

Libellé de l'UE : Métrologie et chimométrie UEM02

Enseignant responsable de la matière: BENYAHIA Azzedine

Cours N°3

III.1 Validation des méthodes d'analyse

Définition

La validation est l'ensemble des opérations effectuées en vue de prouver qu'une procédure est suffisamment exacte et fiable pour avoir confiance dans les résultats fournis pour l'usage prévu (de la méthode de dosage). Pour la mesure, on dispose d'un très grand nombre de méthodes. La méthode choisie pour l'étape de traitement de l'échantillon analytique est liée au choix de la méthode d'analyse, la réflexion devra donc simultanément porter sur ces deux étapes,

Le choix des conditions opératoires dépend :

- de l'analyte,
- de la matrice,
- de la méthode de mesure,
- du laboratoire.

La majeure partie de l'erreur analytique provient de l'étape de traitement de l'échantillon.

III.2 Classification des méthodes d'analyse :

Il existe deux types de méthodes d'analyse, des méthodes classiques et des méthodes instrumentales.

III.2.1 Les méthodes classiques :

Les analyses sont réalisées en séparant les composants d'intérêts (analytes) de l'échantillon par Précipitation, extraction ou distillation. Pour les analyses qualitatives, les composants séparés sont traités après avec des réactifs qui donnent lieu à des produits pouvant être identifiés par leurs couleurs, leurs températures d'ébullitions ou fusion, leurs solubilités, leurs activités optiques ou indices de réfraction. Par contre, dans l'analyse quantitative, la quantité d'analyte est déterminée par mesure gravimétriques ou volumétriques. Dans les mesures gravimétriques, la masse de l'analyte est déterminée. Dans les mesures volumétriques appelées aussi titrimétrie, le volume ou la masse d'un réactif standard nécessaire pour réagir complètement avec l'analyte est mesuré. L'usage de ces méthodes est en voie de diminution, vu l'apparition des méthodes instrumentales.

Exemples de méthodes d'analyse classiques utilisées dans l'analyse des aliments:

- La méthode Kjeldhal ;

- La méthode Soxhlet ;
- La méthode de Gerber ;
- La méthode de Charpentier-Volhard ;
- La méthode de Bertrand ;
- La dessiccation et le séchage à 102 °C ;
- L'incinération (pour la détermination de la teneur en cendres).

III.2.2 Les méthodes instrumentales:

Les méthodes instrumentales permettent la quantification directe de l'analyte avec les détecteurs. L'instrument d'analyse traduit les informations contenues dans les propriétés physiques et chimiques de l'analyte en des résultats manipulables et interprétables par l'opérateur (l'analyste). On citera quelques méthodes d'analyses instrumentales :

- HPLC ;
- Spectrométrie de masse ;
- UV-Visible ;
- IR ;
- ICP-MS et bien d'autres.

Récemment, une nouvelle stratégie de validation basée sur le profil d'exactitude a été introduite. Elle est en parfait accord avec l'objectif d'une méthode analytique, à savoir sa capacité de quantifier le plus exactement possible chacune des quantités inconnues qu'un laboratoire aura à déterminer. A ce stade, il est important de définir certains termes fréquemment rencontrés en validation.

La justesse : exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série homogène de résultats d'essais et une valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie, soit comme une valeur de référence acceptée. La mesure de la justesse est généralement exprimée en termes de recouvrement et de biais absolu ou relatif (erreur systématique)(équation (1)) . Une valeur conventionnellement vraie peut être par exemple un étalon international, un étalon d'une pharmacopée.

$$\text{Justesse (\%)} = 100 (\%) - \text{Erreur relative (\%)} \quad (1)$$

$$\text{Erreur relative (\%)} = \frac{V_0 - V_s}{V_s} \times 100$$

Avec :

V_0 : moyenne des valeurs observées ;

Vs : valeur suggérée.

La fidélité : exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites. La fidélité fournit une indication sur les erreurs liées au hasard. Elle peut être évaluée à trois niveaux, à savoir la répétabilité, la fidélité intermédiaire et la reproductibilité. La reproductibilité n'est envisagée que dans le cas d'étude inter-laboratoires.

