

Généralités sur le profil d'exactitude

Le profil d'exactitude permet de décider de la validité ou non de la méthode en superposant le domaine de validation et le domaine de validité.

- Le domaine de validation signifie l'ensemble des types de matrice auquel s'applique la méthode pour une gamme de concentrations sur laquelle a porté la validation souhaitée.
- Le domaine de validité est l'ensemble des types de matrice auquel s'applique la méthode pour une gamme de concentrations sur laquelle a porté la validation pour laquelle les futurs résultats fournis par la méthode sont jugés valides et acceptables en fonction des critères de performance de la méthode.

Le profil d'exactitude est basé sur l'utilisation de l'erreur totale déterminée à partir des critères de performance tels que la justesse et la fidélité. Il s'agit d'un outil de décision mais également de diagnostic [48].

III.1. Objectif et principe du profil d'exactitude

Le but du profil d'exactitude est de montrer comment deux exigences fondamentales de la norme ISO 17025 [42], à savoir la validation des méthodes et l'estimation de l'incertitude, peuvent se rejoindre pour élaborer une procédure servant à vérifier si une méthode est bien adaptée à ses objectifs.

Le profil d'exactitude est basé sur une application directe des principes décrits dans les normes de la série ISO 5725 (1, 2, 3, 4) [47, 52–54] .

A partir des résultats obtenus lors de la validation, le rôle du profil d'exactitude est d'estimer la garantie qu'aura l'utilisateur sur l'acceptabilité des résultats futurs si on applique la méthode en routine.

Le profil d'exactitude est une combinaison, sous forme graphique, d'un ou plusieurs intervalles de tolérance β et d'un ou plusieurs intervalles d'acceptabilité.

- L'intervalle de tolérance β est l'intervalle qui contient en moyenne une proportion β (en %), définissant de futurs mesurages obtenus selon un mode opératoire donné et pour une concentration donnée.
- L'intervalle d'acceptabilité signifie l'écart acceptable autour de la « valeur de référence ». Cette dernière représente la valeur d'une grandeur dont l'incertitude de mesure associée est considérée communément comme suffisamment petite

pour que la valeur puisse servir de base de comparaison pour les valeurs de grandeurs de même nature [45] (VIM) qui représente la teneur attendue.

III.2. Incertitude

Selon le VIM [45], l'incertitude est définie comme un paramètre associé à une mesure ou à un résultat pour caractériser la dispersion raisonnable que l'on peut associer au mesurande. Comme le préconise la norme ISO 17025 [42], une incertitude doit être associée aux résultats fournis. L'incertitude est un indicateur de la qualité d'un résultat et de la fiabilité qu'on peut lui accorder. Elle doit être associée à tout résultat de mesure. Le résultat d'analyse est consigné sous la forme $x \pm U$, où x représente le résultat d'analyse et U l'incertitude de mesure.

Pour cette approche, le modèle proposé pour le calcul d'incertitude est celui décrit dans la norme ISO/TS 21748 [55]. L'incertitude est liée :

- aux réactifs ;
- à l'étalonnage et réglage des instruments de mesure ;
- à la conservation des échantillons ;
- à l'expertise des opérateurs.

Cette liste, loin d'être exhaustive, dépend surtout des conditions de fidélité intermédiaire.

III.3. Profil de risque

La gestion des risques est utilisée dans plusieurs domaines en l'occurrence le contrôle qualité dans l'industrie pharmaceutique.

En effet, c'est l'agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux (Food and Drug Administration) qui a introduit le profil de risque à travers le « Process Analytical Technology (PAT) » [56]. Le PAT pourrait être défini comme un ensemble de « un système pour la conception, l'analyse et le contrôle de fabrication par des mesures idoines (en cours de traitement) des attributs critiques de qualité et de performance des matières premières et en cours ainsi que des procédés afin d'assurer la qualité du produit final » [57]. Dans le cas de la validation des procédures analytiques, le profil de risque représente la probabilité d'avoir en analyse

de routine, de futurs résultats de mesure en dehors des limites d'acceptation. Basé sur l'estimation des biais, le profil de risque fourni des informations sur l'amélioration et la performance des méthodes d'analyse [56].

DEUXIÈME PARTIE :
ÉTUDE
EXPÉRIMENTALE

DEUXIÈME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

Chapitre I : Matériel et méthodes

I.1. Matériel

I.1.1. Lieu d'étude

Cette présente étude a été réalisée au Laboratoire de Contrôle des Médicaments Vétérinaires (LACOMEV), du service de Pharmacie-Toxicologie de l'Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecines Vétérinaires (EISMV) de Dakar.

Inauguré le 6 février 2001 et aujourd'hui classé parmi l'un des plus importants outils d'expertises dans le domaine des médicaments vétérinaires, le LACOMEV a été officiellement reconnu comme laboratoire de référence de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE) le 27 mai 2004. C'est un laboratoire qui fait parti du réseau des laboratoires chargés du contrôle des médicaments vétérinaires chimiques dans l'espace de l'UEMOA.

