



Université Cadi Ayyad
Faculté des Sciences Semlalia de Marrakech (FSSM)
Département de Chimie
Laboratoire de Chimie Organique Appliquée
Équipe Analyse et Contrôle de Qualité

Cours de :

Métrologie

CHAPITRE IV :

Validation des méthodes d'essais

Mohammed EL KAHLAOUI

Docteur en Chimie

Décembre 2011

I. Introduction :

Suite à la demande croissante en résultats d'analyse dans les domaines environnemental (polluants dans les eaux, les sols...), agro-alimentaire (sécurité des aliments...), pharmaceutique (contrôle qualité), médicolégal (les experts...) et dans l'industrie en général (Qualité des résultats), il est nécessaire de pouvoir garantir la fiabilité et la traçabilité des résultats fournis. Cela exige la mise en place d'un système organisationnel pour répondre à ce besoin.

Ce cours présente les éléments que les laboratoires audités doivent fournir dans le cadre des audits d'accréditation pour répondre aux exigences de la norme ISO/CEI 17025 relatives à la vérification et à la validation des méthodes d'essais et d'étalonnages soumises à l'accréditation.

Lorsqu'un laboratoire fait appel à des méthodes d'essais et d'étalonnage développées en interne, leur validation est une étape fondamentale. Afin de renforcer la mise en application de cette pratique, l'accréditation n'est délivrée qu'à la condition que l'étape de validation soit achevée au moment de l'audit d'obtention.

1. Rappel des exigences :

La norme ISO/CEI 17025 stipule que :

« Le laboratoire doit utiliser des méthodes d'essai et/ou d'étalonnage qui répondent aux besoins des clients et qui conviennent aux essais et/ou étalonnages qu'il effectue, de préférence des méthodes publiées comme normes internationales, régionales ou nationales. »

« Des méthodes développées par le laboratoire ou des méthodes adoptées par le laboratoire peuvent également être employées si elles conviennent à l'usage prévu et qu'elles ont été validées. »

« Le laboratoire doit valider les méthodes non normalisées, les méthodes conçues/développées par le laboratoire, les méthodes employées en dehors de leur domaine d'application prévu, ainsi que les amplifications ou modifications de méthodes normalisées, afin de confirmer que les méthodes sont aptes à l'emploi prévu. La validation doit être aussi étendue que l'impose la réponse aux besoins pour l'application ou le domaine d'application donné. Le laboratoire doit consigner des résultats obtenus, le mode opératoire utilisé pour la validation, ainsi qu'une déclaration sur l'aptitude de la méthode à l'emploi prévu. »

« Le laboratoire doit confirmer qu'il peut correctement appliquer des méthodes normalisées avant de les mettre en œuvre pour des essais ou des étalonnages. »

De ces exigences de l'ISO 17025 nous pouvons déduire qu'une méthode normalisée utilisée par le laboratoire doit être vérifiée pour confirmer sa bonne application par le laboratoire et que si elle n'est pas normalisée, elle doit être validée.

2. Définitions:

La norme ISO/IEC 17025 définit la validation comme étant: « La confirmation par examen et fourniture de preuves réelles que les exigences particulières d'un usage projeté donné sont remplies ».

C'est la procédure par laquelle on démontre, preuves expérimentales à l'appui, que les performances de la méthode permettent de répondre aux exigences de l'usage auquel elle est destinée.

3. Remarques préliminaires:

✎ L'objectif est de prouver de façon traçable qu'une méthode d'essai livre des résultats permettant de vérifier le respect de spécifications préétablies.

✎ L'identification, l'élimination des erreurs systématiques et la réduction de la dispersion des résultats des mesures sont au premier plan.

✎ Une validation n'est pas une opération que l'on effectue une fois pour toutes. Plus une méthode est employée, plus le nombre d'échantillons étudiés augmente.

✎ Une validation devrait couvrir les matrices typiques et contenir une affirmation la plus exacte possible sur l'objectif de l'étude. Tout changement de l'objectif de l'étude nécessite de compléter la validation.

✎ L'intégration, par un laboratoire d'une méthode validée par un tiers peut être réalisée par une validation simplifiée.

✎ Lorsque le laboratoire adopte des méthodes d'essai normalisées (ISO, EN, MSDA, DIN, AOAC) doit pouvoir apporter la preuve que la méthode est maîtrisée en interne (vérification de la fidélité, justesse,...).

II. Méthodes d'essais quantitatives et leur validation :

Les méthodes sélectionnées peuvent être issues des normes (internationales, régionales ou nationales) ou des organisations scientifiques de renom. Elles peuvent être développées et validées en interne par le laboratoire ou spécifiées par le client.

1. Vérification d'une méthode normalisée

Il s'agit ici de déterminer les caractéristiques de la méthode normalisée telle qu'elle est appliquée au sein du laboratoire et de vérifier que ces caractéristiques sont compatibles avec celles définies par la méthode normalisées. Les caractéristiques à vérifier sont :

- ✎ la répétabilité,
- ✎ la reproductibilité,
- ✎ le domaine de linéarité (si applicable),
- ✎ la limite de détection (si applicable),

✕ la limite de quantification (si applicable).

La participation à des essais inter laboratoires, s'il en existe, est indispensable pour assurer la maîtrise dans le temps de la méthode.

