	2	98
	28	60	40
Autres conditions chromatographiques	Débit		0.8 ml/min.
	Volume d'injection		20 µL
	Température de la colonne		30 ° C
	Longueur d'onde de détection		235 nm

Le temps total de l'analyse (y compris la séparation des composés, le rinçage et le rééquilibrage de la colonne) était de 30 min (figure 7).

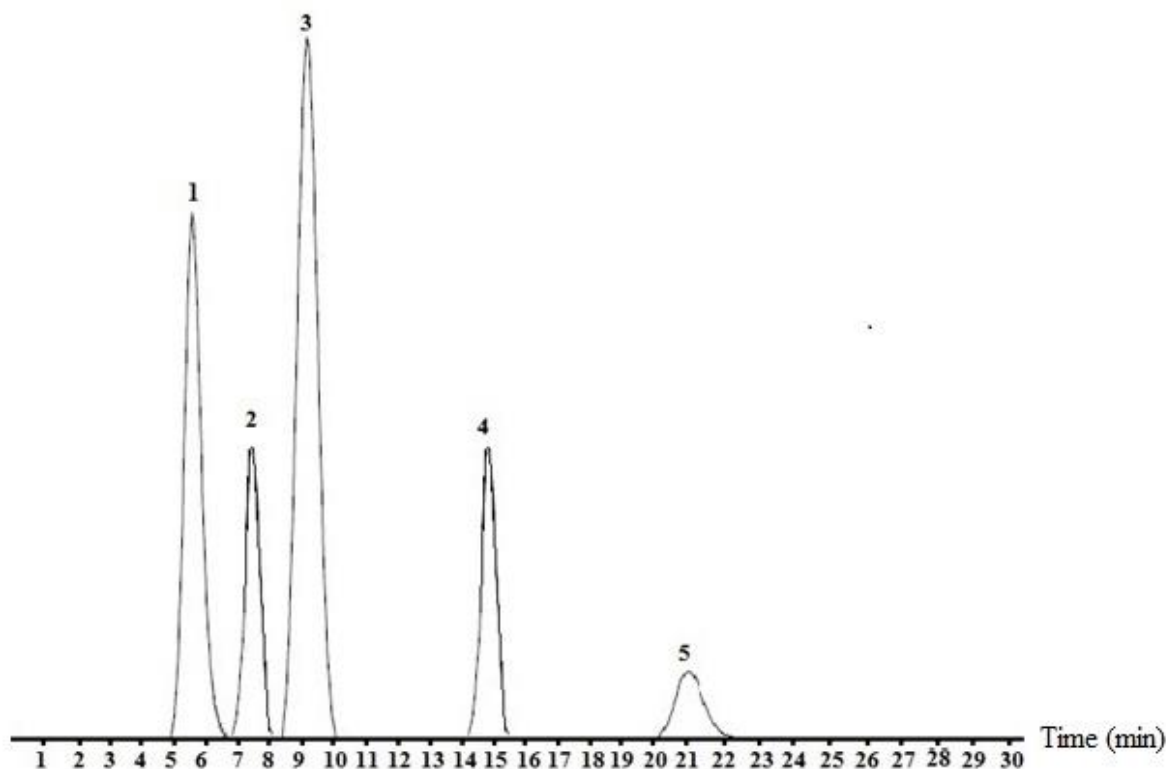


Figure 7 : Chromatogramme de la solution standard. Identification des pics : (1) AB, (2) AS, (3) EI, (4) BHA et (5) (BHT).

1.2. Optimisation de la procédure d'extraction DLLME

1.2.1. Sélection du solvant d'extraction et de dispersion

Le choix de solvants d'extraction et de dispersion les plus appropriés est une étape cruciale et importante lors de l'optimisation de la microextraction DLLME pour obtenir une efficacité d'extraction maximale avec une bonne sensibilité de la méthode. Ces solvants doivent être sélectionnés en fonction d'un certain nombre d'exigences.

Le solvant d'extraction doit avoir une haute affinité et pouvoir extraire les composés d'intérêt, une faible solubilité dans l'eau, permet la formation de minuscules gouttelettes en présence du solvant de dispersion et il doit avoir une densité différente de celle de l'eau pour former deux phases distinctes (SARAJI et BOROUJENI, 2014). Cependant, le solvant de dispersion doit pouvoir se dissoudre dans le solvant d'extraction et doit être miscible avec l'eau et permet la formation de fines gouttelettes du solvant d'extraction dans la phase aqueuse (HERRERA-HERRERA *et al*, 2010). Ces solvants doivent être moins toxiques et moins coûteux.

Conformément à ces exigences, le chloroforme et le tétrachlorure de carbone ont été sélectionnés comme solvants d'extraction et l'acétone, le méthanol, l'acétonitrile et l'éthanol comme solvants de dispersion à tester. Dans cette étape, un plan expérimental (4×2) est utilisé, ce plan consiste en huit expériences réalisées en double en utilisant une solution mélange préparée à une concentration de 10 µg/mL pour chaque standard.

La somme des surfaces de pics des composés analysés a été utilisée comme réponse pour sélectionner les solvants d'extraction et de dispersion les plus appropriés. Les résultats donnés dans la figure 8 montrent que l'utilisation de chloroforme et l'acétone comme solvant d'extraction et de dispersion permet d'obtenir les meilleurs résultats.

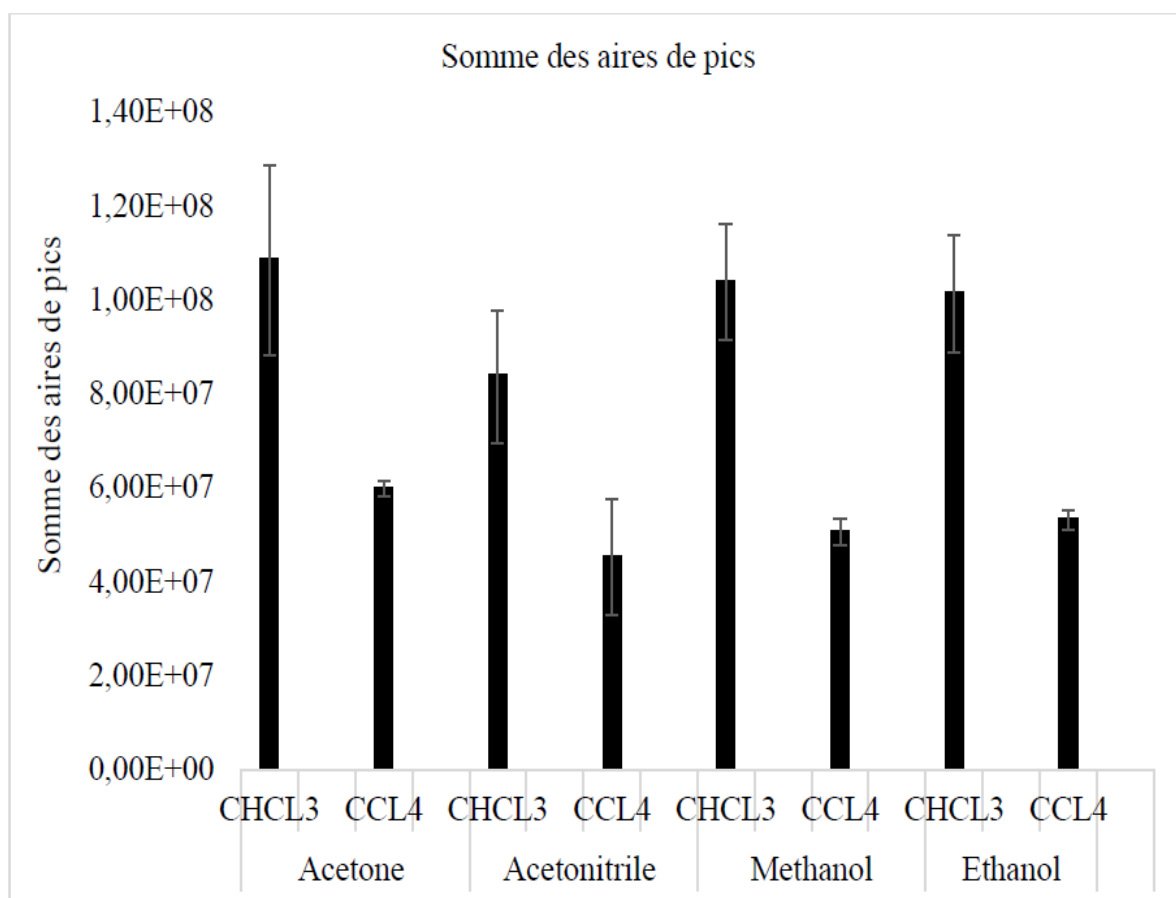


Figure 8 : Sélection du solvant d'extraction et de dispersion pour la méthode DLLME.

1.2.2. Criblage des différents facteurs

Les résultats obtenus lors de l'étape de criblage présentés comme la somme des surfaces de pics des composés analysés ont été ajustés à un modèle mathématique quadratique et sont évalués. Le coefficient de détermination R^2 et $R^2_{ajusté}$ obtenus sont supérieurs à 0.92 et 0.90

respectivement. Les effets des facteurs testés et leurs interactions sont donnés sous forme de diagramme de Pareto (figure 9). Ce diagramme est obtenu par l'analyse de variance (ANOVA) au seuil de signification $\alpha = 5\%$. La longueur de chaque barre est proportionnelle à la valeur absolue des effets standardisés et elle montre l'influence de facteur correspondant ou l'interaction des facteurs. Par conséquent, tous les facteurs dont les valeurs absolues des effets normalisés dépassant la limite critique de la valeur t ($t = 2.14$) présentée par la ligne de référence verticale sont considérés comme significatifs avec une probabilité de 95%.

Les résultats présentés par le diagramme de Pareto (figure 9) indiquent que le volume du solvant d'extraction et la quantité de NaCl ont une influence statistiquement significative. Les résultats de l'ANOVA et le diagramme de Pareto montrent que le pH et le volume du solvant de dispersion ne sont pas significatifs. Par ailleurs, leur interaction est très significative. Par conséquent, tous les facteurs étudiés (pH, le volume du solvant d'extraction et de dispersion et la quantité de NaCl) ont été considérés lors de l'étape d'optimisation.

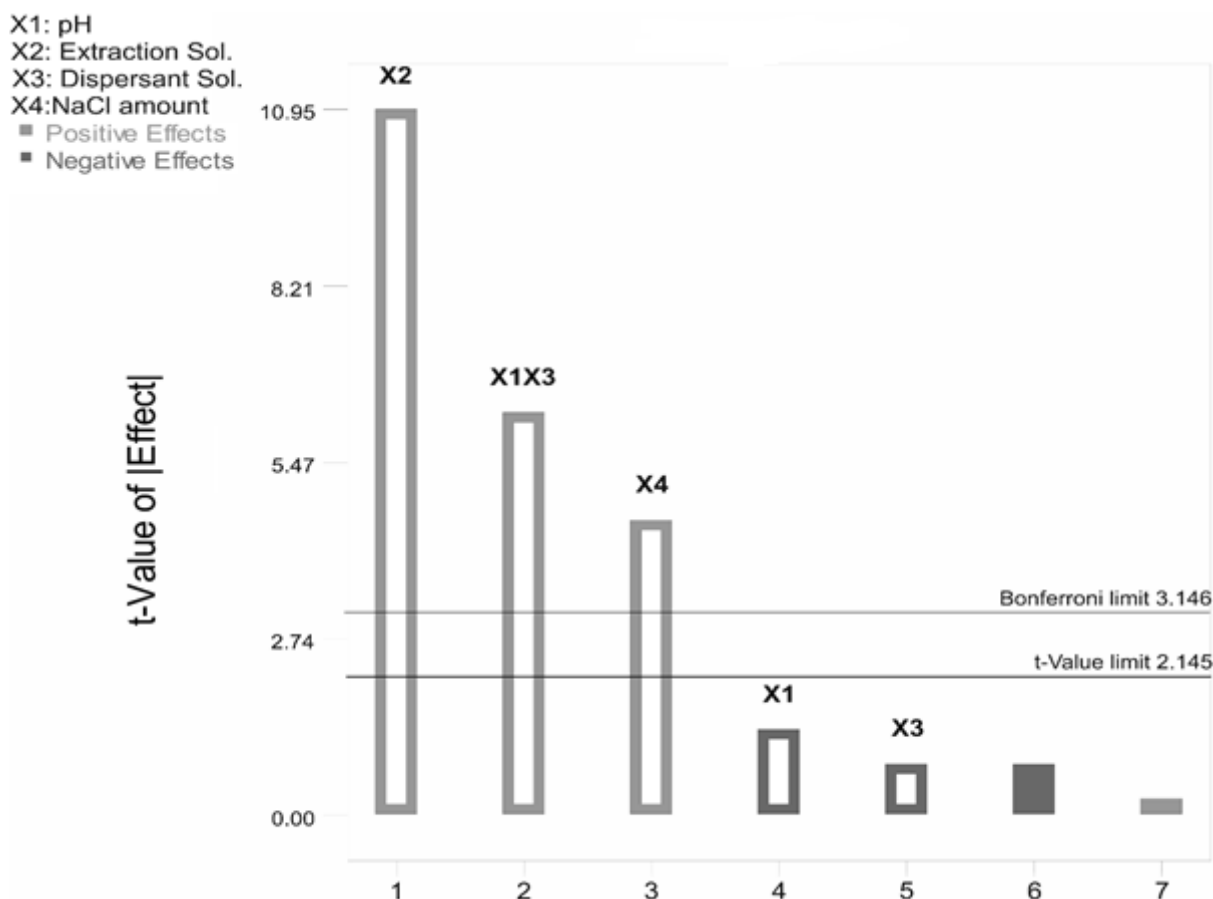


Figure 9 : Diagramme de Pareto des effets principaux normalisés pour le plan de criblage (la réponse est la somme des pics des composés analysés ; $\alpha = 0.05$). X1 (pH de l'échantillon), X2 (volume du solvant d'extraction), X3 (volume du solvant dispersion) et X4 (quantité de NaCl).

1.2.3. Plan d’optimisation composite centré et les surfaces de réponses

Les résultats de l’étape de criblage ont montré que tous les facteurs testés sont significatifs. Un plan composite centré et les surfaces de réponses sont utilisés pour explorer la relation entre les différents facteurs et les réponses mesurées pour déterminer les optimums de tous les facteurs testés afin d’obtenir de bons rendements d’extraction et une sensibilité élevée de la méthode. Tous les essais sont réalisés sur une solution du mélange des différents standards préparée à 10 µg/mL. L’ANOVA a été réalisée sur les données obtenues pour ajuster un polynôme mathématique de second degré (équation 3) qui permet de déterminer et prédire les réponses inconnues pour tracer les surfaces de réponses.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{34} X_3 X_4 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{44} X_4^2 \dots \dots \dots \text{(équation 3)}$$

Où Y : la réponse pour la somme des surfaces des pics de tous les composés analysés en fonction du pH de l'échantillon (X1), de volume du solvant d'extraction (X2), de volume du solvant dispersion (X3) et de la quantité de NaCl (X4).

$$\beta_0 = -1.88 \cdot 10^8, \beta_1 = + 1.14 \cdot 10^8, \beta_2 = + 1.06 \cdot 10^6, \beta_3 = + 2.33 \cdot 10^5, \beta_4 = - 2.32 \cdot 10^5, \beta_{12} = -1,39 \cdot 10^5, \beta_{13} = - 44264.42, \beta_{14} = + 93208. 26, \beta_{23} = - 34.65, \beta_{24} = + 288.77, \beta_{34} = + 52.31, \beta_{11} = - 2.62 \cdot 10^7, \beta_{22} = -1063.93, \beta_{33} = -109.83, \beta_{44} = -21.64.$$

L'équation 3 indique que le modèle comprend quatre effets principaux, six effets à deux facteurs et quatre effets de courbure avec : β_0 ordonnée à l'origine, $\beta_1 - \beta_4$ sont les coefficients de régression linéaire, $\beta_{12} - \beta_{34}$ sont les coefficients des interactions des facteurs et $\beta_{11} - \beta_{44}$ sont les coefficients de régression quadratique.

Il est toujours nécessaire d'examiner le modèle mathématique ajusté pour s'assurer qu'il fournit une approximation adéquate de système réel. La signification statistique du modèle obtenu a été validée par le test ANOVA en utilisant les *p*-value du modèle et des manques d’ajustement. Les résultats de l’ANOVA donnés dans le tableau XI montrent que la valeur F de test FISHER est de 14.1 et la *p*-value du modèle est inférieure à 0.0001, ceux-ci indiquent que l'équation du modèle est bien ajustée pour donner la relation entre les réponses et les facteurs principaux. La *p*-value de manque des ajustements est supérieure à 0.05, ce qui confirme que ces derniers ne sont pas significatifs par rapport à l'erreur pure. Le coefficient de détermination R^2 est de 0.931 supérieurs à 0.8 ce qui indique la bonne qualité du modèle obtenu. Le $R^2_{ajusté}$ est de 0.87 ainsi le modèle a un fort potentiel de prédire les réponses inconnues. Le CV des

expériences répétées sur les points aux centres est de 12.55%, ce qui indique que la répétabilité des données expérimentales est très bonne. La figure 10 montre les réponses calculées par rapport aux réponses réelles et qui sont situées généralement sur la ligne droite de la première bissectrice, ce qui indique qu'il existe une bonne corrélation entre les valeurs réelles et celles calculées.

Tableau XI. Les résultats de l'ANOVA pour le modèle quadratique des surfaces de réponse.

Source de variation	Source de variation	DDL	Carré moyen	F- Value	P-value Probabilité > F	
Modèle	4.381E+016	14	3.129E+015	14.40	< 0.0001	Significatif
X1	1.471E+015	1	1.471E+015	6.77	0.0200	
X2	3.125E+016	1	3.125E+016	143.78	< 0.0001	
X3	2.874E+014	1	2.874E+014	1.32	0.2682	
X4	4.135E+015	1	4.135E+015	19.03	0.0006	
X1X2	7.717E+014	1	7.717E+014	3.55	0.0791	
X1X3	3.135E+014	1	3.135E+014	1.44	0.2484	
X1X4	1.064E+015	1	1.064E+015	4.90	0.0428	
X2X3	7.686E+012	1	7.686E+012	0.035	0.8534	
X2X4	4.086E+014	1	4.086E+014	1.88	0.1905	
X3X4	5.364E+013	1	5.364E+013	0.25	0.6265	
X1 ²	1.180E+015	1	1.180E+015	5.43	0.0342	
X2 ²	3.105E+015	1	3.105E+015	14.29	0.0018	
X3 ²	5.294E+014	1	5.294E+014	2.44	0.1394	
X4 ²	1.204E+013	1	1.204E+013	0.055	0.8171	
Résidus	3.260E+015	15	2.173E+014			
Manque d'ajustement	7.286E+014	10	7.286E+013	0.14	0.9952	Non Significatif
Erreur pure	2.532E+015	5	5.063E+014			
Erreur Total	4.707E+016	29				

DDL : degré de liberté ; *p*-value : test de comparaison de la variance du modèle avec la variance résiduelle.

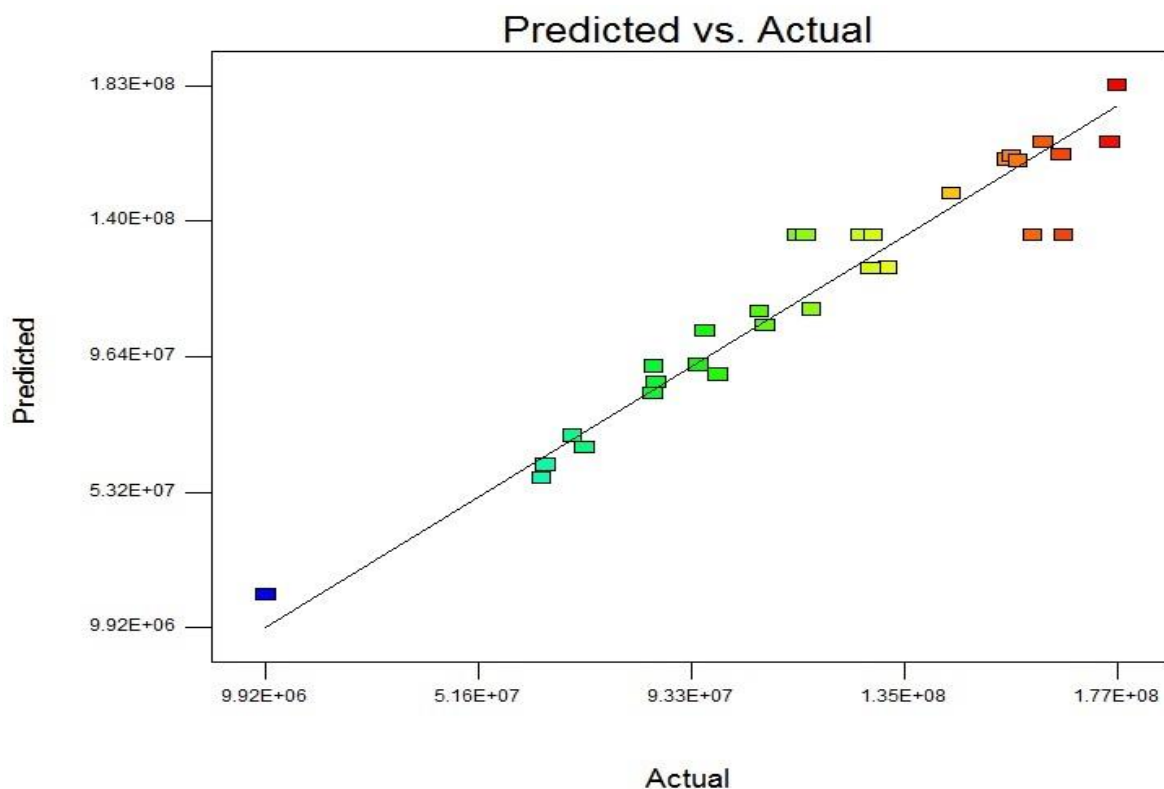


Figure 10 : Les réponses calculées en fonction des réponses réelles.

L'étape de l'optimisation est réalisée pour déterminer les optimums des différents facteurs testés (pH, volume du solvant d'extraction, volume du solvant de dispersion et la quantité de NaCl) pour maximiser l'extraction des composés analysés. Cette étape est basée sur la fonction de désirabilité et les surfaces de réponses dessinées selon les résultats du plan centré composite. Ces surfaces de réponses permettent d'étudier l'effet interactif des différents facteurs deux à deux.

Comme on peut le constater sur la figure 11A qui donne l'effet d'interaction du pH avec NaCl, la réponse considérée comme la somme des surfaces des pics des composés analysés augmente avec la diminution du pH de l'échantillon. Malgré l'intervalle du pH testé est inférieur au pKa des additifs alimentaires étudiés, pKa= 4.2 pour l'acide benzoïque, 4.76 pour l'acide sorbique, 11.82 pour butylhydroxyanisole et 12.75 pour butylhydroxytoluène (tableau I). Par ailleurs, le pH 2 permet d'obtenir une meilleure réponse analytique ce qui peut être expliquée par le fait qu'à ce pH, tous les composés sont sous leurs formes moléculaires neutres la plus soluble dans la phase organique.

Les figures 11B, C montrent les surfaces de réponses qui représentent l'effet d'interaction du solvant d'extraction avec le solvant de dispersion et avec le NaCl,

respectivement. Ces figures montrent que l'efficacité et la sensibilité de la méthode augmentent rapidement avec l'augmentation de volume de solvant d'extraction jusqu'à 350 μ L et elles augmentent lentement avec l'augmentation de volume du solvant de dispersion et la réponse maximale est obtenue à 625 μ L.

L'ajout de NaCl présente un effet positif sur l'efficacité de l'extraction et la sensibilité de la méthode et la réponse maximale est obtenue à 0.85 g/5 mL. L'effet positif de NaCl peut être expliqué par l'effet salting out et l'augmentation de la force ionique dans la phase aqueuse qui conduisent à la diminution de la solubilité des composés cibles dans cette phase et l'amélioration de leur extraction dans la phase organique. De plus, on a constaté que l'augmentation de volume de la phase organique sédimentée, avec l'augmentation de la quantité de sel, suite au relargage de l'acétone qui sédimente avec le chloroforme permettent l'amélioration de l'efficacité de l'extraction et la sensibilité de la méthode en raison de la solubilité de tous les additifs alimentaires analysés dans l'acétone.

En se basant sur les graphes des surfaces de réponses et les indices de désirabilité utilisées pour maximiser la réponse, les conditions d'extraction optimales finales de polynôme simulé ont été comme suit : le volume de chloroforme et de l'acétone ont été de 350 μ L et 625 μ L, respectivement, la concentration de NaCl a été 0.85 g/5 mL et le pH 2. Ces résultats d'optimisation sont utilisés dans la suite de travail pour la validation de la méthode analytique proposée.

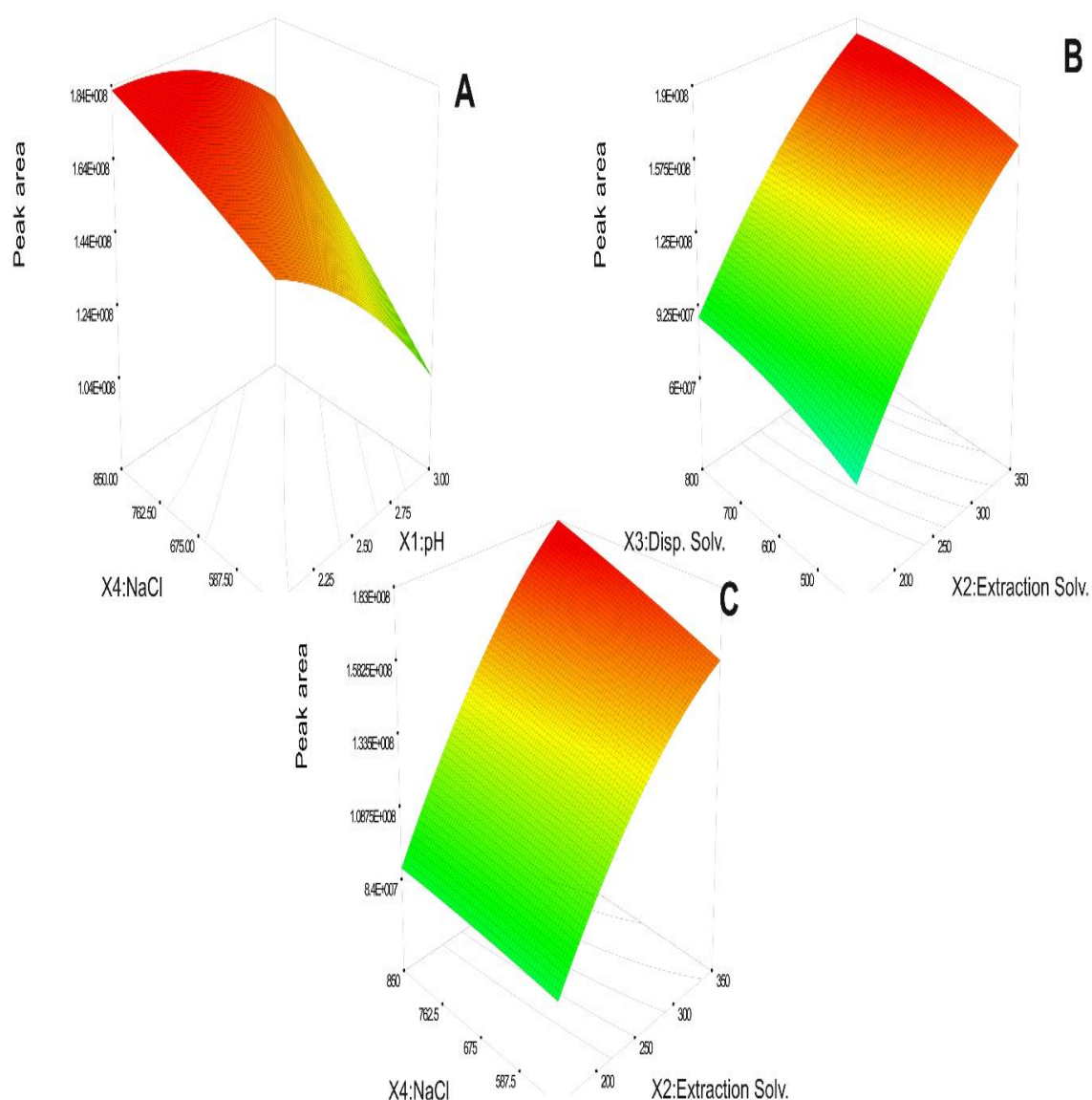


Figure 11 : Les graphes des surfaces de réponses 3D estimées pour l'optimisation du plan centré composite de la DLLME montrant l'effet de la quantité de NaCl et du pH (A), le volume de chloroforme et d'acétone (B) et la quantité de NaCl et le volume de chloroforme (C).

1.3. Validation de la méthode analytique DLLME- HPLC- DAD

Les résultats analytiques obtenus sur les SE et les SV sont exprimés en fonction de rapport de l'aire de pic de composé analysé et l'aire de pic d'EI.

1.3.1. Fonction de réponse

La validation d'une méthode d'analyse selon les directives de la SFSTP 2006 permet de considérer plusieurs modèles de régression mathématique obtenus à partir de l'examen des résultats des standards d'étalonnage (SE) (tableau XII).

Tableau XII. Les résultats analytiques obtenus pour les SE pour les additifs alimentaires AB, AS, BHA et BHT étudiés par DLLME-HPLC-DAD.

Échantillon	Série	AB		AS		BHA		BHT	
		Concentration introduite (µg/mL)	Réponse analytique	Concentration introduite (µg/mL)	Réponse analytique	Concentration introduite (µg/mL)	Réponse analytique	Concentration introduite (µg/mL)	Réponse analytique
SE 1	1	0.1011	0.063	0.1012	0.053	0.1006	0.04	0.098	0.0030
SE 1	1	0.1011	0.067	0.1012	0.054	0.1006	0.03	0.098	0.0029
SE 2	1	5.055	5.14	5.06	6.77	5.03	2.54	4.91	0.3386
SE 2	1	5.055	5.063	5.06	6.61	5.03	2.24	4.91	0.3594
SE 3	1	10.11	10.40	10.12	13.82	10.06	4.85	9.82	0.7002
SE 3	1	10.11	10.61	10.12	13.58	10.06	4.46	9.82	0.7081
SE 4	1	20.22	21.12	20.24	27.54	20.12	9.03	19.64	1.7560
SE 4	1	20.22	22.51	20.24	29.64	20.12	9.44	19.64	1.950
SE 1	2	0.1011	0.060	0.1012	0.049	0.1006	0.04	0.098	0.0039
SE 1	2	0.1011	0.064	0.1012	0.051	0.1006	0.037	0.098	0.0020
SE 2	2	5.055	5.43	5.06	6.60	5.03	2.36	4.91	0.2963
SE 2	2	5.055	5.61	5.06	6.69	5.03	2.34	4.91	0.3369
SE 3	2	10.11	10.40	10.12	12.92	10.06	4.41	9.82	0.6947
SE 3	2	10.11	10.67	10.12	13.69	10.06	4.49	9.82	0.6614
SE 4	2	20.22	21.52	20.24	27.99	20.12	8.87	19.64	1.9011
SE 4	2	20.22	22.45	20.24	27.92	20.12	9.25	19.64	2.0487
SE 1	3	0.1011	0.069	0.1012	0.048	0.1006	0.04	0.098	0.0036
SE 1	3	0.1011	0.063	0.1012	0.052	0.1006	0.038	0.098	0.0028
SE 2	3	5.055	5.81	5.06	7.05	5.03	2.28	4.91	0.3361
SE 2	3	5.055	5.38	5.06	6.78	5.03	2.40	4.91	0.2865
SE 3	3	10.11	9.94	10.12	12.01	10.06	4.23	9.82	0.6367
SE 3	3	10.11	10.95	10.12	13.46	10.06	4.58	9.82	0.7231
SE 4	3	20.22	20.59	20.24	26.31	20.12	9.02	19.64	2.0295
SE 4	3	20.22	22.77	20.24	27.97	20.12	8.96	19.64	2.0266

La fonction de réponse qui décrit la relation entre les concentrations introduites (X) de chaque composé et les réponses (Y) obtenues est sélectionnée en fonction du profil d'exactitude le plus approprié. Cette fonction peut être sélectionnée en utilisant l'indice d'exactitude considéré comme étant la moyenne géométrique des trois autres indices qui sont l'indice de justesse, de fidélité et de l'intervalle du dosage. Comme montré dans le tableau XIII, différentes fonctions de réponse adéquates sont choisies pour les différents composés étudiés. Ces fonction sont la régression linéaire pondérée 1/X pour l'acide benzoïque, la régression linéaire pondérée 1/X² pour l'acide sorbique et le BHA et la régression quadratique pondérée 1/X pour BHT.