Le LACOMEV dont la mission principale est d'apporter une expertise sur la qualité des médicaments vétérinaires dans le cadre de l'autorisation de mise sur le marché (AMM), contribue aussi à la sécurité sanitaire du consommateur par le contrôle des résidus des médicaments vétérinaires dans les denrées d'origine animale.

I.1.2. Verrerie et appareils

Le matériel utilisé est composé de la verrerie classique de laboratoire. Les principaux appareils utilisés sont :

- une balance analytique ;
- un agitateur magnétique ;
- un bac à ultra-son et à dégazage ;
- une hotte aspirante ;
- un distillateur d'eau relié à un appareil de production d'eau ultra pure ;
- une colonne d'extraction C18 de longueur 15cm et dont la taille des particules est égale à 5 μm ;
- une chaîne HPLC composée d'un bac à solvant, un dégazeur à vide, une pompe quaternaire, un injecteur d'échantillon, une enceinte à colonne thermostatée et

un détecteur à barrette de diodes. Cet ensemble est piloté par un ordinateur et une imprimante.

I.1.3. Réactifs

Les réactifs utilisés sont :

- acétonitrile, type HPLC ;
- méthanol, type HPLC ;
- acide ortho phosphorique (0,02 mol/L), préparé à partir de 2,7 mL d'acide ortho phosphorique 85 % dans deux litres d'eau ultra pure ;
- acide chlorhydrique 37 % ;
- solvant d'extraction (SE) composé de méthanol, d'acide chlorhydrique et d'eau ultra pure (50/2/48, V/V/V) ;
- solvant pour phase mobile (PM) composé de solution d'acide ortho phosphorique (0,02 mol/L) et d'acétonitrile (88/12, V/V) ;

La solution d'acide orthophosphorique (0,02 moles) et le solvant d'extraction seront ensuite filtrés sur membrane de méthyle cellulose 0,45 μm ;

- un étalon de substance de référence dont le principe actif est de l'oxytétracycline chlorhydrate en poudre jaune ;
- un médicament vétérinaire à base d'oxytétracycline injectable 10 %, sous forme chlorhydrate (lot n° 762).

I.2. Méthodes

I.2.1. Détermination de la spécificité

Pour cette étude, la spécificité de la méthode d'analyse est déterminée en faisant le test de comparaison spectrale entre le chromatogramme de la matière de référence et celui de l'échantillon. Le facteur de correspondance du spectre du chromatogramme de la matière de référence et celui de l'échantillon doit être supérieur ou égale à 990 pour une méthode spécifique [58] .

I.2.2. Méthodologie du profil d'exactitude

Pour appliquer le profil d'exactitude, il faut faire une série de mesurages i (i variant de 1 à I), contenant des niveaux de concentration k (k allant de 1 à K) pour lesquels des répétitions j (j variant de 1 à J) ont été faites. Les calculs des écarts-types

de répétabilité, fidélité intermédiaire et reproductibilité sont conduits selon le principe décrit dans la norme ISO 5725-2 [52] ou de sa version Afnor NF X 06-041. Ils doivent être effectués indépendamment niveau par niveau k, sur les concentrations retrouvées (Z) par prédiction inverse dans le cas des méthodes indirectes.

La moyenne générale d'un niveau est notée \bar{Z} .

$\bar{Z} = \frac{\sum_{i=1}^I (\sum_{j=1}^J z_{ij})}{IJ}$ avec $z =$ Valeur de la concentration retrouvée dans l'échantillon de validation

On peut faire une décomposition de la somme totale des carrés des écarts en deux sommes des carrés d'écarts et dans ce cas, la norme ISO 5725-2 [52] ne prend en compte que les plans d'expérience où le nombre de répétitions I par série est le même pour toutes les séries.

$$\underbrace{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (z_{ij} - \bar{Z})^2}_{SCE_T} = \underbrace{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (z_{ij} - \bar{Z}_i)^2}_{SCE_r} + \underbrace{\sum_{i=1}^I J \times (\bar{Z}_i - \bar{Z})^2}_{SCE_B}$$

$SCE_r =$ somme des carrés des écarts intra-série, $SCE_B =$ somme des carrés des écarts inter-série, $SCE_T =$ somme totale des écarts à la moyenne générale du niveau.

1.2.2.1. Les limites d'acceptabilité

Les limites d'acceptabilité sont exprimées comme un écart acceptable autour de la valeur de référence. Elles sont notées $\pm \lambda$ en valeurs absolues et dans l'unité du mesurande ou $(1 \pm \lambda) \times 100$ en valeurs relatives.