2. Validation d'une méthode

La validation d'une méthode non normalisée doit inclure les éléments de vérification cités précédemment auxquels s'ajoutent la détermination de la spécificité de la méthode et de sa justesse par rapport à une méthode de référence ou à des matériaux ou solutions de référence certifiés. Les caractéristiques à vérifier sont donc :

- ✕ la répétabilité,
- ✕ la reproductibilité,
- ✕ le domaine de linéarité,
- ✕ la limite de détection (si applicable),
- ✕ la limite de quantification (si applicable),
- ✕ la spécificité,
- ✕ la justesse.

La participation à des essais inter laboratoires est indispensable pour assurer la maîtrise dans le temps de la méthode.

3. Méthodes validées par un organisme indépendant

Le laboratoire peut utiliser des méthodes validées par un organisme indépendant, si possible accrédité. Ces méthodes sont alors assimilées à des méthodes normalisées au regard des exigences de la norme ISO/CEI 17025.

III. Caractéristiques de performances d'une méthode:

1. Spécificité/Sélectivité:

✎ D'après le VIM: « Propriété d'un système de mesure, utilisant une procédure de mesure spécifiée, selon laquelle le système fournit des valeurs mesurées pour un ou plusieurs mesurandes, telles que les valeurs de chaque mesurande sont indépendantes des autres mesurandes ou d'autres grandeurs dans le phénomène, le corps ou la substance en cours d'examen ».

✎ Une méthode est spécifique si elle produit une réponse uniquement pour l'analyte d'intérêt.

✎ Capacité à différencier et quantifier l'analyte cible en présence d'interférents dans l'échantillon. Très souvent la spécificité se fonde sur une absence d'interférence.

✎ Cette caractéristique est étudiée en premier, en effet elle permet de vérifier que le signal mesuré correspond bien à l'analyte recherché.

✎ Lorsque l'on ne peut pas évaluer l'influence de chaque constituant de la matrice, une technique commode d'emploi, permettant d'évaluer l'influence de certaines interférences, est **la méthode des ajouts dosés** : Elle consiste à ajouter dans l'échantillon avant, pendant ou après sa préparation des quantités connues de l'analyte. On examine alors si la réponse de l'instrument de mesure correspond au signal initial augmenté du signal correspondant à la quantité ajoutée.

✎ Les effets liés à la sélectivité et à la spécificité sont évalués globalement lors de l'évaluation de la justesse.

o Exemple:

La spécificité/sélectivité (aussi la justesse) est vérifiée par l'approche des ajouts dosés.

On ajoute une poudre insoluble à l'échantillon d'acide de taux de solide 1,48%. On effectue pour chaque niveau deux essais.

Quantité ajoutée (%)	% TS présumé	N° d'Essai	% TS pratique	Moyenne (%)	Ecart absolu (%)	Ecart relatif (%)	Valeur absolue	Moyenne (%)
50	2,22	1	2,13	2,20	0,08	3,82	3,82	3,07
		2	2,27		-0,05	-2,32	2,32	
60	2,37	1	2,44	2,44	-0,07	-3,05	3,05	3,13
		2	2,45		-0,08	-3,22	3,22	
70	2,52	1	2,62	2,63	-0,10	-4,17	4,17	4,57
		2	2,65		-0,13	-4,96	4,96	
80	2,66	1	2,77	2,76	-0,11	-4,03	4,03	3,78
		2	2,76		-0,09	-3,54	3,54	
90	2,81	1	2,94	2,93	-0,13	-4,47	4,47	3,97
		2	2,91		-0,10	-3,48	3,48	
100	2,96	1	3,07	3,08	-0,12	-3,98	3,98	4,16
		2	3,09		-0,13	-4,34	4,34	

La moyenne de l'écart relatif ne dépasse pas 5%, on conclut que la méthode est spécifique et sélective.

2. Fidélité:

Étroitesse de l'accord entre les indications ou les valeurs mesurées obtenues par des mesurages répétés du même objet ou d'objets similaires dans des conditions spécifiées.

Les conditions spécifiées peuvent être, par exemple, des conditions de répétabilité, des conditions de fidélité intermédiaire ou des conditions de reproductibilité (voir ISO 5725-3:1994).

La fidélité sert à définir la répétabilité de mesure, la fidélité intermédiaire de mesure et la reproductibilité de mesure.

La fidélité est en général exprimée numériquement par des caractéristiques telles que l'écart-type, la variance ou le coefficient de variation dans les conditions spécifiées.

a) La répétabilité:

La répétabilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels successifs obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans **des conditions de répétabilité**.

Les conditions de répétabilité selon le **VIM**: « Condition de mesurage, dans un ensemble de conditions qui comprennent la même procédure de mesure, les mêmes opérateurs, le même système de mesure, les mêmes conditions de fonctionnement et le même lieu, ainsi que des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires pendant une courte période de temps ».

Après les tests pratiques, on détermine les deux valeurs à partir des équations suivantes :

$$\frac{t(0.975;n-1) \times \sigma}{\sqrt{n}} \quad \text{et} \quad CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100$$

Où σ : écart type d'une série de mesures se référant à la répétabilité.

b) La reproductibilité:

La reproductibilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels successifs obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans des conditions de reproductibilité.

Les conditions de reproductibilité selon le VIM: « condition de mesurage dans un ensemble de conditions qui comprennent des lieux, des opérateurs et des systèmes de mesure différents, ainsi que des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires ».

