

Analyse multi-élémentaire de repas complets avec la technique des ajouts dosés au MP-AES : Investigation des effets matrices par le modèle du profil d'exactitude

Justine LANDAIS¹
Caroline BUFFIERE¹

Correspondance

j.landais@outlook.fr
caroline.buffiere@inrae.fr

Résumé.

À ce jour, il n'existe aucune technique d'analyse permettant d'estimer les apports en minéraux dans des échantillons de type repas complet représentatifs des régimes alimentaires dans leur globalité. De plus, les dosages multi-élémentaires réalisés par spectromètre à émission atomique sont souvent confrontés à des effets matriciels qui peuvent entraîner des erreurs d'analyse et biaiser les résultats. Pour pallier ces effets, nous avons mis au point et optimisé une méthode de dosage simultané du fer, zinc, calcium et magnésium dans des matrices de repas complexes par la technique des ajouts dosés. L'objet de cette étude est d'évaluer la pertinence de l'emploi de cette technique grâce au modèle du profil d'exactitude.

Il a été observé des effets matriciels systématiques, corrélés à la complexité de l'échantillon. La correction du biais a permis d'améliorer de manière significative les performances analytiques de la méthode. Elle s'est révélée plus sensible, avec une diminution de la limite de quantification (LOQ) pour tous les éléments considérés. De plus, le domaine de validité global de la méthode a été élargi, s'étendant désormais entre 0,15 et 1,5 mg.L⁻¹ pour les éléments traces (Fe, Zn), et entre 2,5 et 12 mg.L⁻¹ pour les éléments principaux (Ca, Mg). La modélisation de l'incertitude de mesure a permis de caractériser la fidélité de la méthode. Dans le domaine de validité, l'incertitude élargie s'élève en moyenne à 23 % (Fe), 12 % (Zn), 14 % (Ca) et 8 % (Mg). Les niveaux de concentrations d'ajouts ont pu être optimisés en fonction des éléments et de leurs plages de validité, en se basant sur leur seuil de discrimination.

Ce travail nous conforte dans la nécessité d'utiliser cette technique d'ajouts dosés dans le cadre d'un dosage multi élémentaire sur des repas complets.

Mots-clés

MP-AES ; Effet matrice ; Ajout dosés ; Profil d'exactitude ; Analyse multi élémentaire ; Repas ; Alimentation, Régimes

1. Unité de Nutrition Humaine, UMR 1019, INRAE Centre de Recherches Auvergne-Rhône-Alpes, Saint Genès Champanelle, France.

Evaluation of standard addition analysis for the multi elemental determination of complete meals by MP-AES: Investigation of matrix effects using the accuracy profile model

Justine LANDAIS¹
Caroline BUFFIERE¹

Correspondence

j.landais@outlook.fr

caroline.buffiere@inrae.fr

Résumé.

No analytical technique currently exists to assess mineral intakes in whole-meal samples to provide global information on diets. Moreover, multi-elemental determination by atomic emission spectrometers is often subject to matrix effects leading to analytical bias and inaccurate results. To overcome these issues, we have developed and optimized a method for the simultaneous determination of iron, zinc, calcium and magnesium in complex meal samples using the standard addition technique. The aim of this study was to appraise the suitability of this technique using the accuracy profile model. Systematic matrix effects were detected and correlated with the complexity of the sample. Bias correction significantly improved the analytical performance of the method. It appears to be more sensitive, with a decrease of the limit of quantification (LOQ) for all the elements studied. In addition, the overall validity range of the method has been extended, from 0.15 to 1.5 mg.L⁻¹ for trace elements (Fe, Zn), and from 2.5 to 12 mg.L⁻¹ for major elements (Ca, Mg). The method's reliability was assessed by modeling the uncertainty of the measurements. Within the validity range, the expanded uncertainty averages were 23% (Fe), 12% (Zn), 14% (Ca) and 8% (Mg). Addition concentration levels were therefore optimized for each element in their validity ranges, based on their discrimination thresholds. This work confirms the necessity of using standard addition as part of a multi-elemental assay on complete meals.

Keywords

MP-AES; Matrix effect; Dose addition; Accuracy profile; Multi-elemental analysis; Meals; Food, Diets

1. Unité de Nutrition Humaine, UMR 1019, INRAE Centre de Recherches Auvergne-Rhône-Alpes, Saint Genès Champanelle, France.

Introduction

Ces dernières années, de nouvelles politiques de santé publique ont favorisé une transition nutritionnelle vers des régimes alimentaires davantage végétalisés (ANSES, 2019 ; Loi n° 2018-938, 2018 ; Loi n° 2021-1104, 2021). Les travaux de recherche de l'Unité de nutrition humaine (UNH) portent sur l'estimation des impacts de cette transition sur la santé et l'élaboration de stratégies nutritionnelles adéquates.

Dans ce contexte, la question de la satisfaction de nos besoins en minéraux se pose. En effet, les produits animaux sont la principale source de certains d'entre eux, comme le fer, le zinc et le calcium. Leur digestibilité, qui est définie comme la proportion d'un nutriment absorbée au niveau intestinal est également impactée par le ratio animal/végétal du régime (Foster *et al.*, 2013 ; Perignon *et al.*, 2018 ; Miketinas et Champagne, 2022 ; Cutillas *et al.*, 2022).

Bien que des méthodes de détermination de ces minéraux dans des échantillons alimentaires singuliers existent, aucune méthode applicable à des repas complets et de nature variable n'a encore été mise au point. Par conséquent, il y a un besoin de développement analytique pour ce type d'échantillons afin d'enrichir les données en permettant une caractérisation plus complète de ces régimes dans leur globalité.

Actuellement, l'analyse des minéraux dans les produits alimentaires est principalement réalisée par méthodes spectrométriques. Les plus répandues sont la spectroscopie d'émission atomique avec couplage inductif (ICP-AES), la spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif (ICP-MS) et la spectrométrie d'absorption atomique (FAAS, AAS) (Agilent, 2021). Une alternative moins coûteuse et plus durable a été développée par Agilent Technologies (Balaram, 2020) : le spectromètre d'émission atomique à plasma micro-ondes (MP-AES). Malgré son utilisation encore limitée dans le domaine alimentaire, cet instrument présente l'avantage d'offrir des performances analytiques comparables à celles de l'ICP-AES, sans utiliser de gaz combustible avec un plasma autogénéré à base d'azote de l'air.

Les repas complets étant par nature des échantillons complexes et variés, leur analyse au MP-AES soulève des difficultés techniques. De précédentes études conduites sur la détermination élémentaire dans des produits alimentaires ont mis en évidence la présence d'interférences liées à la matrice de l'échantillon (Pelipasov et Polyakova, 2020 ; Thaler *et al.*, 2018 ; Polyakova *et*

al., 2020). Elles sont générées par l'environnement dans lequel se trouvent les éléments d'intérêt et sont qualifiées d'« effets matrices rotationnels ». Le MP-AES est particulièrement sensible à ces interférences en raison de la température de son plasma (3000-5000 °C), qui est faible en comparaison à l'ICP-AES.

La présence de sels dits « facilement ionisables » (Na, K) ou d'acidité et de carbones résiduels ont un effet sur la réponse instrumentale produite par le MP-AES. Cet effet est variable, entraînant une sous- ou une surestimation du signal obtenu pour l'analyte à déterminer. Par ailleurs, une concentration élevée de sels totaux dissous (TDS) dans l'échantillon peut entraîner leur accumulation dans la torche, compromettant les performances analytiques de l'instrument (Sewawa *et al.*, 2023).