Tableau XIII. Les différentes fonctions de réponse choisies pour les additifs alimentaires AB, AS, BHA et BHT étudiés par la méthode DLLME- HPLC- DAD.

Composé	Modèles	Indice d'exactitude	Limites inférieure et supérieure de quantification	Indice de l'intervalle du dosage	Indice de fidélité	Indice de justesse
AB	régression linéaire pondérée 1/X	0.9376	[0.1011, 20.22]	1.00	0.8271	0.9964
AS	régression linéaire pondérée 1/X ²	0.9278	[0.1012, 20.24]	1.00	0.8033	0.9942
BHA	régression linéaire pondérée 1/X ²	0.9069	[0.1006, 20.12]	1.00	0.7528	0.9907
BHT	régression quadratique pondérée 1/X	0.8203	[0.09820, 19.64]	1.00	0.5630	0.9805

Les résultats de la validation montrent que les coefficients de détermination (R^2) obtenus sur les trois courbes d'étalonnage tracées pour les trois différentes séries réalisées pour chaque composé sont supérieurs à 0.99 (tableau XIV).

Tableau XIV. Les coefficients de détermination (R^2) obtenus pour les différentes courbes d'étalonnage des additifs alimentaires AB, AS, BHA et BHT étudiés par la méthode DLLME- HPLC- DAD.

Composé	Série 1	Série 2	Série 3
AB	0.9972	0.9984	0.9935
AS	0.9957	0.9980	0.9955
BHA	0.9972	0.9987	0.9985
BHT	0.9940	0.9963	0.9980

Tous les autres critères de validation sont évalués sur les résultats obtenus sur les SV (tableau XV)

Tableau XV. Les résultats analytiques obtenus pour les SV des additifs alimentaires AB, AS, BHA et BHT étudiés par la méthode DLLME- HPLC-DAD.

Echantillon	Série	AB		AS		BHA		BHT	
		Concentration introude (µg/mL)	Réponse analytique	Concentration introude (µg/mL)	Réponse analytique	Concentration introude (µg/mL)	Réponse analytique	Concentration introude (µg/mL)	Réponse analytique
SV 1	1	0.1011	0.0675	0.1012	0.0509	0.1006	0.0371	0.0982	0.0041
SV 1	1	0.1011	0.0601	0.1012	0.05618	0.1006	0.0352	0.0982	0.0036
SV 1	1	0.1011	0.0652	0.1012	0.0459	0.1006	0.0446	0.0982	0.0034
SV2	1	5.055	5.6968	5.06	6.9008	5.03	2.511	4.91	0.2734
SV2	1	5.055	5.3927	5.06	6.2476	5.03	2.4977	4.91	0.3126
SV2	1	5.055	5.6618	5.06	7.0135	5.03	2.2864	4.91	0.3329
SV3	1	10.11	11.091	10.12	13.7131	10.06	4.8914	9.82	0.7044
SV3	1	10.11	11.462	10.12	14.3747	10.06	4.9197	9.82	0.7445
SV3	1	10.11	10.557	10.12	12.9767	10.06	4.5928	9.82	0.6341
SV4	1	20.22	21.428	20.24	28.7124	20.12	9.2512	19.64	2.0501
SV4	1	20.22	22.317	20.24	29.0411	20.12	9.7692	19.64	2.0466
SV4	1	20.22	22.171	20.24	29.1419	20.12	9.1064	19.64	1.8449
SV 1	2	0.1011	0.0628	0.1012	0.0543	0.1006	0.0428	0.0982	0.0041
SV 1	2	0.1011	0.0693	0.1012	0.0569	0.1006	0.0415	0.0982	0.0038
SV 1	2	0.1011	0.0626	0.1012	0.0521	0.1006	0.0389	0.0982	0.0029
SV2	2	5.055	5.2687	5.06	6.6584	5.03	2.3057	4.91	0.3006
SV2	2	5.055	5.7243	5.06	7.4383	5.03	2.4531	4.91	0.2933
SV2	2	5.055	5.2059	5.06	6.1272	5.03	2.1536	4.91	0.3029
SV3	2	10.11	11.194	10.12	12.3895	10.06	4.7383	9.82	0.6787
SV3	2	10.11	10.959	10.12	13.6324	10.06	4.6562	9.82	0.6189
SV3	2	10.11	10.778	10.12	13.1645	10.06	5.0632	9.82	0.6448
SV4	2	20.22	21.795	20.24	27.7399	20.12	9.2474	19.64	1.9192
SV4	2	20.22	21.598	20.24	27.1906	20.12	10.244	19.64	2.0182
SV4	2	20.22	22.635	20.24	28.6584	20.12	9.6193	19.64	1.7956
SV 1	3	0.1011	0.0643	0.1012	0.0531	0.1006	0.0372	0.0982	0.0035
SV 1	3	0.1011	0.0632	0.1012	0.0573	0.1006	0.0375	0.0982	0.0027
SV 1	3	0.1011	0.0705	0.1012	0.0483	0.1006	0.0391	0.0982	0.0035
SV2	3	5.055	4.9958	5.06	6.7101	5.03	2.5208	4.91	0.3544
SV2	3	5.055	5.2468	5.06	6.5379	5.03	2.1701	4.91	0.3312
SV2	3	5.055	5.4200	5.06	6.8555	5.03	2.4269	4.91	0.3585
SV3	3	10.11	11.002	10.12	13.1448	10.06	4.6671	9.82	0.7167
SV3	3	10.11	10.722	10.12	13.7604	10.06	4.5078	9.82	0.7303
SV3	3	10.11	11.074	10.12	13.1180	10.06	4.4915	9.82	0.7330
SV4	3	20.22	22.442	20.24	28.1079	20.12	9.112	19.64	2.1583
SV4	3	20.22	22.839	20.24	27.796	20.12	9.5162	19.64	2.0904
SV4	3	20.22	22.128	20.24	28.8011	20.12	9.0975	19.64	2.1409

1.3.2. Traitement des résultats des standards de la validation obtenus par la méthode DLLME- HPLC-DAD

1.3.2.1. Alignement et prédiction inverse des résultats

Tous les résultats obtenus après l'alignement et la prédiction inverse des données obtenues sur les SV sont donnés dans le tableau XVI

Tableau XVI. Les résultats de prédiction inverse obtenus sur les données analytiques des SV pour les additifs alimentaires AB, AS, BHA et BHT étudiés par la méthode DLLME- HPLC-DAD.

Échantillon	Serie	AB		AS		BHA		BHT	
		Concentration introduite (µg/mL)	Concentration calculée (µg/mL)	Concentration introduite (µg/mL)	Concentration calculée (µg/mL)	Concentration introduite (µg/mL)	Concentration calculée (µg/mL)	Concentration introduite (µg/mL)	Concentration calculée (µg/mL)
SV 1	1	0.1011	0.1076	0.1012	0.094	0.1006	0.0999	0.098	0.115
SV 1	1	0.1011	0.1007	0.1012	0.103	0.1006	0.0957	0.098	0.107
SV 1	1	0.1011	0.1055	0.1012	0.087	0.1006	0.1158	0.098	0.103
SV2	1	5.055	5.411	5.06	5.73	5.03	5.40	4.91	4.23
SV2	1	5.055	5.124	5.06	5.27	5.03	5.37	4.91	4.75
SV2	1	5.055	5.378	5.06	5.80	5.03	4.92	4.91	5.02
SV3	1	10.11	10.49	10.12	10.16	10.06	10.50	9.82	9.43
SV3	1	10.11	10.84	10.12	10.57	10.06	10.56	9.82	9.862
SV3	1	10.11	9.99	10.12	9.706	10.06	9.859	9.82	8.658
SV4	1	20.22	20.23	20.24	18.85	20.12	19.84	19.64	21.21
SV4	1	20.22	21.07	20.24	19.03	20.12	20.95	19.64	21.19
SV4	1	20.22	20.93	20.24	19.09	20.12	19.53	19.64	19.67
SV 1	2	0.1011	0.102	0.1012	0.105	0.1006	0.1080	0.0982	0.1192
SV 1	2	0.1011	0.108	0.1012	0.11	0.1006	0.1051	0.0982	0.1115
SV 1	2	0.1011	0.1016	0.1012	0.102	0.1006	0.0995	0.0982	0.09257
SV2	2	5.055	4.928	5.06	5.68	5.03	5.094	4.91	5.039
SV2	2	5.055	5.350	5.06	6.23	5.03	5.419	4.91	4.940
SV2	2	5.055	4.869	5.06	5.30	5.03	4.759	4.91	5.071
SV3	2	10.11	10.42	10.12	9.51	10.06	10.45	9.82	9.444
SV3	2	10.11	10.20	10.12	10.29	10.06	10.27	9.82	8.824
SV3	2	10.11	10.03	10.12	9.99	10.06	11.17	9.82	9.095
SV4	2	20.22	20.25	20.24	18.55	20.12	20.39	19.64	19.36
SV4	2	20.22	20.06	20.24	18.24	20.12	22.59	19.64	20.00
SV4	2	20.22	21.03	20.24	19.06	20.12	21.21	19.64	18.53
SV 1	3	0.1011	0.098	0.1012	0.1036	0.1006	0.099	0.098	0.1014
SV 1	3	0.1011	0.097	0.1012	0.1105	0.1006	0.1005	0.098	0.083
SV 1	3	0.1011	0.1035	0.1012	0.096	0.1006	0.1040	0.098	0.099
SV2	3	5.055	4.710	5.06	5.78	5.03	5.606	4.91	5.81
SV2	3	5.055	4.945	5.06	5.66	5.03	4.829	4.91	5.51
SV2	3	5.055	5.107	5.06	5.89	5.03	5.398	4.91	5.86
SV3	3	10.11	10.33	10.12	10.11	10.06	10.36	9.82	9.81
SV3	3	10.11	10.06	10.12	10.50	10.06	10.01	9.82	9.94
SV3	3	10.11	10.39	10.12	10.09	10.06	9.975	9.82	9.97
SV4	3	20.22	21.03	20.24	19.01	20.12	20.22	19.64	20.51
SV4	3	20.22	21.40	20.24	18.84	20.12	21.12	19.64	20.10
SV4	3	20.22	20.73	20.24	19.40	20.12	20.19	19.64	20.40

1.3.3. Performances des critères de la méthode d'extraction DLLME- HPLC- DAD

1.3.3.1. Fidélité

La fidélité est évaluée à deux niveaux qui sont la répétabilité et la fidélité intermédiaire. Ce critère qui permet de donner des informations sur les erreurs aléatoires est déterminé par le calcul de CV pour la répétabilité (intra-série) et pour la fidélité intermédiaire (inter-série) à chaque niveau de concentration des SV (HUBERT *et al*, 2007b). Le calcul des CV se fait par la division de l'écart type estimé pour la répétabilité et la fidélité intermédiaire par la concentration moyenne introduite à chaque niveau. Les résultats de tableau XVII montre que la fidélité de la méthode est acceptable avec des CV maximaux de 4.18, 5.94, 6.06 et 10.65 % pour AB, AS, BHA et BHT, respectivement pour la répétabilité et de 5.15, 5.94, 6.06 et 11.87% respectivement pour AB, AS, BHA et BHT pour la fidélité intermédiaire.

Tableau XVII. La répétabilité et la fidélité intermédiaire obtenues pour les additifs alimentaires AB, AS, BHA et BHT étudiés par la méthode DLLME- HPLC- DAD.

Composés	Concentration (µg/mL)	Répétabilité (CV %)	Fidélité intermédiaire (CV %)
AB	0.01	3.55	4.04
	5.05	4.18	5.15
	10.11	2.68	2.68
	20.22	2.16	2.31
AS	0.101	3.04	3.73
	0.506	5.94	5.94
	10.12	3.95	3.95
	20.24	1.76	2.09
BHA	0.1	5.94	5.94
	5.03	6.06	6.06
	10.06	3.73	4.00
	20.12	4.13	4.70
BHT	0.01	10.65	11.75
	4.91	5.32	11.87
	9.82	4.06	5.39
	19.64	3.43	4.63

1.3.3.2. Justesse

La justesse d'une méthode analytique donne des informations sur l'erreur systématique. Ce critère est évalué à tous les niveaux de concentrations des données de SV en comparant la moyenne des résultats obtenus par rapport à une valeur de référence acceptée comme vraie. Il

peut être exprimé en termes de biais absolu ou relatif ou en pourcentage de recouvrement (HUBERT *et al*, 2007b).

Le tableau XVIII montre que les résultats obtenus à chaque niveau de concentration sont très bons et acceptables pour tous les composés. Pour les biais absolus, les résultats sont inférieurs à 0.527, 0.82, 0.55 et 0.47, les biais relatifs sont inférieurs à 2.61, 4.05, 3.36 et 5.37 % et les recouvrements obtenus sont très proches de 100 % et sont compris entre 100.7-102.6%, 98.42-104.1 %, 102.5-103.4 % et 96.22-105.4 % pour AB, AS, BHA et BHT, respectivement.

Tableau XVIII. La justesse obtenue pour les additifs alimentaires AB, AS, BHA et BHT étudiés par la méthode DLLME- HPLC- DAD.

Composés	Concentration (µg/mL)	Biais absolu	Biais relatif %	Recouvrement relatif %
AB	0.101	0.0014	1.41	101.4
	5.05	0.036	0.72	100.7
	10.11	0.198	1.95	102.0
	20.22	0.527	2.61	102.6
AS	0.101	0.0014	1.37	101.4
	5.06	-0.019	-0.37	99.63
	10.10	-0.16	-1.58	98.42
	20.24	0.82	4.05	104.1
BHA	0.1	0.0025	2.54	102.5
	5.03	0.17	3.36	103.4
	10.06	0.29	2.9	102.9
	20.12	0.55	2.73	102.7
BHT	0.098	0.005	5.37	105.4
	4.91	0.23	4.64	104.6
	9.82	-0.37	-3.78	96.22
	19.64	0.47	2.38	102.4

1.3.3.3. Linéarité

La linéarité d’une méthode analytique fait référence à la relation entre les concentrations introduites et les concentrations calculées par prédiction inverse des résultats des SV (FEINBERG, 2007 ; HUBERT *et al*, 2007 a, b). La linéarité de la méthode est déterminée par ajustement d’un modèle de régression linéaire donné par la relation : concentrations estimées = f (concentrations introduites) (figure 12).

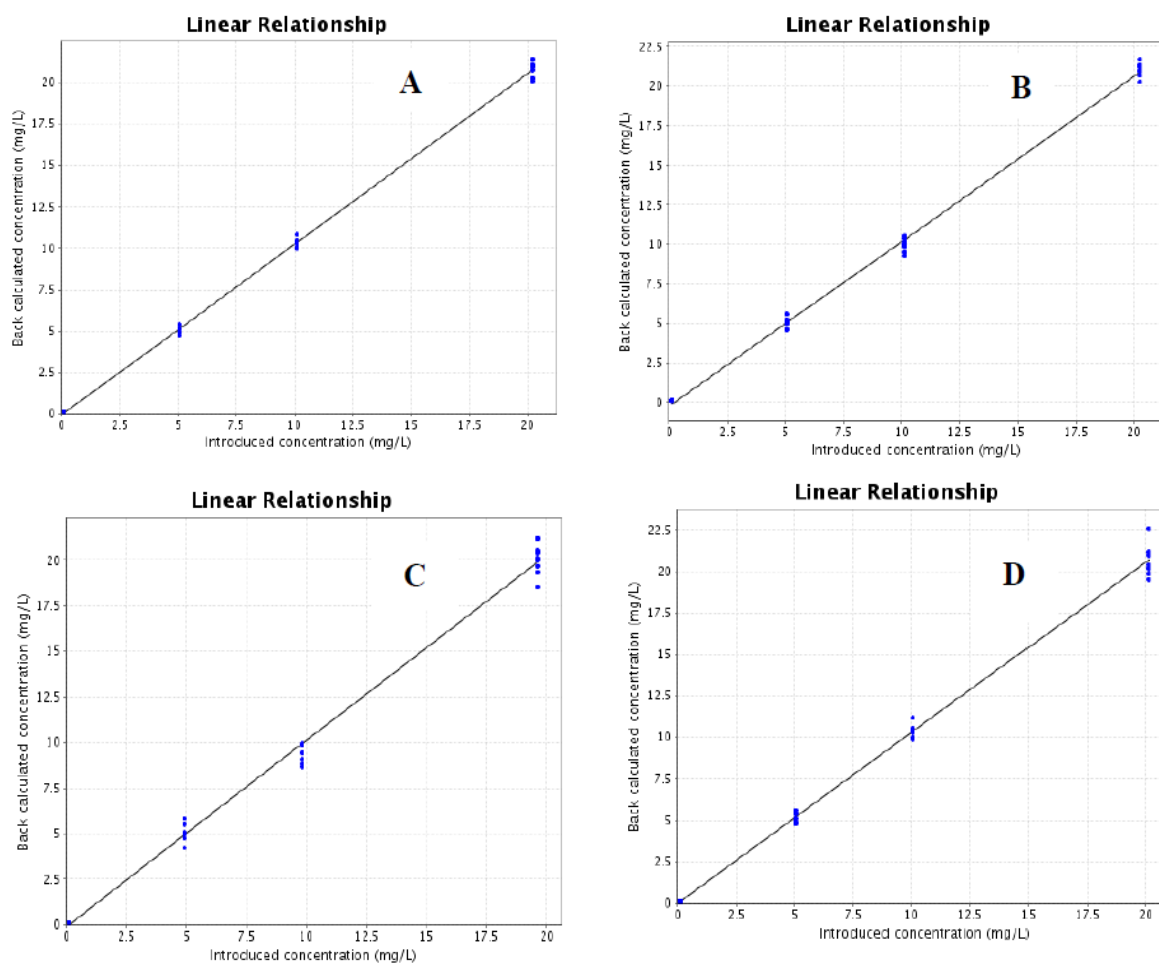


Figure 12 : Relation linéaire entre les concentrations introduites et calculées après prédiction inverse en utilisant le modèle sélectionné pour chaque additif alimentaire AB (A), AS (B), BHA (C) et BHT (D).

Les résultats présentés dans le tableau XIX, montre que les coefficients de détermination obtenus pour la linéarité sont supérieurs à 0.99 pour tous les composés étudiés.

Tableau XIX. Les paramètres de régression obtenus pour les additifs alimentaires AB, AS, BHA et BHT étudiés par la méthode DLLME-HPLC- DAD.

	Équation de la linéarité	Pente	Ordonnée à l'origine	R ²
AB	$Y = -0.05 + 1.027 X$	1.027	-0.05	0.9987
AS	$Y = -0.203 + 1.04 X$	1.04	-0.203	0.9975
BHA	$Y = 0.016 + 1.027 X$	1.027	0.016	0.9958
BHT	$Y = -0.075 + 1.018 X$	1.018	-0.075	0.9935

De plus, la figure 13 montre que les limites inférieures et supérieures des intervalles de tolérance calculées au risque $\beta = 80\%$ sont incluses à l'intérieur des limites d'acceptation λ fixées à $\pm 30\%$. Ces résultats montrent que la linéarité de la méthode est acceptable pour tous les composés étudiés.

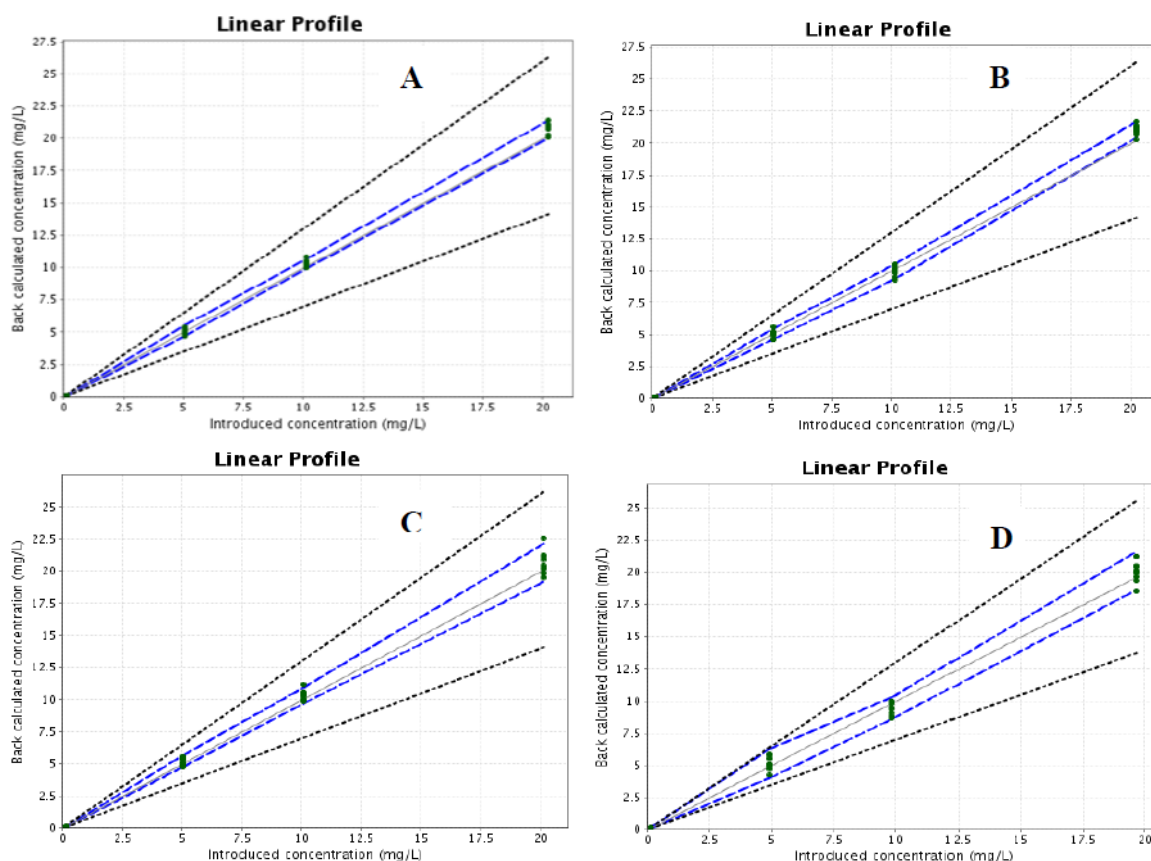


Figure 13 : Les profils linéaires de la méthode analytique DLLME- HPLC- DAD exprimés en valeurs des concentrations pour AB (A), AS (B), BHA (C) et BHT (D). La ligne continue est la ligne d'identité ($y = x$), les lignes discontinues correspondent aux limites de tolérance inférieures et supérieures du profil d'exactitude et les lignes pointillées représentent les limites d'acceptation λ fixées à $\pm 30\%$.

1.3.3.4. Profil d'exactitude

Une approche flexible du profil d'exactitude utilisée comme une méthode graphique pour l'erreur totale est appliquée comme un indicateur pour évaluer l'exactitude de la méthode (HUBERT *et al*, 2007b ; ROZET *et al*, 2007b). Cette approche est utilisée pour déterminer le degré de fiabilité de la méthode analytique et si la combinaison des erreurs, la justesse et la fidélité de cette méthode analytique sont correctement adaptées au problème analytique dans l'intervalle du dosage compris entre les deux limites de quantification LDQI et LDQS (ROZET

et al, 2007a). Ces deux limites (LDQI et LDQS) sont définies graphiquement à partir des profils d'exactitude donnés dans la figure 14 par l'intersection entre les limites de tolérance inférieures et supérieures et les limites d'acceptation λ fixées. La figure 14 montre que les intervalles de tolérances calculés sont inclus à l'intérieur des limites d'acceptation fixées à $\pm 30\%$ pour tous les composés. Ainsi, la méthode est jugée capable de fournir des résultats précis et exacts sur la totalité de l'intervalle du dosage pour tous les composés étudiés.

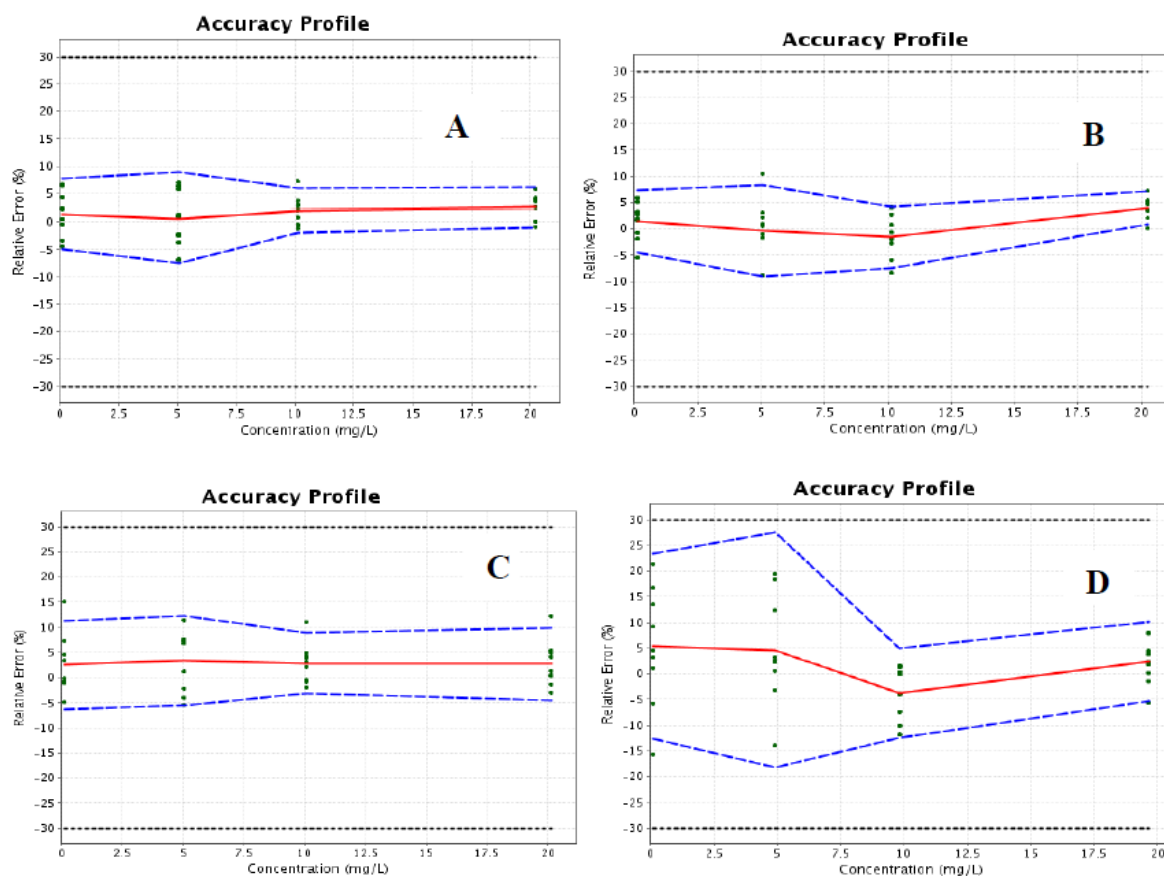


Figure 14 : Représentation schématique des profils d'exactitude obtenus pour AB (A), AS (B), BHA (C) et BHT (D). Les lignes discontinues sont les limites de tolérance inférieures et supérieures calculées au risque β de 80 %, les lignes pointillées sont les limites d'acceptation inférieures et supérieures λ fixées à $\pm 30\%$ et la ligne continue est le biais relatif.

1.3.3.5. Limite de quantification

La détermination des LDQ est basée sur le graphe du profil d'exactitude obtenu pour chaque composé (figure 14). Ces graphes du profil d'exactitude montre que les intervalles de tolérance sont inclus à l'intérieur des limites d'acceptation fixées $\pm 30\%$ pour tous les composés étudiés, ainsi les LDQ correspondent aux LDQI qui sont les plus petites concentrations qui

peuvent être quantifiées avec exactitude et sont de 0.101, 0.101, 0.1 et 0.098 µg/mL pour AB, AS, BHA et le BHT, respectivement.

1.3.3.6. Limite de détection

La LDD est la plus petite quantité d'un composés qui peut être détectée, mais non quantifiée avec exactitude. Dans ce travail, les LDD des différents composés ont été estimées et calculées à l'aide de la méthodologie de Miller et Miller (MILLER and MILLER, 1993). Cette méthodologie est basée sur le calcul pour chaque série de Y_{LDD} = ordonnée à l'origine (0 si négatif) + 3 x écart type résiduel obtenu par le test d'ANOVA. Le calcul par prédiction inverse en utilisant le modèle de régression sélectionné, donnera le X_{LDD} pour chaque série et la moyenne des différents X_{LDD} calculés donne la LDD de la méthode.

Les résultats donnés dans le tableau XX montrent que les LDD obtenues pour tous les composés sont de 0.03 µg/mL.

Tableau XX. Les LDD et les LDQ obtenus pour les additifs alimentaires AB, AS, BHA et BHT étudiés par la méthode DLLME- HPLC-DAD.

LDD µg/mL				LDQ µg/mL			
AB	AS	BHA	BHT	AB	AS	BHA	BHT
0.03	0.03	0.03	0.03	0.101	0.101	0.1	0.098

1.4. Analyse des échantillons commerciaux et présence des additifs analysés

La méthode optimisée et validée est appliquée pour l'analyse des différents échantillons pour le dosage des différents additifs alimentaires (AB, AS, BHA et BHT) dans 41 échantillons répartis en neuf différentes marques de jus de fruits qui sont fortement consommés en Algérie et disponibles sur les supermarchés de la région de Tizi Ouzou.

Comme résumé dans le tableau XXI, les résultats obtenus montrent que 21 échantillons (51.22%) n'indiquent pas les additifs alimentaires étudiés sur leurs étiquettes, alors que 20 échantillons (48.78%) indiquent le benzoate de sodium et le sorbate de potassium. Ces deux additifs alimentaires ont été quantifiés dans 25 et 20 échantillons, respectivement. En général, toutes les marques présentent des concentrations de ces additifs inférieures à 200 µg/mL, exempté la marque H (O 'jus, orange) qui présente des concentrations de AB ou bien ses sels de 216.2- 250.8 ± (15.54) µg/mL et la marque C (Ramy gazéifiée, orange) qui présente des concentrations de AS ou bien ses sels de 204.7-214 ± (3.78) µg/mL.

Comparant les résultats obtenus aux normes nationales et internationales, on détermine que ces résultats sont inférieurs ou sans dépasser les limites de 1000 µg/mL autorisées et fixées par le *Codex Alimentarius* (ANONYME 1, 1995) et sans toutefois dépasser les concentrations fixées par la Commission Européenne et qui sont de 200 et de 500 µg/mL pour AB et AS, respectivement (ANONYME, 2011).

En comparant les résultats obtenus aux autres publiés, on constate qu'ils sont généralement supérieurs à ceux trouvés par JAVANMARDI *et al* (2015) qui allant de non détecté à 95.5 µg/mL pour AB ou bien ses sels et de non détecté à 13 µg/mL pour AS ou bien ses sels. L'étude portugaise réalisée par DIOGO *et al* (2013) a montré que les deux composés AB et AS ou bien leurs sels n'ont pas été détectés dans les jus de fruits et seulement les boissons gazeuses contiennent ces additifs alimentaires.

Il est important de noter que les deux autres additifs alimentaires étudiés le BHA et le BHT ne sont pas autorisés dans les jus par les différents organismes nationaux et internationaux. Les résultats obtenus montrent que ces deux composés n'ont pas été détectés dans aucun des échantillons analysés et sont en accord avec ces différents organismes législatifs. Par ailleurs, l'étude Iranienne de BIPARVA *et al*, (2012) ont quantifié ces deux composés à des concentrations de 189 à 539 µg/L pour le BHA et de 80 à 320 µg/L pour le BHT dans les différentes marques des échantillons de jus de fruits de marché Iranien.

Tableau XXI. Les résultats analytiques du dosage des additifs alimentaires AB, AS, BHA et BHT étudiés par la méthode DLLME-HPLC-DAD dans les échantillons commerciaux.