Après les tests pratiques, on détermine les deux valeurs à partir des équations suivantes :

$$\frac{t(0.975;n-1) \times \sigma}{\sqrt{n}} \quad \text{et} \quad CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100$$

Où σ : écart type d'une série de mesures se référant à la reproductibilité.

c) Calculs et Interprétations :

Les deux termes précédents se rapportant à la fidélité s'expriment à l'aide:

✎ D'un intervalle de confiance à une concentration donnée, en fonction de l'écart type (σ), à un niveau de confiance spécifié et pour un nombre donné de déterminations ($n \geq 10$).

✎ Le niveau de confiance habituellement retenu est de 95 %.

✎ L'intervalle de confiance bilatéral de la moyenne arithmétique (valeur minimale et valeur maximale) d'une série de mesures à un niveau de confiance de 95 % est défini par la double inégalité suivante :

$$\bar{x} - \frac{t(0.975; n-1) \times \sigma}{\sqrt{n}} \leq x \leq \bar{x} + \frac{t(0.975; n-1) \times \sigma}{\sqrt{n}}$$

✎ Le coefficient de variation ne doit pas dépasser une valeur limite tolérée qui est choisie auparavant (ex. 5%).

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100$$

✎ Lorsque $n \geq 30$, $t(0.975; n-1) = 2$, Pour $n < 30$, il faut se référer au tableau statistique, ci-dessous, de la distribution de Student pour connaître la valeur de $t(0.975; n-1)$ correspondant à la probabilité au dépassement bilatéral.

DL* (n-1)	t(0,975)	DL* (n-1)	t(0,975)	DL* (n-1)	t(0,975)
1	2.706	9	2.262	17	2.110
2	4.303	10	2.228	18	2.101
3	3.182	11	2.201	19	2.093
4	2.776	12	2.179	20	2.086
5	2.571	13	2.160	25	2.060
6	2.447	14	2.145	30	2.042
7	2.365	15	2.131	40	2.021
8	2.306	16	2.120	60	2.000

* : *degré de liberté*

En pratique, la répétabilité et la reproductibilité s'effectuent de la façon suivante :

Dans la zone quantifiable de la méthode, choisir une concentration d'un échantillon et faire 10 répétitions.

Chaque échantillon doit subir toutes les étapes de la méthode d'analyse en respectant les conditions spécifiées à l'égard de la répétabilité et de la reproductibilité.

Faire l'ensemble des calculs liés à la méthode et reporter les résultats en utilisant les unités appropriées et le nombre de chiffres significatifs nécessaires.

Inclure dans les calculs un test de rejet si certaines données semblent aberrantes.

d) Exemple :

Cet exemple a pour objet de présenter les résultats de la vérification de la fidélité de la méthode titrimétrique à l'EDTA pour la détermination de la somme des concentrations en calcium et magnésium (la **dureté totale** ou titre hydrotimétrique **TH en degré Français**) dans les eaux.

Répétabilité:

Les paramètres de répétabilité ont été déterminés sur une série de 10 mesures déterminées dans des conditions de répétabilité sur un échantillon d'eau potable.

Eau potable	
Fait par Chimiste le, jj/mm/aa	
ESSAIS	TH (en °F)
1	33,12
2	33,04
3	33,00
4	33,08
5	33,08
6	33,12
7	33,00
8	33,12
9	33,08
10	33,00
MOYENNE	33,06
ECART TYPE	0,05
C.V	0,15
t (P=0.05)	2,262
LIMITE	32,95 33,17
MAXIMUM	33,12
MINIMUM	33,00

Nous donnons ci-après la moyenne des résultats :

Elément	Teneur moyenne (°F)	Ecart-type (°F)	Coefficient de variation (°F)
Eau potable	33,06	0,05	0,15

Le coefficient de variation ne dépasse pas 5% et toutes les valeurs sont comprises dans l'intervalle de confiance [32.95 – 33.17], ce qui montre que la méthode est répétable.

Reproductibilité :

Les paramètres de reproductibilité ont été déterminés sur trois séries de mesures déterminées dans des conditions de reproductibilité sur l'échantillon d'eau potable.

Test d'égalité des variances (F-Test) :

Les paramètres de reproductibilité ont été déterminés sur une série de 30 mesures effectuées par trois chimistes dans des conditions de reproductibilité :

Chimiste 1		Chimiste 2		Chimiste 3	
ESSAIS	TH (en °F)	ESSAIS	TH (en °F)	ESSAIS	TH (en °F)
1	33,12	11	32,86	21	33,08
2	33,04	12	33,00	22	33,08
3	33,00	13	32,94	23	33,10
4	33,08	14	32,86	24	33,00
5	33,08	15	33,00	25	33,08
6	33,12	16	32,94	26	33,08
7	33,00	17	33,00	27	33,06
8	33,12	18	32,86	28	33,00
9	33,08	19	32,94	29	32,94
10	33,00	20	33,00	30	33,08
MOYENNE	33,02				
ECART TYPE	0,08				
C.V	0,23				
t (P=0.05)	2,26				
LIMITE	32,84			33,19	
MAXIMUM	33,12				
MINIMUM	32,86				

A partir des échantillons indépendants, il s'agit de mettre en place un test de Fisher qui permettra de vérifier que si les variables parents sont de même variance ou pas.

Les calculs du test sont disponibles sous EXCEL.

