



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

**UNIVERSITÉ ABOU-BEKR BELKAID - TLEMCCEN**

# THÈSE

Présentée à :

FACULTÉ DES SCIENCES – DÉPARTEMENT DE CHIMIE

Laboratoire de Spectrochimie et Pharmacologie Structurale

Pour l'obtention du diplôme de :

**DOCTORAT EN SCIENCES**

Spécialité : Chimie

Option : Spectrochimie et méthodes d'analyse

Par :

**Mr DJELLOULI Omar**

Sur le thème

---

## **Quantification de l'incertitude de mesures des dosages des micronutriments par des méthodes spectroscopiques et chromatographiques**

---

Soutenue publiquement le 09/02/ 2019 à Tlemcen devant le jury composé de :

Mr. LARABI Lahcéne,	Professeur,	Univ. Tlemcen,	Président
Mr. DAHMANI Benamar,	Professeur,	Univ. Tlemcen,	Directeur de Thèse
Mr. BENAMAR Mohamed El Amine,	Professeur,	Univ. Blida I ,	Examineur
Mr. HAMZAOUI Saad,	Professeur,	USTO Oran,	Examineur
Mr. HAREK Yahia,	Professeur,	Univ. Tlemcen,	Examineur
Mr. CHEKNANE Benamar,	MCA,	Univ. Blida I,	Examineur

اللهم اجعل خالص هذا العمل في ميزان حسنات والدي

À ma femme et à mes enfants  
Je prie Allah le tout puissant de les bénir  
et de les garder de tout mal.

## بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

الحمد لله الذي وفقني بمنه وكرمه لإعداد هذه الأطروحة راجيا منه عز وجل أن يتقبلها مني عملا خالصا لوجهه الكريم ويبارك لي فيه. كما أسأله سبحانه وتعالى أن يتجاوز عني ما خفي فيه من أخطاء وزلات، تطهيرا لنفسي من كل عجب ورياء وسمعة وأن يرفع به درجاتي ويمحو به سيئاتي.

اللهم ألهمني أن أستخلص ما فيه من كل خير ونفع، وجنبي أن أخوض فيما لا ينفع، آمين.  
وصلي اللهم وسلم وبارك على أشرف المرسلين سيدنا محمد وعلى آله وصحبه أجمعين.

قال رسول الله ﷺ

﴿ لا يشكر الله من لا يشكر الناس ﴾

Ne remercie pas Allah celui qui ne remercie pas les gens

صدق رسول الله ﷺ

## Remerciements

---

Je tiens à souligner que ce travail n'aurait pas pu être achevé sans la bénédiction de mes chers parents, je les remercie de tout mon cœur pour leurs soutiens et leurs sincères prières. "Ô Allah, fais guérir ma mère. Ô Allah, pardonne à mon père et fais-lui miséricorde".

Je remercie ma très chère épouse, pour son aide et sa présence permanente à mes côtés au cours de ce parcours qui était souvent pénible, d'assumer la plus grande part de responsabilité dans l'éducation et le soin des enfants.

J'ai une pensée aussi toute particulière à mes sœurs et frères pour leurs soutiens et leurs encouragements, à tous les membres de ma famille, merci.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude à mon promoteur de thèse, professeur DAHMANI Benamar, directeur du Laboratoire de Spectrochimie et Pharmacologie Structurale de l'université de Tlemcen, pour son appui inconditionnel, ses précieux conseils et surtout pour sa patience le long de toutes ces années d'encadrement.

Je voudrais remercier vivement les honorables membres de jury de cette thèse, au professeur LARABI Lahcène de l'université de Tlemcen, d'avoir accepté de présider ce jury de soutenance, merci également aux professeurs HAMZAOUI Saad de l'université des sciences et technologies d'Oran, HAREK Yahia de l'université de Tlemcen, BENAMAR Mohamed El Amine de l'université de Blida et au docteur CHEKNANE Benamar de l'université de Blida, d'avoir accepté de juger ce travail. Je crois fortement à l'apport de leurs interventions dans l'enrichissement et l'amélioration des propos de cette thèse.

Je remercie chaleureusement professeur Philippe Hubert de l'université de Liège de m'avoir accueilli dans son laboratoire de chimie analytique, ainsi qu'à l'ensemble des membres de son staff, pour l'hospitalité généreuse que j'ai ressentie de leurs parts.

Je tiens tout particulièrement à remercier Eric Rozet statisticien principal supérieur à Arlenda, Belgique, pour sa disponibilité et son assistance, depuis mon passage à l'université de Liège.

Mes remerciements vont également à mes amis Mohamed Bouaouina médecin à l'hôpital de Lure en France et à Karim Bindouza de Liège pour leurs précieux supports. Finalement, je désire adresser mes remerciements à tous mes amis et collègues, pour leurs soutiens et leurs encouragements.

## Sommaire

Résumé	5
Liste de publications et communications	8
Listes des figures	9
Liste des tableaux	10
Liste des abréviations	11
<b>Objectifs et structure de la thèse</b>	<b>12</b>
<b>Chapitre I : Analyse des micronutriments vitamines</b>	<b>18</b>
I. 1. Introduction	19
I. 2. Analyse des vitamines	21
I. 3. Méthodes HPLC pour le dosage des vitamines	22
I. 3. 1. Traitement des échantillons dans le but d'une analyse de vitamines par HPLC	23
I. 3. 1. 1. Nature des échantillons	23
I. 3. 1. 2. Extraction des vitamines	23
I. 3. 1. 3. Mode directe du traitement de l'échantillon	24
I. 3. 1. 4. Mode indirecte du traitement de l'échantillon	24
I. 3. 2. Conditions chromatographiques	26
I. 3. 2. 1. Séparation	26
I. 3. 2. 2. Détection	26
I. 4. Aspect chimique des vitamines A & E	28
I. 4. 1. Définition structure et nomenclature	28
I. 4. 1. 1. Vitamine A	28
I. 4. 1. 2. Vitamine E	30
I. 5. Concept nutritionnel et biochimique	31
I. 5. 1. Apports nutritionnels de référence	31
I. 5. 2. Sources alimentaires	34
I. 5. 3. Absorption et transport	35
I. 5. 4. Fonctions physiologiques	37
I. 5. 5. Carence	41
I. 5. 6. Toxicité	42
I. 6. Le rétinol et l' $\alpha$ -tocophérol indicateurs biochimiques	42
I. 6. 1. Propriétés physicochimiques du rétinol et de l' $\alpha$ -tocophérol	43
I. 6. 1. 1. Stabilité	43
I. 6. 1. 2. Propriétés spectroscopiques du rétinol et de l' $\alpha$ -tocophérol	44
I. 7. Références	45
<b>Chapitre II : Validation des procédures bioanalytiques</b>	<b>52</b>

II. 1. Introduction	53
II. 2. Cycle de vie d'une procédure analytique	54
II. 3. Validation des méthodes bioanalytiques	55
II. 3. 1. Définitions	55
II. 3. 2. Critères de validation	56
II. 3. 3. Validation par la stratégie du profil d'exactitude	59
II. 3. 3. 1. Notion de l'erreur totale	59
II. 3. 3. 1. 1. Fidélité	60
II. 3. 3. 1. 2. Justesse	60
II. 3. 3. 1. 3. Exactitude	60
II. 3. 3. 2. Planification des expériences de validation	62
II. 3. 3. 2. 1. Plan d'étalonnage	63
II. 3. 3. 2. 2. Plan de validation	63
II. 3. 3. 3. Construction du profil d'exactitude	63
II. 3. 3. 4. Illustration graphique du profil d'exactitude	66
II. 4. Références	68
<b>Chapitre III : Incertitude de mesure dans les essais chimiques</b>	<b>71</b>
III. 1. Introduction	72
III. 2. Définition de l'incertitude de mesure	72
III. 3. Evaluation de l'incertitude de mesure	73
III.4. Les différentes approches pour l'évaluation de l'incertitude de mesure	75
III.5. Approche intra-laboratoire pour l'évaluation de l'incertitude de mesure	77
III. 5. 1. Approche de modélisation (ISO-GUM)	77
III. 5. 1. 1. Spécification du mesurande	77
III. 5. 1. 2. Identification des sources d'incertitude	79
III. 5. 1. 3. Quantification des composantes et calcul des incertitudes types	79
III. 5. 1. 3. 1. Évaluation type A	79
III. 5. 1. 3. 2. Évaluation type B	80
III. 5. 1. 4. Calcul de l'incertitude type composée et l'incertitude élargie	81
III. 5. 1. 4. 1. Incertitude type composée	81
III. 5. 1. 4. 1. 1. Grandeurs d'entrée non corrélées	81
III. 5. 1. 4. 1. 2. Grandeurs d'entrée corrélées	82
III. 5. 1. 4. 2. Incertitude élargie	82
III. 5. 2. Approche basé sur les données de validation d'un seul laboratoire	83
III. 6. Références	86
<b>Chapitre IV : Estimation de l'incertitude par approche de validation</b>	<b>89</b>
IV. 1. Matériels et méthode	90
IV. 1. 1. Réactifs	90
IV. 1. 2. Instruments	90

IV. 1. 3. Méthode	91
IV. 1. 3. 1. Conditions chromatographiques	91
IV. 1. 3. 2. Manipulation des étalons et des échantillons de plasma	91
IV. 1. 3. 2. 1. Préparation des étalons	91
IV. 1. 3. 2. 2. Préparation des échantillons de plasma	93
IV. 1. 3. 3. Plan expérimental de validation	93
IV. 2. Résultats et discussions	94
IV. 2. 1. Analyse spectroscopique	94
IV. 2. 1. 1. Analyse qualitative (déterminer les longueurs d'onde maximale)	95
IV. 2. 1. 2. Analyse quantitative	96
IV. 2. 2. Avantage de l'étalonnage interne	96
IV. 2. 3. Validation	101
IV. 2. 3. 1. Pureté des étalons	101
IV. 2. 3. 2. Sélectivité	101
IV. 2. 3. 3. Effet de matrice	107
IV. 2. 3. 4. Fonction de réponse	110
IV. 2. 3. 4. 1. Prédiction inverse pour la détermination de la concentration des standards de validation	110
IV. 2. 3. 4. 2. Alignement des observations	113
IV. 2. 3. 5. Efficacité de l'extraction	120
IV. 2. 3. 6. Fidélité	121
IV. 2. 3. 7. Justesse	121
IV. 2. 3. 8. Calcul du profil d'exactitude	121
IV. 2. 3. 9. Linéarité	126
IV. 2. 3. 10. Limite de détection et limite de quantification	128
IV. 2. 4. Estimation de l'incertitude par approche validation	128
IV. 2. 4. 1. Identification des sources d'incertitude par diagramme d'Ichikawa	128
IV. 2. 4. 2. Estimation de l'incertitude combinée	130
IV. 2. 4. 3. Estimation de l'incertitude élargie	130
IV. 2. 5. Estimation de l'incertitude en utilisant les données de charte de contrôle	131
IV. 3. Références	133

## **Chapitre V : Estimation de l'incertitude de mesure par approche de modélisation** 135

V. 1. Construction du modèle mathématique et identification des sources	136
V. 2. Estimation des composantes d'incertitude	137
V. 2. 1. L'incertitude relative aux essais spectrométrique	138
V. 2. 2. Incertitude due à la pureté des étalons	139
V. 2. 3. Incertitude due au pipetage	140
V. 2. 4. Incertitude issue du taux de recouvrement	144

V. 2. 5. Incertitude associée aux paramètres chromatographiques	145
V. 2. 5. 1. Effet de Détection	148
V. 2. 5. 2. Effet du débit de la phase mobile	149
V. 2. 5. 3. Effet de bruit de la ligne de base	149
V. 2. 5. 4. Variabilité du temps de rétention	151
V. 2. 5. 5. Effet de la dérive de la ligne de base	152
V. 3. Calcul de l'incertitude type combinée	157
V. 4. Calcul de l'incertitude élargie	158
V. 5. Comparaison avec les résultats de l'estimation de l'incertitude de mesure par approche de validation	159
V. 3. Références	161
<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>163</b>

## Résumé

Actuellement, il est de pratique courante d'associer l'incertitude de mesure au mesurande, afin de juger la qualité d'un résultat lié au processus de mesure. Cependant, l'amélioration de ce paramètre ainsi que l'adaptation de ses modes d'estimation restent toujours un défi analytique, notamment dans les essais chimiques. Ce manuscrit , présente un mode d'estimation de l'incertitude de mesure basée sur l'équation d'étalonnage linéaire à un point afin d'établir une approche "Bottom-up" pour l'estimation de l'incertitude de mesure d'une méthode quantitative HPLC-UV basée sur une conception d'étalonnage multipoints. Pour démontrer ce mode d'estimation, nous avons suivi comme exemple d'intérêt les influences résultant de la détermination simultanée de deux indicateurs biochimiques, à savoir les vitamines du plasma humain, le rétinol et l' $\alpha$ -tocophérol. Les résultats de cette estimation ont montré une cohérence par rapport à ceux obtenus avec la méthode alternative basée sur les calculs de validation, où les incertitudes élargies ont été trouvées inférieures à 15% pour les faibles concentrations des deux molécules et à un niveau de confiance de 95%. Cependant, l'approche de modélisation montre tous les avantages de son utilisation pour identifier et quantifier toutes les contributions d'incertitude découlant des différentes étapes du processus analytique et semble être tout à fait réalisable pour les méthodes HPLC comparatives.

## Abstract

Currently, it is common practice to associate measurement uncertainty with the measurand, in order to judge the quality of a result related to the measurement process. However, the improvement of this parameter as well as the adaptation of its estimation methods remain an analytical challenge, especially in chemical tests. This manuscript outline an uncertainty estimation mode based on the one point linear calibration equation, to fully establishing a “bottom-up” approach for estimating the measurement uncertainty of a multi-point calibration-based HPLC-UV quantitative method. To demonstrate this method of estimation, we have followed as an example of interest the influences resulting from the simultaneous determination of two biochemical indicators, namely the vitamers of human plasma retinol and  $\alpha$ -tocopherol. The results of this estimation showed consistency with those obtained with the alternative method based on validation calculations, where the expanded uncertainties were found less than 15% for the weak concentrations of the two molecules, at a 95% confidence level. However, the modelling approach shows all the benefits of its use to identify and quantify all the uncertainty contributions arising from the different steps of the analytical process and seems to be quite achievable for comparative HPLC methods.

## ملخص

في الوقت الحالي أصبح من التطبيقات الشائعة، إضافة ترتيب القياس الى المقدار المقاس من اجل الوقوف على جودة النتيجة المتعلقة بآلية القياس. ومع ذلك يظل تحسين هذا العامل بالإضافة الى تكييف أساليب تقديره يشكلان دائماً تحدي تحليلي يتعين معالجته، خاصة في الاختبارات الكيميائية. نقدم في هذه الأطروحة طريقة لتقييم ترتيب القياس باعتماد معادلة المعايرة الخطية الموافقة لمستوى واحد، وذلك من أجل تأسيس مقارنة تصاعدية "Bottom-up" لتقدير الارتفاع الخاص بطريقة تحليلية كمية HPLC-UV مبنية على تصميم معايرة متعددة المستويات. ولا ثبات هذه الطريقة، تتبعنا كمثل ذا أهمية، التأثيرات الناتجة اثناء التحديد المتزامن للرتنول التوكوفول، المؤشرين البيوكيميائيين في البلازما البشري للفيتامين أ و هـ. نتائج هذا التقدير أظهرت اتساقاً مع تلك التي تم الحصول عليها باستخدام الطريقة البديلة المعتمدة على حسابات التحقق من كفاءة الطريقة تحليلية، حيث تم الحصول عند مستوى ثقة 95٪ على ترتيب نسبي موسع أقل من 15٪ للتركيز الضعيفة لكلا الجزئين. مع ذلك، فإن مقارنة النمذجة هذه بينت جميع فوائد استخدامها لتحديد وقياس جميع مساهمات الارتفاع الناشئة عن الخطوات المختلفة للعملية التحليلية، كما يبدو أنه يمكن تحقيقها تماماً في طرق HPLC المبنية على المقارنة.

## Liste des publications et communications

---

### Articles

Omar Djellouli, Eric Rozet, Benamar Dahmani and Philippe Hubert,

Compromise in uncertainty estimation by the modelling and validation approaches of an HPLC-UV method for vitamins A&E biochemical indicators measurement, *Analyst*, **2018**, 143, 1492–1501. (RSC, UK)

O. Djellouli, H. Bensaoula, B. Dahmani.

Uncertainty contribution of the chromatographic factors during an HPLC-UV elution of four vitamins compounds, *Der Pharma Chemica*, **2016**, 8(17):105-112.

### Communications

O. Djellouli, B. Dahmani

Uncertainty contribution of the baseline noise effect during an HPLC-UV elution of four vitamins compounds, 23rd International Symposium on Separation Sciences (ISSS 2017), 19-22 September **2017** Vienna, Austria

O. Djellouli, B. Dahmani, H. Bensaoula, E. Rozet, Ph. Hubert

Experiments by accuracy profile methodology a compromise to fill the Bottom-up approach for the estimation of measurement uncertainty, 7<sup>th</sup> European conference on analysis analytical chemistry, 25-29 August **2013** Warsaw, Poland.

O. Djellouli, B. Dahmani, H. Bensaoula, E. Rozet, Ph. Hubert,

Validation by accuracy profile methodology an evidence in the assessment of plasmatic fat-soluble vitamins by an RP-HPLC-UV procedure, 10<sup>ème</sup> Congrès francophones de l'AfSep sur les sciences séparatives et les couplages, 4-7 juin **2013** Paris, France.

O. Djellouli, B. Dahmani, H. Bensaoula.

Measurement uncertainty in Bioanalytical procedures, 4<sup>th</sup> International Workshop Industrial Biotechnology, April **2013** Tlemcen, Algeria.

O. Djellouli, B. Dahmani., Z. Massen

Adequate RP-HPLC-UV method for the simultaneous determination of retinol and  $\alpha$ -tocopherol in human plasma, *The 5th Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry*. September 23<sup>th</sup> - 26<sup>th</sup> **2009**, in Fatsa, Turkey.

O. Djellouli, B. Dahmani, Z. Massen

Qualified handling when using retinyl acetate as an internal standard in the quantification of plasma retinol by RP-HPLC-UV, 34<sup>th</sup> HPLC2009 International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and related Techniques, June 28-Jul 2, **2009** in Dresden, Germany.

B. Dahmani, O. Djellouli., R. Laouar

Development and validation of an RP-HPLC-UV analytical method for the quantification of the  $\alpha$ -tocopherol in human plasma, *Taibah international chemistry conference-2009 (TICC-09)*, Taibah University, from 23<sup>rd</sup> to 25<sup>th</sup> of March, **2009**, in Al-Madinah Al-Munawwarah, Kingdom of Saudi Arabia.

## Liste des figures

<b>Fig. I. 1.</b> Carte conceptuelle des effets d'un apport inadéquat en vitamines.	19
<b>Fig. I. 2.</b> Principales étapes des modes de traitement d'échantillons.	24
<b>Fig. I. 3.</b> Principaux composés rétinoïdes et caroténoïdes de la vitamine A.	28
<b>Fig. I. 4.</b> Structures chimiques de base des vitamers de vitamine E.	29
<b>Fig. I. 5.</b> Absorption et transport des métabolites de vitamines A et E.	35
<b>Fig. I. 6.</b> Métabolisme général des rétinoïdes.	37
<b>Fig. I. 7.</b> Processus physiologique du cycle visuel.	38
<b>Fig. I. 8.</b> Processus antioxydant de la vitamine E dans la membrane cellulaire.	39
<b>Fig. II. 1.</b> Cycle de vie d'une méthode de mesure.	53
<b>Fig. II. 2.</b> Comparaison de deux méthodes, en utilisant la dispersion et la justesse indépendamment.	57
<b>Fig. II.3.</b> Illustration de l'erreur totale, de la justesse et de la fidélité des résultats d'une méthode analytique.	60
<b>Fig. II.4.</b> Profil d'exactitude représenté à partir des valeurs relatives en fonction de la concentration.	66
<b>Fig. III. 1.</b> Carte de route pour les différentes approches de l'évaluation de l'incertitude de mesure.	75
<b>Fig. III. 2.</b> Le processus d'évaluation de l'incertitude de mesure selon l'approche ISO GUM.	77
<b>Fig. IV.1.</b> Protocole du processus analytique réparti en quatre grandes étapes, selon un mode de traitement d'échantillon en vue d'une injection direct.	92
<b>Fig. IV.2.</b> Comparaison des spectres UV du rétinol, tocopherol et BHT.	95
<b>Fig. IV.3.</b> Comparaison de l'étalonnage externe et l'étalonnage interne d'un même plan de calibration.	97
<b>Fig. IV.4.</b> Interaction entre étalonnage externe et étalonnage interne	99
<b>Fig. IV.5.</b> Plan de calibration où les deux droites d'étalonnage donnent des modèles mathématiques de même capacité de détermination.	100
<b>Fig. IV.6.</b> Réponses HPLC-UV obtenue en mode duel à 325 nm et 292 nm.	102-106
<b>Fig. IV.7.</b> Comparaison graphique entre les droites d'étalonnage et les droites des ajouts dosés, pour inspecter l'effet de matrice.	108
<b>Fig. IV.8.</b> Estimation de l'interaction et des effets des facteurs d'influence lors de la manipulation des composés de vitamine A & E.	109
<b>Fig. IV.9.</b> Prospection graphique de la quantité native dans l'échantillon ordinaire contenant l'analyte d'intérêt.	113
<b>Fig. IV.10.</b> Profils d'exactitude de la méthode HPLC-UV	122-126
<b>Fig. IV.11.</b> Vérification de la linéarité de la méthode analytique.	127
<b>Fig. IV.12.</b> Facteurs d'influence sur le résultat de la mesure	129
<b>Fig. IV.13.</b> Comparaison des profils d'incertitude des différents modèles	131
<b>Fig. V.1.</b> Sources d'incertitude identifiées au cours des essais HPLC	147
<b>Fig. V.2.</b> Comparaison des contributions à l'incertitude des composantes identifiées durant l'essai instrumental HPLC	157
<b>Fig. V.3.</b> Magnitudes des contributions des composantes d'incertitude	159
<b>Fig. V.4.</b> Comparaison des estimations d'incertitude obtenues par les deux approches	160

## Liste des tableaux

---

<b>Tableau I.1</b> : Valeurs des apports nutritionnels de référence pour la Vitamine A	32
<b>Tableau I. 2</b> : Valeurs des apports nutritionnelles de référence pour la Vitamine E	33
<b>Tableau I.3</b> : Sources nutritionnelles en vitamine A et en vitamine E	34
<b>Tableau I.4</b> : Facteur affectants la stabilité du rétinol et de l' $\alpha$ -tocophérol	42
<b>Tableau I.5</b> : Propriétés spectrochimiques considérés dans l'analyse HPLC-UV du rétinol et de l' $\alpha$ -tocophérol	43
<b>Tableau II.1</b> : Les critères typiques de validation des méthodes d'analyse effectuées par un seul laboratoire.	56
<b>Tableau III.1</b> : Principaux documents référentiels pour l'estimation de l'incertitude de mesure	73
<b>Tableau IV.1</b> : Résultats de l'analyse de variances à deux facteurs sur les concentrations obtenues par étalonnage externe et interne.	100
<b>Tableau IV.2</b> : Résultats de l'analyse de variance à deux facteurs sur les données de la sensibilité.	107
<b>Tableau IV.3</b> : Résultats du calcul des concentrations des étalons de validation (cas rétinol)	115-116
<b>Tableau IV.4</b> : Résultats du calcul des concentrations des étalons de validation (cas tocophérol)	117-118
<b>Tableau IV.5</b> : Résultats de validation par le modèle à deux points d'une procédure HPLC-UV pour la quantification simultanée du rétinol et $\alpha$ -tocopherol dans les échantillons de plasma.	119
<b>Tableau IV.6</b> Incertitude de mesure obtenue par l'approche de validation pour le modèle d'étalonnage à deux niveaux de concentration.	130
<b>Tableau IV.7</b> : Résultats du calcul de l'incertitude des mesures effectués en routine par la procédure analytique sur des échantillons de contrôle.	132
<b>Tableau V.1</b> : Résultat de l'évaluation de la contribution de la récupération sur l'incertitude de mesure.	145
<b>Tableau V.2</b> : Estimation de la variabilité de l'aire du pic à partir de données générées aléatoirement par le logiciel	150
<b>Tableau V.3</b> : Évaluation de la contribution du temps de rétention	151
<b>Tableau V.4</b> : Résultats de l'évaluation de l'effet de la dérive observée sur les chromatogrammes des échantillons.	154
<b>Tableau V.5</b> : Résultats de la quantification de l'incertitude par approche de modélisation pour la mesure de la concentration du rétinol et de l' $\alpha$ -tocopherol.	158

---

## Liste des abréviations

---

ANREF	Apports nutritionnels de référence
AOAC	De son nom légal AOAC international
BIPM	Bureau international des poids et mesures
CEN	Comité européen de normalisation
CITAC	Coopération international de traçabilité en chimie analytique
DRIs	Valeurs nutritionnelles de référence
EFSA	Autorité européenne de sécurité des aliments
EURACHEM	Chimie analytique en Europe
EUROLAB	Fédération européenne des associations nationales de laboratoires de mesure, d'essais et d'analyse
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
FDA	Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux
GPX	Enzyme glutathion peroxydase
GSH	Enzyme glutathion
GSSG	Glutathion oxydé
GUM	Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure
HDL	Lipoprotéines de haute densité
Holo-RBP	Complexe rétinol- RBP
HPLC-UV	Chromatographie liquide haute performance avec détection UV
ICH	Conférence international d'harmonisation
IFCC	Fédération internationale de chimie clinique
ILAC	Coopération international d'accréditation de laboratoires
ISO	Organisation internationale de normalisation
JCGM	Comité mixte pour les guides en métrologie
LC-MS	Chromatographie liquide avec détection de spectrométrie de masse
LDL	Lipoprotéines de basse densité
LLIT	Bornes inférieures de l'intervalle de tolérance
LLOQ	Limite inférieure de quantification
LOD	limite de détection
NIST	Institut national des normes et de la technologie
OIML	Organisation internationale de métrologie légale
OMS	Organisation mondiale de la Santé
PUFA	Acides gras polyinsaturés
RBP	Protéine liante du rétinol
SFE	Extraction par fluide supercritique
SFSTP	Société française des sciences et techniques pharmaceutiques
SODs	Enzymes superoxyde dismutase
SPE	Extraction sur phase solide
UHPLC	Chromatographie liquide ultra haute performance
ULIT	Bornes supérieures de l'intervalle de tolérance
ULOQ	Limite supérieure de quantification
VADD	Troubles dus à la carence en vitamine A
VIM	Vocabulaire international de métrologie
VLDL	Lipoprotéines de très basse densité
$\alpha$ -TTP	Protéine de transfert de l' $\alpha$ -tocophérol
$\beta$ -IT	Intervalle de tolérance $\beta$ -expectation

---

## **Objectifs et structure de la thèse**

## Objectifs

Actuellement, l'analyse chimique est considérablement sollicitée dans la plupart des domaines d'activité. Partout dans le monde, les résultats analytiques rattachés à ces analyses sont utilisés pour répondre aux problèmes socio-économiques, tels que le contrôle des produits industriels et agroalimentaires, l'évaluation des pollutions, l'établissement des diagnostics et des traitements médicaux. Ces résultats sont employés aussi dans les discussions des accords commerciaux, pour prendre des décisions juridiques et politiques, pour fixer des normes, etc.

En parallèle à cela, une évolution continue en métrologie est toujours maintenue, dans le but d'harmoniser entre la théorie et la pratique en chimie analytique et de rattraper ainsi l'immense retard observé, par rapport aux mesures physiques. À cet effet, des efforts considérables, sous les recommandations des organismes nationaux et internationaux concernés par les mesures chimiques, telles que, l'ISO, BIPM, CITAC, NIST, CEN, ILAC, ICH, IUPAC, FDA, AOAC, EURACHEM et bien d'autres, ont été opérés pour produire des étalons et développer des méthodes standards, afin d'atteindre une traçabilité acceptable et permettre ainsi la comparabilité des résultats de mesurages à des références. Seulement, ces efforts se heurtent toujours à la réalité que la mesure en chimie est une démarche complexe et si elle est établie, elle ne se rapporte qu'à un seul domaine bien précis. En effet, dans le domaine de la chimie, les étalons ou les méthodes standards ne sont pas universels, ils sont par contre spécifiques à un seul composé dans un milieu particulier et pour une gamme de concentration donnée.

En revanche, une exigence est devenue de plus en plus respectée, que les analyses doivent être réalisées de façon organisée, pour exprimer les résultats dans un système d'unités reconnu, avec en plus de l'information sur leur qualité, c'est-à-dire l'incertitude de mesure.

Bien que le but de toute mesure est d'attribuer une valeur au mesurande ; quantité destinée à être mesurée, il est mal admis donc de ne se contenter aujourd'hui que de la forme numérique unique d'un résultat de mesure. En fait, le processus de mesure ne peut donner qu'une estimation, qui après correction, peut être très proche de la valeur du mesurande. Cette situation est encore plus délicate dans le cas des mesures chimiques où la complexité de l'échantillon d'essai empêche généralement la réalisation

des exigences métrologiques strictes pour assurer une traçabilité complète. Comme il s'agit de prendre des décisions importantes sur la base de ces mesures, il est donc encore plus judicieux d'avoir suffisamment d'informations sur la qualité des résultats, pour répondre d'une part, aux revendications de l'utilisateur final du résultat et d'autre part, pour assurer au moins la comparabilité de ce résultat, nécessaire pour une solution métrologique acceptable pour la traçabilité de la procédure analytique validée.

De ce point de vue, les méthodes chromatographiques, qui sont des méthodes comparatives, nécessitant un étalonnage, pour déterminer les quantités des analytes d'intérêt dans les échantillons inconnus, ne sont pas des méthodes primaires (définitives). Mais, elles peuvent au moins devenir des méthodes relativement traçables.

On doit comprendre, par conséquent, que la traçabilité de la mesure qui peut être suivie par la validation de la méthode et l'évaluation de l'incertitude qui lui est associée sont indispensables pour pouvoir utiliser un résultat analytique, n'importe où et à tout moment. Ainsi, tous les efforts sont concentrés sur ces deux critères pour améliorer la qualité de l'analyse chimique. En effet, la validation de la méthode analytique et l'incertitude de mesure sont deux tâches métrologiques fortement exigées, par les organes de réglementation concernés par la mesure chimique et qui peuvent être établies en planifiant des essais répétés pour une gamme de concentration donnée.

Cela permet, d'une part, de justifier la fiabilité des résultats obtenus par la procédure analytique en question, en déterminant les critères de validation, où le biais et la précision sont considérés comme les paramètres clés de performance. D'autre part, d'avoir une indication quantitative sur la qualité des résultats, en utilisant dans de nombreux cas le calcul de ces mêmes paramètres pour estimer l'incertitude de mesure.

L'approche "Bottom-up", dite aussi approche ISO-GUM, et l'approche de validation sont les plus évoquées pour estimer l'incertitude dans le cas des mesures chimiques, à cause de leur faisabilité en interne, où l'étude se consacre seulement, sur les variations des paramètres d'influences au sein d'un même laboratoire (Approche intra-laboratoire). Alors que dans la majorité des cas, les études sur l'incertitude sont portées sur une évaluation par approche de validation, reconnue par tous les textes normatifs et

guides référentiels récents en tant qu'approche alternative cohérente avec les principes du guide ISO-GUM pour l'expression de l'incertitude de mesure.

Par contre, l'approche "Bottom-up", particulièrement recommandée par ces mêmes documents référentiels, repose essentiellement sur un modèle mathématique, qui relie normalement tous les paramètres influençant (quantités d'entrée) sur la quantité de sortie. Cette approche est souvent critiquée comme étant inapplicable dans les mesures chimiques, le déclin à son utilisation pour estimer l'incertitude est souvent justifié par la complexité des échantillons chimiques, dont les étapes de traitement ne tolèrent pas l'achèvement de ce modèle. Cette réserve est également référée à des raisons économiques ; comme cela peut être laborieux lors de l'exécution de son processus expérimental associé. Mais, il convient toutefois de noter qu'un large éventail de données, deviennent disponibles dès la fin des expériences de validation, comme les données des paramètres chromatographiques. Plus particulièrement celles du temps de rétention, qui pourront être utilisées efficacement pour soutenir l'estimation de l'incertitude de manière ascendante conformément aux exigences ISO-GUM.

Dans ce travail nous avons fixé comme objectif principal, d'effectuer une évaluation de l'incertitude de mesure d'une méthode quantitative HPLC-UV selon l'approche "Bottom-up", en admettant comme modèle mathématique la fonction de réponse correspondante au modèle de calibration à un point, malgré une conception quantitative multipoints du plan d'étalonnage. Nous avons démontré dès lors le bien-fondé de cette hypothèse, qui conduit précisément à l'identification et à la quantification de toutes les composantes d'incertitude et couvrant ainsi les erreurs qui peuvent surgir des principales étapes d'une méthode physico-chimique d'analyse, basée sur un étalonnage multipoints. Cette estimation est basée essentiellement sur les données issues des étapes de validation, dont les expérimentations ont été réalisées selon la nouvelle stratégie de validation par profil d'exactitude. Cette démarche repose sur deux concepts complémentaires, la limite d'acceptation ( $\pm \lambda$ ), qui est une valeur prédéfinie telle qu'elle est exigée par la pratique professionnelle acceptée, par exemple  $\pm 15\%$  pour les procédures bioanalytiques et l'intervalle de tolérance  $\beta$ -expectation ( $\beta$ -IT), qui délimite une plage dans laquelle il est prévu que chaque résultat futur qui sera obtenu par cette procédure analytique y sera inclus avec une probabilité égale à  $\beta$  (par exemple 95%). Dans la mesure où cet intervalle est compris dans les limites d'acceptation, la procédure

analytique est considérée comme valide. Ce qui nous a permis de fixer en plus comme deuxième objectif, la comparaison des résultats de cette évaluation à ceux trouvés par l'autre approche alternative de validation de l'incertitude.

Nous avons utilisé comme support pour accomplir cette étude, une méthode quantitative HPLC pour le dosage simultané de deux indicateurs biochimiques, notamment, le rétinol et l' $\alpha$ -tocophérol qui sont les métabolites plasmatiques prédominants de la vitamine A et de la vitamine E, respectivement.

### **Structure de la thèse**

Ce manuscrit de cette thèse est structuré selon les cinq chapitres suivants :

**Le chapitre I** est consacré aux micronutriments, en particulier les vitamines. On rappelle en premier plan, sur l'importance de l'analyse des vitamines et les méthodes analytiques convenant leurs dosages, plus précisément les méthodes quantitatives de chromatographie HPLC, on montre par cette évocation que ces stratégies comparatives peuvent se résumer suivant certaines étapes analytiques similaires, ce qui justifie la limitation de la matière étudiée à deux vitamines seulement. En deuxième plan on discute l'aspect biochimique et nutritionnel, qui permet à travers ces deux vitamines de montrer l'importance de l'ensemble des micronutriments pour la santé humaine. On évoque surtout leurs fonctions physiologiques les mieux étudiées, les recommandations à leurs apports et les risques liés à leurs carences. Finalement, on aborde les propriétés physico-chimiques, décisives dans l'analyse HPLC de leurs indicateurs biochimiques, notamment, le rétinol et l' $\alpha$ -tocophérol.

**Le chapitre II** rappelle les définitions de la validation des méthodes analytiques, relatives aux différentes étapes du cycle de vie d'une procédure bioanalytique, on discute ici les principaux critères de performances visés dans la validation des méthodes utilisées par un seul laboratoire. On introduit ensuite la terminologie et le principe de la nouvelle méthodologie de validation par profil d'exactitude, à savoir la notion d'erreur totale, le calcul de l'intervalle de tolérance et les protocoles d'organisation des essais de validation par cette stratégie.

**Le chapitre III** est consacré à l'estimation de l'incertitude de mesure, on met le point sur son statut dans les milieux, académiques et socio-économiques, on donne les différentes définitions des termes connexes, on appuie cette discussion par les recommandations et exigences des textes normatifs récents, on rapporte par la suite les difficultés et les obstacles rencontrés au cours de l'évaluation de l'incertitude dans le cas des mesures chimiques. On fait ensuite une mise à jour sur les différentes approches homologuées par ces textes référentiels, pour contourner ces difficultés, principalement, les approches conçues pour être réalisées dans un même laboratoire. Les méthodes de calcul de l'incertitude sont aussi pleinement discutées à ce niveau.

**Le chapitre IV** et le **chapitre V** sont destinés à la partie expérimentale de ce manuscrit. On discute les résultats obtenus par des protocoles établis conformément aux théories discutées dans les chapitres II et III.

Dans le **chapitre IV** on discute l'estimation de l'incertitude par l'approche de validation. Pour cela on détermine les critères de validation nécessaires et on vérifie ensuite la validation de la méthode par la méthodologie du profil d'exactitude. Finalement, on évalue l'incertitude de mesure relative aux résultats déterminés par cette méthode.

**Le chapitre V** est destiné à l'évaluation de l'incertitude par approche de modélisation. Ici on justifie l'utilisation du modèle d'étalonnage linéaire à un point, pour identifier toutes les sources d'incertitude imposantes sur la quantification de la concentration selon une conception d'étalonnage multipoints. Par contre, les calculs et les expressions de l'incertitude sont faits selon les principes du GUM.

À la fin, on termine de cette discussion par la comparaison des résultats de l'estimation de l'incertitude issus des deux approches (intra-laboratoire) permises dans ce travail. Afin de tirer un compromis qui avantage la quantification de l'incertitude de mesure pour une variété de mesures chimiques comparatives, en particulier les méthodes chromatographiques HPLC. Ceci, vis-à-vis la méthodologie analytique et indépendamment de la nature du composé chimique étudié.

## **Chapitre I**

### **Analyse des micronutriments vitamines**

## I. 1. Introduction

Pour survivre normalement, l'être humain a besoin de certains composants essentiels, appelés micronutriments et qui ne lui sont accessibles dans la majorité des cas, qu'à travers son régime alimentaire. Contrairement aux autres aliments dits macronutriments, tels que les protéines, les glucides et les lipides. Les micronutriments, qui regroupent les vitamines et les minéraux (oligo-éléments), n'ont aucun rôle énergétique et ils ne sont indispensables qu'à très faibles quantités [1]. Il est reconnu maintenant dans la nutrition humaine que seuls treize types de molécules répondent au terme vitamine [2]. Ces composants diffèrent largement dans leurs structures chimiques, leurs propriétés physicochimiques et leurs activités biologiques. Les vitamines sont réparties selon leurs solubilités en deux classes. On distingue ainsi : les vitamines solubles dans l'eau (hydrosolubles), qui sont les B-complexes (B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9, B12) et la vitamine C.

L'autre classe regroupe les vitamines (A, E, D et K) qui sont solubles dans les lipides (liposolubles). Le corps humain ne peut synthétiser que trois parmi les treize vitamines, notamment, les vitamines D, la biotine et l'acide pantothénique. Et même pour celles-là, les quantités peuvent ne pas être suffisantes pour réjouir d'une bonne santé [1]. La présence des vitamines aux teneurs requises permet de réguler les réactions biochimiques nécessaires à un métabolisme normal et au bon déroulement des différentes fonctions physiologiques de l'organisme humain. Sans quoi, leurs insuffisances peuvent provoquer des symptômes manifestes de carence, qui conduit à de graves conséquences sur la santé. D'autre part, lorsque leurs quantités deviennent excessives, cela peut également favoriser des effets de toxicité ; qui peut être néfaste aussi pour la santé.

C'est pourquoi la détermination du statut de ces composants est d'un grand intérêt analytique, pour prévoir l'état nutritionnel et de santé dans les populations. La figure (I.1), reprise avec une légère modification de la référence [3], représente une carte conceptuelle des effets de l'apport inadéquat en vitamines. En raison de cette importance, l'exigence de résultats précis sur les formes et les concentrations de vitamines est devenue plus stricte au cours des dernières années [4].

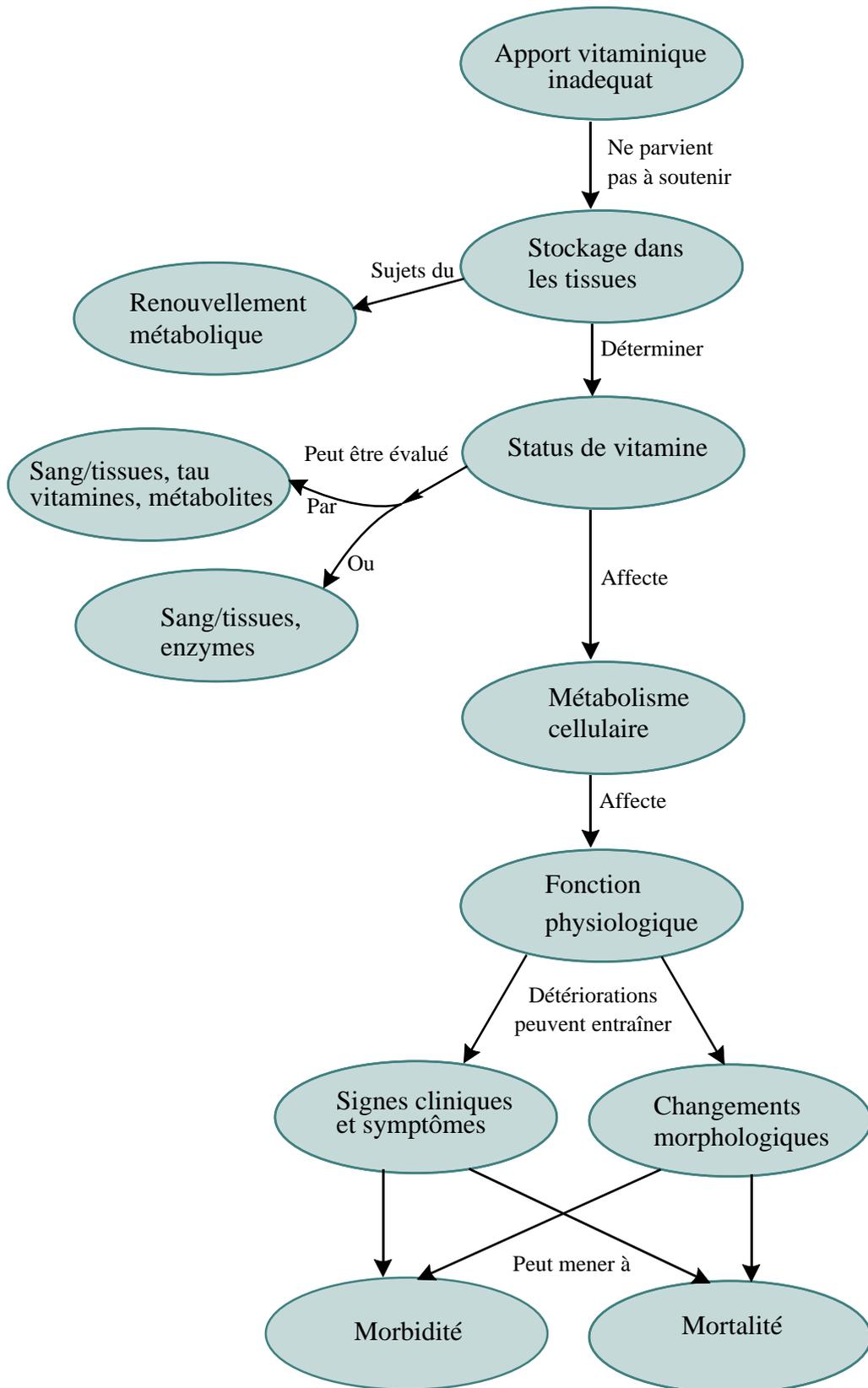


Fig. I.1. Carte conceptuelle des effets d'un apport inadéquat en vitamines selon [3].

## I. 2. Analyse des vitamines

L'importance de l'analyse des vitamines dans différents types d'échantillons est bien constatée dans la détermination de leurs statuts et l'évaluation de la prévalence de leurs carences dans les populations. De savoir quels sont les besoins nutritionnels chez les humains et chez les animaux, de déterminer les apports alimentaires afin d'évaluer l'adéquation du régime alimentaire et améliorer la nutrition humaine dans le monde entier. Aussi, autant que ces analyses soient fiables, le fabricant et le consommateur seront assurés de l'exactitude de l'étiquetage des aliments [5].

Les essais sur les vitamines peuvent être répartis en trois grandes classes comme suit :

1. Essais biologiques (bio essais) : ces essais exigent l'intervention in vivo sur les humains et les animaux,
2. Essais microbiologiques : ils nécessitent l'utilisation des organismes protozoaires, bactéries et levures,
3. Essais chimiques : ces essais regroupent l'ensemble des méthodes spectrométriques UV-Vis et de fluorescences, chromatographiques, enzymatiques, immunologiques et radiométriques.

De nos jours, on retrouve de plus en plus, dans la littérature, de nouvelles procédures basées principalement sur la chromatographie liquide haute performance et qui sont bien adaptées pour l'analyse des vitamines. Actuellement, les méthodes de chromatographie liquide (LC) sont devenues le premier choix pour déterminer les vitamines, du fait de leurs précisions, rapidité et faible coût. Ce qu'on observe clairement, dans leurs adoptions par les institutions s'intéressant à la mesure et la normalisation [5-7].

Ceci contrairement à de nombreuses méthodes, même internationales, basées sur les dosages microbiologiques, qui sont regardées maintenant comme obsolètes, longues, coûteuses et caractérisées par une incertitude très élevée [4]. On doit s'attendre donc, avec l'élaboration de plus en plus de méthodes officielles utilisant l'HPLC et l'UHPLC, que le recours aux tests microbiologiques pour le dosage des vitamines devrait certainement diminuer avec le temps.

### I. 3. Méthodes HPLC pour le dosage des vitamines

Plusieurs méthodes sont validées pour la détermination de vitamines dans leurs échantillons réels, soit individuellement ou simultanément, ou même souvent combinés entre eux, qu'elles soient hydrosolubles ou liposolubles. Ces méthodes visent l'amélioration de la préparation des échantillons en maximisant l'extraction sans détruire les vitamines et optimisant ainsi la détectabilité lorsque les quantités naturelles sont très faibles.

Le dosage des vitamines par les méthodes HPLC, commence toujours par un traitement d'échantillon, où la vitamine est extraite de sa matrice naturelle avant l'analyse. Selon la nature de l'échantillon et la forme de la vitamine, ce traitement d'échantillon peut comprendre une ou plusieurs étapes, par exemple : chauffage, traitement acide, traitement basique, digestion enzymatique, solvants organiques, etc. Alors que ces étapes d'extraction au cours d'une procédure analytique spécifique d'une vitamine sont généralement établies, avec la vigilance de ne pas détériorer ni de perdre l'analyte étudié. Aussi, ces étapes peuvent convenir à d'autres procédures pour une extraction combinée de plusieurs vitamines.

À cet effet, les critères de sélection pour un dosage particulier dépendent d'un certain nombre de facteurs, dont l'exactitude et la précision bien sûre, mais également de facteurs économiques et de la quantité d'échantillon à traiter [5]. Dans tous les cas, le traitement de l'échantillon doit être effectué de façon prudente et rigoureuse afin de limiter les pertes dues à l'instabilité des vitamines. En effet, ces composés sont facilement dégradables au cours de leurs manipulations. D'autre part, leurs quantités recherchées pendant l'analyse sont généralement très faibles et n'aident pas à résister à cette perte lorsque ces molécules seront extraites de leurs matrices natives.

D'autres facteurs comme le pH, les métaux traces, etc. peuvent aussi amener à cette inactivation [4]. Pour minimiser cette influence et éviter la dégradation des vitamines il est nécessaire d'utiliser une verrerie appropriée (ambrée), opérer sous lumière très atténuée pendant toute la durée d'analyse, manipuler en présence d'un antioxydant ou dans certains cas, on préfère travailler en présence d'un gaz inerte [3].

### **I. 3. 1. Traitement des échantillons dans le but d'une analyse de vitamines par HPLC**

#### **I. 3. 1. 1. Nature des échantillons**

Divers types d'échantillons sont manipulés dans le but d'analyser les vitamines pour des fins différentes. Ainsi, les fluides biologiques comme le plasma ou sérum sont traités pour déterminer la biodisponibilité et l'état nutritionnel des vitamines, aussi pour évaluer leurs statuts pour une population. Par contre, les échantillons comme les aliments et les denrées alimentaires sont traités pour développer une base de données sur ces micronutriments, d'évaluer leurs stabilités pendant le stockage et d'estimer l'apport nutritionnel en vitamines [8, 9]. D'autres types d'échantillons, tels que certaines préparations pharmaceutiques, qui sont considérés comme des formes complètes et utilisés pour la supplémentation en vitamines et minéraux, sont aussi manipulés pour contrôler, par exemple, la qualité du produit fini, en vérifiant, les doses, les teneurs des excipients utilisés dans sa formulation et identifier les interférents potentiels de leur dégradation [10-12].

#### **I. 3. 1. 2. Extraction des vitamines**

L'extraction est l'étape cruciale dans l'analyse des vitamines à cause des difficultés qui peuvent surgir au cours de leurs manipulations et qui sont liées à leur nature même. Principalement, l'instabilité envers les facteurs environnants, la complexité de la matrice, interactions avec d'autres composés, hétérogénéité chimique et la diversité de leurs concentrations dans les échantillons [4]. Selon la nature de l'échantillon, on distingue généralement, trois procédés d'extraction des vitamines. On évoque tout d'abord l'extraction sur phase solide (SPE), cette technique a l'avantage éminent de purifier l'analyte d'intérêt, de minimiser les problèmes liés aux contaminants et de favoriser l'automatisation du procédé, en plus de concentrer l'analyte d'intérêt [13], où on procède, par exemple, à une purification sur couche mince avant analyse [14]. Le couplage de cette technique avec l'HPLC permet de quantifier efficacement les vitamines dans les échantillons cliniques et alimentaires. La majorité des applications utilisant la SPE dans le domaine clinique, par exemple, sont consacrées à la détermination de la vitamine D et de ses métabolites hydroxylés [13].

Cette technique est employée aussi pour l'extraction d'autres vitamines, comme la vitamine K ou divers métabolites de la vitamine B [15, 16].

Un deuxième procédé d'extraction se passe par fluides supercritiques (SFE), particulièrement le CO<sub>2</sub>, qui se trouve très approprié pour extraire les vitamines liposolubles de différentes matrices, comme les aliments [17, 18] et les préparations pharmaceutiques [19]. Enfin, le troisième procédé, qui nous intéresse dans la suite de cette étude, consiste à une extraction liquide-liquide, qui emploie une variété de solvants organiques, compatibles avec la composition de la phase mobile. Ce procédé est couramment utilisé pour extraire les vitamines dans les fluides humains, en utilisant généralement un équipement très simple [13]. Cependant, on constate deux modes de traitement pour manipuler les vitamines dans leurs matrices naturelles, avant de les analyser par chromatographie liquide haute performance. Ainsi, on peut opérer soit directement ou indirectement pour extraire les composés d'intérêt qu'on veut doser.

### **I. 3. 1. 3. Mode directe du traitement de l'échantillon**

Dans ce mode de manipulation, on utilise généralement des solvants appropriés, totalement miscibles avec la phase mobile et qui solubilisent parfaitement les composés d'intérêt. Dans ce cas, la procédure doit être suivie seulement des étapes d'agitation, de centrifugation et de filtration. Le liquide surnageant est injecté ensuite directement dans le système HPLC pour analyse [20–22]. Ce type de traitement exhibe des avantages souvent souhaités d'une procédure analytique, tels que, rapidité, économie et faible risque d'exposition. Mais avec l'inconvénient tout de même, du risque de détérioration de la colonne, si on ne prévient pas de séparer les particules solides, par exemple par une grande vitesse de centrifugation, une filtration sur membranes micropore et l'application d'une colonne de garde qui doit être changée régulièrement, pour protéger la colonne analytique [5, 23].

### **I. 3. 1. 4. Mode indirecte du traitement de l'échantillon**

Ce mode de traitement se caractérise par un travail laborieux de plusieurs étapes qui consiste à effectuer dans beaucoup de cas, selon la nature de l'échantillon, une hydrolyse acide ou basique [3]. L'extraction des vitamines doit être réalisée à plusieurs reprises à l'aide de solvants organiques immiscibles, en utilisant aussi les mêmes étapes

d'agitation et de centrifugation. L'opération est suivie par la récupération de la phase organique, pour les vitamines liposolubles [24, 25], ou bien la phase aqueuse dans le cas des vitamines hydrosolubles [26]. Une évaporation est ensuite entamée sous vide ou en présence d'un gaz inerte et enfin la reconstitution de la solution d'analytes d'intérêt avec un faible volume de solvant convenable, généralement de la phase mobile, pour une ultime injection dans le système HPLC pour analyse.

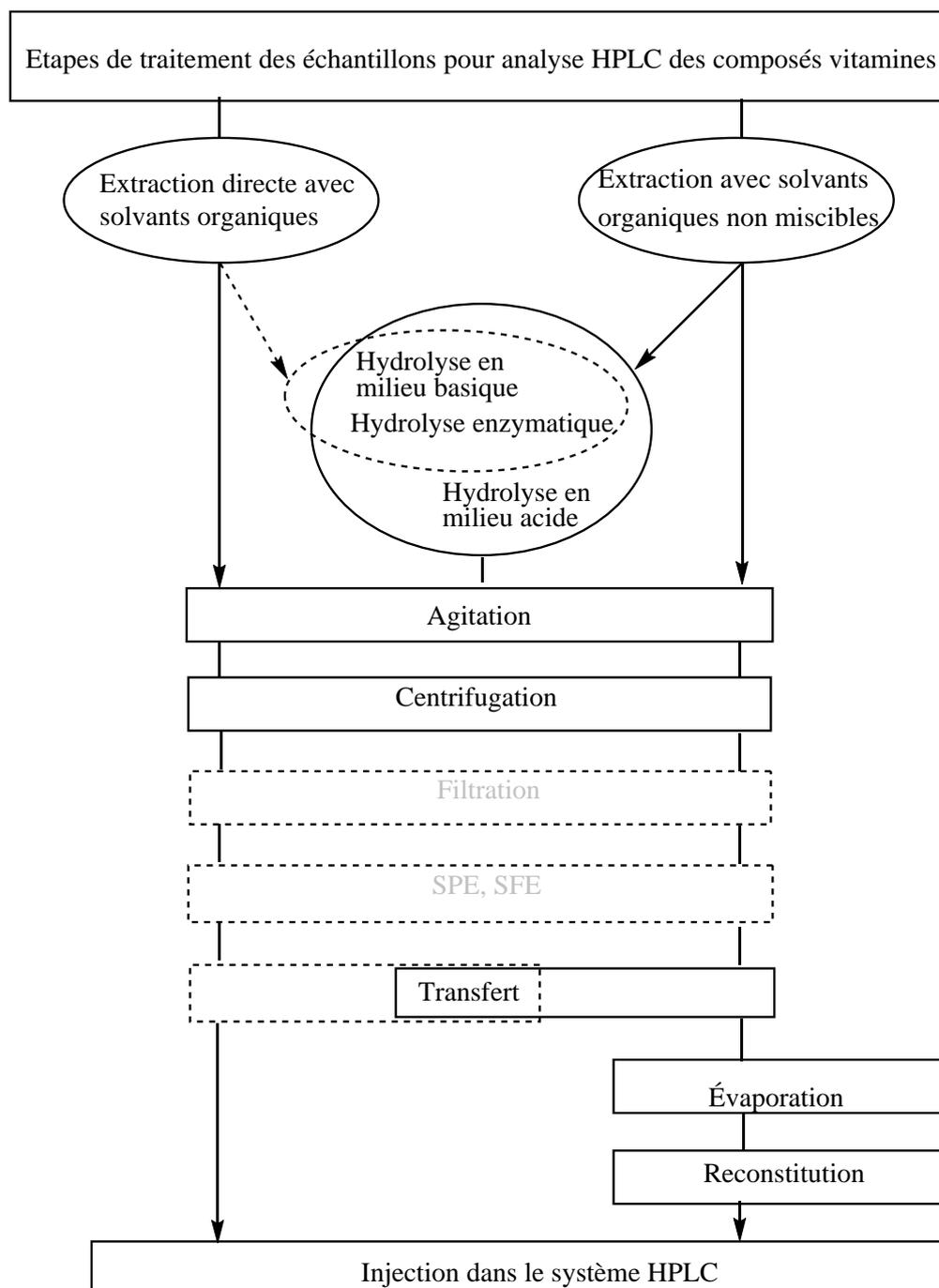


Fig. I.2. Principales étapes des modes de traitement d'échantillons

Ce type de traitement convient bien pour améliorer la détectabilité, avec l'avantage d'une bonne limpidité du liquide injecté. Cependant, ce mode de préparation exige une quantité considérable d'échantillons, l'utilisation de plusieurs solvants, plusieurs étapes et un grand risque de perte de l'analyte surtout lors de l'évaporation à cause de la fragilité de ces molécules. La figure (I.2) dessine les principales étapes de traitement d'échantillons pour une éventuelle analyse HPLC des vitamines.

### **I. 3. 2. Conditions chromatographiques**

#### **I. 3. 2. 1. Séparation**

Que ce soit une analyse individuelle ou simultanée, les méthodes HPLC utilisées dans le dosage des composés vitaminés utilisent généralement une séparation sur phases stationnaires à polarité inverse (RP), ou à un degré moins sur une phase normale (NP) [5]. Cependant, les recherches analytiques se planifient, en vue de réussir des analyses précises, dans des conditions où les quantités de ces molécules sont souvent influencées par les conditions d'analyses. L'amélioration à cet effet, peut-être atteinte par l'emploi de détecteurs plus spécifiques et plus sensibles.

