



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
ⵜⴰⵎⴻⵔⴰⵏⵜ ⵜⴰⵎⴳⴷⴰⵢⵜ ⵜⴰⵏⵓⵔⵉⵜ ⵜⴰⵎⴳⴷⴰⵢⵜ



Université Mouloud MAMMERRI Tizi-Ouzou  
Faculté de médecine  
Département de Pharmacie  
N° D'ordre :

جامعة مولود معمري تيزي وزو  
كلية الطب  
فرع الصيدلة

*Mémoire de fin d'études présenté sous forme d'article*

*Sous le thème*

**Soutenu publiquement le :**

**16 Juillet 2023**

**MISE AU POINT ET VALIDATION D'UNE METHODE DE  
DOSAGE DE L'ACIDE OXALIQUE DANS LES URINES PAR  
HPLC**

**Réalisé et présenté par :**

M<sup>elle</sup> BEN AMRIOU Yasmine

M<sup>elle</sup> YOUSFI Sarah

M<sup>elle</sup> KOLIAI Kenza

**Encadré par :**

Dr BELKAID Nawal

**Co-encadré par :**

Dr BEN SI SAID Hassan

**En vue de l'obtention du diplôme de**

**Docteur en Pharmacie**

Devant le jury composé de :

Pr MAMOU.M  
Pr MEKACHER.L.R  
Dr DAHMANI.D

Professeur Faculté de médecine  
Professeur Faculté de médecine  
MAHU Faculté de médecine

Président de jury  
Examineur  
Examinatrice







# MISE AU POINT ET VALIDATION D'UNE METHODE DE DOSAGE DE L'OXALURIE PAR HPLC.

## DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A METHOD FOR THE DETERMINATION OF OXALURIA BY HPLC.

BEN AMRIOU Yasmine<sup>1</sup> | YOUSFI Sarah<sup>1</sup> | KOLIAI Kenza<sup>1</sup> | BELKAID Nawal<sup>2</sup> | BEN SI SAID Hassan<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Faculté de Médecine  
Département de Pharmacie  
Université  
MOULOUD MAMMERI  
Tizi ousou.

<sup>2</sup> Laboratoire de biochimie  
CHU Tizi ousou, Unité  
Nedir Mohammed

<sup>3</sup> Laboratoire Central  
CHU Tizi ousou, Unité  
Beloua

Correspondance à :

[benayouskol16@gmail.com](mailto:benayouskol16@gmail.com)

Reconnaissance :

Nous reconnaissons avec gratitude le soutien de chaque personne ayant contribué à la réalisation de ce travail.

### Résumé:

**Introduction :** L'oxalate urinaire est reconnu comme un biomarqueur important de diagnostic et suivi des hyperoxaluries responsables des lithiases oxalocalciques. **Objectif :** L'objectif principal de notre étude effectuée au sein du laboratoire de biochimie et de chimie analytique du département de pharmacie à l'Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou (UMMTO) est de mettre au point et de valider une méthode de dosage de l'oxalate urinaire par HPLC en phase inverse qui sera appliquée en routine au laboratoire de biochimie au profit des malades.

**Matériels et Méthode :** Le dosage de l'oxalate urinaire est effectué par HPLC en phase inverse (C18) après une dérivatisation par l'o-phénylènediamine. La validation répond au protocole V2 de la SFSTP 2006. Le travail est complété par une étude de la stabilité et confection des contrôles de qualité interne. **Résultats :** La méthode a été validée selon le profil d'exactitude dans les limites de quantification [12,5 ; 250] mg/L avec des coefficients de variation  $\leq 6\%$ , des biais relatifs  $\leq 7\%$ , la régression est linéaire avec  $R = 99,5\%$ , une stabilité satisfaisante des échantillons (écart  $\leq 5\%$ ). **Conclusion :** notre méthode est validée et pourra être utilisée pour le dosage de l'oxalurie en routine.

**Mots clés:** oxalate, SFSTP, CLHP, hyperoxalurie.

### Abstract:

**Introduction:** Urinary oxalate is recognized as an important biomarker for the diagnosis and monitoring of hyperoxaluria responsible for oxalocalcic lithiasis. **Objective:** The main objective of our study, carried out in the Biochemistry and Analytical Chemistry Laboratory of the Pharmacy Department at the Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou (UMMTO), is to develop and validate a method for the determination of urinary oxalate by reverse-phase HPLC, to be applied routinely in the biochemistry laboratory for the benefit of patients.

**Method:** Determination of urinary oxalate by reverse-phase HPLC (C18) after derivatization with o-phenylenediamine. Validation according to SFSTP 2006 protocol V2 followed by stability study and establishment of internal quality controls. **Results:** The method was validated with analytical specificity within the quantification limit [12.5; 250] mg/L with coefficients of variation  $\leq 6\%$ , relative bias  $\leq 7\%$ , regression is linear with a linear coefficient of determination of 99.5%, satisfactory sample stability. **Conclusion:** our method is validated and can be used for routine oxaluria determination.

**Key words:** oxalate, SFSTP, HPLC, hyperoxaluria.

## 1. Introduction

L'acide oxalique est un acide di carboxylique organique, sa formule chimique est  $C_2H_2O_4$  (1). En solution, il forme des sels appelés les oxalates dont la solubilité dépend de plusieurs facteurs chimiques comme la force ionique et le pH (2). En milieu physiologique, on les retrouve souvent sous forme d'oxalates de calcium. En condition de sursaturation, trois formes cristallines peuvent se former ; monohydratée appelée **wewhellite**, dihydratée appelée **wedellite** et rarement trihydratée appelé **caoxite**(3).

L'oxalate est principalement produit par le métabolisme interne et provient, en quantité limitée, de l'alimentation(4). Dans le foie, il est synthétisé à partir du glyoxalate ; une substance générée lors du métabolisme intermédiaire de la glycine, de l'hydroxyproline et du glycolate(1, 5). La transformation du glyoxalate en glycine, permettant sa détoxification, est principalement assurée par l'enzyme alanine glyoxalate amino transférase (AGT) présente dans le peroxysome des hépatocytes humains(1, 5-7) ; processus au cours duquel la vitamine B6 agit en tant que cofacteur (1). Dans les conditions normales, seule une partie du glyoxalate est convertie en oxalate par l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH)(5) (voir annexe 1). L'oxalate circulant est librement filtré au niveau du glomérule, réabsorbé et sécrété par le tubule proximal, puis éliminé par les reins sous sa forme inchangée(4).

La présence des cristaux urinaires n'est pas, sauf cas particuliers, pathologique en soi. Cependant, chez un sujet lithiasique, ou dans certains contextes pathologiques, la cristallurie peut donc être un indicateur très utile des facteurs lithogènes. Parmi les inhibiteurs de la cristallurie ; des ions comme : Mg , Fe ,Cr , Zn Al ou des petites molécules acides comme : citrate, isocitrate, pyrophosphate, acide aspartique...(8).

L'hyperoxalurie est une condition caractérisée par une augmentation anormale du niveau d'oxalate dans l'urine, ce qui peut entraîner la formation de calculs rénaux oxalo-dépendants(1, 3). Celle-ci peut rarement avoir pour causes des mutations génétiques (Hyperoxaluries primaires)(1,9) qui affectent le métabolisme de l'oxalate, les plus courantes sont : l'HOP de type 1 caractérisée par un déficit en l'enzyme hépatique l'alanine glyoxylate aminotransférase(5, 10), l'HOP de type 2 résultant d'un dysfonctionnement l'enzyme cytosolique du glyoxylate/hydroxypyruvate réductase et enfin l'HOP de type 3 où le gène HOGA1 est muté altérant ainsi la fonction de l'enzyme 4-hydroxy-2oxoglutarate aldolase responsable de la dégradation du glyoxylate(10). En majorité les hyperoxaluries sont d'origines alimentaires et métaboliques (Hyperoxaluries secondaires) (1). Plusieurs maladies du système digestif augmentent l'absorption intestinale de

l'oxalate ou réduisent sa dégradation(4). Dans certaines maladies métaboliques ; telles que le diabète et le syndrome métabolique, l'insulino-résistance est responsable d'une augmentation de l'oxalurie(11) ; étant donné que le glyoxylate est un produit du métabolisme du glucose, dans le cas de diabète, il y'a élévation du niveau de glyoxylate qui génère par la suite de l'oxalate (4). Par ailleurs, les changements induits par l'inflammation dans le transport intestinal de l'oxalate pourraient expliquer l'hyperoxalurie induite par l'obésité en raison de la suppression de la sécrétion intestinale active d'oxalate ou de l'augmentation de son absorption (4).

