

Conséquences de la directive européenne 2009/90/CE sur l'estimation des limites de quantification des méthodes d'analyse chimique

Rapport final

BRGM/RP-58049-FR
Décembre 2009

Conséquences de la directive européenne 2009/90/CE sur l'estimation des limites de quantification des méthodes d'analyse chimique

Rapport final BRGM/RP-58049-FR

JP GHESTEM (BRGM) avec la collaboration de MP STRUB (INERIS), P BADOS (CEMAGREF), J CABILIC (LNE), G LABARRAQUE (LNE) et C BRACH PAPA (IFREMER)

Étude réalisée dans le cadre des projets de Service public du BRGM 2009

Vérificateur :

Nom : L AMALRIC

Date : 10/02/10

Signature :

Approbateur :

Nom : G HERVOUET

Date : 15/02/10

Signature :

En l'absence de signature, notamment pour les rapports diffusés en version numérique, l'original signé est disponible aux Archives du BRGM.

Le système de management de la qualité du BRGM est certifié AFAQ ISO 9001:2000.

Mots clés : directive 2009/90/CE, limite de quantification, NF T90-210, ISO/TS 13530, analyses chimiques, transposition, directive 2000/60/CE.

En bibliographie, ce rapport sera cité de la façon suivante :

GHESTEM J.P., (2009) -. BRGM/RP-58049-FR, Conséquences de la directive européenne 2009/90/CE sur l'estimation des limites de quantification des méthodes d'analyse chimique ; 93 pages, 5 annexes.

© BRGM, 2009, ce document ne peut être reproduit en totalité ou en partie sans l'autorisation expresse du BRGM.

Synthèse

La directive européenne 2009/90/CE a pour objectif de proposer un cadre d'assurance et de contrôle qualité pour les analyses réalisées dans les programmes de surveillance liés à la Directive Cadre Européenne sur l'Eau (DCE).

Cette directive impose notamment des exigences concernant les performances des méthodes d'analyses à utiliser pour la DCE. D'autres exigences concernent les systèmes d'assurance qualité des laboratoires ainsi que les contrôles qualité qui devront être appliqués (essais interlaboratoires et matériaux de référence).

Les deux principaux critères de performance mentionnés sont les suivants :

- La limite de quantification de la méthode doit être inférieure à 30% de la norme de qualité environnementale (NQE)
- L'incertitude au niveau de la NQE doit être inférieure à 50% ($k=2$).

Ce rapport élaboré dans le cadre du programme d'activité d'AQUAREF 2009 a pour objectif de discuter les implications des exigences de la Directive 2009/90/CE en ce qui concerne la limite de quantification. Le rapport a été rédigé avec le soutien de l'ONEMA en collaboration entre les 5 partenaires d'AQUAREF (BRGM, CEMAGREF, IFREMER, INERIS, LNE).

Outre la stricte exigence de la Directive, les enjeux liés à la notion de limite de quantification sont très importants. Il s'agit d'un critère de performance de méthode :

- qui peut potentiellement être un élément de concurrence entre laboratoires,
- qui est souvent un élément contractuel entre client et laboratoire,
- qui constitue une information très importante pour la qualité du résultat (l'incertitude est notamment forte autour de cette concentration).

De façon générale également, les concentrations environnementales recherchées sont souvent très proches des limites de quantification d'où l'importance de bien maîtriser cette notion et les performances de la méthode à ces niveaux.

Malheureusement, la notion de « limite de quantification » est une notion mal définie. De nombreuses définitions différentes existent ainsi que de nombreuses méthodes d'estimation. La directive 2009/90/CE propose une définition issue d'un consensus et qui ne permettra sans doute pas une harmonisation des pratiques sur ce point.

Les deux principaux référentiels existant au niveau français dans le domaine de l'eau pour la qualité des données et la validation des méthodes sont :

- la norme française NF T 90-210 (Mai 2009)
- le texte international ISO/TS 13530 (Mars 2009)

Ces deux textes revus récemment ont modifié leur définition et/ou leur mode de détermination de la limite de quantification et ils ne sont pas harmonisés sur ce point.

De façon schématique, la norme NF T90-210 propose une définition de la limite de quantification basée uniquement sur un critère de performance de la méthode au niveau de la LQ. L'exigence est de vérifier que l'exactitude de la méthode est inférieure à 60% au niveau de la LQ.

Le texte ISO/TS 13530 propose plusieurs modes d'estimation de la limite de quantification et notamment des estimations basées sur la détermination d'écart-types sur des échantillons blancs ou encore une évaluation du rapport signal sur bruit. Le texte indique qu'une fois ces évaluations faites, le laboratoire doit vérifier les performances de sa méthode en termes de d'incertitude. Cependant, les critères sont définis de façon imprécise et les exemples donnés ne sont pas prescriptifs.

Dans le cadre de ce rapport, des essais ont été réalisés dans les laboratoires des membres d'AQUAREF. Ils ont consisté, sur un certain nombre de méthodes, à tester les modes d'estimation et de validation de la limite de quantification proposés par ces deux normes et à comparer les résultats obtenus.

Il ressort de ces essais et des discussions qui ont eu lieu au sein du groupe ayant mené ces essais, les conclusions suivantes :

- les différentes méthodes d'estimation des limites de quantification peuvent dans certains cas donner des résultats très différents.
- L'exigence de vérifier les performances de la méthode au niveau de la LQ ou bien la définition de la LQ à partir d'exigences de performance semblent indispensables pour la fiabilité des données.
- La norme ISO/TS 13530 fournit des méthodes pour évaluer la limite de quantification de la méthode. La norme NF T90-210 n'en donne pas. C'est au laboratoire d'estimer sa limite de quantification et de vérifier qu'elle respecte les exigences.
- A l'inverse, les exigences de performance de la méthode au niveau de la limite de quantification sont plus claires et cohérentes dans la norme NF T90-210.

Au final, l'exigence de performance semblant le point capital à respecter pour assurer la fiabilité des données, la norme NF T90-210 semble tout à fait adaptée pour donner

des résultats fiables (à condition de prendre en compte au mieux lors de l'application de la norme la matrice des échantillons à analyser).

En ce qui concerne le lien avec la Directive 2009/90/CE et sa future transposition en droit national, l'avis du groupe ayant participé à la rédaction du document est que la norme française NF T90-210 respecte la définition proposée par la directive et notamment le point concernant une exigence de «détermination (de concentration) avec un degré d'exactitude et de précision acceptable ».

Ce dernier point de la définition de la directive semble le point capital à mettre en avant afin de justifier de la compatibilité de la norme française avec la directive et afin de limiter les risques de concurrence faussée entre laboratoires français et européens.

Il reste cependant que, même si l'exigence de vérification de performance au niveau de la limite de quantification est retenue et mise en avant, le niveau de performance n'est pas défini dans la Directive comme cela avait été préconisé par les représentants français lors des discussions de préparation de la Directive. Ce niveau est défini dans la norme NF T90-210 mais semble très peu précis dans le texte ISO/TS 13530. Le risque de concurrence faussée existe donc à ce niveau.

Si les conclusions de ce rapport sont reprises au niveau français, la norme NF T90-210 devrait être intégrée (en remplacement de l'ancienne version XP T90-210) dans le texte de l'agrément des laboratoires par la Ministère en charge de l'Ecologie.

Sommaire

1. Introduction	9
2. Contexte et exigences de la directive européenne 2009/90/CE	11
2.1. CONTEXTE	11
2.2. LA DIRECTIVE 2009/90/CE [1]	11
2.3. IMPORTANCE DE LA NOTION DE LIMITE DE QUANTIFICATION.....	13
2.4. EXIGENCES POUR LES AGREMENTS DES LABORATOIRES.....	14
3. Différents modes d'estimation de la limite de quantification	15
3.1. DEFINITIONS NORMATIVES ET DE REFERENCE.....	15
3.2. EXEMPLE DU FASCICULE DE DOCUMENTATION ISO/TS 13530 (2009) [17].....	16
3.2.1. Limite de détection basée sur l'écart-type de résultats obtenus sur un échantillon blanc.....	17
3.2.2. Limite de détection basée sur l'écart-type de la méthode	18
3.2.3. Limite de détection basée sur l'estimation du bruit de fond de la ligne de base.....	18
3.2.4. Limite de quantification.....	18
3.2.5. Vérification de la limite de détection et de la limite de quantification dans la matrice	18
3.3. EXEMPLE DE LA NORME FRANÇAISE NF T90-210 [9]	20
3.3.1. La norme annulée XP T90-210 (1999) [8]	20
3.3.2. La nouvelle norme NF T90-210 (Mai 2009) [9].....	21
4. Discussion sur les définitions de la Directive 2009/90/CE	23
4.1. RAPPEL DES DEFINITIONS.....	23
4.2. DISCUSSION.....	23
4.3. MODELE D'HORWITZ.....	25
5. Les matrices sédiments et biote	27
6. Exemples d'application	29

7. Conclusion	31
8. Bibliographie	33

Liste des annexes

Annexe 1 Exemples fournis par le CEMAGREF	35
Annexe 2 Exemples fournis par le LNE.....	41
Annexe 3 Exemples proposés par l'INERIS.....	55
Annexe 4 Exemples proposés par le BRGM.....	75
Annexe 5 Exemples proposés par l'IFREMER.....	85

1. Introduction

Ce rapport a été élaboré dans le cadre du programme d'activité d'AQUAREF pour l'année 2009 et dans le cadre de la convention de partenariat ONEMA-BRGM. Il a été rédigé par le BRGM en collaboration avec l'INERIS, le CEMAGREF, le LNE et l'IFREMER.

L'objectif de ce rapport est de présenter la problématique liée à la définition et aux modes d'estimation de la limite de quantification dans le cadre des programmes de surveillance liés à la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) suite à la parution de la Directive européenne 2009/90/CE [1].

Cette dernière directive fixe des exigences d'assurance et de contrôle qualité pour les laboratoires opérant dans le cadre de la DCE. Elle spécifie notamment une définition et des exigences pour la limite de quantification des méthodes d'analyse chimique. Cette donnée de caractérisation d'une méthode pouvant être sujette à diverses interprétations, ce rapport propose au niveau français une façon de transposer les exigences techniques sur ce point.

Le rapport abordera un aspect théorique lié aux définitions et aux textes normatifs. Il présentera également les essais réalisés par les laboratoires AQUAREF sur les problématiques des limites de quantification.

2. Contexte et exigences de la directive européenne 2009/90/CE

2.1. CONTEXTE

La Directive Cadre Européenne sur l'Eau [2] a entraîné la mise en place dans l'ensemble des pays européens de programmes de surveillance des masses d'eau (surface, souterraines et marines). Les objectifs de ces programmes sont d'établir des cartes présentant l'état des masses d'eau au niveau chimique et écologique. Pour ce qui concerne l'état chimique, les directives 2008/105/CE [3] pour les eaux de surface et 2006/118/CE [4] pour les eaux souterraines ont fixé pour un certain nombre de polluants les niveaux de qualité environnementale (NQE) ou normes de qualité (NQ) auxquels les concentrations dans le milieu devront être comparées afin de déterminer l'état de la masse d'eau.

La mise en place au niveau européen de ces programmes de surveillance incluant de multiples étapes techniques de choix des sites de surveillance, de fréquence de surveillance, d'échantillonnage et d'analyses nécessite **une harmonisation des pratiques au niveau européen afin de disposer de données homogènes et interprétables.**

Dans le domaine de l'analyse, la directive européenne 2009/90/CE (dite directive « QA/QC ») a été publiée en Juillet 2009 [1]. Elle est intitulée :

« Directive 2009/90/CE de la Commission du 31 juillet 2009 établissant, conformément à la directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil, des spécifications techniques pour l'analyse chimique et la surveillance de l'état des eaux »

Elle a été rédigée dans le cadre du groupe d'experts européens CMA (Chemical Monitoring Activity). Ce groupe qui rassemble des représentants des états membres et des principaux acteurs de la mise en place de la DCE, a pour objectif notamment de rédiger des guides et textes permettant une mise en place harmonisée de la DCE. La directive « QA/QC » est un exemple de ces textes.

2.2. LA DIRECTIVE 2009/90/CE [1]

La directive s'applique à l'analyse chimique de l'eau, des sédiments et du biote.

Elle regroupe des exigences en termes de :

- Méthodes d'analyse et leur validation

- Critères minimum de performances pour les méthodes d'analyse
- Règles de calcul des valeurs moyennes
- D'assurance et de contrôles qualité (conformité à la norme NF ISO CEI 17025 [5], participation à essais interlaboratoires, utilisation de matériaux de référence, ...).

Cette directive doit être transposée en droit national dans les deux ans suivant sa publication.

La référence [6] propose une description rapide de la directive ainsi que quelques propositions pour sa transposition.

Les exigences de critères de performance contenus dans cette directive (article 4) concernent les limites de quantification et l'incertitude de mesure.

- La limite de quantification des méthodes d'analyses doit être inférieure ou égale au tiers de la norme de qualité environnementale
- L'incertitude au niveau de la NQE doit être inférieure ou égale à 50%(k=2).

Sans que cela ait un lien direct avec ce rapport, la directive précise également que, en l'absence de normes de qualité environnementale pertinentes pour un paramètre donné, ou en l'absence de méthodes d'analyse répondant aux critères minimums de performance établis par le paragraphe 1, les États membres devront s'assurer que la surveillance est réalisée sur la base des meilleures techniques disponibles n'entraînant pas de coûts excessifs.

Dans son article 2, la directive propose des définitions pour les notions de limite de détection et de limite de quantification :

- «limite de détection, le signal de sortie ou la valeur de concentration au-delà desquels il est permis d'affirmer avec un certain degré de confiance qu'un échantillon est différent d'un échantillon témoin ne contenant pas l'analyte concerné »
- «limite de quantification, un multiple donné de la limite de détection pour une concentration de l'analyte qui peut raisonnablement être déterminée avec un degré d'exactitude et de précision acceptable. La limite de quantification peut être calculée à l'aide d'un étalon ou d'un échantillon appropriés, et peut être obtenue à partir du point le plus bas sur la courbe d'étalonnage, à l'exclusion du témoin »

Ces définitions seront discutées dans le paragraphe 4.

