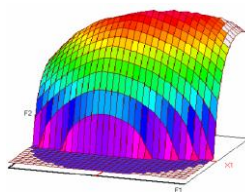




Année Universitaire : 2020-2021



Master Sciences et Techniques CAC Ageq

Chimimétrie et Analyse Chimique : Application à la gestion de la qualité

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

**Dosage des pesticides dans la menthe par  
LC/MS/MS et calcule d'incertitude**

Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Présenté par :

**SAHLI Nazha**

Encadré par :

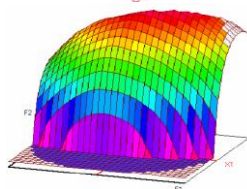
**Dr. A. IDRISSI BOUTAHER (ONSSA)**

**Pr. Abdelhadi LHASSANI (FST-Fès)**

**Soutenu Le 12 Juillet 2021 devant le jury composé de :**

- Pr. Abdelhadi LHASSANI            FST-Fès
- Pr. Hicham CHTIOUI                FST-Fès
- Pr. Adiba KANDRI RODI            FST-Fès

**Stage effectué à : Laboratoire Régional d'Analyses et de Recherches de Casablanca (ONSSA)**



## Master ST CAC Ageq

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Nom et prénom : SAHLI Nazha

Année Universitaire : 2020/2021

Titre : Dosage des pesticides dans la menthe par LC/MS/MS et calcul d'incertitude

### Résumé

L'accréditation permet aux laboratoires d'essais et d'analyses de prouver la qualité de leur organisation et d'assurer la fiabilité de leurs résultats, or la validation de méthode a été intégralement pensé pour faciliter et fiabiliser les processus d'accréditation des analyses.

La validation analytique est réalisée en utilisant une nouvelle approche. Cependant, cette nouvelle stratégie est basée sur l'erreur totale (erreur systématique + erreur aléatoire), qui consiste à construire un outil de décision, appelé profil d'exactitude.

Les résultats collectés sous les conditions de la fidélité intermédiaire ont permis de calculer l'intervalle de tolérance où une proportion élevée des résultats futurs sera comprise dans les limites d'acceptations ( $\pm 30\%$ ).

L'ensemble des résultats obtenus, confirme que notre méthode analytique est déclarée valide et fiable pour quantifier les échantillons d'une manière exacte et fidèle que le laboratoire aura à analyser.

**Mots clés** : Accréditation, Validation, Profile d'exactitude, Erreur totale, spectrophotométrie LC MS/MS



# Table des matières

---

Introduction générale .....	1
Partie 1 : Synthèse bibliographique .....	4
I. Généralité sur les pesticides .....	5
I.1. Définition .....	5
I.2. Historique de pesticide.....	5
I.3. Différentes classes des pesticides .....	6
I.4. La composition d'une formulation pesticide .....	8
I.5. Formulation des pesticides .....	9
I.6. Temps de retrait ou délai d'attente .....	9
I.7. La limite maximale de résidus .....	9
II. Généralité sur la menthe .....	Erreur ! Signet non défini.
II.1. Définition .....	10
II.2. Présentation de la molécule recherchée .....	10
II.3. Principaux risques sanitaires .....	11
II.4. Les limites maximales de résidus ou la concentration de travail.....	11
III. Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse tandem (LC/MS-MS) .....	12
III.1. La chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	12
III.2. La spectrométrie de masse en tandem .....	15
IV. Validation analytique.....	17
IV.1. Généralité sur la validation .....	17
IV.2. Objectif de la validation .....	18
IV.3. Critères de validation.....	18
V. Validation analytique basée sur le profil d'exactitude et la notion de l'erreur totale .....	21
V.1. Introduction.....	21
V.2. Fonctions de réponse.....	23
V.3. Calcule des concentrations retrouvées par prédiction inverse.....	23
V.4. Le calcul Statistique des différents paramètres.....	24
Partie 2 : Partie expérimentale .....	29
I. Matériel et méthodes.....	30
I.1. Introduction.....	30
I.2. Objet et domaine d'application .....	30
I.3. Définition .....	30
I.4. Réactifs utilisés .....	30

<b>I.5.</b>	<b>Appareillage .....</b>	<b>31</b>
<b>I.6.</b>	<b>Préparation et stockage des échantillons .....</b>	<b>31</b>
<b>I.7.</b>	<b>Mode opératoire .....</b>	<b>31</b>
<b>II.</b>	<b>Résultats et discussion .....</b>	<b>36</b>
<b>II.1.</b>	<b>Validation Analytique.....</b>	<b>36</b>
<b>II.2.</b>	<b>Calcul des critères de la validation.....</b>	<b>42</b>
	<b>Conclusion .....</b>	<b>46</b>

---

# Les abréviations

---

**PAM** : Plantes Aromatiques et Médicinales

**ONSSA** : Office national de la sécurité sanitaire des produits alimentaires

**LC-MS/MS** : Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse

**LRARC** : Laboratoire Régional d'Analyses et de Recherches de Casablanca

**FAO** : Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

**m.a.** : Matière active

**DAR** : délai avant récolte

**LMR** : La limite maximale de résidus

**DJA** : Dose Journalière Acceptable

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**HPLC** : La chromatographie liquide en haute performance

**LC** : La chromatographie liquide

**ISO** : Organisation internationale de normalisation

**LD** : Limite de détection

**LQ** : limite de quantification

**FDA** : Food and Drug Administration

**SFSTP** : Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques

**ANOVA** : Analyse de la variance

**CM** : carrée moyenne

**CV** : coefficients de variation

**NCG** : Adsorbant noir de carbone graphite

**PSA** : amines primaires et secondaires,

**ppb** : partie par milliard

**ppm** : partie par million

**C** : concentration

**V** : volume

**ACN** : Acétonitrile

**MeOH** : Méthanol

**EUP** : Eau ultra pure

**CE** : Energie de collision

**TR** : Temps de rétention



# *Dédicaces*

*À mes parents et mon marie et tout qui ont  
participé à la réalisation de ce travail*







# REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, je tiens à remercier :

Mon encadrant le professeur **Abdelhadi LHASSANI**

Mercie de me guider à chaque étape de sa réalisation. Vous avez toujours réservé le meilleur accueil, malgré vos obligations professionnelles. Vos encouragements inlassables, votre amabilité. Je saisi cette occasion pour vous exprimer ma profonde gratitude tout en vous témoignant mes respects.


Je remercie également *Mr.* ABDELAZIZ ELIDRISSI BOUTAHER chef de service de contrôle des produits et des intrants j'ai eu le privilège de travailler parmi votre équipe et d'apprécier vos qualités et vos valeurs. Votre sérieux, votre compétence et votre sens du devoir ont énormément marqués. Veuillez trouver ici l'expression de mes respectueuses considérations et ma profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines.

A Dr. EL DABBAGGHE Malak et Mme EL FILLALI ZAINAB Pour leurs conseils et aussi pour le temps qu'ils m'ont consacré durant la période de mon stage.

Tout le personnel de la Laboratoire régionale d'analyse et de recherche qui ont mis à ma disposition toutes les informations et les connaissances nécessaire pour ma formation et aussi qui m'ont permis d'effectuer cette période de stage dans d'excellentes conditions.

Je tiens à remercier également les membres de jury **Pr. Hicham CHTIOUI et Pr. Adiba KANDRI RODI** qui m'ont fait l'honneur d'examiner ce travail et de participer à ce jury.

Que tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin, trouvent ici l'expression de notre sincère reconnaissance.



# **Introduction générale**

L'agriculture marocaine a accompli de grands progrès en termes de modernisation et de diversification. Hier comme aujourd'hui, l'activité agricole représente d'ailleurs l'un des piliers de l'économie marocaine.

Ainsi au Maroc, le secteur des Plantes Aromatiques et Médicinales (PAM) connaît une forte augmentation de la demande. Parmi ces plantes, la menthe verte, occupe une place primordiale. Son usage quasi-quotidien dans l'aromatisation du thé est associé aux usages et coutumes marocains. La menthe est aussi connue pour son utilisation dans les domaines alimentaire, médicinal et aromatique.

La productivité et la qualité de ses cultures dépend de l'utilisation des pesticides comme élément majeur contre les maladies et surtout les ravageurs. Toutefois, ces dernières années, avec la demande accrue des consommateurs, la menthe a souvent été critiquée pour la persistance des résidus de pesticides qui lui sont appliqués, pouvant avoir des répercussions néfastes sur la santé humaine et l'environnement [1].

Ces dangers font l'objet des plans de surveillance et de contrôle dans un cadre réglementaire par l'Office national de la sécurité sanitaire des produits alimentaires (ONSSA), qui a pour mission le contrôle et la certification sanitaire à l'exportation de la menthe.

Dans ce travail nous nous intéressons au dosage des pesticides dans la menthe par la technique de la Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC/MS-MS) et calcul de l'incertitude.

Le travail réalisé comprend deux parties :

- Une partie bibliographique, rapportant les études relatives aux pesticides, la menthe et la validation.
- Une partie expérimentale, dans laquelle on présente les critères de validation par l'approche de l'erreur totale d'une méthode d'analyse des résidus de pesticides dans la menthe par LC-MS/MS et calcul de l'incertitude.

## Introduction générale

### Présentation de l'office National de sécurité Sanitaire des produits alimentaires (ONSSA)

❑ L'Office National de Sécurité Sanitaire des Produits Alimentaires (ONSSA) est un établissement public doté de la personnalité morale et de l'autonomie financière créée en 2009 par la loi n° 25-08 et placée sous la tutelle de l'Etat. Il exerce, pour le compte de l'Etat, les attributions relatives à la protection de la santé du consommateur et à la préservation de la santé des animaux et des végétaux. Il est appelé à appliquer la politique du gouvernement en matière de sécurité sanitaire des végétaux, des animaux et des produits alimentaires depuis les matières premières jusqu'au consommateur final, y compris les aliments pour animaux.

#### ❑ **Les missions de l'ONSSA**

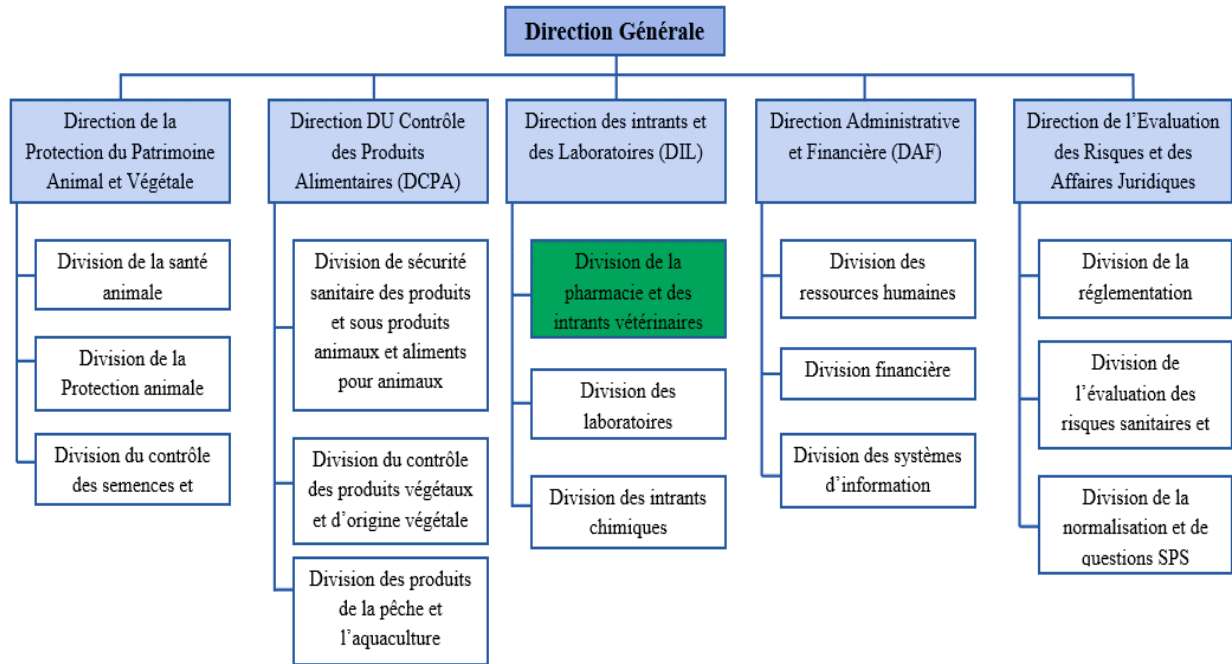
Afin d'accomplir ses attributions relatives à la protection de la santé du consommateur et à la préservation de la santé des animaux et des végétaux, l'Office National de Sécurité Sanitaire des Produits Alimentaires a été chargé :

- D'Assurer la surveillance et la protection sanitaire du patrimoine végétal et animal au niveau national et aux frontières.
- D'Assurer la sécurité sanitaire des produits alimentaires depuis les matières premières jusqu'au consommateur final, y compris les produits de la pêche et les aliments pour animaux.
- Homologuer et contrôler les intrants agricoles (semences, pesticides, engrais) et les médicaments vétérinaires.