#### **I. 3. 2. 2. Détection**

Les méthodes HPLC avec détection UV-Vis sont les plus couramment utilisées pour la quantification des vitamines [20, 24], cette combinaison est utilisée surtout lorsque les quantités sont à un niveau assez appréciable. Cette technique est beaucoup plus pratique avec un détecteur UV à barrette de diode, qui permet une quantification multiple aux longueurs d'onde spécifiques d'une grande variété de vitamines [21], [25–28]. Par contre, lorsque les concentrations sont très faibles, tel est le cas pour certaines vitamines dans les aliments, par exemple (B12), la détection s'améliore en couplant au système HPLC un fluorimètre plus sensible [4, 29]. En plus, cette configuration qui est relativement de même coût est préférée à cause d'une spécificité et d'une sensibilité plus élevée que la détection UV. En effet, la détection par fluorescence fournit des limites de détection atteignant jusqu'à 1000 fois inférieures à celles du même composé en spectrophotométrie d'absorbance [5].

Toutefois, il est toujours très difficile de trouver des conditions expérimentales appropriées pour une détermination simultanée à cause de l'hétérogénéité qui existe entre ces composés, qui diffèrent dans leurs structures et dans leurs propriétés physico-chimiques, ceci est compliqué encore par la nature labile de certaines vitamines et par la complexité des matrices alimentaires. Ces difficultés obligent, dans un sens, de s'orienter vers l'analyse individuelle de chaque vitamine, alors que d'autres problèmes surgissent aussi de la similarité dans la structure des isomères d'une même molécule, qui rend la résolution des pics incomplète et par conséquent une quantification moins précise [5].

L'analyse par chromatographie liquide HPLC d'une seule vitamine n'est pas toujours facile à réaliser, comme c'est le cas de certaines vitamines hydrosolubles contenues dans les aliments. Ainsi ces instruments lorsqu'ils sont couplés à un détecteur MS, donnant sur des méthodes (LC-MS) et dont le principe d'analyse (identification donc qualitative) ne dépend pas de la caractéristique du temps rétention, permettent une analyse quantitative précise et exacte, pour les composés présentant des ions pseudo moléculaires de rapport ( $m/Z$ ) différent. En plus de leur sélectivité élevée, ces techniques sont très sensibles, où des quantités d'analyte de l'ordre de 1 pictogramme sont parfois suffisantes pour effectuer des essais justes [30].

Beaucoup de méthodes ont été développées dans les dernières années pour déterminer un nombre important de molécules vitaminées de manière simultanée, dans différents types d'échantillons. Comme pour la détermination des vitamines liposolubles dans le lait [31] ou des vitamines hydrosolubles dans les boissons et les aliments supplémentés [32]. Aussi, dans les préparations pour nourrissons et les produits nutritionnels connexes [33]. En plus, cette technique a été utilisée aussi pour déterminer les faibles quantités des métabolites de vitamines liposolubles dans le sérum et le plasma humain [34-38]. Mieux encore, cette technique permet une analyse multiple plus complète en déterminant ensemble, les vitamines hydrosolubles et liposolubles [39, 40].

On constate, d'après ce qui a été dit auparavant, que tout composé vitaminé peut être analysé par des méthodes chromatographiques HPLC. Mais ceci ne peut être accompli qu'après passage à travers un processus d'étape(s) de traitement adéquat de l'échantillon. Du point vu quantitatif, cette étape ou bien ces étapes peuvent être caractérisées par une dilution ou une succession de dilutions avant l'analyse

instrumentale des vitamines. De ce fait, nous nous contentons dans ce qui suit de ce manuscrit que de deux vitamines, notamment, la vitamine A et la vitamine E, pour mettre en évidence la méthodologie analytique quantitative, commune pour les différentes techniques employées dans les analyses de vitamines. En effet, la vitamine A et la vitamine E sont des composés qui peuvent être dosés simultanément et d'ont l'étude va permettre bien sûr de montrer l'importance de l'ensemble des micronutriments. Mais plus particulièrement, dans notre cas, d'évoquer l'aspect et l'influence de l'environnement analytique qui accompagnent les essais entamés pour doser n'importe quelles vitamines, par ces méthodes spectrochimiques comparatives, que ce soit individuellement ou de façon simultanée. Ceci malgré la restriction de la nature de l'échantillon, au simple fluide biologique plasma du sang humain.

## **I. 4. Aspect chimique des vitamines A et E**

### **I. 4. 1. Définition structure et nomenclature**

#### **I. 4. 1. 1. Vitamine A**

Le nom vitamine A est un terme générique attribué aux composés présentant qualitativement l'activité biologique du rétinol [41]. Ceci peut inclure aussi d'autres types de composés notamment les provitamines caroténoïdes [42], principalement  $\beta$ -carotène,  $\alpha$ -carotène,  $\beta$ -cryptoxanthine. La figure (I.3) regroupe les structures chimiques, des principales molécules actives de rétinoïdes et de caroténoïdes naturels entrant sous cette désignation. Ces composés sont généralement définis par leurs noms triviaux simples, au lieu de leurs noms systématiques complexes de la nomenclature IUPAC [41]. Par exemple, le rétinol qui possède une configuration *all-trans* stable, porte le nom complet suivant : (2E,4E,6E,8E)-3,7-diméthyl-9-(2,6,6-triméthyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4,6,8 nonatetraen-1-ol.

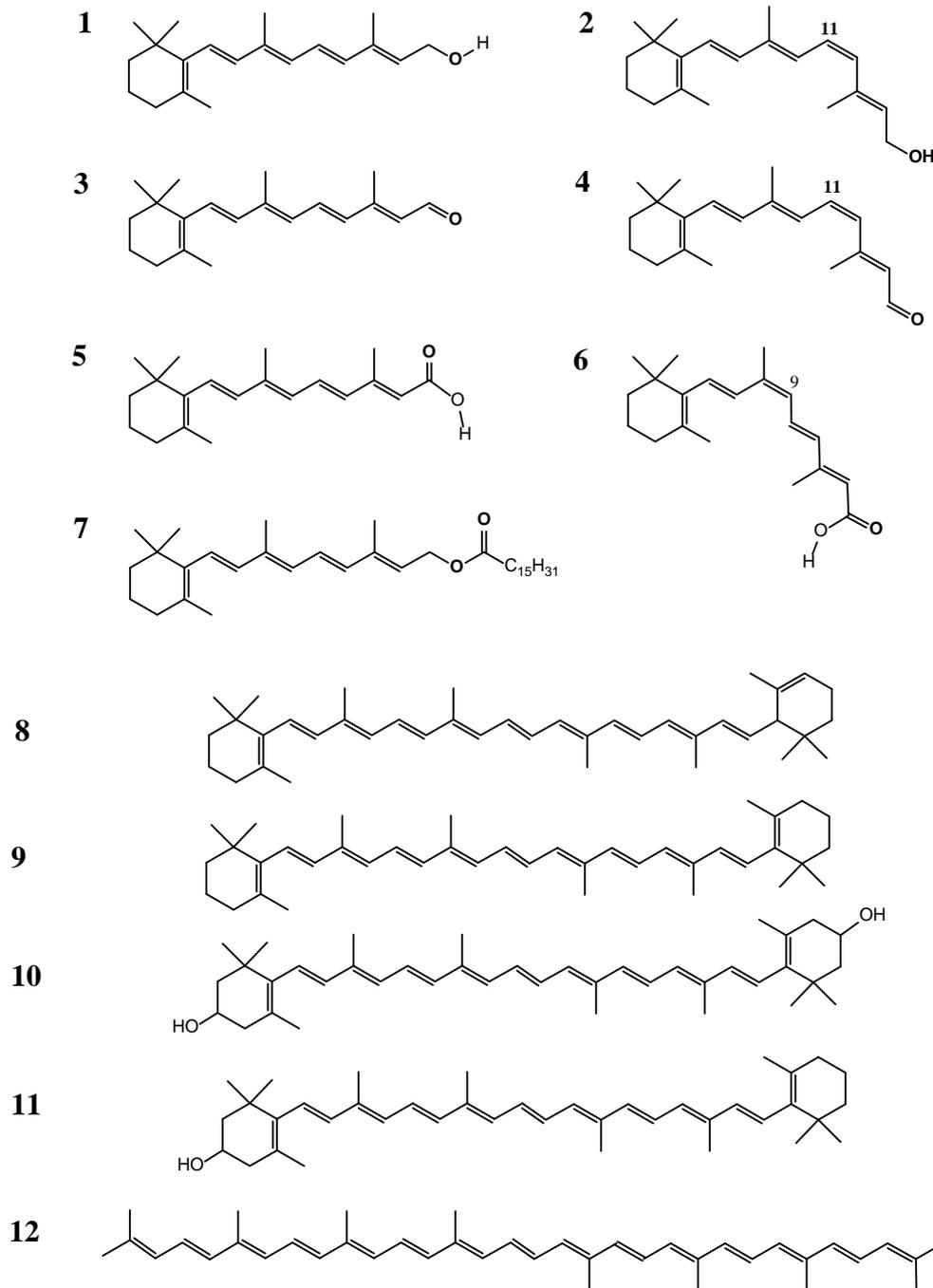


Fig. I.3. Principaux composés rétinoïdes et caroténoïdes de la vitamine A.

Rétinoïdes : 1. All-*trans*-Rétinol, 2. 11-*cis*-Rétinol, 3. All-*trans*-Rétinaldéhyde, 4. 11-*cis*-Rétinaldéhyde, 5. All-*trans*-Acide rétinoïque, 6. 9-*cis*-Acide rétinoïque, 7. All-*trans*-Palmitate de rétinol. Caroténoïdes : 8.  $\alpha$ -carotène, 9.  $\beta$ -carotène, 10. Lutein, 11.  $\beta$ -cryptoxantine, 12. Lycopène

### I. 4. 1. 2. Vitamine E

Le nom vitamine E est le terme générique qui doit être utilisé pour désigner tous les dérivés tocophérols et tocotriénols présentant qualitativement l'activité biologique de l' $\alpha$ -tocophérol [43]. La figure (I.4) donne les deux structures chimiques de base, pour huit molécules incluses sous cette appellation. Ces structures se différencient dans leur chaîne isoprénoïde latérale, qui a une forme phytyle saturée pour les tocophérols, contrairement, à celle des tocotriénols qui présente trois doubles liaisons non conjuguées. En revanche, ces deux structures ont un même système cyclique 6-chromanol (benzopyrane). Selon la position et le nombre des groupements méthyles liés au noyau benzénique du système cyclique, on distingue les quatre désignations ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ), pour les tocophérols et les tocotriénols.

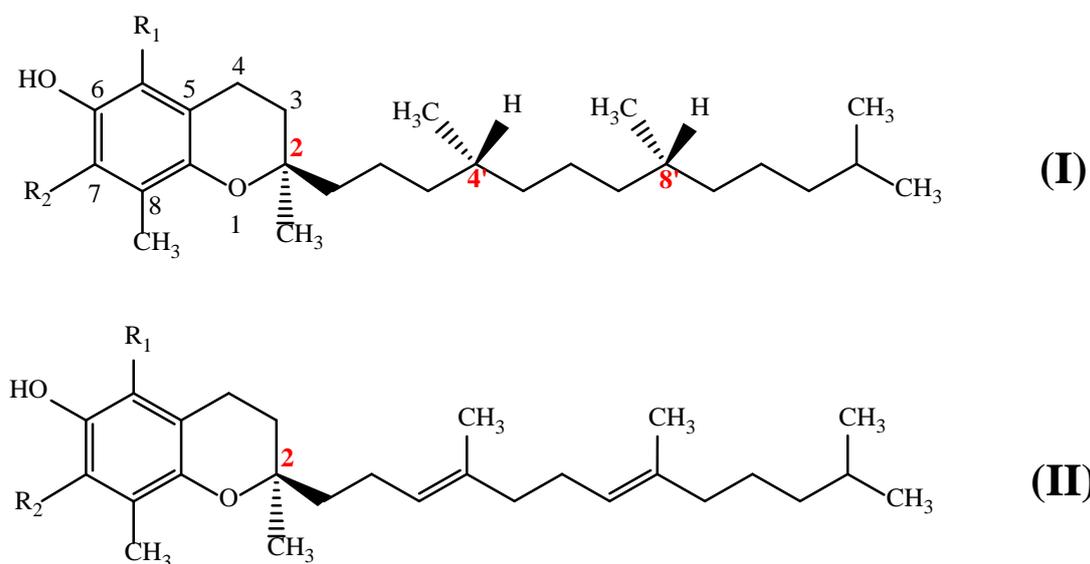


Fig. I.4. Structures chimiques de base des composés vitamine E

R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Tocophérols (I)	Tocotriénols (II)
CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	$\alpha$ -tocophérol	$\alpha$ -tocotriénol
CH <sub>3</sub>	H	$\beta$ -tocophérol	$\beta$ -tocotriénol
H	CH <sub>3</sub>	$\gamma$ -tocophérol	$\gamma$ -tocotriénol
H	H	$\delta$ -tocophérol	$\delta$ -tocotriénol

On constate aussi, que les structures des composés tocophérols comportent trois centres de chiralité en C2, C4' et C8', ce qui donne théoriquement, huit stéréo-isomères optiquement actifs attendus de chaque composé. Alors que la structure des tocotriénols

n'a qu'un centre chiral en C2, qui permet deux stéréo-isomères optiquement actifs. Par contre, l'instauration aux positions 3 'et 7' de la chaîne latérale permet quatre isomères géométriques cis/trans.

## **I. 5. Concept nutritionnel et biochimique**

### **I. 5. 1. Apports nutritionnels de référence**

Les gouvernements et les organismes internationaux examinent régulièrement les résultats et les données les plus récentes des études de nutrition, pour définir les besoins nutritionnels des personnes. À travers ces études les scientifiques ont tiré beaucoup de conclusions sur les liens qui existent entre les nutriments et les maladies chroniques, comme celle par exemple qui existe entre l'approvisionnement en vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol) et le risque du cancer, de diabète et des maladies cardiovasculaires [44]. Cette relation est aussi alertée entre l'approvisionnement en vitamine A (Rétinol) et le risque de cancer, d'asthme et les maladies des yeux [45]. Ce qui a permis au cours du temps à l'élaboration de recommandations nutritionnelles. Ces recommandations s'appellent les apports nutritionnels de référence (ANREF). Les ANREF anciennement appelés apports nutritionnels recommandés (ANR) sont fondés sur la quantité de vitamines, de minéraux et d'autres substances, comme les fibres, dont nous avons besoin. C'est-à-dire la quantité nécessaire non seulement pour prévenir les carences, mais aussi pour réduire le risque de maladie chronique [46].

Ces apports nutritionnels de référence, désignés aussi par l'abréviation anglophone (DRIs) sont un ensemble de valeurs nutritionnelles de référence destinées à des populations en bonne santé, qui peuvent servir à l'évaluation nutritionnelle et à la planification de l'alimentation. Ce système de recommandations nutritionnelles a été supervisé et publié par l'institut de médecine du National Academies des États-Unis, qui est un organisme non gouvernemental indépendant. Ces recommandations ont été apparues sous forme de guide en version anglaise et française [47], qui constitue une base scientifique pour orienter les communautés nord-américaines des USA et du Canada sur les besoins en nutriments, afin d'atteindre un régime alimentaire équilibré. La dernière parution de ces recommandations, consiste à une réévaluation de ces valeurs pour le calcium et la vitamine D [46]. Les différents types de valeurs de référence sont définis dans le guide DRIs de la version française, comme suit :

- Besoin moyen estimatif (BME) : La quantité de nutriments pouvant combler les besoins de la moitié des sujets en bonne santé appartenant à un groupe donné, défini en fonction de l'étape de la vie et du sexe. Cette valeur est fondée sur un critère spécifique d'apport suffisant, déterminé suite à un examen approfondi de la littérature scientifique.
- Apport nutritionnel recommandé (ANR) : C'est l'apport nutritionnel quotidien moyen permettant de combler les besoins nutritionnels de la quasi-totalité (97 à 98 %) des sujets en bonne santé appartenant à un groupe donné, défini en fonction de l'étape de la vie et du sexe. L'ANR représente l'objectif de consommation usuelle chez les particuliers.
- Apport suffisant (AS) - N'est établi que dans les cas où l'on ne dispose pas de données scientifiques suffisantes pour fixer le BME qui permet ensuite de fixer l'ANR. L'AS est l'apport quotidien moyen recommandé en s'appuyant sur des observations, des expérimentations ou des estimations approximatives de l'apport nutritionnel chez un ou plusieurs groupes de personnes apparemment en bonne santé qui semblent conserver un statut nutritionnel adéquat.
- Apport maximal tolérable (AMT) - L'apport quotidien le plus élevé qui n'entraîne vraisemblablement pas de risques d'effets indésirables sur la santé chez la plupart de la population en général. Plus l'apport dépasse l'AMT, plus le risque d'effets indésirables augmente.

De l'autre côté, l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) définit l'ensemble de ces informations sous l'appellation de valeurs nutritionnelles de référence (VNR), en Anglais (DRVs) qui regroupent : l'apport de référence de la population (PRI), au lieu de l'apport nutritionnel recommandé, et les besoins moyens (ARs) au lieu des besoins moyens estimatifs. Par contre, l'apport maximal tolérable (UL) et l'apport suffisant (AI) portent les mêmes définitions que celles employées, dans le guide DRIs, mais qui peuvent se différencier en valeurs [48]. Cependant, pour l' $\alpha$ -tocophérol, ces valeurs sont remplacées les apports suffisants (AIs) pour tous les groupes de population, à cause de l'incohérence ou l'insuffisance des données sur la relation entre la consommation de la vitamine E et les effets sur la santé et par conséquent ces données ne peuvent être utilisées pour calculer le besoin en  $\alpha$ -tocophérol [49].

On trouve dans les tableaux (I.1) et (I.2) un résumé des valeurs nutritionnelles de la vitamine A et la vitamine E, recommandées par l'institut de médecine du National Académies et l'autorité européenne de sécurité des aliments, pour les différentes catégories d'âges.

Ce même intérêt a été toujours suivi à l'échelle mondiale par les organismes internationaux s'occupant de la santé et la nutrition humaine, en effet, l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) et l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) ont publié conjointement un rapport complet sur les besoins de dix-neuf micronutriments pour la nutrition humaine, y compris leurs rôles dans la physiologie normale, le métabolisme et les conditions conduisant à leurs carences [50].

Tableau I. 1 : Valeurs des apports nutritionnels de référence pour la Vitamine A

Groupes d'âge	Valeurs/ Apports nutritionnels de référence pour la Vitamine A					
	PRIs (ARs) ( $\mu\text{g RE}^*$ /jour)		ANR (BME) ( $\mu\text{g RAE}^{**}$ /jour)		AS	AMT
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles		
00 – 06 mois	-	-	-	-	400	600
07 – 11 mois	250 (190)	250 (190)	-	-	-	-
07 – 12 mois	-	-	-	-	500	600
1 – 3	250 (205)	250 (205)	300 (210)	300 (210)	-	600
4 – 6	300 (245)	300 (245)	-	-	-	-
4 – 8	-	-	400 (275)	400 (275)	-	900
7 – 10	400 (320)	400 (320)	-	-	-	-
09 – 13	-	-	600 (445)	600 (420)	-	1700
11 – 14	600 (480)	600 (480)	-	-	-	-
14 - 18	-	-	900 (630)	700 (485)	-	2800
15 – 17	750 (580)	650 (490)	-	-	-	-
$\geq 18$	750 (570)	650 (490)	-	-	-	-
> 18	-	-	900 (625)	700 (500)	-	3000
Grossesse	-	700 (540)	-	750 (500)	-	3000
Allaitement	-	1300 (1020)	-	1300 (900)	-	3000

\* 1  $\mu\text{g RE}$  (Equivalent en rétinol) = 1  $\mu\text{g}$  de rétinol = 6  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -carotène = 12  $\mu\text{g}$  d'autres provitamine A caroténodes.

\*\* 1 $\mu\text{g RAE}$  (équivalent en activité du rétinol) = 1  $\mu\text{g}$  rétinol, 12  $\mu\text{g}$   $\beta$ -carotène, et 24  $\mu\text{g}$   $\alpha$ -carotène ou  $\beta$ -cryptoxanthine

Tableau I. 2 : Valeurs des apports nutritionnels de référence pour la Vitamine E

Groupes d'âge	Valeurs/Apports nutritionnels de référence pour la Vitamine E (mg/jour)					
	AIs		ANR (BME)		AS	AMT
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles		
00 – 06 mois					4	–
07 – 11 mois	5	5			–	–
07 – 12 mois					5	–
1 – 2	6	6			–	–
1 – 3			6 (5)	6 (5)	–	200
4 – 8			7 (6)	7 (6)	–	300
3 – 9	9	9			–	–
09 – 13			11 (9)	11 (9)	–	600
10 – 17	13	11			–	–
14 - 18			15 (12)	15 (12)	–	800
≥ 18	13	11	15 (12)	15 (12)	–	1000
Grossesse		11		15 (12)	–	1000
Allaitement		11		19 (16)	–	1000

### I. 5. 2. Sources alimentaires

Puisque le corps humain ne peut pas synthétiser la vitamine A et la vitamine E, ces derniers doivent être absolument procurés de l'extérieur, ceci peut se faire normalement par un apport alimentaire équilibré et diversifié, que ce soit d'origine animale ou végétale. Les aliments les plus riches en vitamine A (préformée) généralement des enstères, sont d'origine animale comme le foie, le jaune d'œuf, le lait entier, le beurre et le fromage, etc. Par contre, les aliments d'origine végétale apportent les caroténoïdes (provitamine A) qui sont des précurseurs de vitamine A et qu'on trouve plus particulièrement dans les fruits et légumes de couleurs très foncées comme la courge, les carottes, les légumes, les épinards, le brocoli, les abricots, les pêches, melon, etc.

Pour la vitamine E, les principales sources sont d'origines végétales, notamment, les huiles d'olive, de soja, de palme, de maïs, de tournesol, les noix, les grains entiers et le germe de blé, les légumes à feuilles vertes, etc. On trouve aussi ce composé dans le poisson et la viande, mais avec des quantités relativement faibles. Le tableau (I.3) rapporte les teneurs en vitamine A et vitamine E de quelques aliments communément consommés [3].

Tableau I.3 : Sources nutritionnelles en vitamine A et en vitamine E de quelques aliments

	Teneur en vitamine dans 100 g d'aliment.	
	rétinol (RAE)	$\alpha$ -tocophérol (mg)
Huile de maïs	0	14.30
Huile d'olive	0	14.35
Huile de tournesol	0	41.08
Huile de soja	0	08.18
Huile d'arachide	0	15.69
Huile de germe de blé	0	149.4
Huile de palme	0	15.94
Huile de poisson	30000	---
Foie de morue	30000	---
Margarine molle	819	3.10
Lait	47	0.07
Beurre	684	2.32
Œufs	160	1.05
Viandes rouge	0	0.14-049
Viande hachée	4	0.17
Poulet	16	0.21
Poisson	4	6.88
Foie	30000	---
Amandes	0	25.63
Cacahuètes	0	8.33
Pistache	26	2.86
Pomme	17	0.18
Pêche	16	0.73
Abricot	96	0.89
Melon cantaloup	169	0.05
Asperges	38	1.13
Épinards	469	2.03
Carottes	835	0.66
Tomates	42	0.54

### I. 5. 3. Absorption et transport

Les formes esters de la vitamine A et la vitamine E, vitamine A préformé et tocophéryls, contenus dans les aliments sont hydrolysés avant absorption, qui se déroule au niveau de la partie supérieure de l'intestin grêle en présence des lipides et les sécrétions biliaires. La figure (I.5) simplifiée les étapes d'absorption et de transport des deux vitamines depuis le lumen intestinal jusqu'aux cellules cibles. Le rétinol et les tocophérols sont incorporés dans des micelles mixtes [51], pour être absorbés avec les caroténoïdes (Provitamine A) dans les entérocytes (cellules de la muqueuse intestinale).

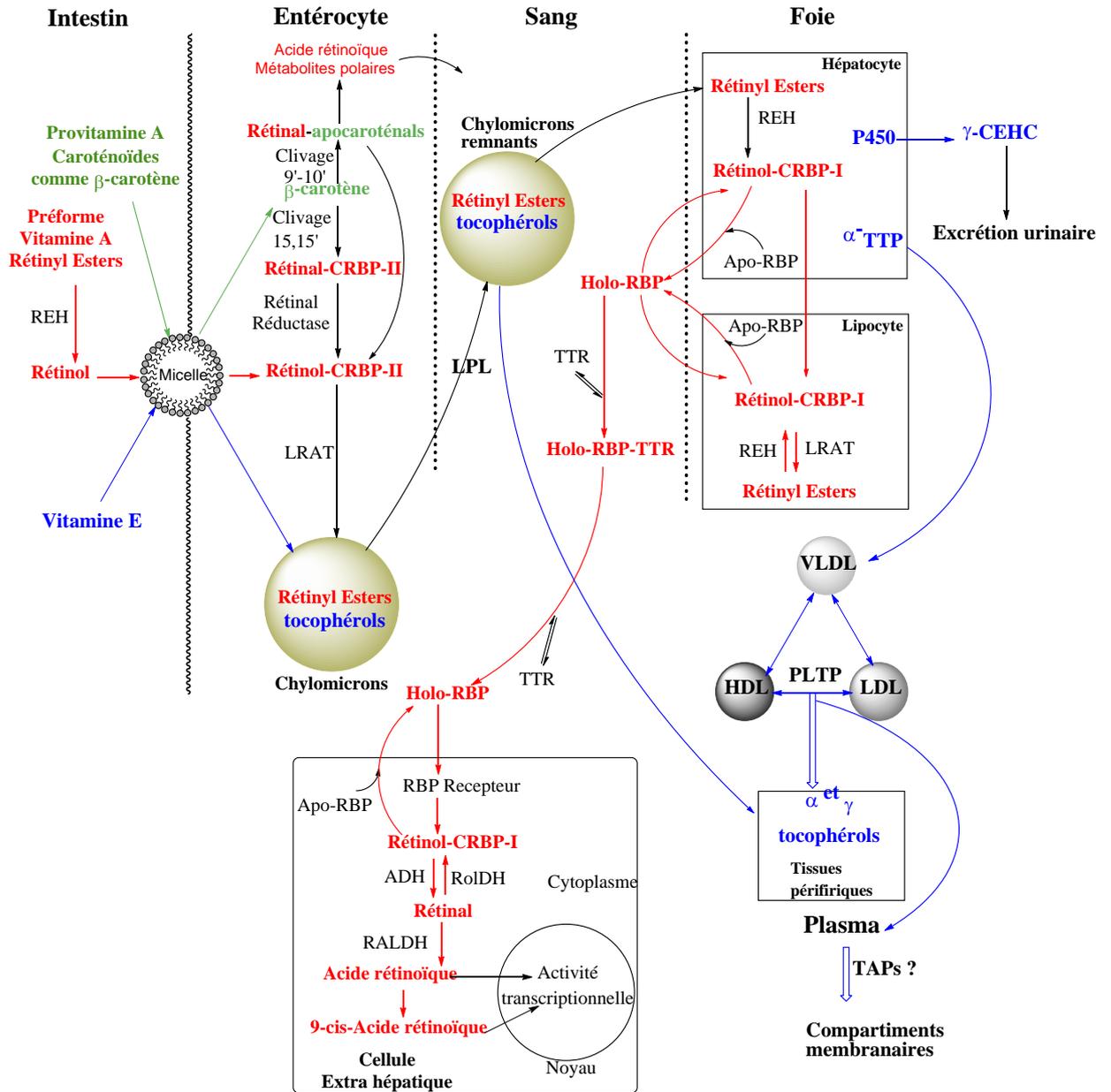


Fig. I.5. Absorption et transport des métabolites de vitamines A et E

À ce niveau les caroténoïdes peuvent être clivés via un processus enzymatique pour générer le rétinol, qui après réestérification est incorporé à nouveau avec les tocophérols dans des chylomicrons (complexe lipoprotéique), contenant également des esters de cholestérol, des phospholipides, des triacylglycérols et des apoprotéines, pour être excrété dans le système lymphatique (canaux lymphatiques) et rejoindre la circulation générale du sang. Une partie des rétinylesters ainsi que du rétinol non estérifié et les caroténoïdes inchangés sont fournis par les chylomicrons à de nombreux tissus extrahépatiques, notamment la moelle osseuse, les cellules sanguines, la rate, les

muscles, les poumons, les reins et le tissu adipeux [52]. Pendant cela, le tocophérol, se transfère spontanément, pour être réparties entre d'autres lipoprotéines, notamment les lipoprotéines de haute densité (HDL), les Lipoprotéines de très basse densité (VLDL) et les lipoprotéines de basse densité (LDL) [3]. Ces derniers possèdent les plus fortes concentrations de vitamine, contiennent environ cinq à neuf molécules d' $\alpha$ -tocophérol par LDL [52]. L'ensemble de ces métabolites arrivent jusqu'au foie à l'aide des chylomicrons « remnants », qui sont les restes de l'attaque de l'enzyme lipoprotéine lipase sur des chylomicrons. À ce stade, le rétinol et l' $\alpha$ -tocophérol, composés prédominants dans le sang, sont associés à des protéines spécifiques fabriquées dans le foie. La protéine de transfert ( $\alpha$ -TTP) fait transférer l' $\alpha$ -tocophérol, dans les VLDL, qui permettent la distribution de la vitamine vers les membranes plasmiques, les membranes cellulaires [51]. Les esters rétiniques par contre, sont hydrolysés au niveau du foie pour donner le rétinol, ce dernier peut être sécrété à sa protéine spécifique liante (RBP) et former le complexe (Holo-RBP), qui sert à le maintenir en milieu aqueux et de le délivrer aux tissus périphériques cibles, ou bien stocké sous forme d'esters rétiniques dans les gouttelettes lipidiques intracellulaires des cellules stellaires. La RBP est sécrétée par le foie sous la forme d'un complexe 1: 1 avec une autre protéine plus volumineuse la transthyréline, ceci sert à faciliter la circulation du rétinol dans le sang et prévenir sa perte dans l'urine, lors de la filtration glomérulaire au niveau des reins [53].

#### **I. 5. 4. Fonctions physiologiques**

La vitamine A, à travers ces différents métabolites actifs, est impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques comme la croissance, la reproduction, la vision et le maintien du système immunitaire [1, 3]. En outre, le rétinol se trouve détenir un rôle crucial, puisqu'il est impliqué dans toutes les transformations biochimiques qui engendrent ces fonctions. La figure (I.6), reprise de la référence [52] donne une idée générale sur le rôle des différents rétinoïdes actifs dans le processus métabolique chez l'humain. Parmi les diverses activités de la vitamine A, la fonction physiologique la mieux élucidée est celle du rétinol dans le processus visuel. Quand la lumière pénètre dans les yeux, elle frappe la rétine au fond du globe oculaire interne, cette dernière contient des cellules spéciales appelées selon leurs formes, cellules bâtonnets et cellules coniques.

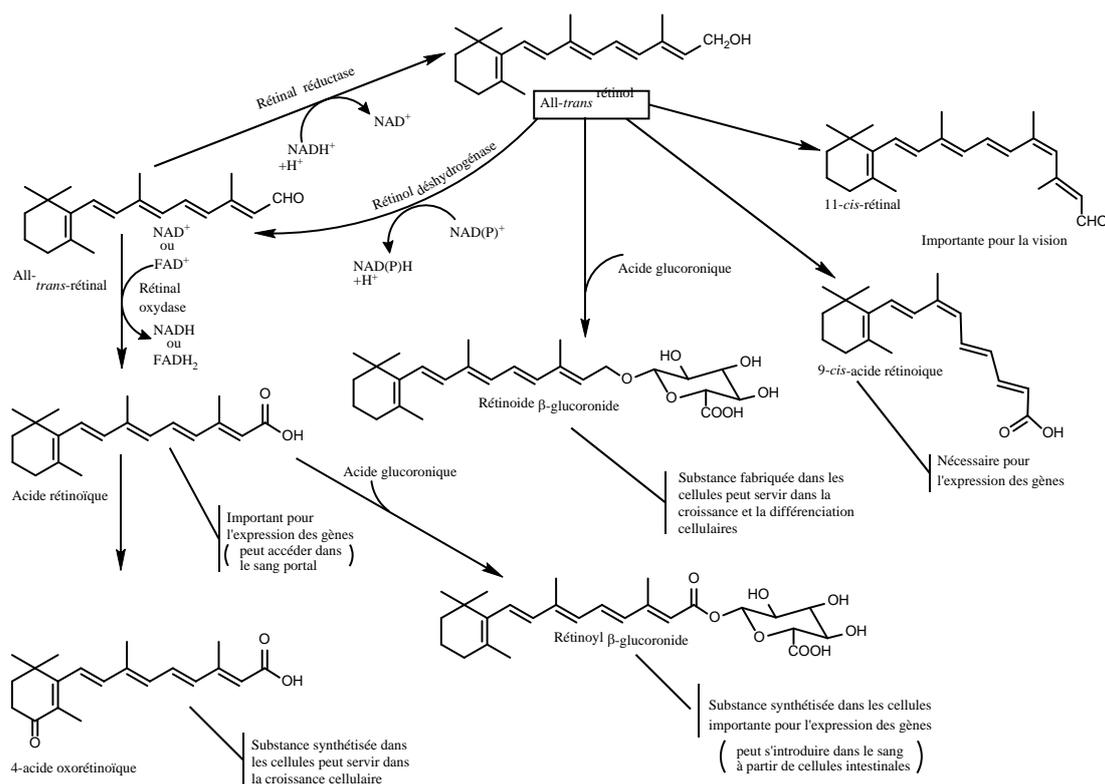


Fig. I.6. Métabolisme général des rétinolides

Au niveau des cellules bâtonnets, l'isomère 11-cis du rétinol se combine avec le résidu lysine d'une protéine appelée opsin, pour donner une base de Schiff, et de former ainsi un pigment sensible à la lumière, appelé rhodopsine. Cette dernière ne réagit qu'avec la lumière faible et elle n'interprète, par conséquent, que les images noir et blanc. Au cours de cette interaction photochimique, la vitamine A se convertie en trans-rétinal et se détache de l'opsin, à cet effet, les cellules bâtonnets subissent un processus de pâlisement et perdent leur couleur [3]. Par contre, les cellules coniques quant à eux sont sensibles à lumière intense et sont responsable à la vision de couleur, à ce niveau il se forme de façon similaire la formation d'un autre pigment, qui est l'iodopsine [54]. Ces changements génèrent donc un influx nerveux qui se propage à travers le nerf optique vers le cerveau, ce qui nous permet la perception des images dans le domaine visible du spectre électromagnétique. La figure (I.7) illustre ces changements et montre les étapes de transformations des métabolites de vitamine A, indispensables pour le bon fonctionnement du processus visuel. On observe, particulièrement, le rôle primordial du all-trans rétinol, initiateur de de ces métabolites.

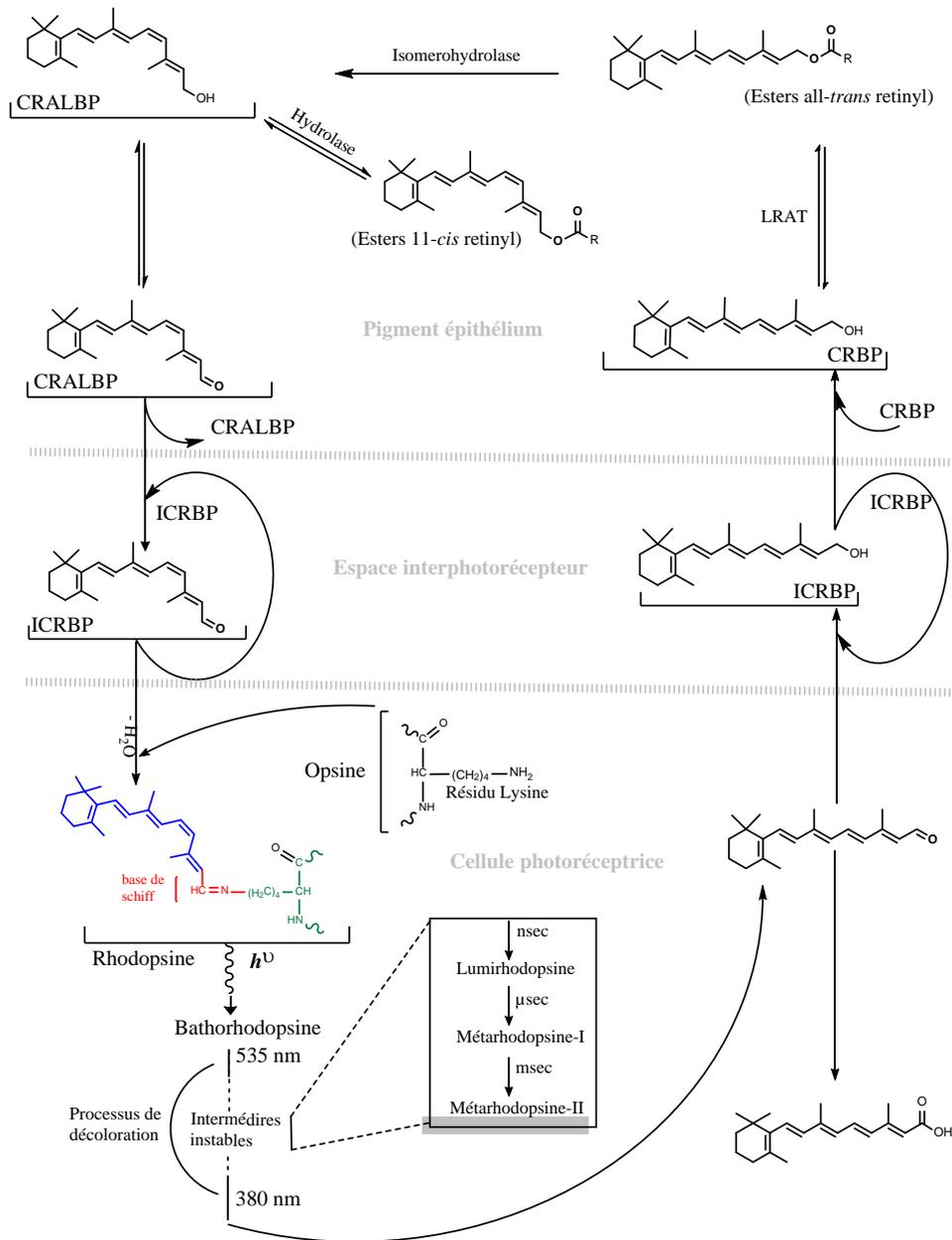


Fig. I.7. Processus physiologique du cycle visuel

De l'autre côté, on voit bien que le recyclage du rétinol n'est pas tout à fait parfait, puisqu'une partie (quantité) s'échappe du cycle, pour donner l'acide rétinoïque qui n'a aucun rôle dans le processus visuel. Dans ce cas, l'apport de l'all-trans rétinol plasmatique doit être suffisant pour compenser cette perte. D'autre part, le rôle de la vitamine E dans l'alimentation humaine n'a été pleinement compris qu'en 1967, lorsqu'il a été démontré que la carence en vitamine E provoquait une anémie hémolytique chez les prématurés [55]. Par contre, la fonction biologique principale de la vitamine E est connue par son rôle d'antioxydant liposoluble au niveau des membranes cellulaires, qui

empêche la propagation de réactions radicalaires et par conséquent, protège les acides gras polyinsaturés (PUFA) et d'autres composants membranaires, de l'oxydation par les radicaux libres formés dans des processus métaboliques normaux et lors d'une exposition à des agents toxiques exogènes, par exemple la fumée de cigarette et d'autres les polluants [3].

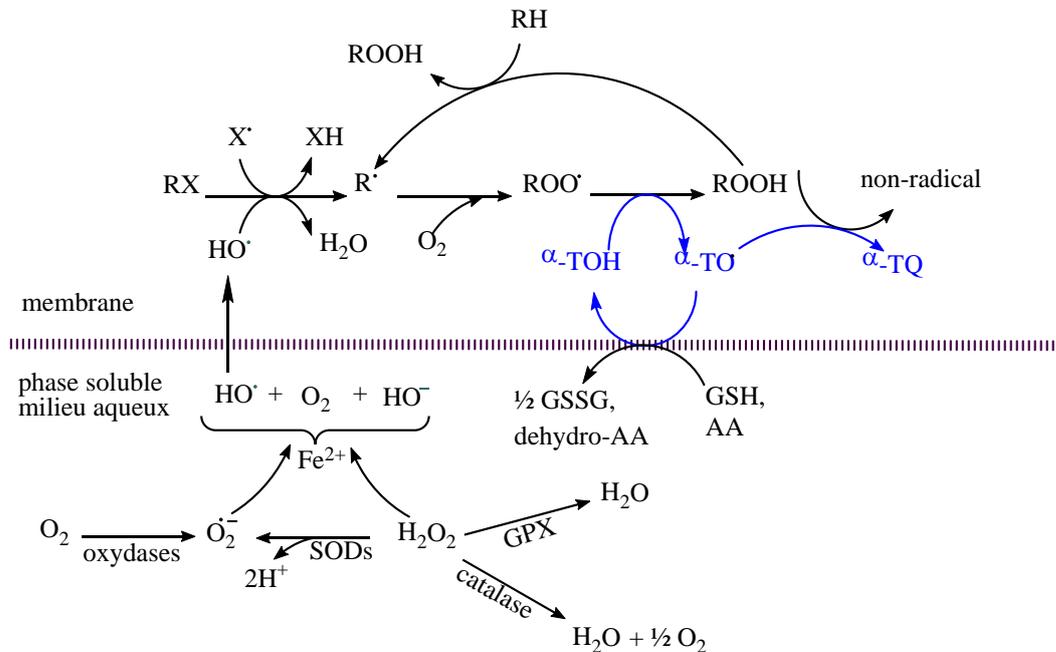


Fig. I. 8. Processus antioxydant de la vitamine E dans la membrane cellulaire.

Parmi ces espèces les plus nocives on trouve le radical hydroxyde ( $HO^{\cdot}$ ), dont les biomolécules cibles comprennent l'ADN, les protéines et les lipides, et qui est principalement généré selon une réaction de Fenton en présence d'ions métalliques, notamment, le Fer ou le cuivre [52]. La figure (I.8), reprise de la référence [3], décrit en trois étapes le processus antioxydant au niveau de la membrane cellulaire et montre le rôle de l' $\alpha$ -tocophérol dans ce système de défense antioxydant. La première étape se déroule en milieu aqueux (à la surface de la membrane), où le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) est dissipé en eau et oxygène en présence des enzymes catalase ou du glutathion peroxydase (GPX) et par conséquent, l'évite de réagir avec les ions métalliques ou les enzymes superoxyde dismutase (SODs), responsables de la production des espèces réactives d'oxygène. La deuxième étape fait intervenir la vitamine E, tel que l' $\alpha$ -tocophérol ( $\alpha\text{-T-OH}$ ), dont l'activité antioxydante est la plus grande par rapport aux autres vitamines E, en piégeant les radicaux libres dans les membranes cellulaires et les

lipoprotéines plasmatiques, et faisant terminer ainsi les réactions en chaîne des acides gras polyinsaturés, déjà endommagés. L'hydrogène phénolique, plus habile dans la structure de l' $\alpha$ -tocophérol est cédé pour empêcher l'attaque du radical libre sur d'autres acides gras polyinsaturés et donne un radical tocopheroxyl stable ( $\alpha$ -T-O), qui peut réagir à son tour avec un autre oxydant pour donner un non-radical dont la tocopheryl quinone ( $\alpha$ -T-Q). En fin, au cours de la troisième étape, le composé vitamine E se régénère au contact des antioxydants aqueux comme l'acide ascorbique (AA) ou l'enzyme glutathion (GSH), suivant une réduction qui donne le dehydro-acide ascorbique (dehydro-AA) ou le glutathion oxydé (GSSG), respectivement.

### **I. 5. 5. Carence**

Le maintien des fonctions physiologiques dépend de la présence, en continu et de façon adéquate, de quantités de métabolites responsables de ces processus vitaux à l'être humain. Comme c'est déjà montré auparavant, par exemple pour le cycle visuel, le recyclage de la molécule all trans-rétinal en cis-rétinal, n'est pas totalement efficace à 100%. En effet, une quantité de cette substance est convertie en acide rétinoïque et qui n'a aucun rôle dans ce processus [56]. Ce qui nécessite toujours la disponibilité d'un excès en métabolite rétinol donc de son précurseur qui est le rétinol. Sans quoi, la vision devient extrêmement difficile, résultant la cécité nocturne, ce qui est déjà un premier indice d'une forme modérée de carence en vitamine A [57]. Alors que cette usure va s'accroître, évidemment, par l'ensemble des processus physiologiques liés. Ceci est valable aussi, pour le cas de la vitamine E, comme on l'observe dans l'exemple de la figure (I.8) la régénération de l' $\alpha$ -tocophérol n'est pas tout à fait complète à 100%. Le manque en ce micronutriment provoque aussi des problèmes de santé, qui peuvent être observés par une variété de symptômes, y compris des problèmes neuromusculaires, une perte de coordination et des douleurs musculaires [56]. Fort heureusement, la carence en vitamine E n'est que rarement observée [3]. La carence en vitamine A est surtout répondeur comme carence primaire dans les pays en cours de développement, notamment en Afrique et l'Asie de sud-est [58, 59]. Le manque de ce micronutriment provoque de nombreuses conséquences nuisibles sur la santé, on parle généralement de troubles dus à la carence en vitamine A (VADD) [56, 60]. Une carence sévère conduit à la xérophtalmie : kératinisation de la cornée suivie d'une ulcération, dommage irrémédiable de l'œil qui cause la cécité. En même temps, il y a des changements dans

la peau, avec une formation excessive de tissu kératinisé [54]. Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), la carence en vitamine A est un problème majeur de santé publique dans de vastes régions du monde et sa prévention est devenue l'une de ces priorités avec celle du fer et l'iode [53]. Dans les pays industrialisés, ces problèmes de santé peuvent survenir chez les personnes atteintes de maladies affectant le pancréas, le foie ou les voies gastro-intestinales, dans ce cas, on parle d'une carence secondaire en vitamine A [56]. Tandis que la carence en vitamine E est relativement rare, mais qui peut être observée dans les populations où il existe une privation de nourriture ou une famine résultant de catastrophes écologiques ou de conflits culturels, surtout chez les nouveau-nés et les adolescents [50]. Comme elle peut survenir chez les personnes présentant des anomalies génétiques, et des maladies telles que la fibrose kystique, qui causent une malabsorption des lipides [44, 53].

### **I. 5. 6. Toxicité**

Une consommation prolongée de fortes doses de vitamine A, peut conduire à une Hypervitaminose A, qui signifie une toxicité en vitamine A. L'hypervitaminose A se manifeste par de graves complications, tel que des anomalies hépatiques, diminution de la résistance osseuse. Pendant la grossesse elle peut entraîner des malformations congénitales telles que des dommages neurologiques et des malformations physiques [3, 45]. Tandis que, une supplémentation en caroténoïdes à forte dose augmente le risque de cancer du poumon chez les fumeurs [3]. De l'autre côté, la vitamine E a été considérée comme l'une des moins toxiques. Les animaux et les humains semblent être capables de tolérer des niveaux élevés [61].

### **I. 6. Le rétinol et l' $\alpha$ -tocophérol indicateurs biochimiques**

Le rétinol et l' $\alpha$ -tocophérol sont les formes circulantes prédominantes dans le sang, respectivement, la vitamine A et la vitamine E. Les concentrations natives de ces molécules sont recommandées comme indicateurs biochimiques pour déterminer leur statut et les méthodes d'analyse HPLC sont les plus conseillées pour leurs dosages dans les échantillons de plasma ou de sérum humain [62, 63]. La prévalence dans une population ayant une faible concentration de rétinol sérique ou plasmatique inférieure ou égale à ( $0.7 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), pour la catégorie d'âge préscolaire, est utilisée pour indiquer si une carence de la vitamine A constitue un problème de santé publique [62]. Alors

que des valeurs supérieures à ( $1.05 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) indiquent un statut adéquat lié à l'absence de signes cliniques de carence [45]. D'autre part, des taux de rétinol plasmatiques supérieur à ( $3 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) indiquent des signes d'hypervitaminose A [3]. Concernant la vitamine E, une concentration d' $\alpha$ -tocophérol plasmatique inférieure à ( $11.6 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) peut également être utilisée comme moyen de diagnostic d'une carence en vitamine E [63, 64], ce seuil est réduit à ( $7 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) pour indiquer une concentration en  $\alpha$ -tocophérol inadéquat dans les sujets pédiatriques [65]. Tandis qu'une concentration dépassant ( $46.4 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) en  $\alpha$ -tocophérol plasmatique, reflète une toxicité en ce micronutriment [52].

## I. 6. 1. Propriétés physicochimiques du rétinol et de l' $\alpha$ -tocophérol

### I. 6. 1. 1. Stabilité

Le rétinol et l'  $\alpha$ -tocophérol sont des molécules photo-sensitives, thermolabiles et facilement oxydables par l'oxygène de l'air [3, 4, 66]. Aussitôt extraits de leurs matrices natives, ces composés sont directement exposés aux effets qui accompagnent les étapes de traitement de l'échantillon. En plus, leurs faibles teneurs naturelles ne permettent pas de couvrir ces dégradations évidentes, donc une perte d'analytes d'intérêt dû à ces interactions avec leurs environnements. Le tableau (I.4) résume les facteurs ambiants les plus influents sur la stabilité du rétinol et de l'  $\alpha$ -tocophérol et recommande des précautions à prendre lors du traitement des échantillons, en vue de leur analyse par HPLC.

Tableau I.4 : Facteur affectant la stabilité du rétinol et de l'  $\alpha$ -tocophérol

Facteur d'influence	All- <i>trans</i> rétinol	$\alpha$ -tocophérol
UV-Lumière	élevé	élevé
Chauffage	élevé	faible
O <sub>2</sub> de l'air	élevé	moyen
pH	élevé en milieu acide	aucun
Métaux	moyen	moyen
Précautions de manipulation et de stockage	Maintenir à l'obscurité et dans le froid, utiliser des antioxydants et préparer à pH naturel	

### I. 6. 1. 2. Propriétés spectroscopiques du rétinol et de l' $\alpha$ -tocophérol

Les structures chimiques des vitamers de vitamine A et E de la figure (I.3 & I.4) présentent des systèmes de liaisons multiples conjugués, notamment le noyau benzénique, riche en électrons délocalisés facilement excitable par les rayonnements lumineux, ce qui constitue donc des chromophores, qui offre à ces molécules des propriétés spectrochimiques mesurables par les techniques instrumentales. Comme celles utilisant l'HPLC couplé à des détecteurs qui peuvent couvrir les domaines correspondants à ces radiations électromagnétiques. Le tableau (I.5) regroupe quelques propriétés spectrochimiques du rétinol et de l'  $\alpha$ -tocophérol.

Tableau I.5 : Propriétés spectrochimiques considérées dans l'analyse HPLC avec détection UV du rétinol et de l'  $\alpha$ -tocophérol

Propriété	rétinol	$\alpha$ -tocopherol
Poids moléculaire ( $\text{g mol}^{-1}$ )	286.4	430.71
Solubilité	insoluble	insoluble
<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="font-size: 2em; margin-right: 10px;">{</div> <div style="margin-right: 10px;">Eau</div> </div>	soluble	soluble
<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="font-size: 2em; margin-right: 10px;">{</div> <div>Organique</div> </div>		
Longueur d'onde maximale $\lambda_{\text{max}}$ (nm)	325	292
Coefficient d'extinction molaire $\epsilon$ ( $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )	52770	3265
Couleur et forme	Jaune cristalline	Jaune huileux

## I. 7. Références

1. Tova Navarra, *The Encyclopedia of Vitamins, Minerals and Supplements*, 2nd edition, Facts on File New York (USA), 2004, 184.
2. G.F.M. Ball, *Vitamins Their Role in the Human Body*, Blackwell science, 2004, 8.
3. G. F. Combs, Jr. and J. P. McClung, *The Vitamins Fundamental Aspects in Nutrition and Health*, Fifth Edition, Elsevier 2017, 56-216.
4. A. Gentili, F. Caretti, « Analysis of Vitamins by Liquid Chromatography » dans *liquid chromatography: Applications*, (S. Fanali, P. R. Haddad, C. F. Poole, M-L. Riekkola) eds, 2<sup>nd</sup> edition, Elsevier 2017, 2, 572-615.
5. S. S. Nielsen, éd. *Food Analysis*, (Food Science Text Series), 5th Edition, Springer 2017, 216-363.
6. The European Standard (EN), *Foodstuffs - Determination of vitamin A by high performance liquid chromatography - Part 1: Measurement of all-E-retinol and 13-Z-retinol*, EN 12823-1:2014.
7. F. Martin, E. C. Giménez, E. Konings, *New Methods for the Analysis of Water-Soluble Vitamins in Infant Formula and Adult/Pediatric Nutritionals*, *JAOAC Int*, 2016, 99 (1), 19-25.
8. US Department of Agriculture, *DSID, Children's Multivitamin/mineral (MVM) Dietary Supplement Study*, editeurs; Karen W Andrews, Joel Palachuvattil, Pavel A Gusev, PhuongTan Dang, Sushma Savarala, and Fei Han, Research Summary 2017.
9. US Department of Agriculture, (DSID-4), *Adult Multivitamin/mineral (AMVM-2017) Dietary Supplement Study*, editeurs; Karen W Andrews, Pavel A Gusev, PhuongTan Dang, Sushma Savarala, Laura Oh, Renata Atkinson and Malika McNeal, Research Summary 2017.
10. P. Jin, L. Xia, Z. Li, N. Che, D. Zou, X. Hu, Dosage rapide de la thiamine, de la riboflavine, du niacinamide, de l'acide pantothénique, de la pyridoxine, de l'acide folique et de l'acide ascorbique dans les comprimés Vitamines with Minerals par chromatographie liquide à haute performance avec détecteur à barrette de diodes, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2012, 70, 151– 157.
11. R. Gatti, M.G. Gioia, V. Cavrini, Analysis and stability study of retinoids in pharmaceuticals by LC with fluorescence detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2000, 23, 147–159.

12. P. F. Chatzimichalakis, V. F. Samanidou, R. Verpoorte, I. N. Papadoyannis, Development of a validated HPLC method for the determination of B-complex vitamins in pharmaceuticals and biological fluids after solid phase extraction, *J. Sep. Sci.* 2004, 27, 1181–1188.
13. J. L. Luque-García, M.D. Luque de Castro, Extraction of fat-soluble vitamins, *J. Chromatogr. A*, 2001, 935, 3–11.
14. B. Edison, Analysis of Tocopherols by High Performance Liquid Chromatography, *E-Journal of Chemistry* 2009, 6(2), 395-398.
15. R. Paroni, E. M. Faioni, C. Razzari, G. Fontana, M. Cattaneo, Determination of vitamin K1 in plasma by solid phase extraction and HPLC with fluorescence detection, *J. Chromatogr. B* 2009, 877, 351–354.
16. N. Chamkouri<sup>1</sup>, S. Khodadoust, F. Ghalavandi, Solid-Phase Extraction Coupled with HPLC-DAD for Determination of B Vitamin Concentrations in Halophytes, *J Chromatogr Sci*, 2015, 53 (10), 1720–1724.
17. M. A. Schneiderman, A. K. Sharma, D. C. Locke, Determination of vitamin A palmitate in cereal products using supercritical fluid extraction and liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatogr. A*, 1997, 765, 215-220.
18. H. Berg, C. Turner, L. Dahlberg, L. Mathiasson, Determination of food constituents based on SFE: applications to vitamins A and E in meat and milk, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2000, 43, 391-401.
19. S. Scalia, G. Ruberto, F. Bonina, , Determination of Vitamin A, Vitamin E, and Their Esters in Tablet Preparations Using Supercritical Fluid Extraction and HPLC, *J. Pharm. Sci.* 1995, 84, 433-436.
20. S. S. Patil, A. K. Srivastava<sup>1</sup>, Development and Validation of a Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Determination of Eight Water-Soluble Vitamins in Multivitamin Formulations and Human Urine, *J AOAC Int.* 2013, 96(6), 1273-1280.
21. P. Chen, R. Atkinson, W.R. Wolf, Single laboratory validation of a high performance liquid chromatographic diode array detector fluorescence detector/mass spectrometric method for simultaneous determination of water-soluble vitamins in multivitamin dietary tablets. , *JAOAC Int.* 2009, 92, 680 – 688.