1.2.2.2. Les limites de tolérance

La méthode de calcul des limites de tolérance proposée par Mee (1984) [59] est celle qui a été choisie pour cette procédure. On exprime l'intervalle de tolérance comme un intervalle symétrique autour de la concentration retrouvée moyenne \bar{Z} du niveau :

$$\bar{Z} \pm k_{tol} \times S_{IT}$$

Le calcul de l'écart-type de l'intervalle de tolérance S_{IT} selon cette formule servira

aussi à l'estimation de l'incertitude de mesure. Il est obtenu grâce aux formules suivantes :

$$S_{IT} = S_{FI} \left(\sqrt{1 + \frac{1}{I \times J \times B^2}} \right) ; B = \sqrt{\frac{R+1}{J \times R+1}} ; R = \frac{S_B^2}{S_r^2}$$

La quantité k_{tol} est appelé facteur de couverture de l'intervalle de tolérance et vaut : $k_{tol} = t_{v, \frac{1+\beta}{2}}$

$t_{v, \frac{1+\beta}{2}}$ est le quantile de la distribution t de Student pour v degrés de liberté et β la probabilité du contenu de l'intervalle de tolérance. Le nombre de degrés de liberté v

est calculé selon méthode d'approximation et par la formule :
$$v = \frac{(R+1)^2}{\frac{(R+1)^2}{I-1} + \frac{1}{J}}$$

Pour chaque niveau k, calculer l'écart-type de l'intervalle de tolérance S_{IT} , le facteur de couverture k_{tol} et les limites basse et haute de l'intervalle de tolérance. La valeur choisie pour β doit être au moins de 80%.

Le nombre v est rarement un nombre entier et il convient d'utiliser des tables de la loi de Student qui acceptent des nombres de degrés de liberté non entiers. Cependant, il est possible d'approcher la valeur du quantile par interpolation linéaire entre les 2 nombres de degré de liberté entiers qui encadrent v.

Le rapport $R = \frac{S_B^2}{S_r^2}$ entre la variance inter-séries et la variance de répétabilité intervient dans plusieurs formules. Il traduit l'importance relative de l'effet de la série.

I.2.2.3. La sensibilité

Après avoir fait le plan d'étalonnage et celui de validation (décrits plus loin dans le mode opératoire), on détermine les coefficients des modèles d'étalonnage en traçant les courbes de type $Y = a_0 + a_1X + e$ pour chaque série. La sensibilité représente ainsi la pente (a_1) de la droite d'étalonnage $Y = a_0 + a_1X + e$ où a_0 est le blanc et e une erreur aléatoire. Une méthode d'analyse est sensible si une légère augmentation de la concentration d'analyte entraîne une augmentation de la réponse instrumentale.

I.2.2.4. Les concentrations retrouvées par prédiction inverse

Les concentrations retrouvées sont calculées à partir des données du plan de validation, en utilisant la fonction inverse du modèle d'étalonnage ($y = f(z)$). Cette fonction inverse s'écrit : $z = f^{-1}(y)$.

I.2.2.5. La Fidélité

La fidélité est déterminée à partir de la répétabilité, de la reproductibilité et de la fidélité intermédiaire.

I.2.2.5.1. La répétabilité

La répétabilité d'une méthode d'essai est étudiée en calculant l'écart-type de répétabilité ou intra-série noté S_r .

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum(z_i - \bar{z})^2}{I(J-1)}} = \sqrt{\frac{SCE_r}{I(J-1)}}$$
 avec \bar{z} = valeur moyenne des répétitions d'une série pour un niveau donné.

I.2.2.5.2. La reproductibilité

La reproductibilité d'une méthode d'essai est étudiée en calculant l'écart-type inter-série noté S_B .

$$S_B = \sqrt{\frac{\frac{SCE_B}{I-1} - S_r^2}{J}}$$

I.2.2.5.3. La fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire est notée S_{FI} .

$$S_{FI} = \sqrt{S_r^2 + S_B^2}$$

Une méthode d'analyse est fidèle si le coefficient de variation (CV) pour chaque niveau est inférieur ou égale à 2%.

$CV = (S_{FI}/\bar{z}) \times 100$ avec \bar{z} la moyenne des concentrations retrouvées des séries par niveau.

I.2.2.6. La justesse

La justesse s'évalue à l'aide du biais et du recouvrement. Le biais absolu est la différence entre la valeur de référence X et la valeur retrouvée Z dans l'échantillon.

Le biais relatif est égal à cent multiplié par le rapport entre le biais absolu et la concentration moyenne retrouvée.

Le recouvrement est égal à cent multiplié par le rapport entre la concentration retrouvée dans l'échantillon (Z) et la valeur de référence moyenne (\bar{x}), le tout est multiplié par cent.

I.2.2.7. L'exactitude

L'exactitude de la méthode est représentée à partir du profil d'exactitude. Une méthode est exacte si les limites de tolérances sont incluses dans les limites d'acceptabilité.

I.2.2.8. Calcul de l'incertitude

Pour chaque niveau, l'incertitude type élevé au carré est :

$$u^2(Z) = u^2(D) + S_{FI}^2$$

Avec Z la valeur du mesurande et D le biais absolu moyen. Si on néglige les incertitudes sur la valeur de référence et d'autres sources d'incertitude éventuelles, on démontre que [60] :

$$u(D) = \sqrt{\frac{S_{FI}^2 - (1 - \frac{1}{I})S_r^2}{J}}$$

En réorganisant les calculs, on trouve :

$$u(Z) = S_{FI} \sqrt{1 + \frac{1}{IJ B^2}} \quad [61]$$

$$\text{Avec } B = \sqrt{\frac{R+1}{J \times R+1}} \text{ et } R = \frac{S_B^2}{S_r^2}$$

On remarque que la formule de l'incertitude $u(Z)$ et celle de l'écart-type de l'intervalle de tolérance S_{IT} sont identiques. En conséquence l'écart-type de l'intervalle de tolérance permet d'estimer les composantes de l'incertitude. Plusieurs sources d'incertitude peuvent être déterminées.