#### ❑ **Organigramme**

L'ONSSA est organisé en structures centrales, régionales et provinciales. Au niveau central il comprend les structures suivantes :

## Introduction générale



### Présentation de Laboratoire Régional d'Analyses et de Recherches de Casablanca (LRARC)

LRARC fait partie du réseau des laboratoires de l'Office National de Sécurité Sanitaire des Produits Alimentaire (voir Annexe I) placé sous la tutelle du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche Maritime. Cet Office a été créé par le Dahir n° 1-09-20 du 22 Safar 1430 (18 février 2009) portant promulgation de la loi n° 25-08 portant création de l'Office national de sécurité sanitaire des produits alimentaires. Le laboratoire procède à l'analyse des objets d'essais et à l'interprétation des résultats par rapport à la réglementation nationale. A défaut, il fait appel à la réglementation des pays importateurs pour les produits exportés ou à la réglementation internationale. Le LRARC est organisé sur le plan technique en deux sections :

❑ **Service de contrôle des produits et des intrants** : comprend trois unités

- Unité microbiologie des aliments.
- Unité chimie bromatologie.
- Unité toxicologie.

❑ **Service de Santé animale et végétale** : comprend cinq unités

- Unité Virologie
- Unité Bactériologie et parasitologie animale.
- Unité Sérologie
- Unité Biologie Moléculaire
- Unité phytopathologie [2]

---

## **Partie 1 : Synthèse bibliographique**

---

## **I. Généralité sur les pesticides**

### **I.1. Définition**

Le Code international de conduite pour la distribution et l'utilisation des pesticides (FAO, 1990) définit ainsi les pesticides: toute substance ou association de substances qui est destinée à repousser, détruire ou combattre les ravageurs, y compris les vecteurs de maladies humaines ou animales, et les espèces indésirables de plantes ou d'animaux causant des dommages ou se montrant autrement nuisibles durant la production, la transformation, le stockage, le transport ou la commercialisation des denrées alimentaires, des produits agricoles, du bois et des produits ligneux, ou des aliments pour animaux, ou qui peut être administrée aux animaux pour combattre les insectes, les arachnides et les autres endo- ou ecto-parasites.

Le terme pesticide comprend les substances destinées à être utilisées comme : régulateurs de croissance des plantes, défoliants, agent de dessiccation, agent d'éclaircissage des fruits ou pour empêcher la chute prématurée des fruits, ainsi que les substances appliquées sur les cultures, soit avant, soit après la récolte, pour protéger les produits contre la détérioration durant l'entreposage et le transport [3].

### **I.2. Historique de pesticide**

Les pesticides ont très tôt été utilisés pour protéger les cultures et la santé publique, afin de limiter la propagation de parasites et autres maladies et d'améliorer la qualité de la production alimentaire.

On retrouve des traces de l'utilisation du soufre en Grèce antique dès 1000 ans avant. L'usage du soufre comme agent de fumigation est mentionné dans les œuvres d'Homère. De la même manière, Pline l'Ancien, naturaliste romain de l'1<sup>er</sup> siècle, recommandait dans ses écrits l'usage de l'arsenic comme insecticide.

Un pas est franchi au XIX<sup>ème</sup> siècle avec l'essor de la chimie minérale, qui va fournir de nombreux pesticides minéraux tirés des sels de cuivre. L'usage de fongicides à base de sulfates de cuivre se répand. C'est à cette époque qu'est inventée la bouillie bordelaise, mélange de sulfate de cuivre et de chaux destiné à lutter contre certaines maladies cryptogamiques de la vigne et de la pomme de terre comme le mildiou [4].

### I.3. Différentes classes des pesticides

Les pesticides sont en général spécifiques d'une classe de nuisibles, et c'est en fonction de leur cible qu'ils sont listés dans l'Index Phytopharmaceutique, qui répertorie la majorité des spécialités commerciales disponibles en France. Il existe principalement trois grandes familles chimiques qui sont les herbicides, les insecticides et les fongicides :

#### ☐ Herbicides

##### Définition

Les herbicides sont des substances chargées de ralentir la croissance ou de détruire les plantes cibles, nommées adventices ou mauvaises herbes. Les plantes adventices sont considérées comme ennemis des cultures car elles entrent en compétition avec la culture elle-même pour la ressource organique et minérale du sol, l'eau, l'espace et la lumière. Les herbicides peuvent agir dans le sol au niveau des racines ou directement sur feuilles.

##### Classification par mode d'action

Les herbicides possèdent différents sites d'actions sur les plantes :

- Perturbateurs de la photosynthèse
- Perméabilisant de la membrane cellulaire
- Perturbateurs de la croissance : inhibition de la division cellulaire, perturbation de l'élongation, inhibiteurs de la synthèse de la cellulose
- Inhibiteurs de la synthèse des lipides
- Inhibiteurs de la synthèse d'acide aminés
- Inhibiteurs de la synthèse de pigments

#### ☐ Fongicides

##### Définition

Les fongicides agricoles permettent de combattre les champignons phytopathogènes susceptibles de provoquer des dégâts sur les plantes cultivées et les récoltes. Les pertes potentielles provoquées par les maladies fongiques sont estimées entre 10 et 30%. En dehors des effets quantitatifs, il existe des champignons pouvant affecter les qualités des productions végétales comme la présence de mycotoxines toxiques pour l'homme, ou des altérations organoleptiques comme la présence de *Botrytis cinerea* sur le raisin.

## Partie 1 : synthèse bibliographique

### Classification par mode d'action

Il existe des fongicides affectant le processus respiratoire, des fongicides affectant la biosynthèse de chitine, des mélanines, des stérols, des acides nucléiques, et des fongicides agissant sur les microtubules.

#### ☐ Insecticides

### Définition

Les insecticides sont des substances actives ayant la propriété de tuer les insectes, leurs larves et/ou leurs œufs. Les insecticides organiques de synthèse sont des molécules carbonées, synthétisées, et se distinguent des insecticides inorganiques ou minéraux. Parmi les insecticides organiques, trois grandes familles se distinguent : les organophosphorés, les carbamates, enfin les pyréthriinoïdes de synthèse, qui présentent une toxicité moindre que les organophosphorés et les carbamates, et s'emploient à faible dose.

### Classification par mode d'action

- Action sur le système nerveux.
- Action sur le système respiratoire.
- Régulateurs de croissance des insectes [5].

### Un classement par groupe chimique :

Il s'agit d'un classement technique à partir de la molécule principale utilisée. On distingue :

- Les organochlorés, parmi les plus anciens et les plus persistants, dont le fameux DDT déjà évoqué. Ils sont surtout utilisés comme insecticides en agriculture et dans les métiers du bois. (Exemples : aldrine, dieldrine, etc..).
- Les organophosphorés, eux aussi utilisés comme insecticides.
- Les carbamates, fongicides et insecticides.
- Les phénoxy, herbicides - (Exemple 2-4 D).
- Les organo-azotés, repérables par le suffixe « zine », principalement utilisés comme herbicides. (Exemple : atrazine, simazine, etc..).
- Les urées, repérables par le suffixe « uron », utilisés comme herbicides et fongicides. (Exemple : DIURON, ISOPROTURON, etc...) [6].



### I.4. La composition d'une formulation pesticide

La formulation des pesticides est une combinaison de matière active (ma) est la partie la plus importante d'un produit, car c'est le produit chimique toxique qui tue / lutte contre le ravageur visé. Tous les autres produits chimiques dans la formulation sont là pour l'aider. Il est très important d'identifier la (ou les) matière(s) active(s), afin d'être en mesure de remonter la filière et d'en savoir plus sur le pesticide.

Les pesticides sont formulés pour les rendre plus sûrs ou plus faciles utiliser. Les entreprises ajoutent des ingrédients inertes aux pesticides destinés à l'utilisation finale des produits. Les ingrédients inertes n'ont diluants ou de supports. Dans de nombreux cas, des ingrédients inertes rendent le produit formulé plus sûr, plus facile à manipuler et à appliquer, et / ou plus efficace (Daniel et Michael., 2015). Parmi les ingrédients inertes on a :

#### Solvant

Un produit chimique utilisé pour dissoudre la ou les ma (s) pour les rendre liquides.

#### Surfactant

Abréviation d'agent actif de surface, appelée aussi humecteur, épandeur et collant n Réduit la tension de la surface, augmente l'émulsion, la diffusion et les propriétés humectants des formulations liquides pour permettre au pesticide de coller aux parasites ou de s'étendre de manière plus uniforme sur les feuilles et les surfaces de la plante.

#### Adjuvant

Un produit chimique qui réduit le potentiel de nuisance à une récolte par un pesticide, aussi accroître son efficacité. Il n'est actif qu'en présence des ma des pesticides.

#### Vecteur

Un solide inerte utilisé pour diluer la ma du pesticide pour en faciliter l'application.

#### Coloris et marqueurs olfactifs

Ils donnent au pesticide une odeur ou un goût désagréable pour réduire les risques d'ingestion du produit par accident. Des colorants sont également utilisés pour enrober les semences, afin de faire la distinction entre les semences traitées et non traitées.

Les granules sont parfois colorés afin de les rendre visibles sur le sol pour pouvoir mieux contrôler et corriger les taux d'application et de propagation [7].

### I.5. Formulation des pesticides

Une formulation pesticide est un mélange de produits chimiques qui contrôle efficacement un ravageur. La formulation d'un pesticide implique son traitement pour améliorer son stockage, sa manipulation, sa sécurité, son application ou son efficacité. Il existe différents types de formulations :

- Les formulations sèches ou solides : (Les poudres pour poudrage, mouillable, soluble, les granulés...).
- Les formulations liquides ou mouillées : suspension concentrée, aérosol
- Autre formulation : Pesticides fumigènes [8].

### I.6. Temps de retrait ou délai d'attente

Le délai de sécurité après traitement (aussi appelé délai d'attente ou simplement délai de sécurité) désigne la période minimale qui doit s'écouler entre le moment de l'application d'un pesticide dans une zone ou sur une culture et le moment où des personnes peuvent circuler sur cette surface ou dans cette zone sans vêtements protecteurs ni équipement de protection individuelle.

Le temps d'attente est déterminé en fonction des limites maximales de résidus [9]. Dans notre cas le délai d'attente ou délai avant récolte (DAR) des pesticides dans la menthe est 7 jours [10].

### I.7. La limite maximale de résidus

La limite maximale de résidus (LMR) pour un pesticide dans ou sur un produit destiné à l'alimentation humaine ou animale est la concentration maximale de résidus légalement tolérée du pesticide en question lorsque celui-ci est utilisé correctement, conformément aux bonnes pratiques agricoles.

$$\text{LMR} = \frac{\text{DJA} \left( \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) * \text{poid d'unhomme en kg}}{\text{quantité d'aliment consommé chaque jour} \left( \frac{\text{kg}}{\text{j}} \right)}$$

DJA : Dose Journalière Acceptable [11].

## II. Etude de l'azoxystrobine dans la menthe

### II.1. Définition

Les menthes forment un genre (*Mentha*) de plantes herbacées vivaces de la famille des Lamiacées (Labiées). Ce genre comprend de nombreuses espèces, dont beaucoup sont cultivées comme plantes aromatiques et condimentaires, ornementales ou médicinales. Le principal producteur est le Maroc notamment pour la préparation du thé à la menthe. Aujourd'hui la culture des menthe acquis une grande valeur économique [12].

### II.2. Présentation de la molécule recherchée

La culture de menthe est pratiquée sur des petites surfaces. Au cours de son développement, la menthe est attaquée par des agents biologiques nuisibles nécessitant un contrôle au moyen de produits chimiques de synthèse.

Les principaux problèmes phytosanitaires de la menthe sont soulevés par les chenilles des lépidoptères, des pucerons, de l'oïdium, l'altise, la rouille et des cicadelles [1]

Dans ce travail, nous sommes intéressés à un principe actif largement utilisé dans les formulations des pesticides :

#### L'azoxystrobine

Est une substance active de produit phytosanitaire, qui présente un effet fongicide, appartient à la famille chimique des strobilurines.

Les strobilurines font quant à elle partie de la plus grande famille des inhibiteurs externes de la quinone Les fongicides de cette famille sont tous unisites c'est-à-dire qu'ils n'agissent que sur un site d'action. Ils sont des inhibiteurs de la respiration mitochondriale et donc de la production d'énergie des cellules

L'azoxystrobine est soluble dans sept mono solvants (méthanol, éthanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol et acétate d'éthyle) et deux solvants mixtes binaires (n-propanol + acétate d'éthyle et méthanol + acétate d'éthyle) à différentes températures de 288,15 à 328,15 K.

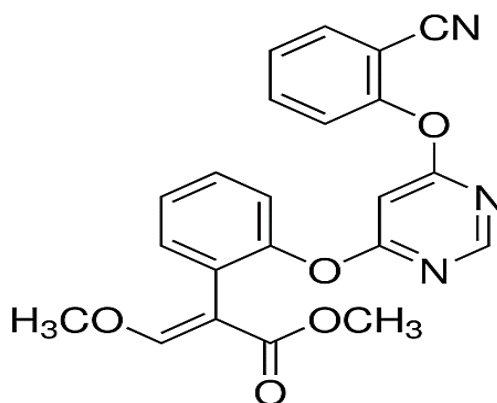


Figure 1: Structure chimique d'azoxystrobine [13].

