

Validation d'une méthode de chimie analytique

Application au dosage des anions fluorure, chlorure, nitrite, bromure, nitrate, phosphate et sulfate par chromatographie ionique

Monique Mayor, Guilhem Bourrié¹

La validation d'une méthode de chimie analytique passe par l'estimation de l'erreur de justesse, ou biais systématique, et de l'erreur aléatoire, qu'il faut combiner pour vérifier si la méthode remplit les objectifs qui lui ont été assignés. La construction d'un modèle statistique permet d'évaluer quantitativement ces notions, qui peuvent être visualisées graphiquement, suivant la méthode du profil d'exactitude (Feinberg, 2010a, b et c), et de se donner les moyens de contrôler le maintien dans le temps des performances de la chaîne de mesure, par la construction des cartes de contrôle.

Résumé : *La validation d'une méthode d'analyse passe par différentes étapes qui visent : (i) à tester la normalité de la distribution des mesures ; (ii) à estimer les composantes de l'incertitude de mesure, fidélité, justesse, spécificité ; (iii) à définir des tests de contrôle de la non dégradation des performances de la méthode. Après un rappel des définitions et des concepts métrologiques, cet article présente les différentes étapes qui permettent de valider une méthode d'analyse. La méthode consiste en la construction d'un modèle statistique, d'un plan d'expérience et l'utilisation d'un matériau de référence certifié (MRC), utilisé (i) pour évaluer le biais (ou « erreur systématique »), (ii) pour calculer « l'incertitude composée », somme de l'incertitude sur la moyenne (« erreur aléatoire ») et de l'incertitude sur la valeur exacte du MRC et (iii) pour construire les cartes de contrôle. Cette méthode est appliquée au dosage des anions contenus en solution aqueuse par chromatographie ionique, et le modèle choisi est linéaire. Les résultats montrent : (i) que les distributions ne sont pas significativement différentes de la loi normale ; (ii) qu'il existe généralement un biais significativement différent de zéro et qu'il faut corriger ; (iii) qu'il n'existe aucune liaison entre le biais et la concentration de l'analyte ; (iv) que l'intervalle de confiance peut être calculé par application de la loi de Student avec l'incertitude composée. La représentation graphique suivant la méthode du « profil d'exactitude » aide à visualiser les performances de la méthode pour chacun des analytes. La méthode des ajouts dosés permet de vérifier la spécificité de la méthode et d'établir le pourcentage de recouvrement. Les droites de régression obtenues permettent de corriger les concentrations brutes de l'erreur systématique. Les cartes de contrôle permettent de déceler la dégradation des performances dans le temps et la stabilité des étalonnages.*

Mots clés : Anions, bromure, chimie analytique, chimiométrie, chromatographie ionique, chlorure, étalonnage, fluorure, incertitude, nitrate, nitrite, phosphate, statistiques, sulfate, validation.

¹ UR1119, Géochimie des sols et des eaux - INRA – F-13545 Aix-en-Provence

☎ 04 42 90 85 42

✉ monique.mayor@aix.inra.fr

Introduction

Toute analyse chimique nécessite des procédures de mise au point de méthodes de dosage, d'étalonnage et de validation des résultats. La démarche Qualité a pour objectif d'assurer la fiabilité et la traçabilité des résultats. Nous présentons ici le protocole expérimental et les méthodes statistiques utilisées pour valider une méthode d'analyse. La démarche est appliquée ici au dosage d'anions en solution par chromatographie ionique et peut être étendue sans difficultés à d'autres méthodes. Plus précisément, l'objectif de cet article est d'évaluer statistiquement la validité de cette méthode de dosage dans le domaine de concentration de 10^{-5} à 10^{-3} M, et de décrire les procédures d'étalonnage multiparamétrique, de correction de biais, de calcul d'incertitude par l'utilisation d'étalons certifiés et la méthode d'ajouts dosés.

1. Principe de la méthode et description de la technique

Le choix d'une méthode analytique doit être fait en fonction du problème posé. Au centre Inra d'Avignon, les travaux de l'unité « Géochimie des sols et des eaux » nécessitent l'analyse des eaux dans les sols hydromorphes et les sols salés. Dans ces milieux, la salinité totale varie très largement. La chromatographie ionique a l'avantage d'être multiparamétrique, de nécessiter peu d'échantillon, environ 2 ml, et d'être rapide. Le détecteur utilisé ici est conductimétrique et peu coûteux.

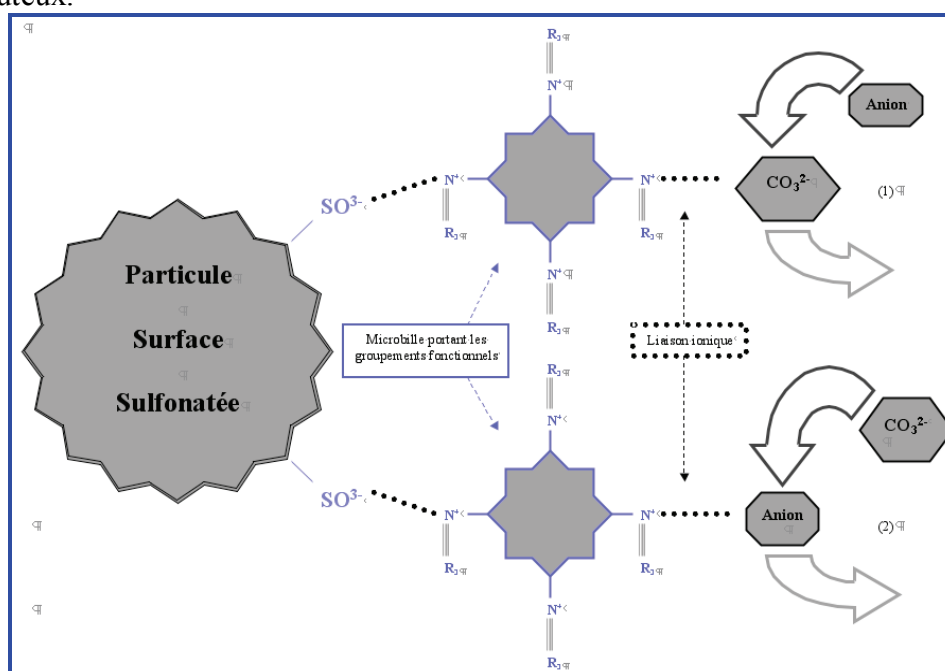


Figure 1 : l'échange ionique : (1) l'anion déplace l'éluant ; (2) l'éluant déplace l'anion

1.1 Principe de la chromatographie ionique

La chromatographie est une technique de séparation d'espèces dans un mélange par partage entre une phase mobile (gaz ou liquide) et une phase stationnaire (liquide ou solide). Chaque soluté injecté dans la colonne est soumis à deux effets antagonistes : l'entraînement par la phase mobile dans laquelle il est soluble et la rétention par la phase stationnaire avec laquelle il interagit. La séparation est possible grâce aux différences d'affinités de ces composés pour

les phases mobile et stationnaire. La phase stationnaire, la colonne, est un échangeur d'ions constitué de particules de résine (**figure 1**).