Échantillon	Étiquetage	AB		AS		BHA	BHT
		Concentration réelle (µg/mL)	Écart type	Concentration réelle µg/mL	Écart type	Concentration réelle (µg/mL)	Concentration réelle (µg/mL)
Assiri Vita jus	A1	Pas de mention de AB, AS, BHA et BHT	Non quantifié	-	Non détecté	-	Non détecté
	A2						
	A3						
	A4						
	A5						
	A6						
	A7						
	A8						
	A9						
	A10						
Jus Ngaous multi fruits	B1	Pas de mention de AB, AS, BHA et BHT	Non quantifié	-	Non détecté	-	Non détecté
	B2						
	B3						
Jus Ramy gazéifié orange	C1	Mention de AB, AS et pas de mention de BHA et BHT	135.64	7.45	204.7	3.78	Non détecté
	C2		139.85		207.0		
	C3		143.78		214.0		
	C4		133.52		207.1		
	C5		124.08		211.5		
Jus Plus Fares orange	D1	Mention de AB, AS et pas de mention de BHA et BHT	141.29	8.69	68.5	3.75	Non détecté
	D2		147.18		72.6		
	D3		136.63		70.7		
	D4		126.62		63.9		
Jus Ngaoues Cocktail	E1	Pas de mention de AB, AS, BHA et BHT	Non quantifié	-	Non quantifié	-	Non détecté
	E2						
	E3						
Jus Plus Fares orange -ananas	F1	Mention de AB, AS et pas de mention de BHA et BHT	138.01	6.86	66.05	2.67	Non détecté
	F2		136.80		67.40		
	F3		149.24		71.19		
Jus Ramy Gazéifié ananas	G1	Mention de AB, AS et pas de mention de BHA et BHT	128.90	2.34	153.29	2.56	Non détecté
	G2		129.73		153.05		
	G3		125.32		157.61		
Jus Safir	H1	Mention de AB, AS et pas de mention de BHA et BHT	250.77	15.54	53.11	7.11	Non détecté
	H2		245.65		45.21		
	H3		216.19		35.51		
	H4		234.43		43.53		
	H5		218.64		36.76		
Jus O'jus orange	I1	Pas de mention de AB, AS, BHA et BHT	45,85	0.69	Non quantifié	-	Non détecté
	I2		45.14				
	I3		45.43				
	I4		44.63				
	I5		46.43				

PARTIE EXPÉRIMENTALE 2

2.1. Conditions chromatographiques de séparation des additifs alimentaires ACE, SAC, APM, AB et AS

Une meilleure résolution est obtenue en utilisant un mode gradient (tableau XXII) avec une phase mobile constituée par un mélange de deux solvants :

- éluant A est un tampon acétate d’ammonium préparé à une concentration 2.5 Mm/L acidifié par l’acide trifluoroacétique à 0.01% (v/v) ;
- éluant B est l’acétonitrile.

Tableau XXII. Le programme d’élution en mode gradient et les autres conditions chromatographiques appliqués pour l’analyse des additifs alimentaires ACE, SAC, APM, AB et AS étudiés par la méthode SALLE- UPLC-UV.

	Temps	A %	B %
Phase mobile	0	100	0
	2	93	7
	3	65	35
	4	90	10
	4.01	90	10
	5.5	93	7
	7	0	100
	9	93	7
Autres conditions chromatographiques	Débit		0.2 mL/min.
	Volume d’injection		10 µL
	Température de la colonne		40 ° C
	Longueur d’onde de détection		210 nm

Tous les composés ont été élués en moins de 6 min dans l'ordre suivant : ACE, SAC, APM, AB et AS (figure 15). La proportion 100 % du solvant B est utilisée pendant 1.5 min pour nettoyage de la colonne, puis 7 % du solvant B pendant 2 min pour rééquilibrer la colonne et revenir aux conditions chromatographiques initiales.

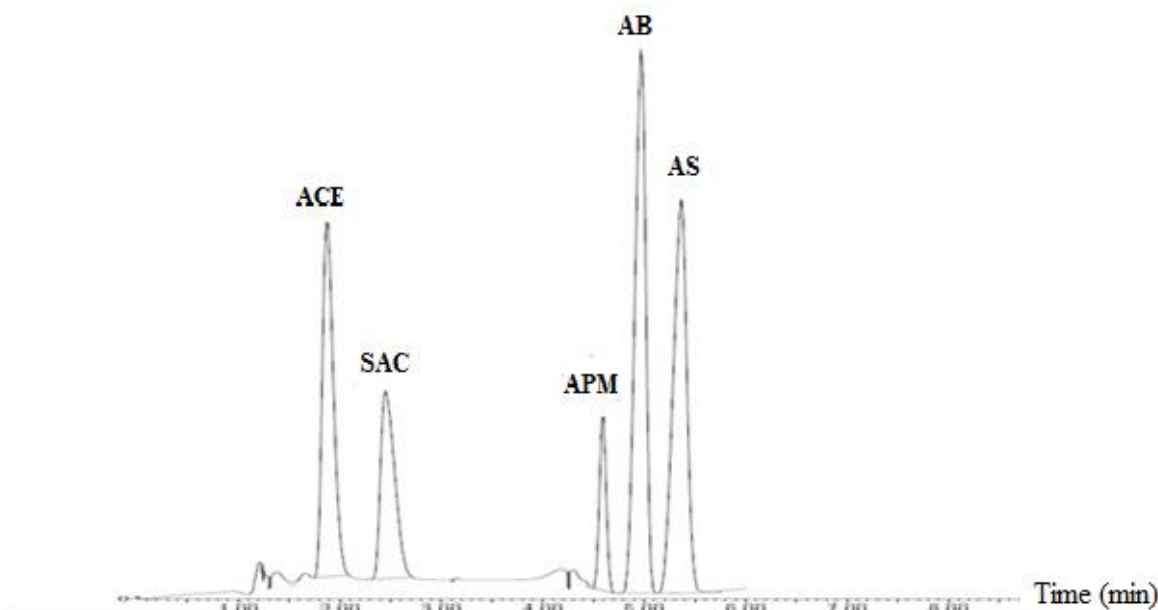


Figure 15 : Chromatogramme de la solution standard des additifs alimentaires étudiés ACE, SAC, APM, AB et AS.

2.2. Optimisation de la procédure d'extraction SALLE

2.2.1. Sélection du type et le volume du solvant d'extraction

La sélection du solvant d'extraction présente une considération importante et une étape cruciale pour contrôler l'efficacité de la méthode d'extraction SALLE. Ce solvant doit être polaire, miscible avec l'eau à toutes proportions, présente une grande capacité de dissolution des analytes et facilement relarguer de l'eau par l'effet de salting out après ajout d'un électrolyte tel que le sel. Les concentrations saturantes des différents sels en présence des différents solvants organiques sont différentes pour chaque sel. Par conséquent, différents tests sont effectués en utilisant le sulfate d'ammonium pour déterminer sa concentration saturante avec réalisation de relargage *in situ* des différents solvants d'extraction testés tels que (l'acétone, l'éthanol, l'acétonitrile et l'isopropanol). Les résultats montrent que ces quantités ont été trouvées comprises entre 1.7 et 2.05 g.

Afin de sélectionner le solvant d'extraction le plus approprié, 1 mL de chaque solvant a été testé dans un mélange de 3 mL d'échantillon et en présence de différentes quantités de sulfate d'ammonium utilisées selon le type du solvant testé. Les résultats donnés par la figure 16A, permettent de constater que les réponses maximales (aire de pic des composés) ont été obtenues avec l'utilisation de l'éthanol pour ACE, SAC et APM et avec l'utilisation de l'acétone pour

AB et AS. Ainsi, des mélanges d'éthanol et d'acétone à différents proportions (50: 50, 75: 25 et 25: 75 v/v) ont été testés. Comme montré par la figure 16B, la réponse donnée comme la somme des surfaces des pics des composés est identique. Cependant, le rapport (50 : 50 v/v) donne le meilleur résultat pour la SAC utilisée dans les jus de fruits à très faible concentration par rapport aux autres additifs alimentaires étudiés. Par conséquent, le mélange éthanol : acétone (50: 50 v/v) est sélectionné comme le solvant d'extraction le plus approprié.

Pour le choix de volume du solvant d'extraction, différents volumes de 0.5, 0.8, 1.1, 1.4, 1.6 et 2 mL sont testés. Les résultats illustrés dans la figure 16C montrent que plus le volume du solvant d'extraction augmente, plus la somme des aires des pics des composés diminuent et les résultats sont plus importants pour le volume de 0.5 mL. Ces résultats sont expliqués par le fait que l'augmentation de volume du solvant d'extraction, la masse des analytes transférés augmente également et davantage les additifs alimentaires sont extraits de la phase aqueuse vers la phase organique. Cependant, l'effet de dilution à des volumes élevés du solvant d'extraction réduit la concentration des composés extraits. Par conséquent, le volume de 0.5 mL est choisi comme l'optimum de la méthode.

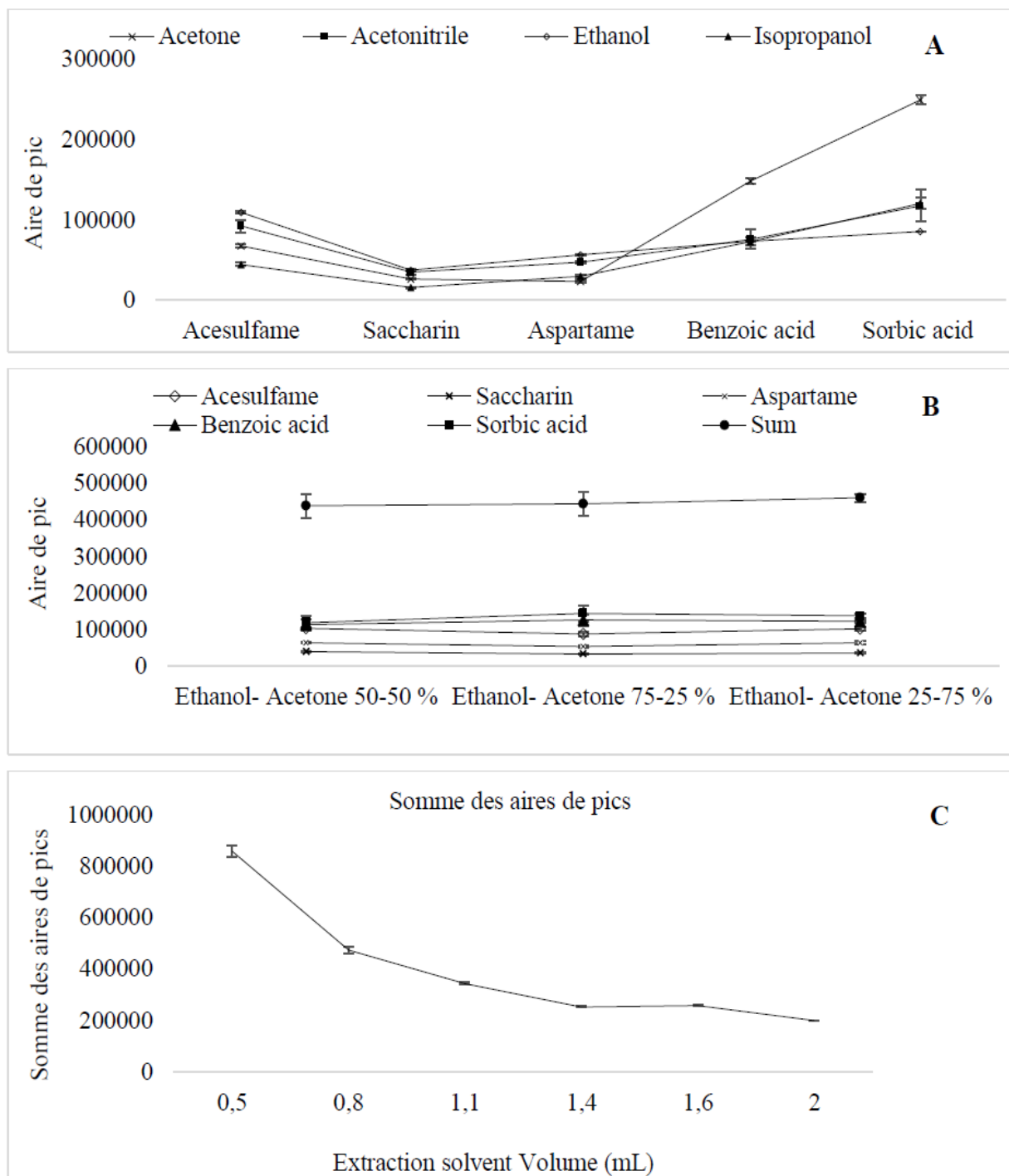


Figure 16 : Influence du type de solvant d'extraction (A), du rapport acétone : éthanol (B) et de volume du solvant d'extraction (C) sur l'efficacité de la méthode SALLE. Conditions d'extraction : (A) volume du solvant d'extraction, 1 mL ; quantité de sulfate d'ammonium, 1.7-2.05 g/3 mL et pH, 2 ; (B) volume de solvant d'extraction, 1 mL ; quantité de sulfate d'ammonium, 1.7 g/ 3 ml et pH, 2 ; (C) ; solvant d'extraction, éthanol : acétone (50 :50 v/v) ; quantité de sulfate d'ammonium, 1.7 g/3 ml et pH, 2.

2.2.2. Sélection du type et de la quantité de sel

Comme il est connu, le phénomène de salting out pour la séparation et la formation de deux phases *in situ* entre le solvant d'extraction organique et la solution aqueuse varie selon le type de sel utilisé. Différents agents de salting out organiques et inorganiques autres que le sulfate d'ammonium ont été testés à leur concentration saturante de 1.08, 3.7, 1.42 et 1.15 g/3 mL pour le chlorure de sodium, le sulfate de magnésium heptahydraté, le sulfate de sodium et le chlorure d'ammonium, respectivement.

Les résultats ont montré que la formation de deux phases *in situ* claires et nettes est obtenue en utilisant le sulfate d'ammonium. Pour le chlorure de sodium et le chlorure d'ammonium, la formation des deux phases n'a pas été obtenue. Cela est probablement dû à la présence de méthanol dans l'échantillon utilisé pour la préparation de la solution standard de l'aspartame. Une autre raison est que ces sels ont un faible pouvoir de salting out car ils sont des anions ou des cations monovalents (LU *et al*, 2013). Pour le sulfate de magnésium heptahydraté, les deux phases n'étaient pas clairement séparées. Dans le cas de sulfate de sodium, un effet salting out important est observé suite au relargage simultanément des molécules d'eau et du solvant d'extraction. Par conséquent, le sulfate d'ammonium ayant donné la meilleure séparation *in situ* des deux phases a été sélectionnée pour la suite du travail.

La force ionique présente également une influence sur la solubilité des composés analysés dans la phase aqueuse et leur transfert vers la phase organique. L'effet de la concentration de sulfate d'ammonium sur l'efficacité de l'extraction a été étudié à différentes concentrations comprises entre 1.6 et 1.9 g/ 3 mL. Comme montré dans la figure 17, lorsque la concentration en sulfate d'ammonium augmente de 1.6 à 1.7 g, la réponse pour la somme des aires des pics augmente également. Cela peut être expliquée par la théorie d'hydratation, car lorsque la concentration en ions de sel augmente dans l'eau, les molécules d'eau forment préférentiellement une sphère d'hydratation autour des ions de sel et moins de molécules d'eau sont disponibles pour hydrater les composés analysés (KOKOSA *et al*, 2009). La différence de force d'interaction entre les paires "ion- eau" et "eau- alcool" conduit à la séparation de la phase organique riche en analytes de celle aqueuse (WANG *et al*, 2010). Cependant, la réponse pour la somme des aires de pics des composés analysés diminue lorsque la quantité de sel est ajoutée à des concentrations de 1.8 et 1.9 g/3 mL. Cela peut être expliqué par l'augmentation de la viscosité de la solution aqueuse, entraînant un transfert de masse difficile.

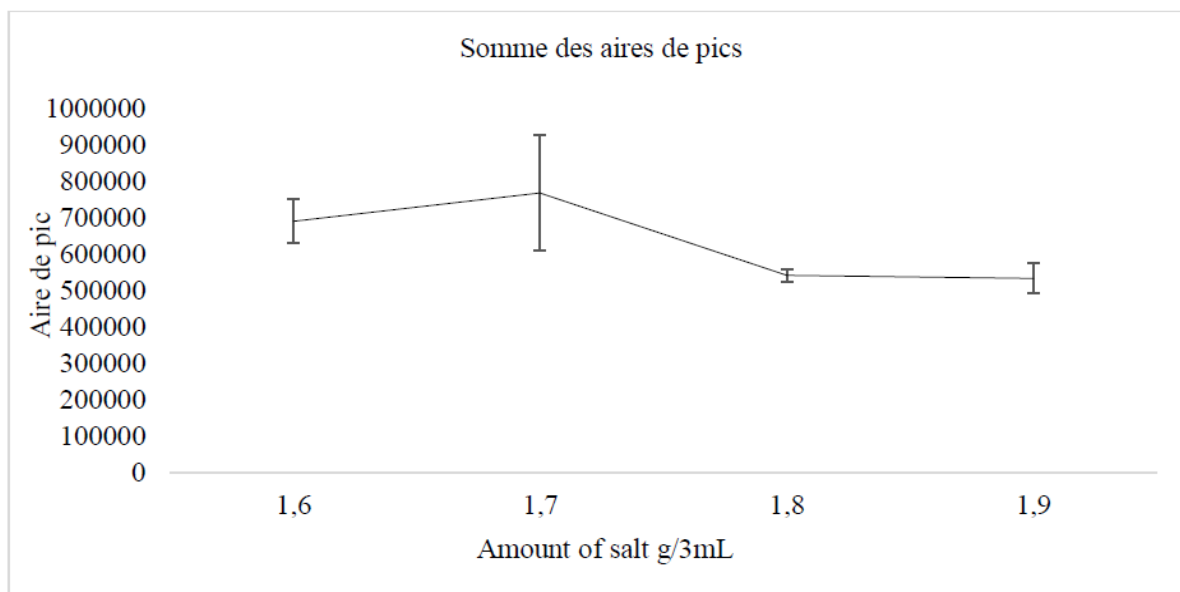


Figure 17 : Influence de la quantité de sel sur l'efficacité de la méthode SALLE. Conditions d'extraction : solvant d'extraction éthanol : acétone (50 :50 v/v) ; volume du solvant d'extraction 0.5 mL et pH, 2.

2.2.3. Sélection du pH de l'échantillon

Le pH de l'échantillon est un facteur important qui affecte l'efficacité d'extraction et le transfert des analytes de la phase aqueuse vers la phase organique. Pour améliorer l'efficacité de l'extraction, le pH de l'échantillon doit être ajusté pour supprimer l'ionisation de tous les composés acides ou basiques en tenant compte du pKa des composés étudiés acésulfame (pKa = 2), saccharine (pKa = 2), aspartame (pKa = 3.1 et 7.9), acide benzoïque (pKa = 4.19) et l'acide sorbique (pKa = 4.76).

Au pH élevé, les capacités d'ionisation des groupements amines et carboxyliques de ces composés sont très élevées. Les composés basiques de la matrice prennent la forme neutre extraite par les solvants organiques et peuvent ainsi interférer avec les composés analysés. Pour éviter cet inconvénient, le pH a été étudié dans l'intervalle de 1 à 4. Comme indiqué par WANG *et al* (2010), à des pH faibles, un volume plus élevé de phase organique formé *in situ* est relargué, ainsi l'effet de dilution des composés extraits sera important. Les résultats montrés dans la figure 18 montrent qu'une extraction satisfaisante est obtenue à des pH élevés de 3 et 4. Cependant, les CV % obtenus sur des triples essais sont de 0.95 à 6.85 % avec une moyenne de 3.11 % au pH 3 et de 3.86 à 7.39 % avec une moyenne de 6.40 % à pH 4. Ainsi, les résultats sont meilleurs pour le pH= 3 choisi comme l'optimum pour les tests ultérieurs.

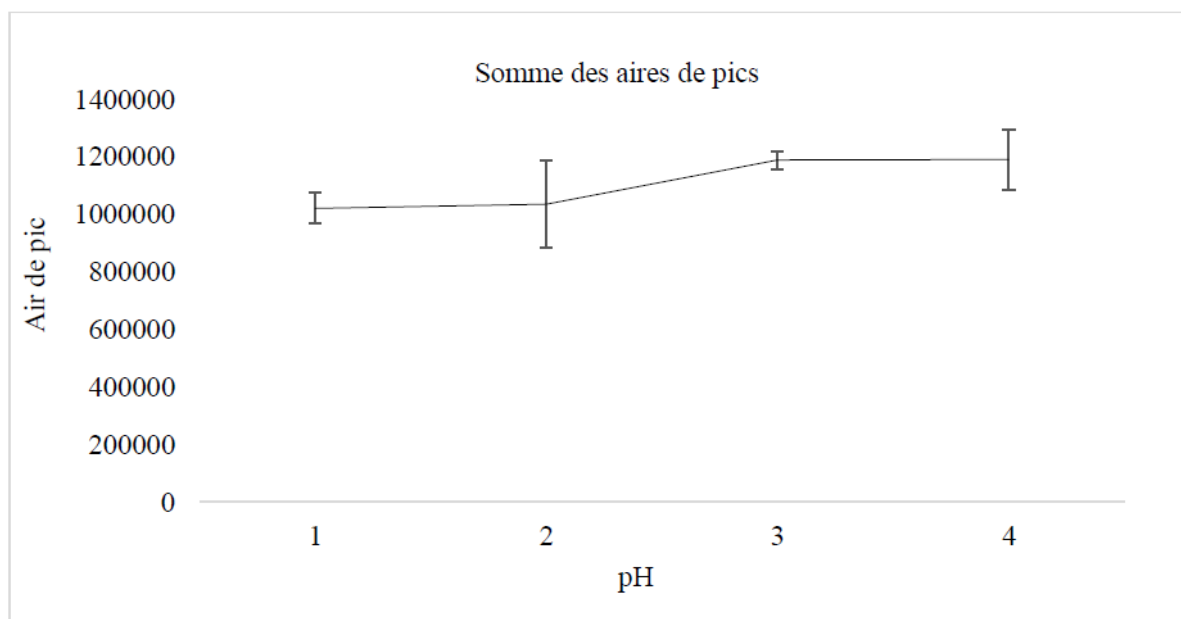


Figure 18 : Influence du pH sur l'efficacité de la méthode SALLE. Conditions d'extraction : solvant d'extraction, éthanol : acétone (50 :50 v/v) ; volume du solvant, 0.5 mL ; quantité de sulfate d'ammonium, 1.7 g/3 mL.

2.3. Validation de la méthode analytique SALLE- UPLC- UV

2.3.1. Fonction de réponse

L'analyse et l'examen des résultats obtenus sur les trois séries des SE (tableau XXIII) permet d'obtenir et de tracer différentes fonctions de réponses.

Tableau XXIII. Les résultats analytiques obtenus pour les SE des additifs alimentaires ACE, SAC, APM, AB et AS étudiés par la méthode SALLE- UPLC-UV.

Échantillon	Série	ACE		SAC		APM		AB		AS	
		Concentration introduite (µg/mL)	Réponse analytique (µg/mL)	Concentration introduite (µg/mL)	Réponse analytique (µg/mL)	Concentration introduite (µg/mL)	Réponse analytique (µg/mL)	Concentration introduite (µg/mL)	Réponse analytique (µg/mL)	Concentration introduite (µg/mL)	Réponse analytique (µg/mL)
SE 1	1	2.49	11404	0.99	7469	2.49	3754	5.14	10542	5.02	9207
SE 1	1	2.49	11894	0.99	7577	2.49	3486	5.14	10104	5.02	8927
SE 2	1	4.99	24698	1.99	18429	4.98	6786	10.28	20298	10.04	15654
SE 2	1	4.99	24534	1.99	19329	4.98	6865	10.28	19671	10.04	14909
SE 3	1	14.96	64336	4.99	38827	14.94	18352	25.71	73459	25.10	60268
SE 3	1	14.96	64165	4.99	38727	14.94	18156	25.71	73487	25.10	60282
SE 4	1	24.93	94814	9.99	65520	24.89	27539	51.42	159591	50.21	150426
SE 4	1	24.93	95992	9.99	67072	24.89	27748	51.42	162940	50.21	150796
SE 5	1	49.87	187138	19.98	129869	49.79	54736	102.84	331129	100.42	302245
SE 5	1	49.87	193165	19.98	136823	49.79	56516	102.84	299747	100.42	270976
SE 1	2	2.49	12748	0.99	7586	2.49	3342	5.14	9962	5.02	8885
SE 1	2	2.49	11178	0.99	7411	2.49	3434	5.14	10625	5.02	9137
SE 2	2	4.99	24654	1.99	19341	4.98	6745	10.28	21098	10.04	15483
SE 2	2	4.99	23953	1.99	19032	4.98	6847	10.28	22963	10.04	16988
SE 3	2	14.96	66943	4.99	39275	14.94	18890	25.71	72970	25.10	67775
SE 3	2	14.96	62778	4.99	38133	14.94	18175	25.71	73107	25.10	61593
SE 4	2	24.93	95009	9.99	65078	24.89	27124	51.42	162860	50.21	150699
SE 4	2	24.93	94565	9.99	65014	24.89	27606	51.42	161282	50.21	149426
SE 5	2	49.87	202094	19.98	136270	49.79	59931	102.84	299045	100.42	278462
SE 5	2	49.87	189940	19.98	129372	49.79	57732	102.84	322884	100.42	295593
SE 1	3	2.49	11789	0.99	7684	2.49	3388	5.14	9870	5.02	8774
SE 1	3	2.49	11242	0.99	7286	2.49	3358	5.14	10603	5.02	9165
SE 2	3	4.99	24741	1.99	19450	4.98	6500	10.28	20854	10.04	15312
SE 2	3	4.99	24963	1.99	19459	4.98	6391	10.28	19413	10.04	14685
SE 3	3	14.96	63517	4.99	39561	14.94	18902	25.71	71866	25.10	60567
SE 3	3	14.96	66701	4.99	39636	14.94	20057	25.71	75437	25.10	61191
SE 4	3	24.93	95003	9.99	67105	24.89	26998	51.42	161588	50.21	149302
SE 4	3	24.93	95940	9.99	66825	24.89	26471	51.42	163018	50.21	149806
SE 5	3	49.87	188254	19.98	129079	49.79	58697	102.84	320240	100.42	288151
SE 5	3	49.87	201831	19.98	137314	49.79	61784	102.84	299733	100.42	270134

Selon les profils d'exactitude obtenus pour chaque composé, plusieurs fonctions de réponses acceptables peuvent être considérées. Les indices d'exactitude estimés pour les meilleurs modèles de régression sont trouvés dans l'ensemble au même ordre de grandeur pour chaque composé. Cependant, la régression linéaire après la transformation logarithmique a été choisie comme la fonction de réponse la plus simple selon le principe de parcimonie est utilisée pour tous les composés étudiés (tableau XXIV).

Tableau XXIV. Les différentes fonctions de réponse choisies pour les additifs alimentaires ACE, SAC, APM, AB et AS étudiés par la méthode SALLE- UPLC-UV.

Composé	Modèles	Indice d'exactitude	Limites inférieure et supérieure de quantification	Indice de l'intervalle du dosage	Indice de fidélité	Indice de justesse
ACE	régression linéaire après transformation logarithmique	0.9357	[2.494, 49.87]	1.000	0.8499	0.9641
SAC	régression linéaire après transformation logarithmique	0.8462	[0.9994, 19.99]	1.000	0.7204	0.8411
APM	régression linéaire après transformation logarithmique	0.9127	[2.490, 49.79]	1.000	0.7705	0.9869
AB	régression linéaire après transformation logarithmique	0.9067	[5.142, 102.8]	1.000	0.7974	0.9349
AS	régression linéaire après transformation logarithmique	0.8860	[5.021, 100.4]	1.000	0.7994	0.8700

Les résultats de la validation montrent que les coefficients de détermination R^2 obtenus pour les courbes d'étalonnage et qui correspondent à la corrélation entre les résultats analytiques (aires de pics) en fonction des concentrations introduites sont supérieurs à 0.99 (tableau XXV).

Tableau XXV. Les coefficients de détermination (R^2) obtenus pour les différentes courbes d'étalonnage des additifs alimentaires ACE, SAC, APM, AB et AS étudiés par la méthode SALLE- UPLC-UV.

	Série 1	Série 2	Série 3
ACE	0.9909	0.9969	0.9968
SAC	0.9904	0.9986	0.9879
APM	0.9990	0.9980	0.9964
AB	0.9950	0.9967	0.9946
AS	0.9903	0.9918	0.9894

L'évaluation des différents critères de validation de la méthode est réalisée sur les résultats des SV donnés dans le tableau XXVI.

Tableau XXVI. Les résultats analytiques obtenus pour les SV des additifs alimentaires ACE, SAC, APM, AB et AS étudiés par la méthode SALLE- UPLC-UV.

Échantillon	Série	ACE		SAC		APM		AB		AS	
		Concentration introduite (µg/mL)	Réponse analytique (µg/mL)	Concentration introduite (µg/mL)	Réponse analytique (µg/mL)	Concentration introduite (µg/mL)	Réponse analytique (µg/mL)	Concentration introduite (µg/mL)	Réponse analytique (µg/mL)	Concentration introduite (µg/mL)	Réponse analytique (µg/mL)
SV 1	1	2.49	11242	0.99	7228	2.49	3340	5.14	10649	5.02	9136
SV 1	1	2.49	11930	0.99	7536	2.49	3337	5.14	9923	5.02	8839
SV 1	1	2.49	10632	0.99	7799	2.49	3207	5.14	10748	5.02	9393
SV 2	1	4.99	23947	1.99	19200	4.98	6749	10.28	20426	10.04	15518
SV 2	1	4.99	23617	1.99	19233	4.98	6735	10.28	21113	10.04	19301
SV 2	1	4.99	24614	1.99	19464	4.98	6907	10.28	19559	10.04	14298
SV 3	1	14.96	66647	4.99	40431	14.94	19206	25.71	74741	25.10	67748
SV 3	1	14.96	65128	4.99	41096	14.94	19258	25.71	74217	25.10	67797
SV 3	1	14.96	64773	4.99	39282	14.94	17292	25.71	67031	25.10	65170
SV 4	1	24.93	96965	9.99	69065	24.89	29303	51.42	159555	50.21	154722
SV 4	1	24.93	96668	9.99	68657	24.89	27366	51.42	164869	50.21	159955
SV 4	1	24.93	102051	9.99	73570	24.89	29840	51.42	152933	50.21	148422
SV 5	1	49.87	210733	19.98	122680	49.79	57837	102.84	268257	100.42	286663
SV 5	1	49.87	207528	19.98	129165	49.79	58151	102.84	293633	100.42	295244
SV 5	1	49.87	201023	19.98	130343	49.79	56736	102.84	293593	100.42	294945
SV 1	2	2.49	11059	0.99	7258	2.49	3355	5.14	10660	5.02	9149
SV 1	2	2.49	12616	0.99	7372	2.49	3316	5.14	9837	5.02	8905
SV 1	2	2.49	11576	0.99	7610	2.49	3487	5.14	9888	5.02	8827
SV 2	2	4.99	24342	1.99	19327	4.98	6344	10.28	20985	10.04	15345
SV 2	2	4.99	24781	1.99	19717	4.98	6754	10.28	18768	10.04	14415
SV 2	2	4.99	24803	1.99	19673	4.98	6257	10.28	19704	10.04	14482
SV 3	2	14.96	68995	4.99	40150	14.94	19167	25.71	74470	25.10	68773
SV 3	2	14.96	63756	4.99	38336	14.94	18122	25.71	67032	25.10	64459
SV 3	2	14.96	64415	4.99	39260	14.94	18112	25.71	72812	25.10	61496
SV 4	2	24.93	103440	9.99	72465	24.89	29559	51.42	152460	50.21	149300
SV 4	2	24.93	97121	9.99	67196	24.89	27912	51.42	144657	50.21	159558
SV 4	2	24.93	97920	9.99	67715	24.89	28298	51.42	159521	50.21	154631
SV 5	2	49.87	208393	19.98	145415	49.79	60744	102.84	275528	100.42	281149
SV 5	2	49.87	198841	19.98	143266	49.79	59738	102.84	302144	100.42	289542
SV 5	2	49.87	206821	19.98	133049	49.79	59446	102.84	302361	100.42	290232
SV 1	3	2.49	11297	0.99	7352	2.49	3382	5.14	10534	5.02	9290
SV 1	3	2.49	11677	0.99	7802	2.49	3169	5.14	10731	5.02	9283
SV 1	3	2.49	12185	0.99	7462	2.49	3326	5.14	9922	5.02	9134
SV 2	3	4.99	24591	1.99	19222	4.98	6528	10.28	19690	10.04	14296
SV 2	3	4.99	24118	1.99	19380	4.98	6513	10.28	20901	10.04	15252
SV 2	3	4.99	23749	1.99	19608	4.98	5746	10.28	23467	10.04	17360
SV 3	3	14.96	64732	4.99	39572	14.94	17540	25.71	68533	25.10	62840
SV 3	3	14.96	66880	4.99	38870	14.94	18785	25.71	69381	25.10	58722
SV 3	3	14.96	63127	4.99	38618	14.94	18885	25.71	72588	25.10	60327
SV 4	3	24.93	95800	9.99	67787	24.89	27550	51.42	164623	50.21	159427
SV 4	3	24.93	96698	9.99	68386	24.89	27772	51.42	159780	50.21	154510
SV 4	3	24.93	103990	9.99	73078	24.89	29001	51.42	152772	50.21	148823
SV 5	3	49.87	203188	19.98	118639	49.79	58308	102.84	291910	100.42	294430
SV 5	3	49.87	210446	19.98	123021	49.79	57505	102.84	268877	100.42	287455
SV 5	3	49.87	205527	19.98	126374	49.79	58050	102.84	293870	100.42	295265

2.3.2. Traitement des résultats des SV obtenus par la méthode SALLE- UPLC-UV

2.3.2.1. Alignement et prédiction inverse des résultats

Les résultats obtenus après alignement et prédiction inverse des données obtenues sur les SV sont donnés dans le tableau XXVII ci-après.