### II.3. Principaux risques sanitaires

Les résidus de pesticides contenus dans les menthes peuvent être une source de contamination des huiles essentielles qui sont utilisées en tant qu'additif alimentaire, cosmétique et dans l'industrie pharmaceutique. Les pesticides possèdent tous, à différents degrés, un potentiel de toxicité et peuvent malheureusement être toxiques pour des organismes non visés, y compris l'Homme. Par leurs sérieux effets secondaires sur la santé humaine et sur l'environnement, les consommateurs, les utilisateurs ou les contaminés en général peuvent courir des risques sanitaires tels que le cancer, la suppression du système immunitaire, la destruction hormonale, la diminution de la capacité intellectuelle, une reproduction anormale avec des avortements et la modification de l'ADN. L'exposition aux organophosphorés affecte aussi la qualité du spermatozoïde.

En effet, selon l'organisation mondiale de la santé, le nombre annuel des intoxications par les pesticides se situe entre 1 et 5 millions, dont plusieurs milliers de cas de morts sont les fœtus, les enfants, les nourrissons et les personnes âgées qui sont les plus sensibles.

L'exposition aux pesticides peut se faire par les voies cutanée, respiratoire et orale dont le risque s'accroît généralement avec l'augmentation de la dose qui n'améliore pas nécessairement l'efficacité du traitement et, aucun pesticide ne peut être utilisé de façon sécuritaire sans le port de vêtements de protection individuelle propre et en bon état. [14].

### II.4. Les limites maximales de résidus ou la concentration de travail

Matières actives	LMRs ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
AZOXYSTROBINE	10

### III. Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse tandem (LC/MS-MS)

La chromatographie liquide en haute performance (HPLC) est largement utilisée dans le domaine de la chimie analytique. Le couplage à la spectrométrie de masse en tandem est un puissant outil pour détecter, identifier et quantifier spécifiquement des molécules de façon très précise.

Les couplages de la LC avec des systèmes à triple quadripôles, dits « en tandem » (LCMS/MS) représentent aujourd'hui les plus fortes ventes dans l'industrie pharmaceutique (en particulier pour les études de toxicocinétique et de pharmacocinétique), ainsi probablement que dans les laboratoires de toxicologie médicale ou de suivi thérapeutique pharmacologique.



*Figure 2: Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse tandem (Agilent).*

#### III.1. La chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

La chromatographie liquide en haute performance permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification, sa grande précision permet la recherche de traces.

Au niveau chromatographique, Le temps de rétention d'analyte varie selon l'interaction entre la phase stationnaire, les molécules étant analysées et le ou les solvants utilisés. À mesure que l'échantillon passe à travers la colonne, il interagit entre les deux

## Partie 1 : synthèse bibliographique

phases à des vitesses différentes, principalement à cause des polarités différentes des analytes. Un analyte sera plus ou moins retenu sur la colonne selon que son affinité avec celle-ci est grande ou petite. Un composé apolaire sera par exemple, plus retenu, sur une colonne apolaire qu'un composé polaire. Et sur une colonne apolaire, un solvant apolaire à un pouvoir éluatif plus grand qu'un solvant polaire [15].



*Figure 3: Appareil de la Chromatographie Liquide à Haute Performance [16].*

### III.1.1. Les composants de la HPLC :

- **Réservoir de La phase mobile** : Ce réservoir est rempli de la **phase mobile** qui est un solvant ou un mélange de solvants qui entraîne les solutés à travers la colonne, et qui doit être de pureté analytique et filtré par des filtres en téflon, pour éliminer les particules solides qui risqueraient d'endommager la pompe ou de bloquer la colonne.
- **La phase stationnaire (la colonne)** : La colonne est l'élément majeur de la chaîne HPLC. C'est un tube construit par un matériau le plus possible inerte aux produits chimiques, souvent en inox ou en verre. C'est un support plus ou moins poreux recouvert d'un gel (liquide greffé) qui a les propriétés désirées pour retenir les molécules de solutés.

Le choix d'une colonne HPLC est lié aux paramètres suivants :

- Type de la phase stationnaire
- Longueur
- Diamètre des particules
- Débit de la phase mobile supportable.

## Partie 1 : synthèse bibliographique

Le type de la colonne diffère selon la méthode choisie. Les principales phases stationnaires utilisées sont :

### ❑ La phase normale :

Cette phase est constituée de gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi, lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaires qui sortent en tête.

### ❑ La phase inverse :

Cette phase est majoritairement composée de gel de silice greffée par des chaînes linéaires de 18 atomes de carbones (C18). Cette phase apolaire et nécessite donc un éluant polaire. Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. Ainsi cette phase qui est utilisée dans l'HPLC

#### • Pompe :

Elle doit fournir la phase mobile à un débit constant à une certaine pression pour atteindre la colonne, La pression à imposer dépend des facteurs (Débit de la phase mobile, Taille des grains de la phase stationnaire et Géométrie de la colonne).

Elle permet de travailler soit :

- **En mode isocratique**, c'est à dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.
- **En mode gradient**, c'est à dire avec une variation des constituants du mélange d'éluant.

#### • Injecteur :

Le type d'injecteur le plus couramment utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe (10, 20, 50  $\mu$ L...). Cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne.

#### • Vanne à boucle d'échantillonnage :

Elle possède 2 positions. La première permet le remplissage de la boucle d'injection de volume fixe, la seconde permet la mise en circulation de l'échantillon dans le système chromatographique. [15]

## **Partie 1 : synthèse bibliographique**

### **III.1.2. Fonctionnement de l'appareil**

- La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique.
- Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.
- En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

### **III.2. La spectrométrie de masse en tandem**

La spectrométrie de masse est une technique de détection extrêmement sensible qui permet de déterminer des structures moléculaires, d'analyser qualitativement et quantitativement une vaste gamme de composés biologiques et chimiques.

Son principe est le suivant : un composé organique introduit dans le spectromètre de masse est ionisé par différents procédés (bombardement électronique, ionisation chimique...). Parmi les ions obtenus, l'ion moléculaire (ion parent ou ion précurseur) permet la détermination de la masse molaire du composé.

Il peut y avoir rupture des liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire, formant ainsi des ions fragments (ion fils) caractéristiques puisque cette dissociation éventuelle ne se fait pas au hasard mais selon des mécanismes bien déterminés.

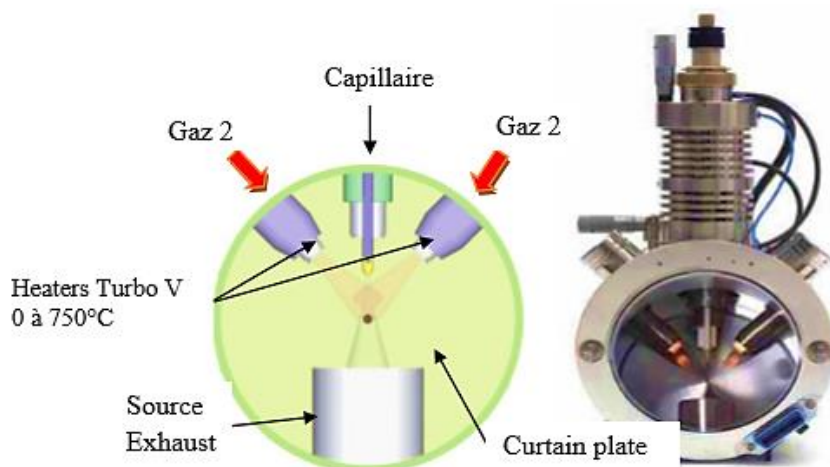
Les ions formés sont ensuite séparés en fonction de leur rapport masse/charge par l'application d'un champ magnétique et/ou électrique, puis collectés par un détecteur. L'ensemble de ces ions constitue le spectre de masse dont le lecteur permet l'identifier de la structure moléculaire [16].

#### **Principe générale :**

A la sortie de la colonne chromatographique, le composé en solution est introduit par un capillaire dans la source d'ionisation : ESI ou l'électrospray. C'est l'interface dans laquelle les molécules sont ionisées.

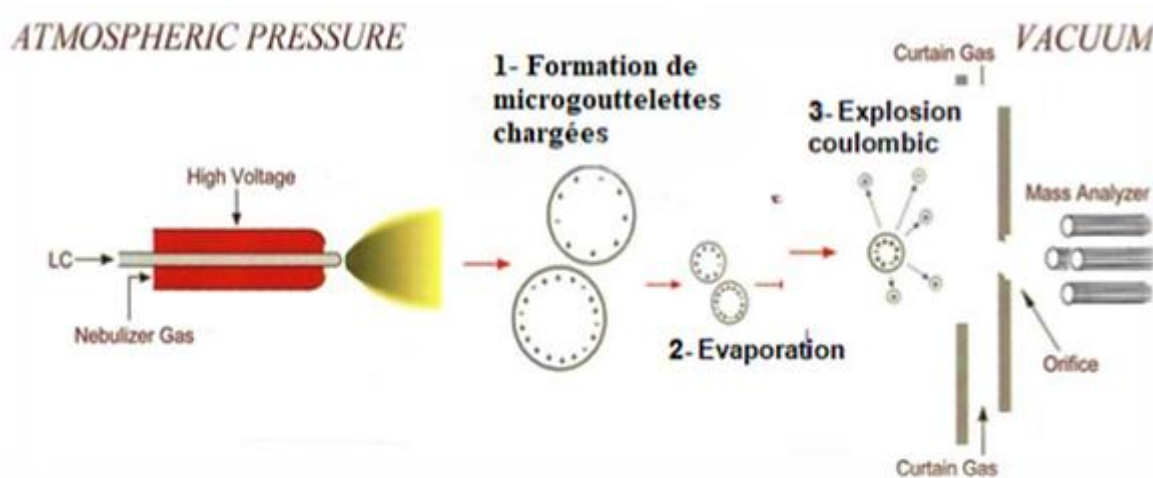


## Partie 1 : synthèse bibliographique



**Figure 4:** Source d'ionisation [17].

Le principe de l'électrospray peut être décrit en trois étapes qui sont : la production de gouttelettes hautement chargées (Mode Positif M+H / Mode négatif : M-H) contenant des molécules de solvant et d'analyte, la réduction du diamètre de ces gouttelettes, et enfin le passage des ions de la solution vers la phase gazeuse [16].



**Figure 5:** Schéma d'une ionisation par Electrospray [18].

Les ions sont ensuite dirigés dans la direction du premier quadripôle (le quadripôle de transfert ou Q0) qui a pour rôle la focalisation du faisceau d'ions avant l'entrée dans l'analyseur.

L'analyseur se comporte ici de trois quadripôles : le premier (Q1) va permettre de sélectionner un ion précurseur, L'ion précurseur est amené à la chambre de collision (Q2) qui est le quadripôle responsable de la fragmentation des ions parents par une énergie de collision définie préalablement et sous l'effet d'un bombardement par des atomes d'azote en ions fils.

## Partie 1 : synthèse bibliographique

Les ions fils (ions produits) sont sélectionnés encore une fois selon leur rapport  $m/z$  dans un deuxième analyseur (Q3), seuls les ions prédéfinis sont triés [16].

Chaque molécule se trouve ainsi identifiée par deux couples (ou plus) ions parents/ ions fils, les deux couples présentent deux transitions, la première transition produite est utilisée pour la quantification et sert également à identifier la molécule, la deuxième est complémentaire pour la confirmation de l'identité de la molécule.

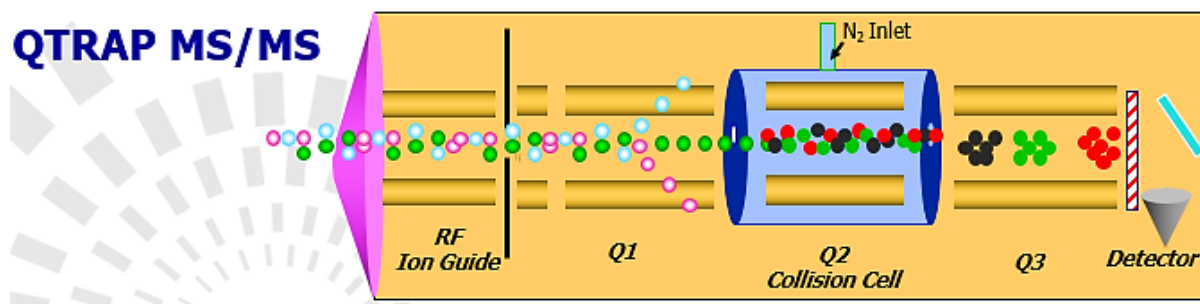


Figure 6: Schéma résumant les trois quadripôles [19].

Ou RF Ion Guide est le Q0

Le faisceau d'ion, ayant traversé l'analyseur de masse, doit être détecté et transformé en un signal utilisable. Pour ce faire, il existe plusieurs types de détecteur capable de transformer un courant ionique faible en un signal mesurable. Les détecteurs multiplicateurs d'ions sont les plus utilisés en spectrométrie de masse.

Un système d'exploitation et de traitement de données (ordinateur muni d'un logiciel approprié), permet l'enregistrement des mesures, de contrôler l'instrument et d'interpréter les résultats illustrés sous forme d'un chromatogramme représentant le signal par rapport au temps de rétention de chaque molécule. [16]

## IV. Validation analytique

### IV.1. Généralité sur la validation

La validation d'une méthode analytique est l'opération par laquelle on s'assure que ses résultats répondent au problème de manière satisfaisante pour l'utilisateur. Elle s'efforce de détecter et contrôler les sources d'erreur possible liée à la méthode étudiée donc la définition générale est proposée par FDA : « Valider une méthode consiste à démontrer, avec un degré de confiance élevé et sous une forme documentée, que la méthode permet d'obtenir un résultat analytique qui atteint les spécifications définies à l'avance » [20].