22. S. Carballo, S. Prats, S. Maestre, Determination of fat-soluble vitamins in vegetable oils through microwave-assisted high-performance liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 2015, 38, 1073–1081.
23. R.R. Eitenmiller, L. Ye, W. O. Landen, Jr., Vitamin analysis for the health and food sciences Second edition, (USA), CRC Taylor & Francis, 2008, 149-152.
24. C. Yuan, M. Burgyan, D. R. Bunch, E. Reineks, R. Jackson, R. Steinle, S. Wang, Fast, simple, and sensitive high-performance liquid chromatography method for measuring vitamins A and E in human blood plasma, *J. Sep. Sci.* 2014, 37, 2293–2299.
25. G. Lazzarino, S. Longo, A. M. Amorini, V. Di Pietro, S. D’Urso, G. Lazzarino, A. Belli, B. Tavazzi, Single-step preparation of selected biological fluids for the high performance liquid chromatographic analysis of fat-soluble vitamins and antioxidants, *J. Chromatogr. A*, 2017, 1527, 43-52.
26. M. G. Giorgi, K. Howland, C. Martin, A. B. Bonner, A Novel HPLC Method for the Concurrent Analysis and Quantitation of Seven Water-Soluble Vitamins in Biological Fluids (Plasma and Urine): A Validation Study and Application, *The Scientific World Journal*, 2012, Article ID 359721, 8.
27. S. Langer J. K. Lodge, Determination of selected water-soluble vitamins using hydrophilic chromatography: A comparison of photodiode array, fluorescence, and coulometric detection, and validation in a breakfast cereal matrix, *J. Chromatogr. B* 2014, 960, 73–81.
28. P. Jin, L. Xia, Z. Li, N. Che, D. Zou, X. Hu, Rapid determination of thiamine, riboflavin, niacinamide, pantothenic acid, pyridoxine, folic acid and ascorbic acid in Vitamins with Minerals Tablets by high-performance liquid chromatography with diode array detector, *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 70, 151– 157.
29. C. Pakin a, M. Bergaentzle, D. Aoude-Werner, C. Hasselmann ,  $\alpha$ -Ribazole, a fluorescent marker for the liquid chromatographic determination of vitamin B12 in foodstuffs, *J. Chromatogr. A* 2005, 1081, 182–189.
30. A. Gentili, F. Caretti, “Multimethod for Water - Soluble Vitamins in Foods, by Using LC – MS” in Fortified Foods with Vitamins, Analytical Concepts to Assure Better and Safer Products, M. Rychlik (ed), Wiley-VCH, (Germany), 2011, 173-198.
31. A. Gentili, F. Caretti, S. Bellante, S. Ventura, S. Canepari, and R. Curini, Comprehensive Profiling of Carotenoids and Fat-Soluble Vitamins in Milk from

- Different Animal Species by LC-DAD-MS/MS Hyphenation, *J. Agric. Food Chem.* 2013, 61, 1628–1639.
32. A. Kakitani, T. Inoue, K. Matsumoto, J. Watanabe, Y. Nagatomi and N. Mochizuki, Simultaneous determination of water-soluble vitamins in beverages and dietary supplements by LC-MS/MS, *Food Additives & Contaminants : Part A*, 2014, 31, (12), 1939–1948.
  33. N. A. Cellar, S. C. McClure, L. M. Salvati, T. M. Reddy, A new sample preparation and separation combination for precise, accurate, rapid, and simultaneous determination of vitamins B1, B2, B3, B5, B6, B7, and B9 in infant formula and related nutritionals by LC-MS/MS, *Analytica Chimica Acta*, 2016, 934, 180-185.
  34. A. Gentili, A. Cafolla, T. Gasperi, S. Bellante, F. Caretti, R. Curini, Virginia Pérez Fernández, Rapid, high performance method for the determination of vitamin K1, menaquinone-4 and vitamin K12,3-epoxide in human serum and plasma using liquid chromatography-hybrid quadrupole linear ion trap mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 2014, 1338, 102–110.
  35. A. A. Albahrani, V. Rotarou, P. J. Roche, R. F. Greaves, A simultaneous quantitative method for vitamins A, D and E in human serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 2016, 159, 41-53.
  36. L. Konieczna K. Kazmierska, A. Roszkowska A. Szlagatyś-Sidorkiewicz T. Baczek, The LC-MS method for the simultaneous analysis of selected fat-soluble vitamins and their metabolites in serum samples obtained from pediatric patients with cystic fibrosis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, 124, 374-381.
  37. H. Zhang, L. Quan, P. Pei, Y. Lin, C. Feng, H. Guan, F. Wang, T. Zhang, J. Wu, J. Huo, Simultaneous determination of Vitamin A, 25-hydroxyl vitamin D3  $\alpha$ -tocopherol in small biological fluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 2018, 1079, 1-8.
  38. B. Hrvolová, M. Martínez-Huélamo, M. Colmán-Martínez, S. Hurtado-Barroso, R. M. Lamuela-Raventós and J. Kalina, Development of an Advanced HPLC–MS/MS Method for the Determination of Carotenoids and Fat-Soluble Vitamins in Human Plasma, *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17(10), 1719.
  39. A. B. Tayade, P. Dhar, J. Kumar, M. Sharma, O. P. Chaurasia, R. B. Srivastava, Sequential determination of fat- and water-soluble vitamins in *Rhodiola imbricata*

- root from trans-Himalaya with rapid resolution liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta* 2013, 789, 65-73.
40. M. Khaksari, L. R. Mazzoleni, C. Ruan, R. T. Kennedy and A. R. Minerick, Determination of water soluble and fat-soluble vitamins in tears and blood serum of infants and parents by liquid chromatography/mass spectrometry, *Experimental Eye Research*, 2017, 155, 54-63.
  41. Nomenclature of retinoids. *Pure and Applied Chemistry*, 2009, 55(4), 721-726.
  42. Nomenclature of carotenoids (rules approved 1974). *Pure and Applied Chemistry*, 2009, 41(3), 405-431.
  43. Nomenclature of tocopherols and related compounds (Recommendations 1981). *Pure and Applied Chemistry*, 2009, 54(8), 1507-1510.
  44. EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies), 2015. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for vitamin E as  $\alpha$ -tocopherol. *EFSA Journal* 2015 ; 13 (7) : 4149, 10-72.
  45. EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies), 2015. Scientific opinion on Dietary Reference Values for vitamin A. *EFSA Journal*, 2015; 13(3): 4028, 84.
  46. A. C. Ross, C. L. Taylor, A. L. Yaktine, H. B. Del Valle, (Eds), DRI Dietary Reference Intakes Calcium Vitamin D, Institute of Medicine, NAP, Washington (USA), 2011, 19.
  47. J. J. Otten, J. P. Hellwig, L. D. Meyers (Eds), Dietary Reference Intakes (DRI): The Essential Guide to Nutrient Requirements, Institute of Medicine, NAP, Washington (USA), 2006.
  48. EFSA (European Food Safety Authority), Overview on Dietary Reference Values for the EU population as derived by the EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), Summary of Dietary Reference Values, version 4, 2017.
  49. EFSA (European Food Safety Authority), Dietary reference values for nutrients: Summary report. EFSA supporting publication 2017:e15121.
  50. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Human Vitamin and Mineral Requirements, Vitamin and mineral requirements in human nutrition, 2nd edition. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004.
  51. M. Kohlmeier, Nutrient Metabolism Structures Functions and Genes, 2nd Edition, Elsevier 2015, 490-518.

52. S. S. Gropper, J. L. Smith, *Advanced Nutrition and Human Metabolism*, 6th Edition, Wadsworth Cengage Learning (USA), 2013, 376-407.
53. D. A. Bender, *Introduction to nutrition and metabolism*, Fifth Edition, (USA), CRC Press Taylor & Francis Group , 2014, 317-323.
54. M. J. Gibney, S. A. Lanham-New A. Cassidy, H. H. Vorster (Eds), *Introduction to Human Nutrition*, 2 edition, (The Nutrition Society Textbook Series), Wiley-Blackwell 2009, 137-154.
55. A. Dasgupta and K. Klein, *Antioxidants in Food Vitamins and Supplements, Prevention and Treatment of Disease*, Elsevier, 2014, 11-282.
56. M. McGuire, K. A. Beerman, *Nutritional Sciences From fundamentals to food*, 3rd Edition, Wadsworth Cengage Learning (USA), 2013, 466-480.
57. WHO, Xerophthalmia and night blindness for the assessment of clinical vitamin A deficiency in individuals and populations. Vitamin and Mineral Nutrition Information System. Geneva: World Health Organization; 2014, WHO/NMH/NHD/EPG/14.4.
58. WHO. Guideline: Vitamin A supplementation in infants and children 6–59 months of age. Geneva, World Health Organization, 2011.
59. WHO. Guideline: Vitamin A supplementation in pregnant women. Geneva, World Health Organization, 2011.
60. A. Burgess, *Family Nutrition Guide*, Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2004.
61. J. N. Hathcock, A. Azzi, J. Blumberg, T. Bray, A. Dickinson, B. Frei, I. Jialal, C. S Johnston, F. J. Kelly, K. Kraemer, L. Packer, S. Parthasarathy, H. Sies, M. G. Traber, Vitamins E and C are safe across a broad range of intakes, *Am J Clin Nutr.* 2005, 81, 736–45.
62. WHO. Serum retinol concentrations for determining the prevalence of vitamin A deficiency in populations. Vitamin and Mineral Nutrition Information System. Geneva, World Health Organization, WHO/NMH/NHD/MNM/11.3, 2011.
63. U.S. Centers for Disease Control and Prevention. *Second National Report on Biochemical Indicators of Diet and Nutrition in the U.S. Population 2012*. Atlanta (GA): National Center for Environmental Health; April 2012.
64. E S Ford, R L Schleicher, A H Mokdad, U A Ajani, S Liu, Distribution of serum concentrations of  $\alpha$ -tocopherol and  $\gamma$ -tocopherol in the US population, *Am J Clin Nutr*, 2006, 84 (2), 375-383.

65. Brian T. Drewel, D. W. Giraud, S. R. Davy, J. A. Driskell, Less than adequate vitamin E status observed in a group of preschool, *J. Nutr. Biochem*, 2006, 17, 132–138.
66. S. Clark, L. D. Youngman, B. Chukwurah, A. Palmer, S. Parish, R. Peto, R. Collins, Effect of temperature and light on the stability of fat-soluble vitamins in whole blood over several days: implications for epidemiological studies, *Int J Epidemiol*, 2004, 33, 518–525.

## **Chapitre II**

### **Validation des procédures bioanalytiques**

## II.1. Introduction

Comme pour l'ensemble des analyses physico-chimiques, les analyses bioanalytiques consistent à réaliser un certain nombre d'expérimentations, qui sont propres au dosage d'un analyte en particulier dans une matrice biologique bien définie. Ceci se fait selon une succession d'étapes qui commencent toujours par un prélèvement de l'échantillon, pour aboutir enfin à un résultat fiable et permet ainsi de disposer d'une donnée analytique. On peut cependant, répartir une méthode bioanalytique en deux parties : la première partie comporte les étapes pré-analytiques, dont la plupart sont exécutés par du personnel qualifié, autre que l'analyste chimiste, ce qui est pratiqué dans les analyses biochimiques où l'échantillon est un matériel biologique prélevé, par exemple sur des sujets vivants, dans des endroits autorisés pour cette pratique. Cette partie comprend les étapes suivantes :

- Prélèvement de l'échantillon, par exemple un fluide biologique (sang),
- Stockage et traitement de l'échantillon, exemple stockage du plasma après obtention à partir du sang.

La deuxième partie de cette méthode est la partie analytique, elle s'exécute, par contre, dans un laboratoire d'analyse chimique et relève donc directement de la responsabilité du chimiste analyste. Les manipulations à ce niveau utilisent généralement une gamme importante de matériels et d'instruments de mesure sophistiqués, l'échantillon biologique recevait est souvent exposé à l'environnement du laboratoire avant d'être finalement dosé. Cette partie peut engendrer les étapes suivantes :

- Conservation des échantillons (généralement dans leurs conditionnements (emballages) d'origine, à des températures souvent au-dessous de  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,
- Préparation de l'échantillon, par exemple extraction de l'analyte d'intérêt. Cette étape s'effectue généralement le même jour de l'analyse instrumentale,
- Analyses instrumentales,
- Traitement des données et évaluation des résultats (compte-rendu des résultats).

La partie pré-analytique n'est pas étudiée ici, bien qu'elle joue un rôle non négligeable dans l'interprétation du résultat [1]. Ceci du fait qu'elle n'est pas de la responsabilité de l'analyste ni du chercheur-chimiste s'occupant de développer et d'optimiser des

méthodes bioanalytiques. C'est pourquoi nous nous contentons de discuter dans ce manuscrit que de la partie analytique. Par contre, il est renvoyé à la littérature, pour connaître plus des aspects de la partie pré-analytique.

## II.2. Cycle de vie d'une procédure analytique

Comme tout procédé de production les méthodes d'analyse naissent, évoluent et meurent [2]. La méthode d'analyse qui est choisie afin d'obtenir l'information chimique sera bien abandonnée ultérieurement. La figure (II.1) décrit le cycle de vie d'une méthode d'analyse comme rapporter dans le projet de la norme ISO/WD-15725-1 [3]. C'est un processus qui peut inclure plusieurs étapes et montre le rôle de la validation dans la vie d'une méthode d'analyse. À cette fin, des essais rigoureux vis-à-vis de certains critères prédéfinis sont entrepris, pour assurer que la méthode en question satisfait bien au rôle dont elle est prévue.

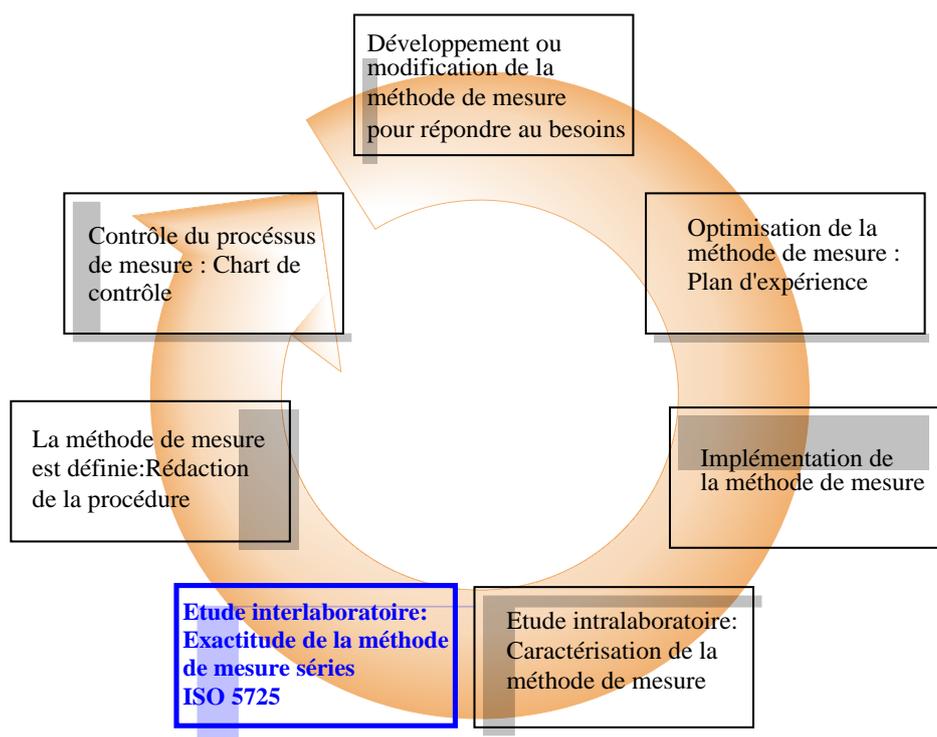


Fig.II.1. : Cycle de vie d'une méthode de mesure

Indépendamment de la disponibilité d'un matériel sophistiqué ou du personnel, même qualifié, qui l'utilise, un laboratoire exerçant sous la norme ISO/IEC 17025 [4] est bien obligé maintenant de donner preuve que la procédure analytique (méthode d'analyse) employée à des fins analytiques quantitatives (ou qualitatives), fournit bien des résultats

fiables. Il faut noter à ce niveau que l'enjeu est important, quel que soit le domaine d'activité socio-économique. Car ces résultats en question pourront être bien utilisés, par exemple pour orienter la politique d'un gouvernement sur un sujet de santé publique, de prendre des décisions judiciaires graves lors d'investigation criminelle, ou les utilisés comme un outil de diagnostic déterminant lors des essais cliniques.

Il faut remarquer aussi que le cout de réalisation de ces mesures est élevé, si ajouté à d'autres dépenses qui peuvent découler des décisions prises sur la base de ces résultats. Il est clair qu'il est important de réaliser des mesures justes et être capable de montrer que le résultat obtenu est correct. La fiabilité d'un résultat doit être justifiée donc par la validation de la méthode analytique envisagée, dont le but est de démontrer qu'elle est bien adaptée aux objectifs analytiques pour lesquels elle est conçue.

## **II.3. Validation des méthodes bioanalytiques**

### **II.3.1. Définition**

Selon la norme ISO/IEC 17025, la validation est définie comme étant « la confirmation par examen et fourniture de preuves réelles que les exigences particulières d'un usage projeté sont remplies ». Selon le VIM [5] la validation est la vérification que des exigences spécifiées sont adéquates pour un usage déterminé. Le terme caractérisation s'applique à la méthode, alors que le terme vérification s'applique au résultat rendu. La validation de la méthode consiste donc à vérifier si les résultats sont adéquats en vue d'un usage défini. La validation de la procédure analytique est maintenant hautement régularisée sous forme de textes référentiels par de nombreuses structures réglementaires, d'organismes de normalisation ou de groupes d'experts. De nombreux documents, plus ou moins officiels ont été publiés par ces structures. On peut par contre, constater qu'ils se recopient largement les uns les autres [1]. Parmi ces principaux documents on cite, les documents ; ISO 5725 [6], ISO 21748 [7], ICHQ2(R1) [8], les documents FDA pour les études bioanalytiques [9, 10]. Ces guides permettent de comprendre les principes adoptés jusqu'à présent pour mener une validation. Pratiquement, cela se résume souvent en un ensemble d'essais nécessaires, qui sont effectués par le personnel (analystes) et au moyen du matériel disponible dans le laboratoire sur un type d'échantillon (matrice) bien déterminé. Dont le traitement des données permet de calculer certains critères statistiques, qui doivent apporter la preuve

de façon traçable que le protocole expérimental de la méthode analytique est suffisamment exact et fiable pour donner des résultats dont on peut faire confiance.

Étant donné qu'un résultat de mesure est toujours entaché d'erreurs, ces essais de validation seront normalement planifiés pour permettre en premier lieu d'identifier et éliminer les erreurs systématiques (essais de justesse). En plus, de minimiser la dispersion des résultats des mesures (essais de fidélité). D'autres essais comme pour évaluer par exemple l'influence de l'environnement du laboratoire (fidélité intermédiaire), l'effet d'interférents présentant dans la matrice, etc. sont aussi exigés. Ces essais représentent les caractéristiques de performance de la méthode d'analyse et qu'on appelle aussi critères de validation d'une procédure analytique. Cependant, on a aujourd'hui pris l'habitude de distinguer la validation intra-laboratoire de la validation inter-laboratoire. La première est universelle et obligatoire pour toutes les méthodes. La seconde, souvent plus lourde n'intéresse en principe que les méthodes qui seront utilisées par plusieurs laboratoires ou dont les résultats peuvent servir à des décisions économiques [2].

### **II. 3. 2. Critères de validation**

Il existe un nombre exhaustif de critères de validation, quoiqu'ils ne soient pas tous applicables pour tous les types de tests [10], c'est le laboratoire qui doit décider quels sont les critères qui doivent être étudiés afin de valider la méthode [11]. L'IUPAC dans son protocole pour la validation des méthodes d'analyse dans un seul laboratoire, "Guide harmonisé pour la validation des méthodes d'analyse dans un seul laboratoire" [12], recommande aux laboratoires adoptant l'approche intra-laboratoire de choisir d'évaluer des critères appropriés et de prendre en considération les exigences des consommateurs dans ce choix. Bien évidemment, ces évaluations doivent être disponibles à la demande des consommateurs. Les critères typiques de validation des méthodes d'analyse proposées par les textes référentiels les plus récents [8, 10, 11, 13], sont regroupés dans le tableau (II.1), selon certains types d'applications analytiques. La sélectivité, la linéarité, la fidélité et les limites de quantification et détection sont les principaux paramètres nécessaires à la connaissance de la performance d'une méthode. Des paramètres additionnels comme la robustesse et l'effet de matrice sont également souvent déterminés, ainsi que le rendement d'extraction ou le taux de purification [14]. Ces critères de validation sont largement discutés dans la littérature.

Tableau II.1 : Les critères typiques de validation des méthodes d’analyse effectuées par un seul laboratoire.

Critères de performance	Type d’application analytique			
	Test d’identification	Test quantitative d’impureté	Test limite pour l’impureté	Quantification de la plus part des composés
sélectivité	○	○	○	○
gamme de concentration		○		○
linéarité		○		○
précision (répétabilité et fidélité intermédiaire)		○		○
justesse (biais)		○		○
limite de détection			○	
limite de quantification		○		

Par contre, on dévoile souvent certaines ambiguïtés et de contradictions quant à leurs définitions ainsi qu’à leurs méthodologies [1]. Par exemple, il est tout à fait évident que dans le cadre de la validation d’une procédure analytique on cherche toujours à éliminer les erreurs et de minimiser la dispersion des résultats, afin d’améliorer les limites de l’applicabilité de la méthode. Cependant, il se trouve que les tests statistiques de signifiante d’hypothèse nulle proposés par ces guides ont l’inconvénient de favoriser les méthodes les plus dispersives, c’est-à-dire dont la fidélité est mauvaise [15]. La figure (II.2) illustre une situation où deux méthodes donnent la même moyenne ( $m$ ) et présentent le même biais (différence entre la moyenne des mesures et la valeur de référence, dite conventionnellement valeur vraie  $\mu$ ). Les mesures obtenues par la méthode 1 (points rouges) sont plus dispersées que celles obtenues par la méthode 2 (points bleus).

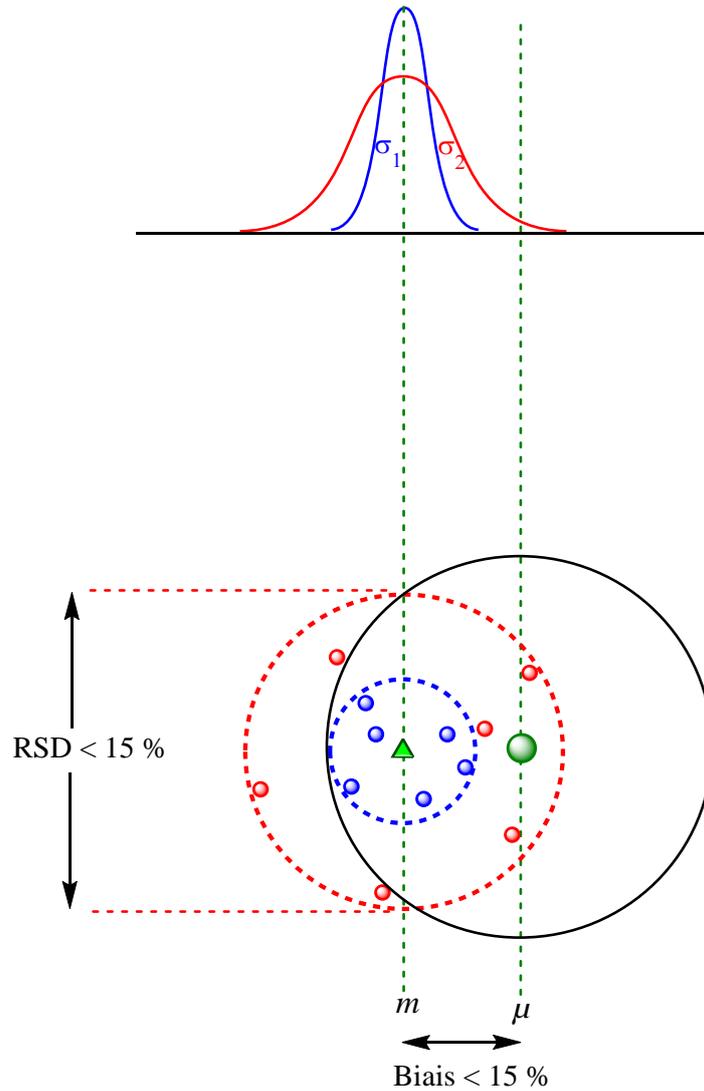


Fig. II.2. Comparaison de deux méthodes, en utilisant la dispersion et la justesse indépendamment.

On voit bien que dans ce cas, l'analyste ne sera pas dans une situation confortable, puisqu'il trouvera beaucoup de mal à décider laquelle de ces deux méthodes doit choisir pour doser ses échantillons. Car, vis-à-vis à un diagnostic classique, les stratégies courantes de validation utilisent la fidélité et la justesse de façon séparée. S'agissant de comparer les calculs de fidélité et de justesse sous forme relative, par exemple, à une valeur seuil (15%) [16], l'analyste va conclure à la validité de la méthode 1, du fait que la valeur de référence (gros point vert) entre dans l'intervalle de confiance de la moyenne. Mais, il aura certainement beaucoup de peine à rejeter une méthode aussi précise que la méthode 2, ce qui n'est jamais satisfaisant. Les méthodes de validation

classiquement utilisées correspondent plutôt à la caractérisation du processus d'analyse. Le calcul de toutes les grandeurs spécifiques (critères de validation) de la méthode étudiée ne permet en aucun cas de répondre à la question de l'adaptation de la méthode à son objectif analytique [17].

### **II. 3. 3. Validation par la stratégie du profil d'exactitude**

Pour contourner ces insuffisances, la commission SFSTP (Société française des sciences et techniques pharmaceutiques) a publié en 2003 un guide intitulé (Démarches harmonisées pour la validation des procédures analytiques quantitatives) [18], qui propose de revoir les bases de la validation pour une stratégie accommodée. La réflexion de cette nouvelle stratégie suggère qu'en plus de l'étude de sélectivité, la validation de la méthode analytique ne doit pas se limiter à réunir des preuves concrètes seulement (calcul de la fidélité et de la justesse), mais la recherche doit se répandre à deux autres éléments bien indispensables ; comme fixer les objectifs de la méthode analytique en imposant une limite d'acceptabilité et de vérifier si ces preuves sont en adéquation avec ces objectifs. Cette démarche permet d'éviter l'anomalie citée ci-dessus, en minimisant le risque d'accepter une procédure incorrecte, ou de refuser une procédure qui réponde bien aux objectifs voulus de son utilisation. Contrairement aux méthodes courantes, la méthodologie du profil d'exactitude prend en considération la justesse et la fidélité, en même temps, c.-à-d. l'erreur totale, pour la validation des procédures analytiques.

#### **II. 3. 3. 1. Notion d'erreur totale**

Deux erreurs sont généralement averties dans les analyses, il y a d'abord l'erreur aléatoire (Fidélité), qui traduit la répétabilité et qui est estimée par l'écart-type d'une population de données de mesures répétées sur un même échantillon. Il y a aussi l'erreur systématique qui est estimée par un biais (Justesse), qui représente la différence qui existe entre la moyenne de plusieurs (séries) mesures répétées sur ce même échantillon par rapport à une valeur de référence. Ces estimations ne sont réalisables, que lorsqu'il y a plusieurs données de répétitions de mesures. Alors que lorsqu'on réalise une seule mesure, comme dans le cas des analyses en routine, par exemple, on ne peut pas différencier entre ces deux types d'erreurs. Ces composants de l'erreur sont généralement évalués au cours de la validation des méthodes. Lorsque ces deux

paramètres sont combinés, entre eux, on parle alors d'erreur totale ou exactitude. Ces paramètres sont définis selon le VIM [5] de la façon suivante :

### II. 3. 3. 1. 1. Fidélité

La fidélité est définie comme étant, « l'étroitesse de l'accord entre les indications ou les valeurs mesurées obtenues par des mesurages répétés du même objet ou d'objets similaires dans des conditions spécifiées ». Les conditions spécifiées peuvent être, par exemple, des conditions de répétabilité, des conditions de fidélité intermédiaire ou des conditions de reproductibilité, comme c'est indiqué dans la norme ISO 5725 [6]. La fidélité est généralement exprimée par l'écart-type, la variance ou le coefficient de variation dans ces mêmes conditions spécifiées.

### II. 3. 3. 1. 2. Justesse

La justesse est définie comme étant, « l'étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence. » Selon l'ISO 5725 [6], la mesure de la justesse est généralement exprimée en termes de biais. La justesse caractérise donc l'erreur systématique (varie en sens inverse de l'erreur systématique), mais elle n'est pas liée à l'erreur aléatoire.

### II. 3. 3. 1. 3. Exactitude

Par définition, l'exactitude est « l'étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et une valeur vraie (valeur de référence acceptée) d'un mesurande ». Selon l'ISO 5725 [6], le terme exactitude, lorsqu'il est appliqué à un ensemble de résultats d'essais, implique une combinaison de composantes aléatoires et une erreur systématique commune ou une composante de biais. La figure (II.3) illustre ces trois définitions pour une dispersion de résultats supposée suivre une loi normale d'écart-type  $\sigma$  et de moyenne  $\bar{X}$ . On remarque, cependant, qu'une mesure unique dépend de son erreur analytique totale. Pour une mesure  $x_i$ , cette combinaison a été décrite par Mandel [19] sous forme d'une différence par rapport la valeur de référence  $\mu$  (inconnue), selon l'équation suivante :

$$\text{Erreur Totale} = x - \mu = (x - \bar{X}) + (\bar{X} - \mu) \quad (II. 1)$$

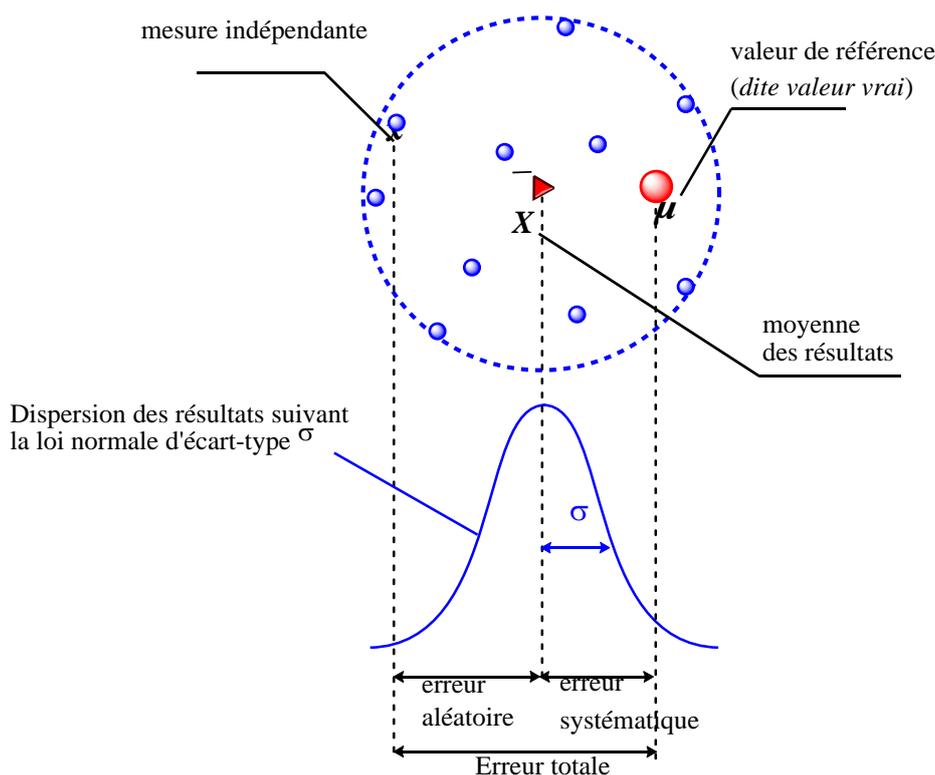


Fig. II.3. Illustration de l'erreur totale, de la justesse et de la fidélité des résultats d'une méthode analytique.

Le principe de méthodologie du profil d'exactitude peut être exprimé par l'équation (II.2), qui précise que la différence entre une mesure ( $x$ ) et la vraie valeur ( $\mu$ ) doit être inférieure à une limite d'acceptation ( $\lambda$ ) définie en fonction des contraintes du secteur d'activité [18].

$$-\lambda < x - \mu < +\lambda \Leftrightarrow |x - \mu| < \lambda \quad (II. 2)$$

La limite d'acceptation  $\lambda$  varie selon les exigences de la pratique professionnelle, par exemple, une limite de 15 % est communément admise en bioanalyse et environnement [15, 16]. La limite d'acceptabilité est donc un premier concept qui permet de prendre des décisions basées sur l'objectif de la méthode analytique. Cependant, pour juger que la procédure est acceptable, il faut désigner une probabilité  $\beta$  qui affirme que la différence de l'équation (II.2) soit comprise dans les limites d'acceptation déjà établies. Dans ce cas, on fixe une valeur seuil arbitraire  $\beta$ , qui se situe généralement entre 80 et 95%, en fonction du champ d'application [20]. Autant que cette probabilité est grande, autant on aura la garantie que l'écart entre chaque valeur mesurée d'un échantillon et sa « vraie valeur » soit compris dans ces limites d'acceptation, il est préférable donc de

fixer cette proportion au moins à 80% [21]. Une procédure analytique validée dans un domaine de concentration donné devient donc acceptable avec un risque connu. Ainsi, pour  $\beta = 95\%$ , il y a risque que les résultats obtenus par cette méthode d'analyse sont à plus ou moins 5% de ladite valeur vraie. Cette notion peut se traduire par la relation suivante [14] :

$$P(|x - \mu| < \lambda) \geq \beta \quad (II. 3)$$

Le deuxième concept, complémentaire à la limite d'acceptation, consiste à déterminer un intervalle de tolérance (IT), dont les limites (%) sont liées à la proportion  $\beta$ , on parle alors de  $\beta$ -expectation tolérance intervalle ( $\beta$ -TI). Il permet de prédire entre quelles limites la méthode produira en moyenne un pourcentage connu de futures mesures, pour ensuite vérifier si cet intervalle se situe bien entre les limites d'acceptabilité [1]. La réalisation du profil d'exactitude est formalisée par certaines étapes analytiques, conçues pour être exécutées dans des conditions de répétabilité intermédiaire (c'est à dire, même opérateur, même échantillon, même instrument, mais selon des séries différentes). Le choix de ces conditions doit couvrir le maximum de sources d'incertitude, qu'on pourra rencontrer lors de l'utilisation future de la méthode analytique en routine, comme varier les jours dans les essais inter-séries, pour prendre en compte, par exemple, l'évolution des réactifs et des échantillons, stabilité des instruments, etc. Comme il est aussi important de faire ces essais à plusieurs niveaux de concentration à fin de couvrir l'ensemble du domaine de validation de la méthode. Pour étudier ces effets, globalement, il est recommandé d'utiliser un plan expérimentale de validation, Par conséquent, les résultats des tests répétés vont permettre de calculer les critères de validation (fidélité et justesse), pour finir jusqu'à la détermination des limites (inférieur et supérieur) de l'intervalle de tolérance.

### II. 3. 3. 2. Planification des expériences de validation

Pour les procédures analytiques indirectes, telles que les méthodes physico-chimiques d'analyse, la construction du profil d'exactitude nécessite de réaliser des expérimentations bien conçues a priori sur deux types de matériels. D'une part les étalons qui sont les échantillons, avec ou sans matrice, de concentrations connues qui permettent d'établir les « points de la courbe d'étalonnage », on parle dans ce cas de plan d'étalonnage. D'autre part les standards de validations qui sont des échantillons, reconstitués dans la matrice ou tout autre matériau de référence, dont la valeur dite vraie

peut être établie par consensus et qui sont utilisés pour la validation de la procédure d'analyse. Les guides de validation de la commission SFSTP [22, 23] proposent selon le cas, différents protocoles pour établir le plan des expériences de validation et qui exigent tous de réaliser des expérimentations répétées. Il faut définir un nombre de niveaux de concentration, délimitant la gamme de concentration étudiée, un nombre de séries et en fin un nombre de répétitions effectuées par niveau, qui peut être au minimum égal à 2, ou bien porté au moins à 3, si le nombre de niveaux étudiés est inférieur ou égal à 3 [21]. Pour recueillir enfin, suffisamment de données nécessaires pour computer les critères la validation.

### **II. 3. 3. 2. 1. Plan d'étalonnage**

Le plan d'étalonnage servira à déterminer la fonction d'étalonnage de la méthode (fonction de réponse), après avoir testé plusieurs modèles d'étalonnage pour calculer les concentrations (quantités) du composé d'intérêt dans les échantillons inconnus.

### **II. 3. 3. 2. 2. Plan de validation**

Le plan de validation servira à déterminer les estimateurs de validations à l'aide les concentrations obtenues en retours, par les différents plans d'étalonnage, sur les standards de validation. On peut construire donc plusieurs profils d'exactitude pour les mêmes données.

### **II. 3. 3. 3. Construction du profil d'exactitude**

Pour construire le profil d'exactitude, suivant les recommandations des guides SFSTP mentionnés auparavant, il faut arriver à computer des intervalles de tolérance à différents niveaux de concentration, ceci est faisable après des calculs enchainés, en appliquant les équations succinctes, ci-dessous :

Pour un plan d'expérience établi pour réaliser  $J$  répétitions à chaque niveau de validation  $K$  et pendant  $I$  séries (jours), on calcul la moyenne générale de la référence au niveau de concentration  $\bar{\mu}_{(k)}$ :

$$\bar{\mu}_{(k)} = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \mu_{ij(k)}}{I \times J} \quad (II. 4)$$

On calcule ensuite la concentration moyenne retrouvée en retour du niveau de validation :

$$\bar{X}_{(k)} = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J X_{ij(k)}}{I \times J} \quad (II. 5)$$

Après, on calcule la variance intra-laboratoire ( $s_r^2$ ), en utilisant la somme de carrés résiduelle ( $SCE_r$ ) :

$$s_r^2 = \frac{SCE_r}{I(J - 1)} \quad (II. 6)$$

Où :

$$SCE_r = \sum_{j=1}^J \sum_{i=1}^I (X_{ij(k)} - \bar{X}_{(k)})^2 \quad (II. 7)$$

Ainsi que la variance inter-séries ( $s_B^2$ ), en utilisant la somme de carrés inter-séries ( $SCE_B$ ), qui peut être déduite de l'équation générale de l'analyse de variance ( $SCE_B = SCE_t - SCE_r$ ).

$$s_B^2 = \frac{SCE_B}{I - 1} - s_r^2 \quad (II. 8)$$

Où  $SCE_t$  représente la somme totale des écarts à la moyenne générale du niveau, telle que :

$$SCE_t = \sum_{j=1}^J \sum_{i=1}^I (X_{ij(k)} - \bar{X}_{(k)})^2 \quad (II. 9)$$

En combinant ces deux variances, on obtient l'écart-type de la fidélité intermédiaire par niveau ( $s_{FI}$ ) :

$$s_{FI} = \sqrt{s_r^2 + s_B^2} \quad (II. 10)$$

Par contre, la justesse par niveau peut être calculée sous forme de biais absolu ou relatif, ou bien évaluée à l'aide du taux de recouvrement moyen (R%) comme suit :

$$R (\%) = \frac{\bar{\mu}_{(k)}}{\bar{X}_{(k)}} \times 100 \quad (II. 11)$$

Certains coefficients sont nécessaires pour simplifier la suite des écritures, comme le rapport des variances inter et intra série ( $Q$ ) :

$$Q = \frac{s_B^2}{s_r^2} \quad (II. 12)$$

Et un facteur noté ( $B'$ ) qui est écrit en fonction de  $Q$ , tel que :

$$B' = \sqrt{\frac{Q + 1}{J \times Q + 1}} \quad (II. 13)$$

On calcule après l'écart-type de l'intervalle de tolérance ( $s_{IT}$ ), selon les travaux de Mee [24] adoptés par la commission SFSTP.

$$s_{IT} = s_{FI} \times \sqrt{1 + \frac{1}{IJ \times B'^2}} \quad (II. 14)$$

L'écart-type de tolérance est ensuite multiplié par un facteur de couverture de l'IT, ( $k_{IT}$ ), tel que :

$$k_{IT} = t_{\left(\nu, \frac{1+\beta}{2}\right)} \quad (II. 15)$$

Où  $t_{\left(\nu, \frac{1+\beta}{2}\right)}$  représente le quantile de la distribution t de Student pour la probabilité  $(1+\beta)/2$  et avec  $\nu$  le nombre de degrés de liberté, calculé selon l'approximation de Satterthwaite [25], tel que :

$$\nu = \frac{(Q + 1)^2}{\frac{\left(Q + \frac{1}{J}\right)^2}{I - 1} + \frac{1 - \frac{1}{J}}{IJ}} \quad (II. 16)$$

En fin, l'intervalle de tolérance IT pour un niveau de validation, avec une moyenne  $\bar{X}_{(k)}$ , un écart-type  $s_{IT}$  et un facteur de couverture  $k_{IT}$  se présente comme suit :

$$\left[ \bar{X}_{(k)} - k_{IT} \times s_{IT}, \bar{X}_{(k)} + k_{IT} \times s_{IT} \right] \quad (II. 17)$$

Tel que la limite de tolérance basse relative est :

$$\left( \frac{\bar{X}_{(k)} - k_{IT} \times s_{IT}}{\bar{\mu}_{(k)}} \right) \times 100 \quad (II. 18)$$

Et la limite de tolérance haute relative est :

$$\left( \frac{\bar{X}_{(k)} + k_{IT} \times s_{IT}}{\bar{\mu}_{(k)}} \right) \times 100 \quad (II. 19)$$

### II. 3. 3. 4. Illustration graphique du profil d'exactitude

Le calcul de l'intervalle de tolérance à plusieurs niveaux de concentration permet de représenter le profil d'exactitude sous forme d'un graphique unique, lorsque tous les résultats sont exprimés en valeurs relatives, par rapport à la valeur de référence du niveau.

La figure (II.4) illustre un exemple du tracé des valeurs des limites de l'IT et du taux de recouvrement moyen, par rapport aux concentrations de références moyennes. En supposant que les variations de ces paramètres sont linéaires entre les différents niveaux de validation. On peut alors relier les points désignant leurs valeurs par des segments de droites, pour obtenir un modèle interprétable du profil d'exactitude. On remarque que ce graphique représente un outil de diagnostic visuel, simple et direct, pour juger la validité de la méthode dans le domaine de concentration étudié. Ainsi, dès que l'IT dépasse les limites d'acceptation ( $\pm\lambda$ ), la méthode ne devient plus valide, autrement dit, aussi longtemps que l'IT est compris entre les limites d'acceptabilité, la méthode utilisée répond bien aux objectifs fixés initialement.

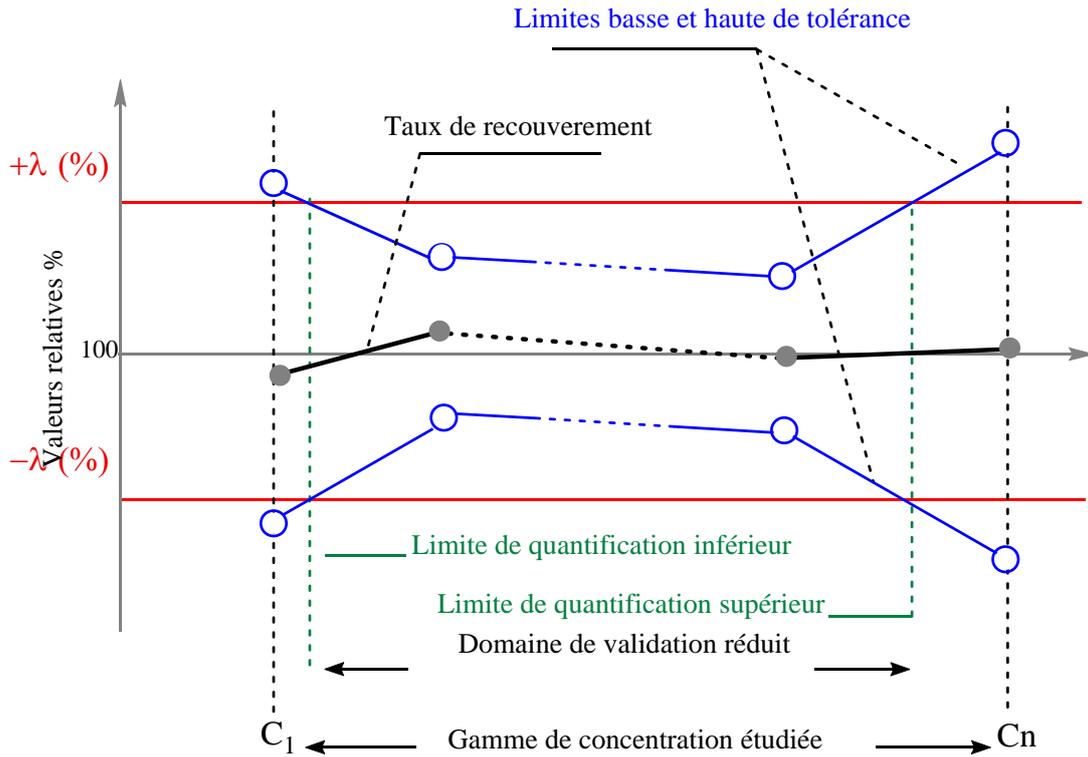


Fig. II.4. Profil d'exactitude représenté à partir de valeurs relatives en fonction de la concentration.

Des informations supplémentaires peuvent être aussi tirées de ce graphique, comme les limites de quantification (inférieure et supérieure), si on maintient toujours la supposition de linéarité des variations évoquée ci-dessus, ces limites représentent sur le graphique les points d'intersection des bornes de l'IT et les limites d'acceptation.

## II .4. Références

1. M. Feinberg, guide de validation de méthodes d'analyse, Labo-stat, éditions TEC&DOC, Lavoisier, 2009, 33-255.
2. M. Feinberg, validation interne des méthodes d'analyse, *techniques-ingénieur*, Réf : P224 v1, 2001.
3. ISO/WD 15725-1, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results, Part 1: Introduction and basic principles
4. ISO/IEC FDIS 17025, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, ISO/IEC FDIS 17025:2017(E)
5. International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM), JCGM 200:2012, [www.bipm.org](http://www.bipm.org)
6. ISO 5725-1, Application of the Statistics, Accuracy (Trueness and Precision) of the Results and Methods of Measurement, Part 1: General Principles and Definitions, International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland, 1994.
7. ISO 21748:2017 (E), Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty evaluation, International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland, 2<sup>ed</sup> edition, 2017.
8. ICH Harmonized Tripartite Guideline, Validation of analytical procedures: Text and Methodology, Q2(R1) Step 4 version, 2005.
9. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (FDA), bioanalytical method validation, Guidance for Industry, Biopharmaceutics, September 2013.
10. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (FDA), Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics, Guidance for Industry, Pharmaceutical Quality/CMC, July 2015.
11. B. Magnusson and U. Ornemark (eds.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0. [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org)
12. M. Thompson, S. L. R. Ellison, A. Fajgel, P. Willetts, R. Wood, Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis, IUPAC- (Technical Report), *Pure Appl. Chem.*, 2002, 74, No. 5, 835–855.
13. V. Barwick (Ed), Eurachem/CITAC Guide: Guide to Quality in Analytical Chemistry: An Aid to Accreditation (3<sup>rd</sup> ed. 2016). [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org).

14. M. Feinberg, Validation des méthodes d'analyse quantitatives au moyen du profil d'exactitude, *Technique de l'ingénieur*, P224v2, 2012.
15. B. Boulanger, P. Chiap, W. Dewe, J. Crommen, Ph. Hubert, An analysis of the SFSTP guide on validation of chromatographic bioanalytical methods: progresses and limitations, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 753\_/765.
16. Ph. Hubert, J.-J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.-A. Compagnon, W. Dewe, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: SFSTP proposal—Part I, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 579–589.
17. Cédric Moretton. Analyse des caramels liquides : développement et validation de nouvelles méthodes basées sur la chromatographie en phase liquide bidimensionnelle (LC-LC). Autre. Université Claude Bernard - Lyon I, 2009. Français. <NNT : 2009LYO10279>
18. Ph. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat, Validation des procédures analytiques quantitatives, Harmonisation des démarches, *S.T.P. Pharma Pratiques*, 2003, 13 (3), 101 – 138.
19. J. Mandel, *The Statistical Analysis of Experimental Data*, (Dover Books on Mathematics) Dover Publications, INC., New York (USA), 2012, 105.
20. Valérie Gaudin. Caractérisation de la performance et validation des méthodes de dépistage des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires. Sciences agricoles. Université Rennes 1, 2016. Français. <NNT : 2016REN1B006>.
21. ANSES, (Pôle Recherche et référence), Guide de validation des méthodes d'analyses, ANSES/PR3/07/01 version (a), 2015.
22. Ph. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat, E. Rozet, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: SFSTP proposal—Part II, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45 (2007) 70–81.
23. Ph. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Cohen, P.-A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, L. Valat,

- E. Rozet, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: SFSTP proposal—Part III, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45 (2007) 82–96.
24. R.W. Mee;  $\beta$ -Expectation and  $\beta$ -Content Tolerance Limits for Balanced One-Way ANOVA Random Model. *Technometrics* (1984) 26:3, 251-254.
25. F. E. Satterthwaite, Synthesis of variance, *Psychometrika*, 1941, 6 (5), 309-316.

## **Chapitre III**

### **Incertitude de mesure dans les essais chimiques**

### III. 1. Introduction

Le but de toute mesure est d'attribuer une valeur au mesurande. En réalité, le processus analytique de mesure ne permet en aucun cas de saisir la valeur vraie (qui reste toujours inconnue), mais nous conduit à estimer le mesurande, en l'attribuant une valeur, qui dans les meilleurs des cas, soit proche de la valeur vraie et dont on peut faire confiance [1]. D'ailleurs, il est maintenant mal admet de rendre compte un résultat de mesure sous sa forme numérique unique, alors qu'on sait qu'elle est seulement une approximation de la vraie valeur. Le résultat de mesure est donc une « variable aléatoire » dont l'expression doit contenir en plus de la valeur numérique attribuée au mesurande, un paramètre de dispersion qui marque cette confiance. Ceci dit, qu'on doit associer au résultat une estimation de l'étendue des valeurs dans laquelle se situe la vraie valeur [2]. Par contre, ce résultat de mesure n'est obtenu qu'après de lourdes tâches expérimentales employant des dépenses et du temps, tel est le cas des analyses chimiques, pour qu'il soit finalement interprété et utilisé pour prendre des décisions, de dire, par exemple, si les éléments testés sont conformes avec les spécifications, etc. L'ampleur de la décision qui sera prise par rapport à ce résultat exige donc, autant d'information sur sa qualité, indépendamment de la validité de la méthode analytique utilisée ou le matériel expérimental employé. Sans cette information, il y a un risque réel, soit de surinterpréter ou de sous-interpréter les résultats. Les décisions incorrectes prises sur cette base vont avoir des répercussions socio-économiques graves, par exemple, ils peuvent conduire à des dépenses inutiles dans l'industrie, des poursuites judiciaires incorrectes, ou des conséquences sociales ou de santé contraire à la réalité. C'est pourquoi, il est incessamment recommandé, d'accompagner ce résultat par des preuves qui garantissent la valeur attribuée à la grandeur testée et qui donnent une indication quantitative sur la qualité du résultat, c'est l'incertitude de mesure. D'ailleurs, il est maintenant reconnu que les laboratoires accrédités sous la norme ISO 17025 [3] doivent obligatoirement associer l'incertitude, étant qu'un indice de qualité des résultats obtenus par leurs processus de mesure.

### III. 2. Définition de l'incertitude de mesure

Selon le VIM [4], l'incertitude de mesure est un paramètre associé au résultat d'un mesurage, qui caractérise la dispersion des valeurs qui pourraient raisonnablement être

attribuées au mesurande. Ce paramètre peut être par exemple un écart-type obtenu à partir de la distribution statistique des résultats correspondant à des séries de mesurages.

### III. 3. Évaluation de l'incertitude de mesure

L'évaluation et l'expression de l'incertitude nécessitent qu'elle soit uniforme, pour pouvoir comparer facilement des mesurages effectués partout dans le monde. Le document de base qui s'occupe de l'incertitude des résultats de mesure est le guide pour l'expression de l'incertitude de mesure, connu sous l'abréviation GUM [2] et qui est fondée sur une théorie rigoureuse et apporte une évaluation logique et transférable de l'incertitude de mesure [5]. Ce guide établit les règles générales pour l'évaluation et l'expression de l'incertitude, prévues pour s'appliquer à un large éventail de mesurages (principalement des mesures physiques). La dernière version de ce guide [2] a été préparée par un groupe de travail mixte composé d'experts désignés par le bureau international des poids et mesures (BIPM), l'organisation internationale de normalisation (ISO), la Commission électrotechnique internationale (IEC), et l'Organisation internationale de métrologie légale (OIML). Bien que d'autres organisations ont contribué à son élaboration et il est publié aussi en leurs noms, il s'agit de l'union internationale de chimie pure et appliquée (UIPAC), l'union internationale de physique pure et appliquée (UIPAP) et la fédération internationale de chimie clinique et de médecine de laboratoire (FICC). On compte donc au total sept institutions réglementaires, dont deux s'intéressent directement au domaine de la chimie.

Les règles de ce guide recommandent que l'incertitude soit exprimée sous forme d'incertitude type pour chaque paramètre identifié comme influent sur le procédé de mesure, de combiner les incertitudes types, en acceptant de manière égale les évaluations de type A (obtenue par l'analyse statistique de séries d'observations) et les évaluations de type B (obtenue par d'autres moyens que l'analyse statistique de séries d'observations). La procédure de l'évaluation de l'incertitude de mesure, par contre, doit être détaillée et applicable dans le cas où une équation de mesure (modèle mathématique) compréhensive peut être développée et où l'incertitude est faible lorsqu'elle est comparée à sa valeur respective. La rigueur qu'on peut lire à travers ces principes exige que le concept de base doive être accepté et les recommandations doivent être suivies [6].

Tableau III.1 : Principaux documents référentiels pour l'estimation de l'incertitude de mesure

Documents référentiels		Approches d'évaluation				
		General	Modélisation	Intralaboratoire	Interlaboratoire	Tests d'appétitude
ISO, <i>Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM)</i>	[2]	•	•			
EURACHEM / CITAC, <i>Quantifying uncertainty in analytical measurement</i> , 3rd edition	[1]	•	•	•		
EUROLAB, <i>Guide to the Evaluation of Measurement Uncertainty for Quantitative Test Results</i>	[5, 6]	•	•	•		•
EA, <i>Guidelines on the expression of uncertainty in quantitative testing</i>	[7]	•	•	•	•	•
NORDTEST, <i>Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories</i>	[8]			•	•	•
ISO 5725- (1 - 6) <i>Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results</i>	[9-14]			•	•	
ISO/TS 21748 <i>Guide to the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation</i>	[15]				•	
AFNOR FD X 07-021, <i>Fundamental standards – Metrology and statistical applications – Aid in the procedure for estimating and using uncertainty in measurements and test results</i>	[16]		•		•	
ISO 13528 <i>Statistical methods for use in proficiency testing by inter-laboratory comparison</i>	[17]					•
ISO/TS 21749 <i>Measurement uncertainty for metrological applications – Repeated measurements and nested experiments</i>	[18]			•		

Dans le domaine des sciences, cette approche repose sur l'établissement d'une équation mathématique, qui relie entre le résultat de mesure (valeur de sortie) et les valeurs d'entrées des différentes grandeurs d'influence. Il faut remarquer, cependant, que dans le domaine de physique ces principes de métrologie peuvent être facilement accessibles, du fait qu'il est toujours possible de réaliser une comparaison directe entre la mesure de toutes les grandeurs physiques et un étalon approprié. En appliquant une méthode primaire qui possède des qualités métrologiques élevées, et que sa mise en œuvre peut être entièrement décrite par cette relation mathématique, reliant la mesure à la quantité du mesurande [19]. Ce type d'évaluation rigoureux est appelé approche par modélisation ou "Bottom-up" approche pour l'évaluation de l'incertitude de mesure, aussi connu sous l'appellation approche ISO-GUM. Dans le cas des mesures chimiques cette démarche est souvent difficile à réaliser, à cause de la complexité de l'échantillon chimique, dont les de traitement ne tolère pas une telle modélisation. En effet, l'analyte, peut exister sous plusieurs formes et qui se trouve souvent liée à une matrice en présence d'un nombre considérable de substances différentes, ce qui fait que l'analyse chimique n'est pas toujours concevable à ce mode d'estimation. Bien heureusement, il existe maintenant d'autres approches aussi reconnues pour justifier la qualité des mesures, notamment l'approche alternative de validation, même, si l'incertitude ici n'est estimée que de façon globale et ne permet pas de discuter pleinement toutes les sources potentielles d'erreurs influentes sur les étapes de processus de mesure. Mais, qui reste suffisamment valable pour accompagner les performances de validation de la méthode analytique utilisée. Le tableau (III.1) repris du manuel de métrologie et d'essais [20], mis à jour et résume les principaux textes référentiels, dont beaucoup sont des documents normatifs, qui appuie cela et les approches qu'ils traitent pour l'évaluation de l'incertitude de mesure.

### **III. 4. Les différentes approches pour l'évaluation de l'incertitude de mesure**

On distingue au total quatre approches, pour l'évaluation de l'incertitude de mesure ; l'approche de modélisation dont les principes sont cités auparavant, l'approche basée sur les données de validation d'un même laboratoire, l'approche basée sur les données de validation inter-laboratoire et l'approche basée sur les essais d'aptitude. Ces approches peuvent être classées selon les évaluations effectuées par le laboratoire lui-

même. On remarque dans ce cas deux grandes catégories ; l'approche intra-laboratoire qui regroupe l'approche de modélisation et l'approche basée sur les données de validation d'un seul laboratoire. L'autre catégorie est l'approche inter-laboratoire qui comprend les deux autres restantes. Cette classification est aussi souhaitée faite d'une autre façon, en considérant l'approche de modélisation comme une classe à part et les trois autres constituent la catégorie des approches empiriques. La figure (III.1) est reprise du rapport technique EUROLAB (Approches alternatives pour l'évaluation de l'incertitude) [6], illustre bien cette classification et propose une carte de route pour choisir l'approche la plus adéquate.