□ **La répétabilité :**

Elle représente l'étroitesse de l'accord entre les résultats d'essais indépendants obtenus avec la même méthode, sur un même échantillon homogène, dans le même laboratoire, par le même opérateur utilisant le même matériel et dans un court intervalle de temps.

□ **La reproductibilité :**

Elle considère les résultats obtenus avec une même méthode et sur un même échantillon homogène, mais dans des laboratoires différents et par différents opérateurs utilisant différents équipements.

L'exactitude : exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée « valeur conventionnellement vraie ». L'étroitesse d'accord ainsi observée est la résultante de la somme des erreurs systématiques et aléatoires, en d'autres termes l'erreur totale liée au résultat. La nouvelle stratégie de validation permet d'associer les deux éléments fondamentaux de la validation que sont la justesse et la fidélité au résultat final d'une mesure, et par conséquent de tenir compte de l'erreur totale de mesure (erreur systématique + erreur aléatoire). Le principe de cette stratégie de validation peut être traduite par l'équation (2) qui stipule que la différence entre une mesure (x) et sa vraie valeur (μ) doit être inférieure à la limite d'acceptation (λ) définie *a priori*.

$$-\lambda < x - \mu < \lambda \Leftrightarrow x - \mu < \lambda \quad (2)$$

La notion de limite d'acceptation introduit donc un premier critère permettant à l'analyste de prendre des décisions basé sur l'objectif de la méthode analytique. Communément, la limite d'acceptation est de 1% ou 2 % pour le dosage de principes actifs dans une matière première, de 5 % pour les formes pharmaceutiques et de 15 % pour les analyses dans les matrices biologiques ou environnementales. Pour la détermination des impuretés, une limite d'acceptation minimale de 10 % est communément admise. Le profil d'exactitude est construit à partir des estimés de l'intervalle de tolérance d'espérance β de mesures attendues à chaque niveau de concentration. Une autre notion importante définie est celle de « bonne procédure analytique » avec un risque connu qui peut se traduire par la relation suivante :

$$\Pr[x - \mu > \lambda] \leq \beta \quad (3)$$

avec β la proportion de mesures dans les limites d'acceptation, et λ la grandeur définissant les limites d'acceptation fixées *a priori* en fonction des contraintes du secteur d'activité. Le risque associé d'une procédure s'évalue par la proportion attendue de mesures en dehors des limites d'acceptation. Le risque associé dépend des estimés du biais et de la précision de la procédure analytique obtenus en phase de validation comme le montre la figure (1). Précisons dès à présent que dans le cadre de notre travail nous avons considéré qu'une « estimation » est un moyen par lequel on obtient une valeur qui est l'« estimé ». La formule qui est appliquée pour obtenir cet estimé est quant à elle l'« estimateur ».