A titre d'information et étant donné que chaque terme peut potentiellement être important pour l'interprétation, la version anglaise du texte est donnée ci-dessous.

- « limit of detection means the output signal or concentration value above which it can be affirmed, with a stated level of confidence that a sample is different from a blank sample containing no determinand of interest »
- « limit of quantification' means a stated multiple of the limit of detection at a concentration of the determinand that can reasonably be determined with an acceptable level of accuracy and precision. The limit of quantification can be calculated using an appropriate standard or sample, and may be obtained from the lowest calibration point on the calibration curve, excluding the blank »

2.3. IMPORTANCE DE LA NOTION DE LIMITE DE QUANTIFICATION

La limite de quantification est un paramètre clé à la fois pour les laboratoires et pour les donneurs d'ordre.

Pour le laboratoire, c'est de façon simplifiée, la concentration en dessous de laquelle, il ne rend pas de résultat « quantifiable ». C'est un élément d'information important pour l'interprétation d'un résultat analytique. Les incertitudes sont en général fortes autour de cette valeur (ordre de grandeur 50-70%). Or, dans le contexte d'analyses environnementales, les concentrations recherchées sont en général faibles (état de trace) et proches des limites de quantification.

La limite de quantification est également de plus en plus un argument de concurrence entre laboratoires (« course » à la limite de quantification la plus faible).

Elle devient un élément contractuel entre le laboratoire et le client (cahier des charges, réglementation, agrément, offres) et un critère de sélection des laboratoires. Des limites de quantification sont exigées à travers l'agrément des laboratoires par le ministère en charge de l'écologie [7] et la directive « QA/QC » renforce encore ces exigences.

Enfin, la limite de quantification a depuis peu un lien avec la définition du bon état des masses d'eau. Dans le calcul des valeurs moyennes annuelles, les résultats inférieurs à la LQ doivent être remplacés par $LQ/2$. Des variations de LQ peuvent donc en théorie avoir un impact sur le calcul de la moyenne et donc sur la définition de l'état. Cet impact est a priori limité si l'ensemble des exigences de la directive QAQC sont respectés (notamment LQ inférieure au tiers de la NQE). Cependant, pour quelques substances, cette exigence est difficile à atteindre et en conséquence, les règles de calcul de moyenne décrite ci-dessus pourraient avoir un impact non négligeable sur l'évaluation de l'état.

Tout ceci montre l'importance grandissante de la notion de « limite de quantification ». Malgré cette importance grandissante, la limite de quantification est souvent une notion vague et les définitions issues de différentes normes ainsi que les pratiques sont variables (cf chapitre 3).

2.4. EXIGENCES POUR LES AGREMENTS DES LABORATOIRES

Plusieurs textes réglementaires notamment dans le cadre de l'agrément des laboratoires imposent d'ores et déjà en France des exigences en termes de limite de quantification.

L'arrête du 29 Novembre 2006 [7] qui fixe les exigences pour l'agrément des laboratoires par le Ministère de l'Environnement spécifie dans son annexe I, des limites de quantification à atteindre pour une liste de substances. Afin d'harmoniser les pratiques, le texte de l'arrête spécifie la méthode à appliquer pour déterminer la limite de quantification : il s'agit de la méthode décrite au § 5.1.3.3 de la norme XP T90-210 (1999) [8].

Remarque : la norme XP T90-210 [8] vient d'être révisée. La nouvelle version est la norme NF T90-210 (Mai 2009) [9]. La définition et les principes de vérification de la limite de quantification y ont été largement modifiés. Ils devraient être pris en compte dans les prochaines révisions de l'agrément des laboratoires.

Dans le domaine du contrôle sanitaire des eaux, l'arrête du 17 septembre 2003 relatif aux méthodes d'analyse des échantillons d'eau et à leurs caractéristiques de performance [10], fixe également des exigences en termes notamment de limite de quantification. Là encore, les modalités de calcul de la limite de quantification sont définies : « plus petite valeur à partir de laquelle il existe un résultat de mesure avec une fidélité suffisante ; elle doit être calculée selon le paragraphe 5.1.3.3 de la norme française XP T90-210 de Décembre 1999 » [8].

3. Différents modes d'estimation de la limite de quantification

3.1. DEFINITIONS NORMATIVES ET DE REFERENCE

Afin d'illustrer le manque d'harmonisation de la notion de limite de quantification, nous donnons ci-dessous quelques exemples de définition issues de textes normatifs ou faisant référence ainsi que de publications scientifiques.

Guide Eurachem [11]

La limite de quantification est () la plus petite concentration d'un analyte qui peut être déterminée avec un niveau acceptable de répétabilité et de justesse. Elle est aussi définie par différentes conventions par la concentration en analyte correspondant à la valeur d'un échantillon « blanc » à laquelle on ajoute 5,6 ou 10 fois l'écart-type sur la détermination de cette valeur de blanc.

Ce guide renvoie également en annexe aux 2 définitions suivantes :

AOAC – PVMP [12]

Concentration égale ou supérieure à la plus faible concentration de la courbe d'étalonnage.

IUPAC Orange book [13]

Les limites de quantification sont des caractéristiques de performance qui indiquent la capacité d'un processus de mesure chimique à quantifier de façon adaptée un analyte. Note : La capacité à quantifier est généralement exprimée en terme de signal ou de concentration d'analyte qui permettront des évaluation avec une fidélité relative de 10%.

Ainsi, $LQ = k_Q \sigma_Q$

Avec LQ limite de quantification, σ_Q écart-type à la LQ, et k_Q est un facteur multiplicatif indiquant le niveau de RSD (relative standard deviation) choisi. La valeur IUPAC par défaut pour k_Q est 10.

Vial & al [14]

La limite de quantification est la plus petite quantité d'un analyte qui peut être quantifiée avec un niveau de confiance défini. Généralement, la limite de quantification est presque toujours donnée par :

$LOQ \approx 10 \sigma_B$

σ_B (écart-type sur la détermination du blanc)

Recueil International des méthodes d'analyse – OIV [15]

La limite de quantification est la plus petite concentration ou teneur de l'analyte pouvant être quantifiée, avec une incertitude acceptable, dans des conditions expérimentales décrites de la méthode.

La liste des définitions référencées est très longue. Mermet [16] a effectué une synthèse sur la notion de limite de quantification montrant clairement l'ambiguïté de cette notion à travers la multiplicité et l'imprécision des définitions.

Il n'est pas dans l'objectif de ce rapport de répertorier et discuter toutes ces définitions. Dans ce rapport, nous nous attarderons sur les définitions issues de deux principaux textes normatifs de référence utilisés par les laboratoires français et européens travaillant dans le domaine de l'eau. Il s'agit des textes :

- ISO/TS 13530 (Mars 2009) [17]: lignes directrices pour le contrôle de qualité analytique pour l'analyse chimique et physico chimique de l'eau
- NFT90210 (Mai 2009) [9]: Protocole d'évaluation initiale des performances d'une méthode dans un laboratoire.

Les définitions et les modes d'estimation et de vérification de la LQ de ces deux textes seront présentés dans les chapitres suivants et ils seront confrontés aux définitions de la directive « QA/QC ».

Il est à noter que ces deux textes normatifs ont évolué très récemment et que le mode d'estimation de la LQ ainsi que les exigences associées, font partie des changements principaux. Les pratiques vont donc changer très rapidement sur ce point en France et en Europe.

3.2. EXEMPLE DU FASCICULE DE DOCUMENTATION ISO/TS 13530 (2009) [17]

Au niveau international et européen, le texte principal utilisé dans le domaine de l'eau jusqu'à 2009 était le guide ISO/TR 13530 : 1997 [18] repris en France sous la dénomination XP ENV ISO 13530 (1998) : « Guide de contrôle qualité analytique pour l'analyse de l'eau ». Ce texte vient d'être révisé (Mars 2009) [17] et est paru sous forme de Technical Sheet (recueil de lignes directrices) et non de norme.

Le guide ISO/TR 13530 [18] a très longtemps été utilisé comme référence dans le texte de la directive QA/QC avant une évolution dans les dernières versions et sa disparition dans le texte final.

La limite de quantification et la limite de détection sont définies dans la nouvelle version du document de la façon suivante (définitions issues de la norme ISO 6107-2 : 2006 [19]) :

- « limite de quantification : multiple défini de la limite de détection, par exemple 2 ou 3 fois la limite de détection, à une concentration de l'analyte qui peut raisonnablement être déterminée avec un niveau acceptable d'exactitude et de fidélité ».
- « limite de détection : signal de sortie ou valeur au dessus de laquelle on peut affirmer avec un niveau de confiance défini par exemple 95% qu'un échantillon est différent d'un échantillon blanc ne contenant pas l'analyte d'intérêt »

Le texte ISO/TS 13530 (2009) propose, sur la base de ces définitions, une estimation de la LQ principalement basée sur un multiple défini de la LD. Sur ce point, le texte n'a pas beaucoup évolué par rapport à sa précédente version.

L'évolution majeure concerne l'exigence de vérification de la LD et de la LQ. Il est notamment précisé (§4.4.1) que « l'étape essentielle de l'estimation de la LD et de la LQ est la vérification. L'analyste doit prouver qu'il est capable de détecter et quantifier l'analyte aux limites estimées dans les matrices considérées ». Ceci va dans le sens de la pratique française dans le domaine (cf paragraphe 3.3).

Le texte propose 3 estimations possibles de la limite de détection et une estimation de la limite de quantification

3.2.1. Limite de détection basée sur l'écart-type de résultats obtenus sur un échantillon blanc

La limite de détection peut être estimée par :

$$X_{LD}=3S_0 + X_{BL}$$

X_{LD} : limite de détection

X_{BL} : concentration moyenne de l'échantillon blanc

S_0 : écart-type des résultats obtenus sur un échantillon blanc (à l'exclusion des valeurs aberrantes). Cet écart-type doit être obtenu sur au moins 10 déterminations indépendantes et complètes de la concentration de l'analyte sur un blanc de matrice ou sur un matériau de faible concentration.

3.2.2. Limite de détection basée sur l'écart-type de la méthode

Pour les méthodes d'analyse qui ont une fonction d'étalonnage linéaire, la limite de détection peut être obtenue par :

$$X_{LD}=4 S_{x0}$$

S_{x0} : écart-type de la méthode (issue de l'étude de l'étalonnage).

3.2.3. Limite de détection basée sur l'estimation du bruit de fond de la ligne de base

Pour les méthodes qui présentent une ligne de base dont il est possible d'estimer le bruit, X_{LD} peut être estimée comme la concentration de l'analyte qui permet d'obtenir un rapport signal sur bruit de 3.

3.2.4. Limite de quantification

La limite de quantification peut être estimée par :

$$X_{LQ}=3X_{LD}$$

Il est précisé que le facteur 3 correspond à une incertitude relative sur le résultat de 33% (dans l'annexe A du texte, cette valeur de 33% est attribuée à la moitié de l'intervalle de confiance associé aux résultats obtenus sur un échantillon dopé à la LQ -cf 3.2.5).

3.2.5. Vérification de la limite de détection et de la limite de quantification dans la matrice

Cette partie est nouvelle dans le texte ISO/TS 13530 [17]. Elle indique notamment que la vérification de la limite de quantification est essentielle si les échantillons analysés en routine montrent des concentrations d'analyte proches de la limite de quantification et que dans ce cas, la vérification de la LQ doit être réalisée de façon régulière.

Le mode de vérification est en partie précisé. Les vérifications de la LD et de la LQ doivent être faites sur des échantillons « blancs » dopés à ces concentrations et les analyses de ces échantillons doivent être faites dans des conditions de reproductibilité intra laboratoire.

Des exemples de mode de vérification sont proposés en annexe du texte de façon informative.

Ainsi, l'annexe A indique que, pour un facteur 3 utilisé ($X_{LQ}=3 X_{LD}$), la vérification peut se faire de la façon suivante :

Pour n analyses effectuées sur l'échantillon dopé au niveau de la LQ, l'intervalle de confiance sur la moyenne des n valeurs est donné par :

$$t_{f,\alpha} s/\sqrt{n}$$

avec :

- $t_{f,\alpha}$, facteur de Student pour $\alpha=0.05$ et $f=n-1$
- s écart-type des résultats sur l'échantillon dopé à la LQ

Il est demandé que cet intervalle de confiance soit inférieur à $0.33 * X_{LQ}$.

Exemple

Le calcul suivant donne un exemple d'application de cette vérification des performances au niveau de la LQ suivant l'ISO/TS 13530. Cet exemple est volontairement choisi afin de se mettre dans les conditions de la norme NF T90-210 et disposer d'un nouvel élément de comparaison de ces deux méthodes.

La norme NF T90-210 demande de réaliser 5 séries d'analyse d'un échantillon dopé à la LQ et de réaliser deux répétitions dans chaque série. Pour appliquer le test de la norme ISO/TS 13530, on choisit $n=10$. L'intervalle de confiance sur la moyenne des 10 résultats obtenus sur l'échantillon dopé est donné par :

$$t_{0.05, 9} s_{FI}/\text{racine}(10) = 0.7 s_{FI}$$

avec s_{FI} : écart-type de fidélité intermédiaire au niveau de la LQ

La norme ISO/TS 13530 impose que cet intervalle de tolérance soit inférieur à $0.33 X_{LQ}$.

On obtient donc l'égalité suivante : $s_{FI}/X_{LQ} < 0.47$ ou $s_{FI} < 47\%$.

Cette tolérance est plus large que la tolérance de la norme NF T90-210 (de façon simplifiée, une valeur maximale de 30% est tolérée dans cette norme).

Cette partie nouvellement introduite dans le document ISO/TS 13530 est très importante. Elle demande aux laboratoires, à partir d'estimations de limite de quantification effectuées suivant différentes méthodes, de vérifier les performances de

leur méthode sur des échantillons à matrice dopés à la limite de quantification. Cette approche est utilisée en France depuis une dizaine d'année et a été renforcée dans la nouvelle norme NF T90-210. Toutefois, les critères de vérification de performance de cette norme ISO/TS 13530 sont peu précis et plus larges que ceux définis dans la norme NF T90-210 (cf 3.3.2).