I.2.2.9. Etude de la linéarité

Pour étudier la linéarité de la méthode, deux approches ont été utilisées.

La première est basée sur le coefficient de détermination R^2 de la droite de régression linéaire appliquée sur les concentrations retrouvées par rapport aux concentrations de références. Si R^2 est proche de l'unité, alors la méthode est linéaire.

L'autre approche est basée sur les limites de tolérance absolues. Une droite de régression n'est linéaire que si les limites de tolérance absolues sont comprises dans les limites d'acceptation prédéfinies.

I.2.2.10. Calcul de la limite de quantification

La limite de quantification (LOQ) de la méthode correspond à l'abscisse du point d'intersection entre une des bornes de l'intervalle de tolérance et une des limites d'acceptabilité. Au-dessus de ce seuil, l'analyste peut garantir que la méthode produira une proportion de résultats au moins égale à β . la méthode est donc valide puisqu'elle permet de garantir les objectifs fixés. La LOQ peut être obtenue soit par interpolation soit plus exactement en calculant l'abscisse du point d'intersection. Les calculs doivent être réalisés sur les valeurs absolues des limites d'acceptabilité et de tolérance.

Les deux droites peuvent être représentées à l'aide d'un système de deux équations, dont la première traduit la limite de l'intervalle de tolérance (t_0 est l'ordonnée à l'origine et t_1 la pente) et la seconde la limite d'acceptabilité (paramètres a_0 et a_1) :

$$\left. \begin{array}{l} Z = t_0 + t_1 X \\ Z = a_0 + a_1 X \end{array} \right\}$$

$a_0 = 0$ car la limite de l'intervalle d'acceptabilité passe toujours par le zéro.

$$Z = t_0 + t_1 X = a_0 + a_1 X \quad \Longrightarrow \quad X = loq = \frac{a_0 - t_0}{t_1 - a_1}$$

I.2.2.11. Profil de risque

Le profil de risque exprime par niveau de concentration, la probabilité pour que le résultat d'une mesure effectuée en analyse de routine puisse tomber en dehors des limites d'acceptation. Il est établi graphiquement en considérant la valeur absolue des biais obtenus en phase de validation. La probabilité de risque est fixée à 5%.

I.2.3. Calcul de la limite de détection (LOD)

La méthode du profil d'exactitude ne propose pas d'approche spécifique pour le calcul de la LOD. Par contre, on peut s'appuyer sur d'autres références pour calculer la LOD. Elle peut être déterminée en se basant sur l'écart-type résiduel et la pente. Elle est exprimée comme suit $LOD = \frac{3,3S}{m}$ [43].

S = écart-type résiduel ; m = pente de la courbe = $\frac{S_{xz}}{S_{xx}}$

$$S = \sqrt{\frac{S_{zz} - m^2 S_{xx}}{(N-2)}} \quad [62]$$

$$S_{zz} = \sum (z_i - \bar{z}')^2 \quad ; \quad S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x}')^2 \quad ;$$

$$S_{xz} = \sum (x_i - \bar{x}') (z_i - \bar{z}') \quad ;$$

x_i et z_i sont des paires de données, N le nombre de paires et \bar{x}' et \bar{z}' sont les valeurs moyennes des variables.

I.3. Mode opératoire

Deux plans d'expériences sont nécessaires, l'un dit d'étalonnage sert à calculer la fonction de réponse de la méthode, l'autre dit de validation sert à calculer les caractéristiques de validation. La même structure de plan a été choisie pour l'étalonnage et la validation : 36 essais réalisés à 4 niveaux de concentration, sur 3 jours avec 3 répétitions (4×3×3). Les essais de validation doivent être effectués les mêmes jours que ceux d'étalonnage afin d'utiliser les fonctions d'étalonnage correspondantes.

I.3.1 Procédure d'extraction

➤ Etalon

On prépare une gamme de concentration comportant les niveaux suivants : 2 ; 0,25 ; 0,20 et 0,16 mg/mL. Pour faire une solution de 2 mg/mL, on pèse et on introduit dans une fiole jaugée de 100 mL la quantité d'étalon correspondant à 200 mg d'oxytétracycline pure en ajoutant un peu de solvant d'extraction. Après passage de la fiole au bain ultrason pendant 15 minutes, puis 10 minutes à l'agitateur magnétique, la solution est complétée avec le solvant d'extraction jusqu'au trait de jauge. A partir de la solution de 2 mg/ml (S_1), on prépare les autres solutions S_2 , S_3 et S_4 en passant par les solutions intermédiaires S'_1 , S'_2 et S'_4 (tableau II).