Test d'égalité des variances (F-Test)

	Chimiste 1-Chimiste 2		Chimiste 1-Chimiste 3		Chimiste 2-Chimiste 3	
	Variable 1	Variable 2	Variable 1	Variable 2	Variable 1	Variable 2
Moyenne (°F)	32,94	33,0626	32,94	33,04976	33,04976	33,0626
Variance	0,0037	0,0024	0,0037	0,0027	0,0027	0,0024
Observations	10	10	10	10	10	10
Degré de liberté	9	9	9	9	9	9
F	1,59		1,41		1,13	
P(F<=f) unilatéral	0,25		0,31		0,43	
Valeur critique pour F (unilatéral)	3,18		3,18		3,18	

La moyenne des résultats de chaque série de mesures du test d'égalité des variances :

	Série I	Série II	Série II	Série III	Série I	Série II
Teneur moyenne (°F)	32,94	33,06	32,94	33,05	33,05	33,06
Variance (°F)	0,004	0,002	0,004	0,003	0,003	0,002
F Observée	1,59		1,41		1,13	
F Critique	3,18		3,18		3,18	

Conclusion :

On constate que les valeurs observées sont inférieures aux valeurs critiques correspondantes d'où l'hypothèse d'égalité du test des variances est validée.

Résultats après test :

	Eau potable
MOYENNE (°F)	33,02
ECART TYPE (°F)	0,08
C.V (°F)	0,23

3. Justesse:

Pour évaluer la justesse, il faut disposer de références. Les valeurs de référence acceptées peuvent provenir : d'un matériau de référence, d'une valeur fournie par une méthode de référence, d'une valeur provenant d'un essai inter laboratoires (essai d'aptitude) et éventuellement de l'utilisation de la méthode des ajouts dosés. Bien évidemment la « qualité » de la valeur de référence est primordiale.

La justesse se mesure, à un niveau donné de concentration, dans la zone quantifiable pratique de la méthode.

a) Calcul de la justesse à l'aide d'un matériau de référence:

Dans la zone quantifiable de la méthode, appliquer 10 fois le protocole expérimental ($n = 10$) sur un échantillon dont la valeur suggérée est fournie par un organisme reconnu (matériau de référence).

$$\text{Justesse (\%)} = 100 - \text{Erreur relative (\%)}, \quad \text{Erreur relative (\%)} = \left| \frac{V_0 - V_s}{V_s} \right|$$

Où V_0 : moyenne des valeurs observées et V_s : valeur suggérée.

Le test statistique de justesse adopté consiste à calculer un écart normalisé E_N :

$$E_N = \left| \frac{\overline{X_i} - X_{\text{réf}}}{\sqrt{u_i^2 - u_{\text{réf}}^2}} \right|$$

Si E_N est inférieur à 2, on considère que l'écart n'est pas significatif.

Il est aussi possible de comparer l'écart $\left| \overline{X_i} - X_{\text{réf}} \right|$ à une tolérance L .

Si $\left| \overline{X_i} - X_{\text{réf}} \right| \leq L$, alors l'erreur de justesse est considérée comme non significative.

b) Calcul de la justesse par rapport à une méthode de référence

Cette approche permet de comparer la justesse de la méthode alternative à la méthode de référence à travers des échantillons analysés plusieurs fois par les deux méthodes.

Préparer au moins 10 échantillons différents situés dans le domaine de concentration de la méthode. Effectuer au moins 2 répétitions pour chaque échantillon avec la méthode alternative et au moins 2 répétitions avec la méthode de référence.

- Calculer la moyenne arithmétique $\overline{X_i}$ des résultats obtenus pour chaque échantillon i par la méthode alternative ;

- Calculer la moyenne arithmétique $\overline{Z_i}$ des résultats obtenus pour chaque échantillon i par la méthode de référence ;

- Calculer des différences pour chaque échantillon i , $\overline{d_i} = \overline{X_i} - \overline{Z_i}$

- Calculer la moyenne et l'écart type des différences.

La justesse de la méthode alternative par rapport à la méthode de référence s'effectue en comparant les moyennes des deux méthodes. Pour cela calculer le rapport w :

$$w = \frac{|\bar{d}|}{\sigma_d}$$

Où $\bar{d}$ et σ_d sont la moyenne et l'écart type des différences.

La justesse de la méthode alternative par rapport à la méthode de référence est établie si l'écart moyen entre les moyennes de chaque échantillon, obtenues par la méthode de référence et la méthode alternative, est négligeable.

La règle de décision est la suivante :

- ✎ Si w est inférieur ou égal à 3.0, conclure que les deux méthodes ont la même justesse, avec un risque d'erreur $\alpha=1\%$;
- ✎ Si w est supérieur à 3.0, conclure que la méthode alternative n'est pas juste par rapport à la méthode de référence, avec un risque d'erreur $\alpha=1\%$;

c) Calcul de la justesse par la technique des ajouts dosés

Lorsqu'aucun matériau de référence certifié et aucune autre méthode ne sont disponibles, la justesse est déterminée en recourant au dopage.

Celui-ci consiste à ajouter l'analyte à 5-10 échantillons. Ensuite, les concentrations des échantillons dopés et non dopés sont déterminées. La différence entre les deux résultats par rapport à la concentration dopée donne la récupération.

Un minimum de cinq essais est demandé pour l'évaluation d'une méthode d'analyse.

Dans la zone quantifiable de la méthode, analyser au moins cinq échantillons réels. Ajouter une concentration d'au moins 50 % et d'au plus 100 % de la concentration réelle de la substance à doser.