L'appareil utilisé est un chromatographe ionique Dionex hautes performances monocanal modèle DX 100 muni d'un passeur diluteur Dionex modèle AS50, le tout piloté par le logiciel de gestion « *Chroméléon™ CM-CHM-1-IC version 6.5* ».

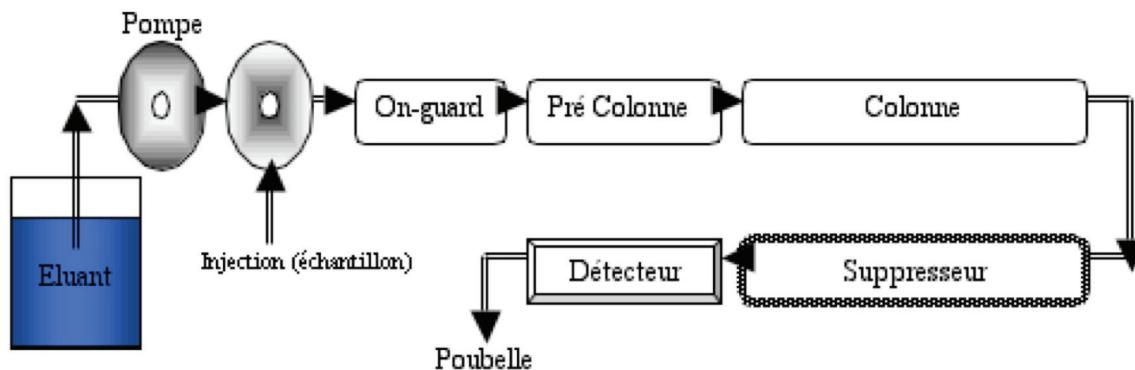


Figure 2 : schéma de principe d'un équipement de chromatographie ionique

1.2 Mise au point de la méthode

Il est nécessaire avant de valider une méthode d'optimiser les conditions d'analyse, en faisant varier le débit, la température, en modifiant la nature ainsi que la concentration de l'éluant, en optimisant le choix de la colonne. On peut ainsi minimiser le temps de l'analyse, fixé par le temps du dernier composé élué, tout en préservant une bonne résolution pour que la méthode reste spécifique, c'est-à-dire qu'elle produise une réponse uniquement pour l'analyte d'intérêt.

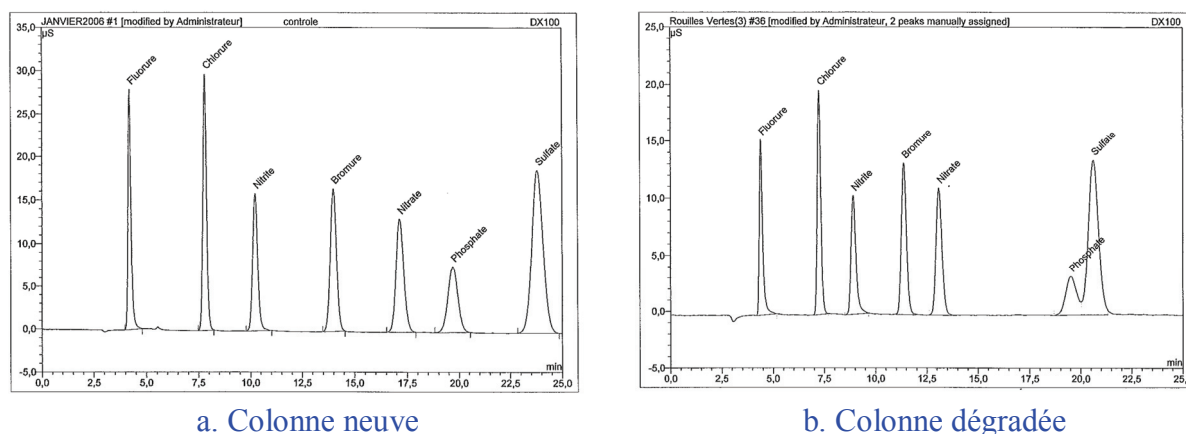


Figure 3 : dégradation des performances d'une colonne de chromatographie ionique.

La résolution de la méthode est le pouvoir de séparation des composés, elle est quantifiable par exemple par le rapport $R = d/m$, où d est la distance séparant les sommets des 2 pics, et m la moyenne des largeurs à la base des pics. Si on considère des pics rapprochés, par exemple les pics du phosphate et du sulfate, il apparaît qu'une résolution $R = 1,12$ n'est pas suffisante, mais qu'avec une résolution supérieure à 2, les pics sont bien résolus. **La figure 3** montre la différence entre une bonne résolution et une résolution incorrecte due à la dégradation des performances de la colonne avec le temps.

2. Théorie, modèle statistique et méthodes de traitement des données

2.1 Modèle statistique

La construction d'un modèle statistique permet d'évaluer quantitativement les grandeurs métrologiques définies ci-dessus à partir de séries de résultats expérimentaux. Le modèle choisi ici est additif : Résultat = valeur vraie + erreur systématique + erreur aléatoire.

La démarche choisie consiste d'abord à tester la normalité de la distribution des résultats, puis à évaluer l'erreur systématique, l'erreur aléatoire, l'incertitude composée, la spécificité de la méthode, les limites de détection et de quantification, l'intervalle de confiance du résultat de mesure, enfin à construire la procédure de carte de contrôle.

2.2 Méthodes

2.2.a Normalité

La normalité est testée en construisant la droite de Henry : si les points sont alignés sur la droite, on ne peut pas infirmer l'hypothèse de normalité de la distribution.

2.2.b Évaluation du domaine d'analyse

La détermination du domaine d'analyse permet de vérifier si la technique est adaptée aux valeurs ou aux concentrations recherchées. La courbe d'étalonnage peut être linéaire mais cela ne fait pas partie des exigences. L'exigence de linéarité s'applique à la relation entre la concentration calculée et la concentration introduite et non pas à la fonction de réponse qui est la relation entre le signal et la concentration introduite. Il est en revanche nécessaire que la fonction de réponse soit strictement croissante ou décroissante. Le calcul de la courbe d'étalonnage par la méthode des moindres carrés suppose la constance de la variance de la réponse à toutes les concentrations.

2.2.c Calcul des limites de détection et de quantification

À partir d'une mesure faite sur un blanc analytique, on calcule l'écart type du signal. La limite de détection LOD correspond à la concentration qui conduit à un signal dont l'intensité est égale à 3 fois celle de l'écart type du blanc $y_d = y_b + 3 s_b$. La limite de quantification LOQ est calculée en prenant comme valeur du signal 10 fois la valeur de l'écart type du blanc $y_q = y_b + 10 s_b$. (ACS, 1980).