Tableau XXVII. Les résultats de prédiction inverse obtenus sur les données analytiques des SV des additifs alimentaires ACE, SAC, APM, AB et AS étudiés par la méthode SALLE-UPLC-UV.

Échantillon	Série	ACE		SAC		APM		AB		AS	
		Concentration introduite $\mu\text{g/mL}$	Réponse analytique $\mu\text{g/mL}$	Concentration introduite $\mu\text{g/mL}$	Réponse analytique $\mu\text{g/mL}$	Concentration introduite $\mu\text{g/mL}$	Réponse analytique $\mu\text{g/mL}$	Concentration introduite $\mu\text{g/mL}$	Réponse analytique $\mu\text{g/mL}$	Concentration introduite $\mu\text{g/mL}$	Réponse analytique $\mu\text{g/mL}$
SV 1	1	2.49	2.273	0.99	0.8369	2.49	2.282	5.14	5.429	5.02	5.529
SV 1	1	2.49	2.426	0.99	0.8758	2.49	2.280	5.14	5.113	5.02	5.381
SV 1	1	2.49	2.139	0.99	0.9090	2.49	2.181	5.14	5.472	5.02	5.657
SV 2	1	4.99	5.204	1.99	2.420	4.98	4.974	10.28	9.437	10.04	8.555
SV 2	1	4.99	5.126	1.99	2.424	4.98	4.963	10.28	9.706	10.04	10.24
SV 2	1	4.99	5.363	1.99	2.456	4.98	5.103	10.28	9.096	10.04	7.997
SV 3	1	14.96	15.97	4.99	5.436	14.94	15.84	25.71	28.38	25.10	28.81
SV 3	1	14.96	15.57	4.99	5.533	14.94	15.89	25.71	28.21	25.10	28.83
SV 3	1	14.96	15.47	4.99	5.268	14.94	14.11	25.71	25.88	25.10	27.91
SV 4	1	24.93	24.07	9.99	9.727	24.89	25.30	51.42	54.03	50.21	56.90
SV 4	1	24.93	23.99	9.99	9.664	24.89	23.46	51.42	55.55	50.21	58.48
SV 4	1	24.93	25.46	9.99	10.42	24.89	25.82	51.42	52.12	50.21	54.98
SV 5	1	49.87	56.33	19.98	18.16	49.79	53.74	102.84	83.98	100.42	94.58
SV 5	1	49.87	55.39	19.98	19.21	49.79	54.06	102.84	90.68	100.42	96.90
SV 5	1	49.87	53.49	19.98	19.40	49.79	52.60	102.84	90.66	100.42	96.82
SV 1	2	2.49	2.221	0.99	0.8350	2.49	2.427	5.14	5.254	5.02	5.389
SV 1	2	2.49	2.564	0.99	0.8494	2.49	2.397	5.14	4.903	5.02	5.269
SV 1	2	2.49	2.334	0.99	0.8794	2.49	2.529	5.14	4.925	5.02	5.231
SV 2	2	4.99	5.258	1.99	2.435	4.98	4.801	10.28	9.411	10.04	8.268
SV 2	2	4.99	5.361	1.99	2.489	4.98	5.134	10.28	8.549	10.04	7.851
SV 2	2	4.99	5.366	1.99	2.483	4.98	4.730	10.28	8.914	10.04	7.881
SV 3	2	14.96	16.41	4.99	5.413	14.94	15.69	25.71	27.99	25.10	28.62
SV 3	2	14.96	15.05	4.99	5.147	14.94	14.77	25.71	25.56	25.10	27.13
SV 3	2	14.96	15.22	4.99	5.283	14.94	14.76	25.71	27.45	25.10	26.09
SV 4	2	24.93	25.54	9.99	10.32	24.89	24.95	51.42	51.84	50.21	54.37
SV 4	2	24.93	23.84	9.99	9.504	24.89	23.46	51.42	49.55	50.21	57.45
SV 4	2	24.93	24.05	9.99	9.584	24.89	23.81	51.42	53.90	50.21	55.98
SV 5	2	49.87	54.90	19.98	22.09	49.79	53.95	102.84	86.26	100.42	91.82
SV 5	2	49.87	52.15	19.98	21.74	49.79	52.99	102.84	93.39	100.42	94.08
SV 5	2	49.87	54.44	19.98	20.05	49.79	52.71	102.84	93.45	100.42	94.27
SV 1	3	2.49	2.302	0.99	0.8401	2.49	2.508	5.14	5.375	5.02	5.643
SV 1	3	2.49	2.386	0.99	0.8962	2.49	2.342	5.14	5.460	5.02	5.639
SV 1	3	2.49	2.499	0.99	0.8538	2.49	2.465	5.14	5.108	5.02	5.564
SV 2	3	4.99	5.354	1.99	2.392	4.98	5.021	10.28	9.149	10.04	8.053
SV 2	3	4.99	5.242	1.99	2.413	4.98	5.009	10.28	9.625	10.04	8.495

Suite de Tableau XXVII.

Échantillon	Série	ACE		SAC		APM		AB		AS	
		Concentration introduite µg/mL	Réponse analytique µg/mL	Concentration introduite µg/mL	Réponse analytique µg/mL	Concentration introduite µg/mL	Réponse analytique µg/mL	Concentration introduite µg/mL	Réponse analytique µg/mL	Concentration introduite µg/mL	Réponse analytique µg/mL
SV 2	3	4.99	5.155	1.99	2.444	4.98	4.389	10.28	10.62	10.04	9.452
SV 3	3	14.96	15.30	4.99	5.249	14.94	14.25	25.71	26.42	25.10	27.32
SV 3	3	14.96	15.86	4.99	5.147	14.94	15.32	25.71	26.70	25.10	25.84
SV 3	3	14.96	14.89	4.99	5.111	14.94	15.40	25.71	27.74	25.10	26.42
SV 4	3	24.93	23.42	9.99	9.430	24.89	22.95	51.42	55.66	50.21	58.90
SV 4	3	24.93	23.66	9.99	9.521	24.89	23.14	51.42	54.27	50.21	57.40
SV 4	3	24.93	25.60	9.99	10.23	24.89	24.22	51.42	52.23	50.21	55.65
SV 5	3	49.87	52.95	19.98	17.34	49.79	50.62	102.84	90.59	100.42	97.72
SV 5	3	49.87	55.01	19.98	18.04	49.79	49.88	102.84	84.47	100.42	95.81
SV 5	3	49.87	53.61	19.98	18.58	49.79	50.38	102.84	91.11	100.42	97.95

2.3.3. Performances des critères de la méthode d'extraction SALLE- UPLC-UV

2.2.3.1. Fidélité

La fidélité d'une méthode analytique estimée à chaque niveau de concentration des SV fournit des informations sur l'erreur aléatoire. Elle est évaluée à deux niveaux : la répétabilité (fidélité intra-série) et la fidélité intermédiaire (fidélité inter-séries). Les résultats présentés dans le tableau XXVIII montrent que les CV % obtenus pour la répétabilité et la fidélité intermédiaire de la méthode sont acceptables. Les valeurs obtenues des CV obtenues pour la répétabilité sont inférieures à 5.4, 4.10, 4.67, 5.16 et 6.99% pour ACE, SAC, APM, AB et AS, respectivement et pour la fidélité intermédiaire sont inférieurs à 5.4, 9.16, 5.15, 5.87 et 7.45 % ACE, SAC, APM, AB et AS, respectivement.

Tableau XXVIII. La répétabilité et la fidélité intermédiaire obtenues pour les additifs alimentaires ACE, SAC, APM, AB et AS étudiés par la méthode SALLE- UPLC-UV.

Compounds	Concentration (µg/mL)	Répétabilité (CV %)	Fidélité intermédiaire (CV %)
ACE	2.49	5.4	5.4
	4.99	1.91	1.91
	14.96	3.21	3.21
	24.93	3.49	3.49
	49.87	2.62	2.62
SAC	0.99	2.72	2.72
	1.99	1.27	1.70
	4.99	2.33	3.09
	9.99	3.89	3.89
	19.98	4.10	9.16
APM	2.49	2.89	5.15
	4.98	4.67	4.67
	14.94	4.49	4.49
	24.89	3.75	4.19
	49.79	1.24	3.68
AB	5.14	3.74	4.54
	10.28	5.16	5.87
	25.71	4.05	4.05
	51.42	3.67	3.89
	102.84	3.49	3.49
AS	5.02	1.65	4.08
	10.04	6.99	7.45
	25.10	3.52	4.79
	50.21	3.22	3.22
	100.42	1.49	2.80

2.3.3.2. Justesse

La justesse d’une méthode analytique calculée à chaque niveau de concentration des SV exprime la différence entre la valeur analytique obtenue et la valeur réelle acceptée comme référence. Ce paramètre peut être estimé en termes de biais absolu ou relatif ou en termes de recouvrement. Les résultats obtenus pour la justesse donnés dans le tableau XXIX sont très bons ; le biais absolu est compris entre 0.076 et 13.44 et le biais relatif entre 1.19 et 22.05%. Dans le cas des méthodes d’extraction par solvant, on utilise généralement le recouvrement relatif défini comme le rapport entre les concentrations trouvées dans la matrice étudiée après prédiction inverse et les concentrations ajoutées. Les recouvrements obtenus sont satisfaisants et sont compris entre 84.97 et 122 % pour tous les composés étudiés.

Tableau XXIX. La justesse obtenue pour les additifs alimentaires ACE, SAC, APM, AB et AS étudiés par la méthode SALLE- UPLC-UV.

Composés	Concentration (µg/mL)	Biais absolu	Biais relatif %	Recouvrement relatif %
ACE	2.49	0.1441	5.780	94.22
	4.99	0.2829	5.674	105.7
	14.96	0.5661	3.784	103.8
	24.93	0.5319	2.133	97.87
	49.87	4.382	8.787	108.8
SAC	0.99	0.1354	13.55	86.45
	1.99	0.4407	22.05	122.0
	4.99	0.2904	5.811	105.8
	9.99	0.1716	1.717	98.28
	19.98	0.5878	2.941	97.06
APM	2.49	0.1105	4.440	95.56
	4.98	0.07637	1.534	98.47
	14.94	0.1780	1.192	101.2
	24.89	0.7735	3.107	96.89
	49.79	2.536	5.093	105.1
AB	5.14	0.08477	1.649	101.6
	10.28	0.8942	8.695	91.30
	25.71	1.438	5.594	105.6
	51.42	1.820	3.540	103.5
	102.84	13.44	13.07	86.93
AS	5.02	0.4571	9.103	109.1
	10.04	1.509	15.03	84.97
	25.10	2.336	9.306	109.3
	50.21	6.470	12.89	112.9
	100.42	4.870	4.850	95.15

2.3.3.3. Linéarité

La linéarité de la méthode analytique est évaluée par ajustement d'une courbe de régression linéaire pour chaque composé étudié. Ces courbes sont obtenues en traçant une droite qui donne la relation entre les concentrations calculées en utilisant les SV par rapport aux concentrations théoriques introduites (figure 19).

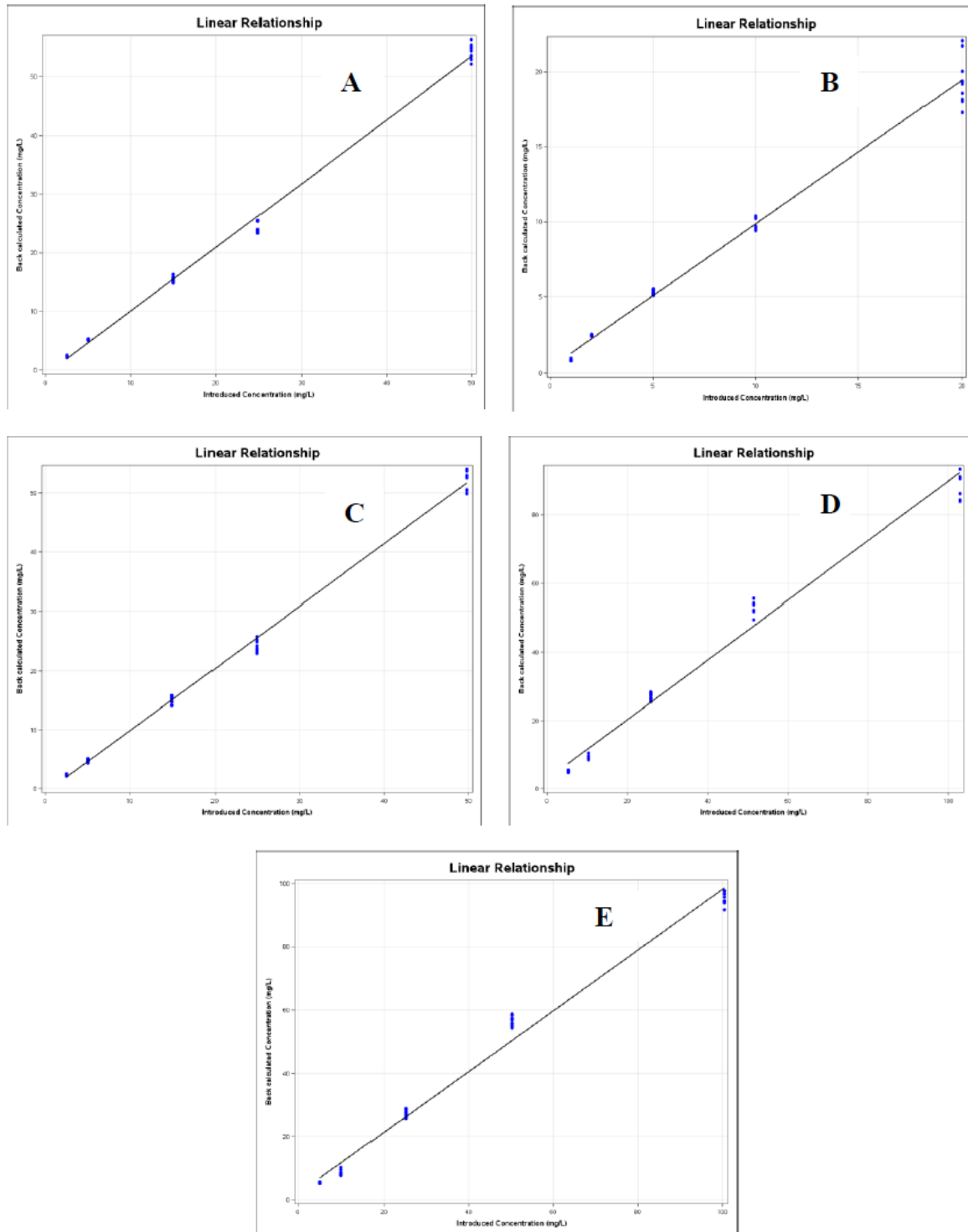


Figure 19 : Relation linéaire entre les concentrations introduites et les concentrations calculées après prédiction inverse en utilisant le modèle mathématique sélectionné pour chaque additif alimentaire ACE (A), SAC (B), APM (C), AB (D) et AS (E).

Comme montrés dans le tableau XXX, toutes les courbes de régression ajustées présentent des coefficients de détermination $R^2 \geq 0.99$, cela montre que les résultats de la linéarité de la méthode SALLE-UPLC-UV sont satisfaisants et acceptables.

Tableau XXX. Les paramètres de régression obtenus pour les additifs alimentaires ACE, SAC, APM, AB et AS étudiés par la méthode SALLE- UPLC-UV.

Composé	Équation de la linéarité	Pente	Ordonnée à l'origine	R^2
ACE	$Y = -0.7561 + 1.086 X$	1.086	-0.7561	0.9958
SAC	$Y = 0.2833 + 0.9584 X$	0.9584	0.2833	0.9876
APM	$Y = -0.6411 + 1.051 X$	1.051	-0.6411	0.9961
AB	$Y = 2.893 + 0.8697 X$	0.8697	2.893	0.9856
AS	$Y = 2.010 + 0.9624 X$	0.9624	2.010	0.9876

Afin de démontrer la linéarité de la méthode analytique, l'approche basée sur les limites de tolérance absolues au risque $\beta = 80 \%$ est utilisée. Les résultats donnés par la figure 20 montrent que la méthode présente une très bonne linéarité pour tous les composés.

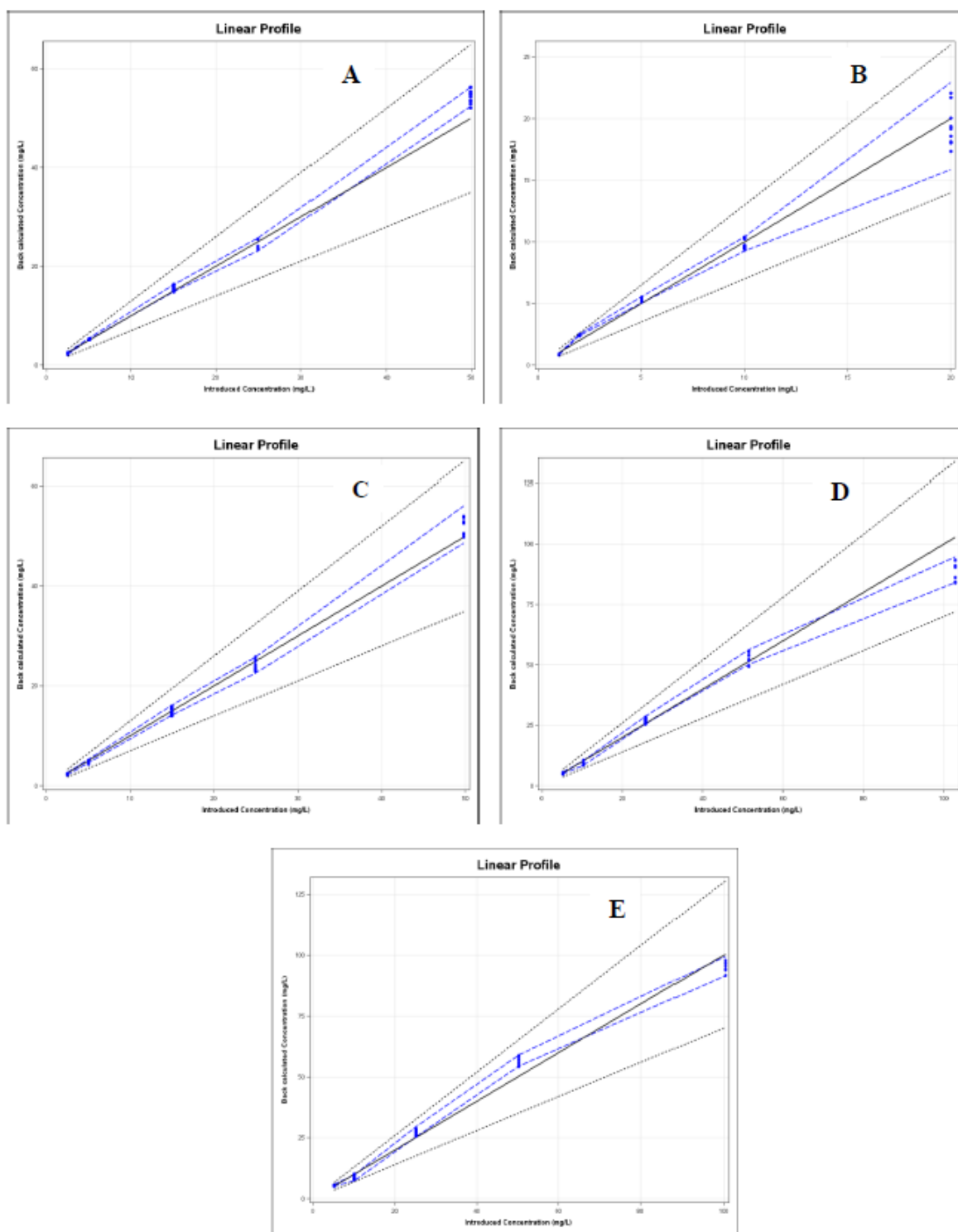


Figure 20 : Les profils linéaires de la méthode analytique SALLE- HPLC-UV exprimés en valeur de concentrations calculées et introduites pour ACE (A), SAC (B), APM (C), AB (D) et AS (E). La ligne continue est la ligne d'identité ($y = x$), les lignes discontinues correspondent aux limites de tolérance inférieures et supérieures du profil d'exactitude, les lignes pointillées représentent les limites d'acceptation λ fixées à $\pm 30 \%$.

2.3.3.4. Profil d'exactitude

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre les résultats du test ou les valeurs trouvées et les valeurs acceptées soit comme valeur de référence ou la valeur conventionnelle vraie. Il prend en compte l'erreur totale qui est la somme de biais et de la fidélité intermédiaire représentée par les limites de tolérance inférieures et supérieures. Les profils d'exactitude obtenus et donnés dans la figure 21 montrent que les limites de tolérance calculées au risque $\beta = 80\%$ se situent à l'intérieur des limites d'acceptation fixées à $\pm 30\%$. Ces résultats signifient que la méthode analytique SALLE-UPLC-UV est capable de produire des résultats exacts sur la totalité de l'intervalle du dosage pour tous les composés étudiés. Par conséquent, les LDQI et LDQS sont les valeurs extrêmes pouvant être quantifiées avec exactitude définie et sont de [2.49, 49.87], [0.99, 19.98], [2.49, 49.79], [5.14, 102.84] et [5.02, 100.42] pour ACE, SAC, APM, AB et AS, respectivement.

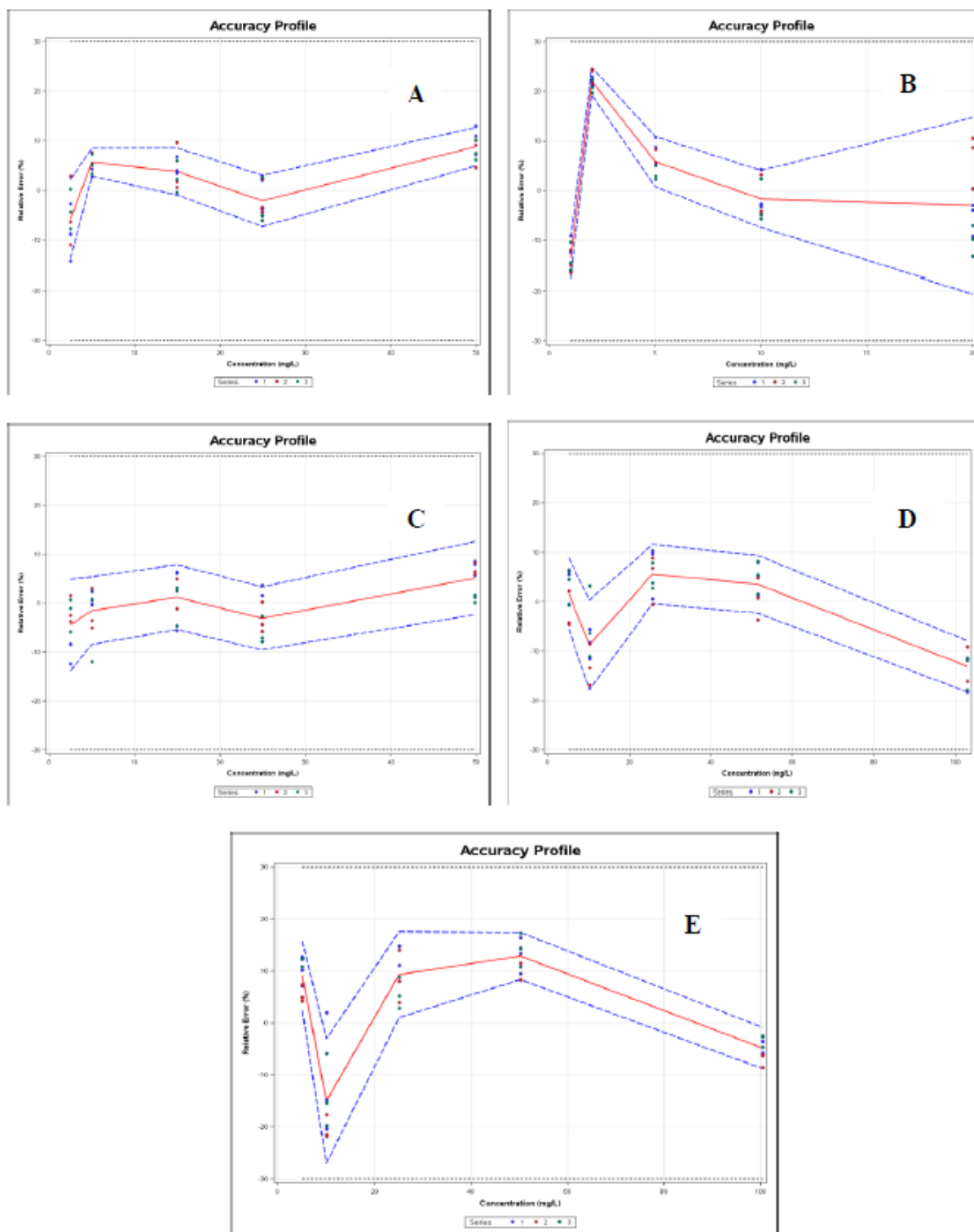


Figure 21 : Représentation schématique des profils d'exactitude obtenus pour ACE (A), SAC (B), APM (C), AB (D) et AS (E). Les lignes discontinues sont les limites de tolérance inférieures et supérieures calculées au risque $\beta = 80\%$, Les lignes pointillées sont les limites d'acceptation inférieures et supérieures λ fixées à $\pm 30\%$ et la ligne continue est le biais relatif.

2.3.3.5. Limite de quantification

Comme l'approche du profil d'exactitude est utilisée dans ce travail pour la validation de la méthode analytique. Ainsi, la LDQ correspond à la LDQI qui peut être détectée et quantifiée avec exactitude. Les résultats résumés dans le tableau XXXI montrent que les LDQ sont arrangées de 0.99 à 5.14 µg/mL.

2.3.3.6. Limite de détection

La plus petite quantité pouvant être détectée, mais non quantifiée avec exactitude est estimée égale à la LDD. Dans ce travail, les LDD de tous les composés ont été calculées à l'aide de la méthodologie de Miller et Miller (MILLER and MILLER, 1993) par le calcul de Y_{LDD} = ordonnée à l'origine (0 si négatif) + 3 x écart type résiduel obtenu par ANOVA pour chaque série. Ensuite, avec l'utilisation du modèle de régression sélectionné, le calcul par prédiction inverse donnera le X_{LDD} de chaque série et la moyenne des différents X_{LDD} calculés donnera la LDD de la méthode. Les résultats donnés dans le tableau XXXI montrent que les LDD obtenues pour tous les composés sont de 0.3 à 1.42 µg/mL les LDQ sont de 0.99 à 5.14 µg/mL.

Tableau XXXI. Les LDD et les LDQ obtenues pour les additifs alimentaires ACE, SAC, APM, AB et AS étudiés par la méthode SALLE- UPLC-UV.

LDD µg/mL					LDQ µg/mL				
ACE	SAC	APM	AB	AS	ACE	SAC	APM	AB	AS
0.75	0.3	0.75	1.27	1.42	2.49	0.99	2.49	5.14	5.02

2.4. Analyse des échantillons commerciaux et présence des additifs étudiés

La méthode développée a été appliquée avec succès pour la détermination et la quantification des trois édulcorants artificiels et des deux conservateurs antimicrobiens analysés dans 47 échantillons de jus de fruits appartenant à neuf différentes marques. Les résultats de tous les échantillons analysés sont résumés dans le tableau XXXII.

En ce qui concerne l'ACE, la SAC et l'APM, aucun de ces additifs alimentaires n'est détecté ou quantifié dans les échantillons analysés et ces résultats sont comparables à ceux de l'étude Taïwanaise de CHANG et YEH (2014). Cependant, toutes les autres études ont quantifié au moins un édulcorant dans les échantillons de jus analysés (BERGAMO *et al*, 2011 ; DIAS *et al*, 2015 ; DIOGO *et al*, 2013 ; LINO et PINA, 2010 ; LORENZO *et al*, 2015 ; ORDOÑEZ *et al*, 2015 ; ZYGLER *et al*, 2011).

Les technologies de conservation telles que la pasteurisation, le conditionnement en utilisant les emballages aseptiques et le caractère fortement acide (pH 3-4) des jus peuvent être un moyen pour protéger les jus de fruits contre la croissance et la prolifération des microorganismes (CAKIR et CAGRI-MEHMETOGLU, 2013). Il est important de souligner que la réglementation Algérienne relative à l'utilisation des additifs alimentaires interdit l'utilisation de l'AB et l'AS et leurs sels dans les jus et les nectars de fruits (ANONYME₂, 2012). Cependant, le sorbate de potassium a été déclaré sur l'étiquette de deux marques des échantillons analysés mais leurs concentrations n'ont pas été données.

Les résultats des échantillons analysés montrent que AB et AS ou leurs sels ont été détectés et quantifiés séparément dans 12 échantillons (25.53%) et simultanément dans 6 échantillons (12.76%). Les concentrations quantifiées varient de 36.34 à 102.09 avec une moyenne de 63.03 ± 14.23 pour AB ou ses sels et de 32.34 à 118 $\mu\text{g}/\text{mL}$ avec une moyenne de 65.69 ± 21.76 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour AS ou ses sels et un maximum de 171.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour la somme des deux composés lorsque sont quantifiés simultanément. Les résultats retrouvés n'étaient pas conformes aux directives de la législation Algérienne qui interdit l'utilisation de ces additifs dans les jus de fruits (ANONYME₂, 2012). Cependant, ils sont inférieurs ou sans dépasser les limites de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ autorisées et fixées par le *Codex Alimentarius* (ANONYME₁, 1995) et sans toutefois dépasser les concentrations fixées par la Commission Européenne et qui sont de 200 et de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour AB et AS, respectivement (ANONYME, 2011).

Les résultats trouvés dans ce travail sont plus faibles pour AB et très similaire pour AS à ceux de l'étude portugaise de MOTA *et al* (2003). De plus, comme dans le cas de notre étude, les chercheurs n'ont pas détecté des concentrations importantes de AB ou AS dans les jus de fruits. L'étude turque de CAKIR et CAGRI-MEHMETOGLU (2013) a montré qu'un seul échantillon de jus contenait de AB à 181.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De plus, AB et AS n'ont pas été détectés dans les jus de fruits et seulement les boissons sans alcool traditionnelles ou à base d'eau minérale contenaient ces deux additifs alimentaires (DIOGO *et al*, 2013). Les résultats obtenus ne sont pas très élevés pour être dangereux sur la santé des consommateurs. Les niveaux de concentration quantifiés peuvent provenir de contenu indigène des fruits utilisés dans la préparation des jus (DAVIDSON *et al*, 2001) ou de leur contamination par l'air, la pluie et l'eau et le sol pouvant contenir d' AB (JAVANMARDI *et al*, 2015).

Tableau XXXII. Les résultats analytiques du dosage des additifs alimentaires ACE, SAC, APM, AB et AS étudiés par la méthode SALLE- UPLC-UV dans les échantillons commerciaux.

Échantillon	Étiquetage	ACE	SAC	APM	AB		AS	
		Concentration réelle (µg/mL)	Concentration réelle (µg/mL)	Concentration réelle (µg/mL)	Concentration réelle (µg/mL)	Écart type	Concentration réelle (µg/mL)	Écart type
Ngaous Gazéifié, Orange	A1	Non détecté	Non détecté	Non détecté	78.46	15.20	83.69	31.34
	A2				46.61		68.13	
	A3				53.60		118	
	A4				36.34		39.30	
	A5				46.69		58.95	
	A6				39.42		32.34	
Ramy, cocktail	B1	Non détecté	Non détecté	Non détecté	79.07	6.97	Non détecté	-
	B2				60.09			
	B3				65.33			
	B4				69.91			
	B5				69.71			
Rouïba, orange	C1	Non détecté	Non détecté	Non détecté	ND	72.19	Non détecté	-
	C2				102.09			
	C3				ND			
	C4				ND			
	C5				ND			
Ifruit Raisin et Mûre	D1	Non détecté	Non détecté	Non détecté	Non détecté	-	Non détecté	-
	D2							
	D3							
	D4							
	D5							
Ramy Kids, pêche	E1	Non détecté	Non détecté	Non détecté	Non détecté	-	Non détecté	-
	E2							
	E3							
	E4							
	E5							
Ngaoues, orange	F1	Non détecté	Non détecté	Non détecté	Non détecté	-	Non détecté	-
	F2							
	F3							
	F4							
	F5							
Ngaoues Gazéifié, Cocktail et Ngaous, Orange	G1	Non détecté	Non détecté	Non détecté	Non détecté	-	38.76	24.05
	G2						97.70	
	G3						87.24	
	G4						72.01	
	G5						53.43	
	G6						40.81	
Ramy Kids Cocktail	H1	Non détecté	Non détecté	Non détecté	Non détecté	-	Non détecté	-
	H2							
	H3							
	H4							
Ifruit, Pêche- Abricot	I1	Non détecté	Non détecté	Non détecté	Non détecté	-	Non détecté	-
	I2							
	I3							
	I4							

CONCLUSION GÉNÉRALE ET
PERSPECTIVES

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Les technologies de transformation des aliments crus notamment les fruits en produits dérivés occupent une place importante dans l'industrie agroalimentaire. Ces pratiques sont généralement accompagnées par l'incorporation et l'ajout de différents composés chimiques notamment les additifs alimentaires suite aux avantages qu'ils présentent dans la conservation et l'amélioration des caractéristiques organoleptiques des produits dérivés. Plusieurs études toxicologiques ont prouvé que l'ajout de ces additifs alimentaires à des concentrations qui dépassent les LMR autorisées par les organismes normatifs et législatifs peut être une source de différents dangers sur la santé des consommateurs particulièrement les enfants. Ces risques sont les désordres métaboliques, les allergies, les cancers...etc. Ainsi, l'analyse et le dosage de ces composés dans les aliments présente l'un des challenges scientifiques les plus importants et qui n'est pas une pratique courante en Algérie.