## IV.2. Objectif de la validation

L'objectif de la validation est de démontrer qu'elles correspondent à l'usage pour lequel elle est prévue, et permettre de donner aux laboratoires ainsi qu'aux autorités compétentes, les garanties que chaque mesure qui sera réalisée ultérieurement en routine, une fois la procédure validée, sera suffisamment proche de la « vraie valeur » inconnue de l'échantillon ou du moins comprise dans une limite acceptable, en fonction de la finalité de la procédure. Le but est de minimiser le risque tant au niveau du producteur que du futur consommateur [20].

## IV.3. Critères de validation

Chaque méthode d'analyse possède un certain nombre de propriétés caractéristiques, des critères qui qualifient les performances de la méthode sous l'objectif d'obtenir des résultats pertinents au moindre coût.

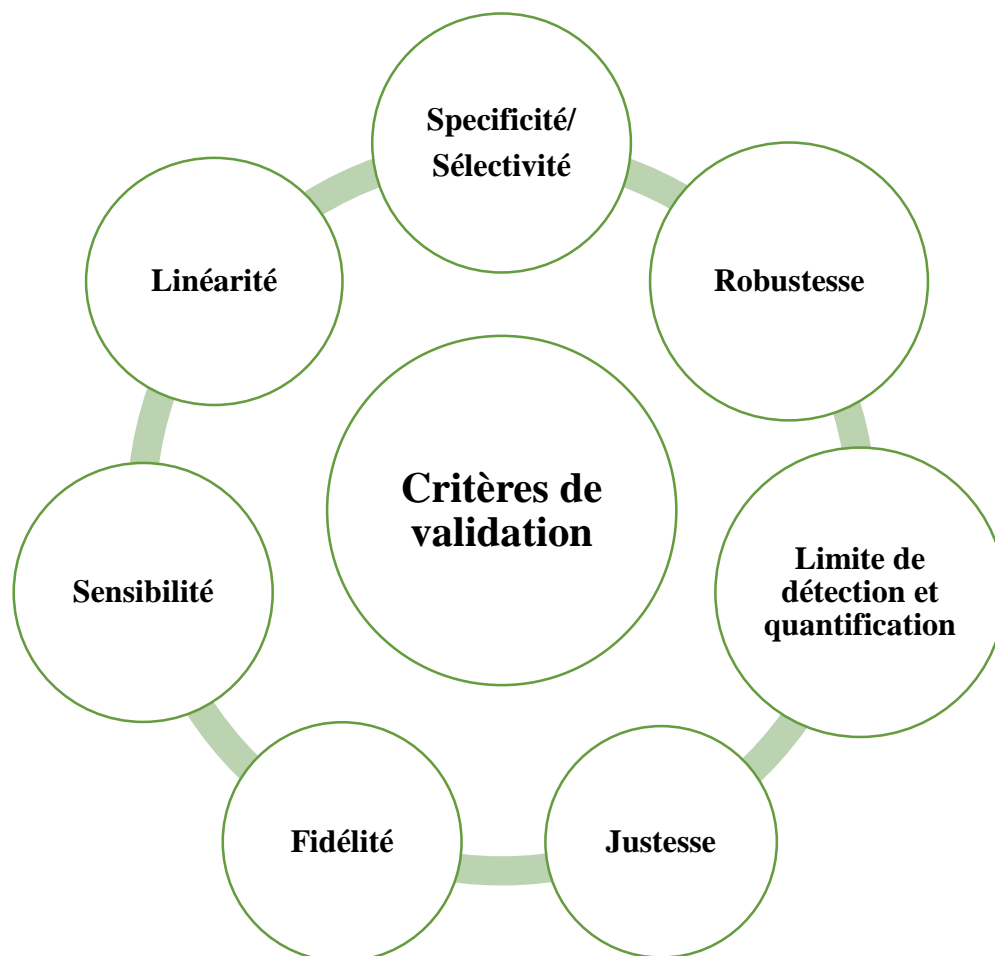


Figure 7: Les critères de validation.

## Partie 1 : synthèse bibliographique

### IV.6.1. Spécificité / sélectivité

La **sélectivité** d'une procédure analytique caractérise l'aptitude d'une méthode à réduire le nombre de composées qui seront mise en évidence, tandis que le **spécificité** est sa capacité d'établir l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants présents(interférences)

### IV.6.2. Linéarité

La linéarité d'une procédure analytique est sa capacité à l'intérieur de l'intervalle de dosage, à fournir des résultats directement proportionnels à la concentration en substance présente dans l'échantillon. Néanmoins il faut bien déterminer le domaine de linéarité de la méthode pour l'analyte considéré.

### IV.6.3. Justesse

Exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultat d'essais et une valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnelle vraie, ou bien valeur de référence acceptée. La mesure de la justesse est généralement exprimée en termes de recouvrement et de biais relatif ou absolu (erreur systématique).

### IV.6.4. Fidélité

Exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion) entre une série de mesure provenant de multiple prise d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites. La fidélité fournit une indication sur les erreurs aléatoires.

*Tableau 1: Types de fidélité.*

<b>Fidélité</b>	<b>Echantillon</b>	<b>Méthode</b>	<b>Laboratoire</b>	<b>Opérateur</b>	<b>Equipements</b>	<b>Jour</b>
<b>Répétabilité</b>	Même	Même	Même	Même	Même	Même
<b>Fidélité intermédiaire</b>	Même	Même	Même	Différent	Différent	Différent
<b>Reproductivité</b>	Même	Même	Différent	Différent	Différent	Différent

### IV.6.5. Exactitude

L'exactitude correspond au degré de concordance entre la valeur de référence ou la valeur considéré comme véritable par convention et la valeur obtenue. L'exactitude présente

## **Partie 1 : synthèse bibliographique**

l'erreur totale liée au résultat car l'étroitesse de l'accord ainsi observées la résultante des erreurs aléatoires et systématiques.

Exactitude = fidélité + justesse

Erreur totale = erreurs systématiques + erreurs aléatoires.

### **IV.6.6. Limite de détection LD**

La limite de détection d'une procédure d'analyse est la plus petite quantité à examiner dans un échantillon pouvant être détectée, sans forcément être quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure.

La détermination de la LD s'effectue par plusieurs moyens :

- Méthode par détermination sur blanc
- Norme XPT 90
- Méthode par la courbe d'étalonnage
- Approche de l'erreur totale

### **IV.6.7. Limite de quantification LQ**

La limite de quantification ou limite de dosage est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrite avec une exactitude (fidélité +justesse) définie. La limite de quantification n'a de sens que si son exactitude a été démontrée. Elle a été obtenue sous la forme :

$$\mathbf{LQ = 3.33*LD}$$

La limite de quantification est plus pertinente que la limite de détection, cette dernière étant par convention le 1/3 de la limite de quantification.

### **IV.6.8. Robustesse**

La robustesse d'une méthode analytique est une mesure de sa capacité à ne pas être affectée par des modifications faibles, délibérées de facteurs associés à la procédure. Elle donne une indication de la fiabilité de la procédure dans les conditions normales d'application [20].

## V. Validation analytique basée sur le profil d'exactitude et la notion de l'erreur totale

### V.1. Introduction

Les **approches classiques** (dites aussi approches de critères) fondées sur les tests d'hypothèses, utilisent séparément les deux erreurs, aléatoire (fidélité) et systématique (justesse) pour la prise d'une décision. On retrouve trois types à savoir, approche descriptive, approche de différence et approche d'équivalence. Cependant ces approches conventionnelles présentent quelques problèmes que la pratique a pu mettre en évidence tel que l'utilisation inadéquate des statistiques, manque de souplesse et généralisation, évaluation séparée de la justesse et de la fidélité ne contrôle pas le risque fournisseur et client...

Ainsi les paramètres fidélité, justesse, linéarité, etc. ne sont plus que des « statistique » ou « éléments de calcul » permettant de contribuer pour chiffrer la garantie. Ils aident à poser un diagnostic, c'est-à-dire nous renseigner sur un point particulier de la performance de la méthode étudiée, comme par exemple la linéarité ou le passage de l'ordonnée par 0. Dès lors ces paramètres ne sont plus considérés comme outils de décision mais plutôt outils de diagnostics [20].

Pour faire face à ces problèmes, une nouvelle commission SFSTP a été créée en 2003. Cette dernière propose une nouvelle stratégie pour la validation des procédures quantitatives analytiques. Cette stratégie consiste à construire un outil de décision graphique simple appelé profil d'exactitude qui repose sur l'utilisation d'un intervalle de tolérance de type «  $\beta$ -expectation » comme méthodologie statistique. La supériorité de cette approche par rapport à ceux qui existaient déjà, est nettement claire [21].

Le profil d'exactitude, construit à partir des intervalles de tolérance permet donc, comme illustré dans la figure 8, de décider de la capacité ou non d'une procédure à fournir des résultats dans les limites d'acceptation. La zone en couleur vert montre l'intervalle de dosage dans lequel la procédure est capable de quantifier avec une exactitude connue et un risque fixé par l'analyste. C'est ainsi que dans ces conditions, si l'analyste est prêt à assumer par exemple un risque de 5%, il pourra au terme de la validation de sa procédure garantir que 95 fois sur 100 les futures mesures fournies par celle-ci seront comprises dans les limites d'acceptation fixées en fonction des contraintes de son secteur d'activité [22].

## Partie 1 : synthèse bibliographique

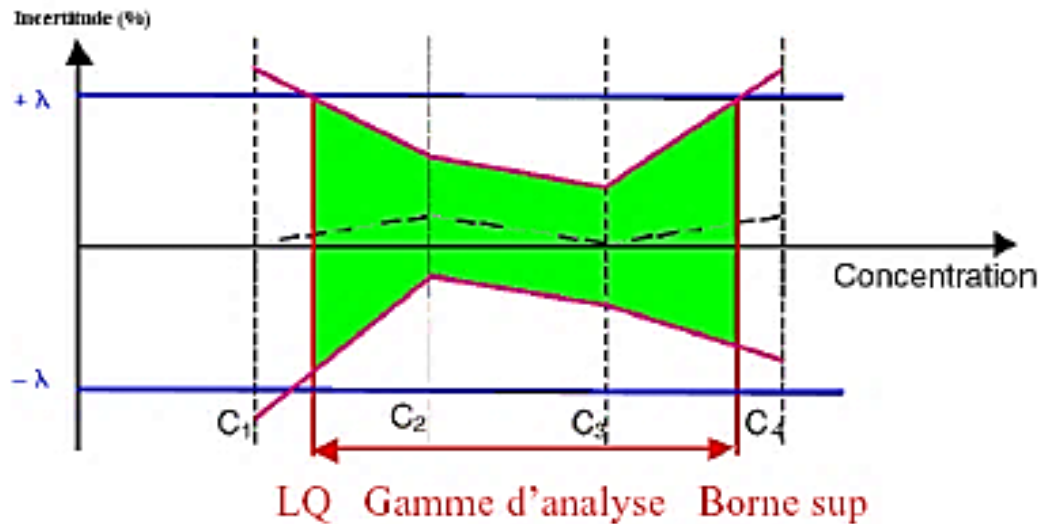


Figure 8: Profil d'exactitude.

Un objectif évident pour une méthode est qu'elle soit susceptible de fournir un résultat aussi exact que possible pour chaque échantillon inconnu à venir. Traduire cet objectif en termes statistiques, signifie que l'analyste veut connaître la probabilité selon laquelle la différence entre la valeur rapportée  $Y$  et la valeur de référence  $T$  reste inférieure à une limite d'acceptation (ou un pourcentage) fixée l'avance et, si possible mais non nécessairement, que cette différence soit petite. Cet objectif peut alors être représenté par l'équation 1 (Eq.1), dans laquelle  $\lambda$  représente la limite d'acceptation et  $\beta$  la probabilité considérée acceptable (par exemple 95%) que l'erreur sur les futures mesures réalisées, une fois la méthode validée, se situent en dessous de la limite d'acceptation fixée.

$$\Pr(Y - T < \lambda) \geq \beta \text{ (Eq.1) [23]}$$

Parmi les avantages de cette nouvelle approche de validation :

- Elle permet non seulement de simplifier l'approche de validation d'une procédure mais aussi l'estimation de l'incertitude de mesure sur la base des données de validation.
- Elle permet de générer différents modèles d'étalonnage et possibilité de choisir le plus adéquat pour calculer, par la prédiction inverse, la concentration en retour.
- Elle est considérée comme une approche globale qui peut être appliquée quel que soit le domaine d'activité et la matrice étudiée [20].

## V.2. Fonctions de réponse

Pour les méthodes indirectes, il est nécessaire d'exprimer la réponse instrumentale  $Y$  en fonction des concentrations  $x$  des étalons, à l'aide d'un modèle mathématique  $f$  de la forme.

$$Y = f(x)$$

Les fonctions  $f$  classiquement utilisées sont regroupées au tableau (2), mais cette liste n'est pas limitative. Les paramètres  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  sont appelés paramètres du modèle.

