

2.6. Préparation de la droite d'étalonnage externe

2.6.1. Matériels et réactifs

- 1 Flacon ambré (pour la solution stock).
- 2 Flacon jaugées de 10 ml (pour les solutions primaires et secondaires).
- 1 Fiole jaugée de 50 ml (pour le mélange C₂H₅OH/CH₃COOC₂H₅).
- Micropipette de 50-200 µl.
- Micropipette de 100-1000 µl.
- Tube Eppendorf.
- Papier d'aluminium.
- Spectrophotomètre UV-Visible.
- Cuvette en quartz.
- Ethanol qualité HPLC.
- Solution stock (Cholécalciférol, C= 6.495 exp-5 mol/l).
- Solution stock (C₂H₅OH/CH₃COOC₂H₅).

2.6.2. Préparation des solutions primaires

- Préparer une solution stock de cholécalciférol (D3) comme suit :
 - ✓ Transférer le contenu de 5 ampoules de cholécalciférol dans un flacon ambré.
 - ✓ Compléter le volume avec 100 ml de l'éthanol qualité HPLC.
- Prélever avec la micropipette 50 µl de la solution stock de cholécalciférol et compléter le volume de la fiole jaugée de 10 ml avec l'éthanol qualité HPLC.
- Refaire la même préparation 2 fois en plus, pour confirmer les concentrations par test UV-Visible [26] qui est comme suit :
 - ✓ A partir de menu en charger l'option « fixed ».
 - ✓ Commander la lecture de l'absorbance à une seule longueur d'onde.
 - ✓ Entrer la valeur de l'absorbance maximal pour le cholécalciférol ($\lambda = 265$ nm).
 - ✓ Sauvegarder la méthode dans la librairie.
 - ✓ Remplir le $\frac{3}{4}$ de volume de la cuvette de quartz par l'éthanol absolu.
 - ✓ Placer la cuvette dans le spectrophotomètre et appuyer sur le bouton « Zéro base ».

- ✓ Rincer la cuvette avec une petite quantité de la solution à analyser et remplir en suite $\frac{3}{4}$ de son volume par la même solution.
- ✓ Essuyer avec un papier doux les parois externes de la cuvette, si nécessaire imbiber le papier avec une goutte d'éthanol.
- ✓ Lancer test en appuy sur le bouton « Run », la valeur de l'absorbance s'affichera sur l'écran.
- ✓ Répéter l'opération 3 fois pour avoir 3 lectures d'absorbance.
- ✓ Sauvegarder les valeurs de l'absorbance : Abs₁, Abs₂, Abs₃, affichées sur l'écran pour calculer les concentrations.

2.6.3. Préparation des solutions secondaires

- Rincer les fioles jaugées plusieurs fois avec l'éthanol absolu.
- Prélever 50 μ l de la solution primaire de cholécalciférol avec la micropipette et compléter le volume de la fiole jaugée de 10 ml avec l'éthanol qualité HPLC.

2.6.4. Préparation des solutions étalon pour tracer la droite d'étalonnage

- Préparer les solutions étalons dans 5 tubes eppendorf différent en combinant les solutions secondaires comme suit :
 - ✓ 0 ; 100 ; 200 ; 300 ; 400 ; 500 μ l de solution de cholécalciférol.
 - ✓ Compléter le volume à 600 μ l avec la solution (1v : 1v) (C₂H₅OH/CH₃COOC₂H₅).
 - ✓ Fermer les tubes, emballer dans le papier aluminium, étiqueter et stocker au frais.
- Mettre en marche le système HPLC selon les conditions suivantes :
 - ✓ Mode d'élution gradient.
 - ✓ Phase mobile CH₃/CH₃CN (70%, 30%).
 - ✓ Débit 1.5 ml/mn.
 - ✓ Volume d'injection 100 μ l.
 - ✓ Longueur d'onde 265 nm.
 - ✓ Atténuation 0.005 AHFS.
 - ✓ Injecter les solutions étalons.