Différentes techniques peuvent être utilisées pour surmonter les effets matrices : l'utilisation d'un facteur de dilution pour lequel l'effet matrice est minimal, l'incorporation d'un standard interne dans l'échantillon ou la technique des ajouts dosés. Cette dernière, largement appliquée dans les analyses de minéraux (Zhu et Chiba, 2012 ; Krejčová *et al.*, 2007 ; Sewawa *et al.*, 2023 ; Andrade, Korn *et al.*, 2008), permet de corriger les effets matrices rotationnels. Recommandée par l'Union internationale de chimie pure et appliquée (IUPAC), elle consiste à ajouter des quantités connues et croissantes de l'analyte à mesurer dans l'échantillon (Danzer et Currie, 1998). Si les points démontrent un coefficient de régression satisfaisant ($> 0,99$), il est possible d'obtenir la concentration initiale par extrapolation de la droite d'étalonnage (Ellison et Thompson, 2008). Son adaptabilité aux différents types d'échantillons et de concentrations en font une technique privilégiée pour l'analyse de matrices de nature variable.

En conséquence, nous avons mis au point une méthode de dosage des minéraux dans des matrices complexes par ajouts dosés. La mise en solution, les conditions opératoires et les techniques d'étalonnage ont été optimisées.

Ce travail a pour objectif de démontrer l'applicabilité et la pertinence de la technique des ajouts dosés pour la détermination en simultané des éléments traces (Fe et Zn) et principaux (Ca et Mg) dans des échantillons de repas complets. La technique des ajouts dosés est testée avec le modèle du profil d'incertitude. Celui-ci permet d'évaluer les performances analytiques de fidélité intermédiaire, répétabilité, linéarité et les limites de quantification (LOQ) de la méthode.

Description de la méthode préalablement développée

Optimisation des paramètres généraux

L'optimisation de ce type d'analyse au MP-AES demande la prise en considération de différents paramètres interdépendants et critiques pour une détermination simultanée des éléments traces et principaux. L'une des difficultés principales est de trouver un facteur de dilution des échantillons, qui tienne compte à la fois : (1) de la concentration en sels totaux dissous (TDS), (2) des LOQ basses pour les éléments traces et hautes pour les éléments principaux et (3) de la variabilité de la concentration des échantillons analysés.

La limite fixée pour les TDS avant l'analyse par MP-AES est de 3 %. Une dilution insuffisante conduirait à l'accumulation de sels dans la torche et le nébuliseur, ce qui pourrait entraîner une saturation du signal des éléments principaux tels que le calcium et le magnésium. Cependant, une dilution excessive de l'échantillon induirait une concentration des éléments traces en dessous des limites de quantification de la technique.

Par conséquent, une série de tests a été réalisée afin de proposer un facteur de dilution et des ajouts pour des échantillons de repas complets lyophilisés uniques. Nous

avons également sélectionné les longueurs d'onde les plus appropriées pour l'analyse. Les valeurs d'émissions préliminaires, les LOD et LOQ et la linéarité du système ont ainsi été évalués pour différents facteurs de dilution et points d'ajouts dosés. Finalement, un facteur de dilution à 5 g/L d'échantillon de repas semble être le plus approprié pour des ajouts à 0,1, 0,15 et 0,2 mg/L (Fe, Zn) et à 1,75, 2,625 et 3,5 mg/L (Ca, Mg). Des longueurs d'onde dépourvues d'interférences spectrales à 371,993 nm, 213,857 nm, 393,366 nm et 285,213 nm ont été retenues respectivement pour le fer, le zinc, le calcium et le magnésium.

Instrumentation et conditions opératoires

La minéralisation des échantillons est réalisée grâce au système de digestion fermé assisté par micro-ondes (ETHOS EASY, Milestone, Sorisole, Italie) dans des inserts en PTFE-TFM. L'évaporation des acides est conduite dans le module associé CombiVac (Milestone, Sorisole, Italie). Le spectromètre d'émission atomique à plasma micro-onde Agilent 4200 (MP AES) est utilisé pour la détermination des analytes. Les échantillons en solution sont introduits dans le plasma à l'aide d'une chambre de nébulisation cyclonique et d'un nébuliseur concentrique OneNeb. Les conditions d'analyse sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Conditions opératoires du MP-AES

Paramètres	Fe	Zn	Ca	Mg
Répliques	3	3	3	3
Longueur d'onde (nm)	371 993	213 857	393 366	285 213
Débit de nébulisation (L/min)	0,65	0,45	0,6	0,7
Vitesse de pompe (tours/min)		15		
Délai de prélèvement (s)/pompage rapide		65		
Durée de rinçage (s)/pompage rapide		30		
Temps de stabilisation (s)		15		
Correction bruit de fond		Auto		
Position de visualisation		0		
Pixels		3		

Traitement de l'échantillon

Deux solutions multistandards sont préparées à partir de solutions de standards certifiées de référence traçables au NIST de 10 000 µg/mL pour le fer/magnésium et 1000 µg/mL pour le zinc/calcium (Sigma-Aldrich, L'Isle-d'Abeau Chesnes, France) : une pour la calibration externe de l'appareil (Fe et Zn 20 mg/L, Ca et Mg 160 mg/L) et

l'autre, pour la calibration interne par ajouts dosés (Fe et Zn 10 mg/L, Ca et Mg 150 mg/L).

Au total, 250 mg d'échantillon sont pesés et placés dans les inserts du digesteur en présence de 5 mL d'HNO₃ 69 % et 1 mL d'H₂O₂ 30 % (Sigma-Aldrich, L'Isle-d'Abeau Chesnes, France). La minéralisation par micro-ondes consiste en une digestion acide sous pression (160 °C-10 min, mon-

tée à 200 °C-5 min, 200 °C-10 min ; puissance maximale 850 W). Elle est suivie d'une étape de concentration de l'échantillon dans l'évaporateur (125 °C-15 min ; 1500 W) jusqu'à un volume résiduel inférieur à 1 mL. Le volume des minéralisas obtenus est ajusté à 50 mL avec de l'acide nitrique 5 % v/v. L'échantillon est ensuite aliquoté pour être analysé au MP-AES sans ajout et avec les 3 ajouts déterminés précédemment. Les résultats obtenus sont calculés par extrapolation.

Cette méthode par ajouts dosés (AD) est reconnue pour être chronophage et exigeante par rapport à une méthode de dosage classique basée sur une détermination prédite inverse. Il apparaît alors important de justifier et d'optimiser son utilisation. Pour mieux caractériser l'application de cette technique, nous avons choisi d'utiliser un modèle de validation de méthode basé sur le profil d'exactitude. Ce modèle permettra d'évaluer de manière approfondie la pertinence et l'efficacité de la technique des ajouts dosés, et ainsi d'améliorer sa mise en œuvre.

Design expérimental de la validation

Démarche générale

Dans cette étude, les concentrations des matrices sont évaluées directement par rapport à une gamme étalon externe réalisée à partir de standards multiélémentaires. Le profil d'exactitude est un outil statistique et graphique permettant de démontrer, s'ils existent, les effets de la matrice sur les résultats et d'évaluer l'impact de la correction apportée par les ajouts dosés sur les performances analytiques. Il permet ainsi de caractériser le biais induit par la matrice et de définir la plage d'analyse pertinente (Feinberg, Laurentie, 2010).

La technique ne pouvant être validée pour l'ensemble des repas possibles, nous avons choisi de vérifier son adéquation à des matrices variables, plus ou moins concentrées en éléments analysés. Les niveaux d'ajouts testés sont restés constants afin de caractériser la technique.

Pour cela, nous avons analysé six matrices différentes, réalisé quatre répétitions d'analyse de chaque matrice sur quatre jours différents, en utilisant sept niveaux d'ajouts dosés. Cette approche nous a permis d'obtenir 24 profils d'exactitude, correspondant à chaque échantillon et à chaque élément analysé (Figure 1).