3.3. EXEMPLE DE LA NORME FRANÇAISE NF T90-210 [9]

3.3.1. La norme annulée XP T90-210 (1999) [8]

Il s'agit de la version abrogée qui a précédé la norme NF T90-210 (2009). Dans le domaine de la qualité de l'eau, cette norme expérimentale a été très largement appliquée par les laboratoires français depuis une dizaine d'année.

Elle est notamment référencée dans le texte de l'arrêté décrivant les exigences pour l'agrément des laboratoires par le ministère de l'Ecologie en ce qui concerne la méthode à appliquer pour estimer la limite de quantification. Cette méthode correspond au paragraphe 5.1.3.3 de la norme XP T90-210.

C'est la même référence qui est utilisée pour l'agrément des laboratoires par le ministère en charge de la Santé.

La limite de quantification est définie de la façon suivante : « Plus petite grandeur d'un analyte à examiner dans un échantillon pouvant être déterminée quantitativement dans des conditions expérimentales décrites dans la méthode avec une variabilité définie (coefficient de variation déterminé) »

Le paragraphe 5.1.3.3 de la norme XP T90-210 correspond à une vérification d'une limite de quantification choisie. Il s'agit de vérifier, sur une solution dopée au niveau de la limite de quantification :

- que la répétabilité de la méthode à ce niveau est inférieure à 20%
- et que la justesse de la méthode est correcte à ce niveau également (test statistique à appliquer).

Ces critères définissent donc de façon indirecte, une limite de quantification basée sur des exigences de performance de la méthode au niveau de la LQ.

3.3.2. La nouvelle norme NF T90-210 (Mai 2009) [9]

La norme AFNOR NF T90-210 (Mai 2009) propose pour le domaine de la qualité de l'eau une nouvelle définition de la LQ à partir d'exigences de performances de la méthode à ce niveau.

Les définitions suivantes sont proposées dans la norme :

- Exactitude : étroitesse d'accord entre des résultats et la valeur de référence acceptée. Le terme « exactitude » appliqué à un ensemble de résultats, implique une combinaison de composantes aléatoires (fidélité) et d'une erreur systématique commune ou d'une composante « biais » (justesse).
- Limite de quantification de la méthode : plus petite grandeur d'un analyte à examiner dans un échantillon pouvant être déterminée quantitativement dans des conditions expérimentales décrites dans la méthode avec une exactitude définie.

Dans le cadre de cette norme, l'exigence de performance définie au niveau de la LQ est par défaut une d'exactitude de 60%, la vérification de cette exigence devant se faire à partir d'un plan d'essai basé sur des analyses d'échantillons à matrice dopés à la LQ.

Il s'agit donc de préparer un volume suffisant d'une eau représentative du domaine d'application de la méthode ne contenant pas l'élément à mesurer et de doper ce matériau avec une quantité d'analyte correspondant à la limite de quantification présumée.

Ce volume est fractionné en au moins $n \times r$ prises d'essai identiques avec $n \geq 5$ et $r \geq 2$. On réalise ensuite dans n séries (définies par des conditions de fidélité intermédiaire ou de reproductibilité intra laboratoire) une analyse complète de l'échantillon. Chaque analyse est au moins répétée r fois dans des conditions de répétabilité au sein de chaque série.

Il s'agit de s'assurer de l'exactitude de la limite de quantification présumée par rapport à un écart maximal acceptable de 60 % de la LQ en vérifiant les deux inégalités suivantes :

$$(1) Z_{LQ} - 2 \times S_{LQ} > LQ - 60 \% \times LQ.$$

$$(2) Z_{LQ} + 2 \times S_{LQ} < LQ + 60 \% \times LQ.$$

Avec Z_{LQ} : grandeur moyenne calculée et S_{LQ} : écart-type de fidélité intermédiaire calculé.

De façon générale, la norme NF T90-210 propose une méthode de validation basée sur une évaluation de l'exactitude d'une méthode physico chimique sur l'ensemble du domaine d'application. Cette méthode de validation est inspirée de publications

récentes [20] [21] basées sur la réalisation du « profil d'exactitude » de la méthode testée. La limite de quantification est atteinte quand l'exactitude de la méthode dépasse la valeur de 60% (cf figure 1).

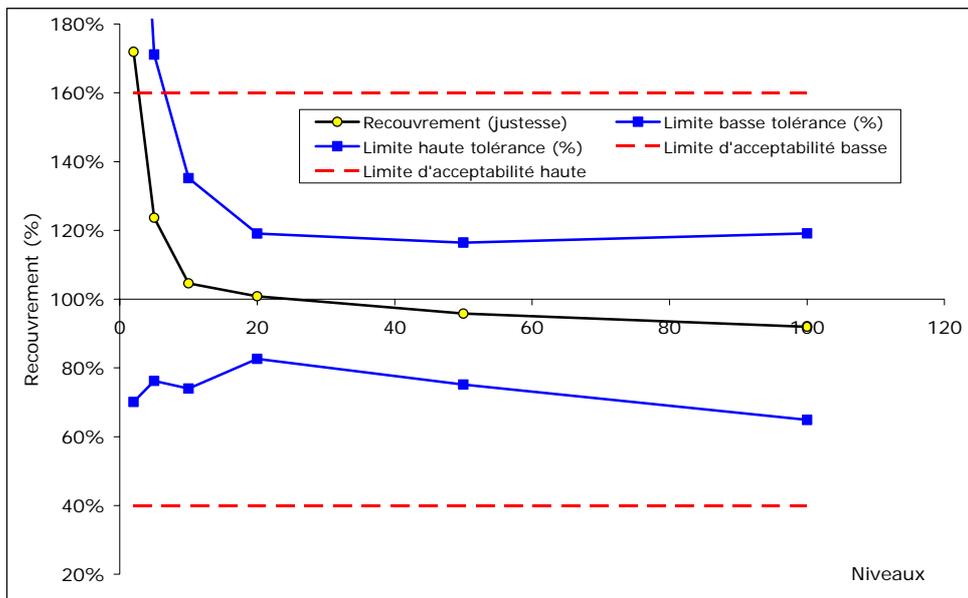


Figure 1 : représentation dite de « profil d'exactitude » : exactitude d'une méthode en fonction du niveau de concentration.

4. Discussion sur les définitions de la Directive 2009/90/CE.

4.1. RAPPEL DES DEFINITIONS

Les définitions de la directive reprennent intégralement les définitions de la norme ISO 6107-2 (2006) – Qualité de l'eau – Vocabulaire.

Ces définitions sont rappelées ci-dessous en français et en anglais. Elles sont extraites des textes officiels de la directive 2009/90/CE.

- « limit of quantification' means a stated multiple of the limit of detection at a concentration of the determinand that can reasonably be determined with an acceptable level of accuracy and precision. The limit of quantification can be calculated using an appropriate standard or sample, and may be obtained from the lowest calibration point on the calibration curve, excluding the blank »
- «limite de quantification, un multiple donné de la limite de détection pour une concentration de l'analyte qui peut raisonnablement être déterminée avec un degré d'exactitude et de précision acceptable. La limite de quantification peut être calculée à l'aide d'un étalon ou d'un échantillon appropriés, et peut être obtenue à partir du point le plus bas sur la courbe d'étalonnage, à l'exclusion du témoin »

4.2. DISCUSSION

En premier lieu, il est important de noter deux points de différence entre les définitions française et anglaise.

- Dans le texte anglais de la directive il est mentionné « acceptable level of accuracy and precision ». Dans le texte français on trouve « niveau acceptable d'exactitude et de précision ». En toute rigueur, le terme anglais « precision » devrait être traduit par « fidélité ». Le terme « précision » en français doit être évité quand on évoque les concepts de métrologie et de validation de méthode. Par ailleurs la notion d'exactitude englobe les notions de justesse et de fidélité (étroitesse d'accord entre des résultats d'essai indépendants obtenus sous des conditions stipulées - Norme NF ISO 5725-1)

- Le terme « témoin » en français exprime ici la notion d'échantillon « blanc ».

De nombreuses discussions ont eu lieu au moment de la préparation de la directive sur cette notion capitale de LQ. Comme nous venons de le voir, des pratiques divergentes existent en niveau international et en Europe. Au final, la définition « consensuelle » choisie apparaît contradictoire entre :

- d'une part une estimation à partir d'un multiple défini de la limite de détection (en général multiple fixé à 3 comme dans le document ISO/TS 13530) ou à partir du point le plus bas sur la courbe d'étalonnage.
- d'autre part une exigence d'un niveau « acceptable » d'exactitude et de fidélité au niveau de la LQ

Il semble difficile de garantir systématiquement cette dernière exigence de la directive à partir d'une estimation basée par convention sur un multiple fixé de la LD (limite de détection) ou bien sur le point le plus bas de la courbe d'étalonnage. Le niveau « acceptable » laisse également une part forte à l'interprétation qu'il conviendrait de préciser rapidement pour éviter le développement de stratégies divergentes.

Cette difficulté est le reflet des différentes pratiques qui peuvent exister sur la notion de limite de quantification. Lors de l'élaboration de la directive, les discussions ont beaucoup porté sur cette définition entre les partisans de la méthodologie issue de la norme ISO/TS 13530 (ou plutôt à l'époque de la précédente version) et les partisans d'une approche basée sur un niveau de performance requis au niveau de la limite de quantification parmi lesquels la France s'appuyant sur ses normes XP T90-210 (1998) et maintenant NF T90-210 (2009).

Le texte ne tranche pas entre ces deux approches et il n'apporte pas la plus value qui aurait été indispensable pour l'harmonisation des pratiques européennes dans le cadre de la DCE sur ce point.

L'avis du groupe ayant participé à la rédaction de ce rapport est que la définition de la limite de quantification proposée par la Directive 2009/90/CE laisse la possibilité à la France d'appliquer les textes normatifs nationaux notamment la nouvelle norme NF T90-210 qui est basée sur un niveau défini d'exactitude à la LQ et non sur un multiple défini de la LD. Du point de vue de l'assurance sur la qualité de la donnée et de l'assurance sur la pertinence de la limite de quantification calculée, l'approche « française » offre des garanties car elle est basée sur une vérification concrète des performances au niveau de la limite de quantification et sur un niveau d'exactitude défini.

Par ailleurs, la lecture faite par le groupe ayant participé à la rédaction du rapport est que la définition de la LQ issue de la Directive, quelle que soit l'approche choisie, impose de respecter un niveau défini d'exactitude acceptable. Cette lecture, qui devra être réaffirmée dans toute discussion européenne sur le sujet, nous semble limiter les possibles problèmes de concurrence entre laboratoires français et laboratoires européens liés par exemple à l'application d'une

définition moins contraignante de la limite de quantification dans d'autres états membres. Cependant, des problèmes de concurrence pourraient apparaître concernant notamment les deux points suivants :

- **Dans le cadre de la norme française NF T90-210 le niveau d'exactitude à vérifier expérimentalement au niveau de la LQ est fixé par défaut à 60 %. Aucune exigence chiffrée n'est donnée dans la directive.**
- **Il n'est pas précisé dans la directive si le niveau d'exactitude acceptable doit être atteint ou vérifié sur des échantillons réels (à matrice) ou sur des solutions étalons (dans la norme NF T90-210, il s'agit d'échantillons à matrice).**

4.3. MODELE D'HORWITZ.

La directive QA/QC fixe principalement deux exigences concernant les performances de méthode :

- La limite de quantification doit être inférieure ou égale à 30% de la norme de qualité environnementale (NQE).
- L'incertitude élargie doit être inférieure ou égale à 50% (k=2) au niveau de la NQE

Le modèle d'Horwitz est un modèle largement utilisé dans le domaine de l'analyse chimique. Il permet de relier les valeurs relatives de fidélité d'une méthode d'analyse à la concentration de l'analyte. Ce modèle est empirique et il est surtout utilisé pour donner des ordres de grandeur. Il s'agit d'une équation générale relative à la fidélité dont il a été constaté qu'elle est relativement indépendante de l'analyte et de la matrice et uniquement dépendante de la concentration pour la plupart des méthodes d'analyse de routine.

Ce modèle est le suivant : les valeurs relatives à la fidélité sont calculées à partir de l'équation,

$$RSD_R = 2^{(1-0.5\log C)}$$

où :

- RSD_R est l'écart type relatif calculé à partir des résultats obtenus dans des conditions de reproductibilité;
- C est la concentration (c'est-à-dire 1 = 100 g/100 g, 0,001 = 1 000 mg/kg).

Cette équation peut être utilisée pour modéliser la variation de fidélité (ou de façon simplifiée de l'incertitude en considérant que la fidélité représente une large part de l'incertitude) en fonction de la concentration.

On a donc au niveau de la NQE une RSD de 25%. Au niveau de $NQE/3$ c'est-à-dire de la LQ exigible, le RSD donné par le modèle d'Horwitz est de 30% soit 60% avec un facteur d'élargissement de 2.

Cette valeur de 60% est la valeur maximale qui a été fixée dans la norme NF T90-210 pour la valeur de l'exactitude au niveau de la limite de quantification. Même si les notions d'exactitude et d'incertitude ne sont pas rigoureusement identiques, elles sont proches et intègrent toutes les deux les notions fondamentales de justesse et de fidélité d'une méthode.

Ce calcul sommaire effectué à partir d'ordres de grandeur et de l'application simplifiée du modèle d'Horwitz montre que le niveau d'exactitude choisi dans la norme française NF T90-210 (60%) est compatible avec l'exigence d'incertitude de 50% au niveau de la NQE fixée par la directive QA/QC.