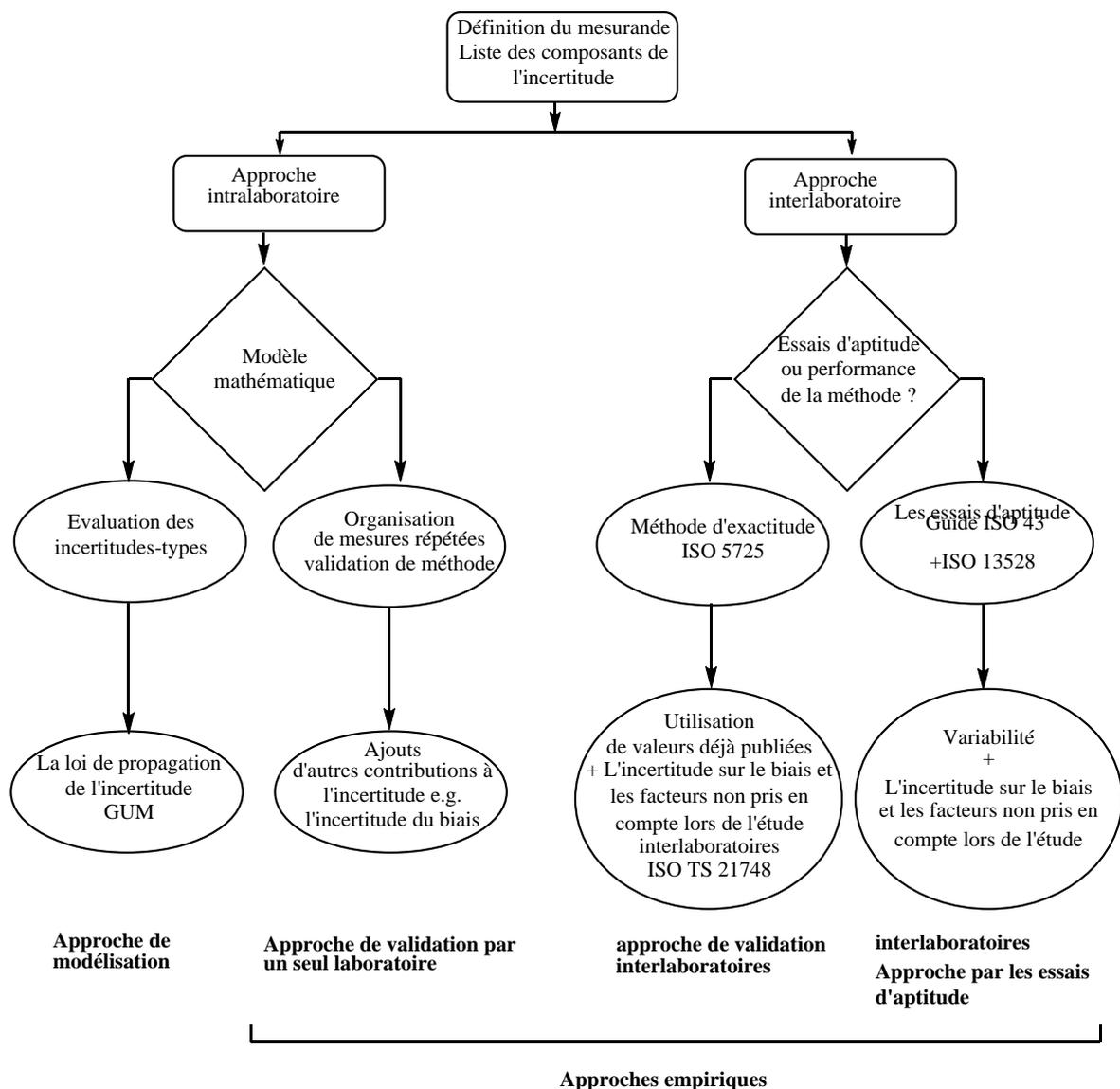


Fig. III.1. Carte de route des différentes approches pour l'évaluation de l'incertitude de mesure.

En effet, il est établi maintenant, des lignes directrices et des normes désignées à adapter les principes du GUM, pour quantifier l'incertitude de mesure et de proposer des applications pratiques pour beaucoup de domaines d'activité. Parmi les documents qui expriment ces instructions, on trouve le guide Eurachem "quantification de l'incertitude dans les mesures analytiques" qui s'intéresse à accommoder ces principes dans le domaine des analyses chimiques. Dans la suite de cette étude, seules les approches de la classe intra-laboratoire seront discutées.

### **III. 5. Approches intra-laboratoire pour l'évaluation de l'incertitude de mesure**

#### **III. 5. 1. Approche de modélisation (ISO-GUM)**

Cette approche permet d'estimer l'incertitude globale selon un chemin ascendant (Bottom-up), qui peut être réparti en quatre étapes [21], exigeant de spécifier le mesurande, d'identifier les sources potentielles d'incertitude, d'évaluer et de combiner toutes les incertitudes associées à la mesure. Le processus de quantification de l'incertitude globale selon cette approche est résumé dans la figure (III.2).

##### **III. 5. 1. 1. Spécification du mesurande**

Cette étape exige de définir de façon claire et sans ambiguïté ce qui va être mesuré, tout en donnant un modèle qui exprime quantitativement la relation entre la valeur du mesurande (la grandeur de sortie) et les paramètres dont elle dépend (grandeurs d'entrées). Ces paramètres peuvent être eux-mêmes des mesurandes, des grandeurs qui ne sont pas directement mesurées ou des constantes [2].

Le modèle est une équation mathématique qui relie donc toutes les grandeurs qui interviennent dans le processus expérimental de mesure (mesurage), ce modèle peut être écrit explicitement sous forme :

$$Y = f(X_1, X_2, \dots, X_N) \quad (III. 1)$$

Où Y est la grandeur de sortie (mesurande),  $X_1, X_2, \dots, X_N$  sont les grandeurs d'entrées et  $f$  représente la fonction de mesure.

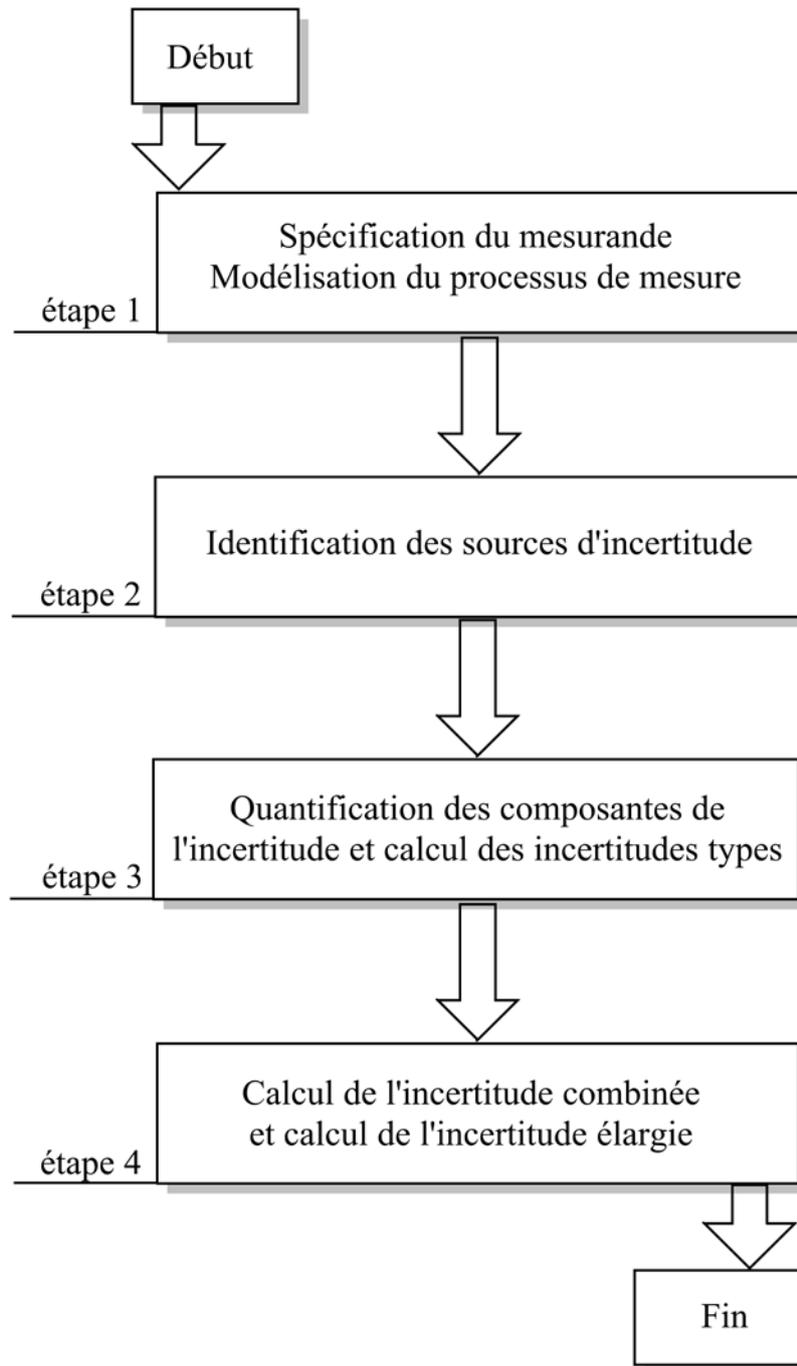


Fig. III.2. Le processus d'évaluation de l'incertitude de mesure selon l'approche ISO-GUM.

Si  $x_1, x_2, \dots, x_N$  sont les estimations pour les valeurs d'entrées des  $N$  grandeurs  $X_1, X_2, \dots, X_N$ , alors la fonction  $f$  fournit l'estimation  $y$  qui est une valeur de sortie unique d' $Y$  et on peut écrire ainsi :

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_N) \quad (III.2)$$

### III. 5. 1. 2. Identification des sources d'incertitude

À ce stade, toutes les sources d'incertitude présentes dans les différentes étapes de la procédure d'analyse doivent être identifiées. Pratiquement, l'identification des sources d'incertitude commence par l'équation utilisée pour le calcul du mesurande, puisque tous les paramètres qui forment cette équation peuvent avoir eux aussi une incertitude associée à leur valeur. D'autres paramètres affectant les résultats de la mesure peuvent exister, mais ne figurent pas dans l'expression du calcul du mesurande, comme la température, par exemple. Toutes ces différentes sources doivent être prises en considération dans le calcul de l'incertitude de mesure et doivent être comptées dans le budget global de l'incertitude. Autrement, l'énumération de ces sources se fait aussi au moyen du diagramme des causes et des effets, qui permet de montrer leur origine et d'établir leur influence sur l'incertitude du résultat [1]. Ensuite, seulement les composantes de l'incertitude qui sont susceptibles d'avoir une contribution significative à l'incertitude globale sont quantifiées.

### III. 5. 1. 3. Quantification des composantes et calcul des incertitudes types

Selon le GUM, les contributions des différentes composantes d'incertitude sont évaluées individuellement et sont classées en deux types, en fonction de leur méthode de détermination (type A) et (type B). Ces deux méthodes sont reconnues de façons égales et utilisées comme outils valides pour l'évaluation de l'incertitude. Les évaluations de Type A des composantes de l'incertitude type sont fondées sur des distributions de fréquence alors que les évaluations de Type B sont fondées sur des lois a priori [2]. Cependant, toutes les incertitudes sont exprimées par des écarts-types, indépendamment du fait qu'ils sont basés sur des effets aléatoires ou systématiques. Les écarts-types associés aux estimations d'entrée  $x_i$  sont appelés incertitudes-types notées  $u(x_i)$ .

#### III. 5. 1. 3. 1. Évaluation type A

L'évaluation de type A de l'incertitude est réalisée à partir de la distribution statistique des valeurs provenant de séries de mesurages. Cette procédure classique est principalement utilisée pour l'estimation des incertitudes, qui sont dues à des effets

aléatoires. Dans la plupart des cas, pour une grandeur d'entrée  $X_i$  estimée à partir de  $n$  observations répétées indépendantes  $X_{i,k}$ , la meilleure estimation disponible de la valeur attendue est la moyenne arithmétique  $\bar{X}_i$  obtenue selon l'équation :

$$\bar{X}_i = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n X_{i,k} \quad (III.3)$$

Cependant, l'estimation de la variance expérimentale  $s^2(X_i)$  et de l'écart-type expérimental  $s(X_i)$  caractérise la dispersion des valeurs observées  $X_{i,k}$ , autour de leur moyenne  $\bar{X}_i$ .

$$s^2(X_i) = \frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (X_{i,k} - \bar{X}_i)^2 \quad (III.4)$$

Par contre, la meilleure estimation de la variance expérimentale de la moyenne est donnée par :

$$s^2(\bar{X}_i) = \frac{s^2(X_i)}{n} \quad (III.5)$$

Ainsi, pour la grandeur  $X_i$ , l'incertitude type  $u(x_i)$  de son estimation  $x_i = \bar{X}_i$  est :

$$u(x_i) = s(\bar{X}_i) \quad (III.6)$$

### III. 5. 1. 3. 2. Évaluation type B

L'évaluation de type B est une procédure alternative qui est principalement utilisée pour l'estimation des incertitudes, qui sont dues à des effets systématiques. Cette évaluation est effectuée à l'aide d'autres moyens que l'analyse statistique des séries de mesures. Notamment, à partir de fonctions de densité de probabilité fondées sur l'expérience ou d'autres informations disponibles sur les quantités concernées [2]. L'incertitude-type  $u(x_i)$  dans ce cas est déterminée donc par un jugement scientifique basé sur ces informations qui peuvent être ; des résultats de mesure antérieurs, des spécifications du fabricant, données des certificats d'étalonnage (incertitude assignée à des valeurs de référence provenant d'ouvrages ou de manuels). L'estimation de l'incertitude est déduite selon le cas où ces informations peuvent être obtenues [2] :

- Informations sous forme de données antérieures. Dans ce cas l'incertitude peut être déjà exprimée sous forme d'écart-type.
- Informations données sous des limites ( $\pm a$ ) avec un niveau de confiance (P %). Dans ce cas l'écart-type est égal au rapport ( $a/P$ )
- Si ces limites sont données sans un intervalle de confiance, mais les valeurs extrêmes sont probables. Dans ce cas on suppose une distribution rectangulaire et l'écart-type est égal à  $(a/\sqrt{3})$ .
- Lorsque les valeurs extrêmes sont improbables, on suppose une distribution triangulaire et l'écart-type est égal à  $(a/\sqrt{6})$ . Les utilisations de ces lois de probabilité a priori, pour la détermination de l'écart-type et l'estimation de l'incertitude type, se trouvent amplement détaillées avec des exemples dans la référence [1].

### III. 5. 1. 4. Calcul de l'incertitude type composée et l'incertitude élargie

#### III. 5. 1. 4. 1. Incertitude type composée

L'incertitude type composée ou combinée  $u_c(y)$ , où ( $y$ ) est une estimation de la grandeur de sortie (Y) est calculée au moyen du principe de la propagation de l'incertitude, en combinant toutes les incertitudes types  $u(x_i)$ . Selon, qu'il existe une relation ou non entre les grandeurs d'entrée ( $X_i$ ).

##### III. 5. 1. 4. 1. 1. Grandeurs d'entrée non corrélées

Dans ce cas, les grandeurs d'entrée sont indépendantes, l'incertitude type composée est donnée par :

$$u_c^2(y) = \sum_{i=1}^N \left( \frac{\partial y}{\partial x_i} \right)^2 u^2(x_i) = \sum_{i=1}^N C_i^2 u^2(x_i) \quad (III. 7)$$

$C_i = \frac{\partial y}{\partial x_i}$  : est appelé coefficient de sensibilité,

### III. 5. 1. 4. 1. 2. Grandeurs d'entrée corrélées

Lorsque les grandeurs d'entrée ne sont pas indépendantes, la relation devient plus complexe en introduisant le terme covariance, tel que :

$$u_c^2(y) = \sum_{i=1}^N \left( \frac{\partial y}{\partial x_i} \right)^2 u^2(x_i) + 2 \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N \frac{\partial y}{\partial x_i} \cdot \frac{\partial y}{\partial x_j} \cdot u(x_i, x_j) \quad (III. 8)$$

Où  $u(x_i, x_j)$  est la covariance estimée associée à  $x_i$  et  $x_j$ .

Lorsqu'on introduit le coefficient de corrélation  $r(x_i, x_j)$  entre  $x_i$  et  $x_j$ , à la place de la covariance, tel que :  $-1 \leq r(x_i, x_j) \leq +1$ , l'équation (III. 8) devient alors :

$$u_c^2(y) = \sum_{i=1}^N C_i^2 u^2(x_i) + 2 \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N C_i \cdot C_j \cdot u(x_i) u(x_j) r(x_i, x_j) \quad (III. 9)$$

Avec  $r(x_i, x_j) = \frac{u(x_i, x_j)}{u(x_i)u(x_j)}$

### III. 5. 1. 4. 2. Incertitude élargie

Est une mesure de l'incertitude, noté  $U$ , qui définit autour du résultat de mesure, un intervalle à l'intérieur duquel on puisse espérer voir se situer une large fraction de la distribution des valeurs qui pourraient être raisonnablement attribuées au mesurande [4]. L'incertitude élargie  $U$  s'obtient par la relation suivante :

$$U = k u_c(y) \quad (III. 10)$$

Où :  $k$  est le facteur d'élargissement, qui est rigoureusement déterminé, en utilisant la formule de Welch-Satterthwaite [21, 22], pour déterminer un nombre effectif du degré de liberté. La valeur de  $k$  est déduite du tableau t-Student (bilatéral) pour un niveau de confiance requis, par exemple (95%).

Finalement on exprime le résultat d'un mesurage sous la forme :

$$Y = y \pm U \quad (III. 11)$$

### III. 5. 2. Approche basée sur les données de validation d'un seul laboratoire

L'approche de validation par un seul laboratoire consiste à établir un modèle simplifié pour exprimer la mesure, en utilisant des critères estimés à l'avance au cours de l'étape de validation. Cette approche est aussi reconnue par les documents normatifs comme approche alternative cohérente avec les principes du GUM. On sous-entend par approche alternative de validation, que l'incertitude de mesure est estimée en utilisant les données obtenues des calculs des paramètres de validation, notamment, la répétabilité (dispersion) et la justesse (biais). Par contre, l'identification des sources d'incertitudes est accomplie, en utilisant le digramme des causes et effets de type Ishikawa, dont le principe sera décrit ultérieurement dans le paragraphe (IV. 2. 4. 1) et illustré par la figure (IV.12) connexe.

Cette évaluation est généralement orientée par des directives normalisées, comme celles de la norme ISO 21748 [15], et qui sont destinées pour évaluer l'incertitude à partir des données obtenues lors d'études inter-laboratoires menées selon les recommandations de la norme ISO 5725 [9]. Le modèle statistique de base sur lequel est fondée la norme ISO 21748, est exprimé par l'équation suivante :

$$y = \mu + \delta + B + \left( \sum C_i x_i' \right) + e \quad (III.12)$$

Où :

$y$  : résultat de mesure, supposé être calculé à partir d'une fonction appropriée ;

$\mu$  : est l'espérance mathématique (inconnue) de résultats idéaux ;

$\delta$  : est un terme représentant le biais intrinsèque de la méthode de mesure utilisée ;

$(\sum C_i x_i')$  : est soumise à des écarts *autres* que ceux donnant lieu à  $\delta$ ,  $B$  ou  $e$ ,

$x_i'$  : est l'écart par rapport à la valeur nominale de  $x_i$ ;

$c_i$  : est le coefficient de sensibilité, égal à  $\partial y / \partial x_i$  ;

$e$  : est l'erreur aléatoire dans des conditions de répétabilité.

Qui selon Feinberg [23], ce modèle peut être simplifié, en négligeant le terme sommation, pour être affecté à un résultat ( $y$ ) observé dans un seul laboratoire et sous des conditions de répétabilité intermédiaire, où le terme  $B$  devient la composante qui traduit l'effet de série (jour), lors d'une étude intra-laboratoire, au lieu de celle du laboratoire dans son contexte original d'études inter-laboratoires.  $B$  et  $e$  sont supposés être distribués

selon une loi normale, avec des variances respectives de  $\sigma_B^2$  et  $\sigma_r^2$ . Ces termes sont ceux qui forment le modèle utilisé par la norme ISO 5725-2 [14], pour l'analyse des données de l'essai inter-laboratoires.

Par conséquent, l'incertitude combinée  $u_c(y)$  associée à  $(y)$  peut être décrite comme suit :

$$u_c(y) = \sqrt{u^2(\delta) + \sigma_B^2 + \sigma_r^2} \quad (III. 13)$$

D'autre part, on remarque que la somme  $\sigma_B^2 + \sigma_r^2$  traduit bien les effets issus des conditions de répétabilité intermédiaire, déjà quantifié par l'équation (II.10) sous forme d'écart-type de fidélité intermédiaire,  $S_{FI}$ , ce qui donne donc :

$$u_c(y) = \sqrt{u^2(\delta) + s_{FI}^2} \quad (III. 14)$$

Par ailleurs, si on pose  $\delta = \bar{y} - X$  et que  $X$  (valeur de référence) est connue avec une incertitude considérée, dans un premier temps, comme négligeable, la variance de  $u^2(\delta)$  est égale à la variance de la moyenne générale  $s^2(\bar{y})$ . Soit, pour un plan de validation constitué de  $(I)$  séries et de  $(J)$  réplifications par niveau de concentration, dans chaque série, c.-à-d.  $(I \times J)$  données par niveau, la variance de la moyenne générale peut être calculée par l'équation suivante :

$$u^2(\delta) = s^2(\bar{y}) = \frac{s_B^2}{I} + \frac{s_r^2}{IJ} \quad (III. 15)$$

En introduisant les termes de l'équation (II.6) et l'équation (II.8), déjà établie dans le chapitre II, on trouve :

$$u^2(\delta) = s_{FI}^2 \times \left( \frac{1}{IJ \times B'^2} \right) \quad (III. 16)$$

Ce qui donne :

$$u_c(y) = s_{FI} \times \sqrt{1 + \frac{1}{IJ \times B'^2}} \quad (III. 17)$$

Par conséquent, l'incertitude combinée  $u_c(y)$  correspond donc, d'après Feinberg, à l'écart-type de l'intervalle de tolérance trouvé dans l'équation (II.14) du chapitre II.

### III. 6. Références

1. S L R Ellison and A Williams (Eds). Eurachem/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, Third edition, (2012) ISBN 978-0-948926-30-3. [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org)
2. JCGM 100:2008, Evaluation of measurement data—Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM), 2008, [www.bipm.org](http://www.bipm.org).
3. ISO/IEC FDIS 17025, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, ISO/IEC FDIS 17025:2017(E)
4. International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM), JCGM 200:2012, [www.bipm.org](http://www.bipm.org)
5. EUROLAB Technical Report No. 1/2006, Guide to the Evaluation of Measurement Uncertainty for Quantitative Test Results, EUROLAB August 2006.
6. EUROLAB Technical Report No. 1/2007, Guide to the Evaluation of Measurement Uncertainty for Quantitative Test Results, EUROLAB March 2007.
7. European accreditation, guidelines on the expression of uncertainty in quantitative testing, EA-4/16 G: 2003.
8. Nordtest, Techn Report 537, Handbook for Calculation of Measurement uncertainty in environmental laboratories, Version 3.1 May 2012.
9. ISO 5725-1, Application of the Statistics, Accuracy (Trueness and Precision) of the Results and Methods of Measurement, **Part 1: General Principles and Definitions**, International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland, 1994 (E).
10. ISO 5725-2, Application of the Statistics, Accuracy (Trueness and Precision) of the Results and Methods of Measurement, **Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method**, International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland, 1994 (E).
11. ISO 5725-3, Application of the Statistics, Accuracy (Trueness and Precision) of the Results and Methods of Measurement, **Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method**, International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland, 1994 (E).
12. ISO 5725-4, Application of the Statistics, Accuracy (Trueness and Precision) of the Results and Methods of Measurement, **Part 4: Basic methods for the determination**

- of the trueness of a standard measurement method, International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland, 1994 (E).
13. ISO 5725-5, Application of the Statistics, Accuracy (Trueness and Precision) of the Results and Methods of Measurement, **Part 5**: Alternative methods for the determination of the precision of a standard measurement method, International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland, 1998 (E).
  14. ISO 5725-6, Application of the Statistics, Accuracy (Trueness and Precision) of the Results and Methods of Measurement, **Part 6**: Use in practice of accuracy values, International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland, 1994 (E).
  15. ISO 21748, Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty evaluation, International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland, 2ed edition, 2017 (E).
  16. AFNOR FD X 07-021: Fundamental standards, Metrology and statistical applications, Aid in the procedure for estimating and using uncertainty in measurements and test results, European Diagnostic Manufacturers Association, Brussels 2006.
  17. ISO 13528, Statistical methods for use in proficiency testing by inter-laboratory comparison, International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland, 2015 (E).
  18. ISO/TS 21749, Measurement uncertainty for metrological applications, Repeated measurements and nested experiments, International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland, 2005 (E).
  19. J. Vialle, P. Linet, E.A. Maier, La métrologie en chimie quelques principes et beaucoup d'incertitudes *ANALYSIS*, 1999, 27, 6.
  20. H. Czichos, T. Saito, L. Smith (Eds.), Springer Handbook of Metrology and Testing (2ed edition), Springer, 2011, 77.
  21. ANSES, Pôle Recherche et Référence, Guide de validation des méthodes d'analyses, ANSES/PR3/07/01, 2015, version a.
  22. B. L. Welch, The generalization of 'student's' problem when several different population variances are involved, *Biometrika*, 1947, 34 (1-2), 28–35.
  23. F. E. Satterthwaite, An Approximate Distribution of Estimates of Variance Components, *Biometrics Bulletin*, 1946, 2(6), 110-114

24. M. Feinberg, Validation des méthodes d'analyse quantitatives au moyen du profil d'exactitude, *Technique de l'ingénieur* 2012, P224, v2.

## **Chapitre IV**

# **Estimation de l'incertitude par approche de validation**

## IV. 1. Matériels et méthode

### IV. 1. 1. Réactifs

Tous les réactifs ; *all-trans* rétinol, *all-trans* acétate de rétinol,  $\alpha$ -tocophérol et acétate de l' $\alpha$ -tocophérol sont procurés de Sigma-Aldrich (St Louis, USA). Les solvants ; Méthanol, Acétonitrile, Ethanol et Acétate d'éthyle sont des CHROMASOLV catégorie HPLC de Sigma-Aldrich (St Louis, USA).

### IV. 1. 2. Instruments

L'instrument HPLC est un système Shimadzu (Japon) basse pression série LC-10Avp et qui est constitué de cinq compartiments, répartie selon le chemin de l'écoulement de la phase mobile comme suit :

- Un dégazeur on-line DGU-14A,
- Une unité de gradient basse pression FCV-10ALvp,
- Une pompe micro-volume à double pistons LC-10ADvp,
- Un détecteur UV-Visible SPD-10Avp à longueur d'onde variable,
- Un contrôleur SCL-10AVP.

Le système est équipé d'un mixeur SUS pour maintenir l'homogénéité de la phase mobile et un dispositif d'injection manuel type Rheodyne 7725i menu d'une boucle de 20  $\mu$ L. L'ensemble du système chromatographique est contrôlé au moyen du logiciel LCsolution (Shimadzu) installé sur un PC.

Un Spectrophotomètre bi-faisceaux, type Nicolet Evolution 100 (Thermoelectron) a été utilisé, pour déterminer les concentrations des solutions étalons dans des cuvettes en quartz d'épaisseur ( $d = 1\text{cm}$ ).

Une micro-centrifugeuse Sigma (Allemagne) a été utilisée pour séparer les particules solides.

Pour tous les prélèvements quantitatifs, une micropipette variable (50-200  $\mu$ L) type Accumax a été utilisée pour délivrer les différents volumes.

### IV. 1. 3. Méthode

#### IV. 1. 3. 1. Conditions chromatographiques

La phase mobile est une composition constante d'un mélange Méthanol/Acétonitrile suivant les proportions (70:30, v/v), respectivement. L'élution a été établie avec un débit de  $2 \text{ ml min}^{-1}$ . La séparation des molécules a été réalisée à la température ambiante sur une colonne analytique Agilent, type Zorbax SB-C18 (4.6x250mm, 5- $\mu\text{m}$ ), cette dernière est continuellement protégée par une colonne de garde de même type Zorbax SB-C18 (4.6 x 12.5 mm, 5- $\mu\text{m}$ ). La détection a été configurée en mode duel aux deux longueurs d'onde maximales 292 nm et 325 nm, respectivement, pour les composés de vitamine E et de la vitamine A.

#### IV. 1. 3. 2. Manipulation des étalons et des échantillons de plasma

Tous les étalons et les échantillons de plasma sont traités sous lumière rouge [1] et sont stockés à  $-34^\circ\text{C}$  lorsqu'ils ne sont pas utilisés.

##### IV. 1. 3. 2. 1. Préparation des étalons

10 ml de chaque solution étalon ; all-*trans* rétinol ( $\approx 7,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), all-*trans* acétate de rétinol ( $\approx 6,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ),  $\alpha$ -tocophérol ( $\approx 255 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) et acétate de l' $\alpha$ -tocophérol ( $\approx 205 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), a été préparée quotidiennement avec l'éthanol absolu. Les absorbances ont été lus trois fois aux leurs longueurs d'onde spécifiques (325 nm) pour les composés de vitamine A, (292 nm) pour l' $\alpha$ -tocophérol et (286 nm) pour l'acétate de l' $\alpha$ -tocophérol. La concentration de chaque solution étalon a été calculée par la loi de Beer-Lambert, en tenant compte des coefficients d'absorption molaire ( $\epsilon$ ) correspondants dans l'éthanol : 52770, 51880, 3265 et 2063  $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , respectivement pour le rétinol, l'acétate de rétinol, l' $\alpha$ -tocophérol et l'acétate d' $\alpha$ -tocophérol [2, 3]. Le reste de chaque solution a été soigneusement conservé pour préparer séparément deux solutions primaires mixtes, une pour les composés alcools et l'autre pour les esters (étalons internes). En diluant une prise adéquate avec un mélange de solvants éthanol/acétate d'éthyle selon les proportions (1: 1, v / v) [4] et qui contient du BHT (2,6-di-tert-butyl-4-méthylphénol) comme antioxydant.

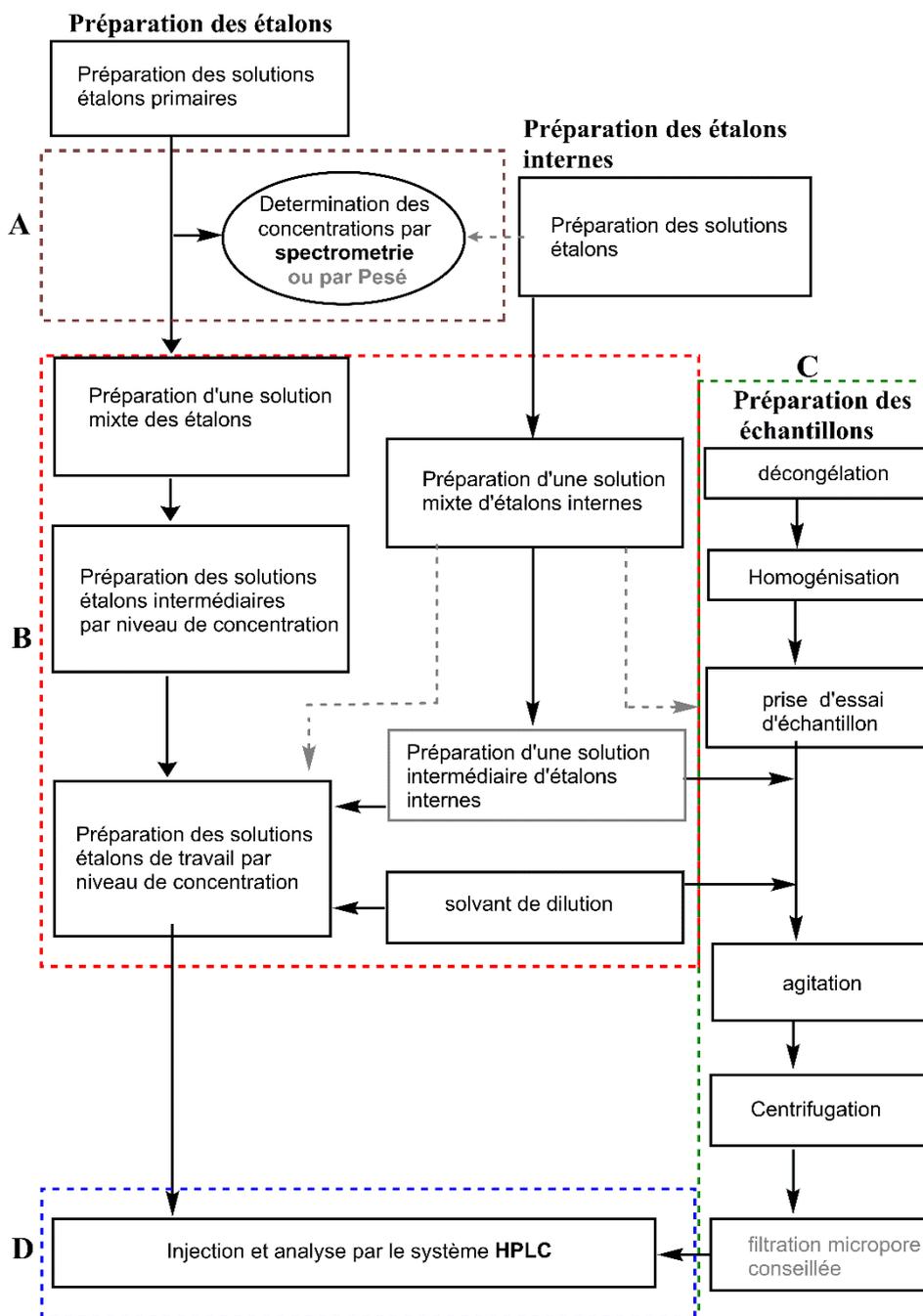


Fig. IV.1. Protocole du processus analytique réparti en quatre grandes étapes, selon un mode de traitement d'échantillon en vue d'une injection directe.

Ensuite, des solutions intermédiaires indépendantes de volume égal à 0.3 mL ont été préparées dans des tubes Eppendorf, en diluant les volumes 0.05, 0.10, 0.15, 0.2 et 0.25 mL de la solution mixte d'alcools avec le mélange de solvants. La première et la deuxième solution ont été préparées en double, pour assurer en plus la préparation des échantillons de validation. En fin, les solutions étalons de travail ont été obtenues en combinant 0.05 mL de chaque solution intermédiaire avec une prise égale de la solution

mixte des étalons internes, le volume total a été complété alors à 0.25 mL avec le même mélange de solvants éthyliques.

#### **IV. 1. 3. 2. 2. Préparation des échantillons de plasma**

L'échantillon utilisé dans ce travail est un plasma de transfusion congelé. Ce matériel a été procuré du CHU-Tlemcen, dans le cadre d'une collaboration entre notre laboratoire et le service pédiatrie, pour une étude nutritionnelle sur les vitamines. Ce matériel a été stocké à -34 °C, aussitôt arrivé au laboratoire. Lors de son traitement pour analyse, l'échantillon de plasma a été tout d'abord décongelé et homogénéisé complètement à température ambiante. Puis, juste une petite prise de 50 microlitres de plasma a été transférée dans un tube Eppendorf et manipulée de la même manière que dans le cas de la préparation des solutions de travail, 0.05 mL de la solution étalon interne a été ensuite ajouté à chaque tube et le volume a été complété à 0.25 mL avec le mélange de dilution éthylique. Ainsi les protéines ont été dénaturées et précipitées [4]. Pour compléter l'extraction des vitamines, le contenu a été énergétiquement agité pendant 10 secondes et laissé au repos 15 minutes dans l'obscurité à la température ambiante [5]. Ensuite suivi d'une centrifugation à 12 000 x g, pendant 4 minutes, pour séparer les particules solides. À la fin, en utilisant une seringue appropriée, le surnageant clair a été enlevé soigneusement et chargé dans le système HPLC pour injection.

#### **IV. 1. 3. 3. Plan expérimental de validation**

Les expériences de validation étaient basées sur la manipulation de deux types d'échantillons, selon le protocole V2 du guide Commission SFSTP «Démarches quantitatives harmonisées pour la validation des méthodes analytiques» [6]. Tout d'abord, les standards d'étalonnage (SE), qui sont les solutions de travail mentionnées ci-dessus, ont été utilisés quotidiennement pour construire une courbe d'étalonnage à cinq niveaux ; 0.1 à 0.5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  et 4.5 à 25.0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , pour le rétinol et l' $\alpha$ -tocophérol, respectivement. Le plan d'étalonnage consiste en une analyse en dupliques des SE (à l'exception des niveaux pairs). Cela a été choisi ainsi, afin d'optimiser le nombre de points de la courbe d'étalonnage pendant l'application en routine de la procédure analytique et de tester plus efficacement la pondération et d'autres transformations mathématiques sur le modèle d'étalonnage, pour pouvoir désigner à la fin, la fonction de réponse la plus appropriée.

Les autres types d'échantillons sont les standards de validation (SV), ils ont été préparés indépendamment dans une matrice de plasma ordinaire, à cause de l'indisponibilité de matériaux de référence certifiés CRM et de matrice sans analyte [7]. En ajoutant des quantités connues des analytes d'intérêt pour obtenir trois niveaux de concentration ; (0.1, 0.15 et 0.2  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) et (4.5, 6.87 et 9.16  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), respectivement, pour le rétinol et l' $\alpha$ -tocophérol. Le plan de validation a été construit à ces faibles plages de concentration, pour couvrir les domaines de concentrations correspondants, lorsque les échantillons de faibles teneurs en analytes seront manipulés. Le plan de validation consiste à analyser trois fois les échantillons SV ( $J = 3$ ), à trois niveaux de concentration ( $K = 3$ ) et pendant trois jours ( $I = 3$ ). De plus, deux extra étalons de validation (Ext), (0.3 et 0.4  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) pour le rétinol et (5.87 et 11.74  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) pour l' $\alpha$ -tocophérol ont été évalués avec le même nombre de répliques dans un jour de validation supplémentaire, pour vérifier complètement le critère de linéarité de la méthode.

Cependant, la quantité naturelle a été évaluée pour chaque série, sur la base des principes de la méthode des ajouts dosés, afin de minimiser son influence dans la détermination des concentrations d'échantillons SV.

## **IV. 2. Résultats et discussions**

### **IV. 2. 1. Analyse spectroscopique**

L'analyse spectroscopique dans cette méthode est une étape cruciale, puisqu'elle engage l'ensemble du processus analytique. Comme le montre la figure (IV.1), c'est l'étape qui permet de vérifier qualitativement les longueurs d'onde spécifiques des vitamines d'intérêt et de déterminer quantitativement les concentrations, pour bâtir le système d'étalonnage pour cette procédure d'analyse indirecte. Toute erreur provoquée à ce niveau va se propager avec l'évolution du procédé analytique et par conséquent, aggraver l'incertitude de mesure de la méthode. Cette technique a été choisie au lieu des essais de pesées, à cause de la nature visqueuse et difficile à manipuler lors de la détermination des masses de ces étalons. Ce choix nous évite donc d'exposer de trop ces produits purs à la dégradation. En plus, les préparations par pesées nécessitent des précautions particulières et prennent beaucoup de temps. Alors qu'une dilution approximative, pour préparer une solution de stockage, est plus facile et très rapide à réaliser.

#### IV. 2. 1. 1. Analyse qualitative (déterminer les longueurs d'onde maximale)

Cette étape a permis de vérifier les longueurs d'onde spécifiques mentionnées dans le tableau (I. 5), des deux analytes d'intérêt de vitamines A et E. Ces valeurs vont être prises en compte dans la configuration du système HPLC, lors de l'étape chromatographique de la procédure analytique. La figure (IV. 2) confirme les longueurs d'onde spécifiques de 325 nm et 292 nm, respectivement, pour le rétinol et l' $\alpha$ -tocophérol et compare les spectres des deux vitamines par rapport à celui du BHT, qui se présente dans toutes les préparations des étapes B et C, de la figure (IV.I). On voit bien que le BHT, dont la longueur d'onde maximale est de 277 nm sera très abondant à cette échelle de préparation dans le mélange du traitement des échantillons. Le pic du BHT va apparaître donc, aussi intense que ceux des composés de vitamine E à 292 nm, lors des essais chromatographiques. Mais, par contre, il ne doit pas gêner leurs éluions.

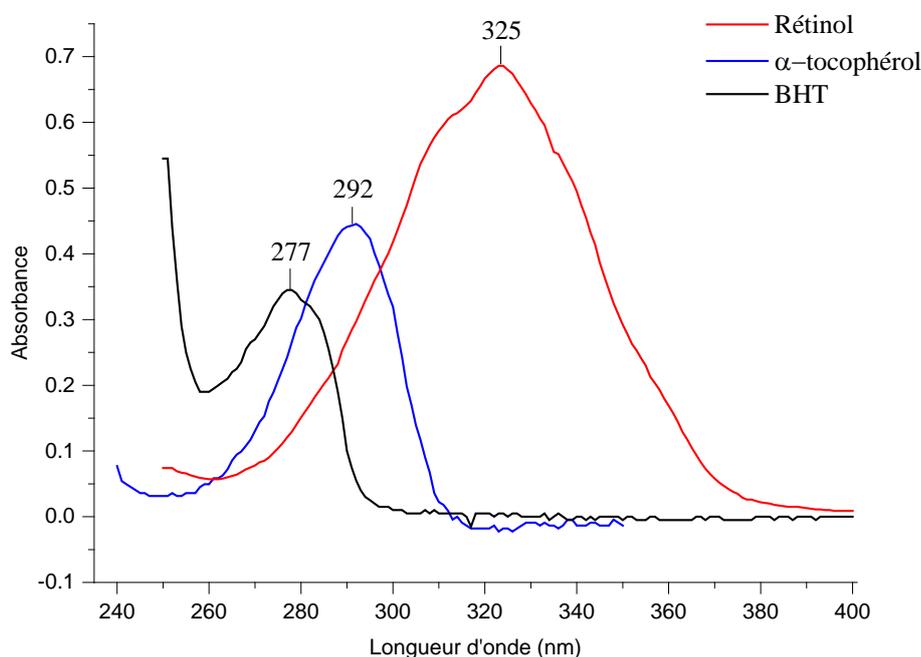


Fig. IV.2. Comparaison des spectres UV du rétinol, de l' $\alpha$ -tocopherol et du BHT, réalisés au laboratoire de recherche Spectrochimie et Pharmacologie Structurale de l'université de Tlemcen

### IV. 2. 1. 2. Analyse quantitative

Les analyses spectrométriques dans le domaine ultraviolet ont été réalisées sur les quatre composés manipulés dans cette procédure. À cet effet, des essais quantitatifs sur l'absorbance  $Abs_{(std)}$  ont été effectués le jour de l'analyse, principalement pour les étalons (alcools), afin de déterminer avec précision les concentrations des solutions de travail. Ainsi, l'équation (IV.1) permet de calculer la concentration  $C_{i(std)}$  d'une solution de calibration ( $i$ ), préparée après trois dilutions consécutives :

$$C_{i(std)} = \frac{Abs_{(std)}}{\varepsilon \times d} \times \frac{V_1}{V_2} \times \frac{V_3}{V_4} \times \frac{V_5}{V_6} \quad (IV.1)$$

On remarque que cette équation résume les faits analytiques exécutés, dans la partie A et la partie B de l'organigramme de la figure (IV. 1). En plus, des essais quantitatifs sur les étalons internes ont permis de fixer leurs concentrations, qui donneront des pics de mêmes ordres de grandeur que ceux des analytes d'intérêt, que ce soit dans les chromatogrammes des étalons ou ceux des échantillons à doser. D'autre part, des essais répétés précis sur l'absorbance ont été effectués aux longueurs d'onde spécifiques de chaque molécule, afin d'évaluer l'apport de l'étape spectroscopique au budget global de l'incertitude de cette procédure analytique.

### IV. 2. 2. Avantage de l'étalonnage interne

Cette méthode de quantification est généralement citée dans la littérature, comme étant la méthode qui permet d'améliorer la précision. De ce fait, on regrette souvent son manque d'emploi dans des analyses sensibles, à cause de la difficulté de trouver la substance convenable ; une substance qui possède des propriétés similaires à celle de l'analyte d'intérêt, qui n'interfère pas, ou bien n'émerge pas avec d'autres composants, du mélange injecté [8]. Alors que dans certains cas, mais rares, cette méthode est critiquée, comme quoi, elle peut conduire à une mauvaise précision. La faiblesse de cette technique est observée dans son incapacité de compenser l'erreur de différence de formes, lorsqu'on utilise un seul étalon interne pour plusieurs composants [9]. Ici l'erreur se multiplie par rapport à l'étalonnage externe, qui nécessite l'intégration que d'un seul pic. La figure (IV.3), trace la dispersion des aires de pic du rétinol et de l'acétate de rétinol, par rapport aux concentrations des solutions étalons injectées, afin

de construire le plan d'étalonnage d'une série de validation. On voit bien dans les niveaux répétés, que l'erreur de préparation se propage généralement dans la mesure de l'aire du pic de l'étalon interne et qu'elle ca être bien corrigée, comme c'est bien illustré par la droite d'étalonnage interne de la figure (IV. 3b). Par contre, cette erreur va persister dans le calcul des paramètres de la droite d'étalonnage externe de la figure (IV. 3a).

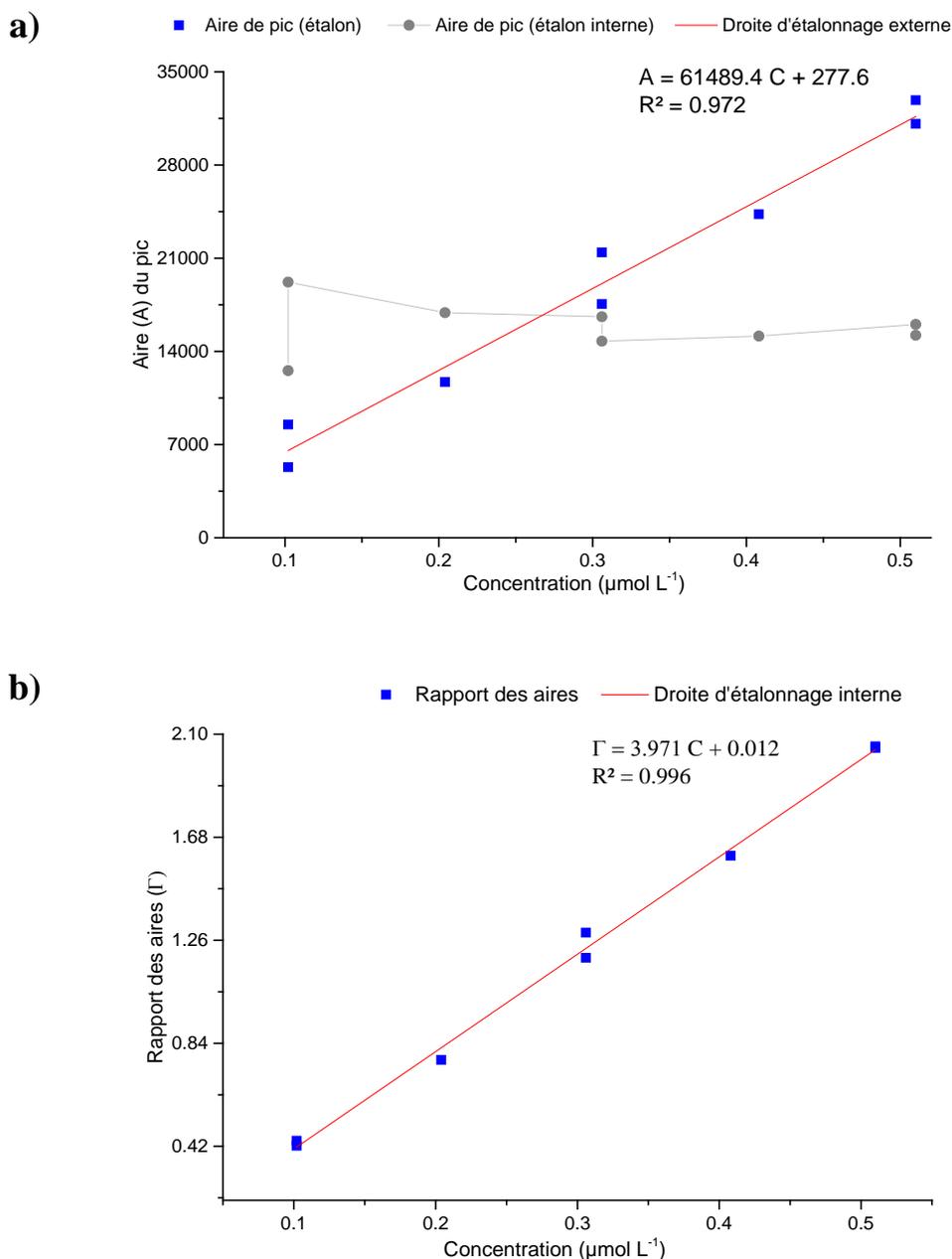


Fig. IV. 3. Comparaison de l'étalonnage externe (a) et l'étalonnage interne (b) d'un même plan de calibration

D'autre part, on peut vérifier cet avantage de l'étalonnage interne statistiquement sur les données de concentration obtenues d'après l'équation (IV.2). Dans le cas du rétinol, par exemple, la différence entre la concentration mesurée ( $C_{(mes)}$ ) et la concentration ajoutée ( $C_{(aj)}$ ) a été déterminée à différents niveaux de concentration, par les deux types de droites d'étalonnages et en supposant des modèles linéaires. Naturellement, cette différence n'est autre que la concentration native du plasma ordinaire, qui sera utilisé dans les essais de validation, étant donné qu'on n'a ni un matériau de référence certifié ni un plasma sans analyte. Néanmoins, ces tests peuvent être effectués aussi sur les données des aires et les rapports des aires.

$$C_{(mes)} - C_{(aj)} = C_{(nat)} \quad (IV. 2)$$

L'analyse de variance à deux facteurs est une méthode appropriée pour analyser les effets principaux et les interactions entre deux facteurs. On vérifie, est-ce que les effets sur le résultat du changement du facteur A (externe – interne) dépendent du niveau de concentration du facteur B.

On réalise donc une ANOVA à deux facteurs sur les concentrations obtenues, pour une seule série de pré-validation ( $J = 9$ ) et par les deux méthodes de quantification, tout en examinant l'influence de la variation des niveaux de concentration. Le tableau (IV. I) récapitule les résultats de cette analyse sur les populations de données de la quantité native, à un niveau de confiance égal à 95%. Les résultats de ce test montrent que l'interaction n'est pas significative entre les deux facteurs ( $p > 0.05$ ). La figure (IV. 4), montre que les deux modes de quantification ne se croisent pas le long des trois niveaux de concentration mis en jeu. Leurs tracés sont plutôt horizontaux et les moyennes des populations du facteur B ne sont pas significativement différentes. C.-à-d. qu'ils ne dépendent pas du niveau de concentration. Par contre, on observe qu'ils sont parallèles avec un décalage bien visible entre eux, ce qui veut dire que les moyennes des populations du facteur A sont significativement différentes ( $p < 0.05$ ).

Ceci est aussi confirmé par le test de comparaison des moyennes de Tukey (Sig = 1), les moyennes des concentrations obtenues par les deux méthodes de quantification sont significativement différentes au même niveau de confiance.

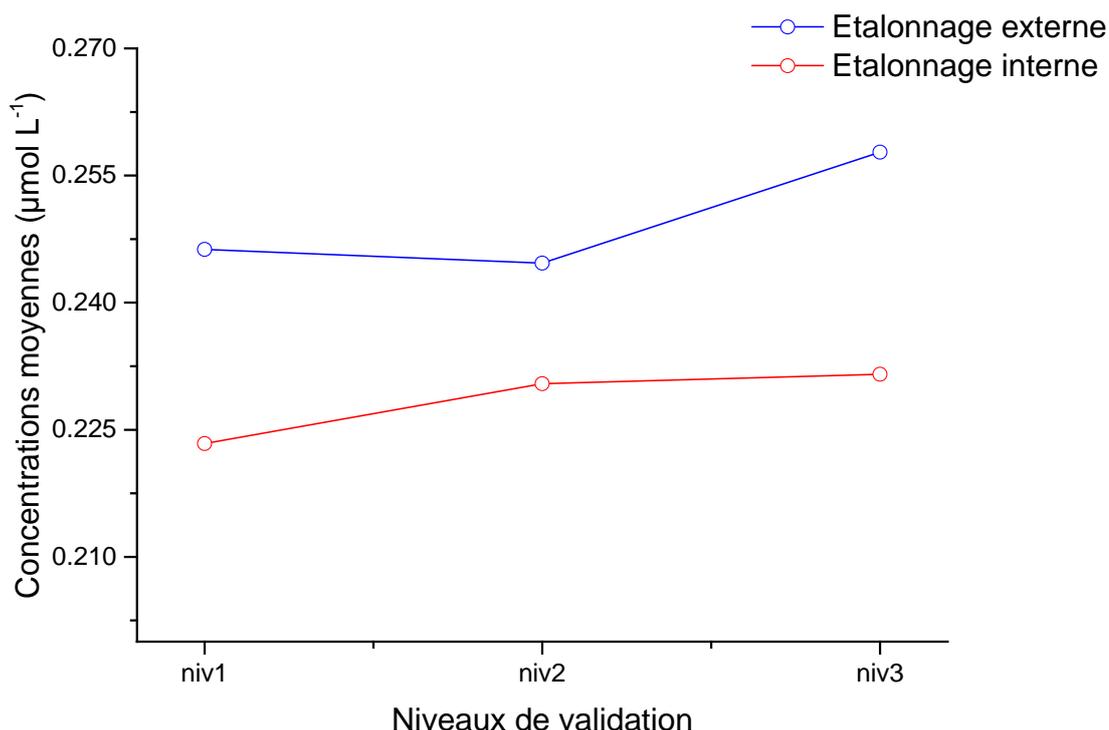


Fig. IV. 4. Interaction entre étalonnage externe et étalonnage interne dans la quantification des quantités des analytes d'intérêt.

Pour prouver que la valeur de la moyenne obtenue par étalonnage interne est la plus proche de la concentration native, il suffit de chercher une autre série, où l'étalonnage externe soit d'une précision aussi appréciable que celle de l'étalonnage interne. L'exemple de la figure (IV. 5), illustre les deux droites d'étalonnages obtenues d'un même plan de calibration, d'une autre série de pré-validation réalisée sur le même échantillon plasma.

Comme on le voit bien, les deux droites offrent des modèles mathématiques d'une même qualité de détermination. Par contre, le calcul des moyennes pour les deux populations de données (externe et interne) a donné dans les deux cas une concentration naturelle ( $C_{(nat)} \approx 0.228 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Ce qui atteste l'avantage de l'étalonnage interne, par rapport à l'étalonnage externe dans la détermination des concentrations des analytes d'intérêt, pour cette procédure analytique. D'autre part, ce test a été réalisé aussi dans le cas de la quantification de l' $\alpha$ -tocophérol et a donné toujours les mêmes satisfactions en faveur de l'étalonnage interne.

Tableau IV.1 : Résultats de l'analyse de variances à deux facteurs sur les concentrations obtenues par étalonnage externe et interne.

Descriptive		N	Moyenne	SD	SEM	Variance
Facteur A	externe	9	0.24957	0.01116	0.00372	1.2444E-4
	interne	9	0.22845	0.00404	0.00135	1.6325E-5
Facteur B	niv1	6	0.23483	0.0127	0.00519	1.6136E-4
	niv2	6	0.23754	0.00798	0.00326	6.3733E-5
	niv3	6	0.24466	0.01842	0.00752	3.3944E-4
Interaction						
Externe	niv1	3	0.24628	0.00303	0.00175	9.1578E-6
	niv2	3	0.24466	0.00185	0.00107	3.4081E-6
	niv3	3	0.25776	0.01823	0.01052	3.3217E-4
Interne	niv1	3	0.22337	7.5934E-4	4.384E-4	5.7659E-7
	niv2	3	0.23043	0.00204	0.00118	4.1698E-6
	niv3	3	0.23156	0.00123	7.113E-4	1.5178E-6

ANOVA total					
	df	SS	MS	F	P
A	1	0.00201	0.00201	34.2868	7.7713E-5
B	2	3.0927E-4	1.5463E-4	2.64332	0.1119
Interaction	2	1.1487E-4	5.7433E-5	0.98176	0.40283
Model	5	0.00243	4.8598E-4	8.30739	0.00135

Comparaison des moyennes (Tukey)					
A	différence	SEM	q	P	Sig
Interne-Externe ( $\alpha = 0.05$ )	-0.02111	0.00361	8.28092	7.788E-5	1

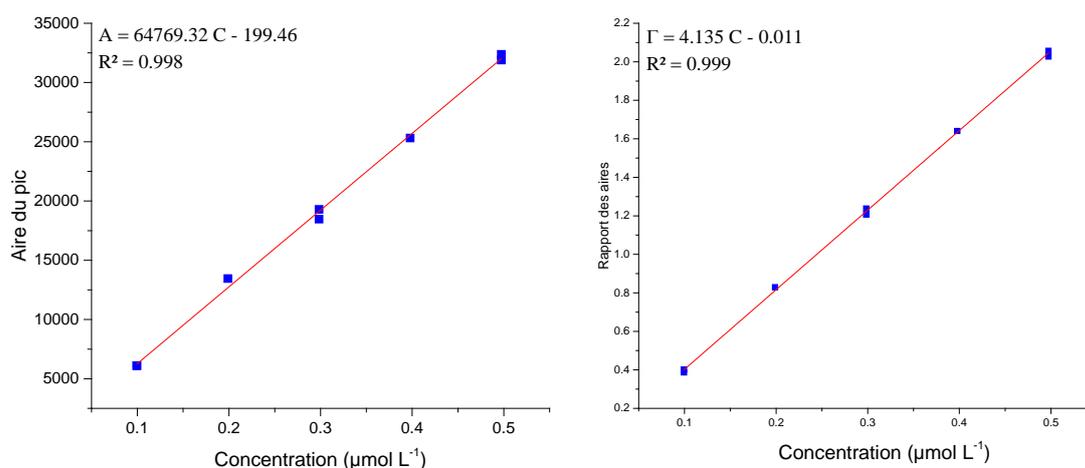


Fig. IV. 5. Un plan de calibration où les deux droites d'étalonnage externe (à gauche) et interne (à droite) donnent des modèles mathématiques de même qualité de détermination.

### IV. 2. 3. Validation

La validation de la procédure analytique a été accomplie en appliquant la méthodologie du profil d'exactitude, tout en déterminant les principaux critères de performances recommandés. Comme la sélectivité, la fonction de réponse, la linéarité, la justesse, la précision (répétabilité et précision intermédiaire), la limite de détection (LOD), la limite de quantification (LOQ) et la gamme de quantification [10, 11]. Le profil d'exactitude a été construit en utilisant une limite d'acceptation ( $\lambda = \pm 15\%$ ), valeur requise dans le cas des procédures bioanalytiques et une probabilité  $\beta = 95\%$ , pour les deux molécules sous étude.