2.7. Résultats

Les concentrations finales des solutions primaires sont calculées d'après la loi de Beer-Lambert et après détermination du degré de pureté de cholécalciférol par RP-HPLC comme suit :

- ❖ Calcule de l'absorbance moyenne de la solution primaire diluée dans l'éthanol :

$$\overline{Abs} = \frac{Abs_1 + Abs_2 + Abs_3}{3}$$

- ❖ Détermination de la concentration finale :

$$C_{pré} = \frac{\overline{Abs}}{\varepsilon \cdot l} \times d$$

Avec :

$C_{pré}$: Concentration de la solution primaire.

\overline{Abs} : Absorbance moyenne.

ε : Coefficient d'absorption molaire en $(L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1})$, $\varepsilon = 18300$ pour les solutions de cholécalférol.

l : Epaisseur de la cuvette en cm.

d : Degré de pureté.

Tableau 2.1 : Résultats de l'analyse UV des solutions primaires :

	Absorbances			d en (%)	Concentration en ($\mu mol/L$)
	Abs ₁	Abs ₂	Abs ₃		
Cholécalférol	1.76	1.76	1.77	99.016	96.392

La concentration de la solution secondaire est déduite de celle de la solution primaire selon l'équation de dilution suivante :

$$C_{Pr} \times V = C_{Sec} \times V_T$$

$$C_{Pr} = \frac{C_{Sec} \times V_T}{V}$$

Avec $C_{pré}$: Concentration de la solution primaire.

V : Volume de la prise diluée de la solution primaire.

C_{Sec} : Concentration de la solution secondaire.

V_T : Volume total de la solution secondaire préparée.

$$C_{\text{pré}} = (96.392 \times 0.05)/10$$

$$= 0.482 \mu\text{mol/L}$$

Les concentrations des solutions étalons sont calculées selon l'équation de dilution suivante :

$$C_{(\text{étalon})} \times V_T = C_{\text{Sec}} \times V$$

$$C_{(\text{étalon})} = \frac{C_{\text{Sec}} \times V}{V_T}$$

Avec :

$C_{(\text{étalon})}$: Concentration de la solution étalon.

C_{Sec} : Concentration de la solution secondaire.

V_T : Volume total de la solution étalon préparer ($V_T = 400 \mu\text{l}$).

V : Volume de la prise diluée de la solution secondaire.

Tableau 2.2 : Résultats de l'analyse HPLC des solutions étalons.

Etalon	Concentrations (nmol/L)		Aires A	Hauteur
	Cholécalciférol	Cholécalciférol	Cholécalciférol	
Blanc	0		0	0
1	80.327		8983	321
2	160.65		18064	651
3	240.98		26982	958
4	321.31		36243	1291
5	401.63		44931	1598

Les résultats cités dans le tableau précédant nous permettent de tracer la droite d'étalonnage externe en utilisant le logiciel « Origin ». Cette courbe est représentée comme suit :