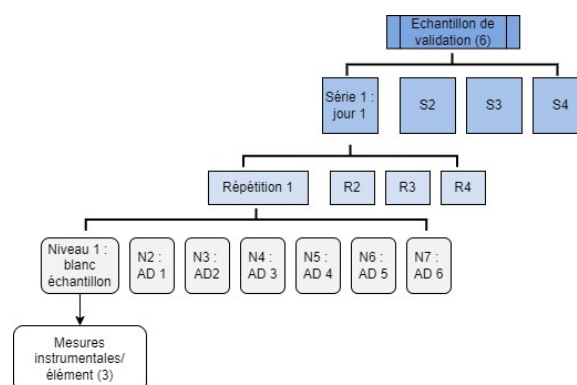


Figure 1. Plan d'expérience par échantillon.

Le tableau 2 ci-dessous décrit le plan d'expérience du programme de validation. Les points d'ajouts sont préparés en ajoutant la solution multistandard aux différents échantillons pour obtenir sept niveaux d'ajouts : 5 mL de chaque matrice d'échantillon sont additionnés de 125 µL d'une solution de standard multiélémentaire de concentration appropriée pour obtenir le niveau d'ajout souhaité. Une gamme d'étalonnage en sept points encadrant les concentrations attendues dans les différents échantillons et leurs ajouts est réalisée pour la calibration externe de

Tableau 2 : Plan d'expérience du programme de validation

Paramètres	Plan d'étalonnage	Plan expérimental
Nombre de niveaux de concentration	7 Ca et Mg (mg/L) : 0-0, 8-1, 6-4-8-9, 6-12-20 Fe et Zn (mg/L) : 0-0, 1-0, 2-0, 5-1-1, 2-1, 5-2, 5	7 [AD] Ca et Mg (mg/L) : 0-1, 5-1, 95-2, 25-2, 7-3-3, 75-4, 5 [AD] Fe et Zn (mg/L) : 0-0, 1-0, 13-0, 15-0, 18-0, 2-0, 25-0,3
Concentration (mg. L-1)		
Nombres de répliques par échantillon (n)	2 4	4 4
Nombre de séries indépendantes	Jour 1 Jour 2 Jour 3 Jour 4	Jour 1 Jour 2 Jour 3 Jour 4
Solution utilisée	À partir de solutions monoélémentaires certifiées.	À partir de solutions monoélémentaires certifiées.
Préparation des solutions	Indépendante (pas de dilutions successives)	Indépendante (pas de dilutions successives)

l'appareil. Les concentrations varient entre 0 et 2,5 mg/L pour les éléments traces et entre 0 et 20 mg/L pour les éléments principaux.

Préparation des échantillons de matrices complexes mimant des repas

À ce jour, aucun matériel de référence certifié de repas complet n'est disponible pour les minéraux analysés. Nous avons spécialement conçu un assortiment de poudres alimentaires pour créer six échantillons de validation (EV) distincts. Les minéraux déterminés dans la méthode sont principalement apportés par des ingrédients organiques, permettant ainsi de simuler le domaine d'application de la méthode. Ainsi, les EV présenteront une composition comprenant d'autres minéraux non spécifiés dans la méthode et responsables d'effets matriciels, des protéines, des glucides et des lipides.

La formulation de base des EV comprend un mélange des ingrédients suivants : farine de blé T45 et T150, farine de soja, lait en poudre écrémé, spiruline, amidon de maïs, sucre et germe de blé (Tableau 3). Les proportions des ingrédients sont ajustées pour correspondre aux concentrations en Fe, Zn, Ca et Mg pouvant être présentes dans des repas à différents ratios de composants d'origine animale et végétale. Les EV concentrés ont été enrichis avec des

poudres de fer et de zinc (Sigma-Aldrich) pour simuler des repas avec un ratio animal/végétal élevé.

Les ingrédients sont pesés puis broyés finement de façon à obtenir une poudre homogène à l'aide d'un broyeur à bille (Dangoumeau). La matière sèche est déterminée par pesée des échantillons après séchage à l'étuve 24 h à 60 °C.

Dans ce contexte, le domaine de validation a été établi pour des échantillons dont les concentrations en Zn et Fe varient de 1 à 20 mg, et en Ca et Mg de 20 à 250 mg pour 100 g de matière sèche. Les valeurs de concentrations théoriques présentées dans le tableau 3 ont été calculées en utilisant la base de données Ciqual.

Critères d'analyse

Linéarité : vérifier l'adéquation matrice/ajouts

Évaluation de la linéarité des ajouts : afin de déterminer la relation linéaire entre les quantités mesurées pour chaque niveau d'ajout dosé et leurs valeurs de référence, nous avons calculé le coefficient de corrélation pour chaque échantillon et chaque répétition.

Spécificité : évaluer l'effet matrice

Le calcul du taux de recouvrement (%) des valeurs permet d'évaluer les effets matrices. Il représente l'écart moyen

Tableau 3 : Composition théorique en Fe, Zn, Ca, Mg, Na et K pour des échantillons de validation selon la base de données Ciqual

Quantité	EV-1	EV-2	EV-3	EV-4	EV-5	EV-6
Farine de blé T45 (g)	2,506	6,505	0,000	0,000	0,000	0,000
Farine de blé T150 (g)	0,000	0,000	2,503	0,000	0,000	0,000
Farine de soja (g)	0,000	0,000	0,000	15,001	0,000	35,008
Lait en poudre écrémé (g)	0,252	1,032	2,260	2,505	5,043	7,509
Spiruline (g)	0,254	1,005	2,754	0,000	2,528	0,000
Maïzena (g)	15,013	10,028	5,015	6,036	0,000	0,000
Sucre blanc (g)	30,501	25,048	24,527	22,067	11,118	0,000
Germe de blé (g)	1,508	6,505	13,002	4,507	31 000	8,029
Poudre de Zinc (g)	0,000	0,000	0,000	0,005	0,008	0,013
Poudre de Fer(g)	0,000	0,000	0,000	0,005	0,007	0,012
Calcium (mg/100 g)	27,966	83,709	167,302	254,009	347,481	648,562
Magnésium (mg/100 g)	24,876	85,867	170,010	267,417	348,451	591,568
Fer (mg/100 g)	1,324	4,128	8,449	25,574	43,466	55,990
Zinc (mg/100 g)	1,240	4,418	8,583	25,191	50,910	64,939
Potassium (mg/100 g)	117,941	406,062	811,272	1 668,601	928,587	333,345
Sodium (mg/100 g)	28,450	79,443	167,001	57,783	488,976	60,703
Matière sèche (%)	96,142	95,612	96,419	95 500	95,872	92,387

entre la valeur théorique de l'ajout et la valeur mesurée au MP-AES. Pour obtenir un taux de recouvrement spécifique de l'échantillon, nous avons moyenné les taux calculés pour chaque niveau d'ajout. Lorsque le coefficient de variation de ce taux est inférieur à 5 %, il est possible d'appliquer une correction de ce biais sur l'ensemble des mesures. Autrement dit, si tous les ajouts effectués sur un échantillon présentent un effet matrice similaire, il est possible de le corriger.

$$\text{Recouvrement (\%)} = \frac{\text{Valeurmoyajout}}{\text{Valeurableajout}}$$

Domaine de validité : caractériser la technique

Le profil d'exactitude nous permet de déterminer le domaine de validité qui englobe les différentes matrices et concentrations d'ajouts où les résultats sont considérés comme valides. Une limite d'acceptabilité de $\pm 20\%$ par rapport à la valeur cible est définie pour la détermination des minéraux dans les produits alimentaires (Afnor, 2014 ; FDA, 2019). En parallèle, un intervalle de tolérance β contenant en moyenne 80 % des mesures réalisées est utilisé.

Le profil d'exactitude permet de visualiser graphiquement la validité des niveaux d'ajouts dans chaque matrice pour l'élément analysé. Ainsi, la LOQ de la méthode est définie comme la concentration à laquelle l'une des bornes de l'intervalle de tolérance croise l'une des limites d'acceptabilité. Elle est calculée en déterminant l'abscisse du point d'intersection entre les deux lignes et est obtenue par extrapolation en utilisant la pente de la droite entre les niveaux d'ajout où l'intersection a été trouvée (Feinberg et Laurentie, 2010).