#### IV. 2. 3. 1. Pureté des étalons

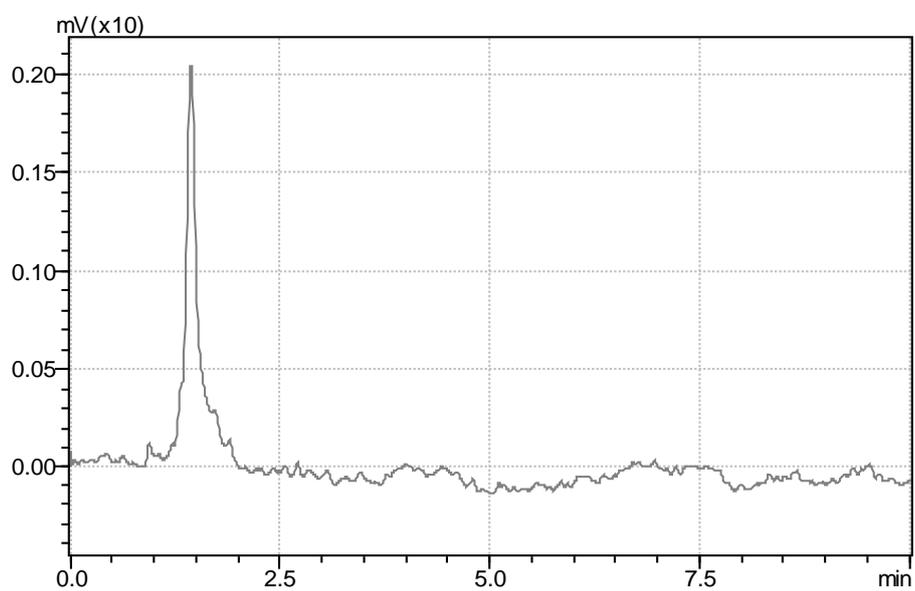
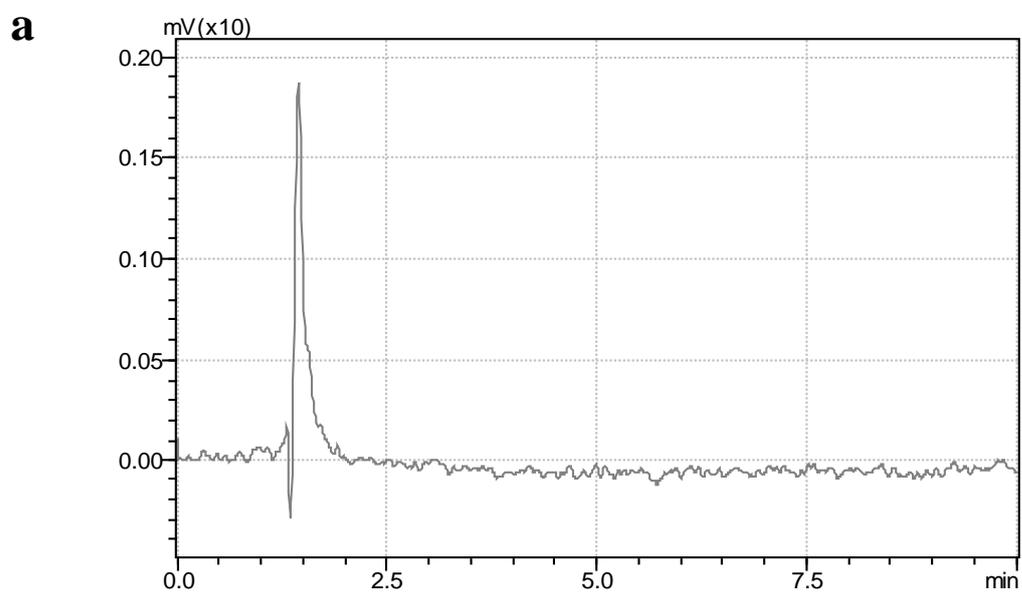
La pureté de tous les étalons utilisés  $P_{(std)}$  a été vérifiée plusieurs fois, ce facteur a été déterminé sur la base du rapport de l'air du pic individuel par la somme totale des aires des pics observés dans les chromatogrammes et à la longueur d'onde spécifique de chaque molécule. La valeur de la pureté a été trouvée proche de 98% pour tous les composés et a été prise en compte pour corriger les concentrations des solutions étalons. Ce qui permet de réécrire l'équation (IV.1) comme suit :

$$C_{i(std)} = \frac{Abs_{(std)}}{\varepsilon \times d} \times P_{(std)} \times \frac{V_1}{V_2} \times \frac{V_3}{V_4} \times \frac{V_5}{V_6} \quad (IV. 3)$$

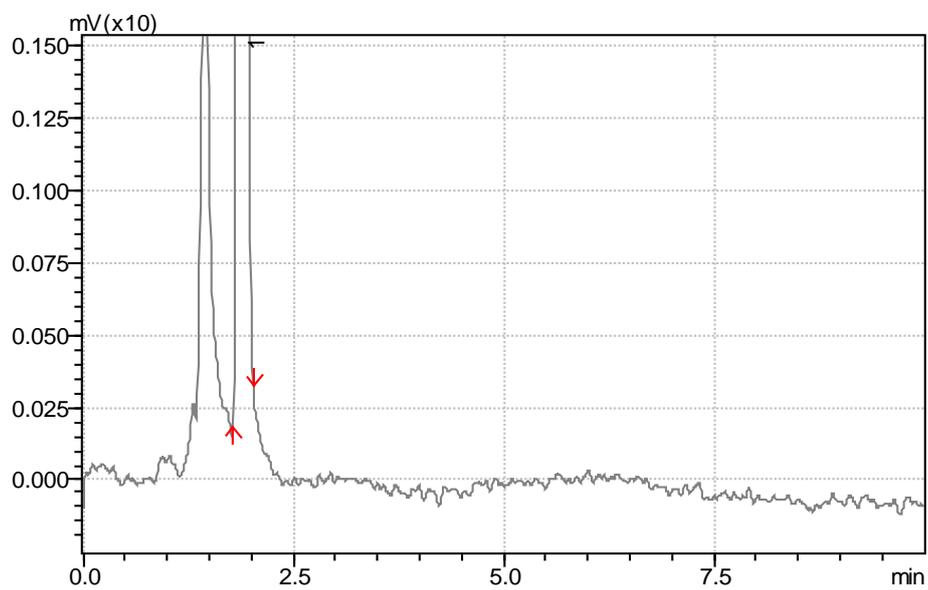
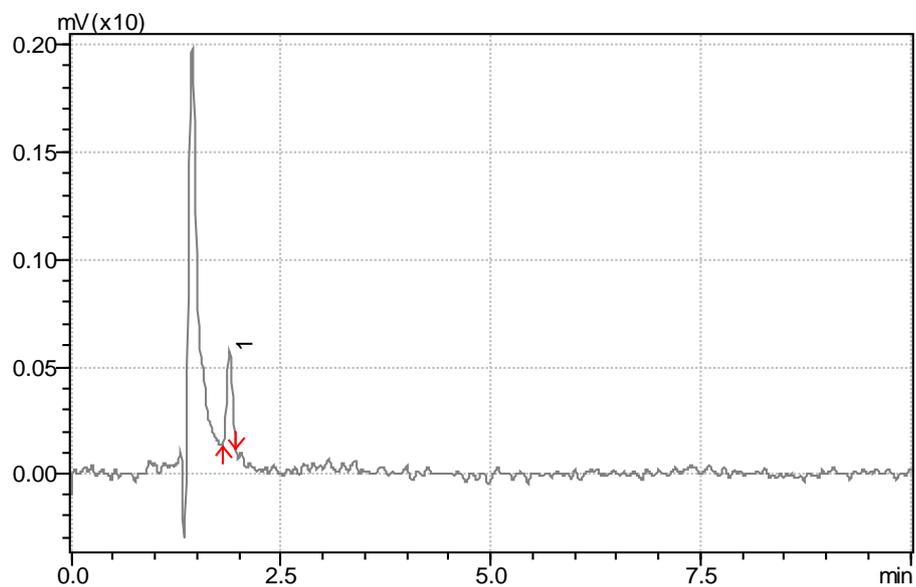
#### IV. 2. 3. 2. Sélectivité

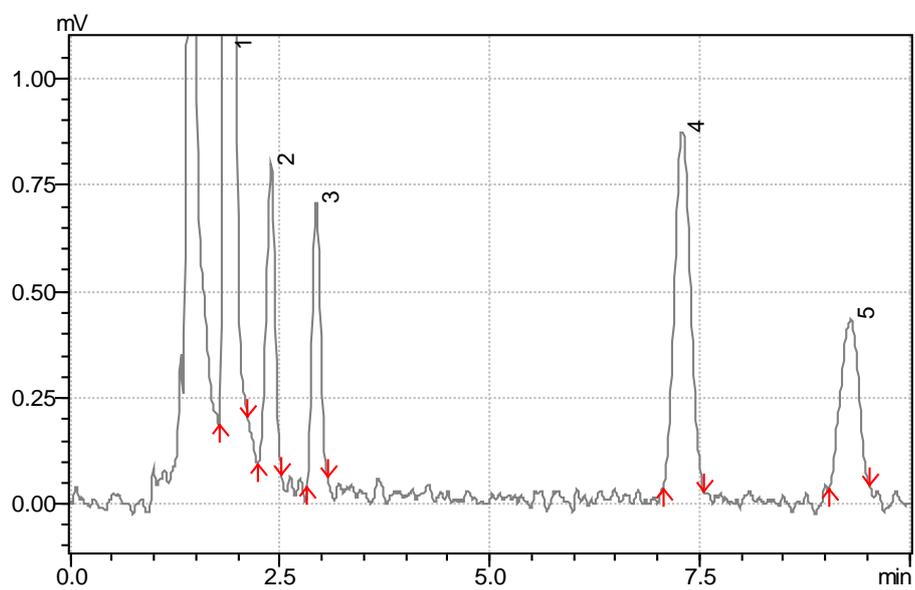
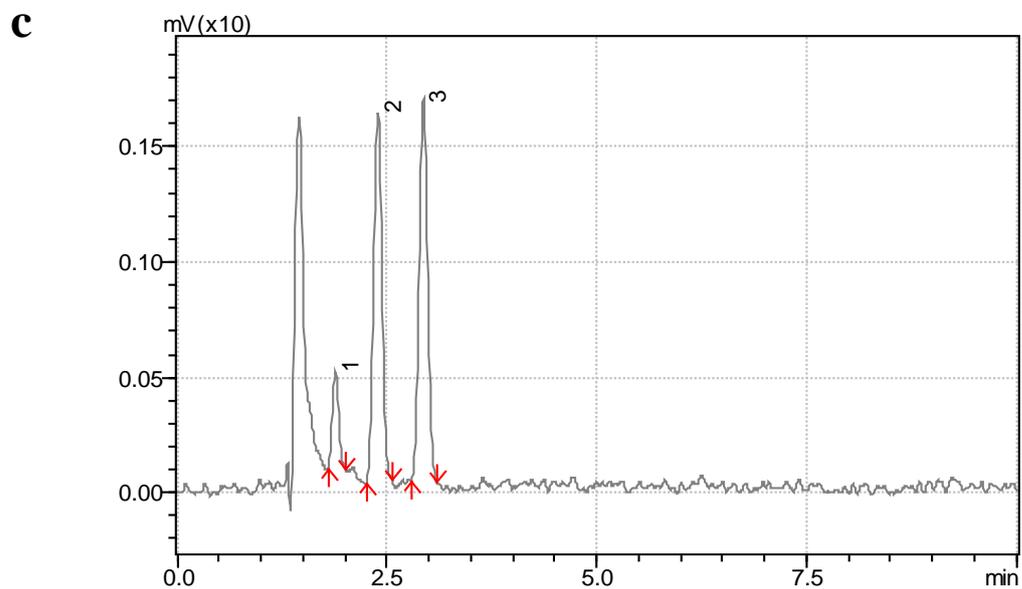
La sélectivité a été approuvée aux longueurs d'onde spécifiques, en comparant les chromatogrammes obtenus par injection du mélange de dilution éthylique avec et sans BHT, d'une solution étalon, d'une solution d'échantillon de plasma ordinaire préparé avec le mélange de dilution contenant du BHT et enfin d'une solution du même échantillon de plasma dopé avec une quantité exogène de 0.1 et 4.3  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de rétinol et d' $\alpha$ -tocophérol, respectivement. Comme c'est illustré sur les figures (IV.6a et b), aucun pic n'a été observé au temps d'éluion des analytes d'intérêt, cependant, la similitude des temps de rétention observés sur les figures (IV.6c et d) a été considérée comme critère d'identification de tous les analytes d'intérêt [12]. En effet, les pics des composés vitaminés, sortent par paires et bien résolus dans les deux bouts du même chromatogramme. Cette caractérisation a été bien appuyée sur la figure (IV.6e),

puisque, aucune anomalie n'a été observée, à l'exception de l'accroissement régulier des pics des analytes d'intérêt et à leurs temps d'élution spécifiques. En outre, l'interférence qui peut résulter de BHT [13] a été entièrement résolue.

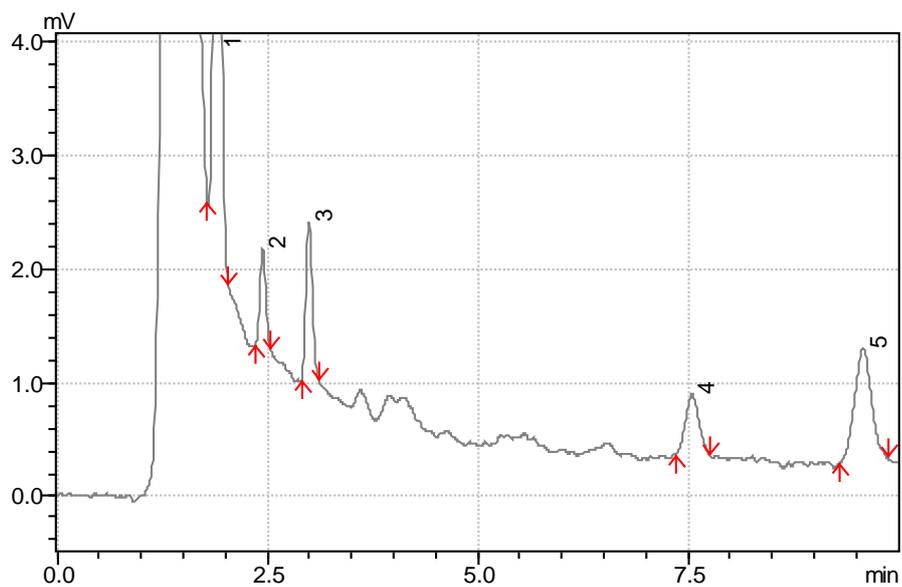
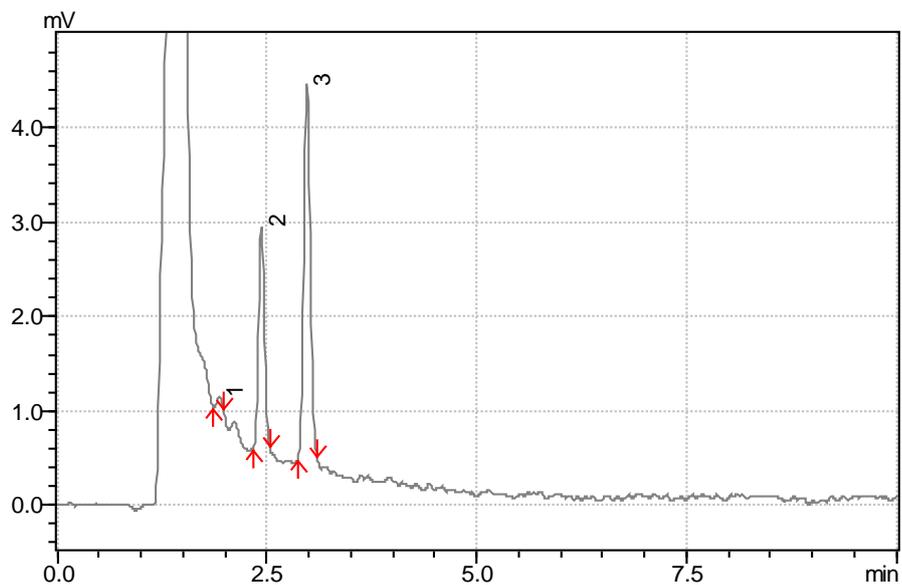


**b**





**d**



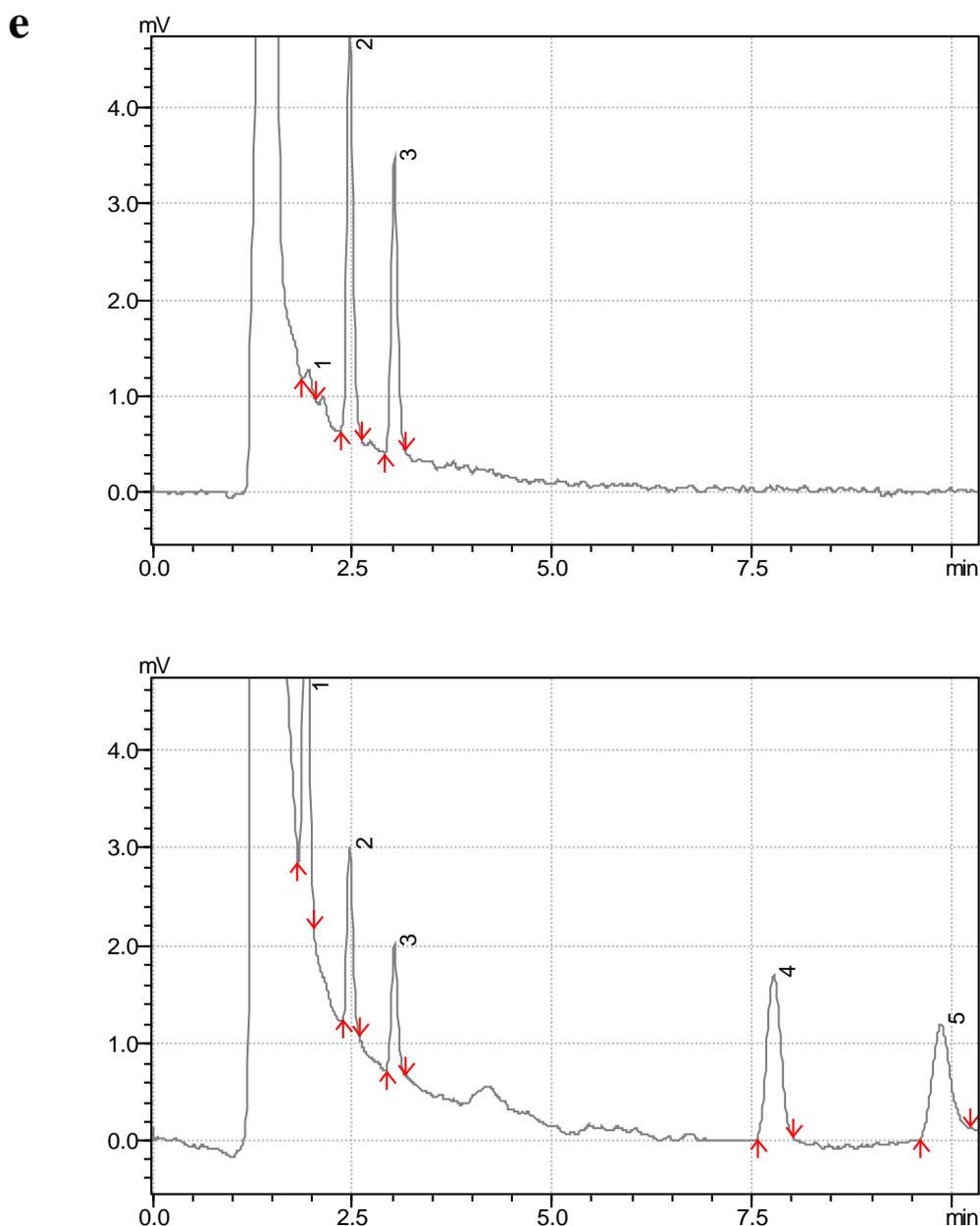


Fig. IV. 6. Réponse HPLC-UV obtenue en mode duel aux deux longueurs d'onde spécifiques, 325 nm (chromatogrammes de haut) et 292 nm (chromatogrammes de bas), après avoir injecté. **a**) le mélange éthanoïque de dilution sans BHT, **b**) le mélange éthanoïque de dilution avec BHT, **c**) une solution de travail contenant ( $0.2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) de rétinol et ( $9 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) d'  $\alpha$ -tocopherol, **d**) un échantillon de plasma traité par le mélange éthanoïque en (b), **e**) le même échantillon de plasma dopé par la solution de travail de (c). Les pics identifiés : **1**. BHT ( $t_R = 1.91 \text{ min}$ ), **2**. rétinol ( $t_R = 2.42 \text{ min}$ ), **3**. acétate de rétinol ( $t_R = 2.97 \text{ min}$ ), **4**.  $\alpha$ -tocopherol ( $t_R = 7.52 \text{ min}$ ), **5**. acétate de tocophérol ( $t_R = 9.53 \text{ min}$ ).

### IV. 2. 3. 3. Effet de matrice

La disposition parallèle des droites d'étalonnages par rapport à ceux des ajouts dosés dans les figures (IV.7a et b), pour les deux composés d'intérêt, éloigne l'idée de présence d'effet de matrice, non détectée d'ailleurs dans les essais préliminaires. Toutefois, il a été judicieux dans ce cas aussi, de vérifier que cet effet est statistiquement insignifiant. Pour cela, nous avons effectué une analyse des variances à deux facteurs, à chaque niveau impliqué dans la conception expérimentale de validation. En utilisant les données de la sensibilité (pentes) obtenues par modèle linéaire, qui relie la réponse de l'instrument et la concentration. L'étude consiste donc à examiner pour deux types de droites, à savoir la droite des ajouts dosés (AD) et la droite d'étalonnage (CE), la dépendance des résultats à la nature des courbes et à la variation du temps.

Tableau IV.2 : Résultats de l'analyse de variance à deux facteurs sur les données de la sensibilité.

		Facteur A type de courbe				
		Rétinol		Tocopherol		
		CE	AD	CE	AD	
Facteur B	Jour 1	3.634	3.771	0.235	0.242	
		3.887	4.075	0.238	0.255	
		4.006	4.106	0.249	0.249	
	Jour 2	4.170	3.994	0.220	0.218	
		4.287	4.055	0.232	0.227	
		4.059	3.938	0.233	0.230	
	Jour 3	4.241	4.101	0.215	0.201	
		3.391	3.892	0.198	0.203	
		4.051	4.096	0.219	0.214	total
moyenne	3.9696	4.0033	3.9865	0.2266	0.2266	0.2266
Variance	0.0856	0.0134	0.04688	2e-4	4e-4	3e-4

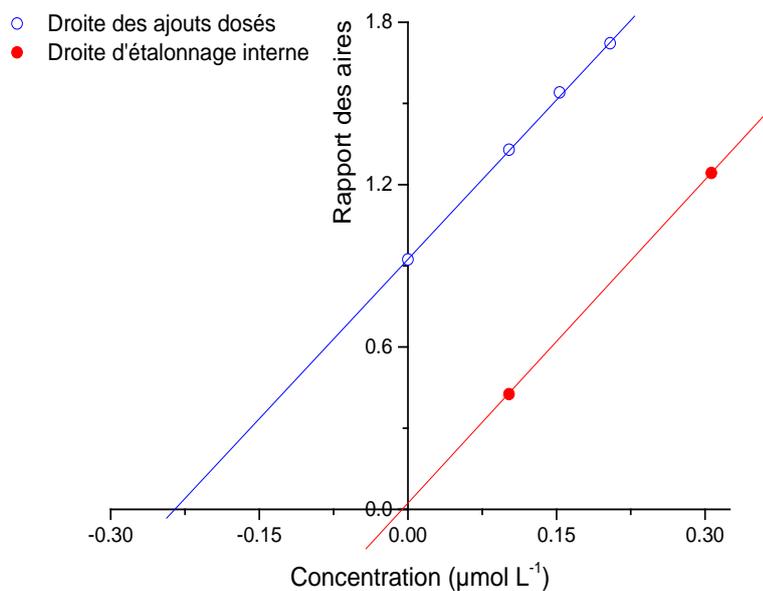
  

ANOVA	df	F	P	F	P
A	1	0.102	0.755	6.6e-5	0.994
B	2	0.929	0.421	31.346	1.7e-5
interaction	2	0.990	0.400	1.095	0.366
model	5	0.788	0.578	12.976	1.7e-4

Comparaison de Tukey des moyennes						
AD CE	différence	q	Sig	différence	q	Sig
( $\alpha = 0.05$ )	0.034	0.451	0	-3.1e-5	0.011	0

a)



b)

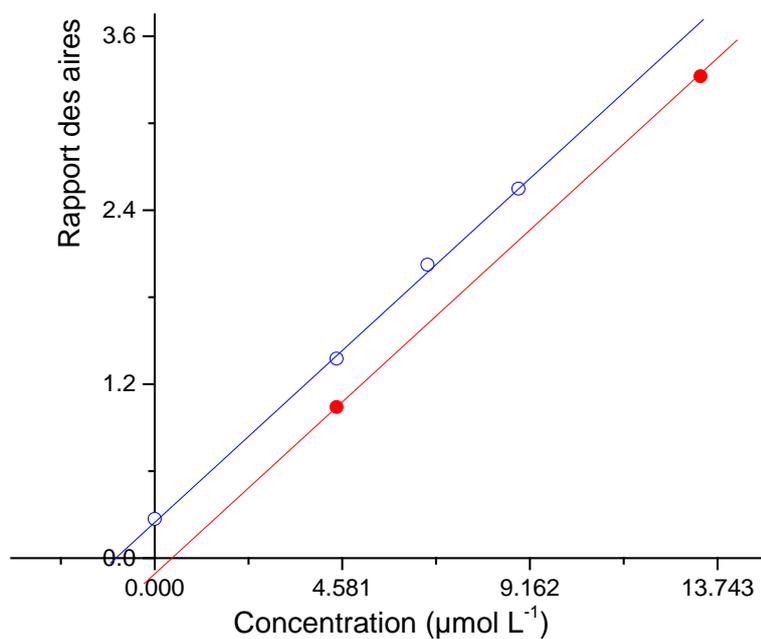


Fig. IV.7. Comparaison graphique entre les droites d'étalonnage et les droites des ajouts dosés, pour inspecter l'effet de matrice : a) cas du rétinol, b) cas de l' $\alpha$ -tocopherol.

Comme nous pouvons le voir sur la figure (IV.8), les lignes se croisent, mais légèrement, indiquant un effet très faible du facteur A avec au moins une interaction légère, mais non significative. Ce qui est vérifié aussi dans le tableau (IV. 2) par la

valeur statistique ( $P > 0.05$ ) c.-à-d. à 95% de niveau de confiance. Cependant, il convient de noter que le facteur jour affecte de manière significative les résultats dans le cas des composés de vitamine E ( $P < 0,05$ ), mais de manière similaire pour les deux types de droites CE et AD. De plus, la signifiante nulle ( $\text{Sig} = 0$ ) au même niveau de confiance dans le test de Tukey montre que les moyennes des pentes sont similaires pour les deux types de courbes. Ceci prouve que dans tous les cas les résultats sont indépendants de la nature des droites et qu'aucun effet de matrice ne s'est produit lors de la manipulation des échantillons de plasma par ce mode de procédé analytique et pour les deux analytes.

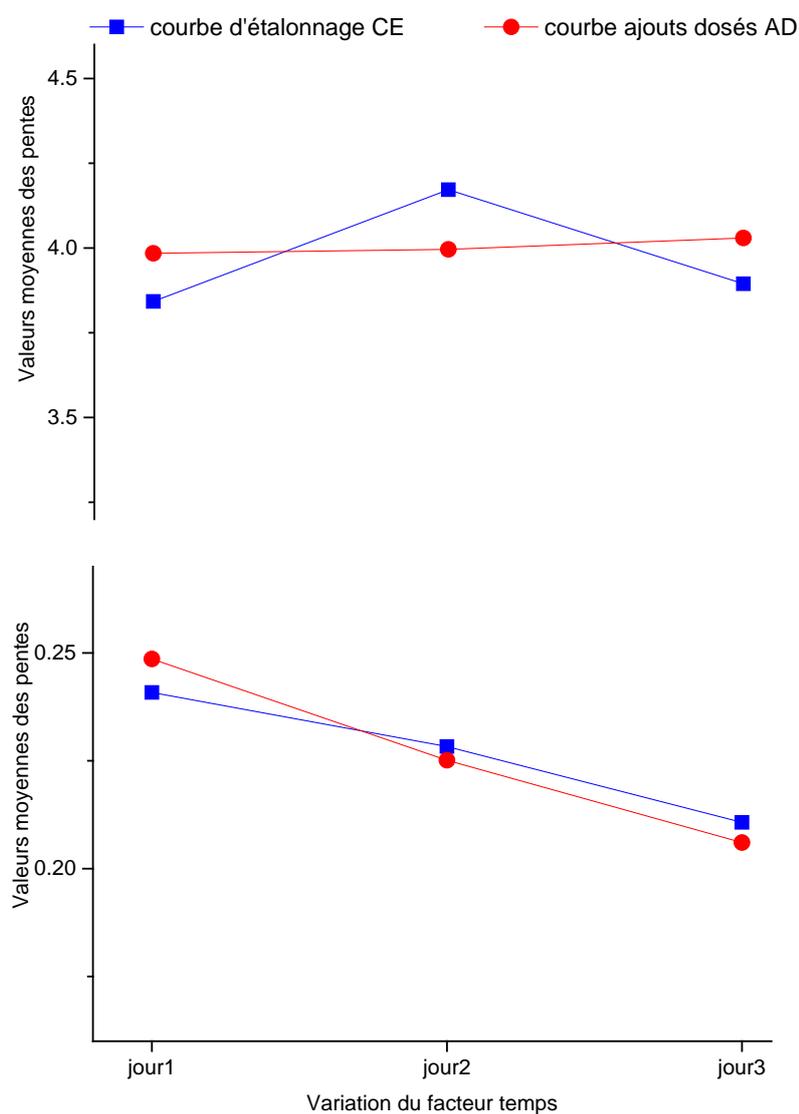


Fig.IV.8. Estimation de l'interaction et des effets des facteurs d'influence lors de la manipulation des composés de vitamine A (graph du haut) et composés de vitamine E (graph du bas).

#### **IV. 2. 3. 4. Fonction de réponse**

Le modèle d'étalonnage linéaire par la méthode de régression des moindres carrés a été choisi, pour désigner la fonction qui relie la réponse de l'instrument à la concentration de l'analyte. Plusieurs ajustements ont été effectués pour optimiser le nombre minimal de points d'étalonnage qui sera utilisé lors de l'application en routine de la procédure analytique. En choisissant ou non une ligne passant par l'origine, en effectuant une pondération de la méthode de régression, ainsi que d'autres transformations mathématiques sur la réponse de l'instrument et de la concentration ont été également appliquées, pour vérifier l'influence de la gamme de concentration sur la procédure d'étalonnage. Dans tous les cas, les coefficients du modèle, pente ( $b_1$ ) et ordonnée à l'origine ( $b_0$ ) de la courbe d'étalonnage ont été déterminés et les concentrations des étalons de validation ont été calculées en retours.

##### **IV. 2. 3. 4. 1. Prédiction inverse pour la détermination de la concentration des standards de validation**

En absence de matériau de référence certifié, de matrice sans analyte, ou bien d'un matériau, présentant des valeurs établies par consensus (c.-à-d., valeurs acceptées comme conventionnellement vrais), il est admis d'utiliser dans les essais de validation une matrice ordinaire contenant l'analyte d'intérêt naturel. Par exemple, pour évaluer le biais ou le taux de recouvrements [14 –16]. Ce cas de figure est adopté ici pour la détermination de la concentration des standards de validation, dont la prédiction par étalonnage inverse nécessite en plus, l'analyse des échantillons non dopés pour déterminer cette quantité naturelle. Soit par la méthode en cours de validation [15] ou bien par la méthode des ajouts dosés [7] et la soustraire par la suite dans le calcul de la concentration des standards de validation. Sachant qu'à ce stade, la détermination de la quantité naturelle n'est pas un objectif en soi même, mais le but ici est d'éliminer son influence sur la mesure de la concentration du standard de validation.

Dans le cas de la méthode des ajouts-dosés, l'élimination de la quantité naturelle se passe d'après l'équation (IV.2). En supposant un modèle linéaire simple, le calcul de la concentration du standard de validation  $C_{(SV)}$  dans les échantillons dilués aboutit à :

$$C_{(aj)} = \frac{\Gamma_{mes} - \bar{\Gamma}_{nat}}{b_{1(AD)}} \quad (IV.4)$$

Avec :

$\bar{\Gamma}_{nat}$ : Réponse moyenne des échantillons non dopés,

$b_{1(AD)}$ : Pente de la droite des ajouts doses.

Par contre, si la quantité naturelle est déterminée par la méthode en cours de validation et en supposant toujours un modèle de régression linéaire simple, selon un étalonnage interne. La fonction qui relie la réponse de l'instrument  $\Gamma_{(Spl)}$  et la concentration  $C_{(Spl)}$  de l'analyte dans les échantillons traités de plasmas est donnée par l'équation suivante :

$$\Gamma_{(Spl)} = b_1 \times C_{(Spl)} + b_0 \quad (IV.5)$$

Où :

$b_1$  : Pente de la droite d'étalonnage interne,

$b_0$ : Ordonnée à l'origine de la droite d'étalonnage interne.

La prédiction inverse de la concentration est alors :

$$C_{(Spl)} = \frac{(\Gamma_{(Spl)} - b_0)}{b_1} \quad (IV.6)$$

Dans ce cas, la concentration du standard de validation dans les échantillons de plasma dopés est calculée conformément à l'équation (IV.2). Ce qui donne, à un niveau de validation ( $k$ ), la concentration d'un ( $j^{\text{ème}}$ ) échantillon comme suit :

$$C_{(SV)} = \frac{\Gamma_{(Spl)} - b_0}{b_1} - \bar{C}_{nat} \quad (IV.7)$$

Après avoir prédit aussi la concentration native, on obtient la relation suivante :

$$C_{(SV)} = \frac{\Gamma_{(Spl)} - \bar{\Gamma}_{nat}}{b_1} \quad (IV.8)$$

Comme cela est clairement montré dans les équations (IV .4&8), une détermination à part, du contenu naturel influe directement sur le résultat de la mesure.

D'autre part, on remarque également, que si dans le premier cas, la droite des ajouts dosés est établie au niveau des concentrations de la série de validation, en considérant ( $l$ ) répétitions du niveau ( $j$ ), on peut écrire vis-à-vis de l'équation (IV.4) :

$$\frac{1}{l} \sum_{j=1}^l \Gamma_{\text{mes}(j)} - C_{(aj)} \times b_{1(AD)} = \bar{\Gamma}_{\text{nat}} \quad (\text{IV. 9})$$

Alors que pour l'ensemble des ( $p$ ) niveaux d'une même série ( $i$ ), on peut avoir :

$$\frac{1}{pl} \sum_{k=1}^p \sum_{j=1}^l \Gamma_{\text{mes}(jk)} - \frac{b_{1(AD)}}{p} \sum_{k=1}^p C_{(aj)(k)} = \bar{\Gamma}_{\text{nat}} \quad (\text{IV. 10})$$

$\bar{\Gamma}_{\text{nat}}$ : Grande moyenne de la réponse des échantillons non dopés

Par conséquent, en combinant les équations (IV.8) et (IV.10), on peut calculer, dans la même série de validation, la concentration du ( $j^{\text{ième}}$ ) échantillon comme suit :

$$\left. \begin{aligned} C_{(SV)} &= \frac{\Gamma_{(Spl)}}{b_1} - \frac{1}{pl \times b_1} \sum_{k=1}^p \sum_{j=1}^l \Gamma_{\text{mes}(jk)} + \frac{b_{1(AD)}}{p \times b_1} \sum_{k=1}^p C_{(aj)(k)} \\ C_{(SV)} &= \frac{1}{b_1} \left( \Gamma_{(Spl)} - \frac{1}{pl} \sum_{k=1}^p \sum_{j=1}^l \Gamma_{\text{mes}(jk)} \right) + \frac{b_{1(AD)}}{p \times b_1} \sum_{k=1}^p C_{(aj)(k)} \end{aligned} \right\} \quad (\text{IV. 11})$$

En plus, si on assume qu'il n'y a pas d'interférence ou d'effet de matrice, compte tenu des conclusions faites au paragraphe (IV. 2. 3. 3), l'équation (IV.11) peut se simplifier mieux encore, tel que :

$$C_{(SV)} = \frac{1}{b_1} \left( \Gamma_{(Spl)} - \frac{1}{pl} \sum_{k=1}^p \sum_{j=1}^l \Gamma_{\text{mes}(jk)} \right) + \frac{1}{p} \sum_{k=1}^p C_{(aj)(k)} \quad (\text{IV. 12})$$

Comme nous pouvons le voir, cette expression n'a en effet mis en évidence que les facteurs d'influences actuels sur la mesure.

La figure (IV.9), représente une illustration des termes de sommation de l'équation (IV.11). On peut vérifier que leur combinaison dans l'équation (IV.12) décrit exactement la concentration native qui se prospecte en fait, dans le côté négatif de l'axe

des concentrations et qui peut être déterminée graphiquement par extrapolation au point d'intersection de la droite des ajouts dosés et l'axe des concentrations.

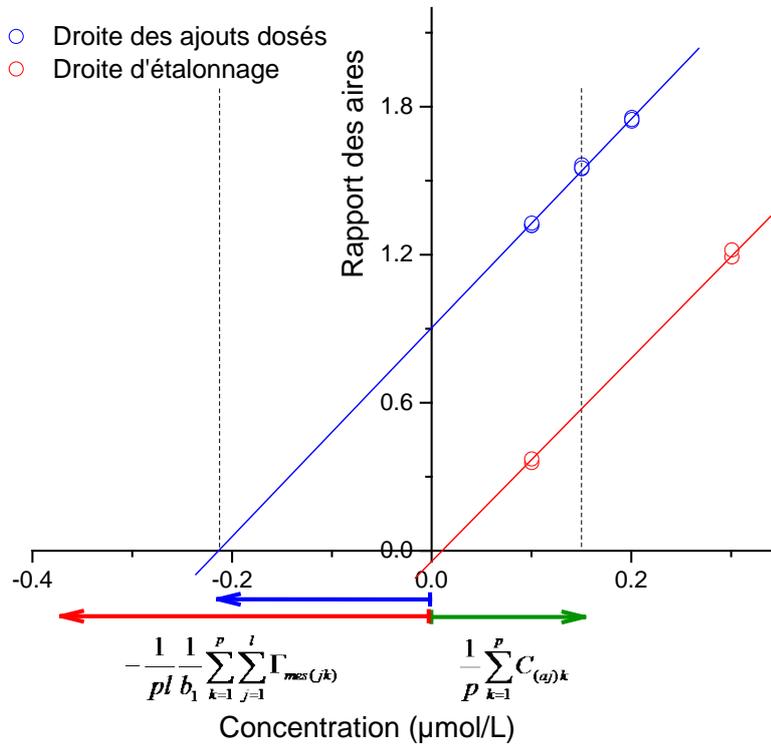


Fig. IV.9. Prospection graphique par méthode des ajouts dosés de la quantité native dans l'échantillon ordinaire contenant l'analyte d'intérêt 'cas rétinol).

#### IV. 2. 3. 4. 2. Alignement des observations

Au cours des étapes de validations, la valeur de référence (concentration ajoutée) n'est pas réellement constante d'une série à l'autre. Il est nécessaire donc de faire un alignement sur la concentration moyenne [17]. Cet alignement peut se faire par interpolation, en ajoutant au deuxième membre des équations (IV.11) et (IV.12), la différence entre la concentration ajoutée moyenne et la concentration introduite. On trouve donc la formule finale pour calculer la concentration du ( $j^{\text{ième}}$ ) SV selon l'équation suivante :

$$C_{(vs)} = \frac{1}{b_1} \left( \Gamma_{(sv)} - \frac{1}{pl} \sum_{k=1}^p \sum_{j=1}^l \Gamma_{(spl)(jk)} \right) + \frac{1}{p} \sum_{k=1}^p C_{(add)(k)} + \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n C_{(add)(ik)} - C_{(add)(ik)} \quad (IV. 13)$$

Par contre, pour les autres transformations mathématiques envisagées dans cette étude, cette expression est différente. Ainsi, dans le cas d'une transformation logarithmique effectuée sur les concentrations et les réponses (rapport des aires), on trouve l'équation d'étalonnage inverse pour le calcul de la concentration du standard de validation comme suit :

$$C_{(VS)} = \left( \left( \frac{1}{b_1} \sqrt{e} \right)^{-b_0} \left( (\Gamma_{(SV)})^{\left( \frac{1}{b_1} \right)} - \frac{1}{p} \sum_{k=1}^p \left( e^{\left( \frac{1}{l} \sum_{j=1}^l \ln(\Gamma_{(spl)(jk)}) \right)} \right) \right)^{\left( \frac{1}{b_1} \right)} \right) + \frac{1}{p} \sum_{k=1}^p C_{(add)(k)} + \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n C_{(add)(ij)} - C_{(add)(ij)} \quad (IV. 14)$$

De même, pour la transformation carrée effectuée sur le modèle linéaire, c.-à-d., sur les concentrations et les réponses (rapport des aires), on écrit l'expression de la concentration du standard de validation de façon suivante :

$$C_{(VS)} = \left( \frac{1}{b_1} \right)^2 \left( \left( \sqrt{\Gamma_{(SV)}} - b_0 \right)^2 - \frac{1}{pl} \sum_{k=1}^p \sum_{j=1}^l \left( \sqrt{\Gamma_{(spl)(jk)}} - b_0 \right)^2 \right) + \frac{1}{p} \sum_{k=1}^p C_{(add)(k)} + \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n C_{(add)(ij)} - C_{(add)(ij)} \quad (IV. 15)$$

Les concentrations obtenues à partir de chaque fonction de réponse sont collectées dans les tableaux (IV.3 IV.4) et utilisées ensuite pour calculer les paramètres donnant les profils d'exactitude illustrés dans la figure (IV.10).

Tableau IV.3 : Résultats du calcul des concentrations du rétinol dans les étalons de validation à partir différents ajustements d'étalonnages linéaires : (5 points. 5 points forcé à 0. 3 points. 3 points forcé à 0. 2 points. 2 points forcé à 0).

SV <sub>(ijk)</sub>	Cajt	Γ éch	5niv	5niv-0	3niv	3niv-0	2niv	2niv-0
SV111	0.1015	1.2939	0.0972	0.0965	0.0977	0.0969	0.0977	0.097
SV112	0.1015	1.2878	0.0958	0.095	0.0963	0.0955	0.0963	0.0955
SV113	0.1015	1.2893	0.0961	0.0954	0.0966	0.0958	0.0966	0.0959
SV121	0.1522	1.5258	0.1537	0.1537	0.1537	0.1537	0.1537	0.1537
SV122	0.1522	1.5208	0.1525	0.1525	0.1524	0.1525	0.1524	0.1525
SV123	0.1522	1.5374	0.1564	0.1565	0.1564	0.1565	0.1564	0.1565
SV131	0.2029	1.746	0.2072	0.208	0.2068	0.2075	0.2068	0.2075
SV132	0.2029	1.7413	0.2061	0.2068	0.2056	0.2064	0.2056	0.2064
SV133	0.2029	1.7358	0.2048	0.2055	0.2043	0.2051	0.2043	0.205
SV211	0.1015	1.3363	0.1035	0.1038	0.1039	0.1042	0.1039	0.1041
SV212	0.1015	1.3362	0.1034	0.1038	0.1039	0.1041	0.1039	0.1041
SV213	0.1015	1.3143	0.0979	0.0983	0.0984	0.0987	0.0984	0.0987
SV221	0.1522	1.542	0.155	0.155	0.155	0.155	0.155	0.155
SV222	0.1522	1.5407	0.1547	0.1547	0.1547	0.1547	0.1547	0.1547
SV223	0.1522	1.5399	0.1545	0.1545	0.1545	0.1545	0.1545	0.1545
SV231	0.2029	1.7382	0.2042	0.2038	0.2037	0.2035	0.2037	0.2035
SV232	0.2029	1.7167	0.1988	0.1984	0.1983	0.1981	0.1983	0.1981
SV233	0.2029	1.7137	0.198	0.1977	0.1976	0.1974	0.1976	0.1974
SV311	0.1015	1.396	0.1042	0.104	0.1035	0.1038	0.1035	0.1038
SV312	0.1015	1.3795	0.1	0.0999	0.0993	0.0997	0.0993	0.0997
SV313	0.1015	1.4035	0.106	0.1059	0.1053	0.1057	0.1053	0.1057
SV321	0.1522	1.593	0.153	0.153	0.153	0.153	0.153	0.153
SV322	0.1522	1.5607	0.1449	0.1449	0.1448	0.1449	0.1448	0.1449
SV323	0.1522	1.5542	0.1433	0.1433	0.1432	0.1432	0.1432	0.1432
SV331	0.2029	1.7999	0.2042	0.2044	0.205	0.2046	0.2043	0.2046
SV332	0.2029	1.8149	0.208	0.2081	0.2088	0.2083	0.2081	0.2084
SV333	0.2029	1.8094	0.2066	0.2067	0.2074	0.207	0.2067	0.207

Suite du tableau IV.3 : calcul des concentrations du rétinol dans les étalons de validation à partir des ajustements d'étalonnages linéaires : (niveau maximale forcé à 0. transformation carrée sur la concentration et la réponse. transformation logarithme sur la concentration et la réponse. pondération (1/x) sur les concentrations. (1/x<sup>2</sup>) sur les concentrations).

SV <sub>(ijk)</sub>	Cajt	Γ éch	0-max	carr-carr	ln-ln	Pond 1/x	Pond 1/x <sup>2</sup>
SV111	0.1015	1.2939	0.0963	0.0977	0.0986	0.0971	0.0972
SV112	0.1015	1.2878	0.0948	0.0962	0.0971	0.0957	0.0957
SV113	0.1015	1.2893	0.0951	0.0966	0.0975	0.096	0.0961
SV121	0.1522	1.5258	0.1537	0.1537	0.1538	0.1537	0.1537
SV122	0.1522	1.5208	0.1525	0.1525	0.1526	0.1525	0.1525
SV123	0.1522	1.5374	0.1565	0.1565	0.1565	0.1564	0.1564
SV131	0.2029	1.746	0.2082	0.2067	0.2057	0.2074	0.2073
SV132	0.2029	1.7413	0.2071	0.2056	0.2047	0.2062	0.2062
SV133	0.2029	1.7358	0.2057	0.2043	0.2034	0.2049	0.2049
SV211	0.1015	1.3363	0.1043	0.1033	0.1032	0.1037	0.1036
SV212	0.1015	1.3362	0.1043	0.1033	0.1032	0.1036	0.1035
SV213	0.1015	1.3143	0.0989	0.0978	0.0977	0.0981	0.098
SV221	0.1522	1.542	0.155	0.155	0.155	0.155	0.155
SV222	0.1522	1.5407	0.1547	0.1547	0.1546	0.1547	0.1547
SV223	0.1522	1.5399	0.1545	0.1544	0.1544	0.1545	0.1545
SV231	0.2029	1.7382	0.2033	0.2043	0.2045	0.204	0.2041
SV232	0.2029	1.7167	0.1979	0.1989	0.199	0.1986	0.1987
SV233	0.2029	1.7137	0.1972	0.1981	0.1983	0.1978	0.198
SV311	0.1015	1.396	0.1041	0.1035	0.1021	0.1033	0.1037
SV312	0.1015	1.3795	0.1	0.0993	0.0979	0.0991	0.0996
SV313	0.1015	1.4035	0.106	0.1053	0.1041	0.1052	0.1056
SV321	0.1522	1.593	0.153	0.1529	0.1529	0.153	0.153
SV322	0.1522	1.5607	0.1449	0.1448	0.1445	0.1448	0.1448
SV323	0.1522	1.5542	0.1433	0.1431	0.1428	0.1431	0.1432
SV331	0.2029	1.7999	0.2042	0.2049	0.2064	0.2052	0.2047
SV332	0.2029	1.8149	0.208	0.2087	0.2103	0.209	0.2085
SV333	0.2029	1.8094	0.2066	0.2073	0.2089	0.2076	0.2071

Tableau IV.4 : Résultats du calcul des concentrations de l'α-tocopherol dans les étalons de validation à partir différents ajustements d'étalonnages linéaires : (5 points. 5 points forcé à 0. 3 points. 3 points forcé à 0. 2 points. 2 points forcé à 0).

SV <sub>(ijk)</sub>	Cajt	Γ éch	5niv	0-5niv	3niv	0-3niv	2niv	0-2niv
SV111	4.581	1.4195	4.5912	4.5694	4.6048	4.5843	4.6048	4.5852
SV112	4.581	1.4049	4.5338	4.5114	4.5478	4.5268	4.5478	4.5277
SV113	4.581	1.3073	4.151	4.1248	4.1674	4.1428	4.1674	4.1438
SV121	6.8715	2.0119	6.9832	6.9843	6.9825	6.9836	6.9825	6.9835
SV122	6.8715	1.9849	6.8773	6.8773	6.8772	6.8773	6.8772	6.8773
SV123	6.8715	2.0784	7.2441	7.2478	7.2418	7.2453	7.2418	7.2451
SV131	9.162	2.5677	9.232	9.2546	9.2178	9.239	9.2178	9.2382
SV132	9.162	2.4933	8.9402	8.96	8.9279	8.9464	8.9279	8.9457
SV133	9.162	2.5895	9.3172	9.3407	9.3026	9.3246	9.3026	9.3237
SV211	4.581	1.3138	4.8536	4.8353	4.8733	4.8518	4.8733	4.8535
SV212	4.581	1.3023	4.8053	4.7866	4.8255	4.8035	4.8255	4.8052
SV213	4.581	1.1902	4.3365	4.3137	4.3609	4.3342	4.3609	4.3363
SV221	6.8715	1.765	6.6329	6.6308	6.6351	6.6327	6.6351	6.6329
SV222	6.8715	1.7783	6.6883	6.6867	6.69	6.6881	6.69	6.6883
SV223	6.8715	1.9323	7.3327	7.3367	7.3284	7.3331	7.3284	7.3327
SV231	9.162	2.4156	9.246	9.2673	9.223	9.2481	9.223	9.2461
SV232	9.162	2.3804	9.0988	9.1189	9.0772	9.1008	9.0772	9.0989
SV233	9.162	2.3431	8.9429	8.9616	8.9227	8.9447	8.9227	8.943
SV311	4.581	1.2685	4.8855	4.8675	4.8734	4.865	4.8734	4.8663
SV312	4.581	1.1561	4.384	4.3614	4.3688	4.3582	4.3688	4.3599
SV313	4.581	1.1773	4.4785	4.4567	4.4639	4.4537	4.4639	4.4553
SV321	6.8715	1.6919	6.8126	6.8121	6.8123	6.812	6.8123	6.8121
SV322	6.8715	1.67	6.7151	6.7136	6.7141	6.7134	6.7141	6.7135
SV323	6.8715	1.6523	6.6362	6.634	6.6347	6.6337	6.6347	6.6339
SV331	9.162	2.2233	9.2219	9.2432	9.2362	9.2462	9.2362	9.2446
SV332	9.162	2.2173	9.1951	9.2162	9.2093	9.2192	9.2093	9.2176
SV333	9.162	2.2913	9.5252	9.5494	9.5414	9.5528	9.5414	9.551

Suite du tableau IV.4 : calcul des concentrations de l' $\alpha$ -tocopherol dans les étalons de validation à partir des ajustements d'étalonnages linéaires : (niveau maximale forcé à 0. transformation carrée sur la concentration et la réponse. transformation logarithme sur la concentration et la réponse. pondération (1/x) sur les concentrations. (1/x<sup>2</sup>) sur les concentrations).

SV <sub>(ijk)</sub>	Cajt	$\Gamma$ éch	0-max	carr-carr	ln-ln	pond 1/x	pond 1/x <sup>2</sup>
SV111	4.581	1.4195	4.5665	4.5638	4.5466	4.5815	4.5859
SV112	4.581	1.4049	4.5085	4.5054	4.4874	4.5239	4.5284
SV113	4.581	1.3073	4.1214	4.1153	4.0919	4.1394	4.1447
SV121	6.8715	2.0119	6.9845	6.9867	6.9939	6.9837	6.9835
SV122	6.8715	1.9849	6.8773	6.8797	6.8861	6.8773	6.8773
SV123	6.8715	2.0784	7.2483	7.2499	7.2591	7.2457	7.245
SV131	9.162	2.5677	9.2575	9.2501	9.2685	9.2419	9.2374
SV132	9.162	2.4933	8.9625	8.957	8.9745	8.949	8.945
SV133	9.162	2.5895	9.3438	9.3357	9.3543	9.3276	9.3229
SV211	4.581	1.3138	4.8347	4.8208	4.8075	4.8497	4.8509
SV212	4.581	1.3023	4.786	4.7717	4.7578	4.8014	4.8026
SV213	4.581	1.1902	4.313	4.2941	4.2737	4.3316	4.3331
SV221	6.8715	1.765	6.6307	6.6254	6.632	6.6324	6.6326
SV222	6.8715	1.7783	6.6866	6.6813	6.6884	6.6879	6.688
SV223	6.8715	1.9323	7.3368	7.3316	7.3434	7.3335	7.3333
SV231	9.162	2.4156	9.268	9.2569	9.2769	9.2505	9.2491
SV232	9.162	2.3804	9.1195	9.1091	9.1288	9.1031	9.1017
SV233	9.162	2.3431	8.9623	8.9526	8.9719	8.9469	8.9456
SV311	4.581	1.2685	4.8597	4.8573	4.8371	4.8638	4.8749
SV312	4.581	1.1561	4.3515	4.3457	4.3189	4.3567	4.3707
SV313	4.581	1.1773	4.4472	4.4422	4.4166	4.4522	4.4656
SV321	6.8715	1.6919	6.8119	6.8151	6.8179	6.812	6.8123
SV322	6.8715	1.67	6.713	6.7162	6.7179	6.7133	6.7142
SV323	6.8715	1.6523	6.6331	6.6362	6.637	6.6336	6.6349
SV331	9.162	2.2233	9.2525	9.2506	9.2781	9.2477	9.2344
SV332	9.162	2.2173	9.2254	9.2236	9.2508	9.2206	9.2075
SV333	9.162	2.2913	9.5599	9.5567	9.5869	9.5544	9.5395

Tableau IV.5 : Résultats de validation de la procédure HPLC-UV pour la quantification simultanée du rétinol et  $\alpha$ -tocopherol dans les échantillons de plasma humain, cas du plan d'étalonnage à deux points.

Rétinol	$\alpha$ -tocopherol									
	VS1	VS2	VS3	Ext1	Ext2	VS1	VS2	VS3	Ext1	Ext2
Nombre de séries ( <i>i</i> )	3	3	3	3	1	1	3	3	1	1
Nombre des répétitions ( <i>j</i> )	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
<b>Concentration (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>										
Ajoutée	0.1015	0.1522	0.1522	0.2029	0.299	0.399	4.581	6.872	9.162	11.739
Calculée (moyenne)	0.1003	0.1517	0.1517	0.2045	0.297	0.398	4.557	6.874	9.188	11.826
<b>Précision (%RSD)</b>										
Intra-série	2.581	2.141	2.141	1.143			5.810	3.689	1.951	
Inter- séries	2.807	2.558	2.558	1.613			0*	0.832	0.966	
Intermédiaire	3.801	3.343	3.343	2.076			5.816	3.776	2.201	
<b>Justesse</b>										
% biais absolue relative	0.901	0.161	0.161	0.504			0.533	0.112	0.340	
% Recouvrement (%RSD)	99.1 (3.5)	99.8 (3.1)	99.8 (3.1)	100.6 (1.9)			99.5 (5.5)	100.1 (3.8)	100.3 (2.1)	
<b><math>\beta</math>-IT limites</b>										
LLIT ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0.089	0.135	0.135	0.189			3.904	6.232	8.660	
ULIT ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0.112	0.169	0.169	0.219			5.200	7.516	9.717	
<b>Linéarité</b>										
LOD ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	$y = 0.9972x + 9.8e-6$ ( $r^2 = 0.9998$ )						$y = 1.0234x - 0.1935$ ( $r^2 = 0.9994$ )			
LLOQ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0.05						0.98			
	0.1015						4.581			

\* La variance entre séries est égale à 0 lorsque l'erreur quadratique moyenne MSE est supérieure au modèle carré moyen MSM, comme dans la référence [19].

### IV. 2. 3. 5. Efficacité de l'extraction

L'efficacité d'extraction montre combien, le solvant ou le mélange de solvants utilisé dans les étapes de traitement de l'échantillon est capable d'extraire la totalité de l'analyte d'intérêt de sa matrice naturelle, mais en veillant toujours à le quantifier sans perte au stade final de la procédure analytique.

Pour mettre en évidence ce point, nous avons tout d'abord entamé des essais préliminaires d'extraction liquide-liquide, en utilisant de l'hexane comme solvant, étant couramment préféré dans le mode de traitement à plusieurs étapes. La précipitation a été effectuée premièrement avec l'éthanol, suivie de plusieurs extractions, agitation, centrifugation et transfert de la phase organique dans un autre flacon. En conséquence, l'analyse HPLC sur la phase aqueuse du liquide a toujours montré une présence substantielle de l'analyte d'intérêt, même après cinq extractions consécutives par le solvant organique non miscible.

Ceci confirme les commentaires de Thompson et *al.* [14] que le transfert de l'analyte dans ce type de procédure est incomplet. Cette perte est susceptible de s'accroître au cours de l'étape d'évaporation, compte tenu de la thermolabilité des molécules étudiées, ce qui peut être fatal pour les échantillons de faibles teneurs. Cependant, cette perte sera totalement évitée dans le cas d'un mode de traitement à une seule étape. C'est ce qui nous a amenés de choisir ce mode de traitement d'échantillons, en utilisant le mélange de solvants proposé par Andrioli et *al.* [4].

Finalement, l'efficacité d'extraction a été vérifiée quantitativement en calculant le taux de recouvrement, selon l'équation suivante :

$$R = \frac{C_{\text{calculée}}}{C_{\text{ajoutée}}} \quad (\text{IV. 16})$$

Comme nous pouvons le voir dans le tableau (IV.5), pour tous les niveaux de validation, ce paramètre exprimé en pourcentage  $\pm$  écart-type (SD) a été trouvé proche de 100%, indiquant ainsi l'adéquation du mode de traitement d'échantillon adopté pour cette procédure analytique, pour les deux molécules d'intérêt.