En outre, une alimentation riche en oxalate ou un défaut d'hydratation peuvent également être à l'origine de l'hyperoxalurie(1, 4, 12-14).

La fréquence de l'hyperoxalurie et des calculs oxalo-dépendants varie en fonction du type de l'hyperoxalurie et des populations étudiées (15) ; la HOP de type 1 (1-3 cas/million d'habitants) est plus fréquente dans les populations où le taux de consanguinité est élevé (15) . La prévalence des autres types est mal connue, mais elle est plus faible que celle de l'HOP1(1). S'agissant des calculs rénaux oxalo-dépendants, les calculs d'oxalate de calcium sont parmi les types les plus courants (4, 14) ; ils représentent 70 à 80 % de tous les calculs rénaux (16).

Le traitement médical en cas d'hyperoxalurie primaire repose sur l'utilisation de la pyridoxine

(Vit B6) afin de réduire la production d'oxalate(1, 9), l'administration d'oxalobacter formigenes pour dégrader l'oxalate dans l'intestin, ainsi que l'utilisation du carbonate de lanthane pour diminuer l'oxalémie et les cristaux d'oxalate de calcium dans l'urine (1).

Ces dernières années, les progrès dans la connaissance des aspects moléculaires et cellulaires de la maladie ont conduit à la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques ; représentées par l'administration d'enzymes ayant pour but de reconstituer chez les patients l'activité enzymatique défectueuse ainsi que la thérapie génique qui a été particulièrement explorée dans la HOP 1 ; elle représenterait une bonne alternative à la transplantation hépatique, bien que transplantation hépatorénale demeure la meilleure stratégie en cas d'insuffisance rénale terminale ou au stade d'hémodialyse(1).

La prévention est l'une des thérapies les plus préconisées ; basée sur l'adoption d'un régime alimentaire pauvre en oxalate et en Vit C étant le précurseur (1) et une hyperhydratation (13).

Le dosage de l'oxalate dans l'urine présente un intérêt majeur dans le diagnostic des hyperoxaluries et surtout dans le suivi des patients (17). Il contribue également au suivi de l'efficacité du traitement ainsi qu'à la prévention des complications associées aux hyperoxaluries(17). Les analyses de l'oxalate urinaire se basent sur des tests enzymatiques,

d'autres méthodes analytiques aussi peuvent être utilisées telles que la chromatographie ionique, la chromatographie en phase gazeuse (CPG), et la chromatographie liquide avec spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)(17) ; Bien que la LC-MS/MS ait suscité récemment un intérêt croissant en raison de sa sélectivité et de sa sensibilité élevée, elle n'est pas largement adoptée en raison de son coût élevé et de sa complexité(17).

Au vu des difficultés techniques et de l'indisponibilité du dosage de l'oxalate urinaire dans les laboratoires de notre pays, le diagnostic et le suivi des hyperoxaluries et des calculs rénaux sont plus complexes. De ce fait, il a été impératif de mettre au point une méthode d'analyse afin de rendre le dosage de ce paramètre plus accessible aux patients.

Par conséquent, la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) suscite un intérêt particulier en raison de son faible coût, de sa facilité d'utilisation et de sa disponibilité, notre objectif était de développer un dosage robuste et économique de l'oxalate urinaire par HPLC de le valider et établir un contrôle qualité interne afin de l'utiliser en routine dans les laboratoires.

## **2. Matériel et méthodes**

### **2.1 Réactifs**

L'acide oxalique dihydraté (qualité purifiée, MM = 126,04g/mol)). L'o-phénylènediamine (OPD, pureté 99,5%). L'acide chlorhydrique (HCl, 35-38% avec MM = 36,46g/mol) et l'hydroxyde de sodium (NaOH, MM = 40g/mol). L'acétate d'ammonium (MM = 77,08g/mol). Le méthanol (qualité HPLC, MM = 32,04g/mol). L'eau pure a été préparée par un système de purification de l'eau.

### **2.2 Matériels**

- Balance électrique KERN
- Vortex IKA MS3
- Etuve MEMMERT
- Centrifugeuse Sigma 3
- Appareil HPLC SHIMADZU LC 20
- Purificateur BOEKI PURE WATER

### **2.3 Conditions chromatographiques**

La Chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à un détecteur ultraviolet *SHIMADZU LC 20* a été utilisée pour la quantification. L'analyse HPLC a été réalisée sur une colonne *SHIMADZU Shim-pack GISTC18* (150×4,6mm, taille des particules 5µm). Une élution isocratique de 15 % de méthanol dans de l'eau contenant 0,17 M d'acétate d'ammonium a été utilisée comme phase mobile pour la séparation chromatographique à un débit de 1 mL/min. La température de la colonne a été maintenue entre 25°C et 29°C. La longueur

d'onde du détecteur ultraviolet (UV) a été fixée à 314 nm.

## **2.4 Méthodologie de la validation analytique**

Cette étude s'appuie sur les directives de la commission SFSTP publiées en 2003 et complétées en 2006(18, 19). Ces recommandations se fondent sur l'utilisation du profil d'exactitude, qui prend en compte à la fois le biais et l'écart type pour évaluer la précision. Toutes les données ont été acquises à l'aide du logiciel AgilentChemStation. A partir de la surface du pic d'oxalate enregistrée dans le chromatogramme et de la courbe d'étalonnage tracée par la surface du pic en fonction de la concentration d'étalonnage, la concentration d'oxalate dans chaque échantillon a été calculée en utilisant la surface du pic par rapport à la fonction de la courbe d'étalonnage.

### **2.4.1 Choix du protocole de validation**

#### **2.4.1.1 Domaines d'application et niveaux de concentration**

Etant donné que l'absence de l'effet matrice a déjà été démontrée par une étude de spécificité préalable, le protocole adapté est le V2(18). Le protocole propose un minimum de 3jours (3séries), chaque jour comporte un standard d'étalonnage (SE) sans matrice avec 2 répétitions, un standard validation (SV) avec 3 répétitions et un blanc avec matrice sans ajout dosé. Le choix des niveaux de concentration est

établi de sorte que les concentrations puissent couvrir la fourchette des valeurs physiologiques et pathologiques(18). Une gamme est réalisée en estimant que l'intervalle globale est de 0.1 mmol/L à 2 mmol/L (12,5 mg/L à 250 mg/L).

#### **2.4.1.2 Limites d'acceptabilité ( $\lambda$ ) et Probabilité de confiance ( $\beta$ )**

Pour le dosage dans une matrice biologique et selon les exigences de SFSTP(18, 19),  $\lambda$  est fixée à  $\pm 15\%$  et  $\beta=85\%$ .

### **2.4.2 Protocole de préparation des solutions**

#### **2.4.2.1 Choix du diluant**

Pour une meilleure solubilité et stabilité de l'oxalate, l'eau purifiée reste le diluant le plus favorable, en plus de sa compatibilité avec la phase mobile et le système chromatographique en général. Cinq solutions mères ont été préparées dans des fioles de 100mL, à partir desquelles des solutions filles ont été obtenues pour la préparation de la gamme étalon et validation.