Tableau II : préparation des solutions intermédiaires et finales de l'étalon

Solutions	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄
S ₁	-	S ₂ ' = 5 mL S ₁ / 10 mL SE	S ₃ ' = 5 mL S ₁ / 10 mL SE	S ₄ ' = 5 mL S ₁ / 25 mL SE
Solutions finales	200 mg OTC/100 mL SE	5 mL S ₂ ' / 20 mL PM	5 mL S ₃ ' / 25 mL PM	10 mL S ₄ ' / 25 mL PM
Concentration des solutions finales	S ₁ = 2mg/mL	S ₂ = 0,25 mg/mL	S ₃ = 0,2 mg/mL	S ₄ = 0,16 mg/mL

SE= Solvant d'Extraction, PM= Phase Mobile, OTC= oxytétracycline

➤ Echantillon

On prépare des solutions de même concentration que celles de l'étalon. On procède comme suit (tableau III):

Tableau III : préparation des solutions intermédiaires et finales de l'échantillon

Solutions	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄
Echantillon (E)	-	E ₂ ' = 1 mL E ₁ / 100 mL SE	E ₃ ' = 1 mL E ₁ / 50 mL SE	E ₄ ' = 1 mL E ₁ / 50 mL SE
Solutions finales	1 mL E / 50 mL SE	5 mL E ₂ ' / 20 mL PM	1 mL E ₃ ' / 10 mL PM	2 mL E ₄ ' / 25 mL PM
Concentration des solutions finales	E ₁ = 2 mg / mL	E ₂ = 0,25 mg / mL	E ₃ = 0,2 mg / mL	E ₄ = 0,16 mg / mL

I.3.2. Identification et dosage par chromatographie liquide haute performance

I.3.2.1 Principe de la chromatographie liquide haute performance (HPLC)

La chromatographie regroupe un ensemble de méthodes variées qui permettent la séparation de substances de propriétés voisines dans un mélange complexe. Elle sert en analyse à des fins d'identification et de quantification. Dans toute séparation par chromatographie, l'échantillon est transporté par une phase mobile gazeuse, liquide ou fluide [63].

La chromatographie liquide haute performance (figure 4) est une technique basée sur les mêmes principes que ceux de la chromatographie classique sur colonne mais elle est plus sophistiquée. Elle permet par exemple l'analyse de composés aussi variés que les acides aminés, les protéines, les acides nucléiques, les hydrocarbures, les

hydrates de carbone, les pesticides, les antibiotiques, les stéroïdes, ainsi que de nombreuses substances inorganiques [64].

Le procédé de chromatographie commence par l'injection d'un échantillon en tête de la colonne. La séparation des composés présents dans cet échantillon se fait dans la colonne grâce à leur affinité avec la phase stationnaire. Chaque composé élué est ensuite détecté. La réponse du détecteur est enregistrée puis exploitée par un système de traitement de donnée sous forme de pics. Les pics d'élution sont assimilables à des courbes de Gauss. Leur surface est proportionnelle à la quantité de substance éluée [65]. Un pic de composé est caractérisé par son temps de rétention qui représente le temps écoulé entre l'injection et le maximum de concentration détectée [16] (DEQM, 2010).



Figure 4 : Photo d'une chaîne HPLC du LACOMEV

Source : auteur

I.3.2.2 Conditions chromatographiques

Après l'extraction, 10 μL d'extraits ont été injectés dans le système chromatographique à un débit de 0,9 mL/mn. Nous avons utilisé la chromatographie en phase inverse en mode isocratique.

Les 10 μL d'extrait à 0,16 ; à 0,2 ; à 0,25 et à 2 mg/mL correspondent respectivement à la quantité de 1,6 ; de 2 ; de 2,5 et de 20 μg en oxytétracycline injectée.

- L'identification par HPLC utilise la comparaison du spectre UV et du temps de rétention du principe actif dans le produit fini avec le spectre UV et le temps de rétention du standard.
- Le dosage par HPLC utilise les surfaces des pics suivant la formule :

$$\text{Résultat} = \frac{\text{Ses}}{\text{Sstd}} \times \frac{\text{Pes Std}}{\text{Pes Essai}} \times F \times D \times T$$

Ses : surface de la préparation à examiner

Sstd : surface du standard

Pes Std : prise d'essai du standard

Pes Essai : prise d'essai de la préparation à examiner

F: facteur de dilution

D : densité

T : titre du standard

Les calculs sont réalisés en utilisant le logiciel Excel.

Chapitre II : Résultats et discussion

II.1. La spécificité

Les facteurs de correspondance obtenus pour l'échantillon et la substance de référence sont tous supérieurs à 990,000 (figure 5). Les chromatogrammes obtenus avec l'échantillon et la substance de référence (figures 6 et 7) correspondent donc à celui de l'oxytétracycline ; la méthode est par conséquent spécifique.