### IV. 2. 3. 6. Fidélité

Le tableau (IV.5), reporte un exemple de calcul de précision intra-série, inter-séries et de fidélité intermédiaire en termes relatifs à tous les niveaux de validation, on remarque que ces valeurs sont tous inférieures à 5% à l'exception du premier niveau de la vitamine E. Ce qui indique aussi une faible dispersion des résultats de mesures obtenus par l'emploi de ce modèle.

### IV. 2. 3. 7. Justesse

La justesse caractérise la distance entre la valeur connue de la quantité introduite et la moyenne expérimentale de celle-ci, ce paramètre a été évalué en utilisant les données de concentrations. Le tableau (IV.5) donne un exemple de ce calcul exprimé sous forme de biais relatif, à chaque niveau de concentration. Comme c'est bien indiqué, la valeur maximale de la justesse ne dépasse pas 1% pour les deux analytes étudiés.

### IV. 2. 3. 8. Calcul du profil d'exactitude

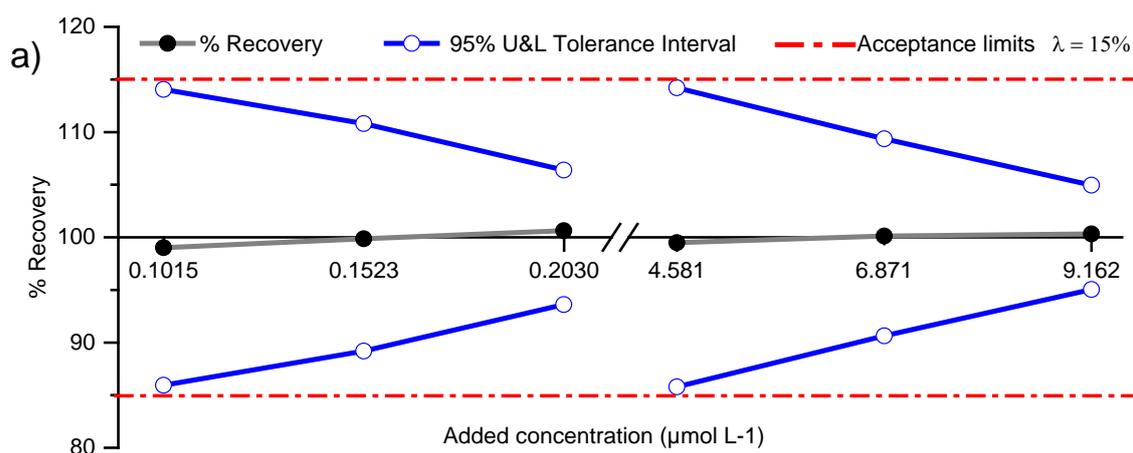
Puisque chaque mesure obtenue reflète simultanément, la vraie valeur, le biais de la méthode ainsi que sa précision [17,18]. L'exactitude introduit donc le concept de l'erreur totale, tel que défini dans la norme ISO 5725 [19]. Au lieu d'évaluer indépendamment, la justesse et la précision, l'erreur totale (biais + précision) peut être estimée globalement pour calculer le  $\beta$ -expectation intervalle de tolérance ( $\beta$ -IT) et de le comparer aux limites d'acceptation  $\lambda$  selon les équations portées dans le paragraphe (II. 3. 3. 3). En effet, les bornes supérieures (ULIT) et des bornes inférieures (LLIT) de l'intervalle de tolérance ont été calculées, à chaque niveau de validation, à partir des données de concentration mentionnées sur les tableaux (IV.3 et IV.4) et avec la probabilité ( $\beta = 95\%$ ). Les valeurs obtenues par ces calculs ont été utilisées dans leurs formes relatives pour élaborer les profils d'exactitudes de la figure (IV.10).

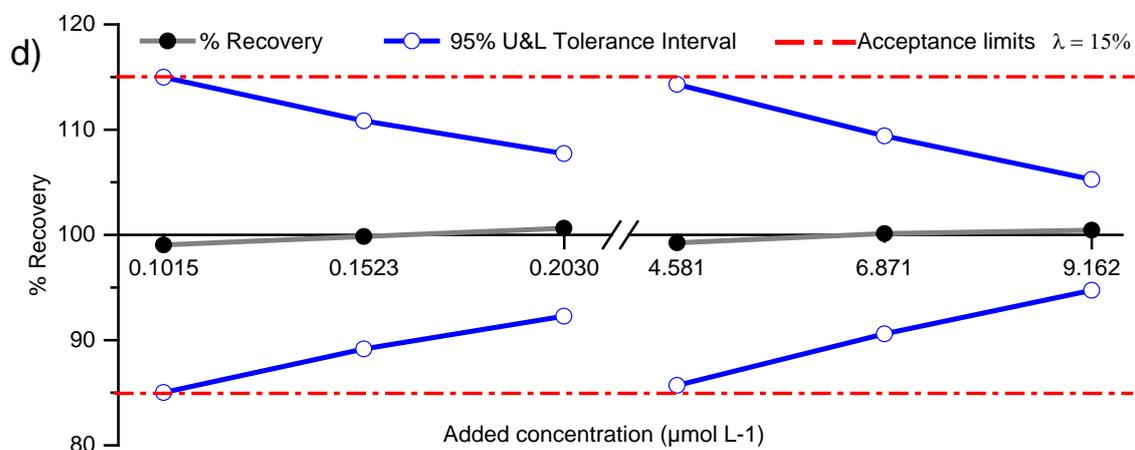
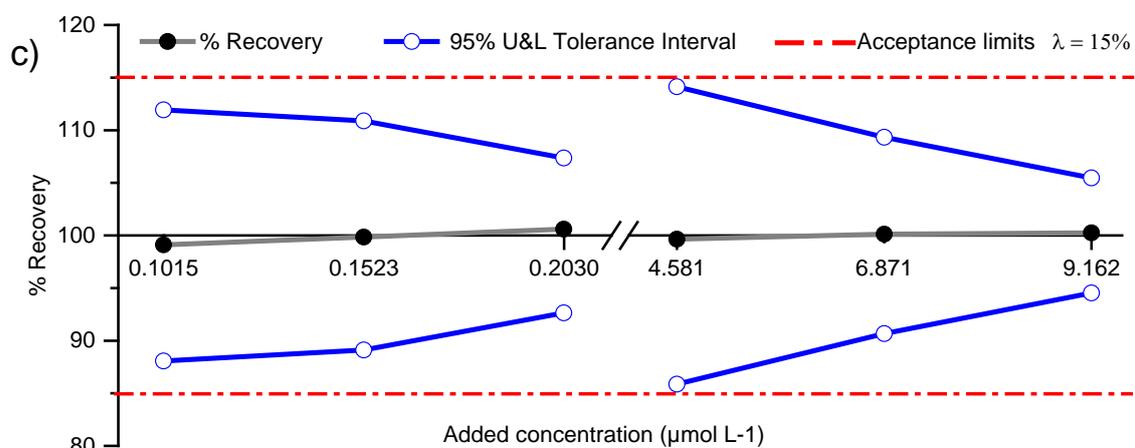
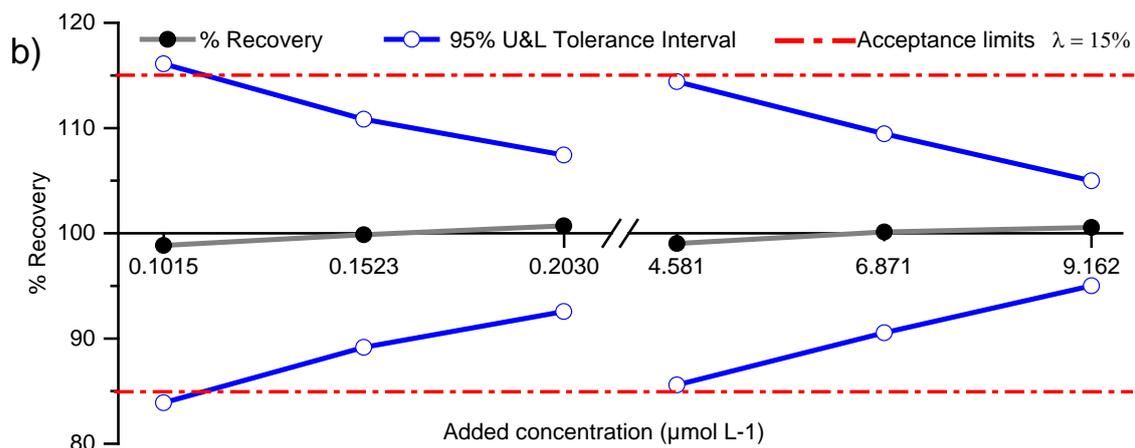
Comme nous pouvons le voir, sauf le cas du graphe de la figure (IV.10i), correspondant à la transformation logarithmique, qui donne une forme différente à ce qui a été globalement obtenu dans les profils du rétinol (profils de gauche). Tous les ajustements fournissent des profils plus au moins appréciables sur la validité de la procédure analytique. Comme on le constate aussi, les allures des graphes montrent une variation très marquée à la limite inférieure de la plage de concentration étudiée pour le rétinol.

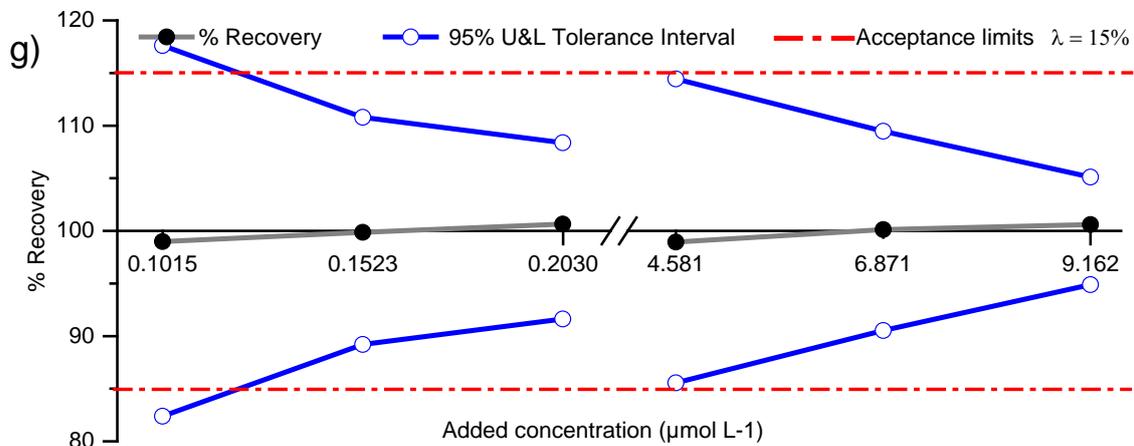
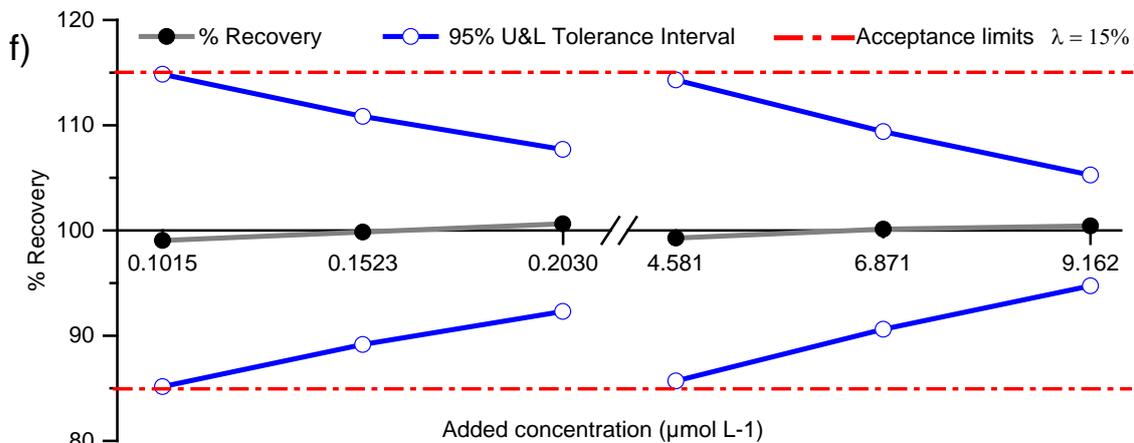
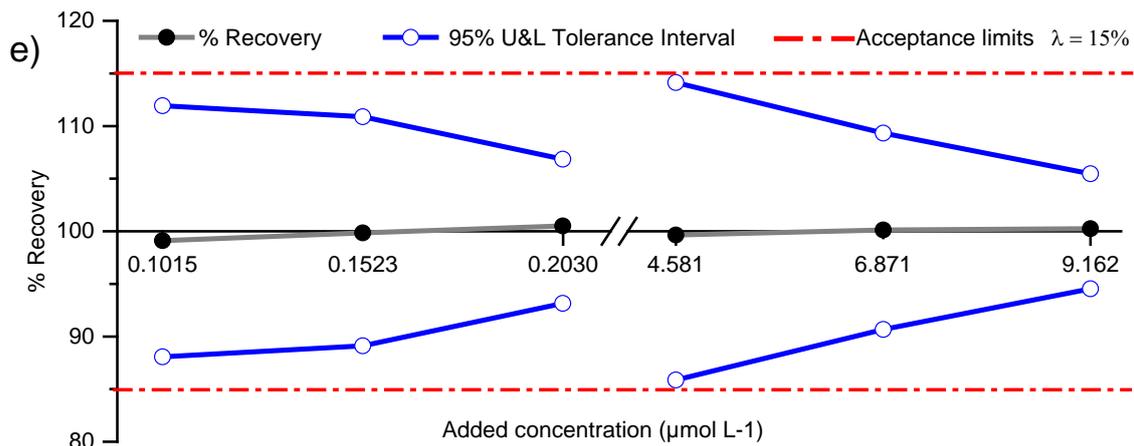
La procédure devient invalide à ce point, pour tous les modèles passant par zéro. Tandis que pour les autres modèles, les bornes de l'intervalle de tolérance sont incluses dans les limites d'acceptabilité de  $\pm 15\%$ , mais avec un élargissement plus au moins important, toujours au niveau de concentration bas. Cependant, les profils de l' $\alpha$ -tocophérol (profils de droite) donnent tous des formes similaires, mais avec le même élargissement observé au premier niveau.

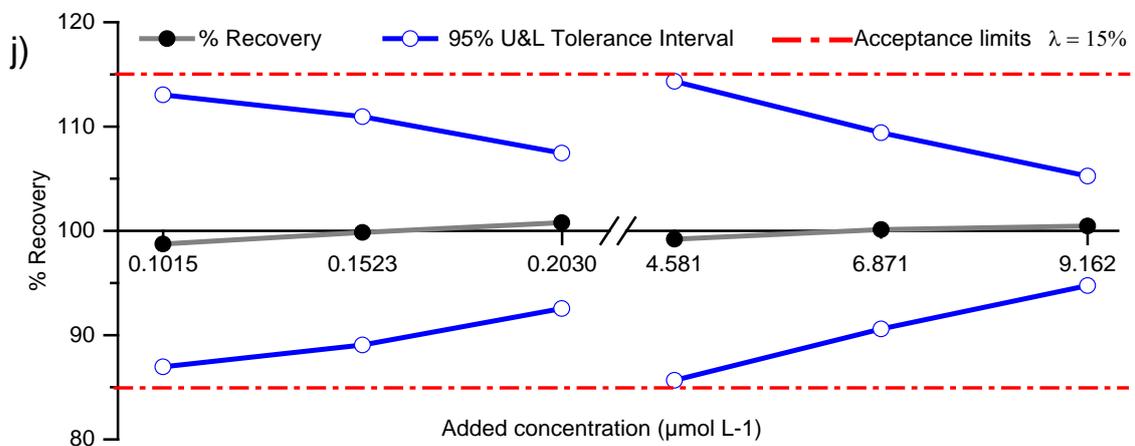
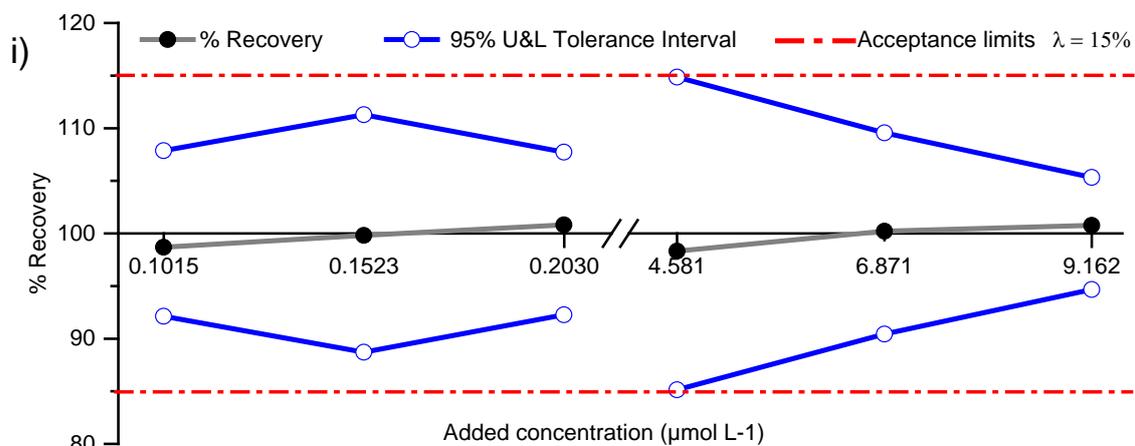
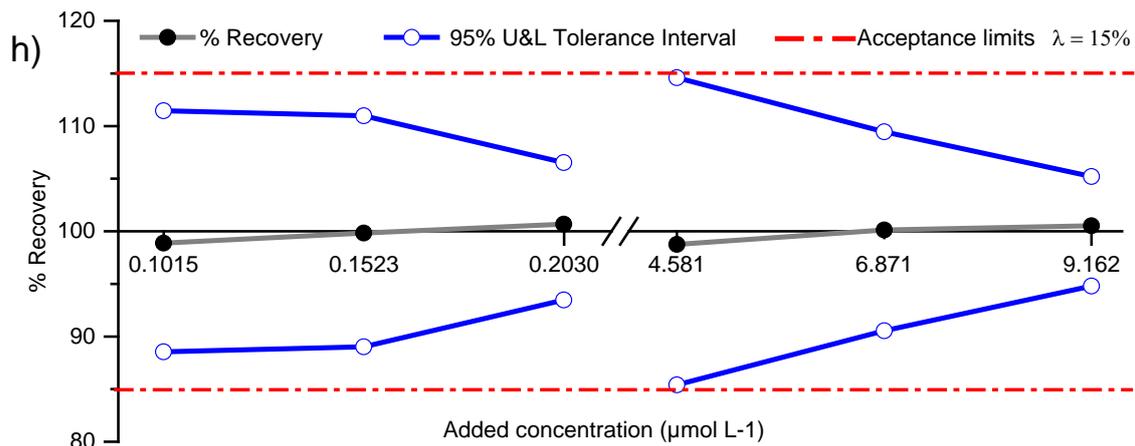
Si on considère un intérêt pratique et économique, ce qui est le cas d'ailleurs, pour toute procédure analytique. La simplicité de la courbe d'étalonnage à deux-points s'est révélée appropriée pour désigner la fonction de réponse, qui servira à quantifier la concentration des analytes dans les échantillons de plasma, lors de l'utilisation en routine de cette procédure analytique. Le tableau (IV. 5) reporte à titre indicatif les valeurs des limites de l'IT calculée selon ce modèle.

Par contre, l'embaras que trouvera un utilisateur de cette procédure sera facilement résolu, pour doser des échantillons aux faibles concentrations du domaine de validité de la méthode. En effectuant simplement, des modifications mineures pour amener son dosage aux niveaux les plus hauts du domaine de validation. En augmentant, par exemple, de deux fois le volume d'injection, ce qui évite certainement de rejeter totalement la procédure analytique.









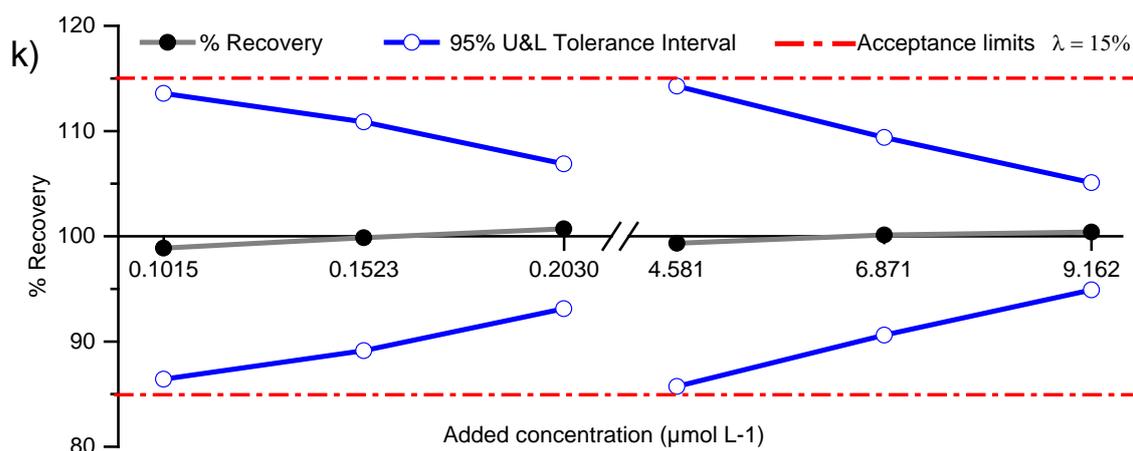


Fig. IV.10. Profil d'exactitude pour la validation d'une méthode HPLC-UV, pour la quantification du rétinol (graphiques de gauche) et  $\alpha$ -tocopherol (graphiques de droite) dans le plasma humain, en utilisant des modèles d'étalonnages linéaires : **a)** 5 niveaux. **b)** 5 niveaux forcé à 0. **c)** 3 niveaux. **d)** 3 niveaux forcé à 0. **e)** 2 niveaux. **f)** 2 niveaux forcé à 0. **g)** niveau maximale forcé à 0. **h)** transformation carrée sur la concentration et la réponse d'un plan à 5 niveaux. **i)** transformation logarithme sur la concentration et la réponse d'un plan à 5 niveaux. **j)** pondération ( $1/x$ ) sur les concentrations d'un plan à 5 niveaux. **k)** pondération ( $1/x^2$ ) sur les concentrations d'un plan à 5 niveaux.

#### IV. 2. 3. 9. Linéarité de la méthode

En premier temps, pour justifier que le modèle d'étalonnage qui a été choisi pour l'ajustement de la fonction de réponse est bien linéaire, il suffit d'inspecter visuellement les représentations graphiques des réponses  $Y$  en fonction des concentrations introduites  $X$ , de la fonction  $Y = f(X)$ . À cet effet, les figures (IV. 3) et (IV. 5) des droites d'étalonnage, déjà étudiées dans le paragraphe (IV. 2. 2) confirment bien le choix du modèle linéaire. Mais, cette linéarité d'étalonnage ne permet pas de vérifier la linéarité de la méthode, étant donné qu'il existe des procédures qui utilisent des modèles d'étalonnage non linéaire. La linéarité d'une méthode caractérise la justesse de la méthode alors que la linéarité instrumentale intéresse la seule réponse instrumentale [20].

En deuxième temps, pour une gamme de concentration donnée, la linéarité d'une procédure analytique est définie pour examiner la relation qui existe entre la quantité introduite et la concentration calculée par la fonction de réponse [17].

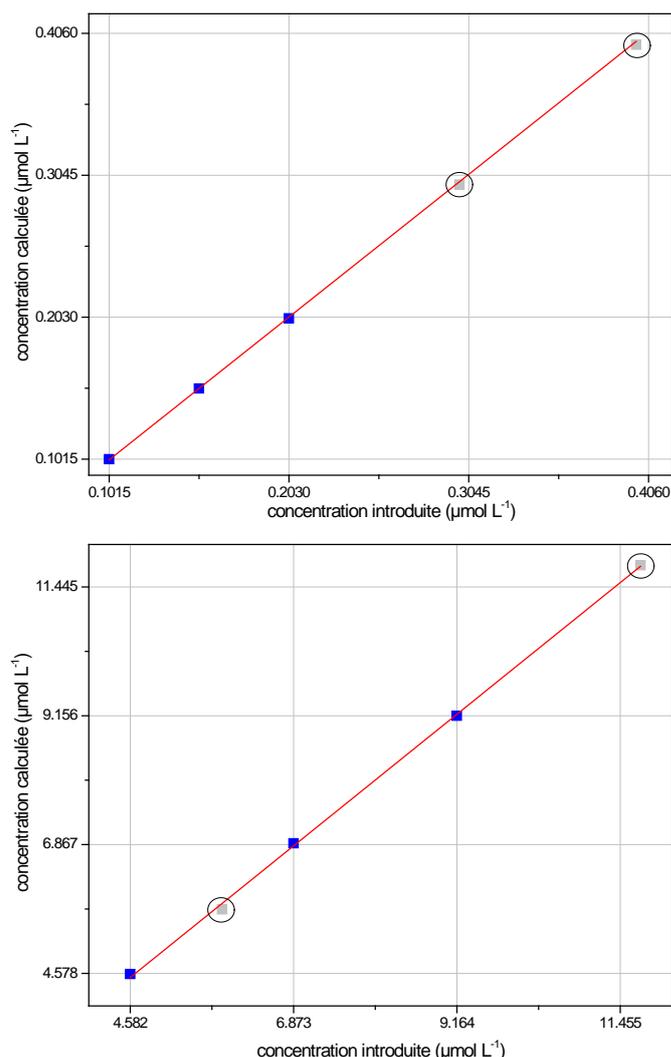


Fig. IV.11. Vérification de la linéarité de la méthode analytique dans des plages légèrement étendues de la concentration : Concentration moyenne calculée =  $f$  (concentrations introduites). Les points gris entourés sont les extra niveaux évalués en addition. Les lignes représentent l'ajustement linéaire des données de concentration ; pour le rétinol (graphe du haut) et celle de l' $\alpha$ -tocophérol (graphe du bas).

Pour cela, les concentrations calculées des étalons de validation ont été tracées en fonction des concentrations introduites,  $C_{(cal)} = f(C_{(add)})$ , selon un modèle de régression linéaire simple. L'alignement de ces données sur la figure (IV.11) par rapport à la ligne de référence ( $y = x$ ), ainsi que les valeurs des coefficients du modèle mentionnés dans le tableau (IV.5) indiquent, que la procédure analytique est linéaire le long des plages de concentration étudiées pour les deux molécules.

### IV. 2. 3. 10. Limite de détection et limite de quantification

Dans la méthodologie du profil d'exactitude, les limites de quantification (limite supérieure de quantification ULOQ et limite inférieure de quantification LLOQ) sont désignées par l'intersection entre le profil d'exactitude et les lignes de limites d'acceptation. Les figures (IV.10b et IV.10g) montrent que cette situation se produit clairement dans les modèles forcés à zéro dans le cas de rétinol. La limite inférieure de quantification devient par contre, le premier niveau de concentration étudié pendant les expériences de validation, dans le cas des autres profils appropriés pour valider la méthode dans toute la gamme choisie [17]. D'autre part, la limite de détection LOD a été estimée sur la base des paramètres de la courbe d'étalonnage [11]. Les meilleures estimations de ces paramètres sont mentionnées dans le tableau (IV.5).

### IV. 2. 4. Estimation de l'incertitude par approche validation

Quel que soit le mode adopté pour l'estimation de l'incertitude, dans notre cas, approches de modélisation et de validation. L'incertitude de mesure doit être estimée conformément aux principes du GUM [21]

- la quantité ciblée est la concentration (C<sub>spl</sub>) mesurée en ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), de rétinol et de  $\alpha$ -tocophérol et contenue dans les échantillons dilués de plasma humain,
- Les principales sources d'incertitude ont été identifiées,
- la contribution de chaque source d'incertitude a été déterminée sous forme d'incertitude type,
- les différentes incertitudes types ont été ensuite combinées pour calculer l'incertitude combinée  $u_c$  (C<sub>spl</sub>).
- Enfin, pour un objectif plus pratique, l'incertitude élargie U (C<sub>spl</sub>) a été déterminée, selon un facteur d'élargissement approprié et à un niveau de confiance égal à 95%.

#### IV. 2. 4. 1. Identification des sources d'incertitude par diagramme d'Ishikawa

Au moyen de l'approche de validation, l'identification des sources d'incertitude se fait généralement à l'aide d'un diagramme d'Ishikawa. Comme le montre la figure (IV.12),

à première vue, la recherche des sources d'incertitude peut être établie selon la qualité de la matière analysée, que ce soit les étalons ou les échantillons d'essai et sur la façon d'utiliser les instruments choisis dans les tâches analytiques, afin de manipuler cette matière. Ceci est bien expliqué par les branches principales illustrées sur la figure (IV.12a). De plus, cette quête peut être détaillée au besoin, en visant les facteurs cruciaux associés à chaque branche. Ainsi, nous pouvons compter les cinq paramètres quantitatifs réarrangés sur la figure (IV.12b).

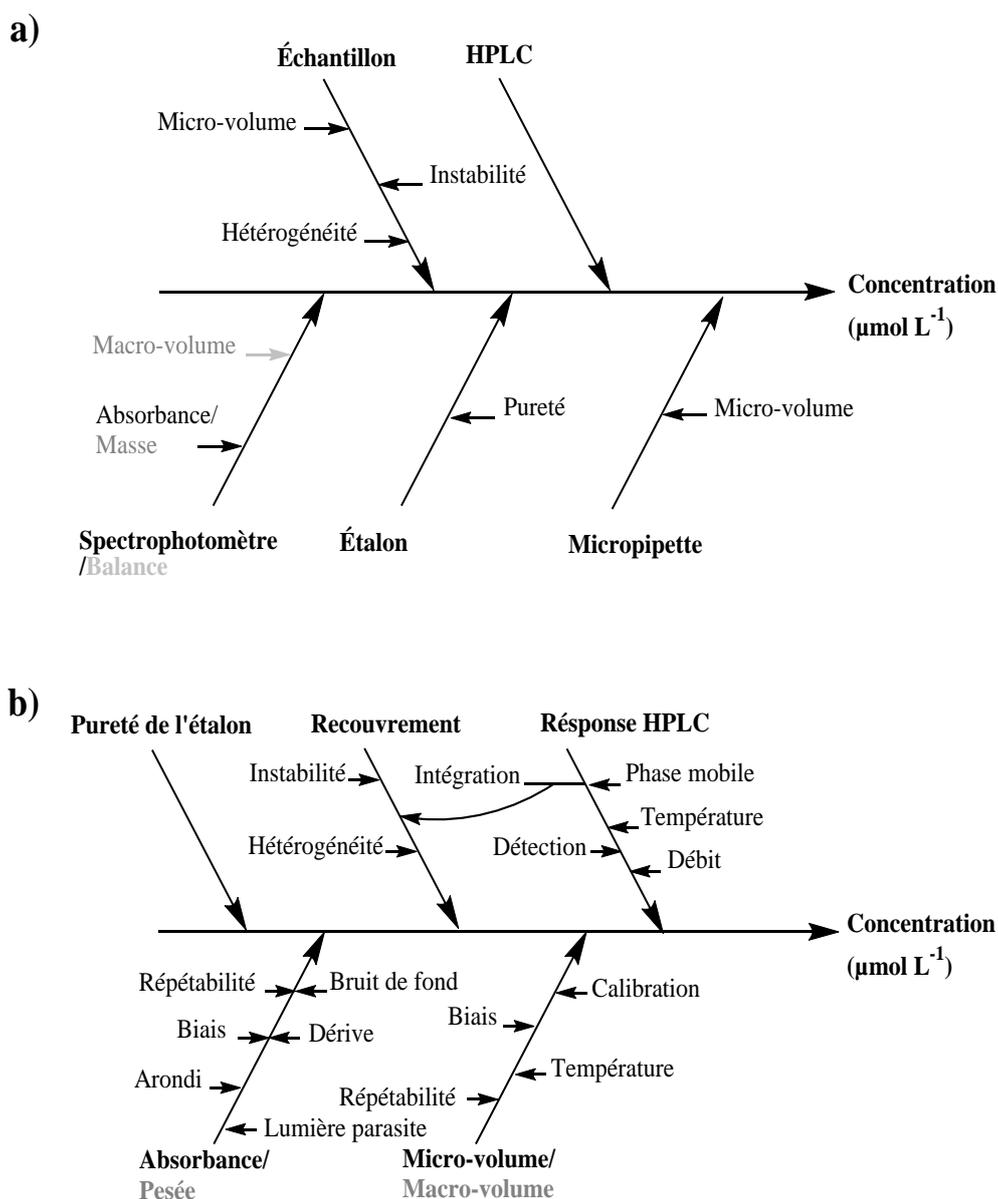


Fig. IV. 12. Facteurs d'influence sur le résultat de mesure : a) Principaux facteurs avec les sources d'erreur associées. b) Les mêmes effets réarrangés en tant que paramètres quantitatifs et montrant une deuxième rangée de sources d'erreur.

#### IV. 2. 4. 2. Estimation de l'incertitude combinée

L'incertitude de mesure a été évaluée à chaque niveau de validation en fonction des calculs antérieurs du profil d'exactitude, comme proposée par Feinberg [20] et conformément aux équations (II.14) et (III.17). L'incertitude combinée peut être donc exprimée, pour un plan de validation ( $I \times J$ ), par l'écart-type de l'intervalle de tolérance :

$$u_c(C_{spl}) = s_{IT} \quad (IV. 15)$$

Les estimations relatives des incertitudes combinées, correspondantes au modèle d'étalonnage à deux points sont regroupées dans le tableau (IV. 6). On constate que l'incertitude de mesure varie aléatoirement et se montre satisfaisante pour les deux analytes, dans les gammes de validation étudiées.

Tableau IV.6 : Incertitude de mesure obtenue par l'approche de validation pour le modèle d'étalonnage à deux niveaux de concentration.

	niveau	Vitamines	
		rétinol	tocopherol
Incertitude combinée relative	1	0.0423	0.0609
	2	0.0372	0.0399
	3	0.0223	0.0228
% Incertitude élargie (facteur d'élargissement)	1	11.76 (2.78)	14.07 (2.31)
	2	10.34 (2.78)	9.42 (2.36)
	3	7.09 (3.18)	5.38 (2.36)

#### IV. 2. 4. 3. Estimation de l'incertitude élargie

L'incertitude élargie a été calculée à chaque niveau de validation, en multipliant l'incertitude combinée par un facteur d'élargissement correspondant à un nombre de degrés de liberté effectif ( $v_{eff}$ ) selon l'équation (II.16) de Satterthwaite, utilisée dans le calcul du profil d'exactitude. La figure (IV.13) trace les valeurs de l'incertitude élargie relative en fonction de la concentration. La comparaison des profils d'incertitude correspondant aux différents modèles d'étalonnage montre qu'ils sont complètement confondus dans le cas de la vitamine E. Par contre, ils se distinguent nettement aux valeurs sensibles de la concentration, plus particulièrement au premier niveau dans le

cas de la vitamine A. On remarque, cependant, qu'à l'exception des droites d'étalonnage forcées à zéro, tous les autres modèles peuvent donner des résultats d'analyse avec une certitude considérable au premier niveau, désigné comme limite de quantification de la procédure analytique. Comme on peut observer aussi que la qualité des analyses s'améliore vers les concentrations élevées du domaine de validité.

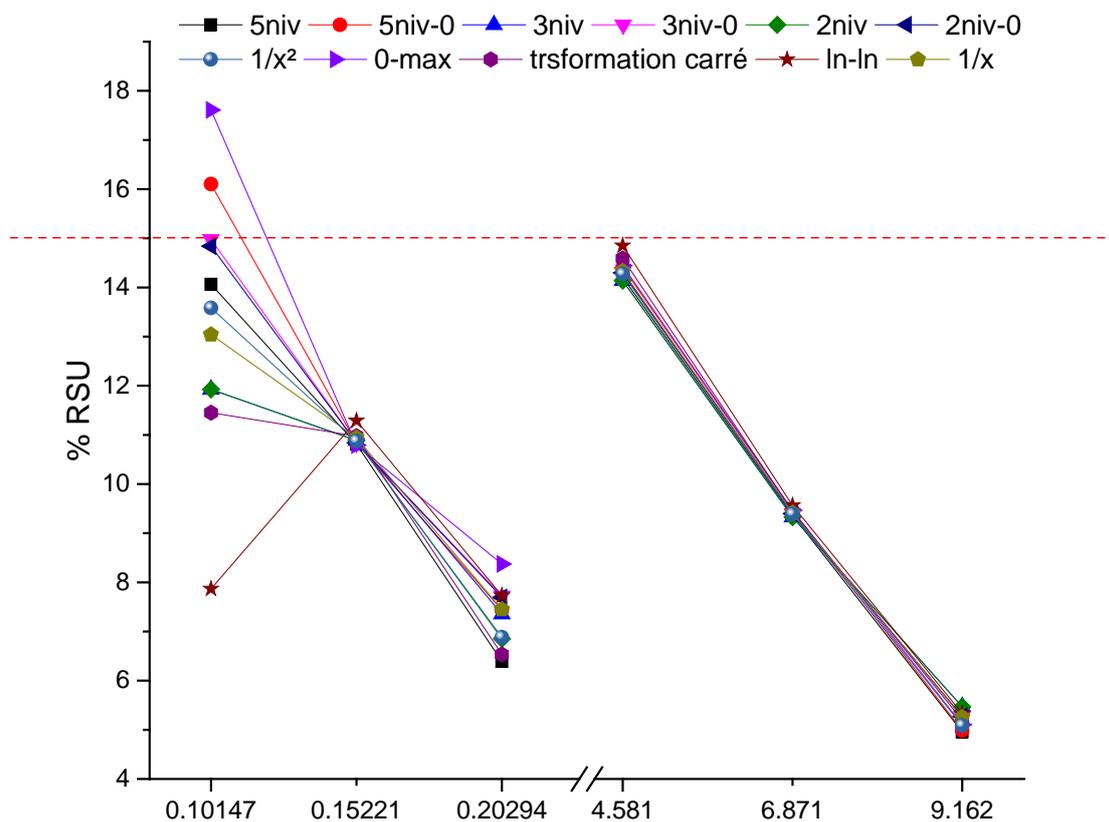


Fig. IV.13. Comparaison des profils d'incertitude obtenus des différents modèles d'étalonnage, pour le rétinol (gauche) et l'alpha-tocophérol (droite).

On peut constater, cependant, dans le tableau (IV.6) que la valeur maximale de l'incertitude élargie apparaît toujours au niveau bas et ne dépasse pas 15%,

#### IV. 2. 5. Estimation de l'incertitude en utilisant les données de charte de contrôle

En utilisant la même formule issue de l'écart-type de l'IT, on a évalué l'incertitude de mesure de la concentration des échantillons d'un même plasma (QC), utilisés pour contrôler l'applicabilité de la procédure analytique en routine. Le tableau (IV.7) reporte les résultats de cette estimation, qui a été effectuée sur les données de 21 essais réalisées

le long d'une période d'un mois, selon un plan établi en 7 séries (jours) et 3 répétitions par série.

Tableau IV.7 : Résultats du calcul de l'incertitude des mesures effectuées en routine par la procédure analytique sur des échantillons de contrôle.

	rétinol	tocophérol
Type d'échantillon	QC	QC
Nombre de Séries ( $I$ )	7	7
Nombre de répliques ( $J$ )	3	3
Concentration moyenne ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0.225	1.374
Répétabilité ( $s^2_r$ )	3.1e-05	0.0066
Précision entre jours ( $s^2_B$ )	6.0e-06	0.0511
précision intermédiaire ( $s^2_{IP}$ )	3.7e-05	0.0577
Ecart-type de l'IT ( $s_{IT}$ )	0.006	0.256
Nombre de degrés de liberté effectif ( $v_{eff}$ )	20	20
% Incertitude élargie (facteur d'élargissement)	5.574 (2.09)	37.19 (2.09)

Comme on le voit clairement, la concentration en rétinol est du même ordre que celle du niveau supérieur de la gamme de validation, ce qui confirme une qualité de résultat similaire au voisinage de ce même niveau, bien que la valeur de l'incertitude élargie diminue de deux unités, puisque, le facteur d'élargissement diminue aussi pour un nombre de degrés de liberté effectif aussi important. Par contre, la concentration d' $\alpha$ -tocophérol dans ces échantillons de contrôle sort du domaine de validité pour cet analyte. La teneur en  $\alpha$ -tocophérol est d'environ un tiers que celle de la limite de quantification inférieure adoptée, ce qui justifie probablement la valeur excessive de son incertitude étendue.

### IV. 3. Référence

1. M. A. Abahusain, J. Wright, J. W. T. Dickerson, M. A. El-Hazmi, H. Y. Aboul Enein, Determination of Retinol,  $\alpha$ -Tocopherol,  $\alpha$  - and  $\beta$  -Carotene by Direct Extraction of Human Serum Using High Performance Liquid Chromatography, John Wiley & Sons, *Biomed. Chromatogr*, 1998, 12, 89–93.
2. R. R. Eitenmiller, L. Ye, W. O. Landen Jr, Vitamin analysis for the health and food sciences, Second Edition (USA), Taylor & Francis Group, 2008, 10-132.
3. A. P. De Leenheer, W. E. Lambert, J. F. Van Bocxlaer (eds), Modern Chromatographic Analysis of Vitamins, third Edition, New York (USA), Marcel Dekker 2000, 16-156.
4. R. Andrioli, P. Manini, D. Poli, E. Bergamaschi, A. Mutti, W. M. A. Niessen, Development of a simplified method for the simultaneous determination of retinol,  $\alpha$ -tocopherol, and  $\beta$ -carotene in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization, Springer-Verlag, *Anal Bioanal chem*, 2003, 378, 987–994.
5. F. Lecomte, C. Hubert, S. Demarche, C. De Bleye, A. Dispas, M. Jost, F. Frankenne, A. Ceccato, E. Rozet, Ph. Hubert, Comparison of the quantitative performances and measurement uncertainty estimates obtained during method validation versus routine applications of a novel hydrophilic interaction chromatography method for the determination of cidofovir in human plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal*, 2012, 57, 153–165.
6. Ph. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat, E. Rozet, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: SFSTP proposal—Part II, *J. Pharm. Biomed. Anal*. 2007, 45, 70–81.
7. SAS: Guide pour la validation des méthodes d'essai chimico-physiques et l'évaluation de l'incertitude de mesure, Document N° 324.fw, Edition 2017, rév. 03.
8. T. E. Beesley, B. Buglio, R. P. W. Scott, Quantitative chromatographic analysis, New York (USA), Marcel Dekker, 2001, 141.
9. N. Dyson, Chromatographic Integration Methods, 2nd edition, Cambridge (UK), the Royal Society of Chemistry, 1998, 125.

10. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (FDA), Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics, Guidance for Industry, Pharmaceutical Quality/CMC, July 2015.
11. ICH Harmonized Tripartite Guideline, Validation of analytical procedures: Text and Methodology, Q2(R1) Step 4 version, 2005.
12. Serban C. Moldoveanu, Victor David, essentials in modern HPLC Separations, Elsevier, 2013, pp. 1–83.
13. R. Wyss, Chromatographic and electrophoretic analysis of biomedically important retinoids, *J. Chromatogr. B* 671 (1995) 381–425.
14. M. Thompson, S. L. R. Ellison, A. Fajgelj, P. Willetts and R. Wood, Harmonised guidelines for the use of recovery information in analytical measurement (Technical Report), *Pure Appl. Chem.*, 1999, 71, No. 2, 337–348.
15. M. Thompson, S. L. R. Ellison, A. Fajgel, P. Willetts, R. Wood, Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis, IUPAC- (Technical Report), *Pure Appl. Chem.*, 2002, 74, No. 5, 835–855.
16. B. Magnusson and U. Ornemark (eds.) Eurachem Guide: The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics, 2nd edition 2014. [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org).
17. Ph. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Cohen, P.-A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, L. Valat, E. Rozet, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: SFSTP proposal—Part III, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, 45, 82–96.
18. E. Rozet, S. Rudaz, R.D. Marini, E. Ziémons, B. Boulanger, Ph. Hubert, Models to estimate overall analytical measurements uncertainty: Assumptions, comparisons and applications, *Analytica Chimica Acta*, 2011, 702, 160–171.
19. ISO 5725-(1-5), Application of the statistics, accuracy (Trueness and Precision) of the results and methods of measurement—Part (1-5): General principles and definitions, International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland, 1994.
20. JCGM 100:2008, Evaluation of measurement data—Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM), 2008, <http://www.bipm.org>.
21. M. Feinberg, Validation des méthodes d'analyse quantitatives au moyen du profil d'exactitude, *Technique de l'ingénieur*, P224v2, 2012.

## **Chapitre V**

### **Estimation de l'incertitude de mesure par approche de modélisation**

## V.1. Construction du modèle mathématique et identification des sources d'incertitude

Comme nous l'avons vu au chapitre IV. L'étalonnage inverse du modèle linéaire, de la fonction de réponse adoptée pour la méthode analytique, permet de calculer les concentrations des analytes d'intérêt dans les échantillons d'essai dilués, selon l'équation (IV.6) :

$$C_{\text{spl}} = \frac{\Gamma_{\text{spl}} - b_0}{b_1}$$

Ce modèle issu d'un plan d'étalonnage multipoints, même lorsqu'il est utilisé pour estimer l'incertitude de mesure, au moyen de l'écart-type de l'équation d'étalonnage [1, 2] est de notre point de vue, inférieure pour satisfaire la méthodologie de l'approche modélisation pour l'estimation de l'incertitude. Puisqu'il masque la plupart des facteurs influençant le processus de mesure. Ceci, contrairement au modèle du plan d'étalonnage à un point de l'équation (V.1), qui peut établir un lien direct entre les facteurs influents (quantités d'entrées) et le résultat de mesure (quantité de sortie).

$$C_{\text{spl}} = C_{\text{std}} \times \frac{\Gamma_{\text{Spl}}}{\Gamma_{\text{Std}}} \quad (\text{V. 1})$$

Ce qui peut apporter des connaissances précieuses sur le processus analytique, pour permettre de réduire l'incertitude globale [3]. En améliorant les étapes de la méthode et dans le cas échéant, en effectuant des mesures correctives efficaces et rentables [4].

En effet, d'autres chercheurs, notamment, Leito *et al.* [5] ont déjà comparé l'estimation de l'incertitude de mesure dans le cas d'utilisation d'un plan à un point et d'un étalonnage à cinq points, afin d'estimer les limites d'utilisation de l'étalonnage à un point dans le contrôle de qualité pharmaceutique. Ils ont abouti par ce rapprochement à une estimation similaire de l'incertitude de mesure dans les deux cas. Par contre, cette évaluation a été réalisée en utilisant le logiciel GUM Workbench (Metrodata GmbH, Grenzach-Wyhlen, Allemagne), qui permet à son utilisateur, en effet, de définir n'importe quel modèle mathématique afin d'exécuter différents calculs de l'incertitude.

Considérant un modèle corrigé, correspondant au plan d'étalonnage à un point, obtenu après avoir effectué un total de  $n$  dilutions consécutives d'une solution étalon primaire.

La quantification de la concentration en analytes d'intérêt, peut être exprimée par l'équation suivante :

$$C_{\text{Spl}} = f_{\text{Abs/W}} \times P \times R \times \prod_{i=1}^n f_{(i)\text{dil}} \times \frac{\Gamma_{\text{Spl}}}{\Gamma_{\text{Std}}} \quad (\text{V.2})$$

Où :

$\Gamma_{\text{Spl}}, \Gamma_{\text{Std}}$  : Rapports des aires de l'analyte d'intérêt et de son étalon interne pour les échantillons et les étalons, respectivement,

P : Pureté de la substance étalon,

R : Facteur de recouvrement,

$f_{(i)\text{dil}} = V_{2i-1}/V_{2i}$  : Facteur correspondant à la  $i^{\text{ème}}$  dilution, c'est le rapport de deux volumes considérés consécutivement,

$f_{\text{Abs/W}}$  : Un terme lié à la détermination de la solution étalon primaire, il est égal à

$\frac{\text{Abs}}{\varepsilon \cdot l}$ , dans le cas d'une détermination spectrométrique ou  $\frac{m}{V}$  dans le cas où la préparation est accomplie par pesée.

Abs : Absorbance de la solution étalon primaire,

$\varepsilon$  : Coefficients d'absorption molaire : ( $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),

$l$  : longueur de la cuvette spectrométrique (cm),

$m$  : masse de substance étalon (g),

$V$  : Volume de la solution étalon primaire (L).

## V. 2. Estimation des composantes d'incertitude

Les composantes de l'incertitude ont été évaluées en calculant l'incertitude type. En utilisant à la fois l'analyse statistique (type A) et d'autres informations disponibles (type B). Comme nous pouvons le constater, les termes de l'équation (V.2) sont ceux, précisément, les paramètres qui apparaissent dans le diagramme d'identification de la figure (V.1). D'autre part, sachant que les dilutions successives de la solution étalon, nécessaires à l'établissement d'un plan d'étalonnage à un point, doivent être reproduites de manière comparable, pour réaliser un plan d'étalonnage multipoints.

Cependant, le modèle quantitatif reste à peu près le même si, en plus, le terme désignant l'étape chromatographique relative à l'étalon est remplacé par la valeur moyenne ( $\bar{\Gamma}_{std}$ ). Néanmoins, ce modèle est plus efficace qualitativement, pour détecter toutes les sources potentielles d'incertitudes, résultantes d'une préparation multipoints. Par conséquent, la divergence dans l'estimation de l'incertitude, d'un plan par rapport à un autre, peut être facilement compensée en comptant simplement dans la composante d'incertitude de dilution, les étapes supplémentaires de pipetage et qui sont nécessaires pour construire le plan d'étalonnage multipoints. Considérant, toutefois, que l'incertitude relative aux termes chromatographiques ne doit couvrir que les effets survenant au cours de l'exécution de l'instrument HPLC.

Ainsi, pour une concentration d'analyte d'intérêt déterminée dans un échantillon d'essai de plasma, en utilisant un étalonnage multipoint, basé sur une préparation spectrométrique. L'incertitude combinée peut être estimée en appliquant la loi de propagation de l'incertitude et en supposant qu'aucune corrélation n'existe entre les quantités d'entrée, de la façon suivante :

$$\frac{u_c(C_{spl})}{C_{spl}} = \sqrt{\left(\frac{u(Abs_{std})}{Abs_{std}}\right)^2 + \left(\frac{u(P_{std})}{P_{std}}\right)^2 + \left(\frac{u(R)}{R}\right)^2 + \sum_{j=1}^n \left(\frac{u(V_j)}{V_j}\right)^2 + \left(\frac{u(\bar{\Gamma}_{std})}{\bar{\Gamma}_{std}}\right)^2 + \left(\frac{u(\Gamma_{spl})}{\Gamma_{spl}}\right)^2} \quad (V.3)$$

Avec :  $(j = 2i)$

### V. 2. 1. L'incertitude relative aux essais spectrométrique

Les spécifications du spectromètre indiquent une stabilité inférieure à 0.0003 UA /h, un bruit crête à crête inférieur à 0.0002 UA et une valeur typique de 0.03% T pour la lumière parasite. La dernière valeur décimale de l'affichage numérique a également été prise en compte pour estimer la contribution de l'arrondi. Pour chacune de ces contributions, l'incertitude a été évaluée en utilisant une méthode type B et en supposant une distribution rectangulaire.

Ainsi, on trouve, respectivement, les incertitudes dues à la stabilité, au bruit de fond, à la lumière parasite et à l'arrondissement comme suit :

$$\frac{0.00015}{\sqrt{3}} = 8.660e - 5 \text{ UA/hr},$$

$$\frac{0.0001}{\sqrt{3}} = 1.155e - 4 \text{ UA},$$

$$\frac{0.00015}{\sqrt{3}} = 8.660e - 5 \text{ T}$$

$$\frac{0.0005}{\sqrt{3}} = 2.887e - 4 \text{ UA}$$

De même, le constructeur propose  $\pm 0.0013$  UA pour l'exactitude, nous avons supposé une distribution triangulaire. Ainsi, on trouve l'incertitude due à l'exactitude :

$$\frac{0.0013}{\sqrt{6}} = 5.307e - 4 \text{ UA}$$

De plus, des essais spectrométriques (6 réplifications) ont été effectués sur les premières solutions étalons alcools, exactement comme décrit au paragraphe (IV.1.3.2.1), aux longueurs d'onde spécifiques des deux molécules, donnant les absorbances moyennes et leurs écarts-types (SD) de 0.411 (1.47196e-3 UA) pour le rétinol et 0.741 (1.16905e-3 UA) pour l' $\alpha$ -tocophérol. Assumant une estimation de type A, l'incertitude dans ce cas est égale donc à l'écart-type, pour chaque série de données. Par conséquent, l'incertitude-type due à la mesure de l'absorbance a été estimée comme étant la racine carrée de la somme des carrés des incertitudes calculées ci-dessus et a donnée, pour le rétinol :

$$u(A)_{\text{Ret}} = 1.600e - 3 \text{ UA}$$

Et pour l' $\alpha$  - tocophérol :

$$u(A)_{\text{ToC}} = 1.327e - 3 \text{ UA}$$

## V. 2. 2. Incertitude due à la pureté des étalons

La pureté des étalons a été vérifiée chaque semaine et a été trouvée supérieure ou égale à 98%. En supposant ainsi une distribution rectangulaire, l'incertitude type due à la pureté des étalons était trouvée égale à :

$$u(P_{\text{Std}}) = \frac{0.01}{\sqrt{3}} = 0,0058$$

### V. 2. 3. Incertitude due au pipetage

Quatre composantes ont été considérées dans l'évaluation de l'incertitude liée aux différents volumes ( $V_x$ ) pipetés par la micropipette, où ( $x = 50, 100, 150$  ou  $200 \mu\text{L}$ ). L'incertitude sur le volume due à la précision  $u(V_{x\_rp})$ , l'incertitude due au biais  $u(V_{x\_b})$ , l'incertitude due à l'étalonnage  $u(V_{x\_cl})$  et l'incertitude due à la température  $u(V_{x\_Tp})$ . Pour chaque composante une estimation de type B a été supposée.

L'incertitude type sur les volumes prélevés a été ensuite calculée selon l'équation suivante :

$$u(V_x) = \sqrt{\left(u(V_{x\_rp})\right)^2 + \left(u(V_{x\_b})\right)^2 + \left(u(V_{x\_cl})\right)^2 + \left(u(V_{x\_Tp})\right)^2} \quad (\text{V. 4})$$

D'autre part, le fabricant suggère des coefficients de variation CV% égal à  $\pm 0.4, \pm 0.15$  pour la répétabilité et  $\pm 1, \pm 0,6$  pour le biais, respectivement, pour les volumes prélevés de  $50 \mu\text{L}$  et  $200 \mu\text{L}$ . Ce qui permet de trouver les paramètres correspondants suivants :

Les imprécisions  $0.4\%$  et  $0.15\%$  donnent les écarts-types de répétabilité pour les volumes de  $50 \mu\text{L}$  et  $200 \mu\text{L}$  comme suit :

$$\frac{0.4}{100} \times 50 = \pm 0.2 \mu\text{L}$$

Et

$$\frac{0.15}{100} \times 200 = \pm 0.3 \mu\text{L}$$

Par contre, les inexactitudes  $1\%$  et  $0.6\%$  donnent pour les mêmes volumes les biais suivants :

$$\frac{1}{100} \times 50 = \pm 0.5 \mu\text{L}$$

Et

$$\frac{0.6}{100} \times 200 = \pm 1.2 \mu\text{L}$$

Pour les autres prises  $V_x$  on considère l'incertitude du volume le plus proche. Ainsi, en supposant une distribution triangulaire, on trouve donc les valeurs suivantes :

$$u(V_{50\_rp}) = u(V_{100\_rp}) = \frac{0.2}{\sqrt{6}} = 0.0817 \mu\text{L},$$

$$u(V_{200\_rp}) = u(V_{150\_rp}) = \frac{0.3}{\sqrt{6}} = 0.1225 \mu\text{L},$$

$$u(V_{50\_b}) = u(V_{100\_b}) = \frac{0.5}{\sqrt{6}} = 0.2041 \mu\text{L},$$

$$u(V_{200\_b}) = u(V_{150\_b}) = \frac{1.2}{\sqrt{6}} = 0.4899 \mu\text{L}.$$

Aussi, les spécifications de l'instrument fournissent des indications ( $\pm$ ) sur la tolérance de la pipette pour différents volumes. Ces données ont été utilisées pour estimer l'incertitude de la calibration de la pipette. En supposant une distribution triangulaire, on trouve :

$$u(V_{50\_cl}) = \frac{0.8}{\sqrt{6}} = 0.3266 \mu\text{L},$$

$$u(V_{100\_cl}) = \frac{1.5}{\sqrt{6}} = 0.6124 \mu\text{L},$$

$$u(V_{200\_cl}) = u(V_{150\_cl}) = \frac{2}{\sqrt{6}} = 0.8165 \mu\text{L}$$

On note dans ce cas aussi qu'il n'y a pas d'indications sur l'incertitude pour le volume 150. On a pris donc l'incertitude du volume le plus proche et la valeur de l'écart-type le plus élevé.

Enfin, l'incertitude due à la température a été calculée pour tous les volumes réalisés, en utilisant l'équation suivante [6] :

$$u(V_{x\_Tp}) = \frac{V_x \cdot \Delta T \cdot \gamma}{\sqrt{3}} \quad (\text{V. 5})$$

Où :  $\Delta T$  représente la différence de température entre la valeur utilisée pour l'étalonnage de la pipette et la température du laboratoire  $\Delta T = |T - T_{\text{labo}}|$ .

Dans notre cas  $\Delta T = |25 - 22| = 3^\circ \text{C}$ ,

$\gamma$  : Coefficient de dilatation cubique du volume, pour les solvants organiques est  $\gamma = 10^{-3} \text{K}^{-1}$ .