Fidélité : mesurer l'incertitude et établir un seuil de discrimination

La réalisation d'un test de fidélité permet d'estimer la dispersion des résultats obtenus pour chaque niveau d'ajout. La fidélité de chaque mesure est évaluée en prenant en compte la variation des mesures effectuées au sein d'une même série (répétabilité) et entre différentes séries d'analyses (fidélité intermédiaire).

Ainsi, nous calculons la somme des carrés des écarts intrasérie (SCE_i) et intersérie (SCE_b) pour ensuite déterminer la variance de la répétabilité intrasérie (Sr^2) et la variance de la fidélité intermédiaire entre séries (Sb^2) du niveau d'ajout. Les formules utilisées sont les suivantes :

$$S_r^2 = \frac{SCE_i}{IK-K} \quad S_b^2 = \frac{SCE_b - Sr^2}{K-1}$$

L'écart type de la fidélité intermédiaire de calcul (SFI) est obtenu en prenant la racine carrée de la somme de Sr^2 et Sb^2 :

$$S_{FI} = \sqrt{Sr^2 + Sb^2} \quad (4)$$

I le nombre de répétitions (4), K nombre de séries (4), IK nombre total de mesures (16).

L'évaluation des écarts types permet de déterminer l'incertitude de mesure, qui révèle la variabilité des résultats en prenant en compte toutes les sources de variation (Andanson *et al.*, 2019). Cela inclut la préparation des échantillons et leur nature. Cette incertitude est spécifique au laboratoire, à la matrice analysée et à l'analyte mesuré. En reliant l'incertitude aux concentrations dans chaque matrice spécifique, nous pouvons identifier des seuils de discrimination pour chaque matrice et chaque niveau d'ajout. Cela nous permet de vérifier l'applicabilité de la technique dans divers contextes d'analyse.

Résultats

Linéarité

Les résultats illustrés dans la figure 2 démontrent une excellente linéarité entre 0 et 2,5 mg/L pour les éléments traces, ce qui correspond à une plage de validation allant de 0 à 50 mg/100 g MS. En ce qui concerne les éléments majeurs, le magnésium ne suit pas un modèle de régression linéaire, mais polynomiale valide jusqu'à 20 mg/L, soit 400 mg/100 g MS. Le calcium présente une linéarité jusqu'à 10 mg/L, soit 200 mg/100 g MS, au-delà de quoi le signal du MP-AES est saturé. Les échantillons de validation 5 et 6 ne pourront donc pas être utilisés pour la détermination du calcium, ce qui limite la validité de la technique multiélémentaire à une plage située entre 0 et 16 mg/100 g MS pour les éléments traces et 0 et 200 mg/100 g MS pour les éléments principaux.

La linéarité moyenne pour les ajouts effectués dans les différents échantillons, présentée dans le tableau 4 ci-dessous, confirme la plage de validation mentionnée précédemment. On constate une perte importante de linéarité pour les ajouts d'éléments traces dans les échantillons 5 et 6 très riches en Fer et en Zinc, ainsi que pour les ajouts de magnésium dans l'échantillon 6. Toutefois, un coefficient de corrélation satisfaisant est observé dans les échantillons de validation 1 à 4 pour tous les éléments.

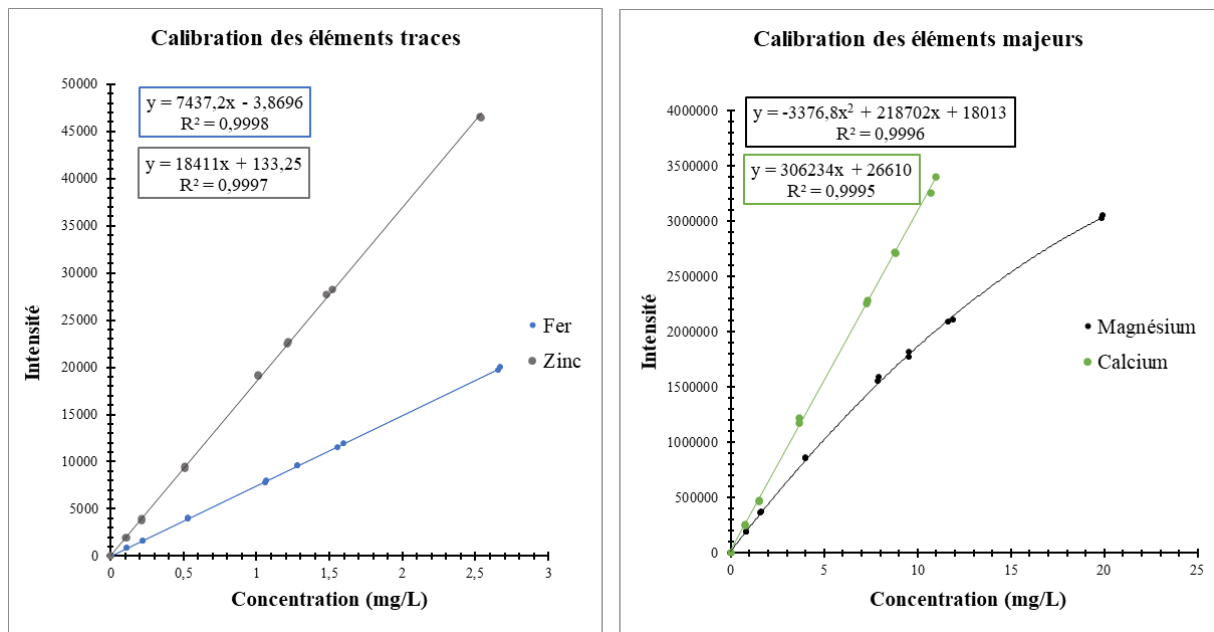


Figure 2. Courbes d'étalonnage externes pour le fer, le zinc, le calcium et le magnésium.

Spécificité

Les résultats des taux de recouvrement présentés dans le tableau 5 révèlent des effets liés à la composition de la matrice, notamment pour le fer, le zinc et le magnésium. On constate un biais systématique sur chaque échantillon, qui varie en fonction de la teneur en éléments (complexité) de la matrice. Pour le magnésium, on observe une sous-estimation des mesures avec une augmentation du biais en fonction de la complexité de l'échantillon. A contrario, on constate une surestimation des mesures pour le fer.

Au sein même de chaque échantillon, les taux de récupération par ajouts sont similaires avec un coefficient de variation < 5 %. L'effet de la matrice est donc le même pour chaque niveau d'ajout réalisé. Cela suggère la possibilité d'appliquer un facteur de correction pour compenser ces variations.