2.2.d Calcul des incertitudes

L'incertitude de la mesure, qui caractérise la dispersion, est exprimée sous la forme d'un écart-type s qui est la racine carrée de la somme de l'ensemble des variances associées aux sources d'erreur :

- *le biais du résultat ou erreur systématique* est la différence entre l'espérance des résultats d'essais et la valeur de référence acceptée, et dépend de la méthode, de l'opérateur et de l'instrument. L'estimation de l'erreur systématique, c'est-à-dire l'incertitude systématique, est évaluée en utilisant un étalon certifié. On obtient alors un facteur de correction, qu'on applique au résultat de mesure. Mais comme l'étalon certifié (MRC) n'est connu qu'avec

une certaine incertitude, soit u_{mrc} , celle-ci doit être comptée dans l'incertitude de mesure. Cette incertitude est donnée par l'organisme certificateur, sous la forme de l'incertitude élargie, U_{mrc} , telle que : $U_{mrc} = k_{mrc}u_{mrc}$. Sauf indication contraire, dûment documentée, $k_{mrc} = 2$ pour un niveau de confiance de 95 % (Taylor et Kuyatt, 1994) ;

- *la fidélité ou erreur aléatoire*, est définie comme la dispersion de la moyenne. Son estimation, ou incertitude aléatoire est :

$$u_a = s/\sqrt{n}, \quad (1)$$

Où n est le nombre de mesures. Le matériau de référence certifié doit avoir une matrice identique à celle des échantillons. Ceci implique l'égalité des variances et peut également être testé par la méthode des ajouts dosés. Dans ces conditions, s est mesuré sur le MRC. On obtient donc l'incertitude composée :

$$u_c = \sqrt{u_{mrc}^2 + u_a^2}, \text{ ou encore } u_c = \sqrt{\left(\frac{U_{mrc}}{k_{mrc}}\right)^2 + \left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)^2}. \quad (2)$$

2.2.e Calcul de l'intervalle de confiance du résultat

L'intervalle de confiance au seuil α (niveau de confiance $1-\alpha$) délimite la zone dans laquelle se trouve probablement la moyenne de la population d'où est extrait l'échantillon. On fixe le risque acceptable pour cette affirmation. L'intervalle de confiance à 95 % signifie que l'on accepte un risque de 5 % de se tromper en affirmant que la moyenne de la population est comprise entre [moyenne - IC et moyenne + IC].

Si x est la grandeur recherchée (exemple la concentration) et y la grandeur mesurée (exemple la hauteur du pic) et si l'étalonnage linéaire est donné par la droite de régression de x par rapport à y , alors $x = C_1 y + C_2$, et l'intervalle de confiance de la moyenne de n mesures est :

$$\bar{x} \pm k(\alpha, \nu)u_c, \quad (3)$$

Où \bar{x} est la moyenne corrigée de toutes les erreurs systématiques identifiées, k suit une **loi de Student** à ν degrés de liberté, $\nu = n - 1$, α est le niveau de confiance, généralement $\alpha = 0,05$ pour $P = 0,95$, n est la taille de l'échantillon, et u_c est l'incertitude composée définie ci-dessus. Le produit $U_c = k u_c$ est l'incertitude élargie.

2.2.f Spécificité

La spécificité est la capacité à établir l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composants présents. Il s'agit de démontrer que la substance analysée au sein de la matrice est bien l'analyte recherché. La spécificité se fonde sur une absence d'interférences. Elle sera estimée par la méthode des ajouts dosés en calculant le pourcentage de recouvrement.

3. Protocole expérimental

Le protocole expérimental est présenté dans le **tableau 1**, et l'ensemble des étapes dans le **tableau 2**.

Tableau 1 : *protocole expérimental*

Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5
Mettre les sels à déshydrater dans l'étuve à 105 °C pendant 24 h en vue de la préparation de la solution multiéléments	Préparation des solutions multiéléments à 0, 1 ; 0,25 ; 0,5 et 1 mmol/l en Fluorure, Chlorure, Nitrite, Bromure, Nitrate, Phosphate, Sulfate	Plan d'étalonnage Fidélité 3 répétitions des solutions multiéléments, niveaux 1, 2, 3, 4	Plan d'étalonnage Fidélité 3 répétitions des solutions multiéléments, niveaux 1, 2, 3, 4	Plan d'étalonnage Fidélité 3 répétitions des solutions multiéléments, niveaux 1, 2, 3, 4
	Dilution de la solution certifiée multiélément à 1 mmol/l au 1/10 ; 1/4 ; 1/2 en Fluorure, Chlorure, Nitrite, Bromure, Nitrate, Phosphate, Sulfate	Plan de validation Justesse 5 répétitions des solutions certifiées, niveaux 1, 2, 3, 4	Plan de validation Justesse 5 répétitions des solutions certifiées, niveaux 1, 2, 3, 4	Plan de validation Justesse 5 répétitions des solutions certifiées, niveaux 1, 2, 3, 4
	Normalité de la distribution : 30 répétitions de la solution certifiée à 0,5 mmol/L	Spécificité Doser la matrice seule et la matrice + 3 concentrations d'ajouts dosés		

- Pour vérifier **la normalité** de la distribution, nous mesurons 30 fois le matériau de référence certifié sous des conditions de répétabilité.

- Pour apprécier **la fidélité**, nous utilisons le plan d'étalonnage en faisant 9 répétitions des solutions multiéléments préparées sans la matrice, à 4 niveaux de concentrations, (0,1 mmol/l; 0,25 mmol/l ; 0,5 mmol/l et 1 mmol/l) ; les dosages sont réalisés sur 3 jours avec le même opérateur. L'équation de la droite d'étalonnage journalière est utilisée pour calculer les concentrations qui serviront pour le calcul de justesse. Le coefficient de variation *CV* des aires est calculé pour les 7 analytes, ceci pour les différents niveaux de concentration.

- Pour apprécier **la justesse**, nous mesurons 15 répétitions du matériau de référence certifié multiélément (MRC) de valeurs connues, réalisées sur 3 jours ceci aux 4 niveaux de concentrations ci-dessus (**tableau 1**), ce qui permet d'apprécier la correction à apporter au résultat obtenu, ainsi que d'effectuer les calculs d'incertitudes.

- Pour apprécier **la spécificité** et les effets de matrice, nous dosons un échantillon de solution du sol représentatif du contexte géochimique étudié, d'abord seul, puis après addition de l'analyte à trois concentrations différentes.