On trouve alors :

$$u(V_{50_{Tp}}) = \frac{50 \times 3 \times 10^{-3}}{\sqrt{3}} = 0.0866 \mu\text{L},$$

$$u(V_{100_{Tp}}) = \frac{100 \times 3 \times 10^{-3}}{\sqrt{3}} = 0.7321 \mu\text{L},$$

$$u(V_{150_{Tp}}) = \frac{150 \times 3 \times 10^{-3}}{\sqrt{3}} = 0.2598 \mu\text{L},$$

$$u(V_{200_{Tp}}) = \frac{200 \times 3 \times 10^{-3}}{\sqrt{3}} = 0.3464 \mu\text{L}.$$

Par conséquent, pour les différentes prises, les incertitudes ont été calculées en utilisant l'équation (V.4), tel que :

$$u(V_{50}) = 0.4011 \mu\text{L},$$

$$u(V_{100}) = 0.6733 \mu\text{L},$$

$$u(V_{150}) = 0.9946 \mu\text{L},$$

$$u(V_{200}) = 1.0206 \mu\text{L}.$$

Ces estimations ont été combinées donc, pour calculer l'incertitude type des volumes manipulés selon les étapes de préparation des solutions étalons comme suit :

Un volume  $V_1$  a été prélevé de chaque solution étalon deux fois 200  $\mu\text{L}$  pour le rétinol et trois fois 200  $\mu\text{L}$  pour l' $\alpha$ -tocophérol. Ces prises ont été combinées pour atteindre un volume  $V_2 = 1 \text{ mL}$  de la solution étalon mixte, ainsi :

$$u(V_2) = \sqrt{5u(V_{200})^2} = 2.2822 \mu\text{L}$$

Un volume  $V_3$  de la solution étalon mixte a été combiné avec un volume complémentaire du mélange de solvants pour préparer le volume  $V_4 = 300 \mu\text{L}$  de la solution étalon intermédiaire, dans ce cas on calcul différentes contributions de cette préparation en fonction du niveau de concentration, on trouve donc :

Pour le niveau 1 :  $V_4 = V_{50} + V_{50} + V_{200}$

$$\begin{aligned} u(V_4)_{\text{level 1}} &= \sqrt{2 \times (uV_{50})^2 + (uV_{200})^2} \\ &= \sqrt{2 \cdot (0.4011)^2 + (1.0206)^2} = 1.1677 \mu\text{L}. \end{aligned}$$

Pour le niveau 2 :  $V_4 = V_{100} + V_{200}$

$$\begin{aligned} u(V_4)_{\text{level 2}} &= \sqrt{(uV_{100})^2 + (uV_{200})^2} \\ &= \sqrt{(0.6733)^2 + (1.0206)^2} \\ &= 1.2227 \mu\text{L}. \end{aligned}$$

Pour le niveau 3 :  $V_4 = V_{150} + V_{150}$

$$\begin{aligned} u(V_4)_{\text{level 3}} &= \sqrt{2 \times (uV_{150})^2} \\ &= \sqrt{2 \cdot (0.9946)^2} = 1.4065 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Pour le niveau 4 :  $V_4 = V_{200} + V_{100}$

$$\begin{aligned} u(V_4)_{\text{level 4}} &= \sqrt{(uV_{200})^2 + (uV_{100})^2} \\ &= \sqrt{(1.0206)^2 + (0.6733)^2} \\ &= 1.2227 \mu\text{L}. \end{aligned}$$

Pour le niveau 5 :  $V_4 = V_{200} + V_{50} + V_{50}$

$$u(V_4)_{\text{level 5}} = \sqrt{(uV_{200})^2 + 2 \times (uV_{50})^2}$$

$$= \sqrt{(1.0206)^2 + 2 \cdot (0.4011)^2} = 1.1677 \mu\text{L}.$$

Puisque ces prélèvements ont été effectivement effectués, l'incertitude type correspondante à  $V_4$  est égale alors à la racine carrée de la somme des carrés de toutes les incertitudes liées à ces réalisations, de ce fait :

$$\begin{aligned} u(V_4) &= \sqrt{(u(V_4)_{\text{level } 1})^2 + (u(V_4)_{\text{level } 2})^2 + (u(V_4)_{\text{level } 3})^2 + (u(V_4)_{\text{level } 4})^2 + (u(V_4)_{\text{level } 5})^2} \\ &= \sqrt{4 \times (uV_{50})^2 + 2 \times (uV_{100})^2 + 2 \times (uV_{150})^2 + 4 \times (uV_{200})^2} \\ &= \sqrt{4 \times (0.4011)^2 + 2 \times (0.6733)^2 + 2 \times (0.9946)^2 + 4 \times (1.0206)^2} \\ &= 2.75881 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Enfin, pour préparer la solution étalon de travail, un volume constant  $V_5 = 50 \mu\text{L}$  de chaque solution intermédiaire et une même prise de la solution étalon interne et  $150 \mu\text{L}$  du mélange de solvants ont été combinés, pour obtenir un volume final  $V_6 = 250 \mu\text{L}$ . Cette composition a été réalisée deux fois, de façon indépendante, pour les niveaux d'étalonnage impairs et une fois pour les niveaux pairs. De ce fait, la contribution à l'incertitude pour cette étape devient alors :

$$\begin{aligned} u(V_6) &= \sqrt{16 \times (uV_{50})^2 + 8 \times (uV_{150})^2} \\ &= \sqrt{16 \times (0.4011)^2 + 8 \times (0.9946)^2} = 2.8046 \mu\text{L}. \\ &= 3.24342 \mu\text{L}. \end{aligned}$$

#### V. 2. 4. Incertitude issue du taux de recouvrement

L'incertitude provenant du taux de recouvrement a été évaluée à trois niveaux de concentration, afin de couvrir les étapes de traitement des échantillons d'essai des deux analytes d'intérêt. En supposant une évaluation de type A, la contribution du taux de recouvrement a été estimée par l'écart-type d'une population de données dérivée de neuf injections répétées ( $SD_{rcp}$ ). En plus, pour une pratique plus rigoureuse, une contribution de la quantité native ( $S_{\text{nat}}$ ) de l'analyte d'intérêt a été prise en

considération. Cette estimation a été réalisée sur les échantillons de plasma ordinaire, la contribution de cette composante est donnée donc par la relation suivante [7] :

$$u(R) = \sqrt{SD_{rcp}^2 + S_{nat}^2} \quad (V.6)$$

Le tableau (V.1) résume les résultats de ces estimations et montre que l'incertitude du taux de recouvrement s'améliore avec l'augmentation de la concentration.

Tableau V.1 : Résultats de l'évaluation de la contribution de la récupération sur l'incertitude de mesure.

Analyte	niveau	$S_{nat}^2$	$SD_{rcp}^2$	u(R)
Rétinol	1	0.00057	0.03515	0.04251
	2	0.00057	0.03076	0.03897
	3	0.00057	0.01815	0.03002
Tocophérol	1	0.000137	0.05471	0.05595
	2	0.000137	0.03763	0.03941
	3	0.000137	0.02124	0.02426

### V. 2. 5. Incertitude associée aux paramètres chromatographiques

L'évaluation de la contribution associée aux paramètres chromatographiques nécessite beaucoup de prudence, lors de l'utilisation de la variabilité de réponse de l'instrument. Les propositions les plus étudiées suggèrent d'injecter plusieurs fois la même solution [8], sans pour autant garantir que l'environnement ambiant n'affectera pas ces expériences répétées. Alors que la variabilité de la réponse, lorsqu'elle est utilisée pour représenter uniquement les influences des paramètres chromatographiques, doit être indépendante de toutes les étapes analytiques précédentes. Sinon, il y a un risque très élevé de surestimer les contributions associées à ces paramètres.

Le rapport des aires dans le modèle mathématique de l'équation (V.2) est le terme qui doit représenter les paramètres influents pendant l'étape chromatographique seulement. Ceci exclut l'utilisation de sa variabilité en tant que telle, pour ne pas recompter les contributions déjà estimées, puisque cette quantité représente le résultat final de toutes les étapes précédentes de la procédure analytique.

Par contre, les sources d'incertitude dérivant des paramètres chromatographiques ont déjà été énumérées par Barwick et *al.* [9]. Où les principaux effets chromatographiques sur la précision de l'aire du pic sont la détection (Det), le débit de la phase mobile (F), la composition de la phase mobile ( $mbl_{\phi}$ ), la température de la colonne, la dérive de la ligne de base (BI\_dft), le bruit de fond de la ligne de base (BI\_ns) et l'intégration du système. La figure (V.1a) illustre les sources d'incertitude associées à ces paramètres.

Dans ce contexte, l'évaluation des effets des facteurs identifiés sur la conduite des tests HPLC-UV a été élaborée sur l'élution des quatre vitamines manipulées au cours des étapes de la procédure analytique (rétinol, acétate de rétinol, tocophérol et acétate de tocophérol). En utilisant à la fois les estimations de type A et de type B, en tenant compte des informations sur les spécifications et les données des essais répétés disponibles. En utilisant les informations apportées par le fabricant, les contributions de la détection et du débit ont été évaluées selon une méthode de type B.

De plus, la répétabilité du temps de rétention ( $t_R$ ) a été calculée pour couvrir la contribution des autres facteurs à l'incertitude de mesure, en supposant ainsi une estimation de type A. En effet, le temps de rétention est une grandeur qualitative indépendante des étapes antérieures de la méthode analytique. Par contre, sa répétabilité permet de caractériser les performances globales du système HPLC, où l'écart type relatif recommandé doit être inférieur à 3% [10].

Cette variation, de notre point de vue, est un outil important pour estimer les influences des paramètres chromatographiques lors des essais HPLC. Puisqu'elle dépend, encore une fois, du débit de la phase mobile, de la composition de la phase mobile, de l'intégration du système et des changements de température de la colonne au cours des essais chromatographiques [9]. En outre, l'opération du mode après-analyse du logiciel permet de générer des données indépendantes à partir des chromatogrammes existants, pour utiliser adéquatement la variabilité de l'air des pics, afin de vérifier l'effet de la ligne de base sur l'intégration et évaluer l'apport de ce facteur. En effet, bien qu'il soit dans sa forme appropriée, le bruit de la ligne de base rend souvent difficile l'identification du début et la fin des pics, comme il est habituellement rencontré dans le cas de pics d'analytes à faibles teneurs.

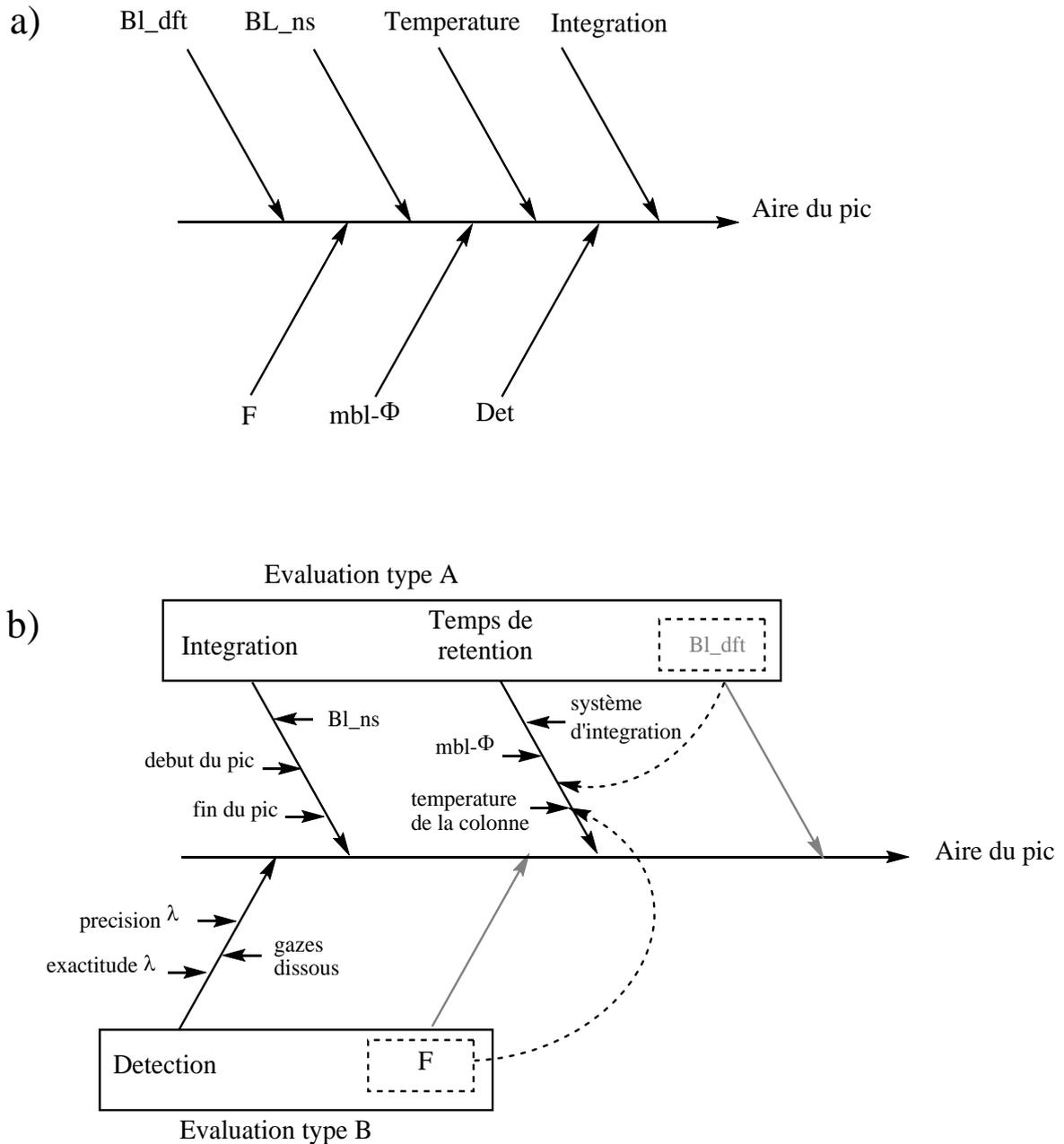


Fig. V.1. Sources d'incertitude identifiées au cours des essais chromatographiques : a) les principaux facteurs d'influence. b) les mêmes facteurs réarrangés selon le type d'estimation de l'incertitude.

Cependant, la dérive de la ligne de base avait un effet négligeable, puisque les expériences ont été effectuées pendant un court intervalle de temps [5]. Toutes ces influences ont été réarrangées selon leur type d'estimation, comme illustré par le diagramme d'Ishikawa de la figure (V.1b).

### V. 2. 5. 1. Effet de Détection

Les erreurs de détection dans les techniques HPLC couplées à des détecteurs UV-visibles peuvent découler de la précision de la longueur d'onde [11] et des gaz dissous dans la phase mobile [12]. Il n'y a aucune information sur les gaz dissous, cependant, leur présence dans la phase mobile augmente l'influence de la dérive. Par conséquent, cet effet est compté dans la contribution de la ligne de base. D'autre part, les spécifications du fabricant garantissent une longueur d'onde fonctionnante avec  $\pm 0.1$  et  $\pm 1$  nm, pour la précision et l'exactitude, respectivement. Nous considérons donc une évaluation de type B, et nous assumons pour cette information une distribution triangulaire, tel que :

$$s(\lambda)_{\text{précision}} = \frac{0.1}{\sqrt{6}} = 0.0408 \text{ nm}$$

$$s(\lambda)_{\text{exactitude}} = \frac{1}{\sqrt{6}} 0.4082 \text{ nm}$$

L'incertitude type pour la détection est calculée ainsi :

$$u(\text{Det}) = u(\lambda) = \sqrt{(0.0408)^2 + (0.4082)^2} = 0.4102 \text{ nm}$$

L'incertitude type relative de ce paramètre devient pour chaque composé comme suit :

$$\left(\frac{u(\lambda)}{\lambda}\right)_{\text{Rétinol}} = \frac{0.41024}{325} = 1.2623 \times 10^{-3}$$

$$\left(\frac{u(\lambda)}{\lambda}\right)_{\text{Acét_rét}} = \frac{0.41024}{325} = 1.2623 \times 10^{-3}$$

$$\left(\frac{u(\lambda)}{\lambda}\right)_{\text{Tocophérol}} = \frac{0.41024}{292} = 1.4049 \times 10^{-3}$$

$$\left(\frac{u(\lambda)}{\lambda}\right)_{\text{Acét_toc}} = \frac{0.41029}{292} = 1.4049 \times 10^{-3}$$

### V. 2. 5. 2. Effet du débit de la phase mobile

Selon les spécifications de l'instrument, qui indiquent une précision de  $\pm 0.3\%$  et une exactitude de  $\pm 2\%$  sur le débit, on utilise donc une méthode type B pour estimer l'apport à l'incertitude du débit de la phase mobile. En assumant une distribution triangulaire, on trouve :

$$s(F)_{\text{précision}} = \frac{0.003}{\sqrt{6}} = 1,225 \times 10^{-3} \text{ mL. min}^{-1}$$

$$s(F)_{\text{exactitude}} = \frac{0.02}{\sqrt{6}} = 8.165 \times 10^{-3} \text{ mL. min}^{-1}$$

L'incertitude-type du débit de la phase mobile est alors :

$$u(F) = \sqrt{(1,225 \times 10^{-3})^2 + (8.165 \times 10^{-3})^2} = 8.2564 \times 10^{-3} \text{ mL. min}^{-1}$$

Par conséquent, l'incertitude-type relative pour tous les composés devient ainsi :

$$\frac{u(F)}{F} = \frac{8.2564 \times 10^{-3}}{2} = 4.1282 \times 10^{-3}$$

### V. 2. 5. 3. Effet de bruit de la ligne de base

La stabilité de l'instrument est essentielle avant chaque analyse. On peut à cet effet, réaliser le test du bruit de la ligne de base et vérifier qu'il est toujours limitrophe du seuil ( $50 \mu\text{V}$ ), comme proposé, par exemple, par défaut par le fabricant. Cependant, malgré les valeurs minimales enregistrées de ce paramètre au cours des essais expérimentaux, son influence a été évaluée compte tenu des faibles concentrations prospectées des analytes étudiés dans les échantillons. Effectivement, l'effet du bruit de la ligne de base peut refléter l'imprécision de l'intégration des pics [13]. Cette évaluation peut être effectuée en utilisant les deux méthodes d'estimation de l'incertitude. D'une part, les spécifications du fabricant tolèrent un niveau maximal de bruit de fond égal à  $\pm 0.5 \times 10^{-5}$  AU, on peut envisager donc une estimation de type B et en assumant une distribution triangulaire, on trouve :

$$\frac{0.00005}{\sqrt{6}} = 2.0412 \times 10^{-5} \frac{\text{UA}}{\text{hr}}$$

D'autre part, on peut envisager aussi une estimation de type A, en amenant le logiciel à détecter aléatoirement le début et la fin des pics dans les chromatogrammes des étalons et ceux des échantillons. Cette évaluation a été réalisée, en exécutant, pour une même configuration du système, une intégration automatique initialisée plusieurs fois par rapport aux étalons. Le tableau (V.2) rapporte les résultats de cette évaluation que nous avons précédemment publiés sur des données déduites de six réalisations, des quantités d'aires relatives aux concentrations des solutions étalons,  $0.1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $0.3 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $4.5 \mu\text{mol L}^{-1}$  et  $15.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivement, pour le rétinol, l'acétate de rétinol, le tocophérol et l'acétate de tocophérol. Ainsi que les quantités trouvées dans l'échantillon de plasma humain de  $0.16 \mu\text{mol L}^{-1}$  de rétinol et  $1.0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de tocophérol [14]. Il faut noter, cependant, que dans tous les cas les pics doivent être inspectés visuellement pour une éventuelle intervention manuelle, afin de corriger les intégrations erronées dues à cette automatisation. Ceci par ce que le logiciel peut conduire à une mauvaise intégration, en particulier pour les pics d'analytes à faible concentration.

Tableau V.2 : Estimation de la variabilité de l'aire du pic à partir de données générées aléatoirement par le logiciel

		Vitamines A		Vitamines E	
		rétinol	retinyl	tocopherol	tocopheryl
étalon	moyenne	6426	17844	15227	15424
	$S_{\text{std}}$	115	191	424	508
	RSD%	1.783	1.072	2.787	3.296
échantillon	moyenne	12084	17871	3424	16840
	$S_{\text{spl}}$	436	498	159	491
	RSD%	3.607	2.789	4.641	2.917

Comme nous pouvons le voir, la variabilité de l'aire du pic peut atteindre jusqu'à 5% et indique que la contribution à l'incertitude de l'effet de la ligne de base est considérable dans la mesure de l'aire du pic. En effet, les fluctuations du bruit de la ligne de base rendent difficile l'identification du début et la fin des pics, ce qui affecte la mesure de l'aire, en particulier pour les analytes de faibles teneurs. Alors que des fluctuations excessives de la ligne de base conduisent certainement à la perte de l'aire du pic à sa partie la plus large [13]. Ceci est nettement observé pour les étalons dans le cas les

composés de la vitamine E, qui sont élués en dernier et dont les pics sont plus larges à leurs bases, en raison du mode d'éluion isocratique. Toutefois, cet effet doit être compté dans la contribution du taux de recouvrement, car il dépend de la teneur de l'analyte, bien que les variations du tableau (V.2) apparaissent plus au moins homogènes, pour les quantités d'aires qui ne sont pas très différentes.

#### V. 2. 5. 4. Variabilité du temps de rétention

Le tableau (V.3) donne la variabilité du temps de rétention après l'exécution de dix-sept essais HPLC, en injectant huit solutions étalons et neuf échantillons traités de plasma. L'estimation de cette contribution a été réalisée pour chaque composé, selon une méthode de type A. Comme on peut le voir, le pourcentage de l'écart-type relatif (%RSD) ne dépasse pas 1%, valeur estimée en utilisant la variation des facteurs chromatographiques rapportée en [9]. Cependant, on constate que cette variabilité est importante d'environ deux à trois fois, dans le cas des composés élués en derniers, si on compare les deux groupes d'analytes. Cet effet est probablement dû à l'élargissement de leurs pics. Par contre, il atteste une influence insignifiante pendant une durée d'analyse d'environ 10 minutes pour un mode d'éluion isocratique.

Tableau V.3 : Évaluation de la contribution du temps de rétention à partir de la variabilité des essais instrumentale HPLC-UV sur les étalons et les échantillons

		Vitamines A		Vitamines E	
		rétinol	retinyl	tocopherol	tocopheryl
étalons	Moyenne (min)	2.452	3.005	7.742	9.829
	$s \times (10^{-2})$	0.1235	0.2038	0.9989	1.3584
	%RSD	0.0504	0.0678	0.1290	0.1382
	%RSD (groupe)		0.0845		0.1891
échantillons	Moyenne (min)	2.465	3.020	7.740	9.830
	$s \times (10^{-2})$	0.1376	0.1748	1.3538	1.6469
	RSD%	0.0558	0.0579	0.1749	0.1675
	%RSD (groupe)		0.0804		0.2422

De plus, les différences, même légères, dans les valeurs des écarts-types entre les solutions étalons (milieu organique) et les solutions d'échantillons de plasma (milieu aqueux), indiquent bien un comportement différent de la colonne vis-à-vis de ces deux différents fluides injectés, et qu'on va vérifier son influence dans le paragraphe qui va suivre. Toutefois, ce faible changement dans le temps de rétention reflète beaucoup plus la stabilité du système lors des essais HPLC et atteste que l'influence des paramètres chromatographiques couverts par cette contribution reste insignifiante. Par conséquent, la variation du temps de rétention satisfait largement ce qui est couramment indiqué pour les systèmes chromatographiques modernes, avec une précision typique d'environ 0.07% pour le débit et de moins de 0.15% RSD% pour la composition en phase mobile [15].

### V. 2. 5. 5. Effet de la dérive de la ligne de base

La dérive de la ligne de base provoque des erreurs de précision sur la mesure de l'aire du pic quand elle n'est pas constante au cours d'une série d'analyses, ainsi que des inexactitudes dans la mesure de l'intégration du pic même si elle est répétable [13]. Cette dérive peut être d'origine électronique, sa vérification est réalisée simultanément avec celle du bruit de fond de la ligne de base avant chaque série d'analyse. On inspecte dans ce cas que sa valeur est au voisinage du seuil de (5000  $\mu$ V) proposée par défaut par le fabricant. En addition, l'évaluation de son effet a été effectuée en utilisant une méthode d'estimation de type B. D'après les spécifications de l'instrument, on admet une dérive maximale de la ligne de base égale à  $3 \times 10^{-4}$  UA/hr, en assumant une distribution rectangulaire, on trouve :

$$\frac{0.0003}{2 \times \sqrt{3}} = 8.66 \times 10^{-5} \text{ UA/hr.}$$

On remarque que cette contribution est effectivement négligeable, pour cette courte durée d'analyse comme c'est bien indiqué par Leito et *al* [5].

D'autre part, on observe une inclinaison très apparente, principalement dans les chromatogrammes des échantillons. En effet, la figure (IV.6) montre une traine négative qui est due à l'élution rapide des composés polaires du milieu aqueux du plasma. Ce qui caractérise en fait un inconvénient de ce milieu complexe lorsqu'il est injecté directement. Cependant, l'absence de cette dérive dans les chromatogrammes

des solutions étalons, malgré la masse du front des solvants organiques purs de préparation, prouve qu'elle n'est pas d'origine électronique, mais qu'elle explique plutôt cette posture différente de la colonne analytique, par rapport aux deux fluides injectés.

Cette dérive révèle donc une erreur systématique persistante, lors de l'injection directe du fluide biologique. Son importance peut être évaluée statistiquement, en se basant sur les données du tableau (V.3), en comparant la déviation sur le temps de rétention ( $\delta_{t_R}$ ) au double de l'incertitude type de ce biais  $u(\delta_{t_R})$  [16]. Si cette dérive est significative alors elle vérifie l'inégalité suivante :

$$\delta_{t_R} = |\bar{t}_R(\text{spl}) - \bar{t}_R(\text{std})| > 2 \times u(\delta_{t_R}) \quad (\text{V.7})$$

Avec :

$$u(\delta_{t_R}) = \sqrt{\frac{S_{\text{spl}}^2}{n_{\text{spl}}} + u^2(\bar{t}_R(\text{std}))} \quad (\text{V.8})$$

Où :

$\bar{t}_R(\text{spl})$  : Temps de rétention moyen de l'analyte d'intérêt dans les chromatogrammes des échantillons,

$\bar{t}_R(\text{std})$  : Temps de rétention moyen de l'analyte d'intérêt dans les chromatogrammes des étalons, assumé comme valeur de référence,

$S_{\text{spl}}$  : L'écart-type du temps de rétention correspondant aux injections des échantillons.

$n_{\text{spl}}$  : Nombre des échantillons injectés.

Le chiffre 2 dans l'équation (V.7) réfère à un facteur de couverture qui est pris par défaut. Pour conserver un aspect d'interprétation homogène, le long de ce manuscrit, la valeur 2 a été remplacée par le facteur ( $k = t_{(v, 95\%)}$ ) pris du tableau de (Student) et qui correspond à un nombre de degrés de liberté  $v$  pour un niveau de confiance de 95%. Soit pour une série d'injection de neuf échantillons,  $k$  est égal à 2.31. D'autre part, l'estimation de la contribution d'incertitude due à cet effet a été réalisée, en calculant tout d'abord l'écart-type commun ( $S_c$ ) selon l'équation (V.9) [17], puis en le combinant avec les incertitudes-types des moyennes des temps de rétention.

$$S_c = \sqrt{\frac{(n_{std} - 1)S_{std}^2 + (n_{spl} - 1)S_{spl}^2}{n_{std} + n_{spl} - 2}} \quad (V. 9)$$

En plus, on introduit dans cette estimation la valeur du biais, étant donné que cette déviation ne peut pas être corrigée. À cette fin, le calcul de la contribution à l'incertitude de cet effet peut être effectué en prenant en compte la procédure de Lira et Wöger [18], recommandée dans [16] selon l'équation suivante :

$$\frac{u(BI_{dft})}{BI_{dft}} = \sqrt{\left(\frac{1}{\bar{t}_{R_{spl}}}\right)^2 \left( S_c^2 + \frac{S_{spl}^2}{n_{spl}} + (\delta_{t_R})^2 + u^2(\bar{t}_R(std)) \right)} \quad (V. 10)$$

$u(\bar{t}_R(std)) = \frac{S_{std}}{\sqrt{n_{std}}}$  : Incertitude type de la moyenne du temps de rétention de l'analyte d'intérêt dans les chromatogrammes des étalons, où ( $n_{std}$ ) est le nombre des étalons injectés et ( $S_{std}$ ) est l'écart-type du temps de rétention correspondant aux injections des étalons.

Tableau V.4 : Résultats de l'évaluation de l'effet de la dérive observée sur les chromatogrammes des échantillons.

	Vitamines A		Vitamines E	
	rétinol	retinyl	tocopherol	tocopheryl
$S_c$	0.00131	0.00189	0.01201	0.01519
% $u(t_R(std))$	0.0437	0.0720	0.3532	0.4803
% $\delta_{t_R}$	1.2502	1.4789	0.1346	0.1642
% $u(\delta_{t_R})$	0.0633	0.0926	0.5730	0.7294
%RSD ( $BI_{dft}$ )	0.5128	0.4986	0.2108	0.2153

Comme nous pouvons le constater, les résultats du tableau (V.4) montrent que ce biais est non significatif dans le cas des composés vitamine E, puisque leurs pics émergent sur une ligne horizontale. Contrairement à ceux des composés vitamine A, où leurs pics sont les plus exposés à cette traîne, comme l'indiquent les figures (IV. 6d-e). Cependant, la contribution à l'incertitude de cette dérive apparaît plutôt faible, avec une

valeur maximale de l'ordre 0.5%, enregistrée toujours pour le compte des composés vitamine A.

Finalement, les contributions des paramètres chromatographiques proportionnels et indépendants de la réponse de l'instrument sont rangées et combinées, pour déterminer l'incertitude de mesure [19]. Par conséquent, pour n'importe quel type d'analyte, l'incertitude relative de l'aire du pic peut être calculée selon l'équation suivante :

$$\frac{u(A_x)}{A_x} = \sqrt{\left(\frac{u(F)}{A}\right)^2 + \left(\frac{u(t_R)}{A}\right)^2 + \left(\frac{u(\text{Det})}{\text{Det}}\right)^2 + \left(\frac{u(\text{Bl}_{\text{ns}})}{\text{Bl}_{\text{ns}}}\right)^2 + \left(\frac{u(\text{Bl}_{\text{dft}})}{\text{Bl}_{\text{dft}}}\right)^2} \quad (\text{V. 11})$$

Compte tenu des considérations citées auparavant, sur l'influence de l'étape chromatographique et de son indépendance par rapport à la teneur de l'analyte, la contribution des étalons durant les tests chromatographiques est estimée comme si nous avons injecté  $n$  fois la solution d'un même niveau de concentration, nous pouvons écrire ainsi :

$$(u(\bar{\Gamma}_{\text{std}}))^2 = \frac{1}{n} (u(\Gamma_{i(\text{std})}))^2 \quad (\text{V. 12})$$

Et

$$\left(\frac{u(\bar{\Gamma}_{\text{std}})}{\bar{\Gamma}_{\text{std}}}\right)^2 = \left(\frac{u(\Gamma_{(\text{std})})}{\Gamma_{(\text{std})}}\right)^2 \quad (\text{V. 13})$$

Puis que

$$\Gamma_{(\text{std})} = \frac{A_{(\text{std})}}{A_{IS(\text{std})}}$$

On peut écrire donc,

$$\left. \begin{aligned} \left(\frac{u(\bar{\Gamma}_{\text{std}})}{\bar{\Gamma}_{\text{std}}}\right)^2 &= \left(\frac{u(A_{(\text{std})})}{A_{(\text{std})}}\right)^2 + \left(\frac{u(A_{IS(\text{std})})}{A_{IS(\text{std})}}\right)^2 \\ \left(\frac{u(\bar{\Gamma}_{\text{spl}})}{\bar{\Gamma}_{\text{spl}}}\right)^2 &= \left(\frac{u(A_{(\text{spl})})}{A_{(\text{spl})}}\right)^2 + \left(\frac{u(A_{IS(\text{spl})})}{A_{IS(\text{spl})}}\right)^2 \end{aligned} \right\} \quad (\text{V. 14})$$

Ce qui donne finalement :

$$\left. \begin{aligned}
 \frac{u(\bar{\Gamma}_{std})}{\bar{\Gamma}_{std}} = & \sqrt{2 \times \left(\frac{u(Det)}{Det}\right)^2 + \left(\frac{u(F)}{A}\right)_{std}^2 + \left(\frac{u(F)}{A}\right)_{IS(std)}^2 + \left(\frac{u(Bl_{ns})}{Bl_{ns}}\right)_{std}^2} \\
 & + \left(\frac{u(Bl_{ns})}{Bl_{ns}}\right)_{IS(std)}^2 + \left(\frac{u(Bl_{dft})}{Bl_{dft}}\right)_{std}^2 + \left(\frac{u(Bl_{dft})}{Bl_{dft}}\right)_{IS(std)}^2 \\
 & + \left(\frac{u(t_R)}{A}\right)_{std}^2 + \left(\frac{u(t_R)}{A}\right)_{IS(std)}^2
 \end{aligned} \right\} \text{et} \quad (V.15)$$

$$\left. \begin{aligned}
 \frac{u(\Gamma_{spl})}{\Gamma_{spl}} = & \sqrt{2 \times \left(\frac{u(Det)}{Det}\right)^2 + \left(\frac{u(F)}{A}\right)_{spl}^2 + \left(\frac{u(F)}{A}\right)_{IS(spl)}^2 + \left(\frac{u(Bl_{ns})}{Bl_{ns}}\right)_{spl}^2} \\
 & + \left(\frac{u(Bl_{ns})}{Bl_{ns}}\right)_{IS(spl)}^2 + \left(\frac{u(Bl_{dft})}{Bl_{dft}}\right)_{spl}^2 + \left(\frac{u(Bl_{dft})}{Bl_{dft}}\right)_{IS(spl)}^2 \\
 & + \left(\frac{u(t_R)}{A}\right)_{spl}^2 + \left(\frac{u(t_R)}{A}\right)_{IS(spl)}^2
 \end{aligned} \right\}$$

La figure (V.2) illustre la contribution de l'incertitude des paramètres chromatographiques recensés, pendant les essais HPLC-UV et compare les amplitudes de ces composantes en termes d'incertitude relative. On voit bien que l'effet de la ligne de base représente la contribution majeure de l'étape chromatographique, lorsqu'on étudie cette étape à titre qualitatif, indépendamment de la procédure analytique. Par contre, on veille à ne pas recompter cet effet lors de l'estimation du budget globale de l'incertitude. De ce fait, l'incertitude de la phase chromatographique s'entrevient partagée entre les autres composantes identifiées, avec un léger avantage de l'effet de la dérive de la ligne de base dans le cas des échantillons. L'estimation de la contribution de l'étape chromatographique est mentionnée dans le tableau (V.5) sous forme relative et montre qu'elle est légèrement élevée pour les composés vitamine A, à cause de ces effets justement.

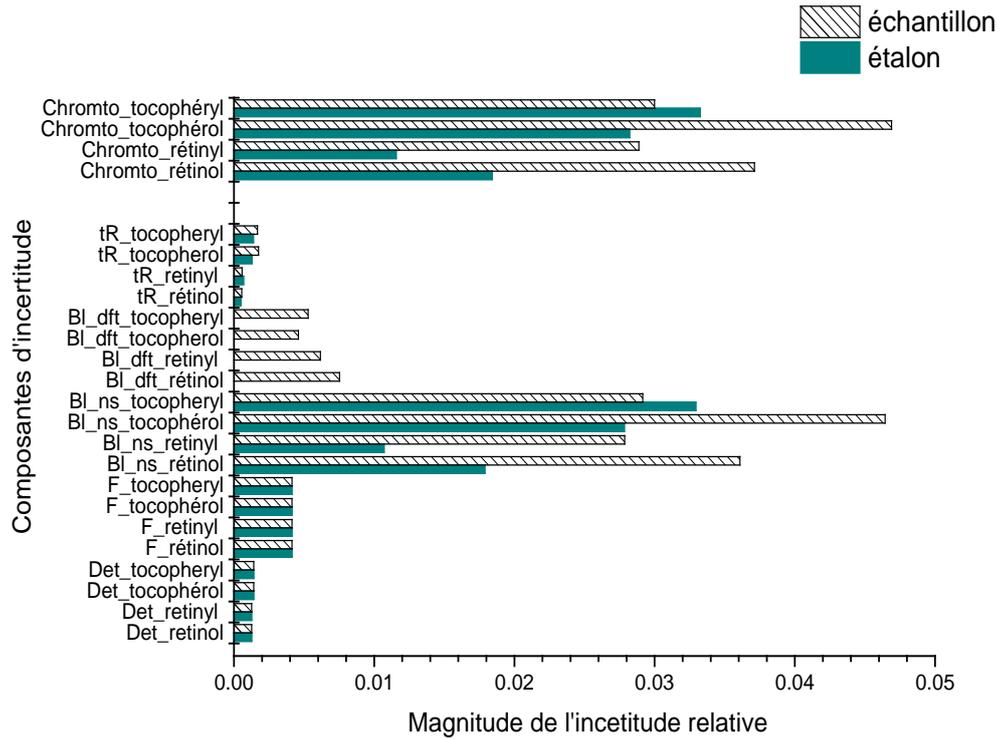


Fig. V.2. Comparaison des contributions à l'incertitude des composantes identifiées durant l'essai instrumental HPLC.

### V. 3. Calcul de l'incertitude type composée

Comme c'est résumé dans le tableau (V.5), les composantes d'incertitude calculées sous forme relative ont été combinées selon l'équation (V.3), pour obtenir à chaque niveau de concentration étudié l'incertitude type composée relative. Les magnitudes de ces calculs ont été comparées entre eux, pour évaluer leurs contributions dans le budget global de l'incertitude. Comme on peut le voir clairement sur la figure (V.3), la variabilité de la récupération constitue la contribution principale de l'incertitude. Mais qui a tendance à diminuer vers la borne supérieure de la gamme de concentrations étudiées, pour qu'elle soit compensée par la contribution de l'étape chromatographique et celle du pipetage des volumes. Dont les influences commencent à être significatives à partir d'une concentration qui apparait deux fois plus grande que la limite de quantification, allant de 13% à 15% et de 14% à 20% du budget global d'incertitude, respectivement, pour le rétinol et l' $\alpha$ -tocopherol. Par contre, la contribution de l'étape d'analyse spectrométrique et la pureté des étalons restent sensiblement faibles, on enregistre à ce même niveau de concentration une influence maximale d'environ 1%

pour la lecture de l'absorbance dans le cas du rétinol et d'un effet de pureté d'environ 4% dans le cas de l' $\alpha$ -tocopherol.

#### V. 4. Calcul de l'incertitude élargie

Comme c'est indiqué dans le chapitre III, l'incertitude élargie est déterminée en multipliant l'incertitude composée par un facteur de couverture, afin de définir un intervalle à l'intérieur duquel on puisse espérer voir se situer une large fraction de la distribution des valeurs qui pourraient être raisonnablement attribuées au mesurande. Le calcul ce facteur d'élargissement a été réalisé, en considérant le nombre effectif de degrés de liberté ( $v_{eff}$ ), selon la formule de Welch-Satterthwaite, comme il est décrit dans les étapes de l'annexe G du guide JCGM [20]. On note que dans ce cas, la valeur du facteur  $k$  est déduite du tableau des valeurs de  $t_p(v)$  de la loi de Student, pour  $v_{eff}$  interpolé au plus proche entier inférieur. Ainsi, pour un niveau de confiance ( $p = 95\%$ ), on trouve associés aux estimations de l'incertitude, à chaque niveau de concentration, les facteurs d'élargissement mentionnées entre parenthèses dans le tableau (V.5).

Tableau V.5 : Résultats de la quantification de l'incertitude par approche de modélisation pour la mesure de la concentration du rétinol et de l' $\alpha$ -tocopherol.

Composantes d'incertitude	niveau	Approche modélisation	
		rétinol	tocophérol
Absorbance		0.0039	0.0018
Pureté		0.0059	0.0059
Pipetage de volumes		0.0136	0.0136
Recouvrement	1	0.0429	0.0563
	2	0.0390	0.0394
	3	0.0299	0.0242
Chromatographie (étalon)		0.0062	0.0065
Chromatographie (échantillon)		0.0115	0.0097
Incertitude composée relative	1	0.0474	0.0593
	2	0.0439	0.0437
	3	0.0360	0.0307
% Incertitude élargie (facteur d'élargissement $k$ )	1	10.42 (2.20)	13.41 (2.26)
	2	9.57 (2.18)	9.52 (2.18)
	3	7.64 (2.12)	6.41 (2.09)

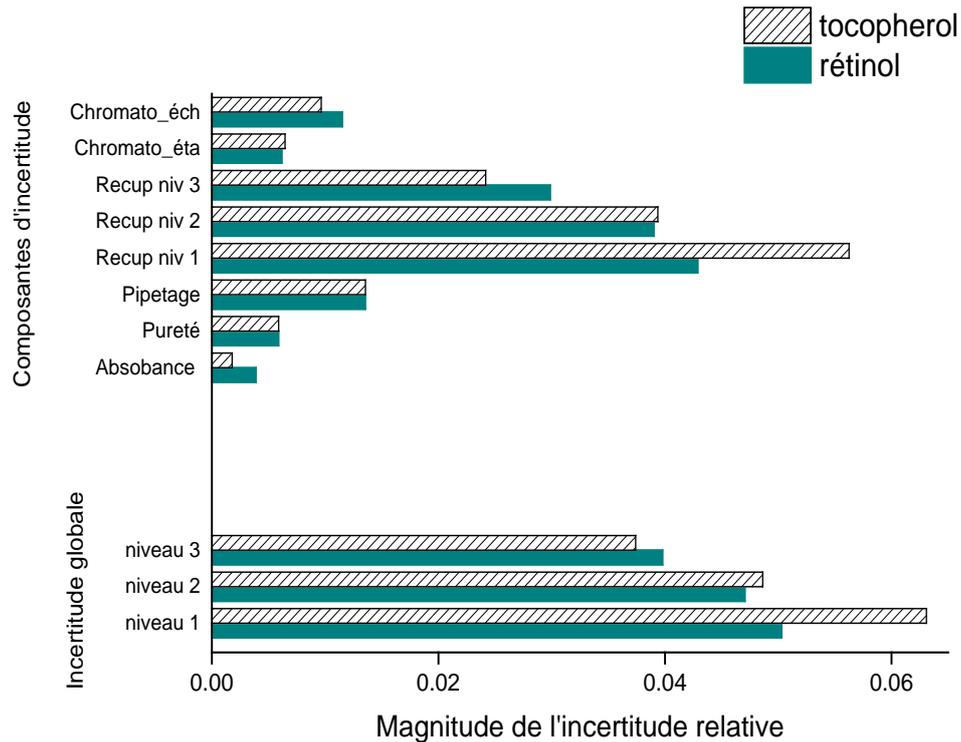


Fig. V.3. Magnitudes des contributions des différentes composantes identifiées au budget global d'incertitude.

### V. 5. Comparaison avec les résultats de l'estimation de l'incertitude de mesure par approche de validation

Les résultats des estimations de l'incertitude de mesure par les approches de modélisation et de validation montrent qu'ils sont comparables, pour l'ensemble de la gamme de concentration étudiée. La figure (V.4) montre une même tendance des valeurs de l'incertitude élargie, ce qui indique que les deux types de composés ont subi les mêmes conditions analytiques. D'autre part, cette illustration révèle un effet plus important dans la moitié inférieure de la gamme étudiée, précisément, pour les vitamines E qui sont considérées comme étant des composés les plus stables [21] et qui subissent moins de perte par rapport aux composés de vitamine A [22]. L'explication à cela, réside dans la différence dans la structure chimique de ces deux types de molécules, ceci fait varier leur comportement à l'intérieur de la colonne analytique, d'où une intégration moins parfaite des pics des vitamines E, qui sortent plus larges à leurs bases comme le montre les chromatogrammes de la figure (IV.6).

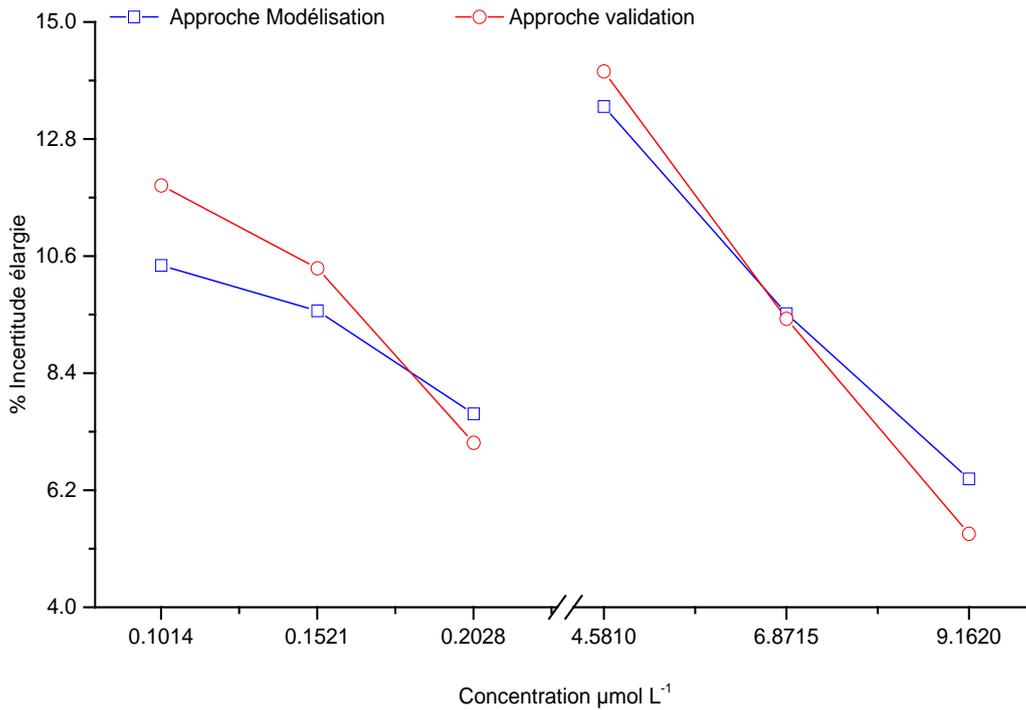


Fig. V.4. Comparaison des estimations d'incertitude obtenues l'approche de modélisation et de validation, pour le dosage simultané du rétinol (graphiques de gauche) et l' $\alpha$ -tocophérol (graphiques de droite) par une méthode HPLC-UV.

Dans cette partie de la plage de concentration, la détermination du début et de la fin du pic est fortement orientée par les fluctuations du bruit de fond. C'est la raison pour laquelle cette anomalie doit être comptée dans la contribution de récupération, comme cela a été mentionné précédemment. En plus, la similitude entre ces estimations confirme le caractère aléatoire des erreurs qui ont accompagnées le procédé de mesure, notamment pour le tocophérol.

## V. 6. Références

1. S L R Ellison and A Williams (Eds). Eurachem/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, Third edition, (2012) ISBN 978-0-948926-30-3. [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org).
2. K.-H. Hsu, C. Chen, The effect of calibration equations on the uncertainty of UV-Vis spectrophotometric measurements, *Measurement*, 2010, 43, 1525–1531.
3. R. Bettencourt da Silva, A. Williams (Eds), Eurachem/CITAC Guide: Setting and Using Target Uncertainty in Chemical Measurement, (1st ed, 2015). [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org).
4. V. Barwick (Ed), Eurachem/CITAC Guide : Guide to Quality in Analytical Chemistry: An Aid to Accreditation, (3rd ed, 2016). ISBN 978-0-948926-32-7. [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org).
5. S. Leito, K. Mölder, A. Künnapas, K. Herodes, I. Leito, Uncertainty in liquid chromatographic analysis of pharmaceutical product: Influence of various uncertainty sources, *J. Chromatogr. A.*, 2006, 1121, 55-63.
6. ISO 21748:2010(E), Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation, International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland, 1<sup>st</sup> edition, 11-2010.
7. SAS: Guide pour la validation des méthodes d'essai chimico-physiques et l'évaluation de l'incertitude de mes, Document N° 324.fw Edition février 2013, rév. 02.
8. B. Magnusson and U. Ornemark (eds.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0. [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org).
9. Vicki J. Barwick, Sources of uncertainty in gas chromatography and high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.*, 1999, 849, 13–33.
10. OIML International recommendation, High performance liquid chromatographs for measurement of pesticides and other toxic substances, OIML R 112, English Ed, 1994.
11. J.B. Esquivel, Wavelength accuracy testing of UV-visible detectors in liquid chromatography, *Chromatographia* 1988, 26, 321-323.

12. J.N. Brown, M. Hewins, J.H.M. Van der Linden, R.J. Lynch, Solvent degassing and other factors affecting liquid chromatographic detector stability, *J. Chromatogr.* 1981, 204, 115-122.
13. N. Dyson, *Chromatographic Integration Methods*, the Royal Society of Chemistry, 1998, 2, 18–53.
14. O. Djellouli, H. Bensaoula, B. Dahmani, Uncertainty contribution of the chromatographic factors during an HPLC-UV elution of four vitamins compounds, *Der Pharma Chemica*, 2016, 8, 105–112.
15. Serban C. Moldoveanu Victor David, *Essentials in Modern HPLC Separations*, Elsevier, 2013, 23-24.
16. EUROLAB Technical Report No. 1/2006, *Guide to the Evaluation of Measurement Uncertainty for Quantitative Test Results*, EUROLAB August 2007.
17. A. Kallner, *Laboratory statistics, Handbook of Formulas and Terms*, 1st edition, (USA) Elsevier 2014, 22-23.
18. I.H. Lira, W. Wöger, Evaluation of the uncertainty associated with a measurement result not corrected for systematic effects, *Meas Sci Technol* 1998, 9, 1010-1011.
19. V. J. Barwick, S. L.R. Ellison, The evaluation of measurement uncertainty from method validation studies Part 1: Description of a laboratory protocol, *Accred Qual Assur* 2000 5, 47–53.
20. JCGM 100:2008, *Evaluation of measurement data—Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM)*, 2008, [www.bipm.org](http://www.bipm.org).
21. P. B. Ottaway (ed), *The technology of vitamins in food*, Springer, Boston (USA), 1993, 90-113.
22. C. Haas, O. Genzel-Boroviczény and B. Koletzko, Losses of vitamin A and E in parenteral nutrition suitable for premature infant, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2002, 56, 906–912.

## **Conclusion et Perspectives**

## Conclusion

La façon dont nous avons envisagé de désigner le modèle linéaire multipoint, sur la base de l'équation d'étalonnage à un point, valorise plus explicitement l'estimation de l'incertitude de mesure par l'approche «Bottom-up» d'une méthode HPLC. En explorant simplement toutes les données résultantes des expériences de validation. Du point de vue analytique, cette approche permet d'améliorer l'incertitude. C'est-à-dire d'améliorer la qualité des résultats, en concentrant les efforts sur les étapes analytiques défectueuses et qui seront facilement identifiables.

En effet, nous avons vu comment cette approche devient un outil puissant pour détecter rapidement les sources potentielles d'erreurs au cours du processus de mesure. Ceci permet de trouver des solutions opportunes, pour éviter ces erreurs et d'optimiser la réduction de l'incertitude de mesure, en réalisant, dans les cas les plus laborieux, des changements mineurs qui n'affectent pas la validité de la méthode. Comme dans le cas de cette étude, où l'incertitude globale peut être minimisée, par exemple, en évitant un pipetage excessif, en utilisant tout simplement une micropipette de précision équivalente, mais qui délivre une gamme de volumes un peu plus large. Mieux encore, cet outil a permis d'éviter une surestimation de l'incertitude en comptant l'effet d'intégration dans la contribution de récupération, qui représente la composante majeure de l'incertitude. De plus, de minimiser cette dernière, par le dosage des échantillons à faible teneur dans les zones supérieures du domaine de validation, en augmentant par exemple, deux fois le volume d'injection, si la plus faible incertitude constatée dans cette estimation, représente la valeur requise cible.

Au contraire, l'approche de validation qui se limite à donner seulement une estimation globale de l'incertitude, ne peut pas permettre cette action judicieuse de repérer ces erreurs et qui lorsqu'elle est tentée elle sera très coûteuse et demandera beaucoup de temps pour la réaliser.

Par contre, la procédure analytique qui a été validée conformément aux exigences réglementaires au moyen de la méthodologie du profil d'exactitude s'est avérée capable

de produire des résultats précis, sur les plages de concentration étudiées des deux analytes.

De plus, le choix de la stratégie de profil d'exactitude dans l'étude de validation, en tant que méthodologie prédictive, couvre d'autres manques liés aux compétences propres de l'analyste et de ses moyens de manipulation. En minimisant le risque d'utilisation de la procédure analytique, sans avoir besoin d'autres tests de validation, ou en rejetant à tort la méthode. Encore une fois, cette méthodologie, à travers le plan de validation utilisé, peut fournir suffisamment de données permettant une estimation régularisée de l'incertitude de mesure selon l'approche alternative de validation dans un seul laboratoire «Approche de validation intra-laboratoire».

## **Perspectives**

L'intérêt pour ce genre de sujets très importants pour le développement des sociétés, dans tous les domaines socio-économiques, attire à étendre cette étude aux autres approches empiriques infaisables dans ce travail, puisque ce genre d'exercices nécessitent une collaboration de plusieurs laboratoires, nationales et mêmes internationales, employant des budgets colossaux et beaucoup de personnel. Voici donc des perspectives motivantes que signale ce travail, ouvrant sur des enjeux en recherche académique et socio-économique.

Du point de vue de la recherche académique, ce raisonnement que nous avons entamé, appelle à de nombreuses perspectives prometteuses, afin d'harmoniser les modalités de l'estimation de l'incertitude de mesure pour les méthodes d'analyses chimiques comparatives, en ligne avec les concepts ISO-GUM. Notamment, les méthodes chromatographiques HPLC, en utilisant différentes fonctions de réponse de quantification et de s'aligner beaucoup plus sur les exigences de métrologie, souvent considérées comme difficiles à atteindre, dans le cas des analyses physico-chimiques.

En outre, l'estimation de l'incertitude de mesure engageant la collaboration inter-laboratoires, peut être aussi envisagée en partenariat avec le secteur socio-économique,

sous forme de thèmes de recherche (master et doctorat), couvrant différentes applications de la chimie analytique d'intérêts.

Ce partenariat doit être aussi impérativement projeté avec les laboratoires d'analyse physico-chimiques étatiques et privés, sous forme de projets de recherche avisant l'estimation de l'incertitude suivant l'approche par les essais d'aptitude, afin d'améliorer les compétences et de mettre à jour le savoir-faire du personnel technique.



Cite this: *Analyst*, 2018, **143**, 1492

## Compromise in uncertainty estimation by modelling and validation approaches for an HPLC-UV method for measurement of biochemical indicators of vitamins A and E

O. Djellouli, \*<sup>a,b</sup> E. Rozet,<sup>c</sup> B. Dahmani<sup>a</sup> and Ph. Hubert<sup>d</sup>

It is common practice nowadays to associate the measurement uncertainty to the measurand, in order to judge the quality of a result related to the measurement process. However, the improvement of this parameter as well as the adaptation of its estimation modes always remain an analytical challenge, especially in chemical testing. In this paper, we outline a measurement uncertainty estimation mode based on the one-point linear calibration equation to fully establish a “bottom-up” approach for estimating the measurement uncertainty of a multi-point calibration-based HPLC-UV quantitative method. To demonstrate this estimation mode, we have followed as an example of interest the influences resulting from the simultaneous determination of two biochemical indicators, namely the human plasma vitamins retinol and  $\alpha$ -tocopherol. Results from this estimation showed consistency when compared to those obtained from the validation-based alternative method, where the relative expanded uncertainties were found, at a 95% confidence level, to be less than 15% for the low concentration ranges of the two molecules. However, the modelling approach shows all the benefits of its use to identify and quantify all the uncertainty contributions arising from the different steps of the analytical process and seems to be quite achievable for comparative HPLC methods.