#### **2.4.2.2 Préparation des solutions mères**

Dans des fioles jaugées de 100 mL, pesée de 100,8 mg d'acide oxalique, dissoudre dans un volume suffisant du diluant (eau pure), puis compléter au trait de jauge ; cinq solutions au total seront préparées ; dont deux pour l'étalonnage et trois pour la validation.

#### **2.4.2.3 Préparation des standards d'étalonnage et de validation**

A partir des solutions mères préparées auparavant à la concentration de 100,8mg/100ml (8mmol/L), on a effectué des dilutions à 3/4, 2/4, 1/4 et 1/20 afin d'obtenir les solutions filles à des concentrations de 6mmol/L, 4 mmol/L, 2mmol /L, 0.4 mmol/L respectivement, à partir de ces solutions filles on prépare les standards d'étalonnage par mélange de 250µL de la solution fille + 750µL d'eau pure et pour les standards de validation par mélange de 250µL de la solution fille+750µL d'urines physiologiques, on obtient au final une gamme d'étalonnage et de validation a des concentration finales 2mmol/L, 1,5mmol/L, 1mmol/L, 0,5mmol/L, 0,1mmol/L.

#### **2.4.2.4 Préparation des échantillons de stabilité**

Des échantillons chargés avec de l'oxalate à un niveau physiologique ont été préparés à partir des contrôles urinaires. La stabilité intra série a été évalué par lancement du même échantillon à des temps différents : 0h, 1H, 2H, 4H et 8H. La stabilité de conservation (2°C, 8°C) et à -20°C a été évalué sur des échantillon conservés de j0 à J7 jours.

#### **2.4.2.5 Préparation des contrôles qualité**

On a utilisé des lyphochek urinaires BIO-RAD (L1, L2). Régénération par l'ajout de 10 mld'eau pure pour chacun.

**Préparation des contrôles chargés** Préparation de deux niveaux de concentration regroupant les concentrations physiologiques (0,2 mmol/L) et pathologiques (1mmol/L).

Préparation de L1 chargé 0,2 mmol/L et L2 chargé 1mmol/L : Dans des tubes en verre, on a rajouté aux 750µL de contrôles urinaire L1, L2

respectivement 250µL de solution d'oxalate 0,8 mmol/L, 4mmol/L respectivement. Aliquotés dans des tubes coniques ensuite congelés. Les contrôles non chargés sont aliquotés dans des tubes coniques puis congelés.

Selon la SFBC (société française de biologie clinique) le protocole adapté est d'analyser 30 valeurs (6 répétitions pour les concentrations physiologiques et 6 répétitions pour les concentrations pathologiques) en 5 jours (20).

Chaque tube conique a subi le même protocole que les standards de validation et d'étalonnage.

#### **2.4.2.6 Préparation des échantillons**

##### **✓ Standards d'étalonnage**

Préparés par mélange de 250µL de la solution d'oxalate de chaque niveau de concentration, 750µL d'eau pure (diluant), 5µL d'HCl pur et 250µL de la solution d'OPD (0,46M).

##### **✓ Standards de validation**

Préparés par mélange de 750µL d'urine, 250µL de la solution d'oxalate de chaque niveau de concentration, 5µL d'HCl pur et 250µL de la solution d'OPD.

##### **✓ Blanc matrice**

Préparés par mélange de 750µL d'urine, 250µL d'eau pure, 5µL d'HCl pur et 250µL de la solution d'OPD.

##### **✓ Blanc eau pure**

Préparés par mélange de 1mL d'eau pure, 5µL d'HCl pur et 250µL de la solution d'OPD. Les tubes ont été scellés, vortexés pendant 1min et chauffés à 120°C pendant 30min. la couleur vire du jaune au brun foncé. Après refroidissement des solutions, 30µL de NaOH

10M sont ajoutés. Les tubes sont centrifugés pendant 10min à 18000tr/min, les surnageants ont été récupérés, versés dans des vials pour être analysés.

### 2.4.3 Protocole de validation

#### 2.4.3.1 Spécificité et effet matrice

L'évaluation de la spécificité et de l'absence de l'effet matrice s'effectue de deux façons :

- ✓ La comparaison des chromatogrammes :  
L'évaluation de la spécificité est faite par la comparaison du chromatogramme d'un Standard sans matrice et un autre avec matrice d'un même niveau de concentration ainsi que celui de l'urine et du diluant non chargés.
- ✓ Confirmation statistique de la spécificité sur les deux gammes d'étalonnage et de validation.

#### 2.4.3.2 Fonction de réponse

Dans le but de choisir le modèle d'étalonnage le plus adéquat qui est capable de produire une proportion suffisante des futures mesures qui se situeront à l'intérieur des limites d'acceptabilité(19), nous avons étudié quatre fonctions reliant les aires des pics aux concentrations introduites :

- 1<sup>ère</sup> fonction : Droite :  $y = ax + b$  ;
- 2<sup>ème</sup> fonction : Droite passant par 0 :  
 $y = ax$  ;

- 3<sup>ème</sup> fonction : Changement de variables par la fonction Logarithmique :  $\ln y = f(\ln x)$  ;
- 4<sup>ème</sup> fonction : Changement de variables par la racine carrée :  
 $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ .

#### 2.4.3.3 Justesse

La justesse est exprimée en termes de biais absolu, de biais relatif et de taux de recouvrement pour chaque niveau de concentration des standards de validation(18).

#### 2.4.3.4 Fidélité

La fidélité est évaluée pour chaque niveau de concentration, elle est calculée par les écarts types et les coefficients de variation qui estiment la répétabilité et la fidélité intermédiaire(18).

#### 2.4.3.5 Exactitude

A partir des concentrations prédites, on peut calculer l'exactitude relative par rapport à la concentration introduite (18).

#### 2.4.3.6 Profil d'exactitude

Après le calcul des critères de validation on collecte toutes les données obtenues pour tracer le profil d'exactitude qui réunit le biais relatif, les deux bornes de l'intervalle de tolérance et celles de l'intervalle d'acceptabilité, dans une courbe qui donne l'exactitude(%) en fonction des niveaux de concentrations introduites (19). Les deux bornes de l'intervalle de tolérance et celles de l'intervalle d'acceptabilité, dans

courbe qui donne l'exactitude (%) en fonction des niveaux de concentrations introduites(19).

#### 2.4.3.7 Linéarité

La linéarité définie comme étant l'existence de la proportionnalité entre les résultats obtenus et les concentrations prédites. Son calcul nécessite différents paramètres qui nous permettent de tracer des droites de régression linéaire de la concentration prédite en fonction de la concentration introduite(18).

#### 2.4.3.8 Limites de quantification

Les limites de quantification sont obtenues à partir du profil d'exactitude en calculant les concentrations (haute et basses) à partir desquelles les limites supérieures ou inférieures de l'intervalle de tolérance sortent des limites d'acceptabilité ( $\pm\lambda$ ) au niveau de la probabilité choisi ( $\beta$ )(19).

### 3. Résultats

#### 3.1 Temps de rétention et résolution

Le temps de rétention obtenu pour l'oxalate est : **18,84** min.

#### 3.2 Spécificité Voir Figure 1(1a, 1b, 1c, 1d).

**NB** : Puisque on a utilisé des urines naturelles issues de sujets sains, il y'a apparition d'un pic d'oxalate à son temps de rétention, l'air de ce pic physiologique est soustrait des résultats des échantillons par l'utilisation des blancs d'urines non chargées.

➤ **Confirmation statistique de la spécificité sur les deux gammes d'étalonnage et de validation** : (voir Tableau 1)

### 3.3 Fonction de réponse

La droite choisie est celle de la deuxième série  $y = 24259x - 54627$  avec un coefficient de détermination  $R^2 = 0,9987$  (voir Figure 2).

#### 3.3.1 Choix de la fonction de réponse

On a comparé les profils d'exactitudes obtenus pour l'Oxalate des quatre modèles de fonctions de réponses. La fonction de réponse qui répond le mieux à ses critères est :  $y = ax + b$  et elle sera choisie comme modèle d'étalonnage pour notre méthode.