*Tableau 2: Principales fonctions de réponse utilisables pour un étalonnage.*

Fonction	Equation	Paramètre
Droite passant par l'origine	$Y = \beta X$	$\beta$
Droite	$Y = \alpha + \beta X$	$\alpha$ et $\beta$
Fonction quadratique	$Y = \alpha + \beta X + \gamma X^2$	$\alpha$ et $\beta$ et $\gamma$
Fonction logarithmique	$Y = \alpha \ln(X) + \beta$	$\alpha$ et $\beta$
Fonction racine carrée	$\sqrt{Y} = \alpha \sqrt{X} + \beta$	$\alpha$ et $\beta$

## V.3. Calcule des concentrations retrouvées par prédiction inverse

Pour les méthodes indirectes, les modèles d'étalonnage servent à calculer les concentrations retrouvées, à partir des données au plan de validation, en utilisant la fonction inverse du modèle d'étalonnage, selon le modèle mathématique suivant :

$$\hat{X} = z = f^{-1}(Y)$$

Le tableau (3) fournit ces équations selon la fonction de réponse choisie.



Tableau 3: Calcule des concentrations retrouvées [20].

Fonction de réponse	Fonction inverse de calcul de la concentration retrouvée
Droite passant par l'origine	$Z = \frac{Y}{a_1}$
Droite	$Z = \frac{Y + a_0}{a_1}$
Fonction quadratique	$Z = \frac{-a_1 + \sqrt{a_1^2 - 4a_2(a_0 - Y)}}{2a_2}$
Racine carre	$Z = \left(\frac{\sqrt{Y} - a_0}{a_1}\right)^2$
Fonction logarithmique	$Z = e^{\left(\frac{\ln(Y) - a_0}{a_1}\right)}$

#### V.4. Le calcul statistique des différents paramètres

##### 1.1.1. Le calcul de la fidélité :

La fidélité fournit une indication sur les erreurs due au hasard. Elle a été estimée en calculant la répétabilité et la fidélité intermédiaire à chaque niveau de concentration utilisé en validation.

Pour le calcul des variances inter-série et intra-série, il suffit de réaliser une analyse de la variance « Balanced One-Way ANOVA » pour chaque niveau de concentration.

La variance intra-série ( $S^2_{w,j}$ ) s'estime comme suit :

$$S^2_{w,j} = C_{\text{Intra-série}}$$

La variance inter-série ( $S^2_{B,j}$ ) se calcul par :

## Partie 1 : synthèse bibliographique

Si  $CM_{intra-série} < CM_{inter-série}$  alors  $S^2_B, j = (CM_{intra-série} - CM_{inter-série}) / n$

Avec  $n$  = nombre de répétitions par niveaux

L'estimation de la variance intra-série donne une estimation de la variance de répétabilité tandis que la somme d'estimations des variances intra et inter-série donne une estimation de la variance de la fidélité intermédiaire :

Variance de Répétabilité :  $S^2_{rép} = CM_{intra\ groupe} = S^2_{intra-série}$  Eq (3)

Variance de Fidélité intermédiaire :  $S^2_{FI} = S^2_{inter-série} + S^2_{intra-série}$

Les coefficients de variation de répétabilité et de fidélité intermédiaire

$$CV_r = \frac{S_w}{X} * 100 \quad CV_{FI} = \frac{S_{FI}}{X} * 100$$

Avec  $X$  = la moyenne des concentrations récupérées

### 1.1.2. Le calcul de la justesse :

La justesse ou le Biais fournit une indication sur les erreurs systématiques de la procédure analytique et obtenu en calculant la différence entre la moyenne arithmétique des concentrations introduites et la moyenne des concentrations calculées. Le biais peut s'exprimer en terme absolu, relatif ou de recouvrement par rapport aux quantités introduites, comme suit :

**Biais absolu**  $B_j = Z_j - X_j$

**Biais relatif**  $B_j (\%) = \frac{Z_j - X_j}{X_j} * 100$

**Recouvrement**  $R_j (\%) = \frac{Z_j}{X_j} * 100$

Avec :

$Z_j$  : est la moyenne des réponses à chaque niveau  $j$

$X_j$  : est la concentration introduite

## Partie 1 : synthèse bibliographique

### 1.1.3. Le calcul des intervalles de tolérance :

Ce qui nous importe en validation, n'est pas la validité des résultats obtenus avec l'erreur totale, mais plutôt la garantie ou une représentation de ce que la même procédure analytique pourra donner comme résultats dans le futur, c'est le rôle de l'intervalle de tolérance.

L'intervalle de tolérance sera calculé pour chaque niveau de concentration envisagé avec les standards de validation.

Les bornes inférieure et supérieure d'intervalles de tolérance sont calculées comme suite :

$$U_j = \text{Biais (\%)} + t\left(v; \frac{1+\beta}{2}\right) * \sqrt{1 + \frac{1}{n*p*B_j^2} * \text{CVFI}}$$

$$L_j = \text{Biais (\%)} - t\left(v; \frac{1+\beta}{2}\right) * \sqrt{1 + \frac{1}{n*p*B_j^2} * \text{CVFI}}$$

Avec :  $t\left(v; \frac{1+\beta}{2}\right)$  : est le quantile de distribution t de student a v degré de liberté

$$R_j = \frac{S^2_{b,j}}{S^2_{w,j}}$$

$$v = \frac{(R_j + 1)^2}{\frac{(R_j + 1)^2}{p-1} + \frac{1-\frac{1}{n}}{np}}$$

$$B_j = \sqrt{\frac{R_j + 1}{n R_j + 1}}$$

## V.6. La construction du profil d'exactitude

Le profil d'exactitude peut être construit de différentes façons, en fonction du type de données traité. Les éléments graphiques principaux entrant dans le profil d'exactitude sont les suivants :

- Axe horizontal** : La concentration théorique des niveaux
- Axe vertical** : Les limites des intervalles de tolérances d'espérance  $\beta$  calculées sur les concentrations retrouvées et exprimées en pourcentages
- Interprétation**

## Partie 1 : synthèse bibliographique

Pour utiliser le profil d'exactitude en vue de valider une méthode, il faut avoir fixé les deux critères de décision suivants :

**Les limites d'acceptabilité  $\pm\lambda$**  : Elles servent à traduire les objectifs pratiques des utilisateurs. Elles délimitent un intervalle autour de la valeur de référence. Le plus souvent, ces limites sont réglementaires ou issues de la réglementation. Mais dans le cas où il n'existe pas de référence établie, il convient de prendre en compte les attentes des utilisateurs finaux, comme une LQ donnée.

**La proportion  $\beta$**  : Elle représente la proportion de futurs résultats qui seront en moyenne compris dans les intervalles de tolérance. La valeur choisie pour  $\beta$  dépend largement du champ d'application (contrôle sanitaire, contrôle de fabrication, etc.).

### V.7. L'incertitude de mesure

#### V.6.1. Introduction

De nombreuses décisions importantes sont fondées sur les résultats d'analyses chimiques qualitatives. Ces résultats sont considérés comme une information technique très utile, relatif à un produit ou à un service, que l'on communique à un utilisateur.

La validité et la pertinence des décisions prises dépendent donc directement de la qualité des informations communiquées et donc de la qualité des résultats fournis.

Dès lors, dans certains secteurs de la chimie analytique, il est maintenant formellement requis que les laboratoires prennent des mesures en matière d'assurance qualité pour démontrer que les méthodes sont capables de fournir des données de qualité requise. de telle mesure incluent : utilisation des méthodes validées d'analyse ; la participation à des essais d'aptitude ; l'accréditation basée sur la norme ISO/CEI 17025.

Ces exigences obligent les chimistes à établir la qualité de leurs résultats et en particulier à démontrer leur capacité à fournir des mesures utiles en évaluent **l'incertitude de mesure** avec un degré de confiance acceptable.

#### V.6.2. Définition

##### □ Mesurande :

Est la grandeur mesurée, en chimie analytique le mesurande sera la concentration de l'analyte.

## Partie 1 : synthèse bibliographique

### ❑ Incertitude :

La définition du terme « incertitude (de mesure) » est tirée de la version actuelle adoptée pour le Vocabulaire International des Termes Fondamentales et Généraux en Métrologie : « un paramètre associé aux résultats de mesure, qui caractérise la dispersion des valeurs et pourrait être raisonnablement attribué au mesurande » .

#### V.6.3. Calcul de l'incertitude

L'incertitude de mesurande  $z$  est calculée de la manière suivante [23] :

$$u(z) = \frac{U_j - L_j}{2 * t}$$

**Incertitude élargie :**  $U_j(\%) = 2 * u_j$

**Incertitude élargie relatif :**  $U_j(\%) = \frac{u_j}{x} * 100$

Avec

$U_j$  : intervalle de tolérance haute

$L_j$  : intervalle de tolérance basse

$t$  : loi de student de ddl ( $V$ )

---

## **Partie 2 : Partie expérimentale**

---

## I. Matériel et méthode

### I.1. Introduction

L'analyse des résidus de pesticides est réalisée en utilisant la norme NF EN 15662, appelée QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe), la version de mai 2018.

### I.2. Objet et domaine d'application

La présente norme européenne décrit une méthode d'analyse UPLC/SM/SM des résidus de pesticides dans le Groupe des Herbes Condimentaires et sous-groupe des Plantes Herbacées dont la matrice représentative choisie est la menthe verte fraîche.

### I.3. Définition

**Standard :** substance non contenue dans l'échantillon possédant des propriétés physico-chimiques aussi proches que possible de celles de l'analyte qui doit être identifié.

**Analyte :** substance devant être détectée, identifiée et/ou quantifiée et dérivés apparaissant au cours de son analyse.

**Étalon interne :** Le rôle de l'étalon interne est de corriger les erreurs d'injection

**Echantillon dopé :** est un échantillon auquel on ajout un volume précis du standard afin d'être confiance des résultats trouvées.

### I.4. Réactifs utilisés dans tous les modules d'extraction, de purification

- Solutions étalons internes et solutions étalons de contrôle qualité dans l'acétonitrile
- Acétonitrile, qualité CLHP
- Mélange de sels tampons pour la deuxième extraction/partition :
- 4 g  $\pm$  0,2 g de sulfate de magnésium anhydre,
- 1 g  $\pm$  0,05 g de chlorure de sodium,
- 1 g  $\pm$  0,05 g de citrate trisodiquedihydraté et 0,5 g  $\pm$  0,03 g de citrate d'hydrogène disodiquesesquihydraté.
- Adsorbant à amines primaires et secondaires
- Adsorbant noir de carbone graphite (NCG)
- Solution d'acide formique dans l'acétonitrile, fraction volumique  $\varphi = 5$  ml d'acide formique/100 mL.

### **I.5. Appareillage utilisé dans tous les modules d'extraction et de purification**

- Tubes à centrifuger avec bouchons à vis, 50 mL
- Pipettes automatiques, adaptées à la manipulation de volumes de 10 µL à 100 µL, de 200 µL à 1 000 µL et de 1 mL à 10 mL, ou pipettes en verre graduées de 10 mL.
- Tubes à centrifuger jetables en polypropylène avec bouchons à vis, 15 mL.
- Agitateur, horizontal, vertical ou orbital, au moins 200 min<sup>-1</sup>
- Centrifugeuses, adaptées aux tubes à centrifuger utilisés dans le mode opératoire et capables d'atteindre une vitesse d'au moins 3 000 g.
- Dispositif de broyage
- Congélateur, fonctionnant entre -18 °C et -25 °C.
- Agitateur de type vortex.

### **I.6. Préparation et stockage des échantillons**

- L'échantillon ne doit pas être abimé, en voie de détérioration.
- L'échantillon doit être broyé le plus finement possible pour proposer une surface de contact la plus grande.
- L'échantillon lors du broyage doit être maintenu à basse température pour éviter les dégradations des molécules thermolabiles : échantillon congelé, utilisation de carboglace, utilisation d'azote liquide.
- L'échantillon doit être homogène et congelé, en attente et entre les analyses

### **I.7. Mode opératoire**

#### **I.7.1. Extraction**

Dans cette étape deux extractions sont recommandés par la norme, dont une première est réalisée après la prise d'essai de 10g de l'échantillon (menthe broyée) homogène est extrait avec 10 ml de l'acétonitrile.

La deuxième extraction a pour objectif la séparation des phases organique et aqueuse afin de récupérer tous les pesticides dans la phase d'acétonitrile. Pour ceci nous réalisons un ajout du sulfate de magnésium, du chlorure de sodium et des sels tampons de citrate, le mélange est agité énergiquement pendant 1min et centrifugé au-delà de 3000g pendant 5min.



## Partie 2 : partie expérimentale

### I.7.2. Purification

- Après centrifugation, une aliquote de 6 ml de la phase organique est purifiée par l'utilisant des adsorbants en vrac ainsi que du sulfate de magnésium pour éliminer l'eau résiduelle.
- Après purification avec des amino-adsorbants (par exemple, adsorbant à amines primaires et secondaires, PSA) pour éliminer les impuretés et du noir de carbone graphite (NCG).
- Le mélange subit une agitation énergétique pendant 2min suivis d'une centrifugation au-delà de 3000g pendant 5min.
- Le surnageant est récupéré et filtré à 0.22µm.

### I.7.3. Analyse

#### □ Préparation de la gamme

La gamme menthe est préparée dans l'extrait d'un blanc matrice

A partir d'un mixte de standard des pesticides de 2 ppm on prépare deux concentrations 100 ppb et 200 ppb (1ppb = 1µg/kg = 0,001ppm).