Le présent travail avait pour intérêt le développement, optimisation et validation des méthodes analytiques appliquées pour la détection et la quantification des concentrations de différents additifs alimentaires qui présentent différentes propriétés physico-chimiques tels que l'acide benzoïque et sorbique ou leurs sels (les benzoates et les sorbates), le BHA, le BHT, l'acésulfame, la saccharine et l'aspartame analysés sur des échantillons de jus de fruits. Cela est pour déterminer si les niveaux de concentrations d'utilisation de ces additifs sont conformes ou non aux recommandations des organismes normatifs et législatifs nationaux et internationaux.

La plupart des méthodes d'extraction et de préparation des échantillons utilisées pour la détection et la quantification simultanée des additifs alimentaires dans les matrices de jus de fruits sont les extractions conventionnelles telles que LLE et SPE couplées aux techniques chromatographiques. Ces techniques sont laborieuses, nécessitent énormément du temps, trop chères et nécessitant beaucoup de moyens et de consommables. Dans cette thèse, deux méthodes d'extraction couplées aux techniques chromatographiques en phase liquide qui sont la DLLME- HPLC-DAD et la SALLE- UPLC- UV sont optimisées et validées en utilisant la méthodologie du profil d'exactitude basée sur l'erreur totale pour l'extraction et la détermination simultanée des additifs alimentaires dans les échantillons de jus de fruits. Les méthodes utilisées dans ce travail sont simple, rapide, économique et moins toxiques.

Les résultats de la validation analytique montrent que tous les critères de performance (la justesse et les recouvrements, la fidélité, l'exactitude, la linéarité et la sensibilité) obtenus pour les deux méthodes sont satisfaisants et acceptables.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

L'ensemble des résultats obtenus sur l'évaluation chimique de degré d'utilisation des additifs alimentaires étudiés ont permis de mettre en évidence que le BHA, le BHT, l'acésulfame, la saccharine et l'aspartame ne sont pas détectés ou quantifiés dans les échantillons analysés. Par ailleurs, nous avons mis en évidence la détection et la quantification seulement de l'acide benzoïque et l'acide sorbique ou bien leurs sels (les benzoates et les sorbates) même s'ils ne sont pas autorisés par la réglementation Algérienne dans les jus de fruits. La comparaison des résultats obtenus aux normes du *Codex alimentarius* et de la commission Européenne de la sécurité des aliments (EFSA)) montre qu'il y'a pas de violation majeure des LMR fixées pour l'utilisation de ces conservateurs dans les jus de fruits et le degré de leur utilisation est rassurant, ne conduis pas à des risques sanitaires et à des dangers sur la santé de consommateurs.

Il est important de garder dans l'esprit que cette étude n'est qu'une représentation qui donne un aperçu sur le degré d'utilisation chimique de quelques additifs alimentaires dans quelques échantillons de jus de fruits disponibles sur le marché de la région de Tizi Ouzou pendant la période d'échantillonnage.

Par ailleurs, il est recommandé que les autorités compétentes de contrôle de qualité et répression des fraudes, qui relèvent de ministère du commerce en Algérie doivent:

- obliger les industriels de veiller à respecter la réglementation en rapport avec l'étiquetage des additifs alimentaires et la mention des concentrations de leur utilisation ;
- faire des suivis continus sur l'utilisation des additifs alimentaires autorisés ou non dans les denrées alimentaires notamment les jus et les autres boissons qui sont très consommées et qui présentent une source importantes de ces composés ;
- obliger les industriels à utiliser des techniques de préservation alternatives à la place des conservateurs antimicrobiens.

En perspective, il serait très intéressant de :

- contrôler les résidus d'additifs alimentaires dans d'autres produits alimentaires afin de protéger pleinement la santé de consommateur ;
- effectuer une révision des LMR autorisées pour les différents additifs alimentaires selon le degré de consommation des aliments contenant ces composés en Algérie et de leurs DJA fixées par les organismes normatifs internationaux;
- contrôler les résidus de pesticides dans les jus de fruits et dans d'autres produits alimentaires commerciaux afin de protéger la santé de consommateur.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABDULMUMEEN H. A., RISIKAT A. N. and SURURAH A. R. (2012). Food: its preservatives, additives and applications. *International Journal of Chemical and Biochemical Sciences*, 1, 36-47.

AMIT S. K., UDDIN MD. M., RAHMAN R., ISLAM S. M. R. and KHAN M. S. (2017). A review on mechanisms and commercial aspects of food preservation and processing. *Agriculture and Food Security*, 6 (51), 1-22.

ANAND S. P. and SATI N. (2013). Artificial preservatives and their harmful effects: looking toward nature for safer alternatives. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4 (7), 2496- 2501.

ANONYME₁. (1995). Norme générale pour les additifs alimentaires. Codex Stan 192-1995. Adopté en 1995. Révision 2016.

ANONYME. (2008). Règlement (CE) No 1333/2008 du parlement européen et du conseil sur les additifs alimentaires. *Journal officiel de l'Union européenne*, L 354, 16 -33.

ANONYME₁. (1989). Noms de catégorie et système international de numérotation des additifs alimentaires CAC/GL 36-1989. Adopté en 1989, révision en 2008, amendement en 2015.

ANONYME. (1969). Flavor chemists define flavor two ways. *Food Technology*, 23, 1360.

ANONYME₁. (2012). Guidance for submission for food additive evaluations, EFSA Panel on food additives and nutrient sources added to food (ANS). *EFSA Journal*, 10 (7), 2760. Parma.

ANONYME. (1974). Toxicological evaluation of certain food additives with a review of general principles and of specifications. Seventieth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Technical Report Series, No. 539, Geneva, Switzerland.

ANONYME₁. (1997). Evaluation of certain food additives and contaminants. Forty-sixth report on the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Technical Report Series, No. 868, Geneva, Switzerland.

ANONYME₂. (1989). Evaluation of certain food additives and contaminants. Thirty third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Technical Report Series, No. 776, Geneva, Switzerland.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANONYME₂. (1995). Evaluation of certain food additives and contaminants. Forty fourth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Technical Report Series, No. 859, Geneva, Switzerland.

ANONYME₁. (1999). Summary of evaluations performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) 1956-1997 (first through forty-ninth meetings).

ANONYME. (2013). Scientific opinion on the re-evaluation of Aspartame (E 951) as a Food Additive. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food (ANS). EFSA Journal 2013, 11 (12), 3496. Parma.

ANONYME₁. (2005). Décret Exécutif No 05- 484 modifiant et complétant le décret exécutif No 90-367 relatif à l'étiquetage et à la présentation des denrées alimentaires. (2005). Journal Officiel de la république Algérienne No 86.

ANONYME₂. (2012). Ministère du Commerce Algérien, décret Exécutif N°12-214. 2012 fixant les conditions et les modalités d'utilisation des additifs alimentaires dans les denrées alimentaires destinées à la consommation humaine. Journal Officiel de la république Algérienne, No 30. 16.

ANONYME₂. (1994). ISO 5725: Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results, Parts 1–4, 6, ISO, Geneva, Switzerland.

ANONYME₂. (1999). ISO/DIS 17025. General requirements for the competence of calibration and testing laboratories, ISO, Geneva, Switzerland.

ANONYME₃. (1995). International Conference on Harmonization: Definitions and terminology (ICH Q2A). Federal Register, 60. 11260- 11262.

ANONYME₂. (1997). International Conference on Harmonization: Methodology (ICH Q2B). Federal Register, 62, 27463- 27467.

ANONYME. (2000). Guidance for industry (draft), analytical procedures and methods validation.

ANONYME. (2001). Guidance for industry, bioanalytical methods validation.

ANONYME₂. (2005). Guidelines prepared within the International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human use (ICH). Validation of analytical procedures: text and methodology (Q2 (R1)), 1- 13.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANONYME. (2011). Commission Regulation (EU) No 1129/2011 of 11 November 2011 Amending Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by establishing a union list of food additives. Official Journal of European Union L295, 1-177, Brussels.

ARAUJO P. (2009). Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B*, 877 (23), 2224-2234.

ARBELÁEZ P., BORRULL F., POCURULL E. and MARCÉ R. M. (2015). Determination of high-intensity sweeteners in river water and wastewater by solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1393, 106-114.

ATRI R., SINGH A., MATHUR N. and VERMA A. (2013), Genotoxic effect of food additives and food products: a review. *International Journal of Chemical Science*, 11(4), 1753-1768.

BERGAMO A. B., DA SILVA J. A. F. and DE JESUS D. P. (2011). Simultaneous determination of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K in soft drinks and tablet of sweetener formulations by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *Food Chemistry*, 124 (4), 1714-1717.

BEZERRA M. A., SANTELLI R. E., OLIVEIRA E. P., VILLAR L. S. and ESCALEIRA L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76 (5), 965- 977.

BIPARVA P., EHSANI M., and HADJ MOHAMMADI M.R. (2012). Dispersive liquid-liquid microextraction using extraction solvents lighter than water combined with high performance liquid chromatography for determination of synthetic antioxidants in fruit juice samples. *Journal of Food Composition and Analysis*, 27 (1), 87- 94.

BLEKAS G. A. (2016). Food additives: classification, uses and regulation. Reference Module in Food Science, *Encyclopedia of Food and Health*, 731-736.

BONVALLOT L., BODIN L., DUBOUDIN C. and BARD D. (2009). Benchmark dose : définitions, intérêt et usages en évaluation des risques sanitaires. *Environnement, Risques et Santé*, 8 (6), 529- 537.

BOSSO J. V. and SIMON R. A. (2003). Urticaria, angioedema, and anaphylaxis provoked by food and drug additives; in: «Food Allergy: Adverse Reactions to Foods and Food Additives»

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BOX G. E. P. and WILSON K.B. (1951). On the experimental attainment of optimum conditions. *Journal of the Royal Statistical Society*, 13 (1), 1- 45.
- BRANEN A. L and HAGGERTY R. G. (2001). Introduction to food additives; in: «Food Additives» ed. Food Science and Technology, 2nd ed., Taylor and Francis, New York.
- BRANEN A. L., DAVIDSON P. M., SALMINEN S. and THORNGATE III J.H. (2001). Food Additives. Food Science and Technology, 2nd Ed., Taylor and Francis, New York.
- BRUYÈRE O., AHMED S. H., ATLAN C., BELEGAUD J., BORTOLOTTI M., CANIVENC-LAVIER M-CH., CHARRIÈRE S. GIRARDETJ-PH., HOUDARTS., KALONJIE., NADAUDP., RAJASF., SLAMA G. and MARGARITISI. (2015). Review of the nutritional benefits and risks related to intense sweeteners. *Archives of Public Health*, 73 (41), 2-10.
- BUCK D. F. (1991). Antioxidants; in: «Food Additive User's Handbook» ed. Springer US, 1sted. Blackie and Son Ltd, New York.
- CAKIR R. and CAGRI-MEHETOGLU A. (2013). Sorbic and benzoic acid in non-preservative added food products in Turkey. *Food Additives and Contaminants: Part B: Surveillance*, 6 (1), 47-54.
- CAROCHO M. and FERREIRA I.C.F.R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25.
- CAROCHO M., BARREIRO M. F., MORALES P., and FERREIRA I. C.F.R. (2014). Adding molecules to food, pros and cons: a review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13 (4), 377-399.
- CAROCHO M., MORALES P. and FERREIRA I. C.F.R. (2015). Natural food additives: *Quo vadis?* *Trends in Food Science and Technology*, 45 (2), 284-295.
- CHAN P. N. A. (2014). Chemical properties and applications of food additives: flavor, sweeteners, food colors, texturizers; in «Handbook of Food Chemistry» ed. Food Science, 1st ed., Springer Berlin Heidelberg.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- CHANG C. S. and YEH, T.S. (2014). Detection of 10 sweeteners in various foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22 (3), 318-328.
- CHEVALLIER E., CHEKRI R., ZINCK J., GUÉRIN T., NOEL L. (2015). Simultaneous determination of 31 elements in foodstuffs by ICP-MS 4 after closed-vessel microwave digestion: method validation based on the accuracy profile. *Journal of Food Composition and Analysis*, 41, 35-41.
- CRUMP K.S. (1984). A new method for determining allowable daily intakes. *Fundamental Applied Toxicology*, 4 (5), 854- 871.
- DAKEISHI M., MURATA K., TAMURA A. and IWATAT. (2006). Relation between benchmark dose and no-observed-adverse-effect level in clinical research: effects of daily alcohol intake on blood pressure in Japanese salesmen. *Risk Analysis*, 26 (1), 115- 123.
- DAVIDSON P. M., JUNEJA V.K. and BRANEN J. K. (2001). Antimicrobials agents; in: « Food Additives» ed. *Food Science and Technology*, 2nd ed., Taylor and Francis, New York.
- DEL OLMO A., CALZADA J. and NUÑEZ M. (2015) Benzoic acid and its derivatives as naturally occurring compounds in foods and as additives: uses, exposure and controversy. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, 57 (14), 3084- 3103.
- DELOSIÈRE M., SANTÉ-LHOUTELLIER V., CHANTELAUZE C., DURAND D., THOMAS A., JOLY CH., PUJOS-GUILLOT E., RÉMOND D., COMTE B., GLADINE C., GUY A., DURAND T., LAURENTIEF M. and DUFOUR C. (2016). Quantification of 4-hydroxy-2-nonenal-proteinadducts in the *in vivo* gastric digesta of mini-pigs using a GC-MS/MS method with accuracy profile validation. *Food and Function*, 7 (8), 3497- 3504.
- DENKOV N. D. (2004). Mechanisms of foam destruction by oil-based antifoams. *Langmuir*, 20 (22), 9463- 9505.
- DIAS C. B., MEINHART A. D., PANE D. Q., BALLUS C. A. and GODOY H. T. (2015). Multivariate optimisation and validation of a method for the separation of five artificial sweeteners by UPLC-DAD in nine food matrices. *Food Analytical Methods*, 8 (7), 1824-1835.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

DIOGO J. S., SILVA L.S., PENA A. and LINO C. M. (2013). Risk assessment of additives through soft drinks and nectars consumption on Portuguese population: a 2010 survey. *Food and Chemical Toxicology*, 62, 548-553.

DOORES S. (2001). pH control agents and acidulants; in: «Food Additives» ed. Food Science and Technology, 2nd ed., Taylor and Francis, New York.

EDWARDS C.H., ROSSI M., CORPE C.P., BUTTERWORTH P.J. and ELLIS P.R. (2016). The role of sugars and sweeteners in food, diet and health: alternatives for the future. *Trends in Food Science and Technology*, 56, 158- 168.

EMERTON V. and CHOI E. (2008). Essential Guide to Food Additives. Royal Society of Chemistry, 3rd Ed., Leatherhead Food International, United Kingdom.

FEINBERG M. (2007). Validation of analytical methods based on accuracy profiles. *Journal of chromatography A*, 1158 (1-2), 174- 183.

FEINBERG M., SAN-REDON J., ASSIE A. (2009). Determination of complex polysaccharides by HPAE-PAD in foods: validation using accuracy profile. *Journal of Chromatography B*, 877 (23), 2388-2395.

GERMAN J. B. 2001. Antioxidants; in: «Food Additives» ed. Food Science and Technology, 2nd ed., Taylor and Francis, New York.

GOUPY J. ET CREIGHTON L. (2006). Introduction aux Plans d'Expériences. Wiley Séries en Probabilités et Statistiques, 3^{ème} Éd, Dunod, Paris.

GUTIÉRREZ-LARRAÍNZA M., RÚA J., DE ARRIAGA D., DEL VALLE P. and GARCÍA-ARMESTO M.R. (2013). In vitro assessment of synthetic phenolic antioxidants for inhibition of foodborne *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens*. *Food Control*, 30 (2), 393- 399.

HERRERA-HERRERA A.V., ASENSIO-RAMOS M., HERNANDEZ-BORGES J., RODRIGUEZ-DELGADO M.A. (2010). Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29 (7), 728- 751.

HERRMAN J. L. and YOUNES M. (1999). Background to the ADI/TDI/PTWI. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 30 (2), 109- 113.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

HUBERT Ph., CHIAP P., CROMMEN J., BOULANGER B., CHAPUZET E., MERCIER N., BERVOAS- MARTIN S., CHEVALIER P., GRANDJEAN D., LAGORCE P., LALLIER M., LAPARRAG M.C., LAURENTIE M. and NIVE J.C. (1999). The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. *Analytica Chimica Acta*, 391 (2), 135- 148.

HUBERT Ph., NGUYEN-HUU J. J., BOULANGER B., CHAPUZET E., CHIAP P., COHEN N., COMPAGNON P.A., DEWÉ W., FEINBERG M., LALLIER M., LAURENTIE M., MERCIER N., MUZARD G., NIVET C., VALAT L. and ROZET E. (2007a). Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal-part II. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45 (1), 70-81.

HUBERT Ph., NGUYEN-HUU J. J., BOULANGER B., CHAPUZET E., COHEN N., COMPAGNON P. A., DEWÈ W., FEINBERG M., LAURENTIE M., MERCIER N., MUZARD G., VALAT L. and ROZET E. (2007b). Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal-part III. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45 (1), 82-96.

HUBERT Ph., NGUYEN-HUU J.J., BOULANGER B., CHAPUZET E., CHIAP P., COHEN N., COMPAGNON P. A., DEWÉ W., FEINBERG M., LALLIER M., LAURENTIE M., MERCIER N., MUZARD G., NIVET C. and VALAT L. (2004). Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal- part I. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36 (3), 579- 586.

HUTT C.A. and GONZALEZ M. (2014). Food labeling. Reference Module in Food Science, *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, 3, 167- 185.

INETIANBOR J. E., YAKUBU J. M. and EZEONU S. C. (2015). Effects of food additives and preservatives on man- a review. *Asian Journal of Science and Technology*, 6 (2), 1118-1135.

JAIN A. and MATHUR P. (2015). Evaluating hazards posed by additives in food: A review of studies adopting a risk assessment approach. *Current Research in Nutrition and Food Science*, 3 (3), 243- 255.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- JAVANMARDI F., AREFHOSSEINI S. R., ANSARIN M. and NEMATİ M. (2015). Optimized dispersive liquid-liquid microextraction method and high performance liquid chromatography with ultraviolet detection for simultaneous determination of sorbic and benzoic acids and evaluation of contamination of these preservatives in Iranian foods. *Journal of AOAC international*, 98 (4), 962-970.
- KAMEL B. S. (1991). Emulsifiers; in: «Food Additive User's Handbook » ed. Springer US, 1st ed., Blackie and Son Ltd, New York.
- KARAKASHEV S. I. and GROZDANOVA M. V. (2012). Foams and antifoams. *Advances in Colloid and Interface Science*, 176 (177), 1- 17.
- KILARA A. and DESAI M. (2001). Enzymes; in: « Food Additives »ed. Food Science and Technology, 2nd ed., Taylor and Francis, New York.
- KOKOSA J. M., PRZYJAZNY A. and JEANNOT M. (2009). Solvent Microextraction: Theory and Practice. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- KÖNIG J. (2015). Food colour additives of synthetic origin; in: «Colour Additives for Foods and Beverages» ed. Wood head Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, 1st ed., Elsevier Science, Cambridge.
- KOUGIAS P.G., TSAPEKOS P., BOE K., ANGELIDAKI I. (2013). Antifoaming effect of chemical compounds in manure biogas reactors. *Water Research*, 47 (16), 6280- 6288.
- LENNERZ B. S., VAFAI S. B., DELANEY N. F., CLISH C. B., DEIK A. A., PIERCE K. A., LUDWIG D. S., MOOTHA V. K. (2015). Effects of sodium benzoate, a widely used food preservative, on glucose homeostasis and metabolic profiles in humans. *Molecular Genetics and Metabolism*, 114 (1), 73-79.
- LEONG M. I., FUH M. R. and HUANG S. D. (2014). Beyond dispersive liquid- liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1335, 2- 14.
- LINO C.M. and PENA A. (2010). Occurrence of caffeine, saccharin, benzoic acid and sorbic acid in soft drinks and nectars in Portugal and subsequent exposure assessment. *Food Chemistry*, 121 (2), 503-508.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- LORENZO R.A., PENA M.T., FERNANDEZ P., GONZALEZ P. and CARRO A.M. (2015). Artificial sweeteners in beverages by ultra-performance liquid chromatography with photodiode array and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Control*, 47, 43-52.
- LU F. C. (1998). Acceptable Daily Intake: Inception, evolution, and application. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 8 (1), 45- 60.
- LU Y., HAO T., HU S., HAN J., TAN Z. and YAN Y. (2013). Measurement and correlation of phase diagram data for acetone and sulfate aqueous two-phase systems at different temperatures. *Thermochimica Acta*, 568, 209-217.
- MAHUNGU S. M. and ARTZ W. E. (2001). Emulsifiers; in: «Food Additives» ed. *Food Science and Technology*, 2nd ed., Taylor and Francis, New York.
- MARIE S. (1991). Sweeteners; in: «Food Additive User's Handbook» ed. Springer US, 1sted., Blackie and Son Ltd, New York.
- MARINOVICH M., GALLIC. L., BOSETTIC. GALLUS S. and LAVECCHIA C. (2013). Aspartame, low-calorie sweeteners and disease: Regulatory safety and epidemiological issues. *Food and Chemical Toxicology*, 60. 109- 115.
- MILLER J. C. and MILLER J. N. (1993). *Statistics for Analytical Chemistry*. Ellis Horwood PTR Prentice Hall analytical chemistry series, 3rd Ed., Ellis Harwood, New York.
- MOORADIAN A D., SMITH M. and TOKUDA M. (2018). The role of artificial and natural sweeteners in reducing the consumption of table sugar: A narrative review, *Clinical Nutrition ESPEN* 18, 1- 8
- MOTA F. J. M., FERREIRA I. M.P.L.V.O., CUNHA S. C. and OLIVEIRA M. B. P. P. (2003). Optimization of extraction procedures for analysis of benzoic and sorbic acids in foodstuffs. *Food Chemistry*, 82, 469-473.
- MSAGATI, T.A.M. (2013). *Chemistry of Food Additives and Preservatives*. 1st Ed., John Wiley & Sons, Ltd. The Atrium, Southern Gate, Chichester.
- MYASEIN F., KIM E., ZHANG J., WU H. and EL-SHOUBAGY T. A. (2009). Rapid simultaneous determination of lopinavir and ritonavir in human plasma by stacking protein precipitations and salting-out assisted liquid/liquid extraction, and ultrafast LC–MS/MS. *Analytica Chimica Acta*, 651 (1), 112- 116.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

MYERS R. H., MONTGOMERY D. C., ANDERSON-COOK C. M. (2009). Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments. Willy Series in Probability and Statistics, 3rd Ed., John Wiley and Sons INC., Canada.

NAUTA T. 1991. Chelating agents; in: «Food Additive User's Handbook» ed. Springer US, 1st ed., Blackie and Son Ltd, New York.

NERÍN C., POLO T., SALAFRANCA J. and CACHO J. (1996). Fast microextraction by demixture and determination of organochlorine pesticides in water. International Journal of environmental Analytical Chemistry, 65, 27-35.

NOGAWA K., KIDO T., NISHIJO M., NAKAGAWA H. and ANDSUWAZONO Y. Benchmark dose of cadmium concentration in rice for renal effects in a cadmium-polluted area in Japan. Journal of Applied Toxicology, 35 (1), 24- 28.

O'MULLANE M., FIELDS B. and STANLEY G. (2014). Food additives: Sweeteners. Encyclopedia of Food Safety, 2, 477- 483.

OCAÑA-GONZÁLEZ J.A., FERNÁNDEZ-TORRES R., BELLO-LÓPEZ M.Á. and RAMOS-PAYÁN M. (2015). New developments in microextraction techniques in bioanalysis. Analytica Chimica Acta, 905, 8-23.

ORDOÑEZ E Y., RODIL R., QUINTANA J. B. and CELA R. (2015). Determination of artificial sweeteners in beverages with green mobile phases and high temperature liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Food Chemistry, 169, 162-168.

PANDEY R. M. and UPADHYAY S. K. (2012). Food Additive; in: « Food Additive » 1st ed., In Tech, Rijeka, Croatia.

PEACE D. and DOLFINI L. (1991). Nutritive additives; in: «Food Additive User's Handbook» ed. Springer US, 1st ed., Blackie and Son Ltd, New York.

PENNER N., RAMANATHAN R., ZGODA-POLS J. and CHOWDHURY S. (2010). Quantitative determination of hippuric and benzoic acids in urine by LC-MS/MS using surrogate standards. Journal of Biomedical Analysis, 52 (4), 534-543.

PRESSMAN P., CLEMENS R., HAYES W. and REDDY C. (2017). Food additive safety: A review of toxicologic and regulatory issues. Toxicology Research and Application 1, 1- 22.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

PROSEN H. (2014). Applications of liquid-phase microextraction in the sample preparation of environmental solid samples. *Molecules*, 19(5), 6776-6808.

RAYNER P. B. (1991). Colours; in «Food Additive User's Handbook» ed. Springer US, 1st ed., Blackie and Son Ltd, New York.

REZAEI M., ASSADI Y., MILANI HOSSEINI M. R., AGHAEI E., AHMADI F. and BERIJANI S. (2006). Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1116, (1-2), 1-9.

RIDGWAY K., LALLJIEP D. S. and SMITH R. M. (2007). Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. *Journal of Chromatography A*, 1153 (1-2), 36- 53.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. (2015). Natural food pigments and colorants. *Current Opinion in Food Science*, 7, 20- 26.

ROZET E., CECCATO A., HUBERT C., ZIEMONS E., OPREAN R., RUDAZ S., BOULANGER B. and HUBERT Ph.(2007a). Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *Journal of Chromatography A*, 1158 (1-2), 111-125.

ROZET E., HUBERT C., CECCATO A., DEWÉ W., ZIEMONS F., MOONEN F., MICHAIL K., WINTERSTEIGER R., STREEL B., BOULANGER B. AND HUBERT Ph. (2007b). Using tolerance intervals in pre-study validation of analytical methods to predict in-study results. The fit-for-future-purpose concept. *Journal of Chromatography A*, 1158 (1-2), 126-137.

RUA J., FERNANDEZ-ALVAREZ L., DE CASTRO C., DEL VALLE P., DE ARRIAGA D. and GARCIA-ARMESTO M.R. (2011). Antibacterial activity against foodborne *Staphylococcus aureus* and antioxidant capacity of various pure phenolic compounds. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(1), 149- 157.

RUSTUM A.M., HOFFMAN NE. (1987). Determination of cyclophosphamide in whole blood and plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 422, 125- 134.

SALMINEN S. and HALLIKAINEN A. (2001). Sweeteners; in: «Food Additives» ed. Food Science and Technology, 2nd ed., Taylor and Francis, New York.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

SALMINEN S. and TAHVONEN R. (2001). Food additive intake assessment; in: «Food Additives» ed. Food Science and Technology, 2nd ed., Taylor and Francis, New York.

SALTMARSH M. (2014). Recent trends in the use of food additives in the United Kingdom. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95 (4), 649-52.

SAPERS G. M., HICKS K. B. and MILLER R. L. (2001). Antibrowning agents; in: «Food Additives» ed. Food Science and Technology, 2nd ed., Taylor and Francis, New York

SARAJI M. and BOROUJENI M. K. (2014). Recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406 (8), 2027-2066.

SHAH V.P., MIDHA K.K., DIGHE S., MC GILVERAY L. J., SKELLY J.P., YACOBI A., LAYLOFF T., VISWANATHAN C.T., COOK C. E., MCDOWALL R. D., PITTMAN K. A. and SPECTOR S. (1992). Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81 (3), 309-312.

SHANKAR P., AHUJA S. and SRIRAM K. (2013). Non-nutritive sweeteners: review and update. *Nutrition*, 29 (11-12), 1293- 1309.

SHEWIYO D. H., KAALE E., RISHA P. G., DEJAEGHER B., SMEYERS-VERBEKE J. and VANDER- HEYDEN Y. (2012). Development and validation of a normal-phase high-performance thin layer chromatography method for the analysis of sulfamethoxazole and trimethoprim in co-trimoxazole tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1216 (42), 7102- 7107.

SILVA M. M. and LIDON F. C. Food preservatives- an overview on applications and side effects. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 28(6), 366-373.

SINKI G. S. and GORDON R. J. (2001). Flavoring Agents; in: «Food Additives» ed. Food Science and Technology, 2nd ed., Taylor and Francis, New York.

SMITH J. (1991). Preservatives; in: « Food Additive User's Handbook » ed. Springer US, 1st ed., Blackie and Son Ltd, New York.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

SOLYMOSI K., LATRUFFE N., MORANT-MANCEAU A. and SCHOEFS B. (2015). Food colour additives of natural origin; in: «Colour Additives for Foods and Beverages» ed. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, 1st ed., Elsevier Science, Cambridge.

SONNERGAARD J. (2006). On the misinterpretation of the correlation coefficient in pharmaceutical sciences. *International Journals of Pharmaceutics*, 321(1-2), 12-17.

SUGITA Y. H. (2001). Flavor enhancers; in: «Food Additives» ed. Food Science and Technology, 2nd ed., Taylor and Francis, New York.

SUMNER S. S. and EIFERT J. D. (2001). Risks and benefits of food additives; in: «Food Additives» ed. Food Science and Technology, 2nd ed., Taylor and Francis, New York.

SUWAZONO Y., UETANI M., ÅKESSON A. and VAHTER M. (2010). Recent applications of benchmark dose method for estimation of reference cadmium exposure for renal effects in man. *Toxicology Letters*, 198 (1), 40- 43.

SZULTKA M., POMASTOWSKI P., RAILEAN-PLUGARU V. and BUSZEWSKI B. (2014). Microextraction sample preparation: techniques in biomedical analysis. *Journal of Separation Science*, 37 (21) 3094- 3105.

TABATA M., KUMAMOTO M. and NISHIMOTO J. (1996). Ion pair Extraction of Metalloporphyrins into Acetonitrile for Determination of Copper (II). *Analytical Chemistry*, 68 (5), 758-762.

TABATA M., KUMAMOTO M. and NISHIMOTO. (1994). Properties of water miscible solvents separated by salt-out and their application to solvent extraction. *Analytical Sciences*, 10 (3), 383- 388

TANG Y. Q. and WENG N. (2013). Salting-out assisted liquid-liquid extraction for bioanalysis. *Bioanalysis*, 5 (12), 1583- 1598.

TEREFE N. S., BUCKOW R. and VERSTEEG C. (2014). Quality-related enzymes in fruit and vegetable products: effects of novel food processing technologies, part 1: high-pressure processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54 (1), 24-63.

THORNGATE III J. H. (2001). Synthetic food colorants; in: «Food Additives» ed. Food Science and Technology, 2nd ed., Taylor and Francis, New York.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

TOMASKA L. D. and BROOKE-TAYLOR S. (2014). Food Additives: Food Additives - General. Reference Module in Food Science, Encyclopedia of Food Safety, 2, 449- 454.

TRUHAUT R. (1991). The concept of the acceptable daily intake: An historical review. Food Additives and Contaminants, 8 (2), 151-162.

TUORMAA T. E. (1994). The adverse effects of food additives on health: A review of the literature with special emphasis on childhood hyperactivity. Journal of Orthomolecular Medicine, 9 (4), 225- 243.

VERBRUGGEN R. (2001). Food additives in the European Union; in: «Food Additives» ed. Food Science and Technology, 2nd ed., Taylor and Francis, New York.

VIÑAS P., CAMPILLO N., LÓPEZ-GARCÍA I., HERNÁNDEZ-CÓRDOBA M. (2014). Dispersive liquid- liquid microextraction in food analysis. A critical review. Analytical Bioanalytical Chemistry, 406 (8), 2067-2099.