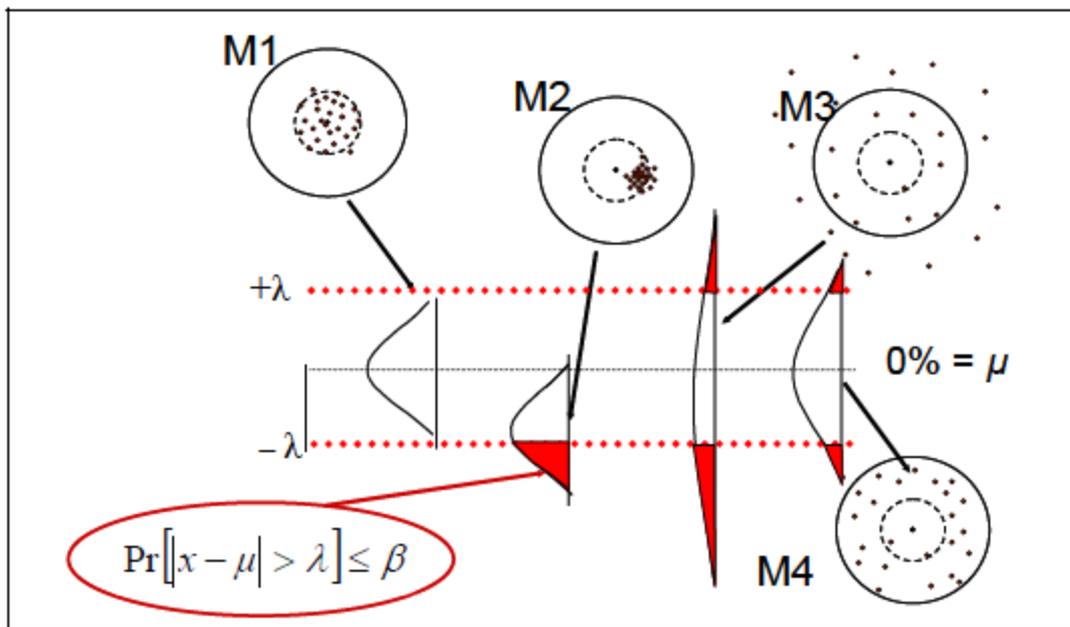


Fig.1 Profil d'exactitude comme outil de décision pour quatre méthodes ;
M1 : Fidèle et juste, M2 : Fidèle mais non juste, M3 : Non fidèle et non juste, M4 : Non fidèle mais juste.

La figure (2) représente la comparaison schématique entre la justesse, exactitude et fidélité.

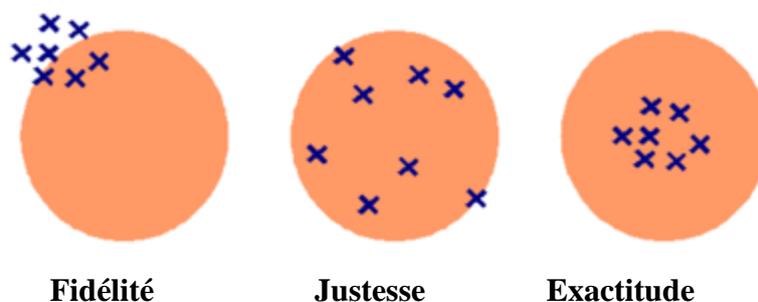


Fig.2 comparaison schématique entre la justesse, exactitude et fidélité.

Ainsi, le profil d'exactitude est un outil de décision basée sur le risque associé à la méthode. La notion de risque est liée à la garantie concernant la future analyse des échantillons inconnus tout en appliquant la méthode validée. Par conséquent, le profil d'exactitude peut servir à accepter ou rejeter une méthode analytique suivant l'usage attendu. Par ailleurs, le profil peut également être utilisé comme outil de diagnostique. Par exemple, il peut être utilisé pour sélectionner le modèle de régression le plus approprié pour la calibration et pour déterminer les limites de quantification supérieure et inférieure et à sélectionner ainsi que l'intervalle de dosage. Une troisième notion relative à cette nouvelle stratégie de validation importante dans le cadre de notre travail est sa possibilité d'estimer l'incertitude de mesure sur la base des données de validation.

III.3. Pourcentage de récupération:

Le pourcentage de récupération permet d'identifier la présence d'interférence dans un échantillon lors du processus d'analyse. Il correspond à la différence (en pourcentage) entre la concentration mesurée d'un échantillon fortifié et la concentration mesurée du même échantillon non fortifié, divisée par la concentration de la substance ajoutée. Ce rapport tient compte de la transformation chimique qui s'est produite, s'il y a lieu. Un minimum de cinq essais est demandé pour l'évaluation d'une méthode d'analyse. Dans la zone quantifiable de la méthode cinq échantillons réels sont analysés. Ajouter une concentration d'au moins 50 % et d'au plus 100 % de la concentration réelle de la substance à doser. En l'absence de contaminants dans les échantillons réels, le pourcentage de récupération peut être calculé en ajoutant à ces derniers une concentration de la substance à doser se situant entre 3 et 10 fois la LD. Le pourcentage de récupération est calculé à partir de la formule suivante :

$$\text{Récupération} = \frac{c_f - c}{c_a} \times 100$$

Avec : f_c : concentration mesurée de l'échantillon fortifié ;

C : concentration mesurée de l'échantillon non fortifié ;

C_a : concentration de la substance ajoutée.