À titre d'exemple, la figure 3 ci-dessous illustre les profils d'exactitude de l'échantillon 3 pour chaque élément. Pour le zinc, malgré un léger biais, le profil se retrouve entièrement dans la zone de validation ce qui témoigne d'un effet matrice négligeable. L'application d'une correc-

Tableau 4 : Coefficient de corrélation moyen obtenu pour chaque échantillon de validation

Échantillon	Fer		Zinc		Calcium		Magnésium	
EV1	0,998	± 0,003	0,999	± 0,001	0,999	± 0,002	0,998	± 0,001
EV2	0,996	± 0,004	0,997	± 0,004	0,998	± 0,003	0,998	± 0,002
EV3	0,990	± 0,017	0,998	± 0,005	0,997	± 0,007	0,997	± 0,001
EV4	0,979	± 0,015	0,996	± 0,002	0,991	± 0,015	0,997	± 0,003
EV5	0,940	± 0,069	0,975	± 0,033			0,992	± 0,007
EV6	0,958	± 0,040	0,983	± 0,020			0,912	± 0,305

Tableau 5 : Taux de recouvrement (%) par échantillon et élément

Échantillon	Fe	Zn	Ca	Mg
EV1	106,643 ± 0,41	106,653 ± 0,06	103,760 ± 0,39	86,988 ± 0,04
EV2	102,361 ± 0,04	104,981 ± 0,02	105,279 ± 2,55	76,479 ± 0,02
EV3	108,333 ± 0,07	104,700 ± 1,12	108,631 ± 0,07	69,569 ± 0,31
EV4	109,921 ± 0,41	102,571 ± 0,29	103,268 ± 0,10	67,769 ± 0,04
EV5	109,251 ± 0,17	97,579 ± 0,34		61,578 ± 0,33
EV6	114,647 ± 0,15	88,2044 ± 0,15		55,235 ± 0,32

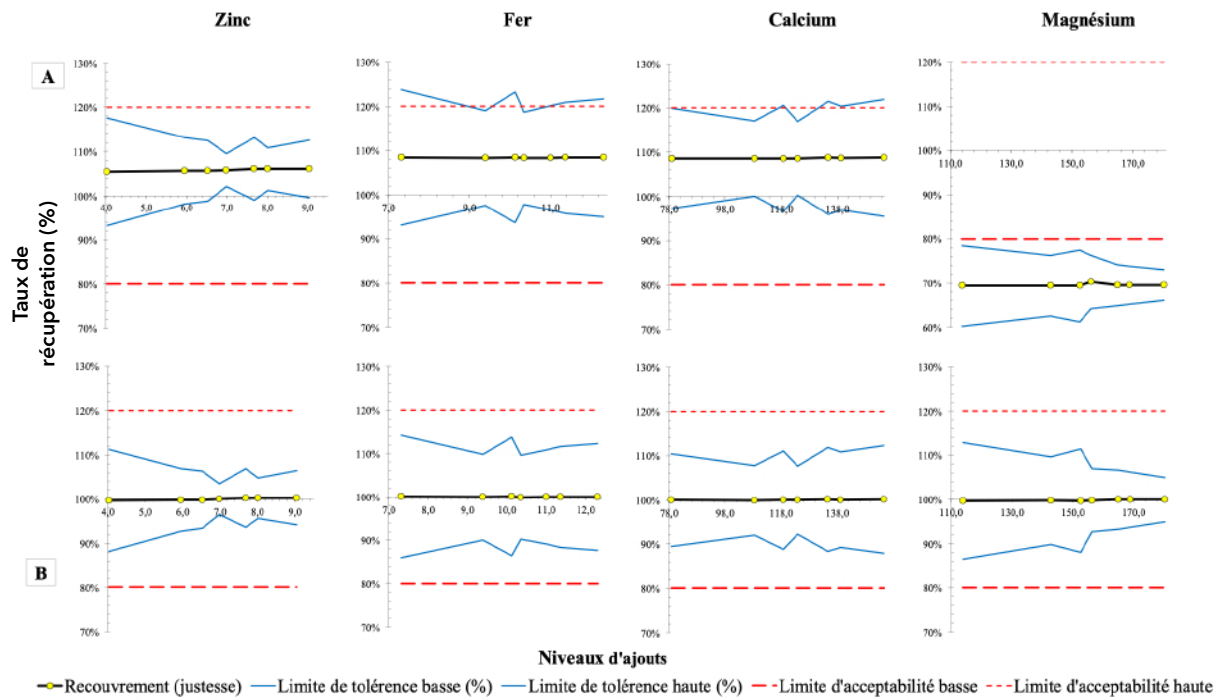


Figure 3. Profils d'exactitude du zinc, fer, calcium et magnésium dans l'échantillon de validation 3 :
A) avant correction du biais B) après correction du biais.

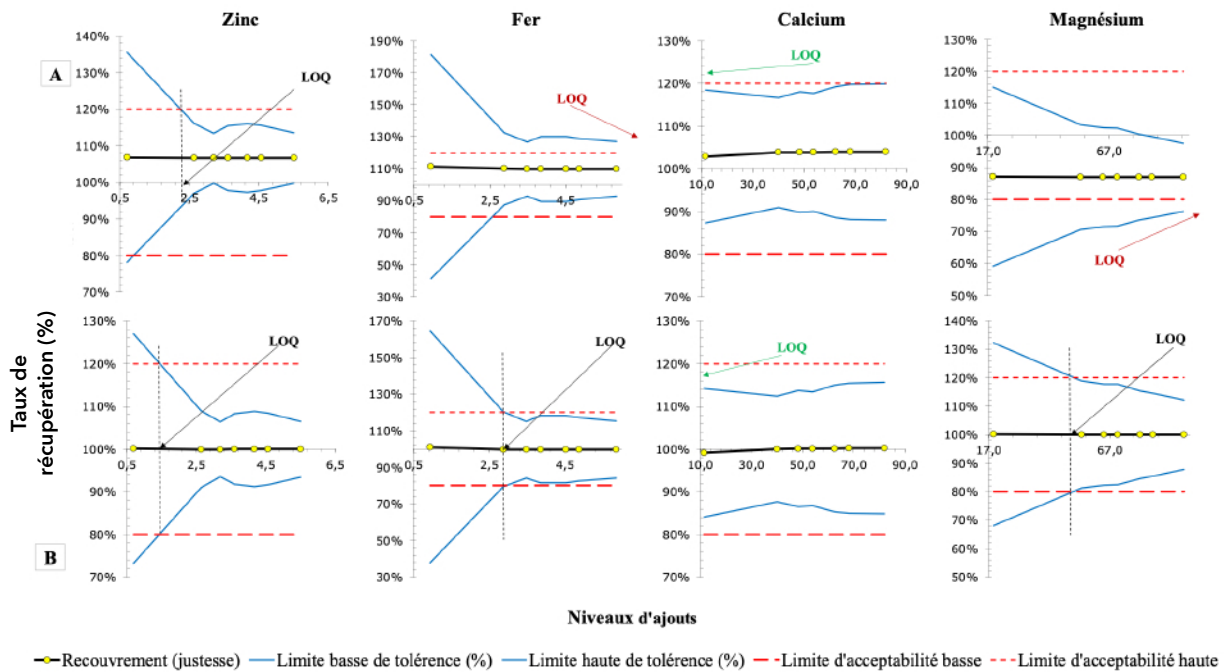


Figure 4. Profils d'exactitude du zinc, fer, calcium et magnésium dans l'échantillon de validation 1 :
A) avant correction du biais B) après correction du biais.

tion basée sur le biais systématique permet d'améliorer les performances de la méthode. En effet, avant cette correction, les mesures de fer, de calcium et de magnésium étaient en dehors de la plage de validité.

La technique des ajouts dosés est ainsi justifiée, car elle permet de mettre en place une correction du biais pour chaque résultat de mesure. Cette approche permet ainsi de corriger les variations systématiques et d'obtenir des résultats plus précis et fiables.

Domaine de validité

LOQ basse

Comme dans l'exemple précédent, la figure 4 ci-dessous met en évidence les améliorations des performances analytiques de la méthode grâce à la correction du biais systématique dans l'EV1. La limite de quantification est déterminée par l'intersection entre la ligne représentant la limite d'acceptabilité et celle de la limite de tolérance. Il est observé que, pour la plupart des minéraux étudiés, les concentrations retrouvées dans l'échantillon de validation 1 sont trop faibles pour être quantifiées de manière fiable et reproductible par le MP-AES. Après correction par le biais, on observe une amélioration des performances et une baisse des LOQ pour tous les éléments.

Le tableau 6 présente l'ensemble des limites de quantification avec ou sans correction du biais systématique. Le zinc présente une réduction de 51,2 % de sa LOQ, le fer une réduction de 87,3 %, le calcium une réduction de 52,8 % et le magnésium une réduction de 65,0 %. Ces facteurs de diminution indiquent que la correction du biais systématique permet d'améliorer considérablement la sensibilité de la méthode d'analyse.