➤ 200 ppb = 200 µg /kg = 200 µg /L

$$C_i * V_i = C_f * V_f$$

$$V_i = \frac{C_f * V_f}{C_i} = \frac{200 \text{ ppb} * 1 \text{ ml} * 1000}{2 \text{ ppm} * 1000} = 100 \mu\text{L}$$

➤ 100 ppb

$$C_i * V_i = C_f * V_f$$

$$V_i = \frac{C_f * V_f}{C_i} = \frac{100 \text{ ppb} * 1 \text{ ml} * 1000}{2 \text{ ppm} * 1000} = 50 \mu\text{L}$$

A partir d'un mixte de standard des pesticides de 500 ppb on prépare trois concentrations 50 ppb, 20 ppb et 10ppb

➤ 50 ppb

$$C_i * V_i = C_f * V_f$$

$$V_i = \frac{C_f * V_f}{C_i} = \frac{50 \text{ ppb} * 1 \text{ ml} * 1000}{500 \text{ ppb}} = 100 \mu\text{L}$$

## Partie 2 : partie expérimentale

### ➤ 20 ppb

$$C_i * V_i = C_f * V_f$$

$$V_i = \frac{C_f * V_f}{C_i} = \frac{20 \text{ ppb} * 1 \text{ ml} * 1000}{500 \text{ ppb}} = 40 \mu\text{L}$$

### ➤ 10ppb

$$C_i * V_i = C_f * V_f$$

$$V_i = \frac{C_f * V_f}{C_i} = \frac{10 \text{ ppb} * 1 \text{ ml} * 1000}{500 \text{ ppb}} = 20 \mu\text{L}$$

Le tableau suivant représente les volumes et les solutions utilisées dans la préparation de la gamme

*Tableau 4 : Préparation de la gamme.*

	Blanc	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3	Niveau 4	Niveau 5
[C] en ppb	0	10	20	50	100	200
V(μL) du mixte 2 ppm					50	100
V(μL) du mixte 500 ppb		20	40	100		
V(μL) ajouté en ACN grade LC MS/MS	100	80	60	0	50	0
V(μL) ajouté en étalon interne d'injection		10	10	10	10	10
V(μL) ajouté en EUP		480	480	480	480	480
V(μL) ajouté en ACN avec 5% d'acide formique		10	10	10	10	10
V(μL) ajouté en blanc matrice	400	400	400	400	400	400

### ❑ Préparation des échantillons dopés

- On dope à des concentrations supérieures ou égales à la LMR
- Le volume de dopage est calculé de la même manière que la gamme
- Le dopage des échantillons est effectué à partir d'un mixte de 5 ppm

## Partie 2 : partie expérimentale

### ➤ **10 ppb**

$$C_i * V_i = C_f * V_f$$

$$V_i = \frac{C_f * V_f}{C_i} = \frac{10 \text{ ppb} * 10 \text{ ml} * 1000}{5 \text{ ppm} * 1000} = 20 \mu\text{L}$$

### ➤ **20ppb**

$$C_i * V_i = C_f * V_f$$

$$V_i = \frac{C_f * V_f}{C_i} = \frac{20 \text{ ppb} * 10 \text{ ml} * 1000}{5 \text{ ppm} * 1000} = 40 \mu\text{L}$$

### ➤ **50ppb**

$$C_i * V_i = C_f * V_f$$

$$V_i = \frac{C_f * V_f}{C_i} = \frac{50 \text{ ppb} * 10 \text{ ml} * 1000}{5 \text{ ppm} * 1000} = 100 \mu\text{L}$$

### ➤ **100ppb**

$$C_i * V_i = C_f * V_f$$

$$V_i = \frac{C_f * V_f}{C_i} = \frac{100 \text{ ppb} * 10 \text{ ml} * 1000}{5 \text{ ppm} * 1000} = 200 \mu\text{L}$$

### ➤ **200ppb**

$$C_i * V_i = C_f * V_f$$

$$V_i = \frac{C_f * V_f}{C_i} = \frac{200 \text{ ppb} * 10 \text{ ml} * 1000}{5 \text{ ppm} * 1000} = 400 \mu\text{L}$$

Avec :

$V_f = 10 \text{ ml}$  est le volume du solvant d'extraction (ACN)

Ces volumes calculés sont ajoutés chacun à un échantillon et laisser reposer au moins une heure à l'obscurité.

### **Préparation du Vial à analyser**

- 400 $\mu\text{L}$  de l'échantillon à analyser
- 480 $\mu\text{L}$  d'Eau Ultra pure (EUP)
- 100  $\mu\text{L}$  d'acétonitrile grade UHPLC/MS
- 10 $\mu\text{L}$  d'étalon interne d'injection

## Partie 2 : partie expérimentale

- 10µL d'acétonitrile acidifié à 5% avec de l'acide formique, afin d'améliorer la stabilité au stockage de certains pesticides sensibles aux bases.

### □ Préparation de la phase mobile

La phase Mobile utilisée est répartie sur deux phases :

- **Phase aqueuse (A)** : H<sub>2</sub>O (EUP) LCMS + 5 mmol formiate d'ammonium + 0.1% Acide formique.
- **Phase Méthanol (B)** : MeOH LCMS + 5 mmol formiate d'ammonium + 0.1% Acide formique

### □ Conditions d'analyse sur CL/SM/SM

- Colonne Zorbax Eclipse plus C18 (Rapid Resolution HD, 2.1\*50mm / 1.8-Micron Agilent).
- Volume d'injection : 5µL
- Débit : 0.6 mL/min
- Température du four : 40°C
- Temps d'analyse 20min.
- Gradient :

Temps (min)	Phase mobile A%	Phase mobile B%
0	90	10
3	70	30
17	0	100
18	0	100
18	90	10
20	90	10

*Tableau 5: Transition recherchée et temps de rétention.*

Analytes	Ion précurseur (m/z)	Ions produits (m/z)	CE	TR (min)	Polarité
Azoxystrobine	404,1	372,1	11	9,071	Positive
		344,1	20		

## Partie 2 : partie expérimentale

### ❑ Méthodologie de l'étude

- Injection des standards de la famille des pesticides (la gamme) dans le système LC-MS/MS pour fixer le temps de rétention et pour vérifier la présence des transitions.
- Injection après extraction des échantillons blancs de la matrice de la menthe exempte des pesticides.
- Injection des échantillons dopés à différents niveaux.
- Injection du blanc.

## II. Résultats et discussion

### II.1. Validation Analytique

A Préparation de la Gamme de Standard d'étalonnage :

A partir des standards des pesticides, on a réalisé 3 séries de 5 niveaux de concentration, préparés indépendamment avec 2 répétitions pour chaque niveau de concentration, à raison d'une série par jour, les niveaux de concentration sont de : 10, 20,50, 100, et 200 µg/kg.

*Tableau 6: Données de standards d'étalonnage.*

Niveau	Concentration (µg/kg)	Réponse analytique (air)		
		Série n°1	Série n°2	Série n°3
1	10,00	25026	29548	24938
	10,00	26805	29685	25509
2	20,00	49675	41528	45507
	20,00	48550	46471	42568
3	50,00	113927	114529	115042
	50,00	114816	111004	111547
4	100,00	271582	253085	273898

## Partie 2 : partie expérimentale

	100,00	294659	254168	263483
5	200,00	481581	440611	420315
	200,00	482472	446895	417705

### II.1.1. Préparation de la gamme de standard de validation

Le plan de validation est obtenu par l'injection des échantillons dopés

Il est formé de p= 3 séries (jours) avec m= 5 niveaux de concentration et n= 3 répétitions par jour et par niveau.

*Tableau 7: Données de standards de validation*

Niveau	Concentration (µg/kg)	Réponse analytique (Aire)		
		Série n°1	Série n°2	Série n°3
1	10,00	27943,00	28865	29898
	10,00	27759,00	28652	29987
	10,00	27685,00	28752	29898
2	20,00	54432	50982	56865
	20,00	51896	51386	54864
	20,00	52652	53538	52835
3	50,00	122593	120012	120114
	50,00	122653	121050	120230
	50,00	122886	120124	120012
4	100,00	229843	226389	222594
	100,00	228729	225164	220235
	100,00	229657	225245	221235
5	200,00	487741	450678	440500
	200,00	489113	455548	440124
	200,00	485831	455576	441240

## Partie 2 : partie expérimentale

### II.1.2. Fonctions de réponse

A la recherche du modèle le plus adéquat, à savoir celui qui nous permettra d'obtenir une garantie de résultats futures incluses dans les limites d'acceptation, nous avons généré plusieurs modèles reliant la surface et la concentration. Le tableau ci-dessous regroupe les résultats statistiques de tous les modèles générés :

*Tableau 8: Résultats des paramètres de modèles.*

Modèle	Jours	Pente	Ordonné à l'origine
Linéaire simple	1	2451,6	4590
	2	2228,9	7354
	3	2128	12317
Transformation racine	1	49,72	1,5
	2	46,69	14,7
	3	46,34	14,1
Transformation logarithmique	1	0,9993	3,4005
	2	0,944	3,4764
	3	0,9791	3,4047
Droite passe par l'origine	1	2412	0
	2	2234	0
	3	2102	0

*Tableau 9: Résultats des paramètres de modèle quadratique.*

	Jours	Pente1	Pente2	Ordonné à l'origine
<b>Linéaire quadratique</b>	1	3167	-3,38	-13968
	2	2760	-2,51	-6422
	3	3258	-5,34	-16969

### II.1.3. Sélection des limites d'acceptation

Pour la recherche des résidus des pesticides dans la matrice végétale (la menthe) les limites d'acceptabilité sont fixées à  $\pm 30$ .

## Partie 2 : partie expérimentale

Nous voulons que 95% de futures mesures soient à l'intérieur de ces limites ( $\beta=95\%$ ) avec un risque de ( $\alpha=5\%$ ).

### II.1.4. Choix du modèle d'étalonnage le plus adéquat

A partir des données de plan de validation et en utilisant les paramètres des différents modèles d'étalonnage, on calcule les concentrations retrouvées par prédiction inverse. Ces concentrations servent à calculer les valeurs des biais relatifs, les recouvrements, les coefficients de variation de répétabilité et de fidélité intermédiaire des différents niveaux de concentration. Ces paramètres sont nécessaires pour établir le profil d'exactitude.

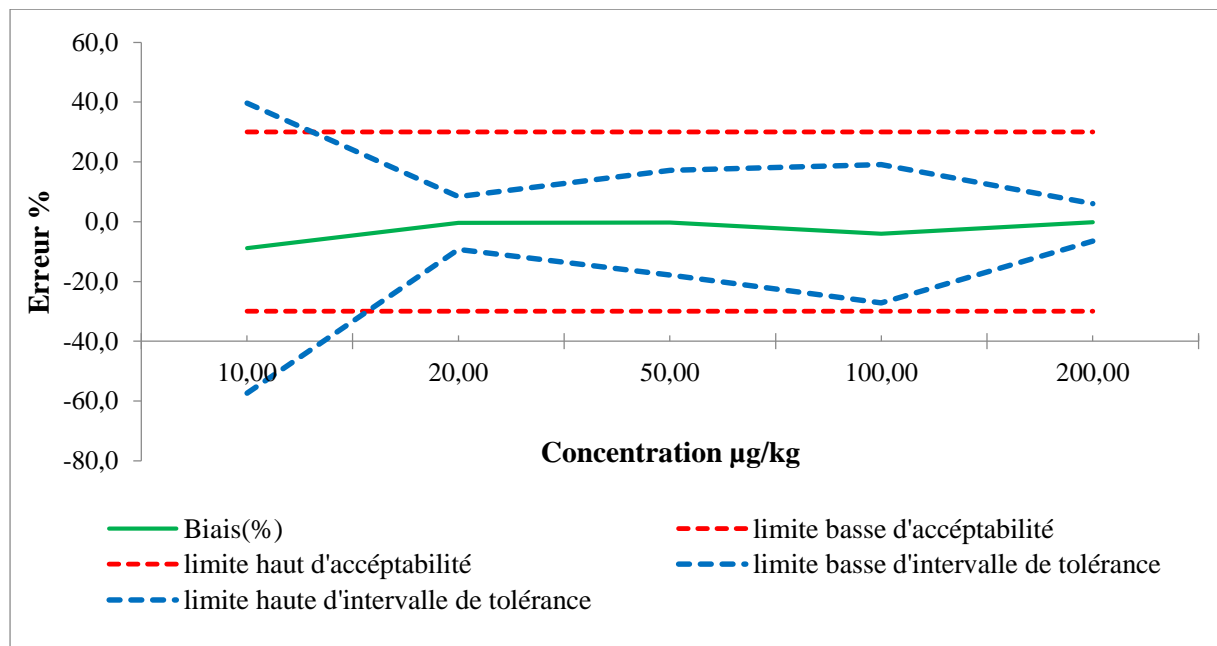


Figure 9: Profil d'exactitude pour un modèle linéaire simple.