Received 5th November 2017,  
Accepted 10th February 2018

DOI: 10.1039/c7an01804e

rscl.li/analyst

### 1. Introduction

The purpose of any measure is to assign a value to the measurand, the quantity intended to be measured. However, nowadays it is not enough to be satisfied only by the unique numerical value of a measurement result. In fact, the measurement process gives only an estimation, which after correction may by chance be very close to the measurand value.<sup>1</sup> This situation is even more delicate in the case of chemical measurements where the complexity of the test sample generally impedes the achievement of strict metrological requirements to ensure complete traceability. Since it involves making important decisions based on these measures, it is important to have sufficient information on the quality of the related results. Indeed, the uncertainty is defined as a non-negative parameter characterizing the dispersion of the quantity values being attributed to a measurand, based on the information used.<sup>2</sup> Nevertheless, it

is recommended to associate this parameter to the measurand to judge the quality of the result.<sup>3</sup> However, this also implies that the improvement of this parameter as well as the adaptation of its estimation modes always remain as analytical challenges, especially for the developed chemical analysis methods, of which the correct practice generally depends on the measuring system performance, the skills of its user, as well as the nature of the material to be analysed. The analysis method must, first, meet the end-user claims and, second, ensure at least the comparability of the results needed for an acceptable metrological solution for traceability of a validated analytical procedure.<sup>4</sup> In fact, method validation and measurement uncertainty are two metrological duties that are mandatory and highly required by regulatory bodies concerned with chemical measurement,<sup>3,5–10</sup> and which may be established by planning repeated trials for a given concentration range. This makes it possible, on the one hand, to justify the reliability of the obtained results by determining the validation criteria of the analytical procedure in use, where the bias and precision are regarded as the key performance parameters.<sup>11</sup> On the other hand, it provides a quantitative indication of the quality of the results, by using in many cases the calculation of these same parameters to estimate the measurement uncertainty.<sup>12</sup> Indeed, the validation approach and the “bottom-up” or so-called ISO-GUM approach are the most evoked to estimate

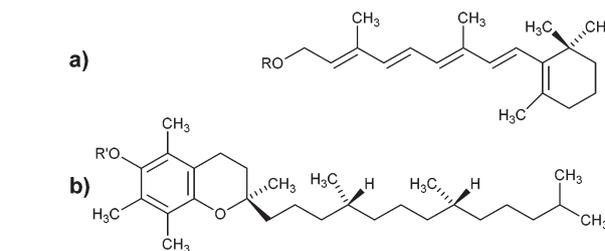
<sup>a</sup>Laboratory of Spectrochemistry and Pharmacology Structural, University of Tlemcen, BP. 119, 13000 Tlemcen, Algeria. E-mail: o\_djellouli@yahoo.com

<sup>b</sup>Ctr Univ A. Salmi of Naama, BP. 66, 45000 Naama, Algeria

<sup>c</sup>Arlenda s.a. Rue Edouard Belin 5, B-1435 Mont-Saint-Guibert, Belgium

<sup>d</sup>Laboratory of Pharmaceutical Analytical Chemistry, CIRM, Department of Pharmacy, University of Liège, CHU, B36, Tour 4, +2 Quartier HOPITAL – Av Hippocrate, 15 Sart Tilman, B-4000 Liège, Belgium

uncertainty in chemical measurements. In many recent publications,<sup>13,14</sup> studies on uncertainty have mainly focused on evaluation by the validation approach, and, furthermore, the recent referential texts, standards and guides testify to its consistency with the ISO-GUM principles for the expression of uncertainty in measurement.<sup>1,12,15</sup> The validation approach is suitable when the measurement uncertainty is intended to be known in a global manner, and it is sufficient to use the validation performance to judge the reliability of an analytical method, knowing, nevertheless, that we cannot be sure to fully discuss all the potential sources of errors influencing the measurement process. This is even when using a tool as helpful as the Ishikawa diagram to locate these errors. Likewise, the bottom-up uncertainty assessment by this means relies mainly on protocols developed in the laboratory based on the analyst's practical experience.<sup>16</sup> The modelling approach is considered as a tool that identifies the parameters or working steps with a disproportionate contribution to the total uncertainty, thus offering the chance to improve them.<sup>17</sup> In fact, the ISO-GUM concepts, recommended for quantifying uncertainty in physical measurements by the above-mentioned referential documents, may be also adapted for chemical testing, as given in the Eurachem/CITAC guide.<sup>1</sup> The evaluation procedure through this approach is essentially based on a mathematical model, which normally connects all influencing parameters to the output quantity. However, the decline in the use of this approach to estimate the uncertainty in chemical measurement is often justified by economic reasons: it can be laborious when executing its associated processes.<sup>14</sup> This reserve is also referred to the complexity of the chemical samples, whose processing steps do not tolerate the completion of this model.<sup>18</sup> It should be noted, however, that a wide range of data becomes available upon completion of the validation experiments, such as the retention time, which could be used effectively to support the uncertainty estimation in an ascending way according to ISO-GUM.<sup>19</sup> Provided that the rules required for a modelling approach must be undertaken, in the following, we propose to perform the two modes evaluations of the measurement uncertainty of an HPLC-UV quantitative method by exploiting only the data resulting from the validation experiments, which in any case must be carried out internally before the routine use of the analytical method. As an example of interest, we consider the internal standard-based HPLC-UV method for the simultaneous quantification of the vitamers retinol and  $\alpha$ -tocopherol, whose structures are illustrated in Fig. 1. The importance of these molecules is well evinced not only in the proper functioning of the human body, but also for their use as a biochemical indicator of the vitamin A and E micronutrients in human plasma, to track their deficiencies in the population.<sup>20,21</sup> As highlighted in the recent WHO reports, vitamin A deficiency (VAD) constitutes a major public health problem around the world, usually in developing countries.<sup>22–24</sup>  $\alpha$ -Tocopherol deficiency can also be observed, not only in regions where there is food deprivation and famine,<sup>25</sup> but also in individuals with health problems, abetalipoproteinemia, cholestatic liver diseases, severe mal-



**Fig. 1** Chemical structures of: (a) vitamers of vitamin A; R = H: retinol, R = CH<sub>3</sub>C=O: retinyl acetate. (b) Vitamers of vitamin E; R' = H:  $\alpha$ -tocopherol, R' = CH<sub>3</sub>C=O:  $\alpha$ -tocopheryl acetate.

nutrition, fat malabsorption and cystic fibrosis.<sup>26</sup> As an objective, the measurement uncertainty was aimed to be evaluated by means of the bottom-up method, using as a mathematical model the one-point calibration response function, despite a multi-point quantitative conception. This assumption is appropriate since it leads precisely to the identification and quantification of all uncertainty components, thereby covering the errors that may arise from the main steps of a multi-point calibration based HPLC analytical method. Finally, the results of this estimation were compared with those obtained according to the alternative approach, using the validation calculation. The validation experiments were performed according to the accuracy profile strategy by applying the V2 protocol of the guide "Harmonization of strategies for the quantitative validation of analytical procedures" of the SFSTP commission (Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutique).<sup>27</sup> This strategy relies on two complementary concepts, the acceptance limit ( $\pm\lambda$ ), which is a predefined value as it is required by the accepted professional practice, e.g.  $\pm 15\%$  for bioanalytical procedures,<sup>28</sup> and the  $\beta$ -expectation tolerance interval ( $\beta$ -IT), which delimits a range within which it is expected that each future result that will be obtained by this analytical procedure will be included with a probability equal to  $\beta$  (e.g. 95%).

## 2. Materials and methods

### 2.1 Chemicals

Retinol, retinyl acetate,  $\alpha$ -tocopherol,  $\alpha$ -tocopheryl acetate and BHT (2,4-di-*tert*-butyl hydroxyl toluene) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, USA). Absolute ethanol, methanol, acetonitrile and ethyl acetate were HPLC grade solvents and were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, USA).

### 2.2 Instruments

The HPLC instrument was a low-pressure LC-10Avp series system (Shimadzu, Japan), constituting an SCL-10AVP controller, an LC-10ADvp pump, a DGU-14A degasser, an SPD-10Avp UV-Vis detector and an FCV-10ALvp gradient unit. The system was equipped with a SUS mixer and a manual Rheodyne 7725i injector with a 20  $\mu$ L loop and was PC controlled using

LCsolution software (Shimadzu). A Nicolet Evolution100 Spectrophotometer (Thermoelectron Corporation) was preferred to determine the standard concentrations. A variable Accumax micropipette (50–200  $\mu\text{L}$ ) was used for all quantitative volume taking and a microcentrifuge from Sigma (Germany) was utilized to achieve the particle separation.

### 2.3 Method

**2.3.1 Chromatographic conditions.** A constant composition of methanol/acetonitrile (70:30, v/v) as the mobile phase was continuously delivered by the system at a flow rate of 2  $\text{mL min}^{-1}$ . The separation was achieved at room temperature on a Zorbax SB-C18 ( $4.6 \times 250$  mm, 5  $\mu\text{m}$ ) analytical column (Agilent), which is permanently protected by a Zorbax SB-C18 ( $4.6 \times 12.5$  mm, 5  $\mu\text{m}$ ) guard column. The detection was monitored in dual mode at the maximum wavelength 325 nm and 292 nm, respectively, for vitamin A and vitamin E compounds.

**2.3.2 Plasma sampling.** Plasma samples were first thawed and homogenised completely at room temperature. To precipitate proteins and to extract the analytes of interest, a 50  $\mu\text{L}$  aliquot was transferred into an Eppendorf tube and combined with an appropriate quantity of an ethanol/ethyl acetate (1:1, v/v) based solvent mixture, containing BHT,<sup>29</sup> to reach the total volume of 250  $\mu\text{L}$ . The contents were then shaken vigorously and left standing in the dark at room temperature, prior to 12 000g centrifugation for 4 minutes. Finally, the clear supernatant was drawn using an adequate syringe and loaded into the HPLC system for injection.

**2.3.3. Validation experimental plan.** According to the V2 protocol of the SFSTP guidelines,<sup>27</sup> the validation experiments were planned to assess, in one part, three ( $j = 3$ ) validation standards (VS) levels, three times ( $k = 3$ ) during three days ( $i = 3$ ), and in the other part, to analyse three calibration standard (CS) levels two times each validation day, to realise a total of 45 assays. The CS are working standard solutions, which are prepared after consecutive dilutions to obtain the lower concentration ranges of (0.1–0.5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) and (4.5–22.2  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) for retinol and  $\alpha$ -tocopherol, respectively. The VS are ordinary plasma samples spiked with 0.1, 0.15 and 0.2  $\mu\text{mol L}^{-1}$  for retinol and 4.5, 6.87 and 9.16  $\mu\text{mol L}^{-1}$  for  $\alpha$ -tocopherol. Additionally, two VS (0.3 and 0.4  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) for retinol and

(5.87 and 11.74  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) for  $\alpha$ -tocopherol were assessed with the same replication in an extra validation day to fully check the linearity criterion of the method. Standards and plasma test samples were handled under red light<sup>30</sup> and stored in the dark at  $-34$   $^{\circ}\text{C}$  when not in use.

## 3. Results and discussion

For both the bottom-up and validation approaches, the measurement uncertainty was estimated with respect to the GUM principles.<sup>18</sup> First, the targeted quantity to be measured in ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) is the concentration ( $C_{\text{spl}}$ ) of retinol and  $\alpha$ -tocopherol contained in the diluted human plasma samples.

The main sources of uncertainty were identified and the combined uncertainty  $u_c(C_{\text{spl}})$  was calculated. Finally, for a more practical aim the expanded uncertainty  $U(C_{\text{spl}})$  was determined at 95% confidence level using an appropriate coverage factor from the t-distribution with an effective number of degrees of freedom obtained by the Welch–Satterthwaite formula.

### 3.1. Validation approach for the measurement uncertainty estimation

**3.1.1. Method validation.** The accuracy profile was constructed by computing, at each concentration level, the 95%  $\beta$ -TI according to the SFSTP guide's formulas<sup>31</sup> and using a linear model as the response function. More details on the calculation of this interval can be also found in.<sup>32,33</sup> As shown in Fig. 2, the estimated percent relative  $\beta$ -TI borders, the upper limit tolerance interval (ULTI) and the lower limit tolerance interval (LLTI), are well inside the acceptance limits ( $\lambda = \pm 15\%$ ), thereby attesting that probably 95% of the future results will be accurate within the studied concentration ranges for both analytes. Furthermore, the main validation criteria, which are gathered in Table 1, show that precision and trueness do not exceed the 15% threshold recommended by the referential document.<sup>34</sup> Furthermore, the selectivity was well approved at the two specific wavelengths by comparing the retention time of the peaks of the identified compounds on the Fig. 3 chromatograms. Moreover, the linearity of the method was verified for the five SV levels by plotting the back-calculated concentrations *versus* the added ones.<sup>27</sup> As reported

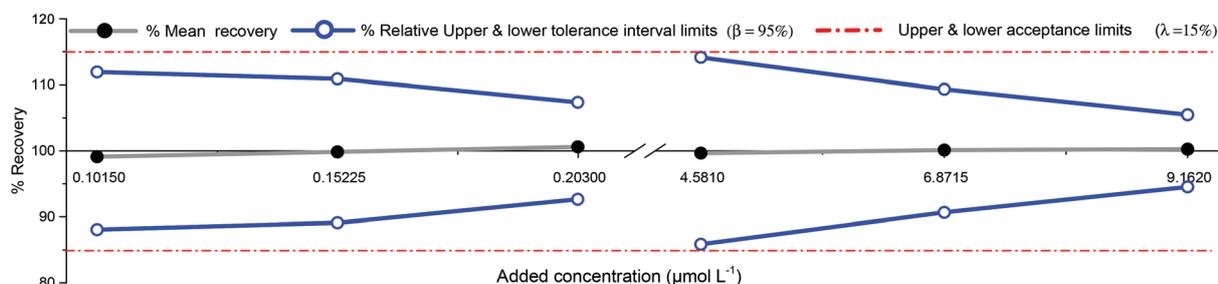
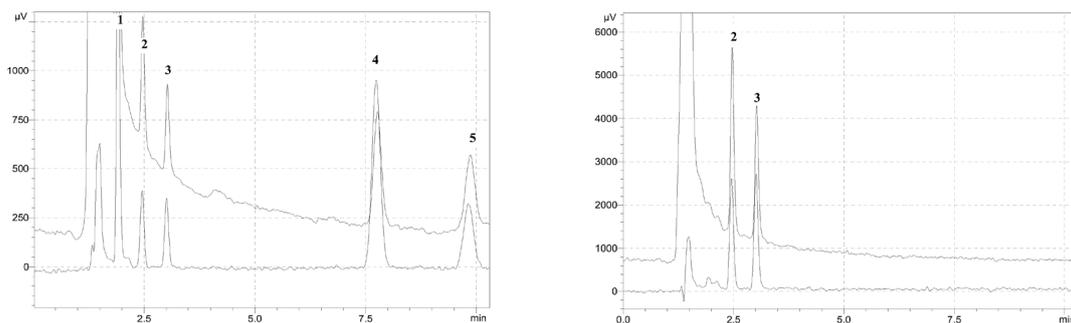


Fig. 2 Accuracy profile obtained using simple linear regression by plotting the mean percent recovery values vs. the introduced concentration for retinol (left profile) and for  $\alpha$ -tocopherol (right profile).

**Table 1** Validation results for the simultaneous quantification of retinol and  $\alpha$ -tocopherol in human plasma samples

	Retinol					$\alpha$ -Tocopherol				
	VS1	VS2	VS3	Ext1	Ext2	VS1	VS2	VS3	Ext1	Ext2
<b>Concentration (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>										
Added	0.102	0.152	0.203	0.299	0.399	4.581	6.872	9.162	5.869	11.739
Mean calculated	0.101	0.152	0.204	0.297	0.398	4.557	6.880	9.184	5.707	11.826
<b>Precision (%RSD)</b>										
Repeatability	2.581	2.141	1.143			5.810	3.689	1.951		
Between series	2.807	2.558	1.613			0 <sup>a</sup>	0.832	0.966		
Intermediate precision	3.801	3.343	2.076			5.816	3.776	2.201		
<b>Trueness</b>										
%Absolute relative bias	0.901	0.161	0.504			0.533	0.112	0.340		
%Recovery (%RSD)	99.1(3.5)	99.8(3.1)	100.6(1.9)			99.5(5.5)	100.1(3.8)	100.3(2.1)		
<b><math>\beta</math>-TI limits</b>										
LLTI ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0.089	0.135	0.189			3.904	6.232	8.660		
ULTI ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0.112	0.169	0.219			5.200	7.516	9.717		
<b>Linearity</b>	$y = 0.9955x + 0.0003492$ ( $r^2 = 0.99988$ )					$y = 1.02064x - 0.172215$ ( $r^2 = 0.99941$ )				
<b>LOD (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	0.05					0.98				
<b>LLOQ (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	0.101					4.581				

<sup>a</sup> Since the between-series variance is equal to 0 when the mean square error MSE is greater than the mean square model MSM, as in ref. 36.



**Fig. 3** HPLC-UV responses obtained in dual mode; 292 nm (left chromatograms) and 325 nm (right chromatograms) after injecting: (a) a standard solution (bottom chromatograms) containing ( $0.2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) of retinol and ( $9 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) of  $\alpha$ -tocopherol, (b) plasma sample (top chromatograms) spiked with the same quantities of the analytes of interest as in (a). Identified peaks: 1. BHT ( $t_R = 1.91$  min), 2. retinol ( $t_R = 2.47$  min), 3. retinyl acetate ( $t_R = 3.02$  min), 4.  $\alpha$ -tocopherol ( $t_R = 7.78$  min), 5.  $\alpha$ -tocopheryl acetate ( $t_R = 9.88$  min).

in Table 1, the slopes are close to one for both analytes, thereby indicating the linearity of the method for a fairly wide concentration range. Additionally, the first concentration level was designated as the lower limit of quantification (LLOQ).<sup>31</sup> However, the limit of detection LOD was estimated based on the calibration curve parameters.<sup>35</sup>

**3.1.2. Measurement uncertainty estimation.** By means of the validation approach, the identification of the sources of uncertainty is generally done by using an Ishikawa diagram, as shown in Fig. 4. At first sight, the search for sources of uncertainty can be established, regarding the materials quality, standards and test samples, and how the chosen instruments for the analytical tasks are used to handle this materials, this is well explained by the main branches illustrated in Fig. 4(a). Furthermore, this quest can be detailed as needed by examining the crucial factors associated with each branch. Thus, we can count the five quantitative parameters rearranged in Fig. 4(b). However, the measurement uncertainty was evaluated at each validation level based on the earlier accuracy

profile calculations. According to Feinberg *et al.*<sup>33</sup> the combined uncertainty can be expressed for the ( $I \times J$ ) designed validation plan, by the standard deviation of the tolerance interval  $\sigma_{IT}$  as follows:

$$u_c(C_{\text{spl}}) = \sigma_{IT} = \sigma_{IP} \times \sqrt{1 + \frac{J \times \tau + 1}{IJ \times (\tau + 1)}} \quad (1)$$

where  $\sigma_{IP} = \sqrt{\sigma_B^2 + \sigma_r^2}$  is the intermediate precision standard deviation, whose calculation formula is derived from ISO 5725 standard,<sup>36</sup> and  $\tau = \sigma_B^2 / \sigma_r^2$  where  $\sigma_B^2$  and  $\sigma_r^2$  are the between-series variance and the repeatability variance, respectively. The measurement uncertainty estimation at each validation level was found to be worthwhile for both analytes. However, the expanded uncertainty was calculated by multiplying the tolerance interval uncertainty by a factor obtained according to the same Satterthwaite degrees of freedom numbers used in the accuracy profile computation; as we can see in Table 3, the

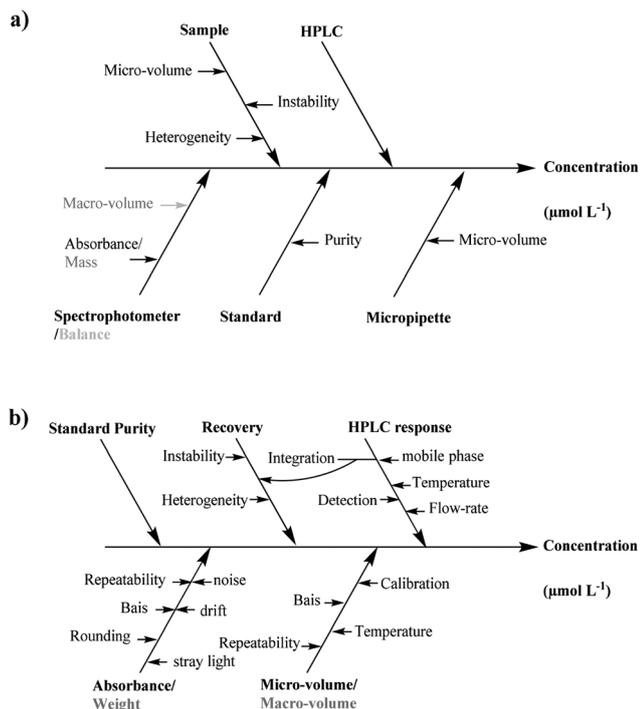


Fig. 4 Factors of influence on the measurement result: (a) main factors with associated sources of error. (b) The same effects rearranged as quantitative parameters and showing a second row of sources of error.

maximum percent relative values always appear at low levels and do not exceed 15%.

### 3.2. Modelling approach for the measurement uncertainty estimation

According to the adopted response function, the back calculation of the analyte concentrations in the diluted test sample can be expressed as follows:

$$C_{\text{spl}} = \frac{(\Gamma_{\text{spl}} - b_0)}{b_1} \quad (2)$$

where:  $\Gamma_{\text{spl}} = A_{\text{spl}}/\Gamma_{\text{IS}}$  is the area ratio of the sample's analyte and its related internal standard.  $b_1$  and  $b_0$  are the slope and the intercept of the linear calibration curve, respectively.

This multi-points model, even when used to estimate the measurement uncertainty, by means of the standard deviation of the calibration equation,<sup>1,37</sup> in our point of view, is inferior to the modelling approach methodology since it hides most factors influencing the measurement process, contrary to the one-point calibration plan model, which links directly between the influential factors (input quantities) and the measurement value (output quantity). That may provide valuable knowledge

on the analytical steps, to allow reduction of the global uncertainty,<sup>38</sup> by improving the method and for identifying efficient and cost-effective corrective measures, when necessary.<sup>39</sup> Moreover, Leito *et al.*<sup>40</sup> compared the estimation of the uncertainty between a one-point and a five-point calibration plan in order to estimate the limits of use of the one-point calibration in pharmaceuticals quality control. They found similar uncertainty estimations for both cases. They achieved this estimation using the GUM Workbench software package.

**3.2.1. Building the model and identifying the uncertainty sources.** Considering a corrected model relating to the one-point calibration plan, the quantification of the analyte concentration, achieved after a total of  $n$  consecutive dilutions of a primary standard solution, can be expressed as follows:

$$C_{\text{spl}} = f_{\text{Abs/W}} \times P \times R \times \prod_{i=1}^n f_{(i)\text{dil}} \times \frac{\Gamma_{\text{spl}}}{\Gamma_{\text{std}}} \quad (3)$$

where:  $\Gamma_{\text{std}}$ : The area ratio of the standard analyte and its corresponding internal standard;  $P$ : purity of the standard material;  $R$ : recovery factor;  $f_{(i)\text{dil}} = V_{2i-1}/V_{2i}$  Factor of the  $i^{\text{th}}$  dilution, is the ratio of two consecutive considered volumes;  $f_{\text{Abs/W}}$ : term relating to primary standard solution determination, equal to  $(\text{Abs}/\varepsilon \cdot l)$  for spectrometric determination or  $(m/V)$  in the case of weighing preparation;  $\text{Abs}$ : absorbance of the primary standard solution;  $\varepsilon$ : molar absorption coefficients: 52 770, 3265  $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$  in ethanol for retinol and  $\alpha$ -tocopherol, respectively;  $l$ : spectrometric cuvette length (cm);  $m$ : mass of the standard material (g);  $V$ : volume of the primary standard solution (L).

As we can see, the eqn (3) terms are precisely those parameters that appear in the above identification diagram. On the other hand, knowing that the successive dilutions of the standard solution necessary to prepare a one-point calibration plan must be reproduced in a parallel way to achieve a multi-point calibration plan. However, the quantitative model remains approximately the same if, in addition, the chromatographic term relating to the standard is replaced by the average. Nevertheless, it is more adequate qualitatively to detect all the potential sources of uncertainties resulting from a multipoint preparation. Therefore, the divergence in uncertainty estimation can be easily compensated by simply counting in the dilution uncertainty component, the additional pipetting steps needed to build the multi-point calibration plan. Considering, however, that the uncertainty related to the chromatographic terms must cover only the effects arising during the instrument run, thus, the combined uncertainty of the analyte concentration, determined using a spectrometric-based multi-point calibration, can be estimated by applying the law of propagation of uncertainty and assuming no correlation between the input quantities, as follows:

$$u_c(C_{\text{spl}}) = C_{\text{spl}} \times \sqrt{\left(\frac{u(\text{Abs}_{\text{std}})}{\text{Abs}_{\text{std}}}\right)^2 + \left(\frac{u(P_{\text{std}})}{P_{\text{std}}}\right)^2 + \left(\frac{u(R)}{R}\right)^2 + \sum_{j=1}^n \left(\frac{u(V_j)}{V_j}\right)^2 + \left(\frac{u(\bar{\Gamma}_{\text{std}})}{\bar{\Gamma}_{\text{std}}}\right)^2 + \left(\frac{u(\Gamma_{\text{spl}})}{\Gamma_{\text{spl}}}\right)^2}, \quad (j = 2i) \quad (4)$$

**3.2.2. Estimating the uncertainty components.** The uncertainty components were assessed by calculating the standard uncertainty, using both the statistical analysis (type A) method and the (type B) other available information-based method.

**3.2.2.1. Uncertainty relating to the spectrometric testing.** The spectrometer specifications indicate a stability below 0.0003 A h<sup>-1</sup>, a peak to peak noise below 0.0002 A and a typical value of 0.03%T for stray light; additionally, the last decimal places of the digital display were accounted for to estimate the rounding contribution. For all of them, the uncertainty was evaluated using a type B method and assuming rectangular distribution. Thus, the uncertainties due to stability, peak-to-peak noise, stray light and rounding remain:  $\frac{0.00015}{\sqrt{3}} = 8.660e - 5$  AU,  $\frac{0.0001}{\sqrt{3}} = 1.155e - 4$  AU,  $\frac{0.00015}{\sqrt{3}} = 8.660e - 5$  T, and  $\frac{0.0005}{\sqrt{3}} = 2.887e - 4$  AU, respectively.

Additionally, the constructor proposes  $\pm 0.0013$  AU for accuracy; we assumed thereby a triangular distribution, hence the uncertainty due to accuracy was  $\frac{0.0013}{\sqrt{6}} = 5.307e - 4$  AU. Likewise, spectrometric assays (six replications) were performed on the primary standard solution at the specific wavelength of each standard, giving the mean absorbance and standard deviation (SD) of 0.411 ( $1.47196 \times 10^{-3}$  AU) and 0.741 ( $1.16905 \times 10^{-3}$  AU) for retinol and  $\alpha$ -tocopherol, respectively.

As a result, the absorbance's standard uncertainty was estimated as a square root of the above-calculated contributions' squares sum and gave  $u(A)_{\text{Ret}} = 1.600 \times 10^{-3}$  AU for retinol and  $u(A)_{\text{Toc}} = 1.327 \times 10^{-3}$  AU for  $\alpha$ -tocopherol.

**3.2.2.2. Uncertainty of the standard purity.** The purity was checked weekly and was found to be  $\geq 98\%$  for all the handled standards. Assuming thereby a rectangular distribution, the standard uncertainty due to standard purity was:

$$u(P_{\text{Std}}) = \frac{0.01}{\sqrt{3}} = 0.0058$$

**3.2.2.3. Uncertainty due to the pipetting.** Four components were considered in the statement of the uncertainty relating to the pipetted volume  $V_x$  (50, 100, 150 or 200  $\mu\text{L}$ ) and assuming type B estimation: the uncertainty in volume due to precision  $u(V_{x,\text{tp}})$ , the uncertainty due to accuracy  $u(V_{x,\text{b}})$ , the uncertainty due to calibration  $u(V_{x,\text{cl}})$  and the uncertainty due to temperature  $u(V_{x,\text{tp}})$ . The standard uncertainty on the pipetted volumes was then calculated according to the following equation:

$$u(V_x) = \sqrt{(u(V_{x,\text{tp}}))^2 + (u(V_{x,\text{b}}))^2 + (u(V_{x,\text{cl}}))^2 + (u(V_{x,\text{tp}}))^2} \quad (5)$$

The manufacturer suggests CV % values of  $\pm 0.4$ ,  $\pm 0.15$  for repeatability and  $\pm 1$ ,  $\pm 0.6$  for inaccuracy (bias), respectively, for 50  $\mu\text{L}$  and 200  $\mu\text{L}$  pipetted volumes, assuming triangular distribution as follows:

A 0.4% imprecision gives a standard deviation of  $(0.4 \div 100) \times 50 = \pm 0.2$   $\mu\text{L}$  for a 50  $\mu\text{L}$  volume and 0.15% gives a standard deviation of  $(0.15 \div 100) \times 200 = \pm 0.3$   $\mu\text{L}$  for a 200  $\mu\text{L}$  pipetted

volume. A 1% inaccuracy gives a bias of  $(1 \div 100) \times 50 = \pm 0.5$   $\mu\text{L}$  for a 50  $\mu\text{L}$  volume and 0.6% inaccuracy gives a bias of  $(0.6 \div 100) \times 200 = \pm 1.2$   $\mu\text{L}$  for a 200  $\mu\text{L}$  volume, thus:

$$\begin{aligned} u(V_{50,\text{tp}}) &= u(V_{100,\text{tp}}) = \frac{0.2}{\sqrt{6}} = 0.0817 \mu\text{L}, \\ u(V_{200,\text{tp}}) &= u(V_{150,\text{tp}}) = \frac{0.3}{\sqrt{6}} = 0.1225 \mu\text{L}, \\ u(V_{50,\text{b}}) &= u(V_{100,\text{b}}) = \frac{0.5}{\sqrt{6}} = 0.2041 \mu\text{L}, \\ u(V_{200,\text{b}}) &= u(V_{150,\text{b}}) = \frac{1.2}{\sqrt{6}} = 0.4899 \mu\text{L}. \end{aligned}$$

The instrument specifications provide ( $\pm$ ) indications on the tolerance of the pipette for different volumes; assuming a triangular distribution, those data were used as estimates of the calibration uncertainty of the pipette.

$$\begin{aligned} u(V_{50,\text{cl}}) &= \frac{0.8}{\sqrt{6}} = 0.3266 \mu\text{L}, \\ u(V_{100,\text{cl}}) &= \frac{1.5}{\sqrt{6}} = 0.6124 \mu\text{L}, \\ u(V_{200,\text{cl}}) &= u(V_{150,\text{cl}}) = \frac{2}{\sqrt{6}} = 0.8165 \mu\text{L}. \end{aligned}$$

Finally, the uncertainty owing to the temperature was calculated for all different realized volumes, using the following equation:<sup>41</sup>

$$u(V_{x,\text{tp}}) = \frac{V_x \cdot \Delta T \cdot \gamma}{\sqrt{3}}$$

where:

$\Delta T$  is the temperature difference between the value used for the calibration of the pipette and the temperature of the medium used in the laboratory,  $\Delta T = |T - T_{\text{med}}| = |25 - 22| = 3$  °C,  $\gamma$  is the cubic coefficient of volume expansion, for organic solvents it is  $\gamma = 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ , thus:

$$\begin{aligned} u(V_{50,\text{tp}}) &= \frac{50 \times 3 \times 10^{-3}}{\sqrt{3}} = 0.0866 \mu\text{L}, \\ u(V_{100,\text{tp}}) &= \frac{100 \times 3 \times 10^{-3}}{\sqrt{3}} = 0.7321 \mu\text{L}, \\ u(V_{150,\text{tp}}) &= \frac{150 \times 3 \times 10^{-3}}{\sqrt{3}} = 0.2598 \mu\text{L}, \\ u(V_{200,\text{tp}}) &= 0.3464 \mu\text{L}. \end{aligned}$$

Therefore, the standard uncertainties for all pipetted volumes were calculated using eqn (5), thus:

$$\begin{aligned} u(V_{50}) &= 0.4011 \mu\text{L}, \\ u(V_{100}) &= 0.6733 \mu\text{L}, \\ u(V_{150}) &= 0.9946 \mu\text{L}, \\ u(V_{200}) &= 1.0206 \mu\text{L}. \end{aligned}$$

These estimations were combined to calculate the standard uncertainty of the volumes handled to realise three consecutive dilutions as follow:

A volume  $V_1$  was taken from each primary standard solution of  $2 \times 200$   $\mu\text{L}$  for retinol and  $3 \times 200$   $\mu\text{L}$  for  $\alpha$ -tocopherol. These volumes were combined to reach  $V_2 = 1$  mL, the volume of the

mixed standard solution, thus,

$$V_2 = 5 \times 200 \mu\text{L} \text{ and } u(V_2) = \sqrt{5u(V_{200})^2} = 2.2822 \mu\text{L}.$$

A volume  $V_3$  of the mixed standard solution was combined with a complementary volume of the solvent mixture to prepare  $V_4 = 300 \mu\text{L}$ , volume of the intermediate standard solution, thus depending on the concentration level:

For level 1:

$$\begin{aligned} V_4 &= V_{50} + V_{50} + V_{200} \text{ and} \\ u(V_4)_{\text{level 1}} &= \sqrt{2 \times (uV_{50})^2 + (uV_{200})^2} \\ &= \sqrt{2 \cdot (0.4011)^2 + (1.0206)^2} = 1.1677 \mu\text{L}. \end{aligned}$$

For level 2:

$$\begin{aligned} V_4 &= V_{150} + V_{150} \text{ and} \\ u(V_4)_{\text{level 2}} &= \sqrt{2 \times (uV_{150})^2} = \sqrt{2 \cdot (0.9946)^2} \\ &= 1.4065 \mu\text{L}. \end{aligned}$$

For level 3:

$$\begin{aligned} V_4 &= V_{200} + V_{50} + V_{50} \text{ and} \\ u(V_4)_{\text{level 1}} &= \sqrt{2 \times (uV_{50})^2 + (uV_{200})^2} \\ &= \sqrt{2 \cdot (0.4011)^2 + (1.0206)^2} = 1.1677 \mu\text{L}. \end{aligned}$$

Since these takes were actually performed, the standard uncertainty corresponding to  $V_4$  was then equal to the square root of the sum of squares of all uncertainties related to these realizations, thus:

$$\begin{aligned} u(V_4) &= \sqrt{(u(V_4)_{\text{level 1}})^2 + (u(V_4)_{\text{level 2}})^2 + (u(V_4)_{\text{level 3}})^2} \\ &= \sqrt{4 \cdot (0.4011)^2 + 2 \cdot (0.9908)^2 + 2 \cdot (0.9946)^2} \\ &= 2.1413 \mu\text{L}. \end{aligned}$$

A constant volume  $V_5 = 50 \mu\text{L}$  was drawn from each intermediate solution. This volume was combined with the same volume of the internal standards solution and  $150 \mu\text{L}$  of the solvent mixture to prepare  $V_6 = 250 \mu\text{L}$ , the volume of the working standard solutions, and this combination was achieved two times for each level to inject six independent working standard solutions, thus:

$$\begin{aligned} u(V_6) &= \sqrt{12(uV_{50})^2 + 6(uV_{150})^2} \\ &= \sqrt{12 \cdot (0.4011)^2 + 6 \cdot (0.9946)^2} = 2.8046 \mu\text{L}. \end{aligned}$$

**3.2.2.4. Uncertainty arising from the recovery.** The uncertainty arising from the recovery was assessed to cover the test sample treatment steps. Assuming a type A evaluation, the recovery contribution  $u(R)$  was estimated as a standard deviation derived from nine replicated injections. Table 1 shows that the recovery values remain close to unity when comparing the calculated concentration to the added quantity. However, the recovery standard uncertainty shows an improvement when the concentration rises for both compounds.

**3.2.2.5. Uncertainty associated with the chromatographic parameters.** The area ratio, in the mathematical model of the eqn (3), is the term that must represent the influential parameters during the chromatographic run only. This excludes, of course, the use of its variability as such, failing to re-count the already estimated contributions, since this response represents the ultimate output resulting from all the previous analytical procedure steps. However, sources of uncertainty arising from the chromatographic parameters have been already enumerated by Barwick *et al.*,<sup>41</sup> where the main chromatographic effects on the peak area precision are the detection, mobile phase flow-rate, mobile phase composition, column temperature, baseline drift, baseline noise and system integration. Moreover, we have shown in a previous publication, by means of data generated on existing chromatograms, that the baseline noise fluctuations make integration the most influential factor on the peak area measurement at low concentrations.<sup>42</sup> However, this effect is well accounted for in the recovery contribution as it depends on the analyte content, whereas the other chromatographic contributions were assessed using retention time fluctuation since this variability depends once again on the mobile phase flow-rate, mobile phase composition, column temperature and system integration during the chromatographic assays.<sup>41</sup> The repeatability of the retention time, in fact, might characterize the overall performance of the HPLC system, where the relative standard deviation is recommended to be less than 3%.<sup>43</sup> Taking into account the above considerations on the chromatographic influence and its independency from the analyte content, the chromatographic contribution from the standards is estimated as if we have injected the same level concentration  $n$  times, then, we can write:

$$(u(\bar{\Gamma}_{\text{std}}))^2 = \frac{1}{n} (u(\Gamma_{i(\text{std})}))^2 \quad (6)$$

$$\text{And } \left( \frac{u(\bar{\Gamma}_{\text{std}})}{\bar{\Gamma}_{\text{std}}} \right)^2 = \left( \frac{u(\Gamma_{(\text{std})})}{\Gamma_{(\text{std})}} \right)^2. \text{ Since, } \Gamma_{(\text{std})} = \frac{A_{(\text{std})}}{A_{\text{IS}(\text{std})}}.$$

Therefore,

$$\left( \frac{u(\bar{\Gamma}_{\text{std}})}{\bar{\Gamma}_{\text{std}}} \right)^2 = \left( \frac{u(A_{(\text{std})})}{A_{(\text{std})}} \right)^2 + \left( \frac{u(A_{\text{IS}(\text{std})})}{A_{\text{IS}(\text{std})}} \right)^2 \quad (7)$$

The contribution of the chromatographic effects (chroma\_to\_spl/std) is finally represented by the retention time variability and using the standard deviation of the mean in the case of the standards as follows:

$$\left. \begin{aligned} \left( \frac{u(\bar{\Gamma}_{\text{std}})}{\bar{\Gamma}_{\text{std}}} \right)^2 &= \left( \frac{u(\bar{t}_{\text{R}(\text{std})})}{\bar{t}_{\text{R}(\text{std})}} \right)^2 + \left( \frac{u(\bar{t}_{\text{RIS}(\text{std})})}{\bar{t}_{\text{RIS}(\text{std})}} \right)^2 \\ \left( \frac{u(\Gamma_{(\text{spl})})}{\Gamma_{(\text{spl})}} \right)^2 &= \left( \frac{u(t_{\text{R}(\text{spl})})}{t_{\text{R}(\text{spl})}} \right)^2 + \left( \frac{u(t_{\text{RIS}(\text{spl})})}{t_{\text{RIS}(\text{spl})}} \right)^2 \end{aligned} \right\} \quad (8)$$

Table 2 gives calculation of the retention time variability after executing fifteen HPLC-UV runs, by injecting six working standards and nine treated plasma test samples solutions. As we can see, the percent relative standard uncertainty does not exceed the estimated value of 1% when using the chromatographic factors variation reported in,<sup>41</sup> such as 1.5% for temp-

**Table 2** Retention time variability after injecting a set of nine plasma test samples and six standards solutions

	Vitamin A vitamers		Vitamin E vitamers	
	Retinol	Retinyl	Tocopherol	Tocopheryl
Standards				
Mean (min)	2.452	3.005	7.744	9.832
SD/ $\sqrt{6}$	$5.4 \times 10^{-4}$	$9.8 \times 10^{-4}$	$4.4 \times 10^{-3}$	$6.0 \times 10^{-3}$
%USD	0.022	0.033	0.056	0.061
Plasma samples				
Mean (min)	2.465	3.020	7.740	9.830
SD	$1.38 \times 10^{-3}$	$1.75 \times 10^{-3}$	$1.35 \times 10^{-2}$	$1.65 \times 10^{-2}$
%USD	0.056	0.058	0.175	0.168

erature,  $\pm 0.05\%$  for system integration, a maximum of 0.7% effect due to mobile phase variability and  $\pm 0.3\%$  for flow-rate, or those reported in,<sup>42</sup> such as a 0.4% variation for flow-rate and an average of 0.13% for detection for the studied wavelength. However, it reveals a feeble increase in variability, about three fold, for the latter eluted compounds when comparing the two groups of analytes; this indicates the effect due to the enlarged peaks, but attests an insignificant influence over the 10 minutes analysis time of an isocratic elution mode. Furthermore, a more slight difference between the standard solutions (organic medium) and the plasma sample solutions (aqueous medium) attests that is no significant influence from the column behaviour towards the two different injected fluids. In view of that, the retention time variation largely satisfies what has been commonly stated for modern chromatographic systems with a typical precision of about 0.07% for flow-rate and less than 0.15% RSD for mobile phase composition.<sup>44</sup>

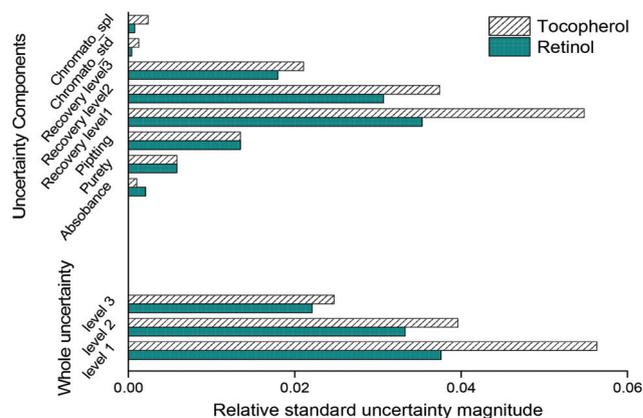
**3.2.3. The combined standard uncertainty.** As summarised in Table 3, the calculated contributions of the identified uncertainty components were combined according to eqn (4) to obtain, at each concentration level, the relative standard uncertainty, which is then expanded by a proper factor to a calcu-

**Table 3** Measurement uncertainty results obtained by the validation and modelling approaches

Uncertainty component	Modelling approach		Validation approach ( $\sigma_{\text{TR}}$ )	
	Retinol	Tocopherol	Retinol	Tocopherol
Absorbance	0.0039	0.0018		
Purity	0.0059	0.0059		
Pipetting	0.0136	0.0136		
Recovery level 1	0.0355	0.0550		
Recovery level 2	0.0308	0.0376		
Recovery level 3	0.0181	0.0212		
Chromato_std	0.0004	0.0008		
Chromato_spl	0.0008	0.0024		
<b>Relative standard uncertainty</b>				
Level 1	0.0385	0.0570	0.0423	0.0609
Level 2	0.0342	0.0405	0.0372	0.0399
Level 3	0.0234	0.0260	0.0223	0.0228
<b>% Relative expanded uncertainty (coverage factor <math>k</math>)</b>				
Level 1	8.62 (2.23)	12.90 (2.26)	11.76 (2.78)	14.06 (2.31)
Level 2	7.57 (2.20)	9.16 (2.26)	10.33 (2.78)	9.42 (2.36)
Level 3	5.28 (2.23)	5.74 (2.20)	7.42 (3.18)	5.39 (2.36)

lated degree of freedom using the Welch–Satterthwaite formula as set out in the JCGM guide.<sup>19</sup> Magnitudes from these calculations were compared to evaluate their relative contribution to the whole uncertainty budget. As can be seen clearly in Fig. 5, the variability of the recovery constituted the largest contribution of the overall uncertainty along the studied ranges, for both analytes. However, the pipetting contribution becomes significant at higher levels, ranging from about 27% to 33% of the overall uncertainty budget at a concentration twice as large as the limit of quantification, respectively, for  $\alpha$ -tocopherol and retinol. It should be noted, however, that this contribution will become more important if other levels are used in the preparation of the calibration plan.

On the other hand, the lowest contribution was observed for the instrumental steps, which together counted at the higher levels a maximum contribution of 3% to 2% for vitamin A and vitamin E compounds, respectively. As for the standard material quality, the highest contribution was about 5 to 6% of the overall uncertainty budget at these same levels. The modelling and the validation approaches can provide comparable uncertainty estimation at each concentration level. As shown in Fig. 6, the tendency of the plotted expanded uncertainty values indicates that both compound types undergo the same circumstances analytically. However, the systematic shift observed for retinol, unlike in the case of tocopherol, may reflect an underestimation of the recovery uncertainty. A more rigorous determination of this component, by accounting, *e.g.* a contribution of the analyte native content, can effectively minimize this gap. On the other hand, this illustration reveals a greater effect along the lower half of the studied range, for vitamin E vitamers, precisely, which are regarded as being more stable vitamin compounds<sup>45</sup> and which undergo less loss compared to the vitamin A compounds.<sup>46</sup> The explanation for this lies in the chemical structure of these two types of molecules and their different behaviour inside the analytical column, hence a less perfect integration of the vitamin E vitamer peaks, which emerge more widely at their bases, as shown in the chromatogram of Fig. 3.

**Fig. 5** Contribution magnitudes of the identified uncertainty components.

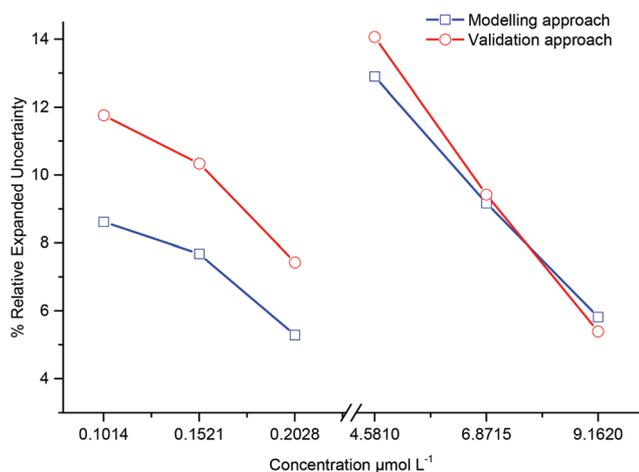


Fig. 6 Comparison of measurement uncertainty estimations obtained by the modelling and validation approaches for retinol (left graphics) and  $\alpha$ -tocopherol (right graphics).

In this concentration range, the determination of the start and end of the peak is strongly influenced by the baseline noise fluctuations. That is why this anomaly was counted in the recovery contribution, as previously mentioned. Moreover, the similarity between these estimates confirms the random nature of the identified errors of the measurement process, specifically for tocopherol.

## 4. Conclusions

The way that we have considered to designate the multi-point linear model based on the one-point calibration equation emphasizes more explicitly the measurement uncertainty estimation through a “bottom-up” approach of an HPLC method by simply exploring all the resulting data from the validation experiments. However, this reasoning opens up numerous perspectives in order to harmonize the modalities of the measurement uncertainty estimation fully in line with the ISO-GUM concepts for HPLC comparative analytical methods using different quantization response functions and to align much more with the metrology requirements, which are often considered difficult to reach, in the case of physicochemical analyses. Otherwise, from an analytical point of view, this approach can be used to reduce uncertainty, *i.e.*, improve the quality of the results, by concentrating efforts on the defective analytical steps. Indeed, we have seen how this approach becomes a powerful tool to quickly identify the major potential sources of error during the analytical process. This allows timely solutions to be found to avoid these errors and to optimize the reduction of measurement uncertainty by accomplishing, in the most laborious cases, some minor changes. As in the case of the example we have in our hands, the overall uncertainty can be reduced by avoiding excessive pipetting and using a micropipette with an equivalent precision but that delivers a slightly wider range of volumes. Better yet, this tool

has helped to avoid an overestimation of the uncertainty by counting the integration effect in the recovery component. Additionally, to minimize the recovery contribution by assaying the low content samples in the higher concentration domains, the injection volume can be doubled, *e.g.* if the lowest obtained uncertainty represents the target required value. Contrary to this, the validation approach, which is limited to giving only an overall estimate of uncertainty, cannot allow this judicious action to track down these errors, which, if attempted, requires a lot of time and cost.

## Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

## Acknowledgements

Thanks to all the members of the Laboratory of Pharmaceutical Analytical Chemistry (CIRM, Institute of Pharmacy, University of Liege) for their hospitality and assistance during the internship period. Also, thanks to Mr Bouaouina, Lure, France, and Mr K. Bindouza, Liège, Belgium, for their valuable support.

## References

- 1 *Eurachem/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, ed. S. L. R. Ellison and A. Williams, 3rd edn, 2012, ISBN 978-0-948926-30-3, <http://www.eurachem.org>.
- 2 International vocabulary of metrology – basic and general concepts and associated terms (VIM), JCGM 200:2012, <http://www.bipm.org>.
- 3 ISO/IEC 17025:2005 (E), Committee on conformity assessment (CASCO), in *General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories*, International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland, 2nd edn, 2005.
- 4 J. Vialle, P. Linet and E. A. Maier, *Analisis*, 1999, 27, 479–490.
- 5 U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (FDA), *Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics, Guidance for Industry, Pharmaceutical Quality/CMC*, 2015.
- 6 FDA Foods Program Guidelines for Chemical Methods Version 1.0 2/28/2012.
- 7 SAS: Guide pour la validation des méthodes d'essai chimico-physiques et l'évaluation de l'incertitude de mes, Document No 324.fw Edition février 2013, rév. 02.
- 8 *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, ed. B. Magnusson and U. Ornemark, 2nd edn, 2014, ISBN 978-91-87461-59-0, <http://www.eurachem.org>.

- 9 European accreditation, Evaluation of the Uncertainty of Measurement in Calibration, EA-4/02 M: 2013, <http://www.european-accreditation.org>.
- 10 ILAC – International Laboratory Accreditation Cooperation, ILAC Policy for Uncertainty in Calibration, ILAC-P14:01/2013, <http://www.ilac.org>.
- 11 Eurachem/CITAC Guide: Guide to Quality in Analytical Chemistry: An Aid to Accreditation, ed. V. Barwick, 3rd edn, 2016, ISBN 978-0-948926-32-7, <http://www.eurachem.org>.
- 12 ISO 21748:2017 (E), *Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty evaluation*, International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland, 2nd edn, 2017.
- 13 M. I. Azilawati, M. H. Dzulkifly, B. Jamilah, M. Shuhaimi and I. Amin, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2016, **129**, 389–397.
- 14 M. Quintela, J. Báguena, G. Gotor, M. J. Blanco and F. Broto, *J. Chromatogr. A*, 2012, **1223**, 107–117.
- 15 EUROLAB Technical Report 1/2007 Measurement uncertainty revisited: Alternative approaches to uncertainty evaluation, Marsh 2007. <http://www.eurolab.org>.
- 16 G. N. W. Leung, E. N. M. Ho, W. H. Kwok, D. K. K. Leung, F. P. W. Tang, T. S. M. Wan, A. S. Y. Wong, C. H. F. Wong, J. K. Y. Wong and N. H. Yu, *J. Chromatogr. A*, 2007, **1163**, 237–246.
- 17 V. R. Meyer, Measurement uncertainty, *J. Chromatogr. A*, 2007, **1158**, 15–24.
- 18 V. J. Barwick, *Evaluating measurement uncertainty in clinical chemistry*, LGC/R/2010/17, UK, 2012.
- 19 JCGM 100:2008, Evaluation of measurement data—Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM), 2008, [http://www.bipm.org/utls/common/documents/jcgm/JCGM\\_100\\_2008\\_F.pdf](http://www.bipm.org/utls/common/documents/jcgm/JCGM_100_2008_F.pdf).
- 20 U.S. Centers for Disease Control and Prevention, *Second National Report on Biochemical Indicators of Diet and Nutrition in the U.S. Population 2012*, National Center for Environmental Health, Atlanta (GA), 2012.
- 21 WHO, *Serum retinol concentrations for determining the prevalence of vitamin A deficiency in populations. Vitamin and Mineral Nutrition Information System*, World Health Organization, Geneva, (WHO/NMH/NHD/MNM/11.3), 2011, <http://www.who.int/vmnis/indicators/retinol.pdf>.
- 22 B. Thompson and L. Amoroso, *Combating Micronutrient Deficiencies: Food-based Approaches*, FAO, 2011.
- 23 WHO, *Guideline: Vitamin A supplementation in infants and children 6–59 months of age*, World Health Organization, Geneva, 2011.
- 24 WHO, *Guideline: Vitamin A supplementation in pregnant women*, World Health Organization, Geneva, 2011.
- 25 WHO/FAO, *Vitamin and Mineral Requirements in Human Nutrition*, World Health Organization, Geneva, 2nd edn, 2004.
- 26 EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies), Scientific Opinion on Dietary Reference Values for vitamin E as  $\alpha$ -tocopherol, *EFSA J.*, 2015, **13**(7), 4149, DOI: 10.2903/j.efsa.2015.4149. <http://www.efsa.europa.eu/efsajournal>.
- 27 Ph. Hubert, J. J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P. A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat and E. Rozet, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2007, **45**, 70–81.
- 28 M. Feinberg, B. Boulanger, W. Dewé and Ph. Hubert, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, **380**, 502–514.
- 29 R. Andrioli and P. Manini, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, **378**, 987–994.
- 30 M. A. Abahusain and J. Wright, *Biomed. Chromatogr.*, 1998, **12**, 89–93.
- 31 Ph. Hubert, J. J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Cohen, P.-A. Compagnon, W. Dewé, M. Feinberg, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, L. Valat and E. Rozet, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2007, **45**, 82–96.
- 32 E. Rozet, V. Wascotte, N. Lecouturier, V. Prétat, W. Dewé, B. Boulanger and Ph. Hubert, *Anal. Chim. Acta*, 2007, **591**, 239–247.
- 33 M. Feinberg, *Validation des méthodes d'analyse quantitatives au moyen du profil d'exactitude*, Technique de l'ingénieur, 2012, p. 224.
- 34 U.S. FDA, *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*, U.S. Department of Health and Human Services FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, DRAFT, 2013.
- 35 ICH Harmonized Tripartite Guideline, Validation of analytical procedures: Text and Methodology, Q2(R1) 2005.
- 36 ISO 5725-5 (E), *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results*, International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland, 1st edn, 1998.
- 37 K.-H. Hsu and C. Chen, *Measurement*, 2010, **43**, 1525–1531.
- 38 Eurachem/CITAC Guide: Setting and Using Target Uncertainty in Chemical Measurement, ed. R. Bettencourt da Silva and A. Williams, 1st edn, 2015, <http://www.eurachem.org>.
- 39 Eurachem/CITAC Guide: Guide to Quality in Analytical Chemistry: An Aid to Accreditation, ed. V. Barwick, 3rd edn, 2016, ISBN 978-0-948926-32-7, <http://www.eurachem.org>.
- 40 S. Leito, K. Mölder, A. Künnapas, K. Herodes and I. Leito, *J. Chromatogr. A*, 2006, **1121**, 55–63.
- 41 V. J. Barwick, *J. Chromatogr. A*, 1999, **849**, 13–33.
- 42 O. Djellouli, H. Bensaoula and B. Dahmani, *Pharma Chem.*, 2016, **8**, 105–112.
- 43 OIML International recommendation, *High performance liquid chromatographs for measurement of pesticides and other toxic substances*, OIML R 112, English edn, 1994.
- 44 S. C. Moldoveanu and V. David, *Essentials in Modern HPLC Separations*, Elsevier, 2013.
- 45 P. B. Ottaway, in *The technology of vitamins in food*, ed. P. B. Ottaway, Springer, Boston MA, 1993, ch. 5, pp. 90–113.
- 46 C. Haas, O. Genzel-Boroviczény and B. Koletzko, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2002, **56**, 906–912.



## UNIVERSITÉ ABOU-BEKR BELKAID - TLEMCEN

### ملخص

في الوقت الحالي أصبح من التطبيقات الشائعة، إضافة ارتياب القياس الى المقدار المقاس من اجل الوقوف على جودة النتيجة المتعلقة بالية القياس. ومع ذلك يظل تحسين هذا العامل بالإضافة الى تكيف أساليب تقديره بشكلان دائماً تحدي تحليلي يتعين معالجته، خاصة في الاختبارات الكيميائية. تقدم في هذه الأطروحة طريقة لتقييم ارتياب القياس باعتماد معادلة المعايرة الخطية الموافقة لمستوى واحد، وذلك من أجل تأسيس مقارنة تصاعدية "Bottom-up" لتقدير االرتياب الخاص بطريقة تحليلية كمية HPLC-UV مبنية على تصميم معايرة متعددة المستويات. ولا ثبات هذه الطريقة، تتبعنا كمثل ذا أهمية، التأثيرات الناتجة اثناء التحديد المتزامن للرتول التوكوفرول، المؤشرين البيو كيميائيين في البلازما البشري للفيتامين أ و هـ. نتأخ هذا التقدير أظهرت اتساقاً مع تلك التي تم الحصول عليها باستخدام الطريقة البديلة المعتمدة على حسابات التحقق من كفاءة الطريقة تحليلية، حيث تم الحصول عند مستوى ثقة 95٪ على ارتياب نسبي موسع أقل من 15٪ للتركيز الضعيفة لكلا الجزئين. مع ذلك، فإن مقارنة النمذجة هذه بينت جميع فوائد استخدامها لتحديد وقياس جميع مساهمات االرتياب الناشئة عن الخطوات المختلفة للعملية التحليلية، كما يبدو أنه يمكن تحقيقها تماماً في طرق HPLC المبنية على المقارنة.

### Abstract

Currently, it is common practice to associate measurement uncertainty with the measurand, in order to judge the quality of a result related to the measurement process. However, the improvement of this parameter as well as the adaptation of its estimation methods remain an analytical challenge, especially in chemical tests. This manuscript outline a measurement uncertainty estimation mode based on the one point linear calibration equation, to fully establish a "bottom-up" approach for estimating the measurement uncertainty of a multi-point calibration-based HPLC-UV quantitative method. To demonstrate this method of estimation, we have followed as an example of interest the influences resulting from the simultaneous determination of two biochemical indicators, namely the vitamers of human plasma retinol and  $\alpha$ -tocopherol. The results of this estimation showed consistency with those obtained with the alternative method based on validation calculations, where the relative expanded uncertainties were found less than 15% for the weak concentrations of the two molecules and at a 95% confidence level. However, the modelling approach shows all the benefits of its use to identify and quantify all the uncertainty contributions arising from the different steps of the analytical process and seems to be quite achievable for comparative HPLC methods.

### Résumé

Actuellement, il est de pratique courante d'associer l'incertitude de mesure au mesurande, afin de juger la qualité d'un résultat lié au processus de mesure. Cependant, l'amélioration de ce paramètre ainsi que l'adaptation de ses modes d'estimation restent toujours un défi analytique, notamment dans les essais chimiques. Ce manuscrit, présente un mode d'estimation de l'incertitude de mesure basée sur l'équation d'étalonnage linéaire à un point afin d'établir une approche "Bottom-up" pour l'estimation de l'incertitude de mesure d'une méthode quantitative HPLC-UV basée sur une conception d'étalonnage multipoints. Pour démontrer ce mode d'estimation, nous avons suivi comme exemple d'intérêt les influences résultant de la détermination simultanée de deux indicateurs biochimiques, à savoir les vitamines du plasma humain, le rétinol et l' $\alpha$ -tocophérol. Les résultats de cette estimation ont montré une cohérence par rapport à ceux obtenus avec la méthode alternative basée sur les calculs de validation, où les incertitudes élargies ont été trouvées inférieures à 15% pour les faibles concentrations des deux molécules et à un niveau de confiance de 95%. Cependant, l'approche de modélisation montre tous les avantages de son utilisation pour identifier et quantifier toutes les contributions d'incertitude découlant des différentes étapes du processus analytique et semble être tout à fait réalisable pour les méthodes HPLC comparatives.