Walker R. (1990). Toxicology of sorbic acid and sorbates. Food Additives and Contaminants: Part A, 7(5), 671-676

WANG Y., YAN Y., HU S., HAN J. and XU X. (2010). Phase diagrams of ammonium sulfate + ethanol/1-propanol/ 2-propanol + water aqueous two-phase systems at 298.15 K and Correlation. Journal of Chemical and Engineering Data, 5(2), 876-881.

WILSON B. G. and BAHNA S. L. (2005). Adverse reactions to food additives. Annals of Allergy Asthma and Immunology, 95(6), 499- 507.

YOKEL R. A. (2012). Aluminum in food- The nature and contribution of food additives; in «Food Additives» ed. Romana Vukelic, 1st ed., In Tech Open, Rijeka

ZENGİN N., YÜZBASIOĞLU D., ÜNAL F., YILMAZ S. and AKSOY H. (2011). The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: Sodium benzoate and potassium benzoate. Food Chemical and Toxicology, 49 (4), 763- 769.

ZULOAGA O., OLIVARES M., NAVARRO P., VALLEJO A. and PRIETO A. (2015). Dispersive liquid- liquid microextraction: trends in the analysis of biological samples. Bioanalysis, 7 (17), 2211- 2225.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ZYGLER A., WASIK A., KOT-WASIK A. and NAMIEŚNIK J. (2011). Determination of nine high-intensity sweeteners in various foods by high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400 (7), 2159-2172.

ANNEXES : PUBLICATIONS

ANNEXE: PUBLICATIONS

ANNEXE: PUBLICATIONS

Article 1:

Tighrine Abderrahmane, Pinto Edgar, Melo Armindo, Ferreira Isabel M.P.L.V.O., Mamou Marzouk and Amir Youcef. (2019). Simultaneous Extraction and Determination of Preservatives and Antioxidants in Juice Samples by an Optimized Microextraction Method Using Central Composite Design and Validated with Accuracy Profile. *Journal of AOAC International*, vol. 102, No. 1 January-February, 2019, 208- 216.

Article 2:

Abderrahmane Tighrine, Youcef Amir, Pilar Alfaro, Marzouk Mamou and Cristina Nerín. (2019). Simultaneous extraction and analysis of preservatives and artificial sweeteners in juices by salting out liquid- liquid extraction method prior to ultra- high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 277 (2019) 586- 594.

Simultaneous Extraction and Determination of Preservatives and Antioxidants in Juice Samples by an Optimized Microextraction Method Using Central Composite Design and Validated with Accuracy Profile

ABDERRAHMANE TIGHRINE

Mouloud Mammeri University of Tizi Ouzou, Faculty of Biological and Agronomic Sciences, Laboratory of Quality and Food Safety (LQFS), Tizi Ouzou, Algeria 15000; Universidade do Porto, Faculdade de Farmácia, LAQV-REQUIMTE/ Departamento de Ciências Químicas, Laboratório de Bromatologia e Hidrologia, R. Jorge Viterbo Ferreira 228, Porto, Portugal 4050-313

EDGAR PINTO

Universidade do Porto, Faculdade de Farmácia, LAQV-REQUIMTE/Departamento de Ciências Químicas, Laboratório de Bromatologia e Hidrologia, R. Jorge Viterbo Ferreira 228, Porto, Portugal 4050-313

ARMINDO MELO

Universidade do Porto, Faculdade de Farmácia, LAQV-REQUIMTE/Departamento de Ciências Químicas, Laboratório de Bromatologia e Hidrologia, R. Jorge Viterbo Ferreira 228, Porto, Portugal 4050-313; Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Departamento de Saúde Ambiental, Rua Alexandre Herculano 321, Porto, Portugal 4000-055

ISABEL M.P.L.V.O. FERREIRA

Universidade do Porto, Faculdade de Farmácia, LAQV-REQUIMTE/Departamento de Ciências Químicas, Laboratório de Bromatologia e Hidrologia, R. Jorge Viterbo Ferreira 228, Porto, Portugal 4050-313

MARZOUK MAMOU

Mouloud Mammeri University of Tizi Ouzou, Faculty of Medicine, Laboratory of Analytical Chemistry, Tizi Ouzou, Algeria 15000

YOUCEF AMIR¹

Mouloud Mammeri University of Tizi Ouzou, Faculty of Biological and Agronomic Sciences, Laboratory of Quality and Food Safety (LQFS), Tizi Ouzou, Algeria 15000

Background: Food additives are widely used in industries. Overall, these additives have a beneficial role, but if their concentration exceeds certain limits, they may have an adverse effect on human health. **Objective:** This study outlines the determination of benzoic acid (BA), sorbic acid (SA), butylated hydroxyanisole (BHA), and butylated hydroxytoluene (BHT) in juices using dispersive liquid–liquid microextraction and HPLC–diode-array detection. **Methods:** Different parameters that significantly affect the extraction efficiency were optimized. The disperser and extraction solvents were acetone and chloroform, respectively. The other parameters were selected and optimized using two-level (2^k) factorial and central composite designs, respectively. A full method validation using an accuracy profile for the total measurement error

was carried out. **Results:** The optimized conditions were 625 μ L acetone, 350 μ L chloroform, 0.85 g NaCl, and pH 2. The validated method demonstrated good linearity with $R^2 \geq 0.99$ and good precision with the RSD of repeatability and intermediate precision at 1.97–10.7% and 2.31–11.9%, respectively. The relative recoveries were 96.2–105.4%, and the LODs were around 0.03 μ g/mL for all compounds. The analysis of 41 samples revealed that BA and SA were quantified in 25 and 20 samples, respectively. BHA and BHT were not detected. **Conclusions:** The proposed methodology is an appropriate tool to determine important food additives in juices to ensure their compliance with the food additives legislation. **Highlights:** The work has demonstrated that the method can be successfully used in the simultaneous determination of four food additives in fruit juices.

Received March 27, 2018. Accepted by SG May 17, 2018.

This work received financial support from the European Union (FEDER funds POI/01/0145/FEDER/007265) and National Funds (FCT/MEC, Fundação para a Ciência e Tecnologia and Ministério da Educação e Ciência) under the Partnership Agreement PT2020 UID/QUI/50006/2013.

¹Corresponding author's e-mail: lab.quality.food.safety@gmail.com

DOI: <https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0104>

Food additives such as preservatives and antioxidants play a vital role in the food industry. They are generally used to maintain the quality, safety, and desirability of food. Benzoic acid (BA), sorbic acid (SA), and their salts are among the most widely used food preservatives. They inhibit yeast and mold growth and show great effectiveness against a wide range of bacteria. Butylated hydroxyanisole (BHA)

and butylated hydroxytoluene (BHT) are synthetic phenolic antioxidants used to prevent lipid oxidation. In addition, their antimicrobial effect against bacteria was demonstrated (1, 2). Nevertheless, the use of BA, SA, BHA, and BHT in foodstuffs can cause adverse effects on human health. The most important effects of BA and SA are urticaria, exfoliative dermatitis, erythema, rhinitis, anaphylactic shock, nausea, headache, migraine, asthma, bronchospasm, esophagus burning, vomiting, diarrhea, muscular weakness, metabolic acidosis, convulsions, tremors, hypoactivity, and emaciation (3, 4). Other studies have demonstrated the clastogenic, mutagenic, and cytotoxic effects of these compounds in human lymphocytes *in vitro* (3, 5). Adverse effects are also described for BHA and BHT. Some studies have concluded that these compounds enhanced carcinogenesis in the forestomach and urinary bladder of rats (6, 7). Therefore, their use must be regulated.

The Codex Alimentarius published a list of food additives recognized as suitable for use in foods. The maximum permitted levels in various food groups were established to ensure that the intake of each additive from all its uses does not exceed its acceptable daily intake based on the recommendations of the Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives (8). Likewise, the European Union (EU) published the list of approved food additives for use in foods and their conditions of use (9). Moreover, the legislation of most countries, including Algeria, also defines the approved additives and the upper limit amounts that can be added to various food groups. It should be highlighted that the allowed food additives and the upper limits differ. In the case of fruit juices, the use of BA and SA or their salts (alone or in combination) is permitted in the EU at 500 and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for BA and SA, respectively, (9) but not in Algeria, where their use is totally prohibited. BHA and BHT are permitted only in fatty foods, and their use in fruit juices is not allowed both in the EU and in Algeria (9, 10). Therefore, the simultaneous determination of these two different types of additives in commercial fruit juices is imperative. For this purpose, the validation of a reliable method to undertake routine analysis of a great number of samples is of major relevance.

Several analytical methods are available to analyze preservatives and synthetic antioxidants in food, drugs, and cosmetic products. Most of them rely on the use of separation techniques such as HPLC (11–15), ultra-performance LC (16), GC (17–21), capillary electrophoresis (22), micellar electrokinetic capillary chromatography (23, 24), and capillary zone electrophoresis (25). Nevertheless, few methods allow for the simultaneous analysis of different classes of preservatives. The direct analysis of these compounds in complex food matrixes is a very complicated task. Therefore, sample pretreatment is an essential step to remove interfering compounds and concentrate the analytes of interest. The most common procedures for sample preparation are liquid–liquid extraction and solid-phase extraction (SPE; 12–14, 18). The first does not require expensive material but is time-consuming and requires large volumes of both samples and toxic organic solvents. The second reduces the amounts of toxic organic solvents but is expensive and time-consuming. To overcome these drawbacks, faster and greener extraction and microextraction techniques were developed. Therefore, dispersive SPE, solid-phase microextraction (SPME), and liquid-phase microextraction (LPME) have become the dominant miniaturized microextraction techniques. The

SPME procedure includes headspace SPME (20, 26), in-tube SPME (14), and stir bar sorptive extraction (17, 21). The LPME is classified into single-drop LPME, hollow-fiber LPME, and dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME; 27). Out of all these microextraction techniques, DLLME has been the most used since its introduction by Rezaee et al. (28) for the extraction of organic analytes from water samples because it is inexpensive, simple, fast, and easy to operate (29). This technique is based on ternary solvent mixture, and the extraction process involves three steps. First, extraction and disperser solvents are injected swiftly into the liquid sample. Then, the extraction solvent is dispersed with the assistance of the disperser solvent. Finally, the formed cloudy mixture is centrifuged, and the extraction solvent containing the analytes is recovered for analysis.

Method validation must occur at the end of the development and optimization to ensure that it is acceptable for its intended purpose and provides reliable data. Method validation is thoroughly described in different regulatory guidance documents, e.g., the International Conference on Harmonization Q2(R1), the United States Pharmacopeia, the U.S. Food and Drug Administration, and the International Organization for Standardization. Nevertheless, the conclusion on the method acceptance criteria is generally unclear. In fact, these validation approaches are usually addressed and proposed to evaluate the trueness and precision of the analytical method separately. Thus, even if only one of these criteria is unsatisfactory, it can lead to ambiguous conclusions about whether to accept or reject the method (30). An accuracy profile is used to simplify the validation approach of an analytical method. This harmonized approach, developed by the Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques (SFSTP) in 2006, is based on the β -expectation tolerance interval that summarizes the total error measurement for the sum of the bias and SD of intermediate precision in a single graph (31–33). A procedure can be qualified as acceptable if the difference between every measurement (x) of a sample and its true, introduced value is inside the acceptance limits ($\pm\lambda$). The acceptance limits differ and depend on the requirements of the analyst or the objectives of the analytical method.

Recently, the authors were interested in the simultaneous extraction of BA and SA (34, 35) and of BHT and BHA in foods and fruit juices (36) independently. However, to the best of our knowledge, no work regarding the extraction of all these compounds simultaneously has been published yet. Therefore, the aim of this work was to optimize, validate, and put into practice a fast and accurate DLLME and HPLC–diode-array detection (DAD) method for the routine analysis of BA, SA, BHA, and BHT in fruit juices in order to check their compliance with food additives legislation. The method used was optimized using an experimental design and validated using an accuracy profile as a decision tool. The main variables affecting the DLLME procedure were screened using a two-level (2^k) factorial design, and the selected variables were optimized by a central composite design (CCD).

Experimental

Chemicals and Reagents

Sodium benzoate ($\geq 99\%$), potassium sorbate ($\geq 99\%$), butylated hydroxyanisole ($\geq 98.5\%$), butylated hydroxytoluene ($\geq 99.0\%$), cinnamic acid ($\geq 99\%$), acetone, acetonitrile,

methanol, and sodium formate were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Ethanol, chloroform, carbon tetrachloride, sodium chloride ($\geq 99.0\%$), hydrochloric acid (37%), and formic acid ($\geq 98.0\%$) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Ultrapure water ($18.2 \text{ M}\Omega \times \text{cm}$) was purified by a Milli-Q gradient system (Millipore, Milford, MA).

Stock standard solutions of sodium benzoate, potassium sorbate, BHA, and BHT were prepared at a concentration of $1000 \mu\text{g/mL}$. Sodium benzoate and potassium sorbate stock solutions were prepared in ultrapure water, whereas BHA and BHT stock solutions were prepared in methanol. Cinnamic acid, used as an internal standard (IS), was prepared at a concentration of $1000 \mu\text{g/mL}$ using methanol. An intermediate IS solution was prepared by appropriate dilution at a concentration of $100 \mu\text{g/mL}$. In order to validate the analytical method following the accuracy profile methodology, two kinds of standards, calibration standards (CS) and validation standards (VS), were prepared in an independent way. For CS, four working solutions at 0.1, 5, 10, and $20 \mu\text{g/mL}$ were prepared on each day of analysis by measuring a known volume of the stock solution to a 50 mL volumetric flask and adjusting the pH to 2 with an HCl solution (0.7 M, v/v). For VS or QC samples, the daily working solutions were prepared at the same concentrations in the presence of a juice matrix.

Instrumentation

The separation and chromatographic analysis of BA, SA, BHA, and BHT was performed using an HPLC system equipped with two pumps (305 and 306; Gilson, Villiers-le-Bel, France), a refrigerated autosampler (AS-2057 Plus; Jasco, Tokyo, Japan), a Column Heater (Model 7981; Jones Chromatography), and a photodiode array detector (Prostar 335; Varian, Palo Alto, CA). The separation was performed on a YMC-Triart C₁₈ column ($250 \times 4.6 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$; YMC, Kyoto, Japan). The data processor software Varian Star Workstation was used for system control and data acquisition.

Conditions of Chromatographic Separation

Chromatographic separation was performed by gradient elution using two solvent mixtures delivered with a flow rate of 0.8 mL/min . Solvent A consisted of 25 mM aqueous sodium formate/formic acid buffer at pH 4.4, and solvent B was made up of acetonitrile. The following linear gradient elution was used: 0–3 min, 40% B; 3–11 min, 98% B; 11–17 min, 98% B; 17–20 min, 98% B; and 20–28 min, 40% B. The total run time (including analyte separation, column rinse, and re-equilibration) was 30 min. The injection volume was $20 \mu\text{L}$, and the column temperature was set at 30°C . The detection was carried out at a wavelength of 235 nm.

Collection of Samples

Forty-one juice samples from nine different brands were collected from different supermarkets in Tizi Ouzou, Algeria. Those brands were codified as follows: brand A (Assiri Vita Jus, orange; $n = 10$), brand B (N'gaous, multifruit; $n = 3$), brand C (Ramy, orange; $n = 5$), brand D (Plus Fares, orange; $n = 4$), brand E (N'gaous, cocktail; $n = 3$), brand F (Plus Fares, orange-pineapple;

$n = 3$), brand G (Ramy, pineapple; $n = 3$), brand H (O'jus, orange; $n = 5$), and brand I (Safir, orange-pineapple; $n = 5$). All the samples were stored under refrigerated conditions (4°C) until the analysis.

Preparation of Sample and DLLME Procedure

The samples were centrifuged at 3500 rpm for 3 min and then diluted $100\times$ with ultrapure water while adjusting the pH to 2 with an HCl solution (0.7 M, v/v). For the DLLME experiment, 5 mL sample was placed in a 10 mL conical tube containing 0.85 g NaCl and $50 \mu\text{L}$ IS solution ($100 \mu\text{g/mL}$). The mixture was hand-shaken vigorously until the total dissolution of NaCl and a mix solution, consisting of $625 \mu\text{L}$ acetone (disperser solvent) and $350 \mu\text{L}$ of chloroform (extraction solvent), was injected rapidly to form a cloudy solution. The mixture was hand shaken for 10 s and vortexed for 1 min to extract the food additives from the fine droplets of chloroform. Afterward, the cloudy solution was centrifuged at 4500 rpm for 10 min and the sedimented phase was recovered and collected into a 2 mL glass vial using a $100 \mu\text{L}$ Hamilton microsyringe. The organic phase was evaporated in a gentle stream of N_2 and reconstituted in $200 \mu\text{L}$ of mobile phase acetonitrile + formic buffer pH 4.4, (40 + 60)%. Finally, $20 \mu\text{L}$ extract was injected into the HPLC system for analysis.

Experimental Designs

Two experimental designs were performed in this work: (1) A two-level (2^k) full-factorial design used to screen the main variables affecting the DLLME procedure, and (2) a CCD to optimize the significant variables selected from the previous experimental design. The screening of experimental design was first performed to evaluate the significance of sample pH (X1), extracting solvent volume (X2), disperser solvent volume (X3), and NaCl concentration (X4). Experiments were carried out on samples with pH 2–4, extracting solvent volumes 50–350 μL , disperser solvent volumes 400–1200 μL , and NaCl concentrations 0.25–1 g. The second experimental design (i.e., CCD) was performed using the significant variables obtained from the screening experiment. A CCD consisting of a complete two-level (2^k) full-factorial design, with six center and two axial points on the axis of each design variable at a distance of $\alpha = 2$ from the design center, was used in a total of 30 runs. Experiments were carried out with the pH value between 2 and 3, the extraction solvent volume varying between 150 and 350 μL , the disperser solvent volume ranging from 400 to 800 μL , and the NaCl concentration between 0.50 and 0.85 g per 5 mL. All the experimental trials were randomized to minimize the effect of the uncontrolled factors. The response was the sum of the peak areas of all the four tested compounds.

The entire statistical analysis of the screening experiment and of the CCD was carried out using Design Expert Trial Version 10.0.3 software (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN).

Method Validation by Accuracy Profile

Accuracy profiles based on the β -expectation tolerance interval for the total error measurement (including both bias and SD for intermediate precision) were applied as a decision tool to evaluate the analytical performance of the optimized method and to decide whether the analytical procedure is valid (31–33).

The following validation criteria were determined in order to validate the present method: linearity, precision, trueness, lower LOQ (LLOQ), upper LOQ (ULOQ), and LOD.

The validation of the method was performed by spiking fruit juice, which was considered the most complex matrix of those analyzed and was free of the studied food additives. All the validation parameters were evaluated by carrying out 60 independent measurements distributed in three series performed independently. In each series, four concentration levels with two repetitions for CS and three repetitions for VS at each level were performed. All the results were calculated using the ratio between the peak area of each compound and the peak area of the IS. Regarding the validation of analytical method in the field of food analysis using the accuracy profile approach, there are a few available official references in the normative literature concerning the accepted decision criteria [acceptability limit (λ) and the risk level (β)]. Therefore, from the recent works, different criteria values have been used, such as $\lambda = \pm 10\%$, $\beta = 80\%$ (37); $\lambda = \pm 30$ or $\pm 40\%$, $\beta = 85\%$ (38); and $\lambda = \pm 40\%$, $\beta = 70\%$ (39). In this work, $\lambda = \pm 30\%$ and $\beta = 80\%$.

All statistical analyses were calculated using the back-predictor and E-noval V3.0 Software (Arlenda, Liège, Belgium).

Results and Discussion

Optimization of the DLLME Procedure

Selection of extraction and disperser solvents.—Choosing the most suitable extraction and disperser solvent is a crucial step in DLLME in order to obtain maximum extraction efficiency. These solvents must be selected according to specific requirements. Besides the capability to extract the compounds of interest, the extraction solvent must present low solubility in water and different density when compared with the aqueous phase to enable phase separation (40). Concerning the disperser solvent, it should be able to dissolve in both the extraction solvent and the water (41). In the present study, two extraction solvents (chloroform and carbon tetrachloride) and four disperser solvents (acetone, acetonitrile, methanol, and ethanol) were tested. A standard mixture containing 10 $\mu\text{g/mL}$ of each compound was used to test the suitability of the extraction and disperser solvents. The sum of the peak areas

of the four compounds was used to select the most suitable extraction and disperser solvents. As can be seen in Figure 1, the use of acetone and chloroform as disperser and extraction solvents, respectively, resulted in the highest sum of peak areas, and thus this mixture was used in the subsequent experiments.

Screening design.—A two-level (2^4) full-factorial design was performed for the screening and identification of the significant variables. The variables tested were the sample pH, extraction solvent volume, disperser solvent volume, and the amount of NaCl. A total of 21 trials (2^4 trials in duplicate with five center points) were performed. The effects of the studied variables and their interactions are shown in the form of a Pareto chart in Figure 2. The results show that all variables were significant (i.e., sample pH, disperser solvent, extraction solvent volume, and amount of NaCl); thus, they were considered significant enough to be studied in the next optimization step.

Central composite design.—Thirty trials were performed with the four variables considered significant in the screening design (i.e., pH of sample, disperser solvent, extraction solvent and amount of NaCl). The statistical significance of the obtained model was validated by verifying the P value of the model and the lack of fit (LOF) according to the analysis of variance (ANOVA) test. The F value was 14.4, which indicates that the model equation is a good fit for representing the relationship between responses and the main factors. The P value of LOF was >0.05 , which confirms that the LOF of this model is not significant relative to the pure error. In addition, the determination coefficient (R^2) was 0.931 and >0.8 , which indicates the quality and the fitness of the obtained model. The adjusted R^2 was 0.87, meaning that the model had high potential for predicting the response. The low CV (12.55%) among the replicate experimental data indicates that the repeatability or precision of the experimental data is very good.

Response surface.—Three-dimensional (3D) response surface plots were drawn to investigate the interactive effect of two factors on the sum of the four compounds' peak areas. Figure 3a shows the interactive effect between the sample pH and NaCl amount. It is clear that a lower pH and higher amount of NaCl results in increased extraction efficiency. This can be explained by the fact that all the compounds are in their unionized form, which has lower water solubility. Regarding NaCl, its addition

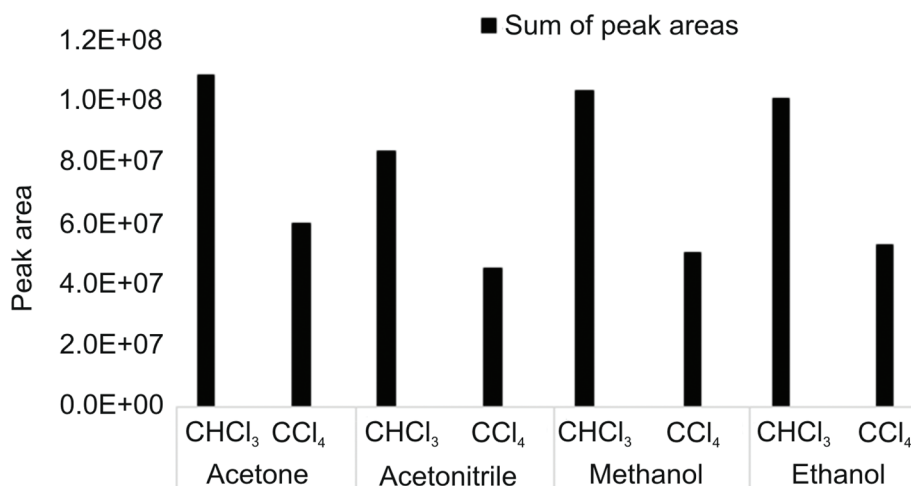


Figure 1. Selection of extraction and disperser solvent pair in DLLME.

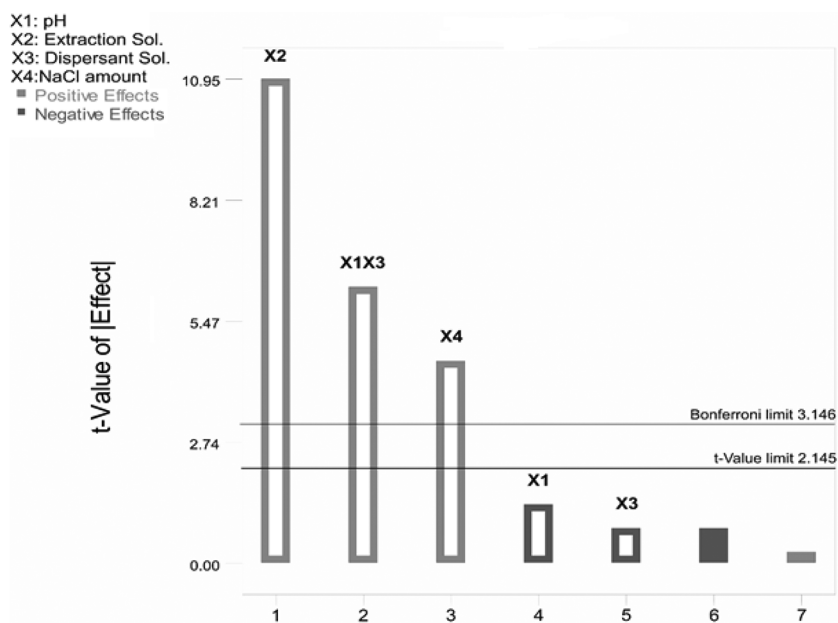


Figure 2. Standardized main effect ($P = 0.05$) Pareto chart for screening design, representing the estimated effects of variables and variables' interactions on the sum peak areas of the compounds. X1 (sample pH), X2 (extraction solvent volume), X3 (disperser solvent volume), and X4 (the amount of NaCl).

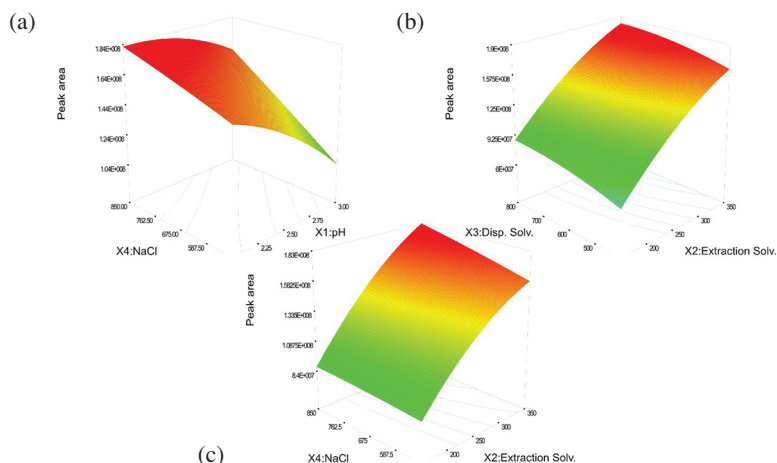


Figure 3. 3D response surface graphs estimated for the central composite design of DLLME optimization showing the effect of (a) NaCl amount and pH, (b) chloroform and acetone volume, and (c) NaCl amount and chloroform volume. Color images are available online at <http://aoac.publisher.intentaconnect.com/content/aoac/jaoac>

increases the extraction efficiency, and the maximum response was obtained at 0.85 g per 5 mL. Figure 3b and c show the 3D response surface representing the interactive effects of both the extraction solvent with disperser solvent and the extraction solvent with NaCl, respectively. These figures show that increasing the extraction solvent volume until 350 μ L increases the extraction efficiency. However, increasing the volume of disperser solvent slowly increases the extraction efficiency, and the maximum response was obtained at 625 μ L. Finally, based on the response surface graphs and on the desirability indexes achieved to maximize the response, the final optimal extraction conditions of the simulated polynomial were selected as follows: 625 μ L acetone, 350 μ L chloroform, an NaCl concentration of 0.85 g per 5 mL, and pH 2. These results were used in the repeatability assessment and validation of the proposed method.

Validation of Method Performance

Response function.—The validation of an analytical method using the SFSTP 2006 guidelines makes it possible to consider several mathematical regression models to be fitted as the response function. All the regression models were obtained from the examination of the CS. Therefore, the most suitable response function describing the relationship between the introduced concentration of each compound (x) and the response ratio (y) of the compound to the peak area of the IS was selected according to the accuracy profile. In addition, this function can be selected by using the accuracy index, which is considered to be the geometric mean of the three other indexes (i.e., dosing range, precision, and trueness). In this work, the selected adequate response functions were weighted $1/X$ linear regression for BA,

weighted $1/X^2$ linear regression for SA and BHA, and weighted $1/X$ quadratic regression for BHT. All the results from the validation method are shown in Table 1. The validation results for the CS curve show that the determination coefficients' R^2 for all the selected response functions were above 0.99. The estimated concentrations have been computed by inverting the selected response function to determine the upper and the lower β -expectation tolerance limits by considering the estimation of the mean relative bias and the intermediate precision SD for each level of VS.

Linearity.—The linearity of a method refers to the relationship between the introduced and the back-calculated concentrations of the VS (32, 33, 42). Therefore, the linearity of the method was determined by plotting a linear regression model that fitted the back-calculated validation concentrations versus the introduced concentrations. The obtained slope and intercept values were close to 1 and 0, respectively, for all compounds, which is an indication of both the absence of the proportional (matrix effect) and constant systematic errors as well as that of a coefficient of determination above 0.99. Therefore, these results demonstrated that the method presents a very good linearity.

Precision.—The precision can be evaluated at two levels: repeatability and intermediate precision. The criterion that gives information on random errors is determined by computing RSD for repeatability (intra-series) and for intermediate precision (the intra- and inter-series) at each concentration level of the VS (33). These results have been obtained by dividing the estimated SD of repeatability and intermediate precision by the mean introduced concentration. For repeatability, the maximum RSD of the method was 4.18, 5.94, 6.06, and 10.65% for BA, SA, BHA, and BHT, respectively; for intermediate

precision, the RSD of the method was 5.18, 5.94, 6.06, and 11.87% for BA, SA, BHA, and BHT, respectively.

Trueness.—The trueness, or bias, of the method provides information about systematic error and was assessed from the VS at four concentration levels. This criterion is obtained by comparing the mean of the results with a consensus or accepted value. It can be generally expressed in terms of absolute or relative bias or in a percentage recovery compared with the spiked concentration (33). The calculated recoveries at each concentration level were very good and fully acceptable for all the compounds and comprised a range of 100.7–102.6% for BA, 98.42–104.1% for SA, 102.5–103.4% for BHA, and 96.22–105.4% for BHT.

Accuracy profile.—A flexible accuracy profile approach was used as a graphical method for the total error (the sum of systematic and random errors) and was applied as an indicator tool to evaluate the accuracy of the method (33, 43). This approach was used to establish the method's reliability and determine whether the combination of precision and trueness of a given analytical method is correctly adapted to the analytical problem within a requested range included between the LLOQ and ULOQ, which are quantitatively determined with suitable precision and accuracy (30). These limits were defined graphically from the accuracy profiles displayed in Figure 4 for all the compounds by the intersection between the β -expectation tolerance limits and the acceptance limits λ . Figure 4 shows that the β -expectation tolerance limits were inside the acceptance limits settled at $\pm 30\%$ for all the compounds. Therefore, the method was considered able to provide accurate results along the complete dosing range for all the studied compounds.

Table 1. Results of the validated DLLME and HPLC-DAD method for the quantification of the studied compounds^a

Compounds	Level, $\mu\text{g/mL}$	Rec., %	Precision		LOD, $\mu\text{g/mL}$	Linearity equation (R^2)
			RSD (R) ^b , %	RSD (IP) ^c , %		
BA	0.101	101.4	3.55	4.04	0.0364	$Y = -0.05 + 1.027x$ (0.9987)
	5.05	100.7	4.18	5.15		
	10.11	102.0	2.68	2.68		
	20.22	102.6	2.16	2.31		
SA	0.101	101.4	3.05	3.70	0.0367	$Y = -0.203 + 1.04x$ (0.9975)
	5.06	99.63	5.94	5.94		
	10.10	98.42	3.95	3.95		
	20.24	104.1	1.97	2.09		
BHA	0.1	102.5	5.94	5.94	0.0348	$Y = 0.016 + 1.027x$ (0.9958)
	5.03	103.4	6.06	6.06		
	10.06	102.9	3.73	3.4		
	20.12	102.7	4.13	4.70		
BHT	0.098	105.4	10.65	11.75	0.0298	$Y = -0.075 + 1.018x$ (0.9935)
	4.91	104.6	5.32	11.87		
	9.82	96.22	4.06	5.39		
	19.64	102.4	4.43	4.63		

^a $p = 3$, $m = 4$, and $n = 3$.

^b R = Repeatability.

^c IP = Intermediate precision.