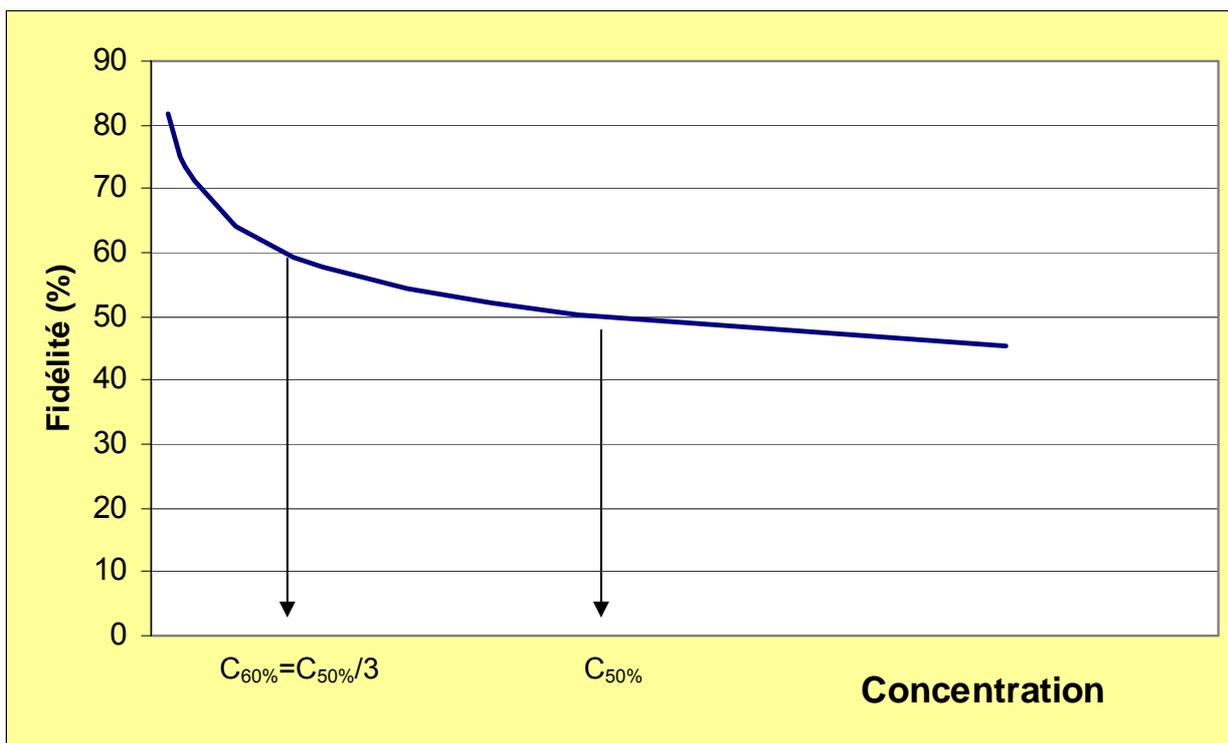


Figure 2 : représentation schématique des variations de la fidélité d'une méthode en fonction de la concentration d'après le modèle d'Horwitz (la concentration qui donne une fidélité de 60% correspond au tiers de la concentration qui donne une fidélité de 50%)

5. Les matrices sédiments et biote

La directive européenne dite QA/QC s'applique aux matrices eaux, sédiments et biote.

Le domaine d'application de la norme française NF T90-210 est limité à l'eau. Les principes d'estimation de la LQ semblent cependant tout à fait adaptables aux autres matrices mais nécessiteront d'être testés.

Le principal problème pour la généralisation de l'approche de la norme NF T90-210 aux matrices biote et sédiments concerne la possibilité de trouver des matériaux sans l'analyte considéré afin de faire les dopages au niveau de la limite de quantification

Des matériaux « blancs » semblent assez facilement accessibles pour ces deux matrices pour les substances organiques et pour les principaux métaux d'origine anthropique. Pour les autres métaux, la notion de LQ semble moins importante. Le test de la norme NF T90-210 pourrait être mené dans ce cas sur une solution reconstituée contenant les éléments majeurs du sédiment ou bien le test pourrait être mené simplement sur le milieu de minéralisation avec en parallèle une étude des interférences montrant que les éléments constitutifs du sédiment n'interfèrent pas au niveau de la LQ.

Il existe également dans certains textes et dans le cadre de certains projets de recherche des protocoles de reconstitution de sédiments artificiels.

Enfin, les biotes pouvant se rapprocher dans certains cas des espèces destinées à l'alimentation humaine, il pourrait être envisageable de se rapprocher des secteurs concernés, qui utilisent quant à eux la norme NF V03-110 [22], en cours de révision [23].

6. Exemples d'application

Les laboratoires d'AQUAREF ont mis en application différents modes d'estimation de limites de quantification à partir des normes NF T90-210 et ISO/TS 13530.

Ces exemples sont présentés dans les annexes 1 à 5. Les principales conclusions issues de ces exemples sont les suivantes :

- Seule la norme ISO/TS 13530 fournit des méthodes d'estimation d'une limite de quantification. La norme NF T90-210 définit la limite de quantification avec une exigence de performance à ce niveau (il est donc nécessaire auparavant d'évaluer ou de choisir une limite de quantification afin de tester les performances de la méthode à ce niveau de vérifier que ces performances répondent aux exigences de la norme). La méthode d'évaluation préalable est libre.
- De façon générale, les modes d'estimation de la limite de quantification suivant la norme ISO/TS 13530 sont sujettes à de nombreuses interprétations et peuvent aboutir à des résultats très différents. En particulier l'estimation de la LQ avec le rapport signal/bruit donne des valeurs très variables suivant les opérateurs et peu aboutir à des estimations très optimistes de la limite de quantification (par rapport au référentiel NF T90-210).
- De la même façon les critères de vérification de performance proposés par la norme ISO/TS 13530 sont peu précis, peu pertinents et sujets à des interprétations variées. Ce critère ne prend notamment pas en compte la justesse au niveau de la LQ (notamment dans l'exemple présenté en Annexe A de la norme). Par ailleurs, l'exemple présenté laisse envisager que la fidélité acceptable au niveau de la limite de quantification serait d'autant plus grande que le nombre d'essais réalisés pour le vérifier serait grand ! Dans l'exemple présenté par l'IFREMER et pour un nombre de mesures $n=10$, l'écart-type autorisé est de 46%. Il est de 27% pour $n=5$.
- Globalement, les essais réalisés montrent que les estimations des LQ suivant la norme ISO/TS 13530 respectent les critères de performance donnés dans la norme NF T90-210. Cependant dans un certain nombre de cas, ces critères ne sont pas respectés ce qui signifie que les LQ estimées sont trop faibles par rapport aux exigences de la norme NF T90-210.

7. Conclusion

La limite de quantification d'une méthode d'analyse chimique n'est pas une notion harmonisée notamment au niveau européen. Les définitions et les modes d'application sont variés.

La transposition en droit français de la Directive Européenne 2009/90/CE qui définit des exigences d'assurance et de contrôle qualité dans le cadre de la DCE nécessite que soit prise en France une décision quant à la définition et aux modes d'évaluation des limite de quantification des méthodes d'analyse chimiques.

Les implications de cette prise de décision sont fortes car la Directive établit des exigences à respecter pour les limites de quantification. Celles-ci devront être inférieures à 30% des normes de qualité environnementales.

Ce rapport établit une synthèse des textes normatifs disponibles, de leur position par rapport aux exigences de la Directive et propose des exemples d'application réalisés dans les laboratoires des partenaires d'AQUAREF.

Il ressort tout d'abord de ce rapport que la définition de la limite de quantification donnée dans la Directive est une définition consensuelle qui ne devrait pas favoriser une application harmonisée en Europe.

Les deux principaux référentiels normatifs disponibles et récemment révisés sont la norme française NF T90-210 (Mai 2009) ainsi que la norme ISO/TS 13530 (Mars 2009).

La norme ISO/TS 13530 propose 3 méthodes d'évaluation de la limite de quantification. Elle donne également des critères de performance à vérifier au niveau de la limite de quantification mais ces critères ne semblent pas précis ni pertinents.

La norme NF T90-210 ne donne pas de méthodes d'évaluation de la limite de quantification mais elle donne des critères très précis sur les performances de la méthode à ce niveau (ce sont ces critères qui définissent la limite de quantification dans le cadre de cette norme).

Les essais réalisés dans le cadre de ce rapport afin de comparer les deux textes, ont montré que de façon générale, les estimations issues de la norme ISO/TS13530 sont compatibles avec les exigences fixées par la norme NF T90-210. Cependant dans certains cas, les estimations de la norme ISO/TS 13530 sont très optimistes et ne permettent pas la vérification des critères de la norme NF T90-210.

Dans un objectif de fiabilisation des données, une exigence bien définie de performance au niveau de la limite de quantification semble indispensable. Sur ce point

la norme NF T90-210 semble présenter le plus de garantie (à la condition importante qu'elle soit appliquée sur une matrice la plus représentative possible du domaine d'application de la méthode). A l'heure actuelle, c'est l'ancienne version de la norme NF T90-210 (norme XP T90-210 de 1999) qui est exigée dans le cadre de l'agrément des laboratoires par le ministère en charge de l'écologie.

L'avis du groupe ayant participé à la rédaction de ce rapport est que la définition de la limite de quantification proposée par la Directive 2009/90/CE laisse la possibilité à la France d'appliquer la nouvelle norme NF T90-210 qui est basée sur un niveau défini d'exactitude à la LQ (60%)

Par ailleurs, la lecture faite de la Directive, est que la définition de la LQ issue de la Directive, même si elle propose divers modes d'estimation de la LQ, impose de respecter un niveau défini d'exactitude acceptable. Cette lecture, qui devra être réaffirmée dans toute discussion européenne sur le sujet, nous semble limiter les possibles problèmes de concurrence entre laboratoires français et laboratoires européens liés par exemple à l'application d'une définition plus favorable de la limite de quantification. Cependant, des problèmes de concurrence pourraient apparaître concernant notamment les deux points suivants :

- Dans le cadre de la norme française NF T90-210 le niveau d'exactitude à vérifier expérimentalement au niveau de la LQ est fixé par défaut à 60 %. Aucune exigence chiffrée n'est donnée dans la directive.
- Il n'est pas précisé dans la directive si le niveau d'exactitude acceptable doit être atteint ou vérifié sur des échantillons réels ou sur des solutions étalons (dans la norme NF T90-210, il s'agit d'échantillons réels).

8. Bibliographie

- [1] Directive 2009/90/CE : directive établissant, suivant la Directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil, des spécifications techniques pour l'analyse chimique et la surveillance de l'état des masses d'eau.
- [2] Directive Cadre Européenne sur l'eau 2000/60/CE établissant un cadre pour une politique communautaire de l'eau
- [3] DIRECTIVE 2008/105/CE DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 16 Décembre 2008 établissant des normes de qualité environnementale dans le domaine de l'eau, modifiant et abrogeant les directives du Conseil 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE, 86/280/CEE et modifiant la directive 2000/60/CE.
- [4] DIRECTIVE 2006/118/CE DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 12 décembre 2006 sur la protection des eaux souterraines contre la pollution et la détérioration
- [5] NF EN ISO/CEI 17025 (2005) : Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais, AFNOR.
- [6] GHESTEM J.P. (2009) - Note sur les conséquences de la directive européenne 2009/90/CE - Eléments de réflexion pour la transposition. Rapport BRGM/RP-57899-FR, 27 p.
- [7] Arrêté du 29 novembre 2006 portant modalités d'agrément des laboratoires effectuant des analyses dans le domaine de l'eau et des milieux aquatiques au titre du code de l'environnement
- [8] XP T90-210 (1999) - Qualité de l'eau - Protocole d'évaluation d'une méthode alternative d'analyse physico-chimique quantitative par rapport à une méthode de référence (norme annulée)
- [9] NF T90-210 (2009) Qualité de l'eau - Protocole d'évaluation initiale des performances d'une méthode dans un laboratoire
- [10] : arrêté du 17/09/2003 relatif aux méthodes d'analyse des échantillons d'eau et à leurs caractéristiques de performance
- [11] : Guide Eurachem – The fitness for purpose of analytical methods – A laboratory guide to method validation and related Topics – December 1998
- [12] AOAC Peer Verified Methods Program – Manual on policies and procedures, AOAC International, Arlington VA 22201-3301, USA

[13] IUPAC Compendium of Analytical Nomenclature "The Orange Book" - Harry Monroe Irving, Henry Freiser, Thomas Summers. West – Janvier 1978

[14] Vial & Jardy, Analytical Chemistry, Vol 71, n°14, July 15, 1999.

[15] Recueil International des méthodes d'analyses – OIV – Estimation de la limite de détection et de quantification – MA-F-AS1-10-LIMDET – Résolution Oeno 7/2000

[16] Mermet JM, Spectrochimica Acta Part B 63 (2008) 166-182

[17] ISO/TS 13530:2009 Qualité de l'eau -- Lignes directrices pour le contrôle de qualité analytique pour l'analyse chimique et physicochimique de l'eau

[18] ENV ISO TR 13530 (1998) Qualité de l'eau – Guide de contrôle qualité analytique pour l'analyse de l'eau,

[19] FD ISO 6107-2 (2006) : Qualité de l'eau – Vocabulaire – Partie 2, AFNOR.

[20] FEINBERG (M) - Approche globale et harmonisée de la validation - Spectra Analyse, n°249, Avril-Mai (2006)

[21] STP PHARMA Pratiques, Volume 13, n°3, mai-juin 2003 : Validation des procédures analytiques quantitatives – Harmonisation des démarches.

[22] NF V03-110 (1998) : Analyse des produits agricoles et alimentaires - Procédure de validation intralaboratoire d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence - Cas de méthodes d'analyse quantitatives.