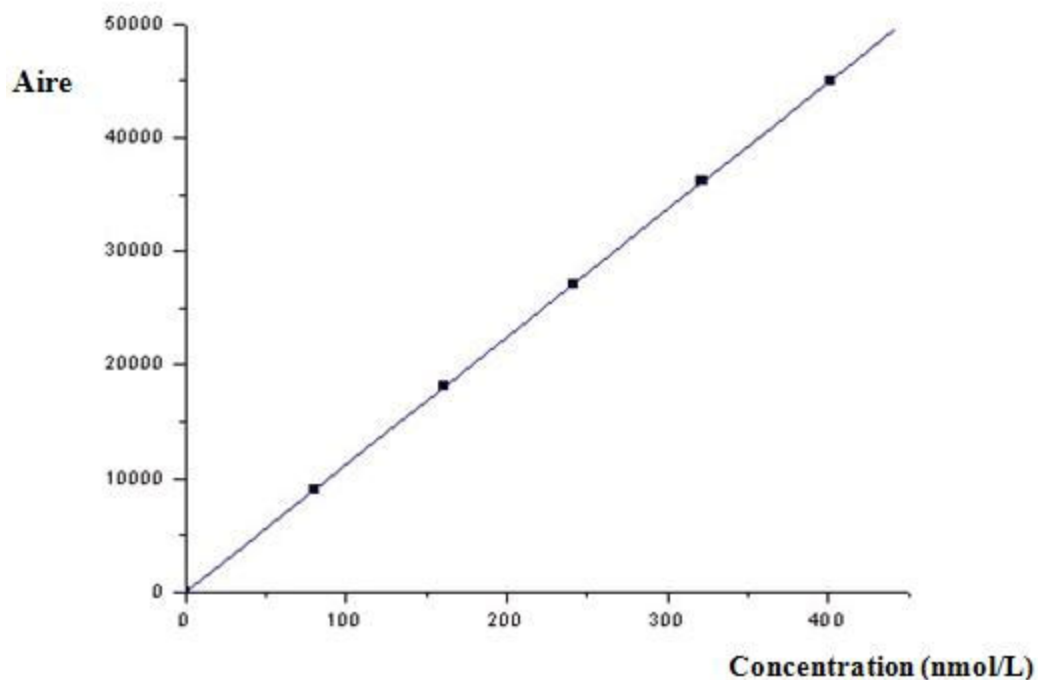


Figure 2.6 : Droite d'étalonnage externe.

Tableau 2.3 : Paramètres de la droite d'étalonnage externe.

Equation de la droite	Coefficients	
	r	r ²
$y = 112.16 x + 8.63$	0.9999	0.9998

2.9. Evaluation de la méthode

2.9.1. Linéarité

L'étalonnage a été effectué avec des solutions étalons de cholécalférol dont les concentrations variaient de 80.327 nmol/L à 401.63 nmol/L. La courbe d'étalonnage (aire du pic chromatographique en fonction de la concentration de cholécalférol) obtenue après régression linéaire des points expérimentaux, elle a présenté une bonne linéarité (coefficient de régression est de 0.9998).

Les paramètres (r et r^2) obtenus, montrent une forte corrélation entre les valeurs des rapports des aires et les rapports des concentrations utilisés pour tracer la droite d'étalonnage externe. Puisque ces paramètres sont des mesures de corrélation et ne pas de linéarité [22] ; il faut inspecter des points de la droite et chercher d'éventuelles courbures. L'outil de diagnostic puissant à cet effet de tracer les résidus.

Représentation des résidus de régression

Une représentation des résidus de régression peut être facilement faite en reportant sur un graphique les valeurs établies selon la formule :

$$y_i - \hat{y}_i$$

En cas de linéarité, les points obtenus doivent se répartir de façon aléatoire autour de la droite de fonction : $X = 0$

Tableau 2.4 : Calcul des résidus de la droite d'étalonnage externe.

Etalon	Cholécalciférol	$Y_i = A_{\text{Cholécalciférol}}$	$\hat{y} = ax_i + b$	Résidus $y_i - \hat{y}_i$
blanc	0	0	-8.638	8.638
2	80.327	8983	9001.48	-18.48
3	160.65	18064	15011.15	52.85
4	240.98	26982	27021.60	31.6
5	321.31	36243	36032.06	210.94
6	401.63	44931	45041.39	-110.39

On obtient une représentation des résidus de régression donnée par le graphique suivant :