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

Où C_f : concentration mesurée d'un échantillon dopé;

C : concentration mesurée d'un échantillon non dopé;

C_a : concentration de la substance ajoutée.

e) Exemple :

- ✎ Calcul de la justesse à l'aide d'un matériau de référence

La justesse a été vérifiée par l'approche du calcul de l'écart normalisé.

L'échantillon analysé est une eau douce issue des essais inter laboratoires.

<i>Chimiste : xxxx, le jj/mm/aa</i>	
<i>ESSAIS</i>	<i>TH (en °F)</i>
1	35,41
2	35,44
3	35,42
4	35,46
5	35,46
MOYENNE	35,44
ECART TYPE	0,02

Valeur moyenne	LABORATOIRE (a)	35,44
	REFERENCE (b)	36,00
Incertitude type	LABORATOIRE (A)	0,02
	REFERENCE (B)	0,80
DIFFERENCE = Abs[(a)-(b)]=(c)		0,56
ERREUR RELATIVE Abs[(a)-(b)]*100/(a)		1,58
TOLERANCE		1,60
(d) % =(c)*100/(b)		1,56
$E_N = (c) / \text{racine}(A^2 + B^2)$		0,70
E_N critique		2

D'après le test de justesse selon la méthode « Ecart normalisé », l'erreur de justesse est considérée comme non significative.

✎ Calcul de la justesse par rapport à une méthode de référence

En se basant sur la norme NF V 03-110 (Décembre 1998), on compare les écarts types (fidélité) et les moyennes (justesse) des teneurs des densités des échantillons d'acide phosphorique obtenues par la méthode normalisée et la méthode par aéromètre. Pour comparer les moyennes, nous avons calculé le rapport de la différence des moyennes sur l'écart type des différences:

Echantillons	Effectifs	Méthode alternative				Méthode référence				
		Répétitions		Moyennes	Variances	Répétitions		Moyennes	Variances	Différence
		1	2			1	2			
1	2	1648	1649	1649	0,5000	1647	1647	1647	0,0000	1,50
2	2	1645	1645	1645	0,0000	1645	1645	1645	0,0000	0,00
3	2	1640	1640	1640	0,0000	1639	1639	1639	0,0000	1,00
4	2	1645	1644	1645	0,5000	1644	1643	1644	0,5000	1,00
5	2	1650	1650	1650	0,0000	1650	1650	1650	0,0000	0,00
6	2	1651	1650	1651	0,5000	1651	1650	1651	0,5000	0,00
7	2	1652	1652	1652	0,0000	1652	1651	1652	0,5000	0,50
8	2	1653	1652	1653	0,5000	1652	1652	1652	0,0000	0,50
9	2	1660	1660	1660	0,0000	1658	1659	1659	0,5000	1,50
10	2	1652	1652	1652	0,0000	1651	1651	1651	0,0000	1,00
11	2	1641	1642	1642	0,5000	1642	1643	1643	0,5000	-1,00
12	2	1654	1654	1654	0,0000	1654	1655	1655	0,5000	-0,50
Moyenne des variances					0,2083	Moyenne des différences				0,4583

Résultats statistiques

	Unité	Alternative	Référence
Justesse			
Moyennes	Sans unité	1649,21	1648,75
Fidélité			
Ecart type de répétabilité		0,4564	0,5000
Variance de répétabilité		0,2083	0,2500
Nombre d'échantillons		12	12
Nombre total des mesures		24	24

Tests statistiques

Tests de vérification	Valeur obtenue	Valeur critique	Conclusion
Justesse			
Différence des moyennes	0,4583		
Ecart - type des différences	0,7821		
Test d'égalité	0,5860	3,0	Acceptable

On constate que la valeur obtenue de test d'égalité est inférieure à 3,0, donc on peut conclure que les deux méthodes ont la même justesse avec un risque d'erreur égal à 1%.

✂ Calcul de la justesse par la technique des ajouts dosés

On reprend l'exemple du critère de sélectivité en ajoutant le terme récupération :

Taux ajouté (%)	Quantité ajoutée (%)	% TS présumé	N° d'Essai	% TS pratique	Moyenne (%)	% de récupération
50	0,74	2,22	1	2,13	2,20	97
			2	2,27		
60	0,89	2,37	1	2,44	2,40	103
			2	2,35		
70	1,04	2,52	1	2,42	2,44	92
			2	2,45		
80	1,18	2,66	1	2,67	2,67	100
			2	2,66		
90	1,33	2,81	1	2,94	2,93	108
			2	2,91		
100	1,48	2,96	1	3,07	3,08	108
			2	3,09		

Le taux de récupération ne dépasse pas $\pm 10\%$ (seuil fixé au préalable par le laboratoire).

4. Sensibilité:

La sensibilité à une concentration donnée correspond au rapport de la variable de la grandeur mesurée à la valeur correspondante de la concentration de l'élément à doser.