III.4 La robustesse:

Elle caractérise le fait qu'une légère modification des conditions expérimentales (température, pH, débit...) ne modifie que très peu la réponse mesurée. Cette propriété est très intéressante si plusieurs opérateurs doivent intervenir pour réaliser une même série d'analyses dans le même laboratoire. Ainsi, une méthode non affectée par des changements dans les paramètres expérimentaux, est dite méthode robuste. La robustesse permet aussi d'identifier les conditions expérimentales optimales de la méthode. Ce test est réalisé en prenant en

considération chaque paramètre séparément ou en variant plusieurs paramètres à la fois, lorsqu'il s'agit d'un grand nombre d'effet à étudier. Ceci peut être réalisé par dessin factoriel.

III.5 La spécificité:

La spécificité de la méthode d'analyse renseigne sur le fait que la réponse mesurée n'est pas perturbée par des espèces physicochimiques autres que l'analyte considéré. L'application d'une méthode d'analyse spécifique n'exigera donc pas de prendre des précautions particulières si la matrice a été modifiée. Si la méthode de mesure est spécifique, l'étape de traitement de l'échantillon sera très allégée avec un gain de temps et une forte diminution des causes d'erreurs.

III.6 La rapidité:

La rapidité de la méthode et son aptitude à l'automatisation représentent aussi deux critères essentiels pour pouvoir diminuer le délai de réponse et du coût.

En conclusion, le choix d'une méthode d'analyse exige de considérer l'ensemble des propriétés qui la caractérisent, dans le but d'optimiser chaque fois le rapport coût sur bénéfice.

III.7 Validation d'une méthode d'analyse choisie par le laboratoire :

Tout laboratoire, lorsqu'il doit pratiquer de grandes séries d'analyses, va choisir en fonction de ces objectifs et moyens dont il dispose, sa propre méthode. Cette dernière peut être de référence ou une méthode qui serait éventuellement retenue pour trancher en cas de litige. La validation est devenue un élément majeur pour la démonstration de la compétence des laboratoires accrédités. Afin de prendre en compte la spécificité des activités de laboratoire et la diversité de leurs domaines d'application, il existe au moins quatre référentiels principaux qui expliquent comment organiser l'assurance de la qualité au laboratoire:

- **Les Bonnes pratiques de laboratoire (BPL)** s'appliquent à l'étude et au développement de molécules chimiques, médicaments, des pesticides et toute substance nouvelle ;
- **Le Guide de bonne exécution des analyses (GBEA)** précise comment doit fonctionner le système d'assurance de la qualité d'un laboratoire d'analyse de biologie médicale ;
- **L'accréditation** suit les principes de la norme ISO 17025 et permet d'assurer la compétence d'un laboratoire qui applique un ensemble de recommandations NF EN ISO/CEI 17025:2005, (NF X 50-061) ;
- **La certification de service** s'appuie sur les normes ISO 9000 et s'applique à une entreprise dans son ensemble et au laboratoire qui s'y rattache.

III.8 Objectifs d'un laboratoire d'analyse :

Pour choisir une méthode d'analyse, le nombre et la cadence des analyses à effectuer, la capacité d'investissement du laboratoire et les moyens humains dont il dispose doivent être

prises en compte. Le but essentiel sera toujours de produire au moindre coût des résultats validés. Pour atteindre cet objectif, il est nécessaire de s'assurer de l'exactitude de la méthode choisie, et de réduire le nombre de répétitions des analyses. Pour cela, un échantillon de référence du laboratoire est utilisé pour étudier et valider la méthode.

III.9.Principales étapes d'une validation :