[23] PR NF V03-110 : 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

Annexe 1

Exemples fournis par le CEMAGREF

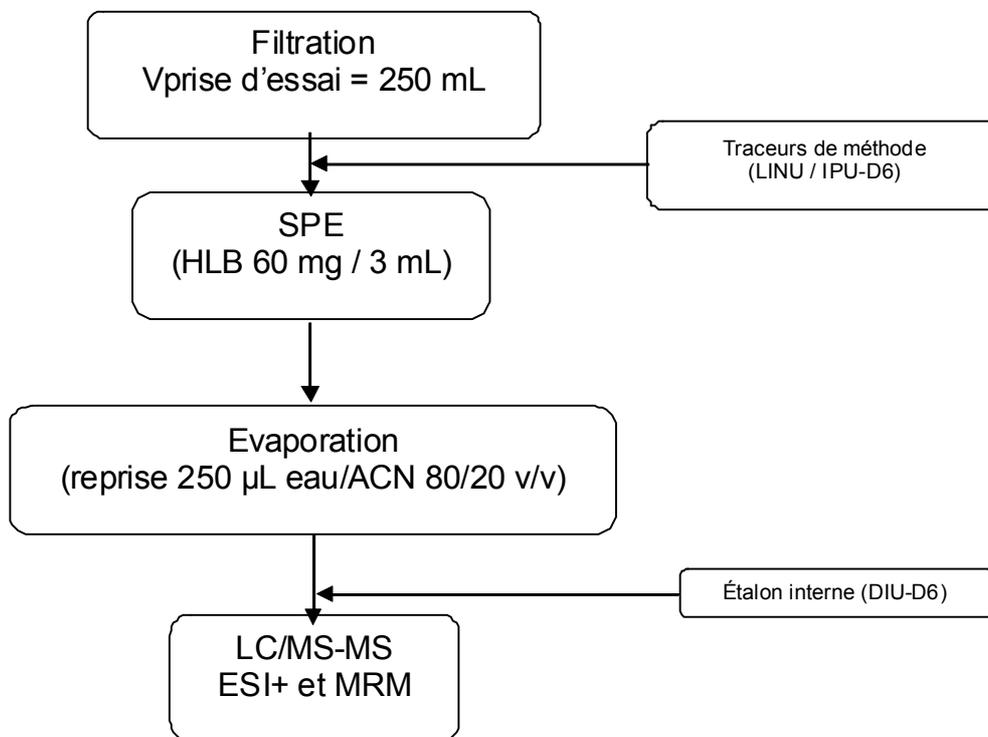
OBJECTIFS

Les tests réalisés ont consisté à comparer les méthodes d'estimation de la limite de quantification suivant les normes NF T90-210 et suivant la norme ISO/TR 13530 (1997). Cette comparaison a été effectuée sur 5 pesticides ou métabolite (dont 2 prioritaires *).

- Chlorfenvinfos (CFV)*
- Diuron (DIU)*
- 3-(3,4-dichlorophenyl)-1-méthylurée (DCPMU)
- Fenitrothion (FNT)
- Procymidone (PCM)

METHODE D'ANALYSE TESTEE

Le synoptique de la méthode d'analyse testée est le suivant.



CONDITIONS DE DETERMINATION DE LA LIMITE DE QUANTIFICATION

NF T90-210 (2009)

Dans un premier temps, l'approche est purement instrumentale (sensibilité à un moment donné) afin d'estimer une limite de quantification

La LQ pressentie a été déterminée sur la base d'un rapport signal sur bruit $S/N \geq 10$ sur les étalons les plus bas. Les valeurs pour chacun des composés ont été multipliées par un coefficient de sécurité $k \geq 2$ (k étant réajusté jusqu'à ce que la validation soit vérifiée selon NF T90-210).

Les dopages pour la vérification de la LQ pressentie sont réalisés en ce sens.

Les conditions expérimentales appliquées sont celles définies dans la norme :

- Conditions de fidélité intermédiaire ($n=5$)
- Analyse d'un duplicat (par jour) sur 5 jours différents

Les dopages sont réalisés chaque jour afin d'assurer la stabilité de l'échantillon dopé. Le dopage a été réalisé par une même solution de dopage.

Les dopages ont été réalisés sur de l'eau d'Evian (faute de disposer d'autres eaux dépourvues de tous les analytes à doser).

ISO/TR 13530 (1998)

A l'époque des essais, la version définitive de la norme ISO/TS 13530 (Mai 2009) n'était pas disponible. Les modes d'estimation de la version de 1998 (ISO/TR 13530) ont été suivis. Excepté la méthode de vérification des performances au niveau de la LQ, les modes de détermination basés sur une estimation de l'écart-type de 10 échantillons blanc sont identiques entre les deux versions.

Dix échantillons « blanc » ont été analysés sur une période de 2 jours. Les aires intégrées ont été transformées en concentrations. L'écart type est calculé sur ces 10 concentrations du blanc.

La valeur de la LQ est calculée comme étant 10 fois l'écart type sur le blanc.

RESULTATS

Le tableau suivant donne les résultats des estimations des limites de quantification obtenus suivant les deux méthodes décrites ci-dessus. En gras, la limite de quantification la plus faible identifiée.

	LQ en ng/l	
	ISO/TR 13530 (1998)	NF T90-210 (2009)
CFV	30	<u>20</u>
DIU	15	<u>5</u>
DCMPU	<u>1.5</u>	5
FNT	60	<u>50</u>
PCM	100	<u>20</u>

De façon générale, dans les conditions des essais réalisés, les limites de quantification estimées sont plus faibles (d'un facteur 1 à 5 environ) par l'application de la norme française NF T90-210. Pour une molécule, la norme ISO/TR13530 donne une LQ plus faible d'un facteur 3.

Il faut noter que les estimations de LQ issues de la norme ISO/TR13530 sont sans doute légèrement pénalisées (valeurs par excès) en raison d'une estimation des blancs sur 2 jours consécutifs. Les indications sur ce point ne sont pas très précises dans la norme. Il n'est pas indiqué clairement si les essais doivent se faire sur un ou plusieurs jours. Il semble quand même que la notion évoquée d'écart-type intra série donne une indication sur la réalisation de blancs au sein d'une seule série.

Annexe 2

Exemples fournis par le LNE

METHODES DE VERIFICATION DE LQ PRESUPPOSEES

Approche ISO TS/13530

La norme ISO/TS 13530 propose différents modes d'estimation de la LQ. Elle demande de vérifier les performances au niveau de la LQ. Le critère de vérification repose sur l'inégalité suivante : l'incertitude de mesure obtenue sur les échantillons dopés à la LQ doit être inférieure ou égale à celle calculée en prenant un intervalle de confiance de 33 %

$$s_n \leq u_{calcul} = \frac{X_{LQ} \cdot \sqrt{n}}{3 \cdot t_{f;\alpha}}$$

avec :

s_n , écart type expérimental

u_{calcul} , l'incertitude calculée

X_{LQ} , grandeur moyenne expérimentale

n , le nombre d'analyse de l'échantillon dopé

$t_{f;\alpha}$, le coefficient de Student pour $f = n-1$ et $\alpha=0.05$

Approche T 90-210

Les critères de vérification consistent à s'assurer de l'exactitude de la limite de quantification présumée par rapport à un écart maximal de 60 % de la LQ.

Deux inégalités doivent être respectées :

- borne inférieure de la tolérance : $\overline{z}_{LQ} - 2 \cdot s_{LQ} > LQ - 60\% \cdot LQ$
- borne supérieure de la tolérance : $\overline{z}_{LQ} + 2 \cdot s_{LQ} < LQ + 60\% \cdot LQ$

avec :

\overline{z}_{LQ} , grandeur moyenne calculée à partir des dix dosages effectués

s_{LQ} , écart type de fidélité intermédiaire calculé $s_{LQ} = \sqrt{s_B^2 + s_{répét}^2}$

LQ , valeur de la LQ présumée

APPLICATION A L'ANALYSE DES METAUX, CD, NI ET PB PAR ICPMS

Les limites de quantification pour ces métaux ont été estimées dans des solutions synthétiques (2 % acide nitrique) et dans une eau souterraine peu polluée et prélevée, filtrée et acidifiée sur le site de La Chapelle Saint Luc (près de Troyes) (cf. « Essai collaboratif sur l'échantillonnage en eau souterraine » - Rapport BRGM RP/57687-FR, www.aquaref.fr).

Les essais se sont déroulés en deux temps. Tout d'abord, les limites de quantification ont été estimées à partir de l'approche des blancs de la norme ISO/TS 13530. Ces limites de quantification ont ensuite été vérifiées suivant les recommandations de la norme NF T90-210 et de l'annexe A de la norme ISO/TS 13530.

Estimation des limites de quantification théoriques

Elles ont été calculées à partir des limites de détection ($LQ = 3*LD$), elles mêmes déterminées à partir des mesures effectuées sur 10 blancs indépendants (10 prélèvements de l'eau synthétique acidifiée à 2 % nitrique et eau souterraine déjà acidifiée lors du prélèvement sur site).

Pour le Ni et Pb les écarts types des mesures sur les blancs ont été utilisés et convertis en concentration par les facteurs de sensibilité obtenus en mesurant le signal net d'un point de gamme étalon en Ni et Pb, $LD = 3 \times s_{blc}$

Pour le Cd l'intégralité du signal obtenu sur les blancs a été pris en considération pour calculer la LD à partir d'un point de gamme étalon (nombre de coups trop faible, 3 cps, pour déterminer un écart type représentatif), $LD = 3 \times \text{bruit}_{blc}$

	Cd111	
	Eau Synth HNO3 2%	Eau souterraine Troyes
Moyenne blancs n=10	3 cps	4 cps
Etalon	0,5µg/l=2489 cps	5µg/l=11698 cps
Limite de détection	$LD=3* \text{bruit}=0,0005\mu\text{g/l}$	$LD=3* \text{bruit}=0,0008\mu\text{g/l}$
Limite de quantification	$LQ=3*LD=0,0014 \mu\text{g/l}$	$LQ=3*LD=0,0023 \mu\text{g/l}$

	Ni60	
	Eau Synth HNO3 2%	Eau souterraine Troyes
Moyenne blancs n=10	3998 cps	48577 cps
Etalon	0.5µg/l=4455 cps	5µg/l=21428 cps
Limite de détection	LD=3*s=0.104µg/l	LD=3*s=0.79 µg/l
Limite de quantification	LQ=3 LD=0.42µg/l	LQ=3*LD=2.36 µg/l

	Pb208	
	Eau Synth HNO3 2%	Eau souterraine Troyes
Moyenne blancs n=10	1256 cps	361 cps
Etalon	0.5 µg/l=11107 cps	5µg/l = 74654 cps
Limite de détection	LD=3*s=0.039µg/l	LD=3*s=0.004 µg/l
Limite de quantification	LQ=3 LD=0.115µg/l	LQ=3*LD=0.012 µg/l

Certaines LQ estimées sont relativement élevées sur la matrice synthétique. Ce problème est lié à l'utilisation d'acide nitrique de pureté non optimale et à une certaine baisse de sensibilité de l'ICP/MS.

Vérification des LQ suivant annexe A norme ISO/TS 13530

Un lot de blanc synthétique et un lot de blanc « eau souterraine » sont respectivement dopés aux limites de quantification estimées ci dessus. Ces deux lots sont ensuite fractionnés en 5 prises d'essais différentes. L'ICP/MS est étalonné à partir d'une gamme étalon établie à partir d'un blanc matrice et de solutions étalons dopées dans la matrice considérée à 1 LQ, 2LQ, 3LQ et 4LQ en l'élément. Les mesures sont effectuées le même jour. Ce protocole se caractérise par une indépendance des échantillons dopés.

	Eau synthétique		
	Cd	Ni	Pb
X LQ (µg/l)	0,0061	0,356	0,1104
Sn	0,0006	0,027	0,009
u calculé	0,0016	0,096	0,0297
sn < u calculé	oui	oui	oui

	Eau souterraine		
	Cd	Ni	Pb
X LQ (µg/l)	0.0107	2.769	0.0162
Sn	0.00058	0.151	0.0024
u calculé	0.0029	0.744	0.0044
sn < u calculé	oui	oui	oui

Les LQ présumées sont vérifiées par les critères définis dans la norme ISO 13530 quels que soit la matrice et les éléments considérés.

Vérification des LQ suivant NF T90-210

Un lot de blanc synthétique et un lot de blanc « eau souterraine » sont respectivement dopés aux limites de quantification estimées. Ces deux lots sont ensuite fractionnés en 5 prises d'essais différentes. Chaque jour une prise d'essai différente est analysée en double. L'ICP/MS est étalonné chaque jour à partir d'une gamme étalon établie à partir d'un blanc matrice et de solutions étalons dopées dans la matrice considérée à 1 LQ, 2LQ, 3LQ et 4LQ en l'élément. Ce protocole se caractérise par une estimation de la fidélité sur 5 jours.

Matrice	Eau synthétique		
	Cd	Ni	Pb
ZLQ (µg/l)	0,0063	0,359	0,105
SLQ (µg/l)	0,00059	0,0283	0,0153
LQ (µg/l)	0,0064	0,412	0,11
ZLQ-2SLQ>LQ-60%LQ	oui	oui	oui
ZLQ+2SLQ<LQ-60%LQ	oui	oui	oui

Matrice	Eau souterraine		
	Cd	Ni	Pb
ZLQ (µg/l)	0.0104	2.703	0.0173
SLQ (µg/l)	0.00082	0.180	0.0028
LQ (µg/l)	0.0105	2.709	0.0126
ZLQ-2SLQ>LQ-60%LQ	oui	oui	oui
ZLQ+2SLQ<LQ-60%LQ	oui	oui	non

Avec :

\bar{z}_{LQ} , pris dans le protocole suivi comme la moyenne des dix dosages effectués (2 sur 5 jours)

s_{LQ} , pris dans le protocole suivi comme l'écart type de fidélité

intermédiaire $S_{LQ} = \sqrt{s_B^2 + s_{répét}^2}$

LQ , pris dans le protocole suivi comme la valeur gravimétrique de référence du dopage aux LQ estimées des lots d'eau synthétique et d'eau de Troyes.

A l'exception du plomb dans l'eau souterraine les limites de quantification présumées par la méthode des blancs sont vérifiées par les critères définis dans la norme NF T90-210 et ceci quels que soit la matrice et les éléments considérés.

APPLICATION A L'ANALYSE DES HAP

Estimation des limites de quantification théoriques, LQ

Les limites de quantification pour chaque composé ont été estimées en étudiant la linéarité sur plusieurs points de faibles concentrations (de 0.1 ng/L à 10 ng/L) :

Composés	Limite de quantification estimée (ng/L)
Benzo[b]Fluoranthène	2
Benzo[k]Fluoranthène	2
Benzo[a]Pyrène	2
Indéno[123, cd]Pyrène	10
Benzo[ghi]Pérylène	5

Tableau 1 : LQ présumée pour chaque composé

Vérification des LQ estimées suivant ISO/TS13530

Le protocole est le suivant : cinq échantillons d'eau d'Evian dopés à la LQ présumée (tableau 1) ont été analysés. L'appareil GC/MS est étalonné à partir d'une gamme étalon à 1xLQ, 2xLQ, 3xLQ et 5xLQ pour les différents composés.