## Partie 2 : partie expérimentale

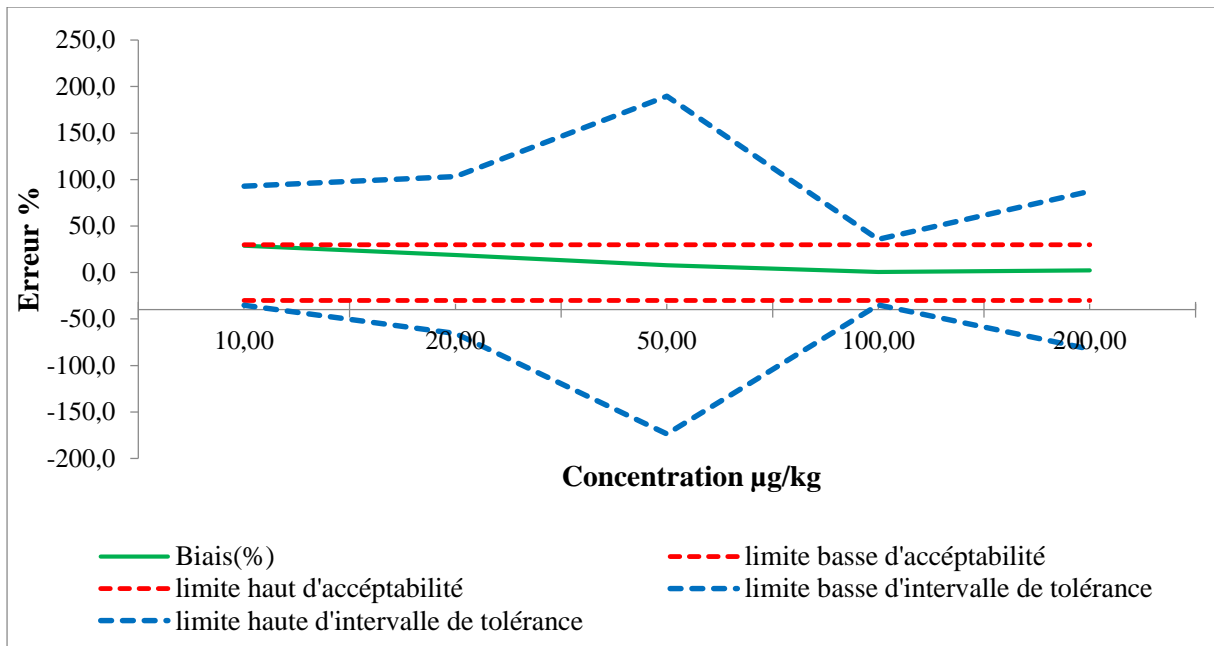


Figure 10: Profil d'exactitude pour un modèle qui passe par l'origine.

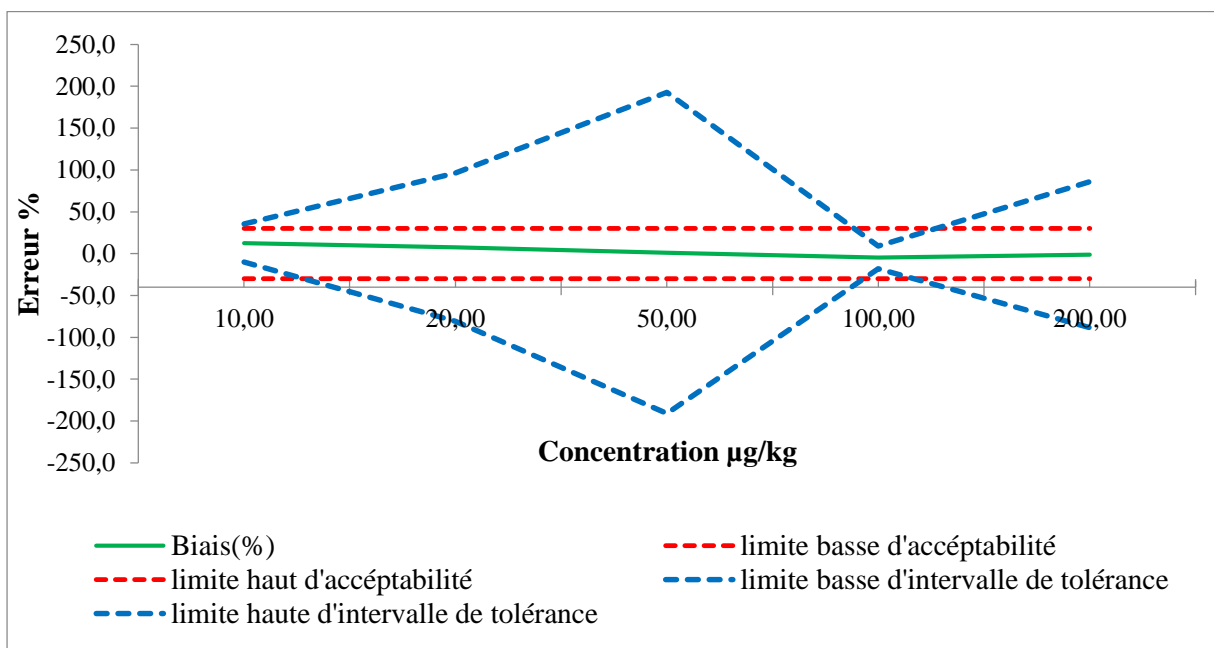


Figure 11: Profil d'exactitude pour un modèle avec transformation racine carrée.

## Partie 2 : partie expérimentale

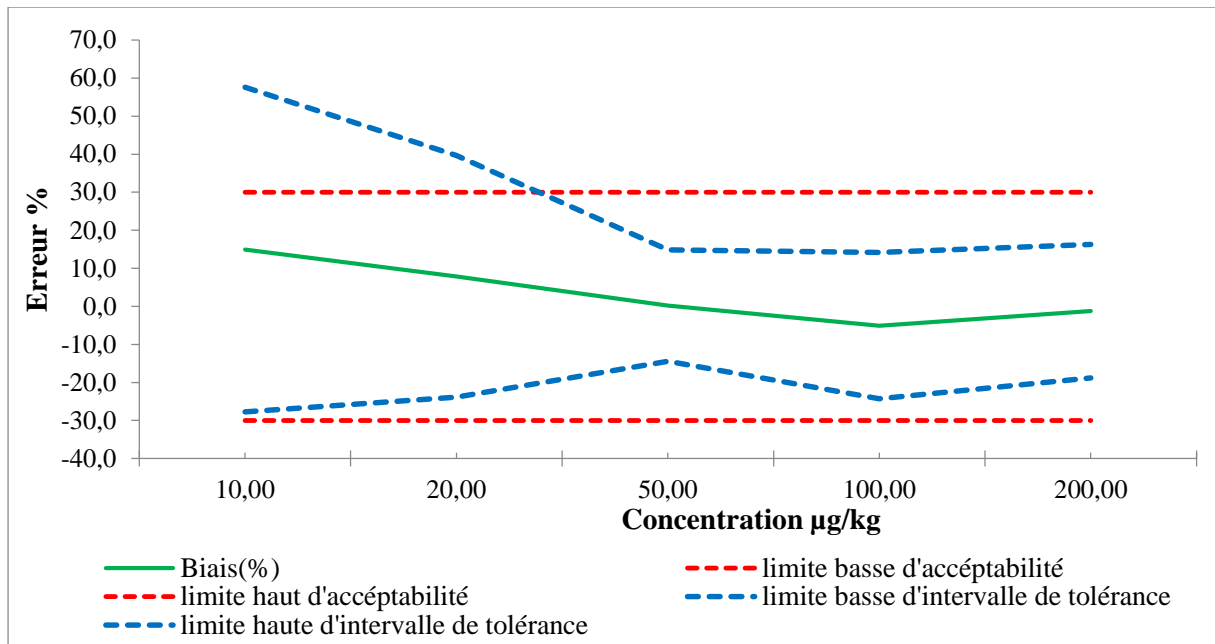


Figure 12: Profil d'exactitude pour un modèle avec transformation logarithmique.

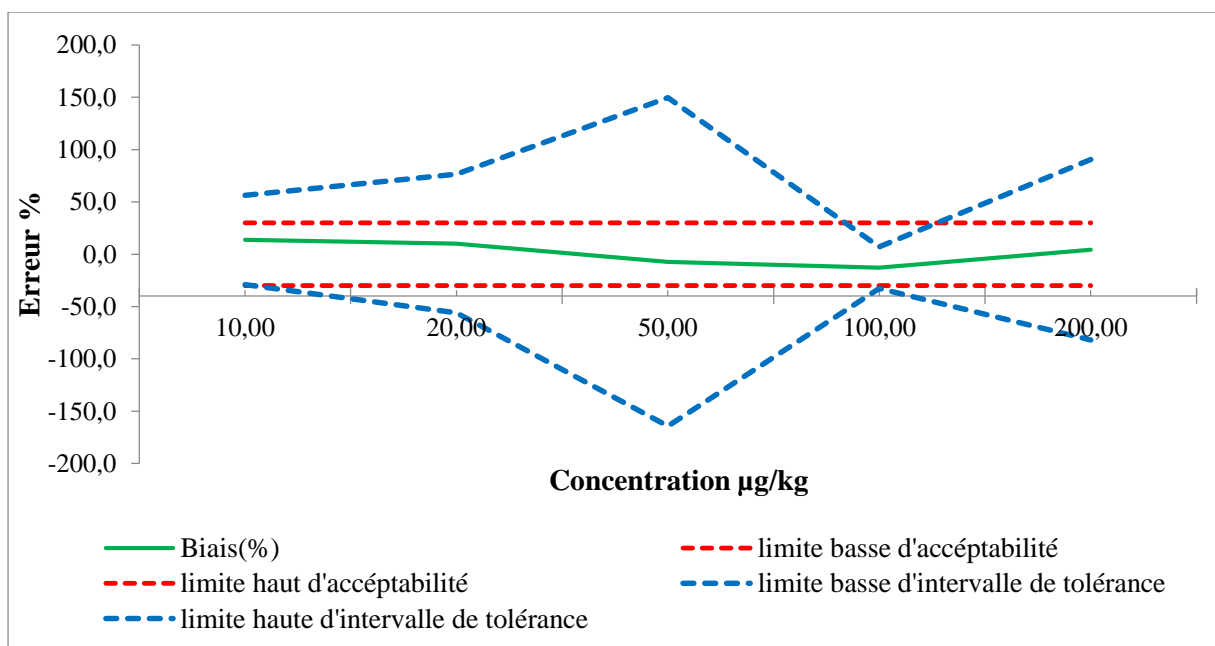


Figure 13: Profil d'exactitude pour un modèle linéaire quadratique.

Le choix du profil d'exactitude le plus adéquat est basé sur l'objectif de trouver des recouvrements par niveau, les plus proches possibles à 100% et des biais plus proches à zéro, avec un intervalle de tolérance le plus étroit et situé à l'intérieur des limites d'acceptabilité, pour avoir une méthode valide dans l'intervalle de concentration étudiée.

Après avoir examiné soigneusement les profils des différents modèles, nous avons sélectionné le modèle linéaire simple.

## II.2. Calcul des critères de la validation

### II.2.1. Prédiction inverse

Les concentrations prédites ou concentrations retrouvées des standards de validation sont calculées en utilisant la fonction inverse du modèle d'étalonnage ( $Y = aX + b$ ).

Ces concentrations retrouvées permettent de calculer le biais, la justesse, la fidélité de chaque mesurage.

*Tableau 10: Les concentrations retrouvées par la prédiction inverse.*

Niveau	Concentration ( $\mu\text{g/kg}$ )	Concentration retrouvée ( $\mu\text{g/kg}$ )		
		Série 1	Série 2	Série 3
1	10,00	9,5256	9,6509	8,2617
	10,00	9,4506	9,5553	8,3035
	10,00	9,4204	9,6002	8,26174
2	20,00	20,3304	19,5737	20,9342
	20,00	19,2959	19,7550	19,9938
	20,00	19,6043	20,7205	19,0404
3	50,00	48,1331	50,5442	50,6564
	50,00	48,1575	51,0099	50,7109
	50,00	48,2525	50,5944	50,6085
4	100,00	91,8799	98,2704	98,8143
	100,00	91,4255	97,7208	97,7058
	100,00	91,8041	97,7571	98,1757
5	200,00	197,0757	198,8981	201,2138
	200,00	197,6354	201,0830	201,0371
	200,00	196,2967	201,0956	201,5615

### II.2.1. Etude de la fidélité et la justesse

La fidélité de la méthode est évaluée sur chaque série de validation, en utilisant les données obtenues pour les trois répétitions des niveaux de concentrations 10 ; 20 ; 50 ; 100 ; 200.

Les recouvrements entre les concentrations introduites et les concentrations retrouvées sont calculés pour les trois séries, puis une analyse statistique est effectuée sur ces résultats.

## Partie 2 : partie expérimentale

### ❑ La justesse :

Les résultats de la justesse sont représentés dans le tableau 12

*Tableau 11: Etude statistique de la justesse par niveau de concentration.*

Concentration (µg/kg)	Concentration retrouvée moyenne (µg/kg)	Biais (%)	Recouvrement (%)
10	9,114467914	-8,8553209	91,14
20	19,91650813	-0,4174593	99,58
50	49,85197587	-0,2960483	99,70
100	95,95046319	-4,0495368	95,95
200	199,5441308	-0,2279346	99,77

On remarque que les valeurs du biais varient de -0.22 à -8.8, ces valeurs sont proche du 0, aussi les valeurs du recouvrement sont proche de 100%

Donc on diagnostique que cette méthode est juste

### ❑ La Fidélité :

La fidélité de la méthode se caractérise par le coefficient de variation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire.