**NB** : pour estimer les paramètres de validation on a fait quelques calculs intermédiaires à savoir l'alignement des réponses et la prédiction inverse en utilisant la courbe d'étalonnage choisie.

**3.4 Justesse** : tous les biais relatifs sont inférieurs à 7% (Voir Tableau 2).

**3.5 Fidélité** : tous les coefficients de variance sont inférieurs à 6% (Voir Tableau 3).

#### 3.6 Exactitude

A partir des concentrations prédites, on peut calculer l'exactitude relative par rapport à la concentration introduite (Voir Tableau 4).

### 3.7 Profil d'exactitude

Après le calcul des critères de validation on collecte toutes les données obtenues pour tracer le profil d'exactitude qui réunit le biais relatif, les deux bornes de l'intervalle de tolérance et celles de l'intervalle d'acceptabilité, dans une courbe qui donne l'erreur totale (%) en fonction des niveaux de concentrations introduites (Voir Figure 3).

**3.8 Linéarité : Droite de linéarité (Voir Figure 4) :** La linéarité de la concentration prédite est évaluée statistiquement en comparant la pente et l'ordonnée à l'origine avec 0 (voir Tableau 5).

### 3.9 Erreur totale et profil d'erreur totale :

L'erreur totale maximale est estimée à 10,561% (Voir Tableau 6).

### 3.10 Limites de quantification

A partir du profil d'exactitude d'oxalate on constate qu'il n'y a aucun point d'intersection entre les limites de tolérance et les limites d'acceptabilité, donc nous pouvons considérer que les limites de quantification supérieures et inférieures comme étant la plus haute et la plus basse concentration étudiée respectivement (**12,5mg/L et 250 mg/L**).

### 3.11 Stabilité

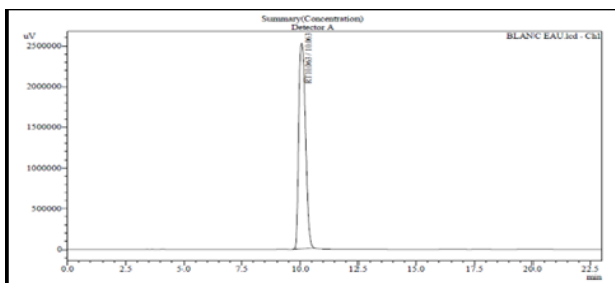
**3.11.1 Stabilité intra série :** (Voir tableau 7).

**3.11.2 Stabilité de conservation entre +2°C à +8°C et à -20°C :** (Voir tableau 8).

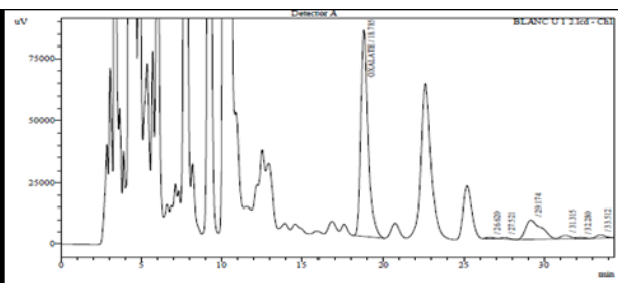
Le taux de perte de concentration de l'oxalate pour les échantillons réfrigérés maximal est estimé à 23%.

Le taux de perte de concentration de l'oxalate pour les échantillons congelés maximal est estimé à 26%.

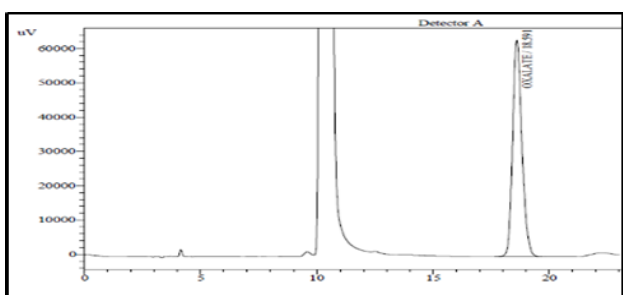
**3.11.3 Contrôle qualité interne :** (Voir Tableau 9).



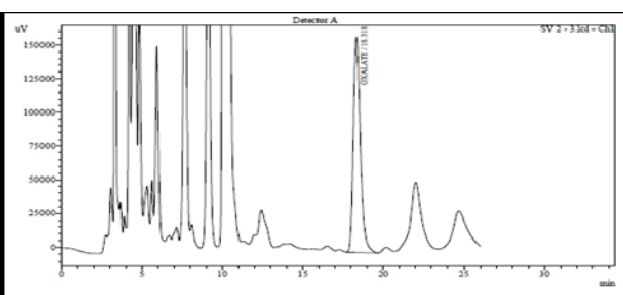
**Figure 1a :** Chromatogramme du diluant non chargé en acide oxalique



**Figure 1b :** Chromatogramme des urines non chargées en acide oxalique.



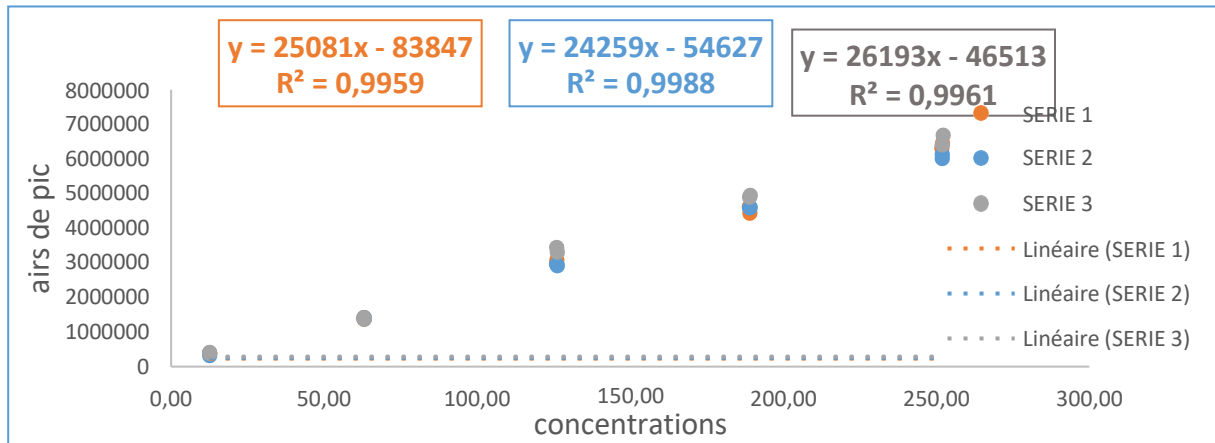
**Figure 1c :** Chromatogramme du diluant chargé en acide oxalique.



**Figure 1d :** Chromatogramme des urines chargées en acide oxalique.

**Tableau 1 :** Comparaison des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine d'Oxalate seul et d'Oxalate dans l'urine.