Benzo[b]Fluoranthène			Benzo[k]Fluoranthène		
valeur moyenne	1.87	ng/L	valeur moyenne	1.83	ng/L
racine(n)	2.24		racine(n)	2.24	
coefficient student	2.78		coefficient student	2.78	
écart type théorique	0.50	ng/L	écart type théorique	0.49	ng/L
écart-type expérimental	0.03	ng/L	écart-type expérimental	0.07	ng/L
Limite de quantification vérifiée			Limite de quantification vérifiée		

Indeno[123, cd]Pyrène			Benzo[a]Pyrène		
valeur moyenne	8.86	ng/L	valeur moyenne	1.86	ng/L
racine(n)	2.24		racine(n)	2.24	
coefficient student	2.78		coefficient student	2.78	
écart type théorique	2.38	ng/L	écart type théorique	0.50	ng/L
écart-type expérimental	0.64	ng/L	écart-type expérimental	0.11	ng/L
Limite de quantification vérifiée			Limite de quantification vérifiée		

Benzo[ghi]Pérylène		
valeur moyenne	4.62	ng/L
racine(n)	2.24	
coefficient student	2.78	
écart type théorique	1.24	ng/L
écart-type expérimental	0.41	ng/L
Limite de quantification vérifiée		

Les LQ estimées sont vérifiées par les critères définis dans la norme ISO 13530 quels que soit les composés considérés.

Vérification des LQ estimées suivant NF T90-210

Le protocole est le suivant : cinq échantillons d'eau d'Evian dopés à la LQ présumée (tableau 1) ont été analysés dans des conditions de fidélité intermédiaire :

- cinq échantillons indépendants ont été préparés du fait de l'instabilité des HAP dans l'eau dans le temps,
- les échantillons ont été analysés sur cinq jours,
- chaque jour une nouvelle gamme étalon a été réalisée : 1xLQ, 2xLQ, 3xLQ et 5xLQ pour les différents composés.

Benzo[b]Fluoranthène		
Série	Moyenne des deux répétitions (ng/L)	S ² _{série}
Jour 1	1.84	4.75E-04
Jour 2	1.87	5.74E-05
Jour 3	1.84	1.39E-03
Jour 4	1.83	1.86E-03
Jour 5	1.96	3.39E-03

Benzo[k]Fluoranthène		
Série	Moyenne des deux répétitions (ng/L)	S ² _{série}
Jour 1	1.72	2.45E-03
Jour 2	1.90	4.56E-03
Jour 3	1.78	8.53E-03
Jour 4	1.78	7.99E-04
Jour 5	1.92	4.94E-06

Paramètres d'exactitude de la limite de quantification présumée	
Nombre de séries: n	5
Nombre de répétitions par série : r	2
Variance de répétabilité : s _{répét} ²	1.43E-03
Variance des moyennes : s(z _i) ²	0.00277
Variance inter-séries : s _B ²	0.00206
Variance de fidélité intermédiaire : s _{LQ} ²	0.00349
Moyenne générale : z _{LQ}	1.86
Ecart type de fidélité intermédiaire : s _{LQ}	0.05907
CV de fidélité intermédiaire en % : CV _{LQ}	3.2
Réf	2.00
EMA = 60% * Réf	1.20
LQ + 60% x LQ	3.20
z _{LQ} + 2 x s _{LQ}	1.98
z _{LQ} - 2 x s _{LQ}	1.75
LQ - 60% x LQ	0.80
Exactitude de la limite de quantification vérifiée	OUI

Paramètres d'exactitude de la limite de quantification présumée	
Nombre de séries: n	5
Nombre de répétitions par série : r	2
Variance de répétabilité : s _{répét} ²	3.27E-03
Variance des moyennes : s(z _i) ²	0.00732
Variance inter-séries : s _B ²	0.00569
Variance de fidélité intermédiaire : s _{LQ} ²	0.00896
Moyenne générale : z _{LQ}	1.82
Ecart type de fidélité intermédiaire : s _{LQ}	0.09465
CV de fidélité intermédiaire en % : CV _{LQ}	5.2
Réf	2.00
EMA = 60% * Réf	1.20
LQ + 60% x LQ	3.20
z _{LQ} + 2 x s _{LQ}	2.01
z _{LQ} - 2 x s _{LQ}	1.63
LQ - 60% x LQ	0.80
Exactitude de la limite de quantification vérifiée	OUI

Indeno[123, cd]Pyrène		
Série	Moyenne des deux répétitions (ng/L)	S²_{série}
Jour 1	8.96	3.43E-03
Jour 2	9.64	5.44E-02
Jour 3	9.49	1.93E-03
Jour 4	8.17	1.02E-02
Jour 5	8.30	4.71E-02

Benzo[a]Pyrène		
Série	Moyenne des deux répétitions (ng/L)	S²_{série}
Jour 1	1.72	2.01E-02
Jour 2	2.02	8.80E-05
Jour 3	1.91	3.24E-03
Jour 4	1.72	1.78E-03
Jour 5	1.86	1.49E-02

Paramètres d'exactitude de la limite de quantification présumée	
Nombre de séries: n	5
Nombre de répétitions par série : r	2
Variance de répétabilité : s _{répét} ²	2.34E-02
Variance des moyennes : s(z _i) ²	0.44872
Variance inter-séries : s _B ²	0.43701
Variance de fidélité intermédiaire : s _{LQ} ²	0.46043
Moyenne générale : z _{LQ}	8.91
Ecart type de fidélité intermédiaire : s _{LQ}	0.67855
CV de fidélité intermédiaire en % : CV _{LQ}	7.6
Réf	10.00
EMA = 60% * Réf	6.00
LQ + 60% x LQ	16.00
z _{LQ} + 2 x s _{LQ}	10.27
z _{LQ} - 2 x s _{LQ}	7.55
LQ - 60% x LQ	4.00
Exactitude de la limite de quantification vérifiée	OUI

Paramètres d'exactitude de la limite de quantification présumée	
Nombre de séries: n	5
Nombre de répétitions par série : r	2
Variance de répétabilité : s _{répét} ²	8.02E-03
Variance des moyennes : s(z _i) ²	0.01616
Variance inter-séries : s _B ²	-0.00006
Variance de fidélité intermédiaire : s _{LQ} ²	0.00802
Moyenne générale : z _{LQ}	1.85
Ecart type de fidélité intermédiaire : s _{LQ}	0.08955
CV de fidélité intermédiaire en % : CV _{LQ}	4.8
Réf	2.00
EMA = 60% * Réf	1.20
LQ + 60% x LQ	3.20
z _{LQ} + 2 x s _{LQ}	2.03
z _{LQ} - 2 x s _{LQ}	1.67
LQ - 60% x LQ	0.80
Exactitude de la limite de quantification vérifiée	OUI

Benzo[ghi]Pérylène		
Série	Moyenne des deux répétitions (ng/L)	S²_{série}
Jour 1	4.67	9.27E-03
Jour 2	5.10	1.70E-02
Jour 3	4.94	3.84E-03
Jour 4	4.19	1.49E-03
Jour 5	4.24	7.74E-03

Paramètres d'exactitude de la limite de quantification présumée	
Nombre de séries: n	5
Nombre de répétitions par série : r	2
Variance de répétabilité : $s_{répét}^2$	7.86E-03
Variance des moyennes : $s(z_i)^2$	0.16712
Variance inter-séries : s_B^2	0.16319
Variance de fidélité intermédiaire : s_{LQ}^2	0.17105
Moyenne générale : z_{LQ}	4.63
Ecart type de fidélité intermédiaire : s_{LQ}	0.41359
CV de fidélité intermédiaire en % : CV_{LQ}	8.9
Réf	5.00
EMA = 60% * Réf	3.00
LQ + 60% x LQ	8.00
$z_{LQ} + 2 \times s_{LQ}$	5.45
$z_{LQ} - 2 \times s_{LQ}$	3.80
LQ - 60% x LQ	2.00
Exactitude de la limite de quantification vérifiée	OUI

Les LQ présumées sont vérifiées par les critères définis dans la norme NF T90-210 quels que soit les composés considérés.

CONCLUSION ET REMARQUES

Le LNE a mené ce travail comme une étude de cas spécifique pour AQUAREF, le laboratoire ne réalise pas d'essais de routine et nos conditions d'analyse ne sont donc pas les mêmes qu'un laboratoire prestataire.

Analyse des métaux : Les limites de quantification estimées à partir des écarts-types obtenus sur l'analyse des blancs de matrice sont en général vérifiées par les critères définis dans les normes ISO/TS 13530 et NF T90-210. Cependant il a été observé que lorsque le fond mesuré est très faible car voisin du bruit électronique (cas du cadmium), l'écart type mesuré n'est pas représentatif. Dans ce cas il est préférable de calculer la limite de quantification à partir des comptages du bruit.

Les deux exemples de matrices étudiées montrent la différence entre la LQ instrumentale (eau synthétique) et la LQ méthode (eau souterraine).

Analyse des HAP : Les limites de quantification présumées à partir du rapport signal/bruit n'ont pas pu être appliquées dans nos analyses par GC/MS. En effet, la grande variabilité du signal peut entraîner une mauvaise évaluation de la LQ. Aucune des deux normes n'impose le mode d'estimation de la LQ (la norme ISO 13530 en propose quelques unes), il convient donc d'en déterminer une adaptée à sa méthode d'analyse.

La norme NF T90-210 présente l'avantage de prendre en compte à la fois la notion d'exactitude de la LQ présumée et celle d'incertitude dans ses critères de vérification de la LQ présumée. Cette norme ne préconise aucune méthode pour l'estimation de la LQ.

La notion de reproductibilité dans le temps de la fidélité intermédiaire n'est pas suffisamment explicite dans la définition des séries du plan d'expérience présentée dans la norme NF T90-210. Il serait souhaitable de la préciser pour s'assurer d'une certaine homogénéité dans la manière de vérifier la LQ estimée par les laboratoires d'analyse.

Annexe 3

Exemples proposés par l'INERIS

GLOSSAIRE

Aux fins du présent rapport, les abréviations suivantes sont utilisées :

B[a]A :	Benzo [a] Anthracène
B[b]F :	Benzo [b] Fluoranthène
B[k]F :	Benzo [k] Fluoranthène
B[a]P :	Benzo [a] Pyrène
B[g,h,i]P :	Benzo [g,h,i] Pérylène
D[a,h]A :	Di benzo [a,h] Anthracène
DBT :	di butyl étain (cation)
DOT :	di octyl étain (cation)
EMA :	écart maximal admissible
GC :	chromatographie en phase gazeuse
ICP :	Inductively Coupled Plasma
LQ :	limite de quantification
MBT :	mono butyl étain (cation)
MOT :	mono octyl étain (cation)
MS :	spectromètre (ou spectrométrie) de masse
NQE :	norme de qualité environnementale
PFPD :	photomètre (ou photométrie) de flamme pulsé(e)
TBT :	tri butyl étain (cation)
TCyT :	tri cyclohexyl étain (cation)
TPhT :	tri phényl étain (cation)
TTBT :	tetra butyl étain (cation)

ELEMENTS DE CONTEXTE ET RESUME

Dans le cadre du programme de travail 2009, AQUAREF a proposé de rédiger une note de synthèse sur les modes d'estimation des limites de quantification (LQ) et les implications de la directive QA/QC sur le sujet. Différents modes d'estimation de la LQ sont décrits dans les textes normatifs français et européens. L'objet de cette étude est de comparer sur des essais réels les résultats obtenus selon les différents modes d'estimation des LQ.

L'INERIS a proposé de partager les données obtenues sur différentes familles de substances :

- Organoétains
- HAP
- Chlorophénols.

Ces données sont extraites des dossiers de validation des laboratoires de l'INERIS. Ils ont été établis au moment de la validation interne de chaque méthode, suivant les prescriptions des textes normatifs en vigueur au moment de leur réalisation. Les valeurs les plus récentes ont été établies selon la norme NF T90-210 : 2009 (vérification d'une LQ choisie dans des conditions de reproductibilité avec une exactitude inférieure à 60%).

Cette norme (Paragraphe 5.2 « Etude d'une limite de quantification présumée de la méthode : plan B ») permet la validation d'une limite de quantification présumée.

Pour cela l'analyse d'une eau représentative du domaine d'application (eau naturelle) dopée à la concentration de la limite de quantification choisie doit être réalisée de la manière suivante :

- n prises d'essai avec $n \geq 5$ dans des conditions de fidélité intermédiaire (changement de l'opérateur, de l'étalonnage, de l'équipement, du jour ou de l'environnement) et dans le temps de stabilité de l'échantillon ont été réalisées,
- les échantillons doivent être préparés et analysés sur des jours différents afin de satisfaire ces conditions de fidélité. Chaque analyse est ensuite répétée ($r \geq 2$) dans des conditions de répétabilité.

La limite de quantification (LQ) choisie sera considérée comme valide si les deux inégalités sont respectées :

- $mLQ - 2 * sLQ > LQ - 60\% * LQ$
- $mLQ + 2 * sLQ < LQ + 60\% * LQ$

Pour ce faire, la moyenne (mLQ) des concentrations et l'écart-type sur ces concentrations (sLQ) sont calculés.

Dans le cadre de cette étude, la validation repose sur 5 prises d'essai ($n=5$) et chaque analyse a été répétée 2 fois ($r = 2$). Toutes les conditions sont prises en compte dans une feuille de calcul validée qui permet de statuer sur la limite de quantification testée.

Les valeurs plus anciennes avaient été établies suivant les prescriptions de la norme XP T90-210 : 1999, § 5.1.3.3 (vérification d'une LQ choisie dans des conditions de répétabilité avec un EMA de $\pm 10\%$). Dans ce cas, une estimation de l'EMA obtenu en appliquant les prescriptions de la norme NF T90-210 : 2009 est présentée : elle permet d'évaluer le potentiel d'amélioration de la LQ en cas de révision du dossier de validation.

L'étude de la mise en œuvre de la méthode du rapport signal/bruit, très répandue dans les laboratoires d'analyse chromatographique¹, a permis de révéler des interprétations variables suivant les opérateurs :

- détermination du rapport S/N sur un échantillon ne contenant pas les substances à doser, constituant un blanc réactif complet, comprenant les étalons internes et traceurs, repérée plus loin sous le vocable « méthode B » ;
- détermination du rapport S/N sur un échantillon ne contenant pas les substances à doser ni aucun étalon interne, repérée plus loin sous le vocable « méthode C ».