Tableau 2 : résumé des différentes étapes de la validation

Principales étapes	Protocole	Tests et calculs
Vérification de la normalité de la distribution	30 répétitions du matériau de référence certifié : MRC multiélément à une concentration de 0,5 mmol/l en Fluorure, Chlorure, Nitrite, Bromure, Nitrate, Phosphate, Sulfate sous des conditions de répétabilité.	Vérification visuelle et droite de Henry
Plan d'étalonnage : Fidélité	9 répétitions des Solutions multiéléments préparées sans la matrice, à 4 niveaux de concentrations, dosages réalisés 3 jours différents avec le même opérateur.	Calcul de la moyenne, variance, écart-type des 9 mesures et du coefficient de variation $CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$.
Plan de validation : Justesse Spécificité Vérification de l'absence d'un effet de matrice	15 répétitions du matériau de référence certifié multiélément de valeurs connues réalisés sur 3 jours différentes, ceci à 4 niveaux de concentrations, ce qui permet d'apprécier la correction à apporter au résultat obtenu ainsi que les calculs des incertitudes. Par la méthode des ajouts dosés, en dosant un échantillon de solution du sol sans ajout et avec 3 ajouts successifs.	Biais ou erreur systématique : Différence entre résultat obtenu et valeur fournie par le laboratoire certifié. Erreur aléatoire : $u_a = s / \sqrt{n}$ tenir compte de l'incertitude de l'étalon $U_{crm} = k_{crm} u_{crm}$ Incertitude de la mesure : $u_c = \sqrt{u_{crm}^2 + u_a^2}$ Intervalle de confiance du résultat (t de Student) $\bar{x} \pm t(\alpha, \nu) u_c$ Calculer le taux de recouvrement , à partir des pentes des droites de régression et démontrer la linéarité entre les concentrations calculées et les concentrations introduites.
Évaluation du domaine d'analyse, Limite de Détection et de Quantification	A l'aide de mesures faites sur un blanc analytique, on déduit la valeur du bruit de fond y_b qui est la réponse au blanc « terrain » Et on calcule l'écart-type de la réponse au blanc « terrain » s_b	$LOD : y_d = y_b + 3 s_b$, $LOQ : y_d = y_b + 10 s_b$, Déduire les concentrations de LOD et LOQ à partir de la valeur de leur signal grâce à l'équation : $x = C_1 y + C_2$ de la droite d'étalonnage de chaque élément. Courbe d'étalonnage : s'assurer que la fonction de réponse est strictement croissante ou décroissante.

Pour valider une méthode, il faut :

- que les CV dans des conditions de fidélité intermédiaire soient inférieurs à une valeur de tolérance, par exemple 10 % ;
- que la régression permettant de relier les concentrations calculées aux concentrations introduites soit parfaitement linéaire dans la gamme de concentrations étudiées ;
- que la différence entre le résultat obtenu et la valeur vraie inconnue de l'échantillon soit petite ou du moins inférieure à une limite d'acceptation : pour cela, les estimateurs de biais et de variance obtenus grâce à des expériences effectuées sur des échantillons connus nous renseignent si la procédure va pouvoir quantifier avec une exactitude suffisante.

4. Résultats et discussion

Les résultats (histogramme et droite de Henry) montrent que l'hypothèse de **normalité** de la distribution ne peut pas être rejetée.

4.1 La fidélité

Les résultats complets pour la **fidélité** sont reportés dans le **tableau 3**. Toutes les valeurs des coefficients de variation sont inférieures à 4 %. La valeur admise dans notre protocole est de 10 %.

Tableau 3 : résultats du test de fidélité, aux quatre niveaux de concentration des solutions multiéléments.
Valeurs en aires de pics ($\mu S \text{ min}$)

	F ⁻	Cl ⁻	NO ₂ ⁻	Br ⁻	NO ₃ ⁻	P-PO ₄ ³⁻	SO ₄ ²⁻
Solution multiélément 0,10 mmol/l							
Moyenne	0,547	0,688	0,526	0,655	0,658	0,502	1,324
Écart type	0,015	0,017	0,018	0,013	0,021	0,019	0,034
Variance	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001
CV	2,74 %	2,44 %	3,40 %	1,98 %	3,25 %	3,79 %	2,59 %
Solution multiélément 0,25 mmol/l							
Moyenne	1,439	1,883	1,416	1,730	1,661	1,324	3,463
Écart type	0,032	0,038	0,027	0,032	0,028	0,026	0,066
Variance	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,004
CV	2,24%	2,02%	1,88%	1,83%	1,66%	1,99%	1,90%
Solution multiélément 0,5 mmol/l							
Moyenne	2,974	3,750	2,900	3,514	3,409	2,747	7,104
Écart type	0,094	0,122	0,089	0,104	0,103	0,065	0,210
Variance	0,009	0,015	0,008	0,011	0,011	0,004	0,044
CV	3,17%	3,25%	3,09%	2,97%	3,03%	2,38%	2,95%
Solution multiélément 1 mmol/l							
Moyenne	6,167	8,184	6,168	7,682	7,369	5,815	15,358
Écart type	0,155	0,165	0,105	0,147	0,140	0,126	0,338
Variance	0,024	0,027	0,011	0,022	0,020	0,016	0,114
CV	2,51%	2,02%	1,70%	1,91%	1,90%	2,17%	2,20%

4.2 La justesse

Les résultats du test de justesse montrent (non présentés ici, données disponibles sur demande) que **le biais** (estimation de l'erreur systématique) est significativement différent de zéro, en général positif, ce qui correspond à une surestimation ; il est négatif pour le chlorure et pour le fluorure et pour ce dernier, le biais maximum est observé à la concentration 0,1 et atteint - 6,2 %, ce qui est considérable. On n'observe pas de variation ordonnée du biais avec la concentration. Il faut donc corriger les valeurs mesurées de ce biais estimé.

Une fois corrigées de ce biais, les valeurs sont accompagnées d'une **incertitude composée** obtenue selon l'équation ci-dessus (éq. 2), qui permet de calculer l'intervalle de confiance du résultat. Ici, le nombre de mesures effectuées pour estimer la moyenne de la concentration d'un échantillon inconnu est de 5. L'intervalle de confiance est donc obtenu par application de l'équation (3) avec $n = 5$, $k(0,95; 4) = 2,78$ et u_c l'incertitude composée. Les résultats obtenus montrent que les moyennes journalières sont comprises dans les intervalles de confiance de la moyenne ainsi calculés. Elles peuvent donc être considérées comme des estimations indépendantes de la même grandeur. Ceci veut dire que les performances instrumentales et que l'étalonnage sont restés stables pendant les 3 jours consécutifs des mesures. On peut en déduire également le nombre de mesures nécessaires pour obtenir un intervalle de confiance sur la moyenne donnée, puisqu'on est dans les conditions de validité de la loi normale.

4.3 Les profils d'exactitude

Une autre représentation possible est celle du « **profil d'exactitude** » (Feinberg, 2000a et b, 2006, 2010a, b, c.). On se fixe une limite d'acceptabilité (ici 10 %) et une probabilité de tolérance (95 %). Par exemple pour le sulfate (**tableau 4, figure 4**) au niveau 3, concentration moyenne du MRC, le biais a une valeur de 3,9 % avant correction et le taux de recouvrement est de 103,9 %.