Domaine de validation

L'analyse du tableau 7 met en évidence une nette amélioration des performances analytiques de la méthode après la correction du biais systématique. Avant cette correction, il était observé que les mesures de magnésium et de fer se situaient en dehors de la plage de validité de la méthode, ce qui remettait en question la fiabilité des résultats pour ces éléments. Après la correction du biais, les échantillons EV1, EV2, EV3 et EV4 présentent des domaines de validité étendus pour tous les éléments, y compris le magnésium et le fer.

Il a également été possible d'obtenir des résultats valides pour les échantillons E5 et E6 pour l'ensemble des éléments excepté le calcium. Cela étend le domaine d'application à des concentrations très élevées de la méthode dans l'optique où seuls le zinc, le fer et le magnésium auraient à être dosés.

L'utilisation de la correction du biais systématique a permis de surmonter les limitations initiales de la méthode et d'élargir son domaine de validité, offrant ainsi des résultats plus fiables et plus représentatifs des teneurs réelles des éléments étudiés.

Fidélité

Incertitude de mesure

La méthode est valide pour le fer, le zinc et le magnésium dans tous les échantillons, et jusqu'à l'échantillon 4 pour le calcium. Cependant, il est important de noter que chaque élément présente une incertitude de mesure spécifique (Figure 5). Les fonctions d'incertitude ont été tracées pour chaque élément et chaque matrice en fonction de la concentration. La figure 5 illustre ces fonctions d'incer-

Tableau 6 : Limites de quantifications calculées avant et après correction du biais échantillon

LOQ (mg/100 g MS)	Zinc	Fer	Calcium	Magnésium
Non corrigé	1,68	22,88	7,25	135,41
Corrigé	0,82	2,90	3,43	47,34

Tableau 7 : Domaine de validité de la méthode après correction par le biais échantillon

Échantillon	[Zn] mg/100 g MS		[Fe] mg/100 g MS		[Ca] mg/100 g MS		[Mg] mg/100 g MS	
	LOQb	LOQh	LOQb	LOQh	LOQb	LOQh	LOQb	LOQh
E1	0,82	5,55	2,90	5,85	3,43	82,25	47,34	97,56
E2	2,24	7,10	4,17	8,07	37,83	110,75	59,43	132,41
E3	4,02	9,08	7,33	12,31	78,97	154,90	113,50	180,17
E4	11,52	16,64	12,10	17,98	137,89	208,40	132,87	194,43
E5	22,58	28,05	22,94	29,37			198,49	249,57
E6	32,01	37,06	24,80	30,36			258,43	298,46
Domaine de validité global	0,82	37,00	2,90	30,36	3,43	208,40	47,34	298,46

titude pour les éléments dans les trois premiers échantillons de validation. Au regard des coefficients de régression calculés, il est intéressant de constater que l'incertitude observée est corrélée à la concentration en fer, zinc et magnésium. Sur les très faibles concentrations, l'incertitude est très élevée, ce qui correspond aux LOQ identifiées.

Lorsque la teneur en fer et en zinc dépasse 5 mg/100 g, elle se stabilise avec pour le zinc une incertitude moyenne d'environ 9 %, tandis que pour le fer, elle est d'environ 16 %. Ceci se vérifie sur les échantillons 4 à 6 (non présentés).

En ce qui concerne le calcium, son incertitude ne semble pas être expliquée par la concentration, comme en témoigne un coefficient de détermination de seulement 0,2762, ce qui indique que d'autres facteurs peuvent influencer son incertitude relative. L'incertitude moyenne du calcium est d'environ 14,32 %, avec une variation de 27 % entre les niveaux des échantillons.

Ces résultats mettent en évidence la relation complexe entre la concentration et l'incertitude de mesure pour

chaque élément analysé. Il est important de prendre en compte cette relation lors de l'interprétation des résultats et de considérer d'autres facteurs qui peuvent influencer l'incertitude.

Seuil de discrimination

La fonction d'incertitude permet de vérifier si la méthode est en mesure de différencier les concentrations d'un même élément de deux échantillons en calculant le seuil de discrimination. Cela permet de déterminer si les valeurs obtenues pour chaque échantillon et élément peuvent être distinguées les unes des autres. L'analyse des seuils de discrimination obtenus à partir des différents échantillons confirme la capacité de la méthode à différencier ces échantillons entre eux. Cela est mis en évidence par la figure 6 ci-dessous, qui présente les seuils de discrimination obtenus lors de la mesure du zinc pour le premier ajout de chaque échantillon de validation.

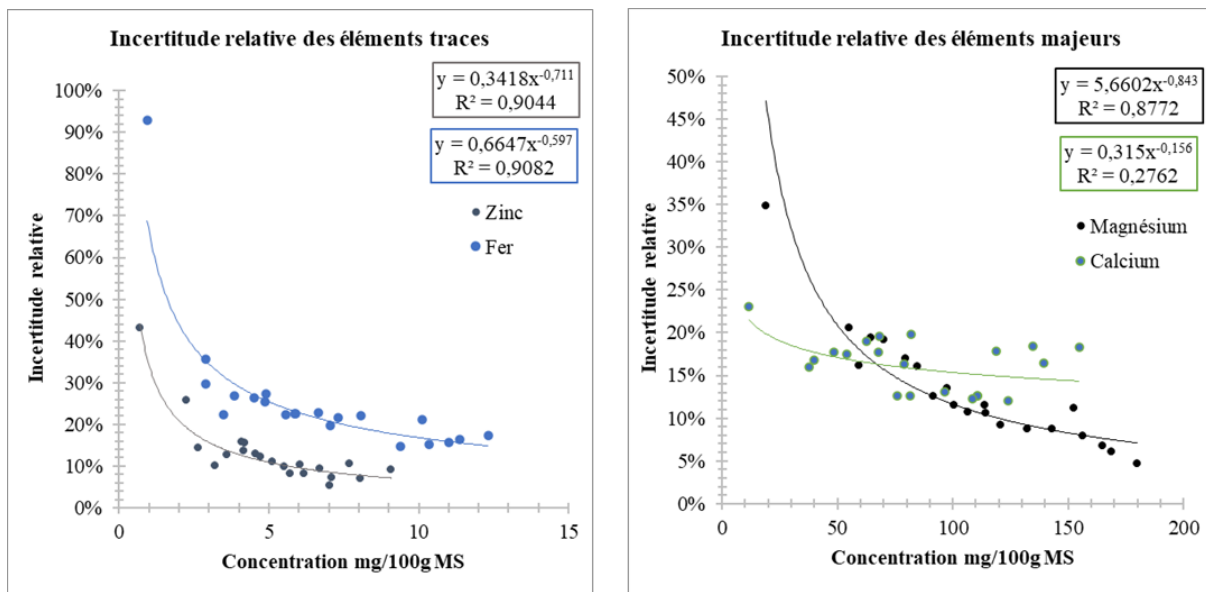


Figure 5. Incertitude relative en fonction du niveau de concentration en élément pour les échantillons de validation EV1-

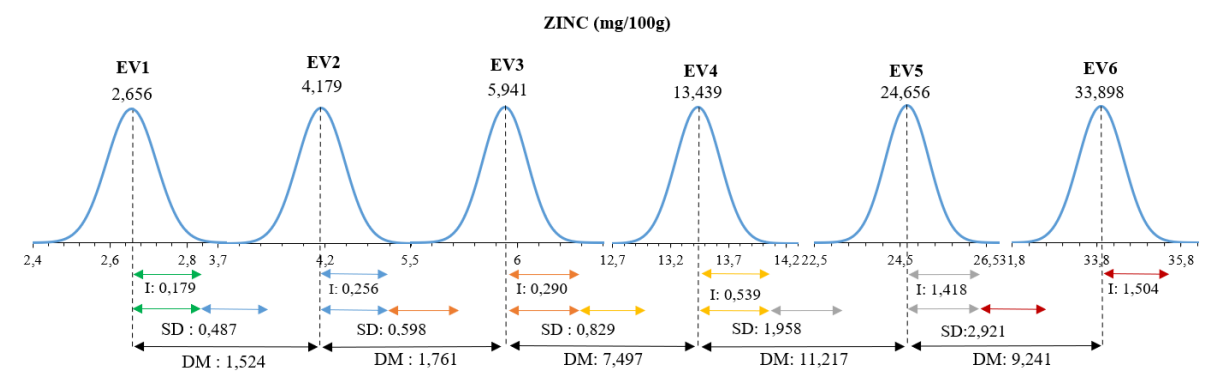


Figure 6. Représentation schématique de la discrimination des échantillons de validation pour le zinc.