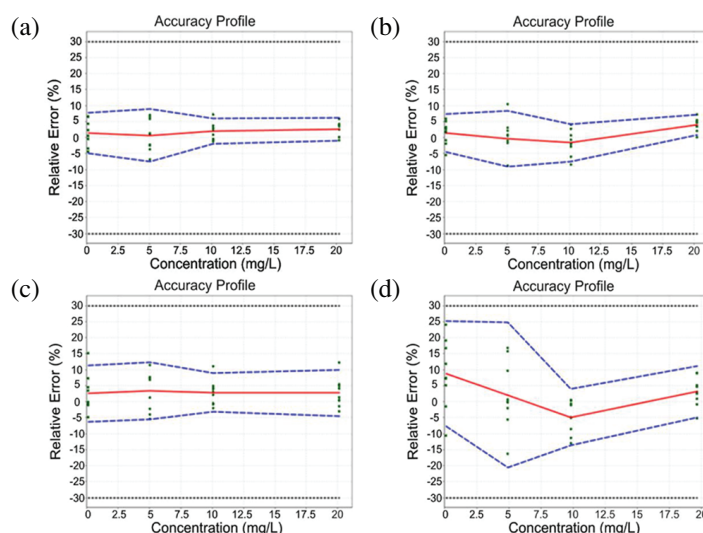


Figure 4. Schematic representation of the accuracy profiles obtained for (a) BA, (b) SA, (c) BHA, and (d) BHT. The dotted lines are the lower and upper acceptance limits set at 30%, the dashed lines are the lower and upper β -expectation tolerance limits, and the continuous line is the relative bias. Color images are available online at <http://aoac.publisher.ingentaconnect.com/content/aoac/jaoac>

Limit of detection.—The smallest values that can be detected, but not quantified accurately, are estimated to be equal to the LOD. In this work, the LODs for all the compounds were estimated using the methodology of Miller and Miller (44). This methodology is based on the computation of the $Y_{LOD} = \text{intercept} (0 \text{ if negative}) + 3 \times \text{residual SD}$ obtained by the ANOVA for each series. After that, using the selected regression model, the back-calculation will give the X_{LOD} for each series, and the mean of the different back-calculated X_{LOD} will provide the LOD of the method. Therefore, the LOD detection is close to 0.03 $\mu\text{g/mL}$ for all the compounds.

Analysis of Real Commercial Samples

Under optimum conditions, the optimized and validated method was applied to the analysis of the four food additives (i.e., BA, SA, BHA, and BHT) in 41 fruit juice samples from nine different highly consumed brands in the Algerian diet that

are available in supermarkets. Twenty-one samples (51.2%) did not indicate the studied additives in the label, whereas 20 (48.8%) indicated the presence of BA and SA. Regarding BA and SA, these additives were quantified in 25 and 20 samples, respectively (Table 2). In general, all the brands presented concentrations of these additives lower than 200 $\mu\text{g/mL}$, except brand H (O'jus, orange), which presented 216.2–250.8 $\mu\text{g/mL}$ of BA, and brand C (Ramy, orange), which presented 204.7–214.0 $\mu\text{g/mL}$ of SA. These results are not in agreement with Algerian legislation that banned the use of these food additives in fruit juices (10), yet they are in agreement with the Codex Alimentarius and the European Commission guidelines (8, 9). When compared with published data, these results are generally higher than those found, for example, by Javanmardi et al., which ranged from not detected to 95.5 $\mu\text{g/mL}$ for BA and from not detected to 13 $\mu\text{g/mL}$ for SA (35). Moreover, in the Portuguese survey performed by Diogo et al., BA and SA were not detected in fruit juices, and only soft drinks had those

Table 2. Analytical results of the occurrence of the studied compounds in real commercial samples

Brand	N^a	BA		SA		BHA		BHT	
		Label claim	Range, $\mu\text{g/mL}$	Label claim	Range, $\mu\text{g/mL}$	Label claim	Range, $\mu\text{g/mL}$	Label claim	Range, $\mu\text{g/mL}$
A	10	No	<LOD ^b	No	ND ^c	No	ND	No	ND
B	3	No	<LOD	No	ND	No	ND	No	ND
C	5	Yes	124.1–143.8	Yes	204.7–214	No	ND	No	ND
D	4	Yes	126.6–147.2	Yes	63.90–72.63	No	ND	No	ND
E	3	No	<LOD	No	<LOD	No	ND	No	ND
F	3	Yes	136.8–149.24	Yes	66.04–71.1	No	ND	No	ND
G	3	Yes	125.3–129.7	Yes	153.1–157.6	No	ND	No	ND
H	5	Yes	216.2–250.8	Yes	35.51–53.11	No	ND	No	ND
I	5	No	44.63–46.43	No	<LOD	No	ND	No	ND

^a N = Number of samples.

^b <LOD = Not quantified.

^c ND = Not detected.

additives (45). BHA and BHT were not detected in any of the analyzed samples. Biparva et al. found these compounds at concentrations of 189–539 µg/L for BHA and 80–320 µg/L for BHT in different brands of samples (36).

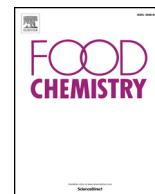
Conclusions

In this study, a simple, quick, sensitive, and economical DLLME method coupled with an HPLC-DAD was developed and optimized for the determination of BA, SA, BHA, and BHT. The two-level (2^k) full-factorial design and the CCD were efficient tools in the optimization process. The validation procedure performed according to the accuracy profile approach has shown good analytical figure of merit with good relative recoveries (96.2–105.4%) and good repeatability (1.97–10.65%) and intermediate precision (2.31–11.9%). Moreover, LODs were around 0.03 µg/mL. Therefore, this methodology is suitable for the determination of these food additives in fruit juices. BHA and BHT were not detected in any of the analyzed samples of fruit juices from the Algerian market, which is in agreement with the national legislation. However, almost half of the samples presented quantified amounts of BA and SA. Although the concentrations of these compounds were always below the limits recommended by the Codex Alimentarius and generally in agreement with EU legislation, there is a need to ensure compliance with food additives national legislation, and the proposed methodology is an appropriate tool to achieve this goal.

References

- Rúa, J., Fernández-Álvarez, L., de Castro, C., del Valle, P., de Arriaga, D., & García-Armesto, M.R. (2011) *Foodborne Pathog. Dis.* **8**, 149–157. doi:10.1089/fpd.2010.0659
- Gutiérrez-Larraínzar, M., Rúa, J., de Arriaga, D., del Valle, P., & García-Armesto, M.R. (2013) *Food Control* **30**, 393–399. doi:10.1016/j.foodcont.2012.07.047
- Zengin, N., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz, S., & Aksoy, H. (2011) *Food Chem. Toxicol.* **49**, 763–769. doi:10.1016/j.fct.2010.11.040
- del Olmo, A., Calzada, J., & Nuñez, M. (2015) *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **57**, 3084–3103. doi:10.1080/10408398.2015.1087964
- Mamur, S., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., & Aksoy, H. (2012) *Cytotechnology* **64**, 553–562. doi:10.1007/s10616-012-9434-5
- Ito, N., Fukushima, S., & Tsuda, H. (1985) *Crit. Rev. Toxicol.* **15**, 109–150. doi:10.3109/10408448509029322
- Williams, G.M., Wang, C.X., & Iatropoulos, M.J. (1990) *Food Chem. Toxicol.* **28**, 799–806. doi:10.1016/0278-6915(90)90052-0
- CODEX (1995) Codex General Standard for Food Additives, Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization Food Standards Program, Rome, Italy, STAN 192–1995
- Commission Regulation No. 1129/2011/EU (2011) *Off. J. Eur. Union* **L295**, 148–149
- Décret Exécutif N°12-214 (2012) *Fixant les Conditions et les Modalités D'utilisation des Additifs Alimentaires Dans les Denrées Alimentaires Destinées à la Consommation Humaine. J. Off.* **30**, 16
- Ferreira, I.M.P.L.V.O., Mendes, E., Brito, P., & Ferreira, M.A. (2000) *Food Res. Int.* **33**, 113–117. doi:10.1016/S0963-9969(00)00014-4
- Mota, F.J.M., Ferreira, I.M.P.L.V.O., Cunha, S.C., Beatriz, M., & Oliveira, P.P. (2003) *Food Chem.* **82**, 469–473. doi:10.1016/S0308-8146(03)00116-X
- Saad, B., Bari, M.F., Saleh, M.I., Ahmad, K., & Talib, M.K. (2005) *J. Chromatogr. A* **1073**, 393–397. doi:10.1016/j.chroma.2004.10.105
- Wen, Y., Wang, Y., & Feng, Y.Q. (2007) *Anal. Bioanal. Chem.* **388**, 1779–1787. doi:10.1007/s00216-007-1395-8
- Akkbik, M., Bin Assim, Z., & Ahmad, F.B. (2011) *Int. J. Anal. Chem.* **2011**, 1–9. doi:10.1155/2011/858153
- Galimany-Rovira, F., Pérez-Lozano, P., García-Montoya, E., Miñarro-Carmona, M., Ticó-Grau, J.R., & Suñé-Negre, J.M. (2017) *J. AOAC Int.* **100**, 1–7. doi:10.5740/jaoacint.16-0104
- Ochiai, N., Sasamoto, K., Takino, M., Yamashita, S., Daishima, S., Heiden, A.C., & Hoffmann, A. (2002) *Anal. Bioanal. Chem.* **373**, 56–63. doi:10.1007/s00216-002-1257-3
- Wang, L., Zhang, X., Wang, Y., & Wang, W. (2006) *Anal. Chim. Acta* **577**, 62–67. doi:10.1016/j.aca.2006.06.030
- Ding, M., & Zou, J. (2012) *Food Chem.* **131**, 1051–1055. doi:10.1016/j.foodchem.2011.09.100
- Alvarez-Rivera, G., Vila, M., Lores, M., Garcia-Jares, C., & Llompart, M. (2014) *J. Chromatogr. A* **1339**, 13–25. doi:10.1016/j.chroma.2014.02.075
- Cacho, J.I., Campillo, N., Viñas, P., & Hernández-Córdoba, M. (2015) *Food Addit. Contam., Part A* **32**, 665–673. doi:10.1080/19440049.2015.1011715
- Liu, F.J., Ding, G.S., & Tang, A.N. (2014) *Food Chem.* **145**, 109–114. doi:10.1016/j.foodchem.2013.08.035
- Guan, Y., Chu, Q., Fu, L., & Ye, J. (2005) *J. Chromatogr. A* **1074**, 201–204. doi:10.1016/j.chroma.2005.03.063
- Ding, X.J., Xie, N., Zhao, S., Wu, Y.C., Li, J., & Wang, Z. (2015) *Food Chem.* **181**, 207–214. doi:10.1016/j.foodchem.2015.02.060
- Yoshikawa, K., Saito, S., & Sakuragawa, A. (2011) *Food Chem.* **127**, 1385–1390. doi:10.1016/j.foodchem.2011.01.126
- Dong, C., Mei, Y., & Chen, L. (2006) *J. Chromatogr. A* **1117**, 109–114. doi:10.1016/j.chroma.2006.04.006
- Asensio-Ramos, M., Ravelo-Pérez, L.M., González-Curbelo, M.Á., & Hernández-Borges, J. (2011) *J. Chromatogr. A* **1218**, 7415–7437. doi:10.1016/j.chroma.2011.05.096
- Rezaee, M., Assadi, Y., Milani Hosseini, M.R., Aghaee, E., Ahmadi, F., & Berijani, S. (2006) *J. Chromatogr. A* **1116**, 1–9. doi:10.1016/j.chroma.2006.03.007
- Kocúrová, L., Balogh, I.S., Šandrejová, J., & Andruch, V. (2012) *Microchem. J.* **102**, 11–17. doi:10.1016/j.microc.2011.12.002
- Rozet, E., Ceccato, A., Hubert, C., Ziemons, E., Oprean, R., Rudaz, S., Boulanger, B., & Hubert, P. (2007) *J. Chromatogr. A* **1158**, 111–125. doi:10.1016/j.chroma.2007.03.111
- Hubert, P., Nguyen-Huu, J.J., Boulanger, B., Chapuzet, E., Chiap, P., Cohen, N., Compagnon, P.A., Dewé, W., Feinberg, M., Lallier, M., Laurentie, M., Mercier, N., Muzard, G., Nivet, C., & Valat, L. (2004) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **36**, 579–586. doi:10.1016/j.jpba.2004.07.027
- Hubert, P., Nguyen-Huu, J.J., Boulanger, B., Chapuzet, E., Chiap, P., Cohen, N., Compagnon, P.A., Dewé, W., Feinberg, M., Lallier, M., Laurentie, M., Mercier, N., Muzard, G., Nivet, C., Valat, L., & Rozet, E. (2007) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **45**, 70–81. doi:10.1016/j.jpba.2007.06.013
- Hubert, P., Nguyen-Huu, J.J., Boulanger, B., Chapuzet, E., Cohen, N., Compagnon, P.A., Dewé, W., Feinberg, M., Laurentie, M., Mercier, N., Muzard, G., Valat, L., & Rozet, E. (2007) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **45**, 82–96. doi:10.1016/j.jpba.2007.06.032
- Kokya, T.A., Farhadi, K., & AliMohammad Kalhori, A. (2012) *Food Anal. Methods* **5**, 351–358. doi:10.1007/s12161-011-9245-x
- Javanmardi, F., Arefhosseini, S.R., Ansarin, M., & Nemati, M. (2015) *J. AOAC Int.* **98**, 962–970. doi:10.5740/jaoacint.14-260

- (36) Biparva, P., Ehsani, M., & Hadjmohammadi, M.R. (2012) *J. Food Compost. Anal.* **27**, 87–94. doi:10.1016/j.jfca.2012.04.002
- (37) Feinberg, M., San-Redon, J., & Assié, A. (2009) *J. Chromatogr. B* **877**, 2388–2395. doi:10.1016/j.jchromb.2008.10.004
- (38) Chevallier, E., Chekri, R., Zinck, J., Guérin, T., & Noël, L. (2015) *J. Food Compost. Anal.* **41**, 35–41. doi:10.1016/j.jfca.2014.12.024
- (39) Delosière, M., Santé-Lhoutellier, V., Chantelauze, C., Durand, D., Thomas, A., Joly, C., Pujos-Guillot, E., Rémond, D., Comte, B., Gladine, C., Guy, A., Durand, T., Laurentie, M., & Dufour, C. (2016) *Food Funct.* **7**, 3497–3504. doi:10.1039/c6fo00413j
- (40) Saraji, M., & Boroujeni, M.K. (2014) *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 2027–2066. doi:10.1007/s00216-013-7467-z
- (41) Herrera Herrera, A.V., Asensio Ramos, M., Hernandez Borges, J., & Rodriguez Delgado, M.A. (2010) *TrAC, Trends Anal. Chem.* **29**, 728–751. doi:10.1016/j.trac.2010.03.016
- (42) Feinberg, M. (2007) *J. Chromatogr. A* **1158**, 174–183. doi:10.1016/j.chroma.2007.02.021
- (43) Rozet, E., Hubert, C., Ceccato, A., Dewé, W., Ziemons, E., Moonen, F., Michail, K., Wintersteiger, R., Streeel, B., Boulanger, B., & Hubert, P. (2007) *J. Chromatogr. A* **1158**, 126–137. doi:10.1016/j.chroma.2007.03.102
- (44) Miller, J.C., & Miller, J.N. (1993) *Statistics for Analytical Chemistry*, Ellis Horwood PTR Prentice, New York, NY
- (45) Diogo, J.S.G., Silva, L.S.O., Pena, A., & Lino, C.M. (2013) *Food Chem. Toxicol.* **62**, 548–553. doi:10.1016/j.fct.2013.09.006



Simultaneous extraction and analysis of preservatives and artificial sweeteners in juices by salting out liquid-liquid extraction method prior to ultra-high performance liquid chromatography



Abderrahmane Tighrine^{a,b}, Youcef Amir^a, Pilar Alfaro^b, Marzouk Mamou^c, Cristina Nerín^{b,*}

^a Mouloud Mammeri University of Tizi Ouzou, Faculty of Biological and Agronomic Sciences, Laboratory of Quality and Food Safety (LQFS), 15000 Tizi Ouzou, Algeria

^b University of Zaragoza, Campus Río Ebro, María de Luna, Department of Analytical Chemistry, EINA, 3, 50018 Zaragoza, Spain

^c Mouloud Mammeri University of Tizi Ouzou, Laboratory of Analytical Chemistry, Faculty of Medicine, 15000 Tizi Ouzou, Algeria

ARTICLE INFO

Chemical compounds studied in this work:

Potassium acesulfame (PubChem CID: 11074431)
Sodium saccharin (PubChem CID: 23696271)
Aspartame (PubChem CID: 134601)
Sodium benzoate (PubChem CID: 517055)
Potassium sorbate (PubChem CID: 23676745)

Keywords:

Food additives
Salting out liquid-liquid extraction
RP-UPLC
Accuracy profile
Juices

ABSTRACT

A novel and fast salting out liquid-liquid extraction method was developed for simultaneous determination of food additives with different polarities in juices. Chromatographic separation was achieved in less than 6 min using Acquity UPLC BEH C 18 (100 mm × 2.1 mm d.i. × 1.7 μm) column with ammonium acetate with 0.01% of trifluoroacetic acid as eluent A and acetonitrile as eluent B at a flow rate of 0.2 mL min⁻¹. The main factors affecting the extraction efficiency were optimized. The method was validated applying accuracy profile based on total error. The extraction recoveries ranged from 84.97 to 122%. Relative standard deviation ranged from 1.24 to 7.99% for intraday assay and from 1.69 to 9.16% for intermediate precision. The limits of detection for five food additives were from 0.3 to 1.42 μg mL⁻¹. The method was successfully applied to 47 samples of juices from nine brands.

1. Introduction

Food additives include preservatives such as benzoic acid, sorbic acid and their salts which are added to foods to inhibit bacterial and fungal growth in order to improve food shelf life (Boyce, 1999). Sweeteners such as, acesulfame, saccharin and aspartame are synthetic, non-metabolized, non-nutritive and non-caloric dietetic sweeteners with sweetness hundreds of times stronger than that of sugars. They are widely used in food industries to improve the sweet taste and to replace sugars in foods for reducing caloric intake, as well as for diabetics for whom sugar restriction is recommended (Bergamo, Da Silva, & De Jesus, 2011).

Current national, international legislation and safety agencies of different countries regulate the additives and their maximum amount or limit that can be added to food. As stated by Algerian food additives legislation, sweeteners are authorized in juices and nectars or concentrated fruit nectars at concentration of 350, 600 and 80 μg mL⁻¹ for acesulfame, aspartame and saccharin, respectively. However, benzoic and sorbic acids are forbidden (Ministère du commerce Algérien, décret

exécutif n°12-214, 2012). Joint FAO/MOS Expert Committee on Food Additives (JECFA) have set the acceptable daily intake (ADI) of these compounds at the range 0–15, 0–5, 0–40, 0–5 and 0–25 mg kg⁻¹ for acesulfame, saccharin, aspartame, benzoic acid and sorbic acid, respectively (WHO, 1999). Otherwise, potential and harmful risks to human health can raise when these compounds are added at high amount to food. Some studies suggested that very high intake of benzoic acid or its salts could cause adverse health effects such as metabolic acidosis, hyperpnoea and convulsions (WHO, 1997). In sensitive persons, even consumed at concentration lower than 5 mg/kg of body weight per day, benzoic acid can cause non-immunological contact reactions (WHO, 2000). It has been proved that benzoic acid in products with high content of ascorbic acid together with transition-metal catalyst, reacts and produce benzene considered as carcinogenic agent (Cakir & Cagri-Mehetoglu, 2013).

According to EFSA CEF Panel (2011), after oral intake, benzoates are rapidly and fully absorbed by the gastrointestinal tract, metabolized primarily in the liver, and excreted in the urine as glycine conjugates of benzoic acid derivatives, mainly as hippuric acid. Sorbic acid is

* Corresponding author.

E-mail address: cnarin@unizar.es (C. Nerín).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.107>

Received 4 July 2018; Received in revised form 16 October 2018; Accepted 22 October 2018

Available online 02 November 2018

0308-8146/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

harmless and it is absorbed and mainly excreted or expired as carbon dioxide (WHO, 1974). According to JECFA (WHO, 1993), saccharin is not metabolized and it is suspected to induce bladder cancer in male rat, which is not relevant to human. Pharmacokinetic studies show that acesulfame is completely absorbed, not metabolized and rapidly excreted unchanged and no adverse effects are associated to acesulfame (WHO, 1991). Aspartame is metabolized in the body into aspartic acid, phenylalanine and methanol and high level of phenylalanine in plasma is known to cause developmental toxicity in humans to individuals with inherited metabolic disorder called phenylketonuria (EFSA ANS Panel, 2013). Moreover, as stated by Swithers-Susan (2013), other harmful effects can be associated to artificial sweeteners with negative health outcomes such as risk of weight gain, metabolic syndrome, type 2 diabetes, hypertension and cardiovascular disease. Therefore, the use of preservatives and artificial sweeteners in foodstuffs must be monitored.

Recently, several analytical methods were employed for separation and quantification of food additives. High or ultra-high performance liquid chromatography (HPLC or UPLC) coupled to ultraviolet detector (Diogo, Silva, Pena, & Lino, 2013; Lino and Pena, 2010), diode array detector (DAD) (Dias, Meinhart, Pane, Ballus, & Godoy, 2015) have been proposed. In addition, tandem mass spectrometry (MSn) (Chang & Yeh, 2014) were the main used techniques. Other techniques were also used and include spectrophotometry UV with PLS-2 method (Cantarelli, Pellerano, Marchevsky, & Camina, 2009), capillary electrophoresis (CE) with capacitively coupled contactless conductivity detection (CE-C⁴D) (Bergamo et al., 2011) and micellar electrokinetic chromatography (MEKC) coupled to UV and DAD (Boyce, 1999).

Sample pretreatment and cleanup is a mandatory step in food samples in order to remove the matrix interference prior to the chromatographic determination. Various sample preparation and simultaneous extraction of these five compounds have been reported in literature such as, centrifugation, microfiltration and dilution (Diogo et al., 2013; Lino and Pena, 2010). Nevertheless, the importance of these techniques cannot be underestimated, as not all errors that occur in this step can be corrected, even by the best separation or detection method (Szultka, Pomastowski, Railean- Plugaru, & Buszewski, 2014). Microextraction method such as dispersive solid-phase extraction (dSPE) using ethylenediamine or tetraethylnepentamine functionalized Fe₃O₄ magnetic polymer (TEPA MP) and (IEPA MP) were developed (Chen, Zhao, Shen, & Jin, 2012; Zhao et al., 2013). These last extraction techniques are tedious, time consuming and expensive, because of the preparation and the synthesis of the TEPA MP and IEPA MP, which use expensive reagents, and their characterization with transmission electron microscopy, which cannot be available in every laboratory. Moreover, these techniques are used to remove natural pigments, organic acids and sugars from the matrix, where a limiting factor can be the sorption of the analytes on these compounds, and thus, the low recoveries.

Non-polar water-immiscible organic solvents used in liquid phase microextraction (LPME) have low dielectric constant and they are relatively poor for extraction of polar compounds. More-polar water-miscible solvents such as acetone, acetonitrile, ethanol and isopropanol, that provide solubility for polar to non-polar compounds, cannot be used for conventional liquid-liquid extraction (LLE) or LLME method. However, if the solvent is generated *in situ* in the aqueous solution and a phase separation further occurs, two-phase system is obtained upon the addition of an appropriate quantity of an electrolyte, such as a salt, that decrease the miscibility of two mixed liquids (Tabata, Kumamoto, & Nishimoto, 1996). Then, the analytes can move selectively from the aqueous phase into the polar organic phase. This process is called salting out and it is applied in salting out liquid-liquid extraction (SALLE) or extraction by demixture (Nerín, Polo, Salafranca, & Cacho, 1996). Recently, this technique was applied as a simple, fast, economical, green and benign extraction/cleanup method for the preparation of various samples and extraction of different compounds such as mycotoxins, antibiotics, pesticides, drugs, polyphenolic compounds

and metals from different matrices such as water, biological fluids and food (Magiera & Kwietniowska, 2016).

The objective of this study is the optimization and validation of fast and efficient salting out liquid-liquid extraction (SALLE), coupled to UPLC-UV, for the simultaneous extraction and determination of food additives with different polarities from the same aliquot of sample. Univariate optimization method was used to optimize the main and effective parameters affecting the extraction, to enhance the efficiency of the method. The optimized method was validated using accuracy profile and applied to the analysis of 47 samples of juices to check if these five additives (acesulfame, saccharin, aspartame, benzoic and sorbic acids) were legally used and within the maximum permitted levels.

To our knowledge, there are no literature describing the simultaneous extraction and analysis of sweeteners and preservatives with the application of SALLE method. The results based on the application of this method show that the method is simple, exhibits excellent applicability, rapid, cheap, environmentally friendly, and very suitable for extraction of food additives with different polarities. As in SALLE method the extraction solvent is generated *in situ*, handling of extraction and enrichment factors can be very high, and the complexity of the extraction is considerably reduced.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Potassium acesulfame ($\geq 99\%$), sodium saccharin ($\geq 99\%$), and aspartame ($\geq 99\%$), Sodium benzoate ($\geq 99\%$) and sorbate potassium ($\geq 99\%$) were obtained from (Sigma Aldrich, Germany). Acetonitrile, acetone, anhydrous ethanol, isopropanol, methanol (HPLC or LC MS grade), hydrochloric acid (HCl, 37%), sodium chloride (NaCl, ≥ 99.5) and sodium sulphate (Na₂SO₄, $\geq 99\%$) were obtained from (Scharlau, Spain). Ultrapure water used for samples preparation through the work was purified from Millipore system (Milli-Q plus 185). Ammonium acetate (CH₃COONH₄, $\geq 98\%$), magnesium sulphate heptahydrate (Mg SO₄ 7 H₂O) and ammonium chloride (NH₄Cl, $\geq 99.8\%$) were obtained from (Merck, Germany). Ammonium sulphate ((NH₄)₂ SO₄, 99%) was purchased from (Pancreac Appli Chem Barcelona, Spain) and Trifluoroacetic acid (TFA, 99%) was purchased from (Fluka, Switzerland). Flow of N₂ (ALPHAGAZI, 99.999% Global purity, Air Liquide Zaragoza-Spain) was used for the evaporation of extraction solvent.

2.2. Preparation of standards

Stock solutions of each compounds were prepared at concentration of 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in ultrapure water for acesulfame, saccharin, sodium benzoate and potassium sorbate and in mixture of water: methanol (50: 50 v/v) for aspartame.

2.3. Procedure of method validation

According to the guidelines of the “French Society of Pharmaceutical Sciences and Techniques” (SFSTP) for the validation of the analytical method using accuracy profile methodology requires two different standard solutions namely calibration standards (CSs) prepared without matrix and validation standards (VSs) or quality control samples (QC) prepared with the presence of the matrix. In this work, modified validation experimental protocol V2 with the addition of two levels to CSs and VSs was used. Therefore, three series of five working solutions with two replicates for CSs and three replicates for VSs were prepared each day.

This approach is based on β expectation tolerance interval that summarizes in a single graph the total error measurement for the sum of the bias and standard deviation of intermediate precision (Hubert,

Nguyen-Huu, Boulanger, Chapuzet, Chiap et al., 2007; Hubert, Nguyen-Huu, Boulanger, Chapuzet, Cohen et al., 2007). A procedure can be qualified as acceptable and gives accurate results if the difference between every recovered concentration (x) of a sample and its true concentration is inside the acceptance limits $\pm \lambda$ settled by the analyst

Different validation criteria as response function, trueness, precision, accuracy, linearity, lower and upper limit of quantification (LLOQ, ULOQ) and limit of detection (LOD) were used in order to validate the method.

2.4. Optimization of RP-UPLC conditions

Ultrahigh performance liquid chromatography analysis was performed on an Acquity UPLC BEH C 18 (100 mm \times 2.1 mm d.i. \times 1.7 μ m) analytical column coupled to Acquity UPLC BEH C 18 1.7 μ m guard column. Analytes separation performed with gradient elution using ammonium acetate buffer 2.5 mmol L⁻¹ acidified with trifluoroacetic acid at 0.01% (v/v) as eluent A and acetonitrile as eluent B. The separation was achieved with optimized gradient as follows: 7% B (0–2 min), 35% (3 min), 10% (4 min), 10% (4.01 min) and 7% (5.5 min) at flow rate of 0.2 mL min⁻¹. In order to clean the column, 100% of B was used for 1.5 min, then 7% of B for 2 min to re-equilibrate and come back to initial condition. The column temperature was kept at 40 °C and the injection volume was 10 μ L. All the analytes were monitored and detected at wavelength of 210 nm and were eluted in less than 6 min in the order: acesulfame, saccharin, aspartame, benzoic and sorbic acids.

2.5. Collection of the samples and extraction method

Forty-seven juice beverages products from nine different brands were collected from different supermarkets area in Tizi Ouzou city (North of Algeria). All the samples were stored under refrigeration conditions (4 °C) until analysis.

The samples were centrifuged twice, 20 min at 4000 RPM each time, and then diluted 20 times to reduce matrix effect, adjusting the pH to 3 with HCl solution (0.7 M, v/v).

For SALLE method, 3 mL of the prepared sample or mixture of standards were placed in 15 mL screw capped polyethylene test tube containing 1.7 g of ammonium sulphate and the mixture was shaken until the complete dissolution of salt. After that, 0.5 mL of the mixture acetone: ethanol (50: 50 v/v) was added using 1 mL micropipette. The mixture was vortexed for 1 min at 3000 RPM then centrifuged for 12 min at 4000 RPM to induce the phase separation. The upper phase was carefully recovered, transferred to 2 mL vial and evaporated under a gentle nitrogen stream at 60 °C to eliminate the organic solvent. To avoid peak overlap, the residue was reconstituted with 1.5 mL of buffer solution of mobile phase, shaken in vortex for 2 min, and injected into UPLC-UV for analysis.

2.6. Data analysis

All the statistical analysis were calculated using the back-predictor and E-noval V3.0 softwares (arlenda, Liège, Belgium).

3. Results and discussion

3.1. Optimization of the method

Fruit juices are complex matrices containing sugars, and fibers among other compounds at low concentration such as proteins. For this reason, sample pretreatment and cleanup is a mandatory step in order to isolate the compounds of interest. In this work, different compounds with different polarities as amino and carboxylic groups were the target. Hence, the simultaneous extraction of these compounds with water-immiscible organic solvents is not an easy task. The low dielectric

constants of these solvents and the polar nature of these compounds, which are slightly or very slightly soluble in immiscible water solvent, make the extraction of the mentioned compounds quite poor, mainly for saccharin, aspartame and acesulfame. However, all these compounds are soluble in water miscible solvents with high dielectric constant i.e. ethanol, acetone, acetonitrile and isopropanol. Hence, SALLE using these water miscible solvents was selected for simultaneous extraction of these compounds. These solvents can dissolve in water in any proportion because of “hydrogen bond” interaction. The presence and the increasing amount of ammonium sulphate in aqueous solution, containing ethanol and acetone, leads to the migration of water molecules away from ethanol and acetone molecules to ions of salts and the mass fraction of acetone and ethanol increases in the upper phase (Wang, Yan, Hu, Han, & Xu, 2010). Therefore, at saturated concentration of the ammonium sulphate two phases are formed *in situ*.

For this purpose, 3 mL of ultrapure water spiked with standards at concentration of 20 μ g mL⁻¹ for acesulfame, aspartame, benzoic and sorbic acids and at 4 μ g mL⁻¹ for saccharin was used for method optimization using univariate optimization method, by varying one factor while keeping all the other factors at constant level. The main factors affecting the extraction efficiency measured as the chromatographic peak area were the nature and the volume of the extraction solvent, the amount of salt and the pH of sample. All the results are the average of triplicate measurements. Optimization of factors influencing the extraction method is discussed below in detail and the optimized results were 0.5 mL for the mixture of ethanol: acetone at (50: 50 v/v) as extraction solvent, 1.7 g/3 mL of ammonium sulphate used as salting out agent and pH 3.

3.1.1. Selection of extraction solvent type and volume

Selection of extraction solvent is an important consideration and crucial step to control the efficiency of SALLE process. This solvent must be polar, miscible with water in all proportions, with high capability to dissolve the analytes and easily separable from water by adding an electrolyte as salt. The saturated concentration of the salts in the presence of different solvents is different for each compound. Therefore, different tests were performed to determine the saturated concentration of ammonium sulphate in water with achieving a salting out effect in the presence of the tested extraction solvents i.e. (acetone, ethanol, acetonitrile and 2-propanol). These amounts were found and ranged from 1.7 to 2.05 g. In order to select the most appropriate organic solvent, 1 mL of each solvent was tested in the mixture of 3 mL of sample and different ammonium sulphate amounts. The results are shown in Fig. 1A. As can be seen, the maximum responses were obtained with ethanol for acesulfame, saccharin and aspartame and with acetone for benzoic and sorbic acids. Therefore, the mixtures of both ethanol and acetone at different ratios of (50:50; 75:25 and 25:75 v/v) were tested. As shown in Fig. 1B, the sum of peak areas was identical. However, the ratio (50:50, v/v) gave the best results for saccharin used at very small concentration in juices products. Therefore, the binary mixture of ethanol: acetone at (50:50 v/v) was used as suitable extraction solvent.