Tableau 4 : profil d'exactitude du sulfate

	Avant correction du biais				Après correction du biais			
	95 %				95 %			
Limite d'acceptabilité	10 %				10 %			
Niveaux	1	2	3	4	1	2	3	4
Valeur cible	0,100	0,250	0,500	1,000	0,100	0,250	0,500	1,000
Moyenne niveau	0,101	0,259	0,519	1,020	0,097	0,249	0,500	0,981
Écart-type de fidélité (s_{FI})	0,002	0,006	0,003	0,021	0,002	0,006	0,004	0,021
Valeur basse tolérance	0,097	0,246	0,512	0,974	0,093	0,236	0,492	0,935
Valeur haute tolérance	0,105	0,271	0,527	1,066	0,101	0,261	0,509	1,027
Biais (%)	1,07	3,49	3,89	2,00	-2,90	-0,51	0,05	-1,90
Recouvrement (justesse) (%)	101,07	103,49	103,9	102,00	97,10	99,49	100,05	98,10
Limite basse tolérance (%)	97,18	98,57	102,38	97,42	93,27	94,57	98,37	93,52
Limite haute tolérance (%)	104,95	108,42	105,40	106,58	100,93	104,42	101,74	102,68
Limite d'acceptabilité basse	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00
Limite d'acceptabilité haute	110,00	110,00	110,00	110,00	110,00	110,00	110,00	110,00

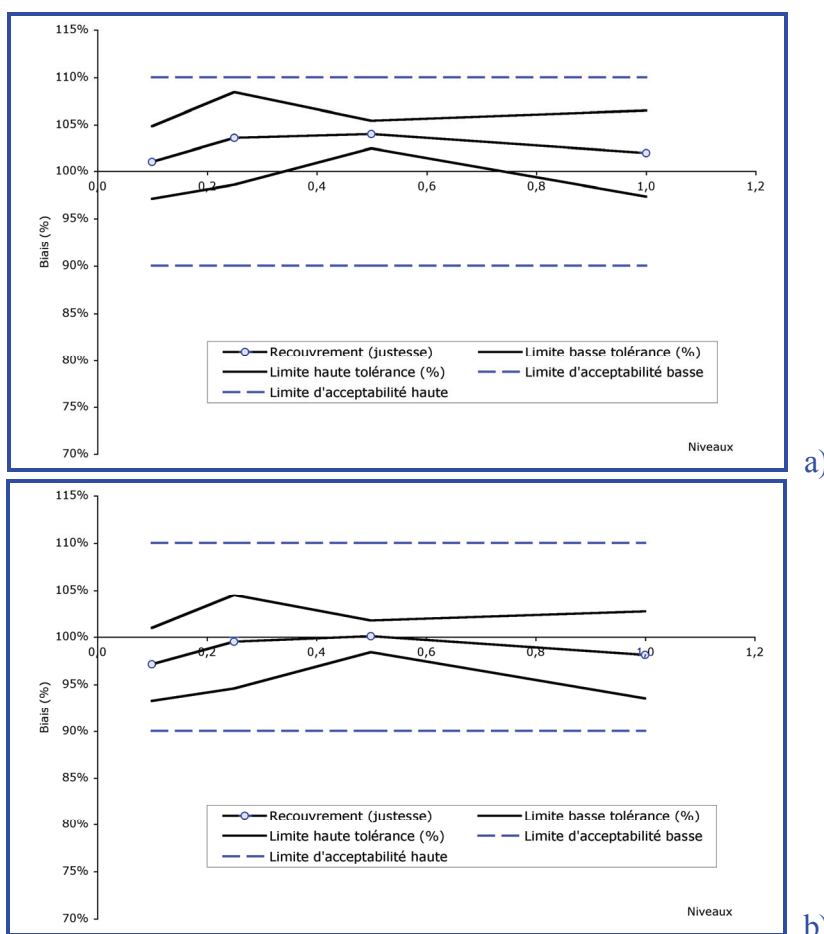


Figure 4 : profil d'exactitude du sulfate
a) avant correction du biais ; b) après correction du biais

La correction du biais (figure 4b) permet de satisfaire plus largement au critère d'acceptabilité, et ramène le taux de recouvrement à 100 %. Les profils d'exactitude pour les autres analytes sont représentés sur les figures 5 à 10 et démontrent que la méthode pour ces éléments est parfaitement adaptée aux objectifs fixés : elle est donc valide sans avoir à affecter un facteur de correction aux futures mesures.