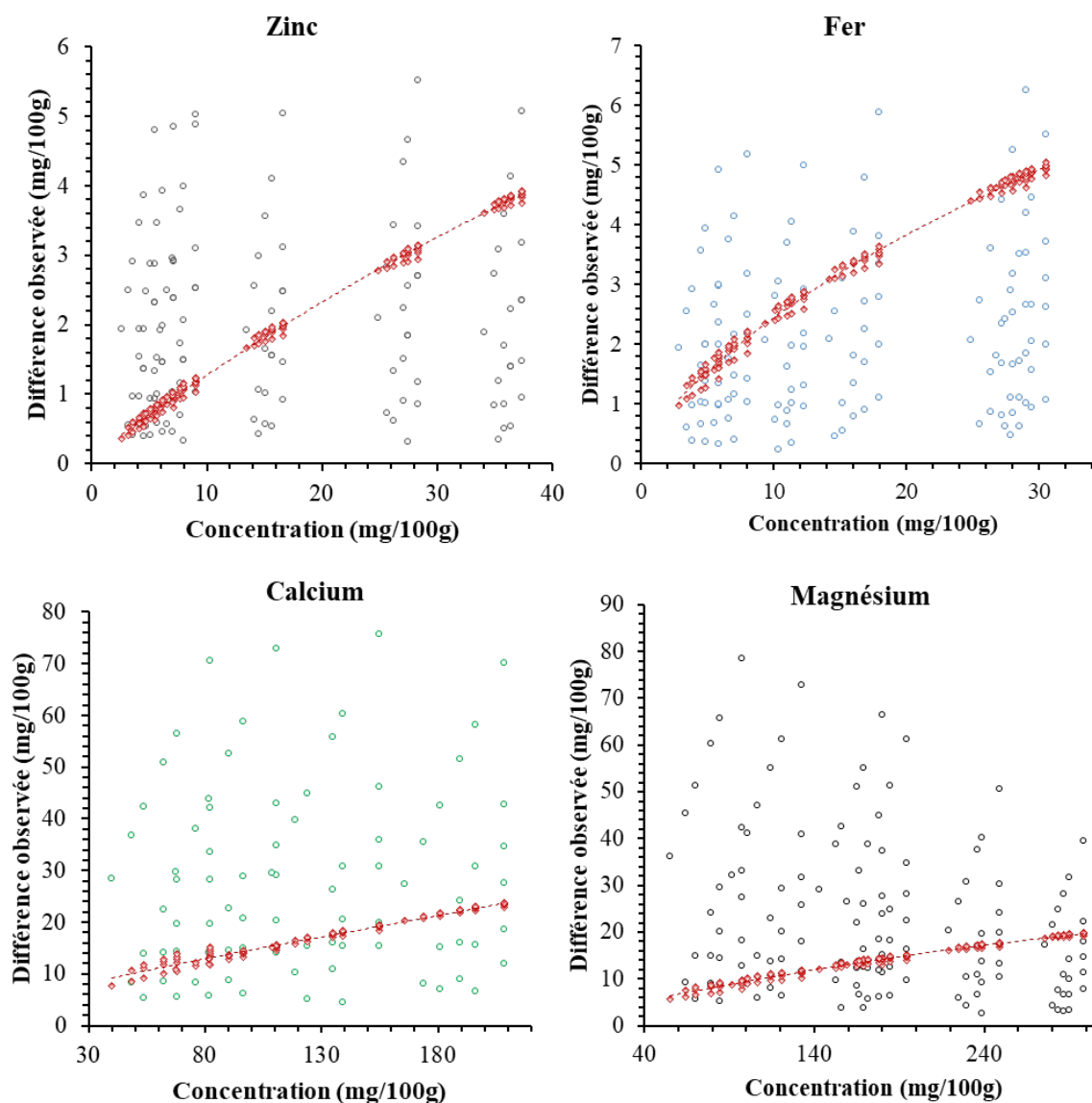


Figure 7. Relation entre la concentration en éléments et la différence induite par l'ajout dosé (\circ) et seuils de discrimination (\diamond).

Il est également possible de déterminer si les points d'ajouts au sein d'un même échantillon peuvent être distingués. Cela permet d'optimiser la concentration des ajouts à chaque type de matrice. Nous avons calculé les seuils de discrimination en comparant deux à deux chacune des mesures. La variation de la mesure résultant de l'ajout dans l'échantillon doit être supérieure au seuil de discrimination calculé. L'objectif est donc de déterminer si les ajouts effectués dans la matrice d'échantillon peuvent être considérés comme statistiquement différents les uns des autres. La figure 7 présente les différentes variations d'ajouts ainsi que les seuils de discrimination calculés pour chaque variation. Les ajouts situés au-dessus du seuil de discrimination peuvent être distingués, tandis que ceux situés en dessous ne le peuvent pas.

L'analyse des graphiques révèle que des ajouts identiques ne peuvent pas être utilisés pour déterminer à la fois des concentrations très faibles et très élevées des éléments traces. Ces résultats peuvent être comparés à la perte de linéarité observée pour les ajouts effectués dans les échantillons EV5 et EV6. En effet, la méthode ne permet pas de différencier de faibles ajouts dans une matrice fortement concentrée. En revanche, pour les échantillons EV1, EV2, EV3 et EV4, les ajouts peuvent être différenciés avec succès. Les seuils de discrimination, exprimés en pourcentage de la valeur finale, varient selon les éléments analysés, avec une moyenne de 12 % pour le zinc, 23 % pour le fer, 8 % pour le magnésium et 14 % pour le calcium. Les ajouts doivent donc être adaptés en fonction de la matrice et de la concentration cible.

Les quantités ajoutées en tant qu'éléments traces dans la méthode développée sont de 0,1 ; 0,15 et 0,2 mg/L, équivalant à 2, 3 et 4 mg/100 g pour un échantillon de 5 g/L. Ces valeurs sont appropriées pour des échantillons dont les concentrations en zinc se situent entre 0 et 16 mg/100 g, et en fer entre 0 et 8 mg/100 g. Les ajouts doivent être adaptés aux concentrations retrouvées dans les échantillons pour permettre une bonne extrapolation du résultat. Il serait donc judicieux d'augmenter la concentration des ajouts de fer à 0,15 ; 0,2 et 0,16 mg/L pour étendre la détermination des échantillons entre 0 et 16 mg/100 g.

Concernant les éléments principaux, les quantités ajoutées dans la méthode sont de 1,75 ; 2,625 et 3,5 mg/L, ce qui correspond à 35, 52,5 et 70 mg/100 g respectivement dans l'échantillon initial. Ces ajouts sont donc compatibles avec toute la plage de concentrations étudiée (0-220 mg/100 g), à condition que la linéarité soit maintenue.

Conclusion

L'analyse des profils d'exactitude a permis de mettre en évidence et de corriger les biais liés à des effets matrices spécifiques de l'échantillon. Étant donné que l'effet matrice est singulier à l'échantillon, il est essentiel d'appliquer systématiquement la technique des ajouts dosés pour ce type de dosage. Cela nous conforte donc dans la nécessité d'utiliser la technique des ajouts dosés pour l'analyse simultanée des éléments traces et principaux dans les repas. La correction du biais améliore les performances de la méthode, notamment les limites de quantification (LOQ) et la plage de validation.