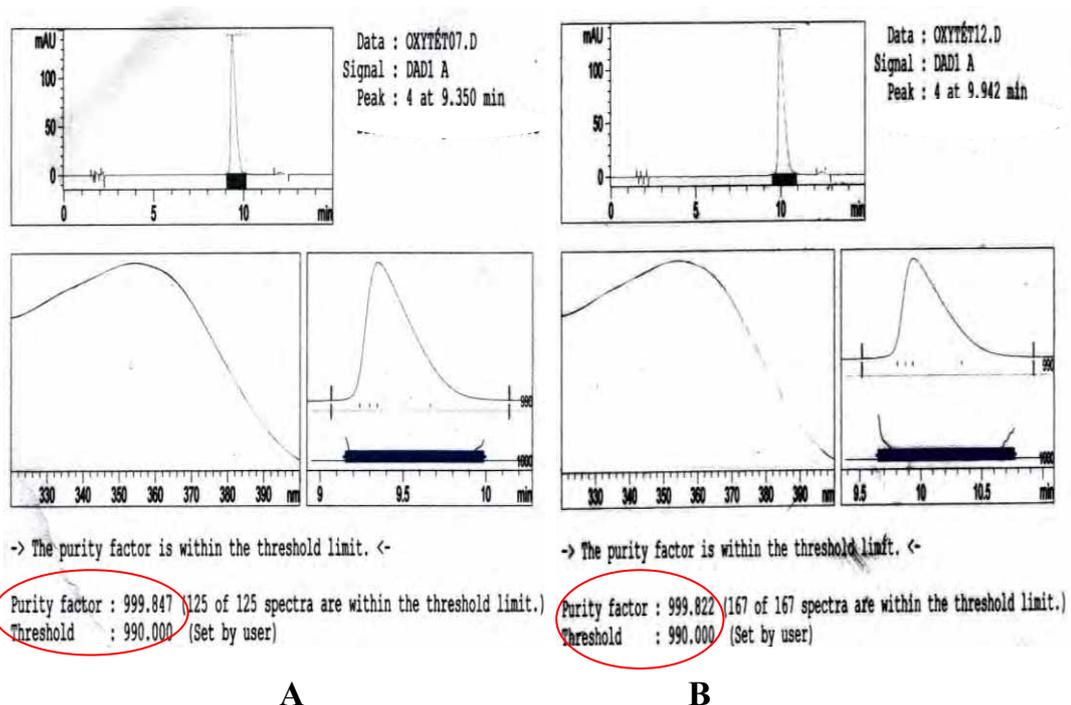
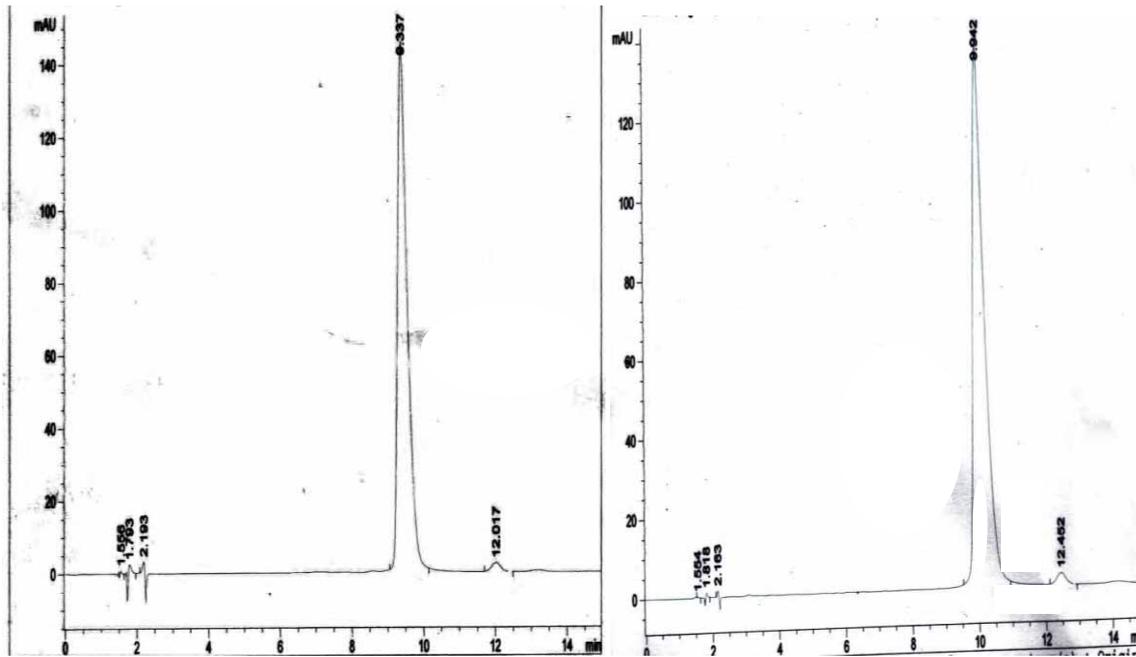


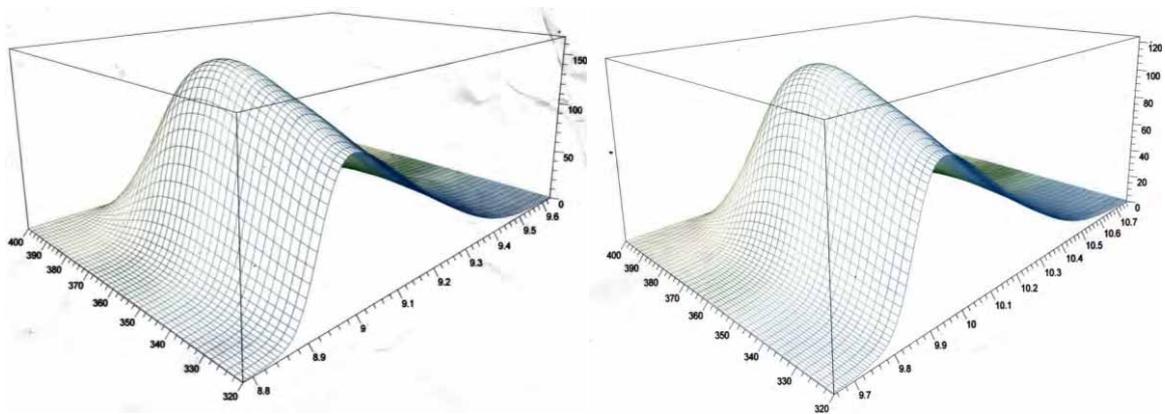
Figure 5 : la pureté des chromatogrammes obtenus (A) avec la substance de référence, (B) avec l'échantillon