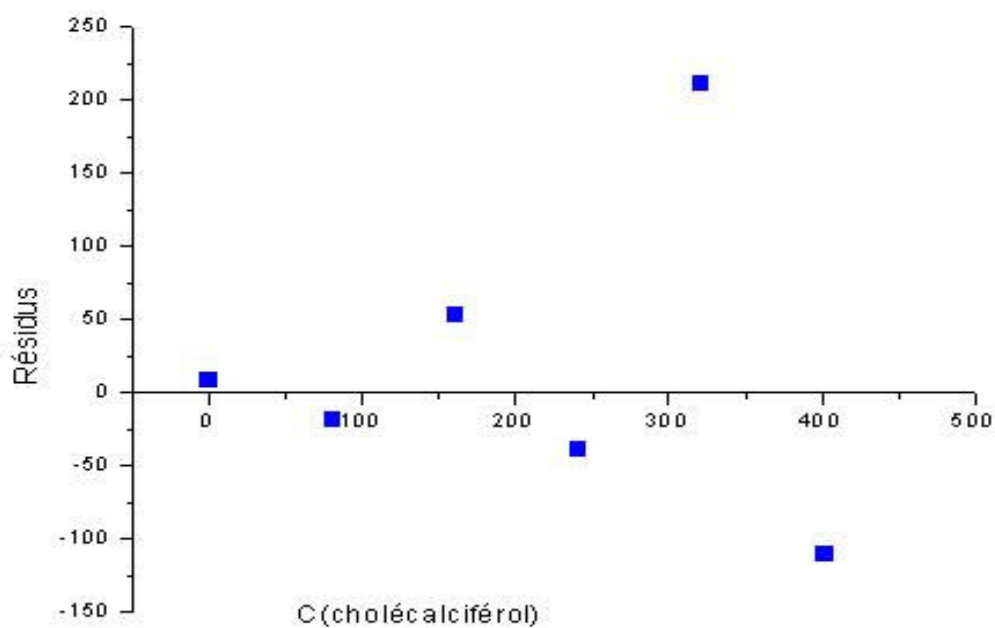


Figure 2.7 : Distribution des résidus en fonction des rapports des concentrations.

2.9.2. Limite de détection et de quantification

- La limite de détection (LOD) d'une procédure d'analyse est la plus petite de l'analyte dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte, dans les conditions expérimentales décrites de la procédure.
- La limite de quantification (LOQ) est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie.

Les deux paramètres ont été calculés comme le signal équivalant à 3 fois et 10 fois le bruit de fond chromatographique en conditions de travail. Le logiciel « labsolution » de l'appareil a donné la valeur de ce bruit, les résultats des calculs sont regroupés dans le tableau suivant :

BF	LOD=3.BF (nmol/l)	LOQ=10.BF (nmol/l)
3	0.150	0.5

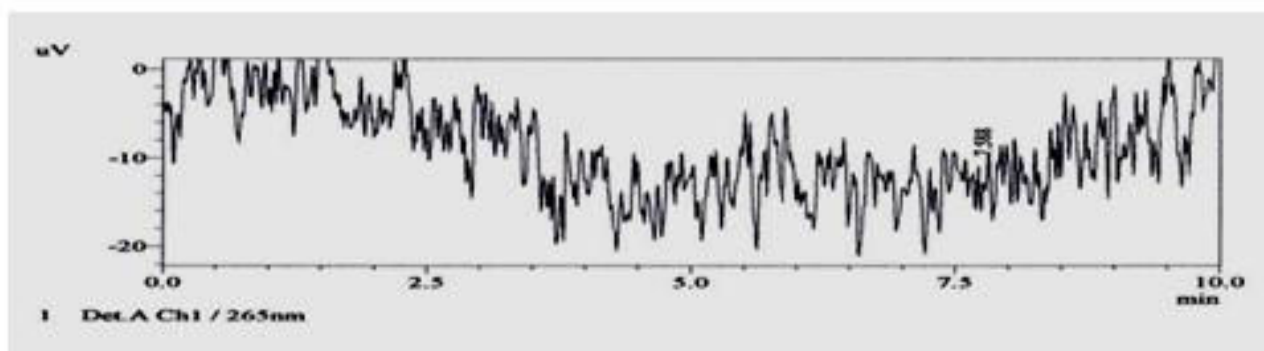


Figure 2.8 : Bruit de fond chromatographique en conditions de travail.

2.9.3. La répétabilité

Même jour

La répétabilité est testée en effectuant six analyses consécutives d'un échantillon de plasma dans le même jour. Les résultats sont comme suite

Tableau 2.4 : Résultats de répétabilité de même jour

Essais	Concentration en (nmol/L)
1	51.042
2	51.622
3	51.462
4	52.148
5	53.146
6	52.647
Moyenne	52.011
Ecart-type	0.787
CV (%)	1.514

Entre jours

La répétabilité est déterminée en faisant l'analyse d'un même plasma à six dates différentes. Les résultats sont les suivants :

Tableau 2.5 : Résultats de répétabilité entre jours.