<i>Comparaison des deux pentes des deux droites de régression</i>	<b>t calculé</b>	<b>0,07</b>	<b>Différence non significative</b>
	<b>t°(α ; 26)</b>	<b>2,06</b>	
	<b>Condition</b>	<b>t calculé &lt; t°(α ; 26)</b>	
<i>Comparaison des ordonnées à l'origine des deux droites de régression</i>	<b>t calculé</b>	<b>0,18</b>	<b>Différence non significative</b>
	<b>t°(α ; 26)</b>	<b>2,06</b>	
	<b>Condition</b>	<b>t calculé &lt; t°(α ; 26)</b>	



**Figure 2 :** Courbe d'étalonnage d'Oxalate obtenue avec la fonction  $y = ax + b$  (série 1, 2 et 3)

**Tableau 2 :** Justesse calculée pour chaque niveau de concentration pour l'Oxalate.

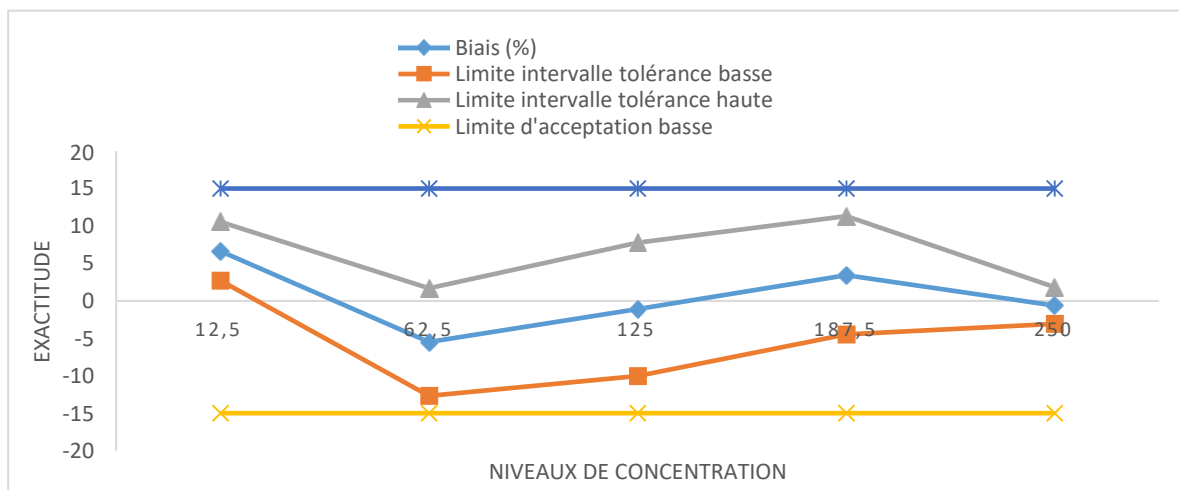
Niveaux de Concentrations	12,5mg/L	62,5mg/L	125mg/L	187,5mg/L	250mg/L
Concentration moyenne théorique	12,5975	62,9825	125,9675	188,95	251,9325
Concentration moyenne retrouvé	13,4325	59,515	124,54	195,4225	250,3575
Biais absolu	0,334	-1,387	-0,57	2,589	-0,63
Biais relatif (%)	6,63	-5,51	-1,13	3,43	-0,63
Taux de recouvrement	106,63	94,49	98,87	103,43	99,37

**Tableau 3 :** Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration pour l'Oxalate.

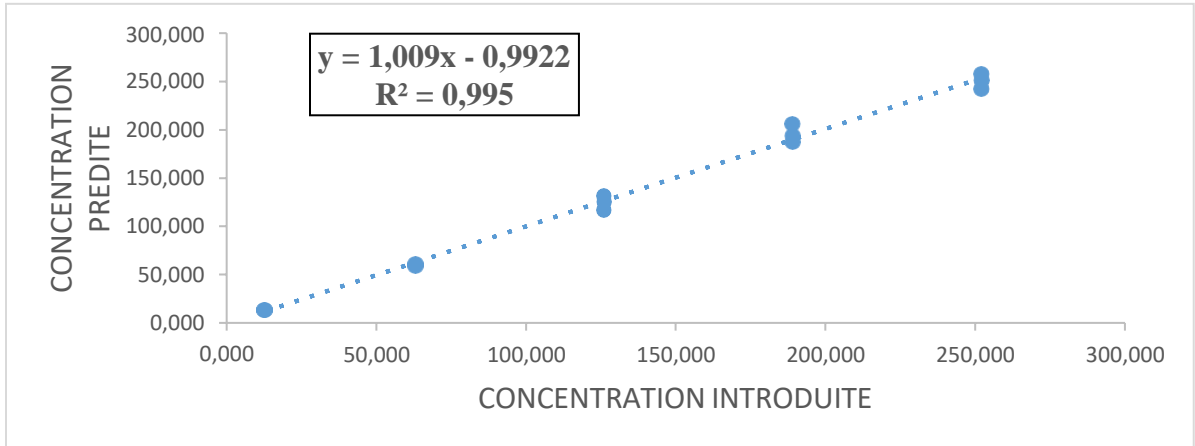
Niveaux de Concentrations	12,5mg/L	62,5mg/L	125mg/L	187,5mg/L	250mg/L
Concentration moyenne théorique	12,5975	62,9825	125,9675	188,95	251,9325
Concentration moyenne retrouvé	13,4325	59,515	124,54	195,4225	250,3575
CV de répétabilité	2,44	5,054	5,975	5,07	1,645
CV de fidélité intermédiaire	2,44	5,054	5,975	5,07	1,645

**Tableau 4 : Résultats du calcul de l'exactitude relative pour l'Oxalate.**

Niveaux Répétitions		Les séries								
		1			2			3		
		Concentrati on introduite mg/L	Concentrati on prédite mg/L	Exactitu de relative (%)	Concentrati on introduite mg/L	Concentrati on prédite mg/L	Exactitu de relative (%)	Concentrati on introduite mg/L	Concentrati on prédite mg/L	Exactitu de relative (%)
12,5mg/L	1	12,6	13,35	-5,74	12,6	13,775	-8,68	12,6	13,5	-6,6
	2	12,6	13	-3,02	12,6	13,325	-5,41	12,6	13,9	-9,29
	3	12,6	13,475	-6,59	12,6	13,575	-7,2	12,6	13	-3
62,5mg/L	1	62,975	62,875	0,14	62,95	61,225	2,79	63,025	59,675	5,6
	2	63	55,6	13,29	63	56,275	11,92	63	63,2	-0,32
	3	62,975	60,325	4,38	62,975	58,6	7,48	63	57,85	8,92
125,5mg/L	1	125,925	117,475	7,2	125,9	126,075	-0,15	126,05	130,45	-3,37
	2	126	112,1	12,38	125,975	123,85	1,71	125,975	122,6	2,75
	3	125,95	121,225	3,89	125,95	144,25	-12,69	126,025	122,825	2,59
187,5mg/L	1	188,9	193,85	-2,56	188,825	196,675	-3,99	189,05	175,625	7,65
	2	188,975	196,075	-3,62	188,975	198,95	-5,02	188,975	190,8	-0,96
	3	188,925	190,375	-0,76	188,925	220,725	-14,41	189,025	195,725	-3,43
250mg/L	1	251,85	235,7	6,85	251,775	259,45	-2,96	252,075	253,9	-0,72
	2	251,975	244,5	3,05	251,95	255,425	-1,36	251,95	251,575	0,15
	3	251,9	247,475	1,79	251,9	257,375	-2,13	252,025	247,825	1,7



**Figure 3 : Profil d'exactitude d'Oxalate ( $\beta = 85\%$  et  $\lambda = 15\%$ ).**



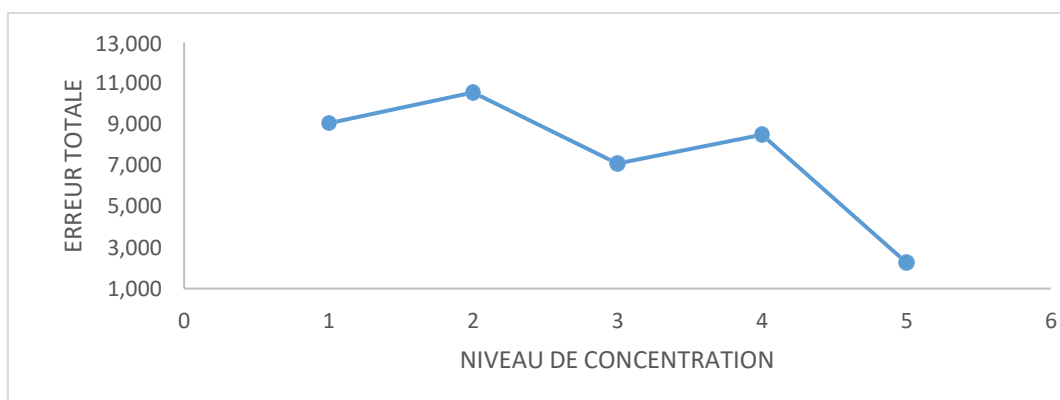
**Figure 4 :** Droite de linéarité de la concentration prédite en fonction de la concentration introduite d'Oxalate.