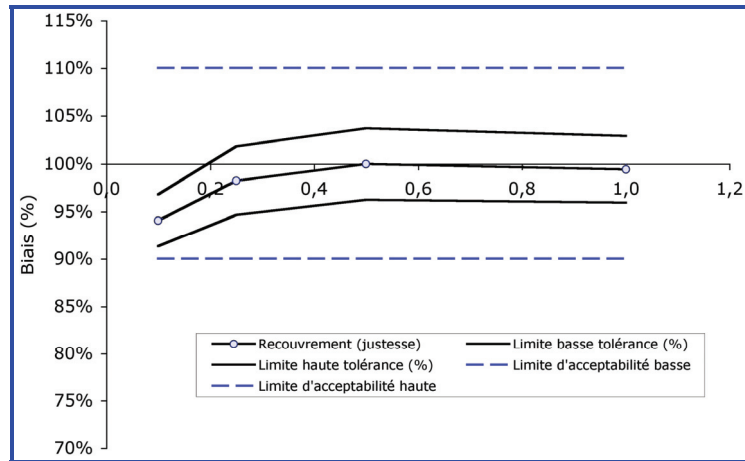


Figure 5 : profil d'exactitude du fluorure

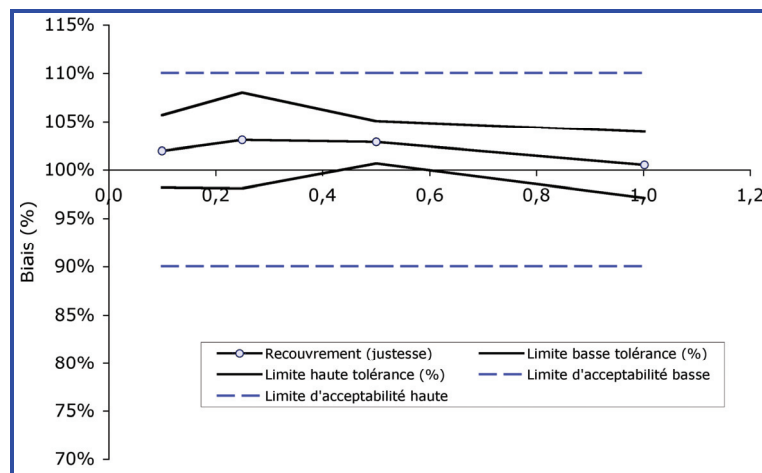


Figure 6 : profil d'exactitude du bromure

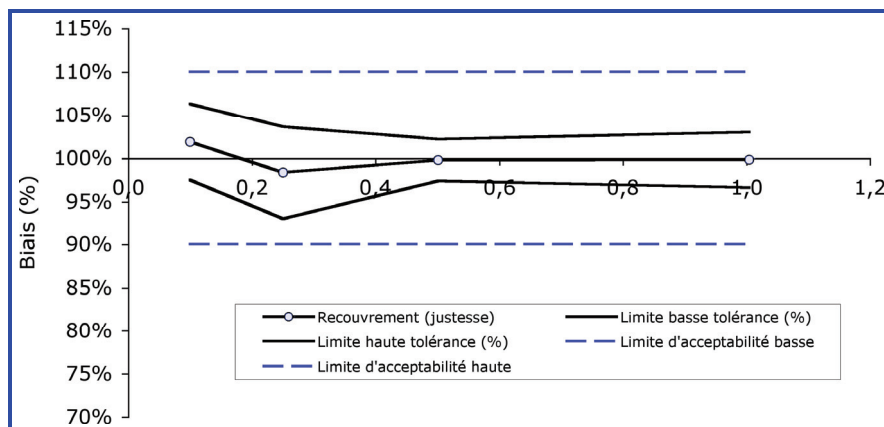


Figure 7 : profil d'exactitude du chlorure

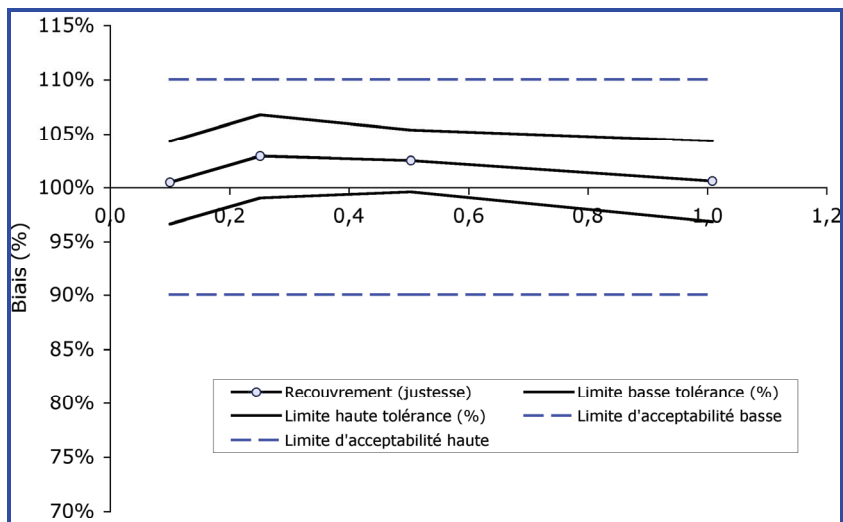


Figure 8 : profil d'exactitude du nitrate

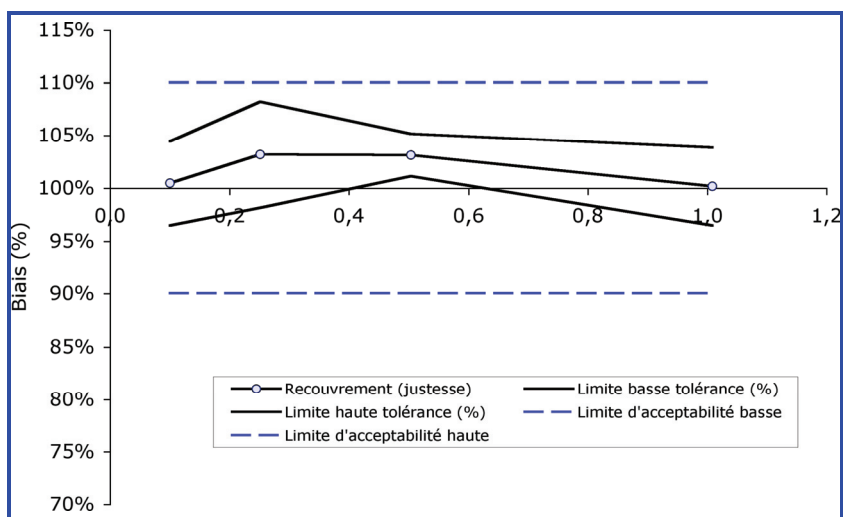


Figure 9 : profil d'exactitude du nitrite

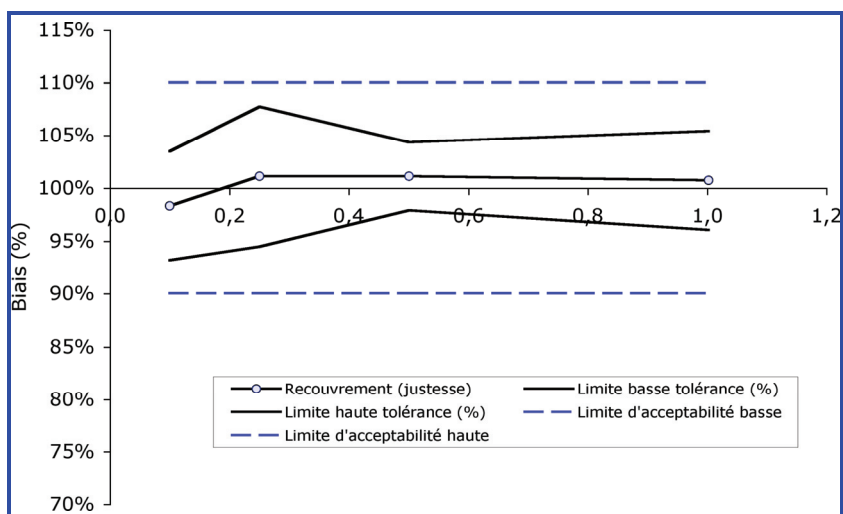


Figure 10 : profil d'exactitude du phosphate

4.4 La spécificité et l'absence d'effets de matrice

Elles sont estimées par la méthode des ajouts dosés (**figure 11** et **tableau 5**). Dans tous les cas, on observe une très bonne linéarité entre la concentration retrouvée et la concentration ajoutée. Toutes les valeurs du test de Fisher sont largement supérieures à la valeur limite. Les pourcentages de recouvrement obtenus par la méthode des ajouts dosés sont déduits des pentes des droites de régression. Des tests sur les ordonnées à l'origine ont montré que celles-ci n'étaient pas significativement différentes de zéro. Les pentes des droites de régression ont donc été recalculées en forçant le passage par l'origine. Les pentes des droites de régression donnent alors directement le pourcentage de recouvrement.

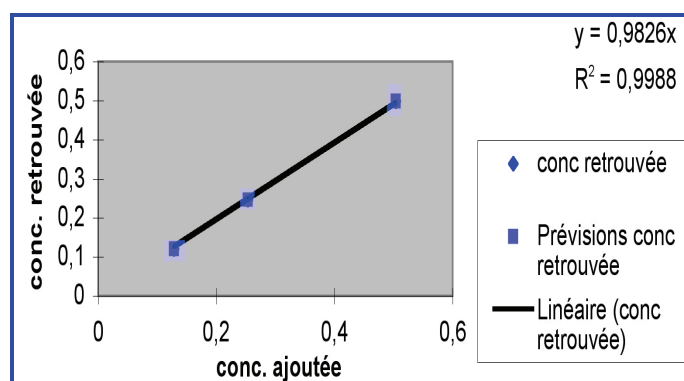


Figure 11 : relation linéaire entre concentration retrouvée et concentration ajoutée par la méthode des ajouts dosés. Cas du fluorure

Tableau 5 : pourcentages de recouvrement obtenus par la méthode du profil d'exactitude et par la méthode des ajouts dosés.