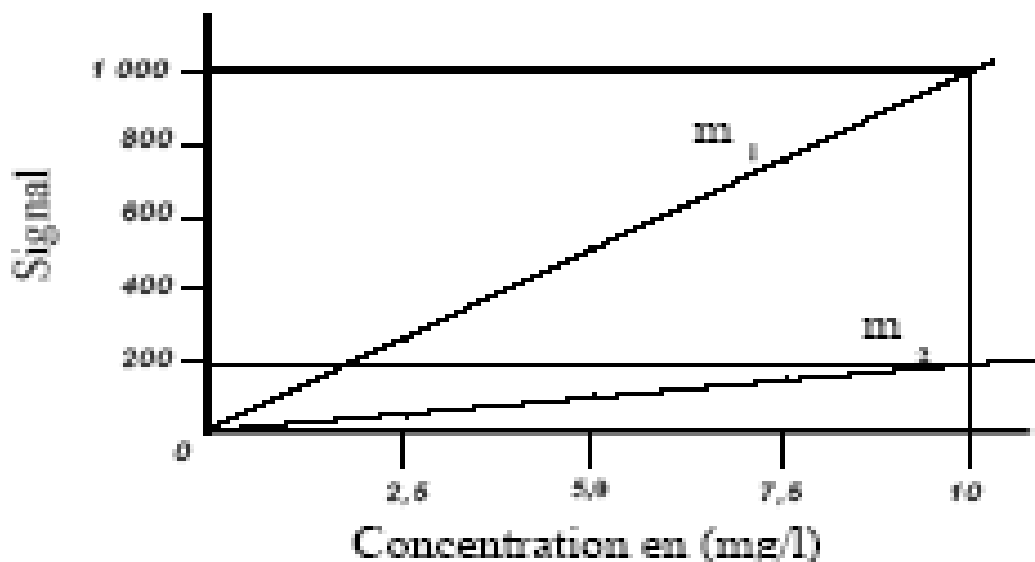
Une méthode est dite sensible si une faible variation de la concentration ou de la quantité d'analyte entraîne une variation importante de la réponse.

Lorsque l'on réfère à des paramètres qui ont une courbe d'étalonnage linéaire, on peut exprimer la sensibilité comme étant la pente moyenne d'un minimum de deux courbes; autrement, on l'exprime par le rapport entre le signal obtenu et la concentration d'un étalon à l'intérieur de la plage pratique de la courbe :

$$Pente = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$$

Exemple :

Sensibilité = Pente



Pour une concentration de 10 mg/l, le signal est de 1000 unités ($y_1=0$ et $x_1=0$):

$$m_1 = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} = \frac{(1000 - 0) \text{ unité de signal}}{(10 - 0) \text{ mg/l}} = 100 \text{ unités de signal/mg.l}^{-1}$$

Pour une concentration de 10 mg/l, le signal est de 200 unités ($y_1=0$ et $x_1=0$) :

$$m_2 = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} = \frac{(200 - 0) \text{ unité de signal}}{(10 - 0) \text{ mg/l}} = 20 \text{ unités de signal/mg.l}^{-1}$$

La pente m_1 représente une meilleure sensibilité; une augmentation de concentration se traduit par un gain du signal.

Note: La sensibilité nous informe sur l'état d'un système analytique et nous permet de voir le changement des conditions du système dans le temps.

5. Linéarité:

La linéarité et la sensibilité sont évaluées simultanément.

Le guide Eurachem préconise $k=6$ niveaux et $n=3$ répétitions, la norme XP T 90-210 propose $k=5$ niveaux et $n=5$ répétitions.

Le test statistique consiste à comparer les écarts entre les moyennes des points expérimentaux et la droite estimée, à l'erreur résiduelle par une analyse de variance.

Les tests de linéarité sont effectués afin :

- ✎ De vérifier la linéarité entre la valeur d'information et la concentration.
- ✎ De vérifier la régression et l'erreur du modèle ainsi que la linéarité dans tout le domaine choisi.
- ✎ Le domaine d'étalonnage est jugé acceptable s'il n'existe pas une erreur de modèle significative (pas de courbure).

a) Organisation des tests : vérification de la linéarité

Pour réaliser les tests, choisir p niveaux de concentration situés dans le domaine de linéarité supposé.

Pour chaque niveau de concentration, préparer n solutions étalons à partir d'un étalon de pureté définie et mesurer la valeur d'information.

Choisir p et n de façon que $(p \times n) \geq 25$

Pour respecter l'indépendance des mesures, chaque répétition doit être faite sur une solution étalon préparée indépendamment.

b) Test d'adéquation au modèle linéaire :

Afin d'éviter toute la partie relative aux calculs des tests, tous les calculs seront conduits par des tableurs Excel et nous donnons ainsi les formules de calcul à appliquer.

A partir des résultats expérimentaux obtenus, construire le tableau suivant :

Source de variation	Somme des carrés des écarts	Degré de liberté	Variance	F calculé	Valeur critique au risque $\alpha = 1\%$
Régression	$SCEl(y)^{(1)}$	(1)	1	$Fl = (1) \times (6) / (3)$	$VC_l = F(1, p(n-1), 1-\alpha)$
Erreur de modèle	$SCEnl(y)^{(2)}$	$p-2^{(5)}$	$(2)/(5)$	$Fnl = (2) \times (6) / (5) \times (3)$	$VC_{ml} = F(p-2, p(n-1), 1-\alpha)$
Erreur expérimentale	$SCEe(y)^{(3)}$	$p(n-1)^{(6)}$	$(3)/(6)$		
Totale	$SCE(y)^{(4)}$	$np-1^{(7)}$			

La valeur critique $VC(v_1, v_2, 1-\alpha)$ correspondant à une variable de Fischer au risque α pour v_1 et v_2 degrés de liberté (voir tableau en annexe). Ce test est effectué avec un risque d'erreur α égal à 1%.