Le dosage a été validé dans une plage de concentrations allant de 3 à 30 mg/100 g pour les éléments traces, et de 50 à 200 mg/100 g pour les éléments principaux. Le domaine de validité de la méthode la rend applicable à la plupart des repas complets, dont les concentrations

varient généralement de 50 à 160 mg/100 g pour le calcium et le magnésium, et de 3 à 15 mg/100 g pour les éléments traces.

Dans le domaine de validité de la méthode, l'incertitude de mesure est acceptable (de 9 % à 16 % selon les éléments) ; elle est principalement due à l'hétérogénéité des échantillons et à leur préparation. Il est donc crucial de veiller à ce que les échantillons soient traités par lyophilisation puis broyage afin d'obtenir un mélange le plus homogène possible. Une attention particulière doit également être accordée au traitement des consommables, tels que le nettoyage à l'acide nitrique, le séchage dans un environnement propre et exempt de minéraux à déterminer, ainsi que l'utilisation de réactifs de qualité ultrapure. Concernant notre méthode originale, et afin de tenir compte des seuils de discrimination pour les ajouts définis, le domaine de validité doit être restreint pour les éléments traces (0-16 mg/100 g).

Il reste recommandé d'estimer, par exemple grâce à la table Ciqua, la concentration des échantillons avant le dosage afin d'ajuster au mieux les ajouts. En règle générale, ces derniers doivent être au minimum de 12 % de la valeur estimée pour le zinc, 23 % pour le fer 8 % pour le magnésium et 14 % pour le calcium, et rester dans le domaine de validité.

Pour les échantillons situés en dessous des limites de quantification de la méthode, il est conseillé d'utiliser une technique de détermination plus sensible telle que l'ICP-MS. En effet, l'incertitude liée à la mesure est plus élevée dans ces plages de concentrations pour une quantification par MP-AES et les valeurs ne peuvent être discriminées. ■

Remerciements

Les auteurs remercient tout particulièrement Stéphane Andanson (Réseau Mesures-Métrologie-Méthodes du Domaine Management par la Qualité) pour ses précieux conseils.

Références

- Afnor (2007). *Vocabulaire international de métrologie : Concepts fondamentaux et généraux et termes associés (VIM)*. ISO/CEI 99:2007. Afnor, 2007.
- Afnor (2010). *Analyse des produits agricoles et alimentaires : Protocole de caractérisation en vue de la validation d'une méthode d'analyse quantitative par construction du profil d'exactitude*. NF V03-110:2010. Afnor, 2010.
- Afnor (2014). *Produits alimentaires. Dosage des éléments traces. Digestion sous pression*. NF EN 13805. Afnor, 2014.
- Agilent (2021). How to choose the right atomic spectroscopy technique: To meet your lab's needs both now and in the future. Agilent, 40. https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/primer-atomic-spectroscopy-selection-5994-4048en-agilent.pdf?utm_source=LinkedIn&utm_medium=Social&utm_campaign=ATO_FY21_PFOILIO&utm_content=eBook1
- Andanson S., Delahaye Q., Ravel C. et al. (2019). De nouveaux critères de sélection des méthodes quantitatives d'analyse fondés sur l'incertitude de mesure : Application à une méthode HPLC d'analyse des catécholamines. *Cahier des Techniques de l'INRA*, 96 (3), 1-19.
- Korn M. D. G. A., da Boa Morte E. S., Batista Dos Santos D., et al. (2008). Sample preparation for the determination of metals in food samples using spectroanalytical methods: a review. *Applied Spectroscopy Reviews*, 43 (2), 67-92. <https://doi.org/10.1080/05704920701723980>
- Anses (2019). *Actualisation des repères du PNNS : élaboration des références nutritionnelles*. <https://hal.science/anses-04314523v1>
- Balaram V. (2020). Microwave plasma atomic emission spectrometry (MP-AES) and its applications: a critical review. *Microchemical Journal*, 159, 105483. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105483>
- Cutillas L., López-Fernández O., Domínguez R., et al. (2022). Mineral Profile. In : Lorenzo J. M., Domínguez R., Pateiro M., et al. (éd.). *Methods to assess the quality of meat products*. Humana, 2022, 73-83. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2002-1_7
- Danzer K., Currie L. A. (1998). Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part I: Fundamentals and single component calibration (IUPAC Recommendations 1998). *Pure and Applied Chemistry*, 70 (4), 993-1014. <https://doi.org/10.1351/pac199870040993>
- Ellison S. L. R., Thompson M. (2008). Standard additions: myth and reality. *The Analyst*, 133 (8), 992. <https://doi.org/10.1039/b717660k>
- Food and Drug Administration (FDA) (2019). Guidelines for the validation of chemical methods for the FDA foods program. FDA. <https://www.fda.gov/media/81810/download>
- Foster M., Chu A., Petocz P., et al. (2013). Effect of vegetarian diets on zinc status: a systematic review and meta-analysis of studies in humans: Zinc and vegetarian diets. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93 (10), 2362-2371. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6179>
- Huyez-Levrat M., Feinberg M., Laurentie M. (2010). Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude. *Le cahier des techniques de l'INRA*.
- Krejčová A., Černohorský T., Meixner D. (2007). Elemental analysis of instant soups and seasoning mixtures by ICP-OES. *Food Chemistry*, 105 (1), 242-247. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.11.005>
- Loi n° 2018-938 (2018). Loi n° 2018-938 du 30 octobre 2018 pour l'équilibre des relations commerciales dans le secteur agricole et alimentaire et une alimentation saine, durable et accessible à tous (1). JORF n° 0253 du 1 novembre 2018. <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000037547946/>
- Loi n° 2021-1104 (2021). Loi no 2021-1104 du 22 août 2021 portant lutte contre le dérèglement climatique et renforcement de la résilience face à ses effets (1). JORF n° 0196 du 24 août 2021. <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000043956924>
- Miketinas D., ChampAGNE C. (2022). The vegetarian/flexitarian diets. In : Wilson T., Temple N. J., Bray G. A. (éd.), *Nutrition guide for physicians and related healthcare professions*. Humana, 2022, 181-191. https://doi.org/10.1007/978-3-030-82515-7_17
- Pelipasov O. V., Polyakova E. V. (2020). Matrix effects in atmospheric pressure nitrogen microwave induced plasma optical emission spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 35 (7), 1389-1394. <https://doi.org/10.1039/DOJA00065E>
- Perignon M., Barré T., Gazan R., et al. (2018). The bioavailability of iron, zinc, protein and vitamin A is highly variable in French individual diets: Impact on nutrient inadequacy assessment and relation with the animal-to-plant ratio of diets. *Food Chemistry*, 238, 73-81. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.070>
- Polyakova E. V., Nomerotskaya Y. N., Saprykin A. I. (2020). Effect of matrix element and acid on analytical signals in nitrogen microwave-plasma atomic emission spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry*, 75 (4), 474-478. <https://doi.org/10.1134/S1061934820040115>
- Sewawa K., Mosekiemang T., Dintwe K., et al. (2023). Comparison of internal standard and standard additions calibration procedures for the determination of selected heavy metals in treated municipal effluent by MP-AES. *Results in Chemistry*, 5, 100907. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2023.100907>
- Thaler K. M., Schwartz A. J., Haisch C., et al. (2018). Preliminary survey of matrix effects in the Microwave-sustained, Inductively Coupled Atmospheric-pressure Plasma (MICAP). *Talanta*, 180, 25-31. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.12.021>
- Zhu Y., Chiba K. (2012). Internal standard method coupled with a gravimetric standard addition method for elemental measurements by ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 27 (6), 1000. <https://doi.org/10.1039/C2JA30048F>



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>.

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « NOVAE », la date de sa publication et son URL.