A

B

Figure 6 : chromatogrammes (A) d'un étalon, (B) d'un échantillon d'oxytétracycline à 0,16 mg/mL



A

B

Figure 7 : spectre à trois dimensions (A) d'un étalon, (B) d'un échantillon d'oxytétracycline à 0,16 mg/mL

II.2. Plan d'étalonnage et sensibilité

Le plan d'étalonnage est présenté dans le tableau IV et les courbes d'étalonnage correspondant à chaque série sont illustrées par les figures 8, 9 et 10.

Tableau IV : plan de d'étalonnage (mesures exprimées en unité de surface de pic)

Niveaux K	Séries (Jours) I	Valeurs de référence X en mg/mL	Quantité de X injectée (en µg)	Mesurages (Réponses instrumentales) Y		
				Répétition J		
				J1	J2	J3
A	Jour 1	0,16	1,6	3361,1	3235,1	3296,6
	Jour 2			3339	3301	3329,9
	Jour 3			3357,8	3306,3	3320,9
B	Jour 1	0,2	2	4146,7	4075,5	4133,4
	Jour 2			4161,5	4174,7	4177,3
	Jour 3			4160,3	4149,8	4187,5
C	Jour 1	0,25	2,5	5213,8	5215	5156,6
	Jour 2			5235,8	5266	5252
	Jour 3			5205,4	5199	5311,5
D	Jour 1	2	20	42544	41810,7	41635,1
	Jour 2			41877,6	42895,6	42895,8
	Jour 3			41987	42342,5	42345,1