**Tableau 5 :** Comparaison de la pente et de l'ordonnée à l'origine avec 0.

<b>Comparaison de la pente avec 1</b>	<b>t calculé</b>	<b>0,46</b>	<b>Différence non significative</b>
	<b><math>t^{\circ}(\alpha ; 13)</math></b>	<b>2,16</b>	
	<b>Condition</b>	<b><math>t \text{ calculé} &lt; t^{\circ}(\alpha ; 13)</math></b>	
<b>Comparaison de l'ordonnées à l'origine avec 0</b>	<b>t calculé</b>	<b>0,33</b>	<b>Différence non significative</b>
	<b><math>t^{\circ}(\alpha ; 13)</math></b>	<b>2,16</b>	
	<b>Condition</b>	<b><math>t \text{ calculé} &lt; t^{\circ}(\alpha ; 13)</math></b>	

**Tableau 6 :** Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration d'oxalate

Niveau (mg/L)	1 (12,5mg/L)	2 (62,5mg/L)	3 (125mg/L)	4 (187,5mg/L)	5 (250mg/L)
Moyenne des concentrations théoriques (mg/L)	12,60	62,98	125,97	188,95	251,93
Biais relatif (%)	6,627	-5,507	-1,132	3,425	-0,625
Biais relatif en valeur absolue	6,627	5,507	1,132	3,425	0,625
Coefficient de variation de fidélité intermédiaire (%)	2,440	5,054	5,975	5,070	1,645
Erreur totale (%)	<b>9,067</b>	<b>10,561</b>	<b>7,107</b>	<b>8,495</b>	<b>2,270</b>



**Figure 5 :** Profil d'erreur totale d'Oxalate.

**Tableau 7 :** Valeurs de la stabilité intra série

Stabilité intra série				
Vial	Air de pic	Air de pic blanc	Concentration mg/L	Concentration (mmol)/L
T0 H	1030129	913573	44,72	0,35
T1 H	975944	859388	42,48	0,34
T2 H	912658	796102	39,87	0,32
T4 H	956472	839916	41,68	0,33
T8 H	931158	814602	40,64	0,32
Blanc échantillon	116556			
ΔC T1 -T0	-5,3%	-5,9%		
ΔC T2 -T0	-11,4%	-12,9%		
ΔC T4 -T0	-7,2%	-8,1%		
ΔC T8 -T0	-9,6%	-10,8%		

**Tableau 8 : Stabilité de conservation entre +2°C à +8°C et à -20°C**

Stabilité de conservation		J0	J1	J2	J3	J5	J7
Niveau 1							
Concentration en mmol/L	+2°C à +8°C	0,37	0,29	0,37	0,29	/	/
	-20°C	0,37	0,28	/	0,29	0,29	0,29
ΔC Réfrigéré		/	-23%	-2,00%	-22%	/	/
ΔC Congelé		/	-26%	/	-22%	-22%	-23%

**Tableau 9 : Valeurs de contrôle qualité interne**

	Intervalle			
	Valeur minimale	Valeur maximale	Cible	Ecart Type
Niveau 1 (mmol/L)	0,164756025	0,334889826	0,24982	0,0425335
Niveau 2 (mmol/L)	0,711197812	1,213642435	0,96242	0,1256112

## 4. Discussion

### 4.1 Spécificité

Après la confirmation des temps de rétention d'Oxalate en injectant leurs standards séparément, on est passé à l'étude de la spécificité par deux méthodes :

#### 4.1.1 Comparaison des chromatogrammes

Selon les résultats obtenus, la spécificité de la méthode est confirmée par :

- ✓ L'absence des pics aux temps de rétention d'Oxalate dans le chromatogramme obtenu à partir des solutions du diluant (eau) non chargé ;
- ✓ Les temps de rétention correspondants à l'Oxalate obtenus sur les

chromatogrammes du standard sans matrice et avec matrice d'un même niveau de concentration sont comparables.

- ✓ L'urine non chargée présente un pic au temps de rétention d'Oxalate correspondant à la quantité physiologique présente chez les sujets sains.

#### 4.1.2 Comparaison des deux pentes $a_1$ et $a_2$ , et des deux ordonnées à l'origine $b_1$ et $b_2$

D'après ce qu'illustre le tableau (5) on conclue que :

- ✓ Les deux pentes ne sont pas significativement différentes au risque  $\alpha$

= 5% considéré, d'où l'absence de l'effet matrice après soustraction de la quantité naturellement présente dans la matrice ;

- ✓ Il n'existe pas de différence significative entre les ordonnées à l'origine au risque  $\alpha = 5\%$  considéré, expliquant ainsi l'absence d'erreur systématique.

On peut déduire qu'avec un risque de 5%, la méthode n'a pas d'erreur systématique, elle est donc statistiquement **spécifique**. Ces résultats confirment ceux obtenus par l'étude des chromatogrammes.

#### 4.2 Justesse

L'accord entre la valeur de la concentration moyenne prédite, obtenue à partir des trois séries de validation, et la valeur de la moyenne des concentrations introduites considérée comme étant la valeur de référence est assez étroit pour les niveaux de concentration inclus dans l'intervalle de quantification [12,5 ; 250] mg/L, en tenant compte que les biais relatifs de ces derniers sont largement inférieurs à 7% confirmant la justesse de notre méthode.

#### 4.3 Fidélité

Etant donné que les coefficients de variation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire des niveaux de concentration inclus dans l'intervalle [12,5 ; 250] mg/L sont inférieurs à 6% pour l'Oxalate, le degré de dispersion des concentrations prédites obtenues est assez étroit

pour tous les niveaux, la méthode est donc **fidèle**.

#### 4.4 Profil d'exactitude

En se référant aux résultats obtenus des profils d'exactitude dans la figure (3) pour l'Oxalate, on considère que la méthode utilisée dans ce présent travail est valide sur l'intervalle de dosage où le profil d'exactitude est compris dans les limites d'acceptation, son domaine de validité est donc compris dans l'intervalle de concentrations [12,5 ; 250] mg/L incluant ainsi les valeurs normales et pathologiques entrants dans le diagnostic des maladies liées aux perturbations de l'oxalate urinaire (valeurs physiologique inférieures à 0,3 mmol/L. En tenant compte de la limite d'acceptabilité  $\lambda = \pm 15\%$  et de la probabilité de confiance  $\beta = 85\%$ . Cela signifie qu'on peut garantir que la méthode est capable de produire des futurs résultats acceptables avec une probabilité de 85%.

#### 4.5 Linéarité

La linéarité a été évaluée à partir de cinq niveaux de concentration (12.5, 62.5, 125, 187.5, 250 mg/L) avec trois répétitions indépendantes pour chaque niveau de concentration.

La droite de régression linéaire obtenue pour l'Oxalate est sous forme  $y = 1,009x + 0,9922$ , Avec un coefficient de détermination  $R^2$  de 0,99504 signifiant ainsi que la variabilité totale de la concentration prédite est expliquée à 99,5%

par la variabilité de la concentration introduite de l'échantillon.

Le coefficient de détermination linéaire de la relation existante entre la concentration introduite et la concentration prédite est très acceptable. Bien qu'il ne nous renseigne que très peu sur la qualité de la régression, sa valeur peut nous orienter, surtout par le fait qu'elle est très proche de 1.

L'étude statistique de la linéarité pour l'Oxalate, illustrée par le tableau (5), a confirmé que la pente est statistiquement non différente de 1 et que l'ordonnée à l'origine est comparable statistiquement avec 0 ce qui prouve la validité de la régression et de la linéarité.