a. moyenne des 4 valeurs de gamme ; b. pente de la droite de régression forcée à passer par l'origine

Analyte	Profil d'exactitude ^a	Ajouts dosés ^b
Fluorure	98,0	98,3
Chlorure	100,0	102,2
Nitrite	102,0	96,5
Bromure	102,0	95,0
Nitrate	101,6	95,4
Phosphate	100,5	97,9
Sulfate	102,6	100,2

Les valeurs obtenues par les pentes des droites de régression sont différentes des valeurs obtenues par la méthode du profil d'exactitude, et plus éloignées de 100 %. Ceci peut être attribué au fait que la méthode du profil d'exactitude a été appliquée à des solutions multiéléments en solution pure, tandis que la méthode des ajouts dosés intègre l'effet de matrice sur un échantillon naturel représentatif du milieu géochimique étudié. On peut considérer que la méthode du profil d'exactitude (**figures 4 à 10**) permet de visualiser l'ordre de grandeur des biais des méthodes, mais qu'il vaut mieux utiliser les droites de régression obtenues (**figure 11**) pour corriger les concentrations brutes, car ces droites tiennent compte de l'effet de matrice.

Dans ces conditions, le résultat d'analyse est simultanément corrigé des effets de matrice et du biais suivant la relation :

$$\bar{x} = (C_1 y + C_2) / C_3 \pm k(\alpha, \nu) u_c, \quad (4)$$

Où C_1 et C_2 sont les coefficients de la courbe de réponse, ici supposée linéaire, et C_3 le pourcentage de recouvrement divisé par 100.

4.5 Les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ)

Elles sont reportées dans le **tableau 6**. Par convention :

□ $y < LOD$: l'analyte n'est pas détecté ;

$LOD < y < LOQ$: l'analyte est détecté, mais non quantifiable ;

$LOQ < y$: l'analyte est quantifiable.

Tableau 6 : limites de détection et de quantification des méthodes (mmol/l)

Analyte	Fluorure	Chlorure	Nitrite	Bromure	Nitrate	Phosphate	Sulfate
LOD	0,018	0,013	0,018	0,014	0,015	0,019	0,007
LOQ	0,060	0,045	0,060	0,047	0,050	0,063	0,024

Les *LOD* sont toutes de l'ordre de 15 à 20 $\mu\text{mol/l}$, sauf celle du sulfate, qui est deux fois plus faible. Ceci est dû à la pente plus grande de la droite d'étalonnage, qui traduit une sensibilité plus grande, du fait que le sulfate est un ion bivalent. La chromatographie ionique semble donc plus performante pour le dosage des sulfates, qui pose problème avec les méthodes traditionnelles comme la néphélométrie après précipitation du sulfate de baryum.

5. Tests de conformité

Les tests de conformité sont des tests permettant de vérifier que, pendant l'analyse, les performances du système restent compatibles avec le cahier des charges de la méthode.

La vérification permet de s'assurer que les écarts entre les valeurs indiquées par un appareil de mesure et les valeurs connues correspondantes d'une grandeur mesurée sont tous inférieurs aux erreurs maximales tolérées.

5.1 Construction de la carte de contrôle et calcul des erreurs maximales tolérées.

La carte de contrôle est un enregistrement utilisé pour contrôler la stabilité d'une méthode dans le temps. On utilise comme « étalon de surveillance » le Matériau de Référence Certifié (MRC) qui a servi au contrôle de la justesse. On réalise un nombre assez important de mesures groupées en séries, les résultats sont reportés sur un graphique. Il est préférable de faire une moyenne sur une trentaine de répétitions au moins et dans ces conditions, les valeurs du t de Student peuvent être prises égales à 2 et 3 respectivement.

Les limites de surveillance LS et de contrôle LC sont calculées suivant les formules :

$$LS = \text{moyenne} \pm 2 u_c, \quad (5)$$

$$LC = \text{moyenne} \pm 3 u_c, \quad (6)$$

et reportées sur la carte.

5.2 Surveillance

La *surveillance* complète les opérations de vérification et d'étalonnage afin de *détecter les dérives éventuelles* de l'équipement entre ces mesures.

Il s'agit d'enregistrer les écarts entre les valeurs d'indication de l'équipement de mesure et les valeurs vraies du contrôle certifié. Ces opérations de surveillance sont consignées sur des enregistrements tels que la carte de contrôle. A chaque nouvelle analyse, le résultat du contrôle est ajouté, ce qui permet de vérifier s'il est bien à l'intérieur des limites admises, et ainsi d'entreprendre des actions correctives si nécessaire. Cela permet également de contrôler au cours du temps que les valeurs expérimentales sont réparties d'une façon aléatoire par rapport à la moyenne et de nous alerter sur une éventuelle dérive de l'appareil (**Tableau 7**).

Tableau 7 : résumé des étapes de la surveillance

Principales étapes	Protocole	Tests
<p>1-Vérification d'un taux de résolution correct $R > 1,2$ d'une bonne répétabilité $CV < 5\%$</p>		$R = \frac{d}{m}$, d est la distance séparant les sommets des 2 pics, et m la moyenne des largeurs à la base des pics. coefficient de variation $CV = \frac{s}{x} \times 100$,
<p>2-Construction de la carte de contrôle</p>	<p>30 répétitions du matériau de référence certifié MRC multiélément, à une concentration de 0,5 mmol/L en Fluorure, Chlorure, Nitrite, Bromure, Nitrate, Phosphate, Sulfate, sous des conditions de reproductibilité</p>	<p>Calculer, Moyenne, Variance s^2 - Erreur aléatoire : $u_a = s / \sqrt{n}$ - Incertitude de la mesure : $u_c = \sqrt{u_{mrc}^2 + u_a^2}$ tenir compte de l'incertitude de l'étalon $U_{mrc} = k_{mrc} u_{mrc}$ -Intervalle de confiance du résultat (t de Student) $\bar{x} \pm t(\alpha, \nu) u_c$ Évaluer les limites de surveillance et de contrôle $LS = \text{moyenne} \pm 2 u_c$, $LC = \text{moyenne} \pm 3 u_c$ Construire la carte de contrôle avec les limites inférieures et supérieures des LS et LC en fonction de la « valeur moyenne de la solution certifiée ».</p>
<p>3-Surveillance quotidienne</p>	<p>Insérer dans la séquence analytique le MRC à peu près tous les 5 échantillons, il sert de contrôle</p>	<p>S'assurer que les valeurs du MRC sont comprises à l'intérieur des limites de surveillance Pour les échantillons à analyser, s'assurer que la concentration obtenue est supérieure à la Limite de Quantification et se trouve bien à l'intérieur du domaine d'analyse</p>

On fait correspondre sur cet enregistrement un point à chacune des valeurs d'une statistique calculée sur des échantillons successifs ; chacun de ces points a pour abscisse le numéro de l'échantillon et pour ordonnée la valeur de la statistique calculée sur cet échantillon.