Avec :

(1) : INDEX(DRITEREG(VALEURS D'INFORMATION ;VALEURS DES NIVEAUX ;VRAI ;VRAI) ;5 ;1)

(2) : (4)-(1)-(3)

(3) : SOMME.CARRES.ECARTS(VALEURS D'INFORMATION NIVEAU1)+ SOMME.CARRES.ECARTS (VALEURS D'INFORMATION NIVEAU2)+...

(4) : SOMME.CARRES.ECARTS(VALEURS D'INFORMATION)

c) Calculs et interprétations:

Mener l'interprétation en deux étapes :

① Vérifier si le modèle de régression est acceptable :

Si $F_I > V_I$, le modèle de régression peut être considéré comme acceptable.

Si $F_{nl} \leq V_{nl}$, l'étalonnage n'est pas de type linéaire.

② Vérifier si le domaine d'étalonnage choisi est acceptable :

Si $F_I \leq V_I$, le domaine d'étalonnage peut alors être validé. L'erreur de modèle est négligeable.

Si $F_{nl} > V_{nl}$, il existe une erreur de modèle significative (statistiquement) pour le domaine d'étalonnage choisi. Cette erreur de modèle traduit sûrement une courbure.

d) Exemple:

On effectue des essais de linéarité de la méthode de dosage du pentoxyde de phosphore (P_2O_5) dans l'eau résiduaire.

Niveau 1	Valeurs expérimentales	SCE(x)	Niveau 2	Valeurs expérimentales	SCE(x)
0,00	-0,01	0,0067429	0,50	0,50	0,0009714
0,00	0,08		0,50	0,51	
0,00	0,09		0,50	0,53	
0,00	0,05		0,50	0,53	
0,00	0,05		0,50	0,52	
0,00	0,06		0,50	0,52	
0,00	0,08		0,50	0,50	
Niveau 3	Valeurs expérimentales	SCE(x)	Niveau 4	Valeurs expérimentales	SCE(x)
2,00	2,01	0,0004857	4,00	3,94	0,0008857
2,00	1,99		4,00	3,94	
2,00	1,99		4,00	3,96	
2,00	1,99		4,00	3,95	
2,00	1,98		4,00	3,93	
2,00	1,99		4,00	3,96	
2,00	1,99		4,00	3,96	

Test de linéarité						
Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Variance estimée	F	Valeur critique à 1%	
Régression	64,55020832	1	64,55021	170510	7,82	ACCEPTABLE $F > \text{Valeur}$
Erreur de modèle	0,003116682	2	0,001558	4,116373	5,61	ACCEPTABLE $F < \text{Valeur}$
Erreur expérimentale	0,009085714	24	0,000379			
Total	64,56241071	27				

Conclusion :

- Le rapport F_l (régression) est supérieur à la valeur critique correspondant à une variable de Fisher au risque 1% pour 1 et 24 degrés de liberté : la régression est acceptable
- Le rapport F_{nl} est inférieur ou égal à la valeur critique correspondant à une variable de Fisher au risque de 1% pour 1 et 24 degrés de liberté : il n'y a pas une erreur du modèle et c'est bien une droite dans tout le domaine choisi.

6. Limites de détection et de quantification:

La détermination de la limite de détection (LD) et de la limite de quantification (LQ) s'effectue selon l'une des deux approches suivantes :

a) Méthode issue de l'étude du blanc de matrice:

Préparer un volume suffisant d'une solution assimilée à un blanc. Fractionner ce volume en 10 prises d'essai identiques. Réaliser une analyse complète sur chacune des prises d'essai dans des conditions de répétabilité.

Si le blanc pour des raisons liées à un prétraitement non maîtrisé du signal est parfois non mesurable ou n'offre pas de variation enregistrable (écart-type de 0), alors la démarche doit être effectuée sur une très faible grandeur proche du blanc.

A partir des résultats obtenus calculer, la moyenne arithmétique de la série de mesure et l'écart type σ . La LD est donnée par : $LD = 3 \times \sigma$

La limite de quantification est la concentration équivalente à 10 fois l'écart type obtenu lors de l'établissement de la LD. $LQ = 10 \times \sigma$

Calcul du ratio de conformité (R)

Le calcul du ratio de conformité nous permet de déterminer la validité d'une démarche pour l'établissement d'une limite de détection. En général, si le résultat du calcul pour un ratio R qui sert à l'établissement d'une limite de détection n'est pas supérieur à 4, il faut recommencer la procédure d'établissement de la limite de détection avec un échantillon qui a une concentration plus haute.

$$R = \frac{\bar{x}}{LD} = \frac{\bar{x}}{3 \times \sigma}$$

Où $\bar{x}$: moyenne arithmétique de série de mesures des blancs;

R : ratio de conformité;

σ : écart type de la série de mesures;

✎ Si $4 < R < 10$, la concentration utilisée est adéquate.

✎ Si $R < 4$, ce ratio indique que la limite réelle de détection de la méthode est plus élevée que la limite de détection estimée lors des essais. Reprendre les essais en révisant la limite de détection estimée et la concentration de l'échantillon utilisé.

✎ Si $R > 10$, ce ratio indique que la limite réelle de détection de la méthode est plus basse que la limite de détection estimée lors des essais.

b) Méthode issue de l'étude de la linéarité:

Utiliser les résultats obtenus lors de l'étude de la linéarité qui ont permis de calculer les paramètres de la fonction d'étalonnage b_0 , b_1 et $\sigma(b_0)$.