Pour organiser la validation d'une méthode d'analyse, il faut d'abord l'avoir correctement mise au point. Souvent les analystes sont trop impatients et vont essayer de valider une méthode dont les effets de matrice sont inconnus. C'est une perte de temps et d'argent. Une étude de validation doit démarrer lorsqu'on dispose d'un mode opératoire complètement rédigé. L'échantillon doit représenter une "moyenne" des échantillons reçus par le laboratoire pour l'analyse. Cette moyenne concerne la teneur de l'analyte ou des analytes recherchés, ou la composition de la matrice. S'il s'agit par exemple de mesurer une pollution des sols par les métaux lourds, on préparera l'échantillon de référence du laboratoire à partir d'un grand nombre d'échantillons prélevés sur différents sites plus ou moins pollués, à différents horizons; ils seront broyés et mélangés les uns aux autres pour obtenir un échantillon homogène. S'il n'existe pas de méthode de référence, une autre façon de procéder est de se procurer un matériau de référence certifié (MRC) auprès d'organismes, tels que le NIST (National Institute of Standards and Technology) aux USA ou le BCR (Bureau Communautaire de Référence) en Europe. Ce MRC a une valeur certifiée de la teneur en l'analyte qu'on souhaite déterminer, cette valeur théorique étant considérée comme conventionnellement vraie. Le MRC doit présenter une matrice aussi proche que possible de l'échantillon car un effet de matrice peut perturber la mesure de l'analyte. La recherche d'un MRC convenable sera facilitée par l'utilisation de banques de données, comme la banque COMAR développée en France par le BNM (Bureau National de Métrologie). En l'absence d'une méthode de référence ou d'un matériau de référence certifié, il reste encore possible de participer à une analyse inter-laboratoires qui utiliserait l'échantillon de Référence du Laboratoire ou un matériau de même nature. Certaines espèces physico-chimiques présentes dans une solution de mesure en même temps que l'analyte considéré, peuvent perturber le signal donné par l'analyte, lorsqu'il se trouve seul dans une solution synthétique (solution étalon), en l'augmentant ou en le diminuant, ce qui correspond à un changement de sensibilité de la méthode. C'est par exemple le cas en spectrométrie d'absorption atomique où certaines espèces vont augmenter (effet d'exaltation) ou diminuer (effet de dépression) le rendement d'atomisation par des interférences chimiques. C'est aussi le cas sur des spectres électroniques (spectrométrie UV/Visible) où la présence de certains groupements fonctionnels va augmenter

(effet hyperchrome) ou diminuer (effet hypochrome) le signal étudié. Dans ces conditions, la droite d'étalonnage établie à partir de deux solutions étalons ne peut être utilisée en vue du dosage de l'analyte dans le milieu de mesure qui a été obtenu après traitement de l'échantillon analytique. Il faudrait pouvoir établir une droite d'étalonnage construite pour l'analyte considéré dans son milieu de mesure, cette méthode est appelée méthode des ajouts dosés (addition standard). La méthode d'analyse n'est réellement corrigée que si, en l'absence de l'analyte considéré, le signal analytique du milieu de mesure est nul. Autrement dit, il ne faut pas que le milieu de mesure sans l'analyte donne une réponse qui correspondrait à un effet de matrice additif.

III.10 Etude de la méthode d'analyse validée:

Les conditions expérimentales précédemment fixées lors de la mise au point de la méthode, on est en mesure de décrire sa procédure d'application. Cette méthode est appliquée à l'échantillon de Référence du Laboratoire, pour mieux préciser l'ensemble des critères qui la caractérisent. On effectue, avant l'étalonnage une recherche du domaine de linéarité de la méthode d'analyse, on applique l'ensemble des opérations prévues dans la procédure établie à différents étalons (différentes concentrations de l'analyte dans une matrice et un blanc qui donne une réponse nulle à la méthode). La régression linéaire permet la détermination des paramètres de la droite plus précise que celle des paramètres d'une courbe obtenus par une régression non linéaire. Aussi, il est plus facile de calculer une concentration à partir du signal, si le modèle de la réponse est linéaire. Il n'est pas davantage nécessaire de faire appel à des tests statistiques pour déterminer avec précision la concentration à partir de laquelle on peut affirmer être sorti du domaine de linéarité. Une représentation graphique suffit pour se faire une opinion. On pourrait aussi considérer comment se comporte le coefficient de corrélation de la régression, lorsqu'on augmente peu à peu le nombre de points pris en compte vers les concentrations les plus élevées. C'est dans ce domaine de linéarité qu'on va construire ensuite la droite d'étalonnage. Un certain nombre de paramètres caractérisant la méthode est: justesse, fidélité (ou répétabilité), domaine de linéarité, sensibilité, limite de détection, limite de quantification. Il en existe d'autres, comme la reproductibilité, la spécificité et la rapidité.