#### 4.6 Erreur totale

Selon les profils d'erreur totale élucidés dans la figure (5) on peut conclure que tous les niveaux de concentration de l'oxalate sont inclus dans l'intervalle de validité, vu qu'ils présentent des erreurs totales relatives acceptables ne dépassant pas les limites d'acceptabilité prédéfinies (15%) avec une erreur maximale de **10,561** pour l'oxalate, observée pour le deuxième niveau de concentration (**62,5mg/L**).

#### 4.7 Stabilité :

La stabilité intra série est acceptable (-5,3% - 11,4%). Pour la conservation la diminution de la concentration de l'oxalate peut atteindre un

taux de 26 %. On recommande d'acidifier les échantillons avant la conservation pour une meilleure stabilité.

#### 4.8 Contrôle qualité

L'intervalle obtenu des valeurs minimales et maximales pour le niveau 1 [0,16, 0,33], pour le niveau 2 [0,71, 1,21].

#### 5. Conclusion

Nous avons développé et validé avec succès une méthode R-HPLC-UV (C18, 15 cm,  $\lambda=314$  nm), la technique développée s'est avérée simple, spécifique, linéaire, juste, fidèle, et exacte dans l'intervalle de tolérance [12,5 ;250]mg/L ; en vue du dosage de l'oxalurie. En raison de sa fiabilité, et du rapport coût-efficacité elle constitue un outil de dépistage et de suivi qui sera appliquée en routine au laboratoire de biochimie au profit des malades.

## Références

1. Bouzidi H, Majdoub A, Daudon M, Najjar MF. [Primary hyperoxaluria: A review]. *Néphrologie & thérapeutique*. 2016;12(6):431-6.
2. Daudon M, Traxer O, Lechevallier E, Saussine C. La lithogénèse. *Progrès en urologie*. 2008;18(12):815-27.
3. Daudon M, Jungers P, Traxer O. *Lithiase urinaire*: Lavoisier; 2012.
4. Efe O, Verma A, Waikar SS. Urinary oxalate as a potential mediator of kidney disease in diabetes mellitus and obesity. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2019;28(4):316-20.
5. Lorenzo V, Torres A, Salido E. Primary hyperoxaluria. *Nefrologia : publicación oficial de la Sociedad Española Nefrología*. 2014;34(3):398-412.
6. Amoroso A, Pirulli D, Florian F, Puzzer D, Boniotto M, Crovella S, et al. AGXT gene mutations and their influence on clinical heterogeneity of type 1 primary hyperoxaluria. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2001;12(10):2072-9.
7. Marengo SR, Romani AM. Oxalate in renal stone disease: the terminal metabolite that just won't go away. *Nature clinical practice Nephrology*. 2008;4(7):368-77.
8. AEK M, Rachid D, Brahim K. Etude de l'effet inhibiteur des substances chimiques (magnésium et citrate) et naturelles (Origan et Gingembre sur la cristallisation oxalo-phosphocalcique in vitro.
9. Hoppe B, Martin-Higuera C. Improving Treatment Options for Primary Hyperoxaluria. *Drugs*. 2022;82(10):1077-94.
10. Cochat P, Cheyssac É, Sellier-Leclerc A-L, Bertholet-Thomas A, Bacchetta J, Acquaviva-Bourdain C. L'hyperoxalurie primitive, aujourd'hui et demain. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*. 2017;201(7-9):1361-75.
11. Traxer O, Lechevallier E, Saussine C, Daudon M, Haymann J-P. Syndrome métabolique et lithiase urinaire. Une notion nouvelle pour l'urologue. *Progrès en urologie*. 2008;18(12):828-31.
12. Ermer T, Eckardt K-U, Aronson PS, Knauf F. Oxalate, inflammasome, and progression of kidney disease. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2016;25(4):363.
13. Houillier P. Diététique et lithiase rénale: le rôle de l'eau. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*. 2015;50:S51-S60.
14. Dalibon P. La lithiase urinaire, une affection sous surveillance. *Actualités Pharmaceutiques*. 2015;54(542):23-9.
15. Djelloul Z, Djelloul A, Bedjaoui A, Kaid-Omar Z, Attar A, Daudon M, et al. Lithiase urinaire dans l'Ouest algérien: étude de la composition de 1354 calculs urinaires en

relation avec leur localisation anatomique, l'âge et le sexe des patients. Progrès en urologie. 2006;16(3):328.

16. El Jery HK, Harzallah A, Chouchi S, Talbi E, Baccouch H, Abdelmoula J, et al. Recherche de facteurs lithogènes au cours des lithiases oxalo-calciques: enquête épidémiologique. Progrès en urologie. 2016;26(8):450-6.

17. Shen Y, Luo X, Li H, Guan Q, Cheng L. Evaluation of a high-performance liquid chromatography method for urinary oxalate determination and investigation regarding the pediatric reference interval of spot urinary oxalate to creatinine ratio for screening of primary hyperoxaluria. Journal of clinical laboratory analysis. 2021;35(8):e23870.

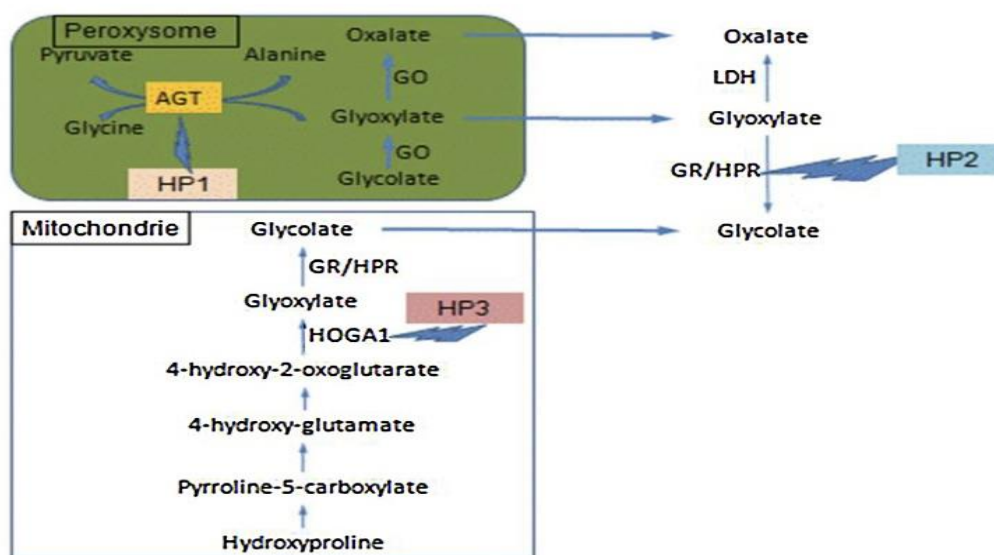
18. Hubert P, Nguyen-Huu J, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, et al. Validation des procédures analytiques quantitatives, harmonisation des démarches. STP Pharma Pratiques. 2003;13(3).

19. Hubert P, Nguyen-Huu J-J, Boulanger B, Chapuzet E, Cohen N, Compagnon P-A, et al. Validation des procédures analytiques quantitatives: harmonisation des démarches- Partie III. Exemples d'application. STP pharma pratiques. 2006;16(2).

20. A. Vassault AH, E. Chapuzet, J. Arnaud, C. Giroud et les membres du sous-groupe 2

analytique de la SFBC. Vérification validation des performances d'une méthode d'analyse.

ANNEXES :



Annexe 1 : Métabolisme de l'acide oxalique.

Annexe 2 : Résultats d'alignement des réponses observées avec les trois séries de validation pour l'acide oxalique.