Essais	Concentration en (nmol/L)
1	54.047
2	53.307
3	53.013
4	53.235
5	53.164
6	52.166
Moyenne	53.156
Ecart-type	0.604
CV (%)	1.136

Les résultats de la répétabilité dans les deux cas sont acceptables (< 5%) pour dire que la méthode est fiable.

2.9.4. La récupération

La récupération est déterminée en dopant un plasma de concentration connu à trois niveaux (70, 100 et 130 %), l'analyse de chaque niveau est répétée six fois. Les pourcentages de récupération sont calculés par la relation suivante :

$$\text{Récupération (\%)} = \frac{C_f - C}{C_a} \times 100$$

C_f : Concentration mesurée d'un échantillon fortifié.

C : Concentration mesurée d'un échantillon non fortifié.

C_a : Concentration de la substance ajoutée

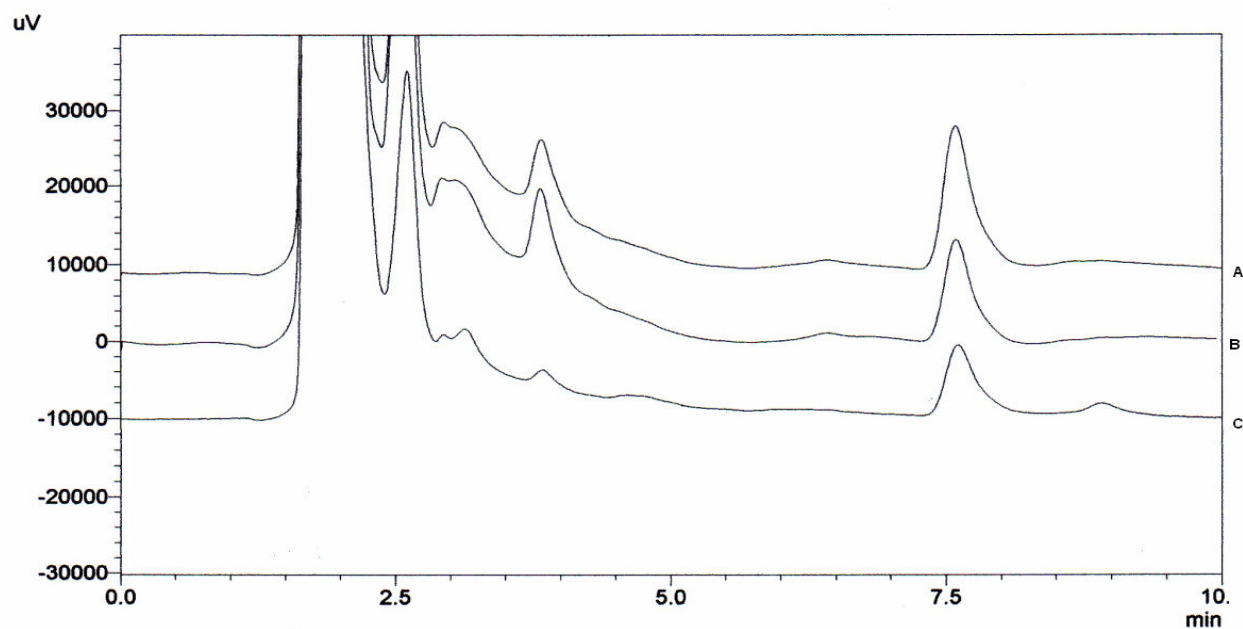


Figure 2.9 : A. Plasma dopé à 130 %

B. Plasma dopé à 100 %

C. Plasma dopé à 70 %

Tableau 2.6 : Pourcentage de récupération pour un même plasma.

Niveau	Pourcentage (%)
1	82
2	108
3	122