The volume of extraction solvent was studied at 0.5, 0.8, 1.1, 1.4, 1.6 and 2 mL. The results illustrated in Fig. 1C show that as the volume of extraction solvent increases the sum of peak areas for all the compounds decreases and the results are higher for 0.5 mL of extraction solvent. This is because when increasing the volume of extraction solvent, the amount of analytes transferred increases too and more food additives are extracted from the aqueous phase. However, the dilution effect reduces the analyte concentration with high extraction solvent volume. Therefore, 0.5 mL was selected as the optimum volume for the extraction.

3.1.2. Selection the type and the amount of salt

As it is known the salting out for phase separation between organic extraction solvent and the aqueous solution varies with the type of salt

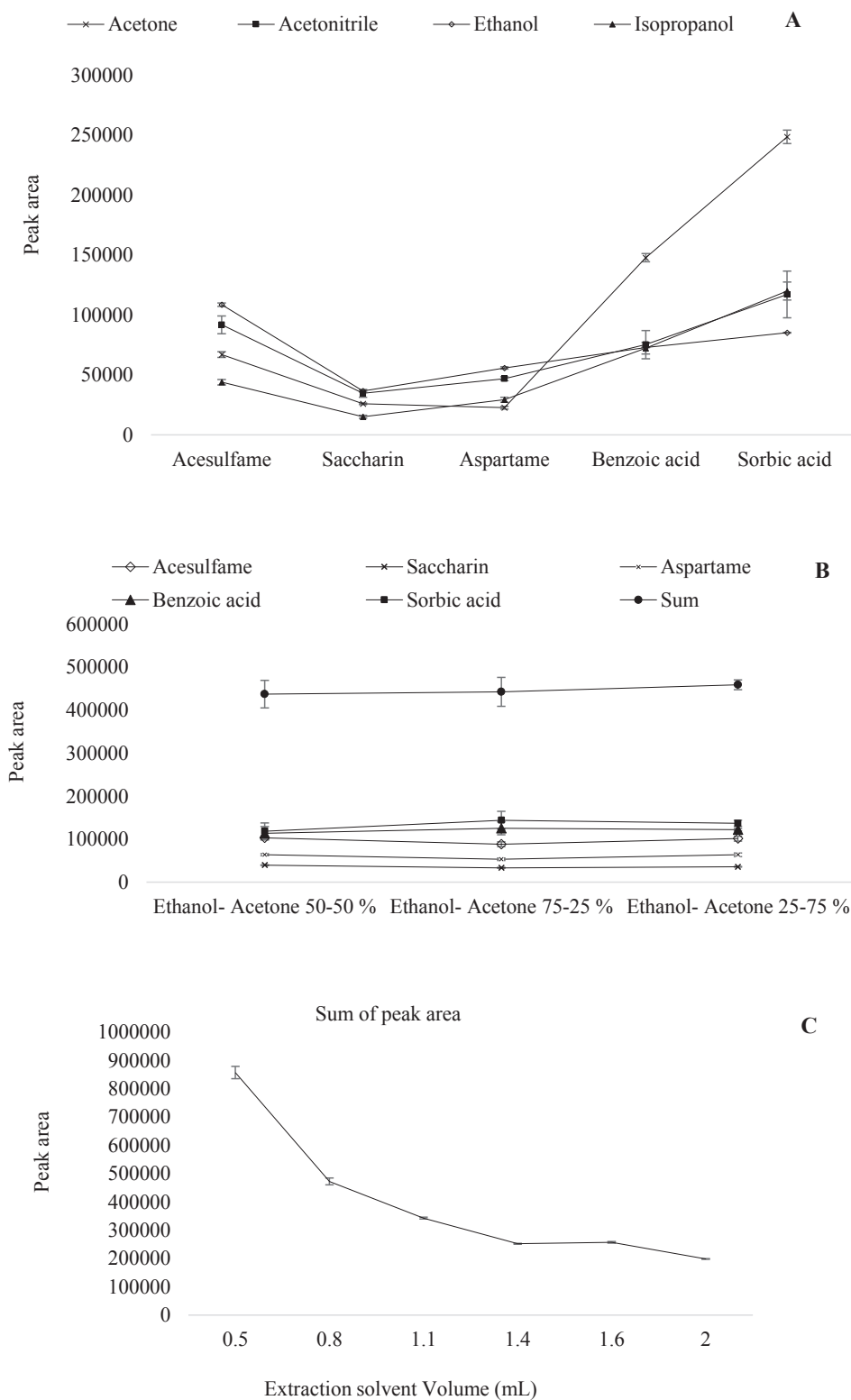


Fig. 1. Influence of (A) Extraction solvent type, (B) Ratio of acetone and ethanol and (C) Volume of extraction solvent on SALLE efficiency. Extraction conditions: (A) extraction solvent volume, 1 mL; ammonium sulphate amount, 1.7–2.05 g, 1.7–2.05 g/3 mL and pH, 2; (B) extraction solvent volume, 1 mL; salt concentration, 1.7 g/3 mL and pH, 2; (C); Extraction solvent, ethanol: acetone (50, 50 v/v); salt concentration, 1.7 g/3 mL and pH, 2.

added. Therefore, different organic and inorganic salting out agents other than ammonium sulphate were checked at their saturated concentration of 1.08, 3.7, 1.42 and 1.15 g for sodium chloride, magnesium sulphate heptahydrate, sodium sulphate and ammonium chloride, respectively. The results showed that the best two-phase separation was

obtained for ammonium sulphate. For sodium and ammonium chloride, two phases were not obtained. This is probably due to the presence of methanol in the sample used for the preparation of aspartame. Moreover, these salts have low salting out effect because these salts are with monovalent anion and cation (Lu et al., 2013). For magnesium

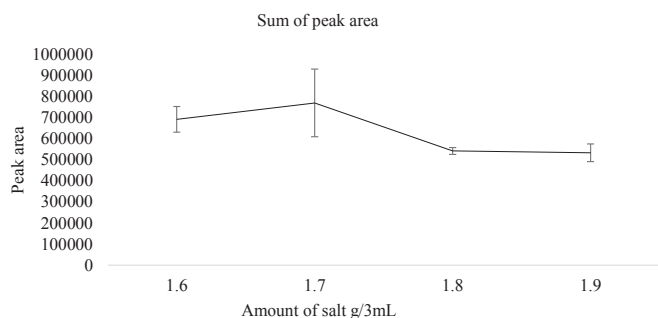


Fig. 2. Influence of salt amount for SALLE efficiency. Extraction conditions: Extraction solvent, ethanol: acetone (50, 50 v/v); Solvent volume, 0.5 mL and pH, 2.

sulphate heptahydrate, the two phases were not clearly separated. In the case of sodium sulphate, an important salting out effect was observed mixture of extraction solvent and water was released. This is probably due to the transference of the aqueous phase into the organic solvent. Therefore, ammonium sulphate that gave the best two-phases separation was selected for the rest of the work.

The ionic strength also influences the solubility of the analytes in the sample solution. Therefore, the effect of the concentration of salt on the extraction efficiency was studied with addition of different ammonium sulphate amount, ranging from 1.6 to 1.9 g/3 mL. As shows Fig. 2, when the concentration of salt increases from 1.6 to 1.7 g, the response for the sum of peak areas increases too. This can be explained by the hydration theory, as when the concentration of salt ions in water increases, more water molecules form preferentially hydration sphere around the salt ions, and fewer water molecules are available to hydrate the organic compounds (Kokosa, Przyjazny, & Jeannot, 2009). This is explained by the difference in the acting force between an “ion-water” and an “alcohol-water” pair, leading to separation of organic phase rich in analytes (Wang et al., 2010). However, the response for the sum of peak areas decreases when the amount of salt is added at high concentrations of 1.8 and 1.9 g. This can be explained by the increase of viscosity of the aqueous solution, which result in a difficult mass transfer.

3.1.3. Selection the pH of sample

The pH of the sample is a significant factor affecting the extraction efficiency and the transfer of the analytes to the organic phase. To improve the extraction efficiency, the pH of sample should be modified to suppress the ionization of any acidic or basic analytes, considering the pKa of the studied compounds acesulfame (pKa = 2), saccharin (pKa = 2), aspartame (pKa = 3.1, 7.9) benzoic acid (pKa = 4.19) and sorbic acid (pKa = 4.76). At high pH the ionizing abilities for the amino and carboxylic groups of these food additives is very high. The basic compounds will be as neutral molecules, extracted by the organic solvent, and can interfere with the studied compounds. To avoid this drawback, the pH was studied in the range from 1 to 4. As stated by Wang et al. (2010) at lower pH values, higher volume of organic phase is released. Therefore, the dilution effect of extracted compounds will be important. Indeed, the results from Fig. 3 show that the satisfactory extraction efficiency was obtained at high pH of 3 and 4. However, RSD % from triplicate assay are from 0.95 to 6.85% with an average of 3.11% at pH 3 and are from 3.86 to 7.39% with an average of 6.40% for all the compounds. Thus, the results are better for pH 3, which was selected as optimum for subsequent tests.

3.2. Validation of the method

In method validation, usually the linearity of the calibration curve obtained using the simple least squares regression model, $y = ax + b$, is the first parameter to be checked using correlation coefficient (R^2). If

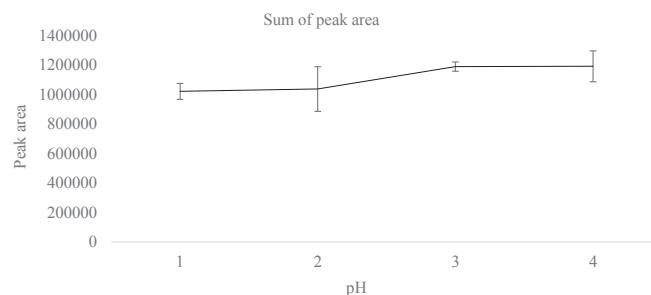


Fig. 3. Influence of pH on SALLE efficiency. Extraction conditions: Extraction solvent, ethanol: acetone (50, 50 v/v); Solvent volume, 0.5 mL; salt amount, 1.7 g/3 mL.

this parameter is ≥ 0.99 , the simple regression model is considered suitable to predict the unknown amount in the sample. However, it was demonstrated that a simple regression model with a correlation coefficient ≥ 0.99 could not be a reliable indicator of linearity (Shewiyo et al., 2012) and it cannot be suitable due to the possible presence of significant lack of fit (Araujo, 2009; Sonnergaard, 2006).

Using SFSTP 2006 guidelines for alternative approach of the accuracy profile validation, different linear and nonlinear response functions (linear and quadratic with logarithm, square root, weighted $1/x$ and $1/x^2$ transformation) describing the relationship between quantity (x) and response (y) are tested using CSs data (Hubert, Nguyen-Huu, Boulanger, Chapuzet, Chiap et al., 2007; Hubert, Nguyen-Huu, Boulanger, Chapuzet, Cohen et al., 2007). The response functions were tested and the best one for which the β expectation tolerance intervals included in the settled limits were selected. Based on the accuracy profile results, several acceptable response functions were obtained for each compound. However, linear regression after logarithm transformation was selected as the simplest one and applied as regression model for all the studied compounds.

The precision of the method evaluated at each level of VSs provides information regarding the random error describing the degree of which data generated from replicate measurements differ from one to another. It was evaluated at two levels of repeatability (intra assay precision) and intermediate precision (inter day precision) by measuring the relative standard deviation. The results are shown in Table 1. The RSD % values obtained were very good and they ranged from 1.24 to 7.99% for repeatability and from 1.69 to 9.16% for intermediate precision.

The trueness of the method measured at each concentration level express the difference between the obtained analytical value and the true value accepted as reference. It can be estimated in absolute or relative bias or in term of absolute or relative recovery. In solvent extraction method, relative recovery defined as the ratio of the back-calculated concentrations found in the investigated matrix to those in distilled or deionized water is generally used. The results show that the relative bias is good and ranged between 1.19 and 22.05%. Moreover, the obtained recoveries are satisfactory and ranged from 84.97 and 122% for all the compounds.

The linearity of the method was evaluated and determined by fitted linear regression curve obtained by plotting back calculated concentrations of validation standards versus theoretical or introduced concentration and applying the best selected model for each compound. All the regression fitted well with minimal coefficients R^2 value ≥ 0.99 , showing the good linearity of the results generated by the SALLE-UPLC-UV method.

Accuracy express the closeness of agreement between the test results and the accepted reference or conventionally true value. The total error is taken into account, which is the sum of trueness (systematic error) represented by the relative bias (%) and precision (random errors) represented by the lower tolerance limit (LTL) and the upper tolerance limit (UTL). The accuracy profiles given in Fig. 4 show that 80% of the β expectation tolerances limits for all compounds are inside

Table 1Results of analytical performances of SALLSE- UPLC-UV method for the quantification of the five food additives in juice sample ($p = 3$, $m = 5$ and $n = 3$).

Compounds	Level $\mu\text{g mL}^{-1}$	Trueness	Precision		LOD	LOQ	R^2
		Recovery %	RSD (R) %	RSD (IP) %	$\mu\text{g mL}^{-1}$	$\mu\text{g mL}^{-1}$	
Acesulfame	2.49	94.22	5.4	5.4	0.75	2.49	0.9958
	4.99	105.7	1.91	1.91			
	14.96	103.8	3.21	3.21			
	24.93	97.87	3.49	3.49			
	49.87	108.8	2.62	2.62			
Saccharin	0.99	86.45	2.72	2.72	0.30	0.99	0.9876
	1.99	122.00	1.27	1.70			
	4.99	105.8	2.33	3.09			
	9.99	98.22	3.89	3.89			
	19.98	97.08	4.10	9.16			
Aspartame	2.49	95.56	2.89	5.15	0.75	2.49	0.9961
	4.98	98.47	4.67	4.67			
	14.94	101.2	4.49	4.49			
	24.89	96.89	3.75	4.19			
	49.79	105.1	1.24	3.68			
Benzoic acid	5.14	101.6	3.74	4.54	1.27	5.14	0.9856
	10.28	91.30	5.16	5.87			
	25.71	105.6	4.05	4.05			
	51.42	103.5	3.67	3.89			
	102.84	86.93	3.49	3.49			
Sorbic acid	5.02	113.6	1.65	4.08	1.42	5.02	0.9876
	10.04	83.20	6.99	7.45			
	25.10	103.0	3.52	4.79			
	50.21	111.3	3.22	3.22			
	100.42	99.06	1.49	2.80			

R, repeatability; IP, intermediate precision.

 R^2 , correlation coefficient for the linearity of back calculated versus introduced concentration.

the acceptance limits set at $\pm 30\%$. This means that the analytical SALLE-UPLC-UV method is capable of making accurate results over the whole concentration range for all the compounds.

Consequently, the lower and upper quantitation limits (LLOQ and ULOQ) are the extreme values that can be quantified with a defined accuracy and were [2.49–49.87], [0.99–19.98], [2.49–49.79], [5.14, 102.84], [5.02, 100.42] for acesulfame, saccharin, aspartame, benzoic acid and sorbic acid, respectively. As the accuracy profile approach is used for method validation, the LOQ correspond to the LLOQ that can be detected and quantified accurately. The results summarized in Table 1 show that the LOQs ranged from 0.99 to $5.02 \mu\text{g mL}^{-1}$.

The limit of detection (LOD) is defined as the lowest concentration of an analyte in a sample that can be detected but not necessarily quantified as an exact value. In this work, the LOD was calculated using the methodology described by Miller & Miller (1993). This method is based on the computation by series of the $Y_{\text{LOD}} = \text{Intercept (0 if negative)} + 3 \times \text{Residual SD}$ obtained by ANOVA. Using the selected regression model, the back-calculation will give the X_{LOD} for each series. The mean of the different back-calculated X_{LOD} will give the LOD of the procedure. The results summarized in Table 1 show that the LODs ranged from 0.3 to $1.42 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.3. Analysis of real samples and occurrence of additives

The developed method was successfully applied for the determination and quantification of three artificial sweeteners and two preservatives in 47 juices products belonging to nine different brands from Algerian market. The results from all analyzed samples are summarized in Table 2. As regards to acesulfame, saccharin and aspartame, fortunately, none of these compounds were found in any analyzed product and these results are in accordance with the Taiwan study of Chang & Yeh (2014). However, all the other studies found and quantified at least one sweetener in the analyzed samples of juices (Bergamo et al., 2011; Dias et al., 2015; Diogo et al., 2013; Lino and Pena, 2010).

Preservation technology such as pasteurization, aseptic packaging and the high acidic character (pH 3–4) of fruit juice can be used for protection of fruit juices against the growth of microorganisms (Cakir & Cagri-Mehetoglu, 2013). It is important to highlight that benzoic and sorbic acids or their salts are forbidden in juices and nectars by Algerian food additive legislation (Ministère du commerce Algérien, décret exécutif n°12-214, 2012). However, potassium sorbate was found declared in the label claim of two brands of analyzed samples but their concentrations were not given.

The results of the analyzed samples show that both benzoic and sorbic acids were detected and quantified separately in 12 samples (25.53%) and simultaneously in 6 samples (12.76%). The mean concentrations measured were 63.03 ± 14.23 and $65.69 \pm 21.76 \mu\text{g mL}^{-1}$ ranging from 36.34 to 102.09 and 32.34 to $118 \mu\text{g mL}^{-1}$ for benzoic and sorbic acids or their salts, respectively and a maximum of $171.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ for the sum of the two compounds when detected simultaneously. The results were not in accordance with the guidelines of Algerian standard legislation (Ministère du commerce Algérien, décret exécutif n°12-214, 2012) as the use of these additives in juices is forbidden; however, they were below or did not surpass the allowed limit of $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ set by Codex Alimentarius (2016).

The results found in this work are lower for benzoic acid and very similar for sorbic acid to those found by the Portuguese study of Mota, Ferreira, Cunha, and Oliveira (2003). Moreover, as in our study, the researchers did not detect exceeding levels of benzoic or sorbic acids in fruit juices.

The study of Cakir and Cagri-Mehetoglu (2013) showed that only one juice sample contained benzoic acid at $181.4 \mu\text{g mL}^{-1}$. Moreover, benzoic and sorbic acids were not detected in fruit juices, and only traditional soft drinks or soft drinks based on mineral water had those additives (Diogo et al., 2013). The results found were not too high to be dangerous for the consumers. The concentration levels found could be from the indigenous and natural content of fruits (Davidson, Juneja, & Branen, 2001) or resulted from the contamination of fruits used in the

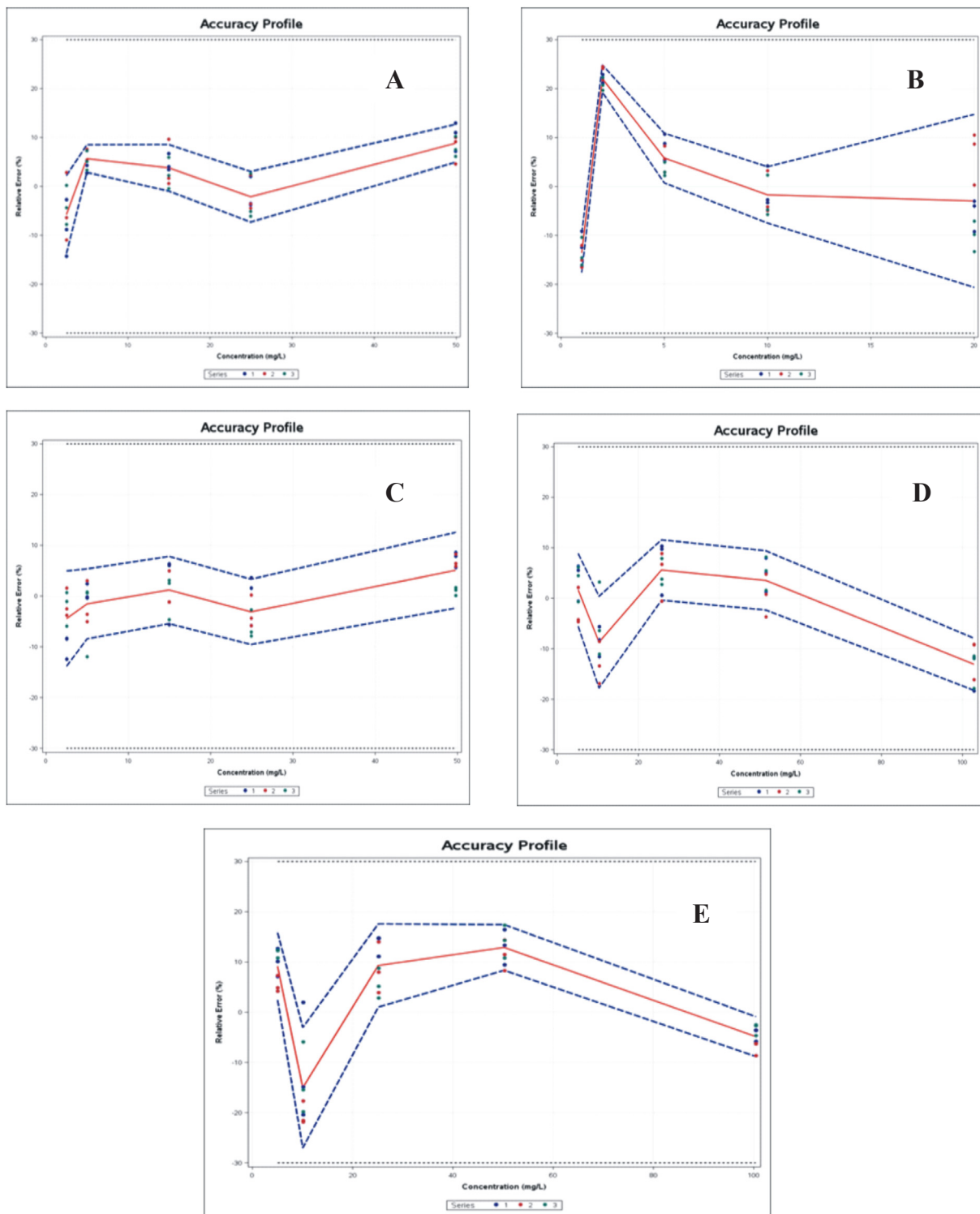


Fig. 4. Schematic representation of the accuracy profiles obtained for all the compounds. (A) Acesulfame; (B) Saccharin; (C) Aspartame; (D) Benzoic acid and (E) Sorbic acid. The dotted lines are the lower and upper acceptance limits set at 30%, the dashed lines are the lower and upper β -expectation tolerance limits and the continuous line is the relative bias.

preparation of the samples of juices by air, rain, soils and water which could contain benzoic acid (Javanmardi, Arefhosseini, Ansarin, & Nemati, 2015).

4. Conclusion

In this study, a simple, fast, economical, green and benign

extraction/cleanup method namely SALLE coupled to UPLC-UV was applied for routine monitoring and quantitative determination of five food additives with wide range of physicochemical properties namely acesulfame, saccharin, aspartame, benzoic and sorbic acids in samples of juices. This method reduces the consumption of the extraction solvent and sample volumes to a very low level compared to the classic extraction methods such as LLE and SPE. The method was optimized

Table 2
Results of the occurrence and concentration of food additives in real commercial samples.

Brand	n	Acesulfame		Saccharin		Aspartame		Benzoic acid		Sorbic acid	
		Label claim	Range $\mu\text{g mL}^{-1}$	Label claim	Range $\mu\text{g mL}^{-1}$	Label claim	Range $\mu\text{g mL}^{-1}$	Label claim	Range $\mu\text{g mL}^{-1}$	Label claim	Range $\mu\text{g mL}^{-1}$
A	6	No	ND	No	ND	No	ND	No	36.34–78.46 (15.20) ^a	Yes	32.34–118 (31.34) ^a
B	5	No	ND	No	ND	No	ND	No	60.09–79.07 (6.97) ^a	No	ND
C	6	No	ND	No	ND	No	ND	No	0–102.09 (72.19) ^a	No	ND
D	5	No	ND	No	ND	No	ND	No	ND	No	ND
E	6	No	ND	No	ND	No	ND	No	ND	No	ND
F	5	No	ND	No	ND	No	ND	No	ND	No	ND
G	5	No	ND	No	ND	No	ND	No	ND	Yes	38.76–97.70 (24.05) ^a
H	4	No	ND	No	ND	No	ND	No	ND	No	ND
I	4	No	ND	No	ND	No	ND	No	ND	No	ND

n, number of sample; ND, not detected.

^a Standard deviation.

using univariate methodology and validated using accuracy profile approach based on the total error. Under the optimum extraction conditions, the optimized method provides suitable trueness, precision, extraction recoveries, linearity, accuracy and sensitivity in a short time. The method was successfully applied to the analysis of samples of juices to ensure a good quality of products and compliance with additive legislation, in order to avoid the effects of these sweeteners and preservatives on people's health if used at high concentrations. The results show that only benzoic and sorbic acids were detected and quantified in the analyzed samples and there are no problems regarding the concentrations found which were not of concern for consumer health.

Funding

This research was financially supported by Gobierno de Aragón and Fondo Social Europeo, given to GUIA group T53_17R.

References

- Araujo, P. (2009). Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B*, 877, 2224–2234.
- Bergamo, A. B., Da Silva, J. A. F., & De Jesus, D. P. (2011). Simultaneous determination of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K in soft drinks and tabletop sweetener formulations by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *Food Chemistry*, 124, 1714–1717.
- Boyce, M. C. (1999). Simultaneous determination of antioxidants, preservatives and sweeteners permitted as additives in food by mixed micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, 847, 369–375.
- Cakir, R., & Cagri-Mehetoglu, A. (2013). Sorbic and benzoic acid in non-preservative added food products in Turkey. *Food Additives and Contaminants: Part B: Surveillance*, 6, 47–54.
- Cantarelli, M. A., Pellerano, R. G., Marchevsky, E. J., & Camina, J. M. (2009). Simultaneous determination of aspartame and acesulfame-K by molecular absorption spectrophotometry using multivariate calibration and validation by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 115, 1128–1132.
- Chang, C. S., & Yeh, T. S. (2014). Detection of 10 sweeteners in various foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22, 318–328.
- Chen, X. H., Zhao, Y. G., Shen, H. Y., & Jin, M. C. (2012). Application of dispersive solid-phase extraction and ultra-fast liquid chromatography–tandem quadrupole mass spectrometry in food additive residue analysis of red wine. *Journal of Chromatography A*, 1263, 34–42.
- Codex Alimentarius (2016). Codex General Standard for food additives. *Codex Stan*, 192–1995 http://www.fao.org/gsfaonline/docs/CXS_192f.pdf.
- Davidson, P. M., Juneja, V. K., & Branan, J. K. (2001). Antimicrobials agents. In A. L. Branan, P. M. Davidson, S. Salminen, & J. H. Thorgate (Eds.), *Food additives* (pp. 563–620). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Dias, C. B., Meinhardt, A. D., Pane, D. Q., Ballus, C. A., & Godoy, H. T. (2015). Multivariate optimisation and validation of a method for the separation of five artificial sweeteners by UPLC-DAD in nine food matrices. *Food Analytical Methods*, 8, 1824–1835.
- Diogo, J. S., Silva, L. S., Pena, A., & Lino, C. M. (2013). Risk assessment of additives through soft drinks and nectars consumption on Portuguese population: A 2010 survey. *Food and Chemical Toxicology*, 62, 548–553.
- EFSA ANS Panel (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food) (2013). Scientific opinion on the re-evaluation of aspartame (E 951) as a food additive. *EFSA Journal*, 11(12), 3496 263.
- EFSA CEF Panel (EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and ProcessingAids) (2011). Scientific opinion on flavouring group evaluation: Benzyl alcohols, benzaldehydes, a related acetal, benzoic acid, and related esters from chemical group 23 and 30. *EFSA Journal*, 9(7), 2176 136.
- Hubert, P., Nguyen-Huu, J. J., Boulanger, B., Chapuzet, E., Chiap, P., Cohen, N., ... Rozet, E. (2007). Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal-part II. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45, 70–81.
- Hubert, P., Nguyen-Huu, J. J., Boulanger, B., Chapuzet, E., Cohen, N., Compagnon, P. A., ... Rozet, E. (2007). Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal-part III. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45, 82–96.
- Javanmardi, F., Arefhosseini, S. R., Ansarin, M., & Nemati, M. (2015). Optimized dispersive liquid-liquid microextraction method and high performance liquid chromatography with ultraviolet detection for simultaneous determination of sorbic and benzoic acids and evaluation of contamination of these preservatives in Iranian foods. *Journal of AOAC International*, 98, 962–970.
- Kokosa, J. M., Przyjazny, A., & Jeannot, M. (2009). *Solvent microextraction: Theory and practice*. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons Inc.
- Lino, C. M., & Pena, A. (2010). Occurrence of caffeine, saccharin, benzoic acid and sorbic acid in soft drinks and nectars in Portugal and subsequent exposure assessment. *Food Chemistry*, 121, 503–508.
- Lu, Y., Hao, T., Hu, S., Han, J., Tan, Z., & Yan, Y. (2013). Measurement and correlation of phase diagram data for acetone and sulfate aqueous two-phase systems at different temperatures. *Thermochimica Acta*, 568, 209–217.
- Magiera, S., & Kwietniowska, E. (2016). Fast, simple and efficient salting-out assisted liquid-liquid extraction of naringenin from fruit juice samples prior to their enantioselective determination by liquid chromatography. *Food Chemistry*, 211, 227–234.
- Miller, J. C., & Miller, J. N. (1993). *Statistics for analytical chemistry* (3rd ed.). New York: Ellis Horwood.
- Ministère du commerce Algérien, décret exécutif n°12-214. 2012 fixant les conditions et les modalités d'utilisation des additifs alimentaires dans les denrées alimentaires destinées à la consommation humaine. *Journal Officiel*, 30, 16. <https://www.commerce.gov.dz/reglementation/decret-executif-n-deg-12-214> Accessed 16 May 2012.
- Mota, F. J. M., Ferreira, I. M. P. L. V. O., Cunha, S. C., & Oliveira, M. B. P. P. (2003). Optimisation of extraction procedures for analysis of benzoic and sorbic acids in foodstuffs. *Food Chemistry*, 82, 469–473.
- Nerín, C., Polo, T., Salafranca, J., & Cacho, J. (1996). Fast microextraction by demixture and determination of organochlorine pesticides in water. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 65, 27–35.
- Shewiyo, D. H., Kaale, E., Risha, P. G., Dejaegher, B., Smeyers-Verbeke, J., & Vanderheyden, Y. (2012). Development and validation of a normal-phase high-performance thin layer chromatography method for the analysis of sulfamethoxazole and trimethoprim in co-trimoxazole tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 66, 11–23.
- Sonnergaard, J. (2006). On the misinterpretation of the correlation coefficient in pharmaceutical sciences. *International Journals of Pharmaceutics*, 321, 12–17.
- Swithers-Susan, E. (2013). Artificial sweeteners produce the counterintuitive effect of inducing metabolic derangements. *Trends Endocrinology Metabolism*, 24, 431–441.
- Szultka, M., Pomastowski, P., Railean-Plugaru, V., & Buszewski, B. (2014). Microextraction sample preparation techniques in biomedical analysis. *Journal of Separation Science*, 37, 3094–3105.
- Tabata, M., Kumamoto, M., & Nishimoto, J. (1996). Ion pair extraction of metalloporphyrins into acetonitrile for determination of copper (II). *Analytical Chemistry*, 68, 758–762.
- Wang, Y., Yan, Y., Hu, S., Han, J., & Xu, X. (2010). Phase diagrams of ammonium sulfate + ethanol/1-propanol/2-propanol + water aqueous two-phase systems at 298.15 K and Correlation. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 55, 876–881.
- WHO, (1974). Toxicological evaluation of some food additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents. Seventeenth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Food Additive Series No 5.

- WHO, (1991). Evaluation of certain food additives and contaminants. Thirty seventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO technical report series No 806.
- WHO, (1993). Evaluation of certain food additives and contaminants. Forty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series, No. 837.
- WHO, (1997). Evaluation of certain food additives. Forty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series No. 868.
- WHO, (1999). Summary of evaluations performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 1956-1997 (first through forty-ninth meetings).
- WHO, (2000). Benzoic acid and sodium benzoate. Concise international chemical assessment document 26.
- Zhao, Y. G., Cai, M. Q., Chen, X. H., Pan, S. D., Yao, S. S., & Jin, M. C. (2013). Analysis of nine food additives in wine by dispersive solid-phase extraction and reversed-phase high performance liquid chromatography. *Food Research International*, 52, 350–358.