Et également :

- observation du rapport S/N dans un intervalle de temps de ± 3 fois la largeur à mi-hauteur du niveau de concentration le plus bas de la droite d'étalonnage ($Tr \pm 3 L1/2h$) ;
- observation du rapport S/N dans un intervalle de temps de ± 10 fois la largeur à mi-hauteur du niveau de concentration le plus bas de la droite d'étalonnage ($Tr \pm 10 L1/2h$).

Les différentes LQ déterminées selon la méthode du rapport signal/bruit peuvent différer de manière sensible.

Les résultats obtenus sur chaque famille sont décrits ci-après ; le tableau 1 résume les données chiffrées disponibles.

Il en résulte que :

- les LQ déterminées selon la méthode du rapport signal/bruit peuvent différer de manière sensible selon les options choisies par l'analyste pour l'acquisition des données relatives au bruit de fond ;
- la méthode qui consiste à valider une LQ pré-supposée fournit généralement une LQ supérieure à celle qui peut être obtenue par la détermination du rapport signal/bruit dans un blanc non pollué par la substance étudiée, et parfois à tort. En effet, la validation de la LQ pré-supposée est très lourde au niveau technique et le laboratoire ne peut tester un nombre important de niveaux de concentration. La pratique habituelle consiste généralement à tester des niveaux de concentration différents d'un facteur 2. Le niveau de concentration le plus bas satisfaisant au critère fixé est alors retenu comme étant la LQ, alors qu'il est probable que des niveaux de concentration inférieurs pourraient également être validés s'ils étaient testés ;
- la solution qui paraît la plus pertinente pour déterminer une limite de quantification est de commencer par estimer les performances de la méthode en utilisant le rapport signal/bruit mesuré sur un intervalle de temps encadrant le temps de rétention intelligemment choisi, puis une validation de cette LQ estimée par la méthode NF T 90-210.

¹ - Experimental comparison of the different approaches to estimate LOD and LOQ of an HPLC method. J. Vial, A. Jardy, Anal. Chem., 1999, 71, 2672-2677,

- Guide de validation analytiques, SFSTP, 5 mai 1992.

- ISO 13530 (2009) Qualité de l'eau - Lignes directrices pour le contrôle de qualité analytique pour l'analyse chimique et physicochimique de l'eau, § 4.4.4 & 4.4.5

Substances	NQE(a)	technique instrumentale	Méth. D	Méth. C	Méth. E	EMA sur E	technique instrumentale	Méth.A	EMA recalculé Cf. Méth.E	Méth. B Tr +/- 3 L1/2	Méth B Tr +/- 10 L1/2	Méth C EI Tr +/- 3 L1/2	Méth C EI Tr +/- 10 L1/2
MBT		CG-ICP-MS	4,57	0,60	1,0	≤60%	PFPD	6,0	15%	20,70		6,50	7,00
DBT	170	CG-ICP-MS	1,21	0,13	1,0	≤60%	PFPD	6,2	16%	12,9 - 9,7 ^c		2,30	2,40
TBT	0,2	CG-ICP-MS	0,10	0,03	0,05	≤60%	PFPD	5,1	18%	9,8 - 3,7 ^c		2,10	2,70
TTBT	-	CG-ICP-MS	0,11	0,08	0,05	≤60%	PFPD	5,9	18%	2,60		2,60	4,40
MOT	-	CG-ICP-MS	0,23	0,13	0,25	≤60%							
DOT	-	CG-ICP-MS	0,16	0,03	0,10	≤60%							
TCyT	-	CG-ICP-MS	0,11	0,04	0,10	≤60%							
TPhT	-	CG-ICP-MS	0,05	0,03	0,05	≤60%							
2,4 dichloro phénol^b	10*10 ³						ECD	1390	22%	640	850	(Valeur acceptée mais sur évaluée)	
									560	60%	640	850	(Valeur rejetée)
2,4,6 trichloro phénol^b	4,1*10 ³						ECD	134	54%	99	140		
2,4,5 trichloro phénol^b	10*10 ³						ECD	205	43%	300	2670		
PCP	400						ECD	158	24%	126	145		
anthracène	100	HPLC-fluo			1,0	35%	HPLC-fluo	1,0	15%			1,3	

Substances	NQE(a)	technique instrumentale	Méth. D	Méth. C	Méth. E	EMA sur E	technique instrumentale	Méth.A	EMA recalculé Cf. Méth.E	Méth. B Tr +/- 3 L1/2	Méth B Tr +/- 10 L1/2	Méth C EI Tr +/- 3 L1/2	Méth C EI Tr +/- 10 L1/2
pyrène	24 ^b	HPLC-fluo			1,0	27%	HPLC-fluo	1,0	22%			2,3	
B[a]A	5 ^b	HPLC-fluo			1,0	53%	HPLC-fluo	1,0	13%			1,7	
B[b]F	30	HPLC-fluo			1,0	25%	HPLC-fluo	1,0	14%			1,6	
B[k]F	30	HPLC-fluo			1,0	35%	HPLC-fluo	1,0	9%			0,20	
B[a]P	50	HPLC-fluo			1,0	30%	HPLC-fluo	1,0	8%			0,30	
D[a,h]A	0,06 ^b	HPLC-fluo			1,0	16%	HPLC-fluo	1,0	8%			0,70	
B[g,h,i]P	2	HPLC-fluo			1,0	28%	HPLC-fluo	1,0	4%			0,95	

Tableau 1 : LQ déterminée en fonction de la méthode employée (Unité : ng/l)

Méthode A : XP T 90-210(1996) § 5.1.3.3 (vérification dans des conditions de répétabilité)

Méthode B : calcul en retour de [C] telle que S/N = 10 sur un échantillon contenant les étalons internes et traceur

Méthode C : calcul en retour de [C] telle que S/N = 10 sur un échantillon ne contenant pas les étalons internes et traceur

Méthode D : XP T90-210 (1996) § 5.1.3.2 : $LQ = m_{\text{blanc}} + 10 s_{\text{blanc}}$

Méthode E : NF T90-210(2009) (vérification dans des conditions de reproductibilité)

EMA : écart maximal (admissible) calculé lors de la mise en œuvre du plan d'expérience de vérification de la LQ. Il est comparé à la valeur critique de 60%

^a : Directive 2008/105/CE

^b : Circulaire DCE 2007/23 du 7 mai 2007 - Réglementation française

^c : valeur différente selon l'opérateur

ORGANOETAÏNS

Analyse selon NF EN ISO 17353 (GC-PFPD après dérivation)

La limite de quantification pour 4 composés organoétains analysés par GC-PFPD a été établie selon deux approches :

- XP T90-210 (décembre 1996) selon les prescriptions du § 5.1.3.3. (méthode par vérification d'une limite de quantification choisie) : analyse dans des conditions de répétabilité de 10 prises d'essai identiques issues d'une eau de l'Oise dopée à la limite de quantification choisie (méthode A).
- Détermination du rapport signal sur bruit LQ = 10 S/N obtenu sur une eau de l'Oise dopée avec des étalons internes (méthode B) et sur une eau de l'Oise non dopée en étalons internes (méthode C). Le bruit de fond est déterminé sur un intervalle de temps encadrant le temps de rétention du composé étudié :
 - soit dans un intervalle de temps de ± 3 fois la largeur à mi-hauteur du niveau de concentration le plus bas de la droite d'étalonnage ($Tr \pm 3 L1/2h$) ;
 - soit dans un intervalle de temps de ± 10 fois la largeur à mi-hauteur du niveau de concentration le plus bas de la droite d'étalonnage ($Tr \pm 10 L1/2h$).

Monobutylétain

	Méthode A LQ : 6 ng/L	Méthode B (Tr ± 3 L1/2h)	Méthode C (Tr ± 3 L1/2h)	Méthode C (Tr ± 10 L1/2h)
	6,71	21	6,3	6,3
	6,3	20,7	6,8	6,8
	6,26	22,1	3,05	3,05
	6,63	24,3	5,3	5,3
	5,84	15,8	4,9	6,9
	6	20,6	4,0	7,1
	6,27	19,4	8,4	8,4
	5,9	20,3	8,9	8,9
	6,25	20,1	9,0	9,0
	5,7	23	7,9	7,9
Moyenne LQ		20,7 ng/L	6,5 ng/L	7,0 ng/L
Ecart-type		2,3	2,1	1,8

Commentaires :

- la vérification d'une LQ choisie (XP T 90-210 § 5.1.3.3., méthode A) valide pour le MBT une LQ de 6 ng/L ;
- le blanc réactifs dans lequel les étalons internes ont été ajoutés contient des traces non négligeables de MBT (méthode B). Ces contaminations en MBT proviennent des étalons internes. En raison de cette contamination, le rapport signal sur bruit déterminé à partir de ces blancs est très élevé et de ce fait la LQ obtenue est également très élevée : 20,7 ng/L. Cette approche surestime de manière sensible la LQ, car le niveau de contamination en MBT est constant : il serait donc plus judicieux soit de retrancher cette contamination soit de déterminer le rapport signal/bruit sur un blanc dans lequel les étalons internes n'ont pas été ajoutés (méthode C).

- la LQ déterminée par le rapport signal/bruit obtenue sur des blancs dans lesquels les étalons internes n'ont pas été ajoutés (méthode C) est comparable à la LQ déterminée selon la norme XP T 90-210 : 6,5 ng/L sur un intervalle de temps de rétention restreint ($Tr \pm 3$ L1/2h) et 7 ng/L sur un intervalle de temps de rétention élargi ($Tr \pm 10$ L1/2h). En ce qui concerne le MBT, la différence est faible selon l'intervalle de temps de rétention retenu car le bruit de fond le plus élevé est situé principalement dans la zone la plus restreinte.

Dibutylétain

	Méthode A LQ : 6,2 ng/L	Méthode B Technicien 1 ($Tr \pm 3$ L1/2h)	Méthode B Technicien 2 ($Tr \pm 3$ L1/2h)	Méthode C ($Tr \pm 3$ L1/2h)	Méthode C ($Tr \pm 10$ L1/2h)
	7,1	11,7	8,3	2,6	2,6
	6,64	13,7	7,3	1,6	3,2
	6,12	15	12,2	1,9	1,9
	6,24	14,9	13,2	2,6	2,6
	6,61	10,6	7,9	1,8	1,8
	6,8	11,1	7,8	1,8	1,8
	6,31	13,1	10,7	3,4	3,4
	6,4	14,5	10,4	2,4	2,4
	6,58	12,7	10	2,8	2,8
	6,5	11,7	9,3	1,6	1,6
Moyenne LQ		12,9 ng/L	9,7 ng/L	2,3 ng/L	2,4 ng/L
Ecart-type		1,6	2,0	0,6	0,6

Commentaires :

- la LQ du DBT selon la méthode A par vérification d'une LQ choisie (XP T90-210 § 5.1.3.3) est 6,2 ng/L;
- le blanc réactifs dans lequel les étalons internes ont été ajoutés contient des traces non négligeables de DBT (méthode B). Ces contaminations en DBT proviennent des étalons internes. En raison de cette contamination, le rapport signal sur bruit déterminé à partir de ces blancs est très élevé et de ce fait la LQ obtenue est également très élevée : 12,9 ng/L selon un technicien et 9,7 ng/L selon un autre technicien. Cette différence entre techniciens est due à la manière d'intégrer les pics de DBT qui sont dans la traînée du TTPT (Tétrapropylétain) utilisé comme étalon interne. La détermination de la LQ selon la méthode du rapport signal sur bruit peut donc différer de manière sensible d'un technicien à l'autre selon la manière de tracer la ligne de base pour les petits pics intégrés dans la traînée d'un pic beaucoup plus grand. Quoi qu'il en soit, cette approche surestime de manière sensible la LQ, car le niveau de contamination en DBT est constant : il serait donc plus judicieux soit de retrancher cette contamination soit de déterminer le rapport signal/bruit sur un blanc dans lequel les étalons internes n'ont pas été ajoutés (méthode C).
- la LQ déterminée par le rapport signal/bruit obtenue sur des blancs dans lesquels les étalons internes n'ont pas été ajoutés (méthode C) est inférieure à la LQ déterminée selon la norme XP T 90-210 (méthode A): 2,3 ng/L sur un intervalle de temps de rétention restreint ($Tr \pm 3$ L1/2h) et à 2,4 ng/L sur un intervalle élargi ($Tr \pm 10$ L1/2h). En ce qui concerne le DBT, la différence est faible selon

l'intervalle de temps de rétention retenu car le bruit de fond est relativement constant de chaque côté du DBT.

Tributylétain

	Méthode A LQ : 5,1 ng/L	Méthode B Technicien 1 (Tr ± 3 L1/2h)	Méthode B Technicien 2 (Tr ± 3 L1/2h)	Méthode C (Tr ± 3 L1/2h)	Méthode C (Tr ± 10 L1/2h)
	4,86	11,7	2,9	2,4	2,7
	4,8	11,1	2,3	2,3	2,3
	5,84	9,9	3,4	3,1	3,1
	5,05	11,2	3,6	2,4	3,3
	5,4	8,3	4,2	2,1	3,1
	5	7,65	3,4	2,0	2,4
	5,18	9,4	4,3	2,2	2,7
	5,6	9,7	4,7	2,1	2,7
	4,47	9,65	4,3	1,5	2,7
	4,7	9,6	4,1	1,2	2,1
Moyenne LQ		9,8 ng/L	3,7 ng/L	2,1 ng/L	2,7 ng/L
Ecart-type		1,3	0,7	0,5	0,4

Commentaires :

- la LQ du TBT selon la méthode A par vérification d'une LQ choisie (XP T90-210 § 5.13.3.) est 5,1 ng/L ;
- le blanc réactifs dans lequel les étalons internes ont été ajoutés contient des traces non négligeables de TBT. Ces contaminations en TBT proviennent des étalons internes. En raison de cette contamination, le rapport signal sur bruit déterminé à partir de ces blancs est très élevé et de ce fait la LQ obtenue est également élevée : 9,8 ng/L selon un technicien et 3,7 ng/L selon un autre technicien. Cette différence entre techniciens est due à la manière d'intégrer les pics de TBT qui sont dans la traînée du MHT (Monoheptylétain) utilisé comme étalon interne. La détermination de la LQ selon la méthode du rapport signal sur bruit peut donc différer de manière sensible d'un technicien à l'autre selon la manière de tracer la ligne de base pour les petits pics intégrés dans la traînée d'un pic beaucoup plus grand. Quoi qu'il en soit, cette approche surestime de manière sensible la LQ, car le niveau de contamination en TBT est constant : il serait donc plus judicieux soit de retrancher cette contamination soit de déterminer le rapport signal/bruit sur un blanc dans lequel les étalons internes n'ont pas été ajoutés (méthode C).
- la LQ déterminée par le rapport signal/bruit obtenue sur des blancs dans lesquels les étalons internes n'ont pas été ajoutés (méthode C) est inférieure à la LQ déterminée selon la norme XP T 90-210 (méthode A) : 2,1 ng/L sur un intervalle de temps restreint (Tr ± 3 L1/2h) et 2,7 ng/L sur un intervalle élargi (Tr ± 10 L1/2h). En ce qui concerne le TBT, la différence est faible selon l'intervalle de temps de rétention retenu car le bruit de fond est relativement constant de chaque côté du TBT.