Calculer la limite de détection LD en grandeur selon l'équation : $LD = \frac{3 \times \sigma(b_0)}{b_1}$

Calculer la limite de quantification LQ en grandeur selon l'équation : $LQ = \frac{10 \times \sigma(b_0)}{b_1}$

Avec b_1 : pente de la droite d'étalonnage

$\sigma(b_0)$: écart type sur l'ordonnée à l'origine

Vérification de la limite de quantification calculée

L'objectif est de vérifier que la limite de quantification déterminée est acceptable.

Préparer un volume suffisant d'eau désionisée. Doper cette solution avec une quantité d'analyte correspondant à la limite de quantification choisie.

Fractionner ce volume en 10 prises d'essai identiques. Réaliser une analyse complète sur chacune des prises d'essai dans des conditions de répétabilité. Calculer la moyenne arithmétique $\bar{x}$ et l'écart type σ de la série de mesure.

Les deux conditions doivent être respectées :

a) S'assurer que $\bar{x}n$ n'est pas différente de LQ :

Si $\left| \frac{LQ - \bar{x}}{\sigma / \sqrt{n}} \right| < 10$, alors la limite de quantification LQ est jugée exacte.

b) S'assurer que la valeur 0 n'est pas acceptable comme limite de quantification :

Si $5\sigma < LQ$, alors la valeur 0 n'est pas acceptable comme limite de quantification

Cela revient à vérifier que le coefficient de variation par rapport à LQ est inférieur à 20%.

c) Exemple:

On détermine les limites de détection et de quantification de la méthode titrimétrique à l'EDTA pour la détermination de la somme des concentrations en calcium et magnésium (la **dureté totale** ou titre hydrotimétrique **TH en degré Français**) dans les eaux.

Méthode issue de l'étude du blanc de matrice:

Les limites de détection et de quantification ont été déterminées sur une série de 10 mesures effectuées dans des conditions de répétabilité sur un échantillon blanc d'eau déminéralisée:

Essai N°	Valeur du blanc (°F)
1	0,09
2	0,10
3	0,09
4	0,10
5	0,10
6	0,11
7	0,10
8	0,09
9	0,09
10	0,11
Moyenne (°F)	0,10
Ecart-type (°F)	0,008
Limite de détection (°F)	0,02
Limite de quantification (°F)	0,08

Le ratio de conformité $R = 4,14$, donc la concentration utilisée est adéquate.

Méthode issue de l'étude de la linéarité:

On reprend les résultats des essais de linéarité de la méthode de dosage du pentoxyde de phosphore (P_2O_5) dans l'eau résiduaire.

Droite : $y = b_1x + b_0$		Pente (b_1)	Ordonnée à l'origine (b_0)
Coefficients de la droite		0,955465438	0,095225806
Ecart type sur les coefficients		0,004088843	0,009199897
Limite inf à	99%	0,94410371	0,069661918
Limite sup à	99%	0,966827166	0,120789695

Ecart- type des résidus	0,035648324
Limite de détection	0,128550436 = 0,13
Limite de quantification	0,195951389 = 0,20

ANNEXE

Définitions :

Limite de détection : Plus petite quantité d'un analyte à examiner dans un échantillon, pouvant être détectée et considérée comme différente de la valeur du blanc (avec une probabilité donnée) mais non nécessairement quantifiée (AFNOR XP T90-210 Décembre 1999).

Limite de quantification : Plus petite grandeur d'un analyte à examiner dans un échantillon pouvant être déterminée quantitativement dans des conditions expérimentales décrites dans la méthode avec une variabilité définie (AFNOR XP T90-210 Décembre 1999).

Blanc : Essai utilisé en l'absence de matrice (blanc réactif) ou sur une matrice qui ne contient pas l'analyte (Blanc matrice) (AFNOR XP T90-210 Décembre 1999).

Linéarité : Capacité d'une méthode d'analyse, à l'intérieur d'un certain intervalle, à fournir une valeur d'information ou des résultats proportionnels à la quantité en analyte à doser dans l'échantillon pour le laboratoire (AFNOR XP T90-210 Décembre 1999).

Limites de linéarité : Les limites de linéarité sont les limites expérimentales de grandeurs entre lesquelles un modèle d'étalonnage linéaire peut être appliqué avec un niveau de confiance connu (AFNOR XP T90-210 Décembre 1999). L'intervalle entre les limites de linéarité est le domaine de linéarité.

Fidélité : Etroitesse d'accord entre des résultats d'essai indépendants obtenus sous des conditions stipulées (ISO 5725-1:1994).

Répétabilité : Fidélité sous des conditions de répétabilité (ISO 5725-1:1994).

Conditions de répétabilité : Conditions où les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps (ISO 5725-1:1994).

Reproductibilité : Fidélité sous des conditions de reproductibilité (ISO 5725-1:1994).

Conditions de reproductibilité : Conditions où les résultats d'essais sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essais identiques dans des différents laboratoires, avec différents opérateurs utilisant des équipements différents (ISO 5725-1:1994). Dans le cas d'une reproductibilité limitée au laboratoire, on parle de reproductibilité interne ou intralaboratoire.

Justesse : Etroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essais et une valeur de référence acceptée (ISO 5725-1:1994).

Spécificité : Capacité d'une méthode d'analyse de convenir exclusivement à la détermination de la grandeur de l'analyte considéré, avec la garantie que le signal mesuré provient seulement de l'analyte (AFNOR XP T90-210 Décembre 1999).

Vérification d'une méthode normalisée : Vérification par le laboratoire de sa capacité à mettre en œuvre une méthode normalisée.