Niveaux %	Séries (Jours)									
	répétitions	1			2			3		
		Rapport des concentrations	Mesurages (Rapport des réponses instrumentales)	Alignement	Rapport des concentrations	Mesurages (Rapport des réponses instrumentales)	Alignement	Rapport des concentrations	Mesurages (Rapport des réponses instrumentales)	Alignement
12,5mg/L	1	12,59	251159,00	251232,15	12,59	279671,33	279792,63	12,60	307034,67	306958,27
	2	12,60	242067,00	241983,40	12,60	268558,33	268467,36	12,60	317168,67	317255,98
	3	12,60	254312,00	254322,45	12,60	274633,33	274603,01	12,60	293778,67	293767,75
62,5mg/L	1	62,96	1492699,00	1493064,77	62,94	1430303,33	1430909,80	63,02	1517063,67	1516681,68
	2	62,99	1311188,00	1310769,98	62,99	1311087,33	1310632,48	62,99	1608225,67	1608662,22
	3	62,98	1429351,00	1429403,25	62,98	1366955,33	1366803,72	63,01	1468696,67	1468642,10
125mg/L	1	125,93	2861723,00	2862454,54	125,89	3002614,33	3003827,27	126,04	3370885,67	3370121,69
	2	125,99	2728898,00	2728061,96	125,98	2950920,33	2950010,63	125,98	3163898,67	3164771,78
	3	125,95	2956796,00	2956900,51	125,95	3445040,33	3444737,10	126,01	3170878,67	3170769,53
187,5mg/L	1	188,89	4777129,00	4778226,31	188,83	4714733,33	4716552,74	189,06	4554554,67	4553408,70
	2	188,98	4835391,00	4834136,94	188,96	4772995,33	4771630,78	188,96	4949693,67	4951003,34
	3	188,93	4690807,00	4690963,76	188,93	5300463,33	5300008,48	189,02	5080402,67	5080238,96

250mg/L	1	251,85	5826584,00	<b>5828047,07</b>	251,78	6237086,33	<b>6239512,20</b>	252,08	6605357,67	<b>6603829,71</b>
	2	251,98	6050479,00	<b>6048806,92</b>	251,95	6143345,33	<b>6141525,93</b>	251,95	6541199,67	<b>6542945,90</b>
	3	251,90	6122841,00	<b>6123050,01</b>	251,90	6189585,33	<b>6188978,87</b>	252,03	6444913,67	<b>6444695,39</b>

Annexe 3 : Résultats des réponses alignées pour les trois séries de validation de l'acide oxalique.

Niveaux %	répétitions	Séries (Jours)								
		1			2			3		
		Réponses alignées	Mesurages (Réponses instrumentales)	prédictions inverses	Réponses alignées	Mesurages (Réponses instrumentales)	prédictions inverses	Réponses alignées	Mesurages (Réponses instrumentales)	prédictions inverses
12,5mg/L	1	251232,15	251159,00	<b>13,360</b>	279792,63	279671,33	<b>13,786</b>	306958,27	307034,67	<b>13,495</b>
	2	241983,40	242067,00	<b>12,991</b>	268467,36	268558,33	<b>13,319</b>	317255,98	317168,67	<b>13,888</b>
	3	254322,45	254312,00	<b>13,483</b>	274603,01	274633,33	<b>13,572</b>	293767,75	293778,67	<b>12,991</b>
62,5mg/L	1	1493064,77	1492699,00	<b>62,872</b>	1430909,80	1430303,33	<b>61,237</b>	1516681,68	1517063,67	<b>59,679</b>
	2	1310769,98	1311188,00	<b>55,604</b>	1310632,48	1311087,33	<b>56,279</b>	1608662,22	1608225,67	<b>63,190</b>
	3	1429403,25	1429351,00	<b>60,334</b>	1366803,72	1366955,33	<b>58,595</b>	1468642,10	1468696,67	<b>57,845</b>
125mg/L	1	2862454,54	2861723,00	<b>117,470</b>	3003827,27	3002614,33	<b>126,077</b>	3370121,69	3370885,67	<b>130,438</b>
	2	2728061,96	2728898,00	<b>112,112</b>	2950010,63	2950920,33	<b>123,858</b>	3164771,78	3163898,67	<b>122,599</b>
	3	2956900,51	2956796,00	<b>121,236</b>	3444737,10	3445040,33	<b>144,252</b>	3170769,53	3170878,67	<b>122,828</b>
187,5mg/L	1	4778226,31	4777129,00	<b>193,853</b>	4716552,74	4714733,33	<b>196,679</b>	4553408,70	4554554,67	<b>175,613</b>
	2	4834136,94	4835391,00	<b>196,082</b>	4771630,78	4772995,33	<b>198,949</b>	4951003,34	4949693,67	<b>190,792</b>
	3	4690963,76	4690807,00	<b>190,374</b>	5300008,48	5300463,33	<b>220,730</b>	5080238,96	5080402,67	<b>195,726</b>
250mg/L	1	5828047,07	5826584,00	<b>235,710</b>	6239512,20	6237086,33	<b>259,459</b>	6603829,71	6605357,67	<b>253,893</b>
	2	6048806,92	6050479,00	<b>244,511</b>	6141525,93	6143345,33	<b>255,420</b>	6542945,90	6541199,67	<b>251,569</b>
	3	6123050,01	6122841,00	<b>247,472</b>	6188978,87	6189585,33	<b>257,376</b>	6444695,39	6444913,67	<b>247,818</b>

Annexe 4 : Résultats du calcul de l'exactitude relative pour la validation de l'acide oxalique.

Niveaux	Répétitions	Les séries								
		1			2			3		
		Concentration introduite mg/L	Concentration prédite mg/L	Exactitude relative (%)	Concentration introduite mg/L	Concentration prédite mg/L	Exactitude relative (%)	Concentration introduite mg/L	Concentration prédite mg/L	Exactitude relative (%)
12,5mg/L	1	12,6	13,35	<b>-5,74</b>	12,6	13,775	<b>-8,68</b>	12,6	13,5	<b>-6,6</b>
	2	12,6	13	<b>-3,02</b>	12,6	13,325	<b>-5,41</b>	12,6	13,9	<b>-9,29</b>
	3	12,6	13,475	<b>-6,59</b>	12,6	13,575	<b>-7,2</b>	12,6	13	<b>-3</b>
62,5mg/L	1	62,975	62,875	<b>0,14</b>	62,95	61,225	<b>2,79</b>	63,025	59,675	<b>5,6</b>
	2	63	55,6	<b>13,29</b>	63	56,275	<b>11,92</b>	63	63,2	<b>-0,32</b>
	3	62,975	60,325	<b>4,38</b>	62,975	58,6	<b>7,48</b>	63	57,85	<b>8,92</b>
125,5mg/L	1	125,925	117,475	<b>7,2</b>	125,9	126,075	<b>-0,15</b>	126,05	130,45	<b>-3,37</b>
	2	126	112,1	<b>12,38</b>	125,975	123,85	<b>1,71</b>	125,975	122,6	<b>2,75</b>
	3	125,95	121,225	<b>3,89</b>	125,95	144,25	<b>-12,69</b>	126,025	122,825	<b>2,59</b>
187,5mg/L	1	188,9	193,85	<b>-2,56</b>	188,825	196,675	<b>-3,99</b>	189,05	175,625	<b>7,65</b>
	2	188,975	196,075	<b>-3,62</b>	188,975	198,95	<b>-5,02</b>	188,975	190,8	<b>-0,96</b>
	3	188,925	190,375	<b>-0,76</b>	188,925	220,725	<b>-14,41</b>	189,025	195,725	<b>-3,43</b>
250mg/L	1	251,85	235,7	<b>6,85</b>	251,775	259,45	<b>-2,96</b>	252,075	253,9	<b>-0,72</b>
	2	251,975	244,5	<b>3,05</b>	251,95	255,425	<b>-1,36</b>	251,95	251,575	<b>0,15</b>
	3	251,9	247,475	<b>1,79</b>	251,9	257,375	<b>-2,13</b>	252,025	247,825	<b>1,7</b>