*Tableau 12: Etude statistique de la fidélité par niveau de concentration.*

Concentration (µg/kg)	Répétabilité (CVr %)	Fidélité Intermédiaire (CV FI %)
10	0,48	9,80
20	3,61	3,61
50	0,31	3,56
100	0,41	4,71
200	0,42	1,41

On remarque que les coefficients de fidélité intermédiaire varient de 1.41 à 9.9. Donc cette variation montre l'intérêt du travailler à différent niveau de concentration

Mais il faut noter que la justesse et la fidélité ne sont que des outils utilisés pour calculer des intervalles de tolérances, afin de construire le profil d'exactitude qui permet la prise de décision de la validité de la méthode ou non.

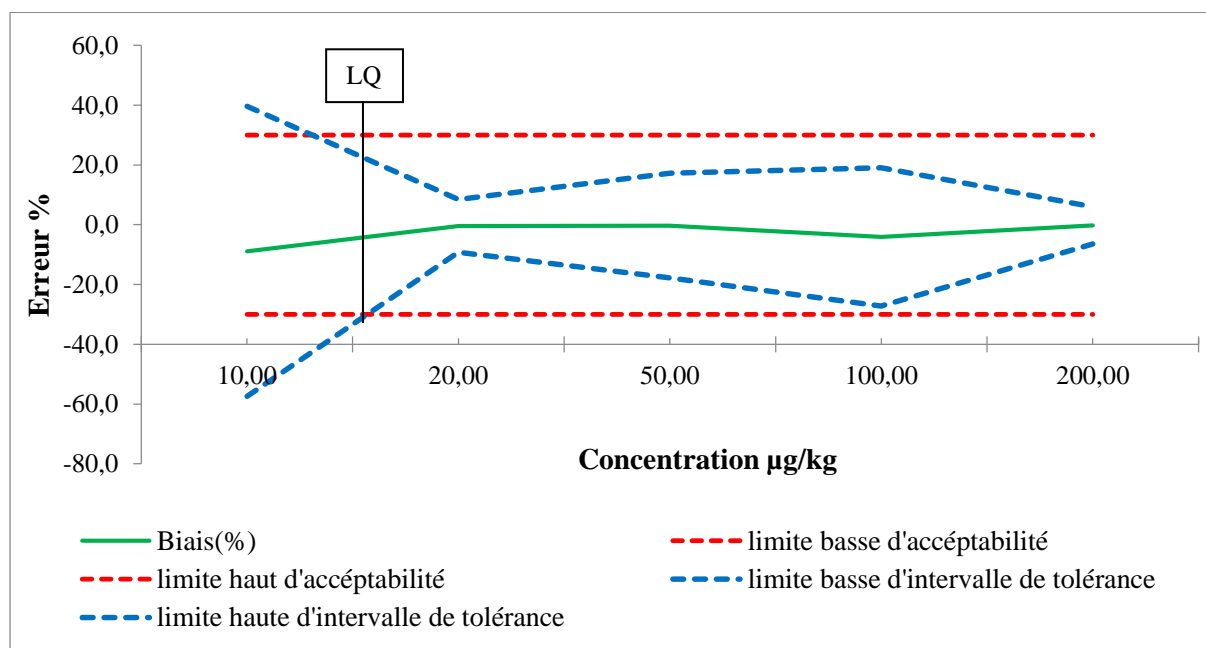
## Partie 2 : partie expérimentale

### II.2.2. Intervalle de tolérance et profil d'exactitude

Les limites inférieure et supérieure de l'intervalle de tolérance sont calculées pour les niveaux de concentration 10 ; 20 ; 50 ; 100 ; 200. Avec une probabilité  $\beta$  de 95%.

*Tableau 13: Paramètres de Construction de Profil d'exactitude.*

Concentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Biais (%)	Fidélité Intermédiaire (CV FI %)	Facteur de couverture K	Lj	Uj
10	-8,855320858	9,80	4,951511523	-57,375472	39,665
20	-0,417459326	3,61	2,446548816	-9,2435065	8,409
50	-0,296048266	3,56	4,917060565	-17,807547	17,215
100	-4,04953681	4,71	4,917075266	-27,195635	19,097
200	-0,227934582	1,41	4,428456269	-6,4801231	6,024



*Figure 14: Profil d'exactitude*

Le profil d'exactitude de cette méthode indique que la méthode est validée par rapport aux exigences pour les niveaux de concentrations 2,3,4 et 5 parce que les limite de tolérance ne dépasse pas les limites d'acceptation, par contre au niveau 1 de concentration la méthode n'est pas valide car les limite de l'intervalle de tolérance dépasse les limites d'acceptabilité.

La LQ est le point d'intersection entre des droites qui sont respectivement la limite supérieure de l'intervalle de tolérance et la limite supérieure d'acceptabilité, donc la LQ se situent entre le niveau de concentrations 1 et 2.

## Partie 2 : partie expérimentale

### II.2.3. Calcule de la limite de quantification et la limite de détection

Sur la figure n, il existe une concentration en dessous les bornes de l'intervalle de tolérance sort des limites d'acceptabilité. Au-dessus de cette concentration, l'analyste peut garantir que la méthode quantifiera de façon acceptable les échantillons reçus. Assez naturellement, on peut proposer de désigner cette limite de concentration la plus basse comme la limite de quantification (LQ) de la méthode.

$$LQ = 16,5 \mu\text{g/kg}$$

$$LD = 1/3 LQ = 5,5 \mu\text{g/kg}$$

### II.2.4. Calcule d'incertitude

Tableau 14: Résultats de calcule d'incertitude.

Niveau	Concentration Introduite	Lj	Uj	t-student	Incertitude-type	Incertitude élargie	Incertitude élargie relatif (%)
1	10,00	4,68717935	13,542	4,289	1,032	2,064	22.65
2	20,00	18,1530156	21,680	2,321	0,760	1,520	7.63
3	50,00	41,119219	58,585	4,261	2,049	4,099	8.22
4	100,00	73,7372645	118,164	4,261	5,213	10,426	10.86
5	200,00	187,071605	212,017	3,864	3,228	6,456	3.23

A partir les résultats du tableau 14, on voit que les valeurs d'incertitude ne dépassent pas les limites d'acceptation  $\pm 30\%$  pour tous les niveaux de concentration

## Conclusion

La méthodologie globale du profil d'exactitude appliquée pour valider la méthode de dosage des pesticides dans la menthe par LC MS/MS est mieux adaptée aux enjeux de la validation, à savoir la satisfaction des besoins des services demandeurs tout en contrôlant le risque de laboratoire. Elle permet de décider la validité de la méthode seulement à partir d'une illustration graphique sans qu'aucun test d'hypothèse ne soit effectué. Et elle permet non seulement de simplifier l'approche de validation d'une procédure mais aussi l'estimation de l'incertitude de mesure sur la base des données de validation.

Alors le profil d'exactitude peut être considéré comme un outil de décision pour accepter ou rejeter une méthode selon son usage prévu

Dans notre travail, nous avons effectué un plan d'étalonnage pour générer plusieurs modèles d'étalonnage de chaque série (le jour) qui permet de relier la réponse analytique (air de pic chromatographiques) à la concentration introduite. Le modèle retenu est le modèle linéaire simple qui donne des résultats très satisfaisants.

En deuxième lieu, l'établissement des deux intervalles de tolérance basse et haute en utilisant les paramètres statistiques telles que le biais relatif et le coefficient de variation de la fidélité intermédiaire pour une attente d'une proportion de 95% des résultats futurs soit comprise entre les limites d'acceptation de  $\pm 30\%$ , nous a permis de construire le profil d'exactitude

Dans le même contexte, nous avons calculé l'incertitude de la méthode. La valeur de l'incertitude calculée se trouve inférieure au risque fixé  $\pm 5\%$ . Ce qui nous permet de déclarer que cette méthode peut être utilisée dans le contrôle de qualité de routine.

Enfin, nous estimons que le fait de rassembler la validation et l'incertitude dans la même approche permet à l'analyste de contrôler le risque d'utiliser cette méthode d'analyse en routine et d'avoir une information complète sur ses performances.

## Références bibliographiques

---

- [1] [1] : [https://www.actu-environnement.com/ae/dictionnaire\\_environnement/definition/pesticide.php4](https://www.actu-environnement.com/ae/dictionnaire_environnement/definition/pesticide.php4)
- [2] : <http://www.onssa.gov.ma/fr/laboratoires-sp-2215/service-du-controle-et-desexpertises>
- [3] : <http://www.fao.org/3/W1604F/w1604f03.htm>
- [4] : <https://www.techno-science.net/glossaire-definition/Pesticide-page-2.html>
- [5] : <https://www.techno-science.net/glossaire-definition/Pesticide-page-2.html>
- [6] : <http://eduterre.ens-lyon.fr/nappe/html/Ressources/pesticides>
- [7] : <http://www.nzdl.org/cgi-bin/library.cgi>
- [8] : Boland et al., 2004
- [9] <https://www.cchst.ca/oshanswers/chemicals/pesticides/reentry.html#:~:text=est%20d'au%20moins%2024,forme%20de%20poudre%20mouillable%2C%20et>
- [10] <http://eservice.onssa.gov.ma/IndPesticide.aspx>
- [11] <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/maximum-residue-limits/fr/>
- [12] <https://www.cordial.fr/dictionnaire/definition/menthe.php>
- [13] <https://cliniquedugazon.fr/index.php/2018/08/03/azoxystrobine-dossier/>
- [14]: [https://www.researchgate.net/publication/272832687\\_Utilisation\\_et\\_risques\\_des\\_pesticides\\_en\\_protection\\_sanitaire\\_de\\_la\\_menthe\\_verte\\_dans\\_le\\_Centre-Sud\\_du\\_Maroc](https://www.researchgate.net/publication/272832687_Utilisation_et_risques_des_pesticides_en_protection_sanitaire_de_la_menthe_verte_dans_le_Centre-Sud_du_Maroc) Use and risks of pesticides in sanitary protection of spearmint in south-central Morocco
- [15] : Antibacterial drugs, Mark Farrington, Clinical Pharmacology (Eleventh Edition), 2012
- [16] : <https://m.indiamart.com/proddetail/perkinelmer-flexar-uhplc-6611967188.html>
- [17] : <http://jflemen.iutlan.univ-rennes1.fr/CHIMIE/SPECMAS/specmas2.htm>
- [18] : <http://jflemen.iutlan.univ-rennes1.fr/CHIMIE/SPECMAS/specmas2.htm>
- [19] : <https://www.analyticaltoxicology.com/spectrometrie-de-masse-tandem-ms-ms/>
- [20] Abderrahim BOUABIDI : Thèse « Etude Critique des Différentes Approches de Validation des Méthodes Analytiques », Mai 2013, faculté de la médecine
- [21] Bouchaib IHSSANE, AOAC: Uncertainty Profile: a new global strategy for the analytical validation and the estimation of measurement uncertainty January 2013
- [22] Max FEINBERG : SPECTRA ANALYSE n° 249 • Avril - mai 2006 Approche globale et harmonisée de la validation



[23] : [https://documents.lne.fr/publications/eurachem\\_guide\\_incertitude\\_fr.pdf](https://documents.lne.fr/publications/eurachem_guide_incertitude_fr.pdf)

## Liste des figures

---

<b>Figure 1:</b> Structure chimique d'azoxystrobine [13].	11
<b>Figure 2:</b> Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse tandem (Agilent).	12
<b>Figure 3:</b> Appareil de la Chromatographie Liquide à Haute Performance [16].	13
<b>Figure 4:</b> Source d'ionisation [19].	16
<b>Figure 5:</b> Schéma d'une ionisation par Electrospray [19].	16
<b>Figure 6:</b> Schéma résumant les trois quadripôles [19].	17
<b>Figure 7:</b> Les critères de validation.	18
<b>Figure 8:</b> Profil d'exactitude.	22
<b>Figure 9:</b> Profil d'exactitude pour un modèle linéaire simple.	39
<b>Figure 10:</b> Profil d'exactitude pour un modèle qui passe par l'origine.	40
<b>Figure 11:</b> Profil d'exactitude pour un modèle avec transformation racine carrée.	40
<b>Figure 12:</b> Profil d'exactitude pour un modèle avec transformation logarithmique.	41
<b>Figure 13:</b> Profil d'exactitude pour un modèle linéaire quadratique.	41
<b>Figure 14:</b> Profil d'exactitude	44

## Liste des tableaux

---

<b>Tableau 1:</b> Types de fidélité.....	19
<b>Tableau 2:</b> Principales fonctions de réponse utilisables pour un étalonnage.....	23
<b>Tableau 3:</b> Calcule des concentrations retrouvées [20]. .....	24
<b>Tableau 4 :</b> Préparation de la gamme.....	33
<b>Tableau 5:</b> Transition recherchée et temps de rétention. ....	35
<b>Tableau 6:</b> Données de standards d'étalonnage. ....	36
<b>Tableau 7:</b> Données de standards de validation.....	37
<b>Tableau 8:</b> Résultats des paramètres de modeles.....	38
<b>Tableau 9:</b> Résultats des paramètres de modelé quadratique. ....	38
<b>Tableau 10:</b> Les concentrations retrouvées par la prédiction inverse.....	42
<b>Tableau 11:</b> Etude statistique de la justesse par niveau de concentration. ....	43
<b>Tableau 12:</b> Etude statistique de la fidélité par niveau de concentration.....	43
<b>Tableau 13:</b> Paramètres de Construction de Profil d'exactitude.....	44
<b>Tableau 14:</b> Résultats de calcule d'incertitude.....	45