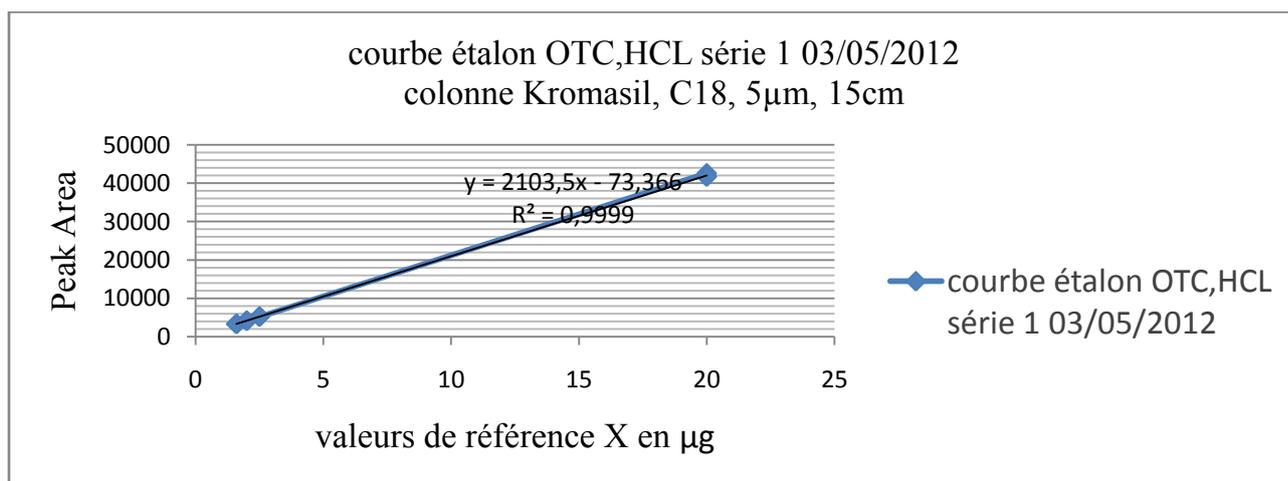


Figure 8 : courbe d'étalonnage de la première série

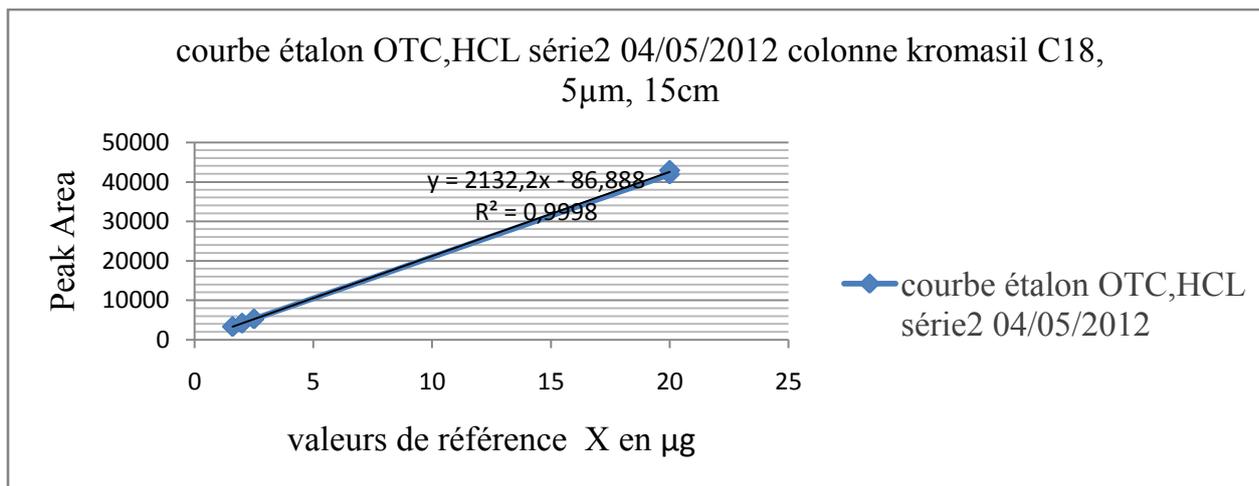


Figure 9 : courbe d'étalonnage de la deuxième série

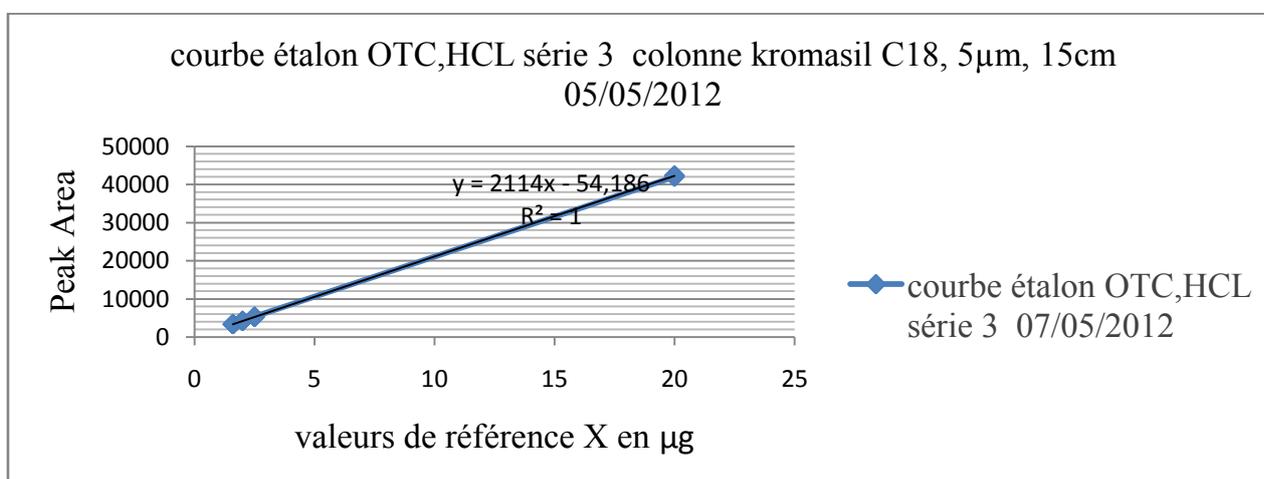


Figure 10 : courbe d'étalonnage de la troisième série

La sensibilité pour chaque série est présentée dans le tableau V.

Tableau V : sensibilité

Série	Sensibilité	blanc
Jour 1	2103,5	-73,366
Jour 2	2132,2	-86,888
Jour 3	2114	-54,186

On a constaté que l'augmentation de la concentration d'analyte est corrélée positivement à la réponse instrumentale (figures 8 à 10). En conséquence la méthode d'analyse est sensible. Pour chaque série, la sensibilité et le blanc de la méthode

d'analyse correspondent respectivement à la pente et à l'ordonnée à l'origine de la droite de régression linéaire obtenue (tableau V).

II.3. Plan de validation

Le plan de validation est présenté dans le tableau VI.

Tableau VI : plan de validation

Niveaux K	Séries (Jours) I	Valeurs de référence X en mg/mL	Quantité de X injectée (en µg)	Mesurages (Réponses instrumentales) Y		
				Répétition J		
				J1	J2	J3
A	Jour 1	0,16	1,6	3230,5	3177	3238,2
	Jour 2			3143,1	3154,8	3114,2
	Jour 3			3118,7	3147,4	3118
B	Jour 1	0,2	2	3963	4144	3987,7
	Jour 2			3961,5	4046,2	4098,8
	Jour 3			4107,3	4050,9	4085,2
C	Jour 1	0,25	2,5	5006,4	5089,3	4983,2
	Jour 2			5007,3	5054,9	4971
	Jour 3			5009,2	4942,5	5076,6
D	Jour 1	2	20	40987,4	40095,8	40405,8
	Jour 2			40131	40680,6	40735,8
	Jour 3			40358,6	40337,8	40463