Le but de ces tests de surveillance est de nous alerter en cas d'anomalie. Reste à définir quels seront les critères utilisés pour considérer ce qui sera anormal. Nous décidons dans notre cas d'être vigilants lorsqu'une mesure sort des limites de contrôle, ce qui déclenchera la répétition du contrôle pour confirmer ou infirmer la dérive et nous alertera lorsque la répartition des mesures fait suspecter un comportement non aléatoire. Un exemple de test de surveillance donné par le logiciel *Chroméléon*TM est reporté sur la **figure 12**. On peut constater que le contrôle ne sort pas des limites autorisées.

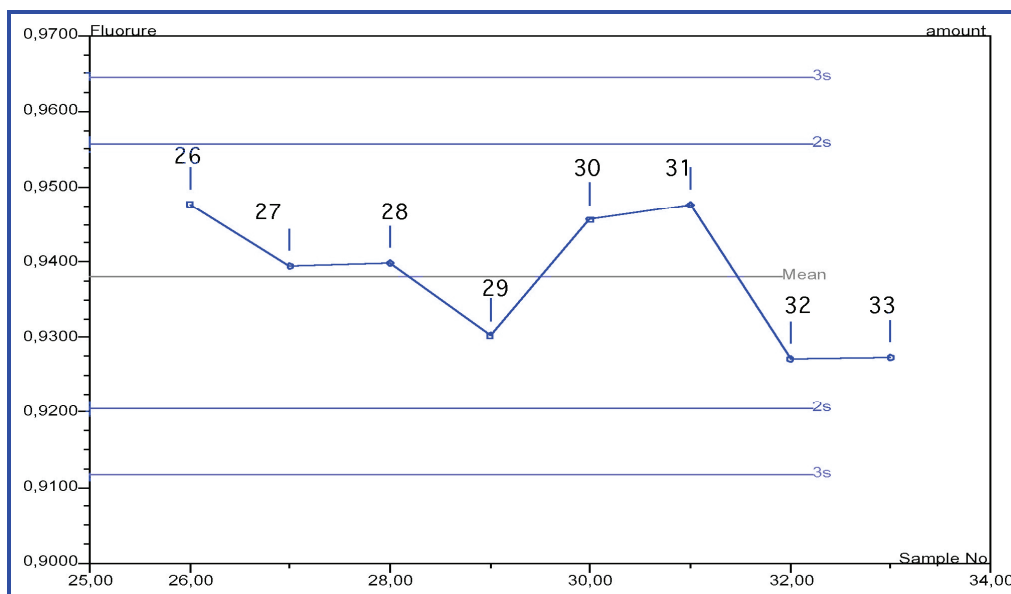


Figure 12 : test de surveillance quotidienne

Conclusion

La démonstration de la normalité des distributions ne nécessite pas d'être répétée. Lors de la mise au point de la méthode d'analyse, ce test est nécessaire et permet d'assurer la validité de l'emploi des statistiques classiques et de leur puissance. Nous avons utilisé ici un modèle statistique linéaire, qui permet d'estimer le biais ou incertitude systématique (« erreur systématique») et l'incertitude aléatoire. Les résultats montrent que le biais n'est pas négligeable et doit être corrigé. L'emploi d'un Matériau de Référence Certifié (MRC) s'impose à cette fin. Ce MRC étant lui-même connu avec une incertitude, donnée par le fabricant, cette incertitude doit être ajoutée à l'incertitude aléatoire, pour donner l'incertitude composée. C'est cette dernière qui est utilisée pour calculer l'intervalle de confiance de la mesure. Ici, comme aucune relation n'a été observée entre l'incertitude composée et la concentration, la valeur de l'incertitude composée obtenue pour une valeur de concentration moyenne (milieu de gamme) a été retenue par souci de simplification. La méthode du profil d'exactitude visualise l'intérêt de corriger du biais et les limites d'acceptabilité. La méthode des ajouts dosés permet d'estimer le pourcentage de recouvrement et de vérifier la linéarité entre concentration retrouvée et concentration ajoutée dans la matrice même des échantillons analysés, c'est-à-dire pour des échantillons représentatifs des milieux étudiés. Les droites de régression obtenues sont utilisées pour corriger des biais systématiques les concentrations

brutes données par la courbe de réponse. L'incertitude composée est également utilisée pour calculer les limites de l'intervalle de confiance acceptables, par une mesure régulière du MRC, qui sert ainsi à effectuer les tests de surveillance et à alerter en cas de dégradation des performances de la chaîne de mesure. L'échantillon doit bien sûr d'abord se situer au dessus de la limite de quantification *LOQ*.

Matériel supplémentaire :

L'ensemble des données et des tableaux peuvent être fournis sur demande.

Bibliographie

- ACS (1980) Guidelines for Data Acquisition and Data Quality Evaluation in Environmental Chemistry, *Analytical chemistry*, **52**, 14, 2242-2249
- AFNOR (1994a) Norme française NF X 07-001 -Vocabulaire International des termes fondamentaux et généraux de métrologie
- AFNOR (1994b) Norme NF ISO 5725-1 : Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure. Partie 1 : Principes généraux et définitions.
- AFNOR (1994c) Norme NF ISO 5725-2 : Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure. Partie 2 : Méthodes de base pour la détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode de mesure normalisée.
- AFNOR (1994d) Norme NF ISO 5725-4 : Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure. Partie 4 : Méthodes de base pour la détermination de la justesse d'une méthode de mesure normalisée.
- AFNOR (1996) Métrologie dans l'entreprise : outil de la qualité.
- AFNOR (1998) Norme NF ISO 5725-5 : Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure. Partie 5 : Méthodes alternatives pour la détermination de la fidélité d'une méthode de mesure normalisée.
- AFNOR (1999) Norme XP T90-210 : Protocole d'évaluation d'une méthode alternative d'analyse physico-chimique quantitative par rapport à une méthode de référence.
- Feinberg M. (2000) La validation des méthodes d'analyse. *Le cahier des Techniques de l'Inra*, 44, 19-49.
- Feinberg M. (2003) L'incertitude des mesures analytiques. *Le cahier des Techniques de l'Inra*, 50, 3-10
- Feinberg, M. (2006) Approche globale et harmonisée de la validation. *Spectra Analyse*, **249**, avril-mai 2006, 16-23.
- Feinberg M. (2010a) Principes et vocabulaire in Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude. *Le Cahier des Techniques de l'Inra*, numéro spécial, 13-25
- Feinberg M. (2010b) Mise en œuvre du profil d'exactitude in Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude. *Le Cahier des Techniques de l'Inra*, numéro spécial, 27-44

Feinberg M. (2010c) Interprétation du profil d'exactitude *in* Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude. *Le Cahier des Techniques de l'Inra*, numéro spécial, 45-59

ISO (1997) Guide 32 : Étalonnage en chimie analytique et utilisation de matériaux de référence certifiés.

ISO (2000) Guide 33 : Utilisation des matériaux de référence certifiés.

Taylor B.N. et Kuyatt C.E. (1994) Guidelines for Evaluating and expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results, *NIST Technical Note 1297, 1-20*