Tetrabutylétain

	Méthode A LQ : 5,9 ng/L	Méthode B (Tr ± 3 L1/2h)	Méthode C (Tr ± 3 L1/2h)	Méthode C (Tr ± 10 L1/2h)
	5,92	2,8	2,8	6,3
	6	3,2	3,2	8
	6,4	2,8	2,7	4,4
	6,43	2,6	3,5	4,7
	5,66	2,9	2,2	3,1
	6,1	2,0	2,0	4,0
	6	2,7	2,8	3,5
	5,4	3,5	2,6	3,0
	5,79	2,2	2,9	3,3
	6,4	2,1	2,1	3,7
Moyenne LQ		2,6 ng/L	2,6 ng/L	4,4 ng/L
Ecart-type		0,5	0,5	1.6

Commentaires :

- la LQ du TTBT selon la méthode A par vérification d'une LQ choisie (XP T90-210 § 5.1.3.3) est 5,9 ng/L;
- le blanc réactifs dans lequel les étalons internes ont été ajoutés (méthode B) ne contient aucune trace de TTBT. La LQ obtenue par le rapport signal/bruit est donc comparable à celle obtenue dans les mêmes conditions sur le blanc réactif non dopé avec les étalons internes (méthode C) : 2,6 ng/L.
- la LQ déterminée selon la méthode C sur un intervalle de temps restreint (Tr ± 3 L1/2h) est inférieure à celle obtenue sur un intervalle de temps élargi (Tr ± 10 L1/2h) : le bruit de fond le plus élevé est situé principalement en dehors de la zone la plus restreinte.

Analyse par GC-ICP-MS

La méthode a été développée sur un couplage entre un GC (Gas Chromatography) et un ICP-MS (Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry). Le couplage GC-ICP-MS est intéressant car l'ICP-MS possède de nombreux avantages par rapport à d'autres détecteurs plus classiques pour la GC (PFPD, FID, ECD, MS...) :

- il possède une plus grande sensibilité que les autres détecteurs et permet d'atteindre des concentrations de l'ordre du ppt pour beaucoup d'éléments ;
- il possède une gamme de linéarité étendue (10^9 : du ng/L au g/L) même s'il est recommandé de ne pas analyser des échantillons trop concentrés afin d'éviter le bouchage des cônes et de risquer un effet de mémoire sur les échantillons suivants ;
- il s'agit d'un détecteur quasiment universel, avec lequel seuls quelques éléments comme l'hydrogène, l'hélium, l'argon, le fluor et le néon ne peuvent pas être mesurés directement ;
- enfin, ce détecteur est sélectif : les composés à doser peuvent être choisis sans prendre en compte la plupart des autres éléments ce qui élimine une majeure partie des interférences qui peuvent apparaître avec un détecteur classique.

Afin de prendre en compte les différentes étapes de préparation de l'analyse et la perte éventuelle de matière au cours de celles-ci, plusieurs étalons internes sont ajoutés dans l'échantillon. Ces étalons sont choisis pour leur absence dans l'environnement. L'étape de dérivation ayant un rendement différent pour chaque degré de substitution, il est

nécessaire de rapporter l'analyte à un étalon interne de même substitution afin de s'affranchir de ces rendements. Par exemple, le TBT sera étalonné par le TPT. Les étalons internes choisis sont identiques à ceux utilisés pour le dosage par GC-PFPD.

L'étude a été menée sur une eau souterraine (EVIAN®).

La concentration présumée à valider a été choisie, pour chaque organo-étain, en fonction de l'intensité du signal par rapport au blanc, un blanc d'analyse étant systématiquement injecté avec les étalons de la gamme. Une marge de sécurité suffisante a été prise afin que les blancs n'aient, en aucune manière, d'interférences significatives sur le signal. Un rapport d'environ 3 a été pris entre l'aire du signal obtenu dans l'échantillon correspondant au blanc d'analyse et le signal obtenu à la concentration supposée être la limite de quantification.

OTC par CG-IPC-MS

Substances	LQ présumée selon la méthode B (ng/L)	LQ validée (ng/L) Méthode E	LQ calculée sur la base du rapport S/N (ng/L) des chromatogrammes des échantillons
MBT	0,50	1,00	0,60
DBT	0,25	1,00	0,13
TBT	0,05	0,05	0,03
TTBT	0,05	0,05	0,08
MOT	0,10	0,25	0,13
DOT	0,10	0,10	0,03
TCyT	0,05	0,10	0,04
TPhT	0,05	0,05	0,03

Certaines limites présumées ont dû être révisées, d'un facteur 2 à 4, les résultats des tests statistiques n'étant pas satisfaisants.

Pour le TBT et le DBT, seuls organoétains dont les teneurs dans l'eau sont réglementées par les directives européennes, les concentrations validées comme LQ sont respectivement de 0,05 ng/L et de 1 ng/L. Ces concentrations sont inférieures à 1/3 de la NQE qui sont fixées respectivement à 0,2 ng/L et 170 ng/L.

Une limite de quantification « instrumentale » a également été calculée sur la base du rapport S/N des données d'analyse relatives aux échantillons de validation de la LQ. Les LQ calculées pour chaque organoétain ont permis de déduire les LQ reportées dans le 0 Elles sont majoritairement inférieures à celles obtenues par vérification.

CHLOROPHENOLS : ANALYSE SELON NF EN 12673 (DOSAGE PAR GC/ECD APRES DERIVATION)

La limite de quantification pour 4 composés chlorophénols analysés par GC-ECD a été établie selon deux approches :

- XP T 90-210 (décembre 1999) § 5.1.3.3 : analyse dans des conditions de répétabilité de 10 prises d'essai identiques issues d'une eau de source (La Neuville-en-Hez) dopée à la limite de quantification choisie (méthode A).
- Détermination du rapport signal sur bruit LQ =10 S/N obtenu sur une eau de source (La Neuville-en-Hez) dopée avec des étalons internes (méthode B). Les étalons internes n'apportant pas de traces des chlorophénols recherchés, il n'a pas été utile de déterminer le rapport signal/bruit sur une eau non dopée en étalons internes. Le bruit de fond est déterminé sur un intervalle de temps centré sur le temps de rétention du composé étudié :
 - soit dans un intervalle de temps de ± 3 fois la largeur à mi-hauteur du niveau de concentration le plus bas de la droite d'étalonnage ($Tr \pm 3 L1/2h$) ;
 - soit dans un intervalle de temps de ± 10 fois la largeur à mi-hauteur du niveau de concentration le plus bas de la droite d'étalonnage ($Tr \pm 10 L1/2h$).

2,4 dichlorophénol

	Méthode A LQ : 1,39 µg/L	Méthode B (Tr \pm 3 L1/2h)	Méthode B (Tr \pm 10 L1/2h)
	1.44	0.72	0.72
	1.49	0.94	0.94
	1.51	0.7	0.70
	1.20	0.63	0.63
	1.29	0.68	0.68
	1.51	0.71	0.71
	1.58	0.61	0.61
	1.52	0.39	0.79
	1.41	0.49	1.4
	1.26	0.49	1.3
Moyenne LQ		0.64 µg/L	0.85 µg/L
Ecart-type		0.15	0.28

Commentaires :

- la LQ du 2,4 dichlorophénol selon la méthode A par vérification d'une LQ choisie (XP T 90-210) est 1,39 µg/L ; Une LQ plus basse (0,56 µg/l) a été testée mais a été rejetée car elle ne satisfaisait pas au critère de fidélité (24,9 % pour un critère de 20 %).
- la LQ déterminée par le rapport signal/bruit (méthode B) est inférieure à la LQ déterminée selon la norme XP T 90-210 quelle que soit l'intervalle de temps étudié pour la détermination du bruit de fond. Toutefois, il est probable qu'une LQ inférieure aurait pu être validée selon la méthode A si des niveaux de concentration intermédiaires entre la LQ rejetée à cause du non-respect du critère de fidélité (0,56 µg/l) et la LQ validée (1,39 µg/l) avaient été testés.

2.4.6 Trichlorophénol

	Méthode A LQ : 0,134 µg/L	Méthode B (Tr ± 3 L1/2h)	Méthode B (Tr ± 10 L1/2h)
	0,137	0,135	0,135
	0,133	0,112	0,112
	0,086	0,13	0,155
	0,095	0,103	0,137
	0,097	0,109	0,127
	0,107	0,109	0,109
	0,141	0,09	0,149
	0,122	0,058	0,143
	0,089	0,0625	0,174
	0,085	0,083	0,156
Moyenne LQ		0,099 µg/L	0,140 µg/L
Ecart-type		0,026	0,020

Commentaires :

- la LQ du 2.4.6 trichlorophénol selon la méthode A par vérification d'une LQ choisie (XP T 90-210) est 0,134 µg/L ;
- la LQ déterminée par le rapport signal/bruit (méthode B) est soit comparable (Tr ± 10 L1/2h) soit meilleure (Tr ± 3 L1/2h) à la LQ déterminée selon la norme XP T 90-210 en fonction de l'intervalle de temps étudié pour la détermination du bruit de fond.

2,4,5 Trichlorophénol

	Méthode A LQ : 0,205 µg/L	Méthode B (Tr ± 3 L1/2h)	Méthode B (Tr ± 10 L1/2h)
	0,223	0,435	3,24
	0,243	0,375	2,77
	0,154	0,32	2,82
	0,165	0,326	2,87
	0,203	0,283	2,52
	0,213	0,33	2,71
	0,151	0,23	2,22
	0,205	0,24	2,18
	0,138	0,22	2,64
	0,138	0,24	2,72
Moyenne LQ		0,300 µg/L	2,67 µg/L
Ecart-type		0,070	0,31

Commentaires :

- la LQ du 2.4.5 trichlorophénol selon la méthode A par vérification d'une LQ choisie (XP T 90-210) est 0,205 µg/L ;
- la LQ déterminée par le rapport signal/bruit (méthode B) est supérieure quel que soit l'intervalle de temps étudié pour la détermination du bruit de fond. La présence d'un pic parasite de taille très importante dans la plage la plus large (Tr ± 10 L1/2h) génère une LQ 13 fois plus élevée que par la méthode A.

Pentachlorophénol

	Méthode A LQ : 0,158 µg/L	Méthode B (Tr ± 3 L1/2h)	Méthode B (Tr ± 10 L1/2h)
	0,156	0,126	0,161
	0,151	0,099	0,128
	0,157	0,08	0,113
	0,158	0,076	0,107
	0,162	0,179	0,179
	0,184	0,17	0,170
	0,120	0,186	0,186
	0,141	0,173	0,173
	0,157	0,084	0,126
	0,165	0,083	0,111
Moyenne LQ		0,126 µg/L	0,145 µg/L
Ecart-type		0,044	0,031

Commentaires :

- la LQ du pentachlorophénol selon la méthode A par vérification d'une LQ choisie (XP T 90-210) est 0,158 µg/L;
- la LQ déterminée par le rapport signal/bruit (méthode B), quel que soit l'intervalle de temps étudié pour la détermination du bruit de fond, est comparable à celle obtenue selon la méthode A.

HAP : DOSAGE SELON NF EN ISO 17993

La limite de quantification pour 8 HAP (anthracène, pyrène, B[a]A, B[b]F, B[k]F, B[a]P, D[a,h]A, B[g,h,i]P) analysés par HPLC et détection fluorimétrique a été établie selon trois approches :

- XP T 90-210 § 5.1.3.3 (décembre 1999) selon la méthode par vérification d'une limite de quantification choisie : analyse dans des conditions de répétabilité de 10 prises d'essai identiques issues d'une eau d'Evian dopée à la limite de quantification choisie (méthode A).
- NF T 90-210 (mai 2009) selon la méthode par vérification d'une limite de quantification choisie : analyse dans des conditions de fidélité intermédiaire de 5 séries x 2 prises d'essai identiques issues d'une eau d'Evian dopée à la limite de quantification choisie.
- Détermination du rapport signal sur bruit LQ = 10 S/N obtenu sur de l'eau d'Evian. Le bruit de fond est déterminé sur un intervalle de temps de ± 3 fois la largeur à mi-hauteur du niveau de concentration le plus bas de la droite d'étalonnage (Tr ± 3 L1/2h) centré sur le temps de rétention du composé étudié.

Dans le tableau 11 sont reportés, pour chacun des paramètres :

- dans la deuxième colonne les LQ validées selon la XP T 90-210 avec les valeurs et critères de justesse et fidélité correspondante ;
- dans la troisième colonne est reportée la LQ validée selon la norme NF T 90-210.

Afin de pouvoir mieux comparer les données, les valeurs obtenues en conditions de répétabilité selon XP T 90-210 ont également été traitées comme des données obtenues en conditions de fidélité intermédiaire selon NF T 90-210. Il est ainsi possible de comparer l'écart maximal acceptable permettant de valider la LQ selon les deux approches.

HAP

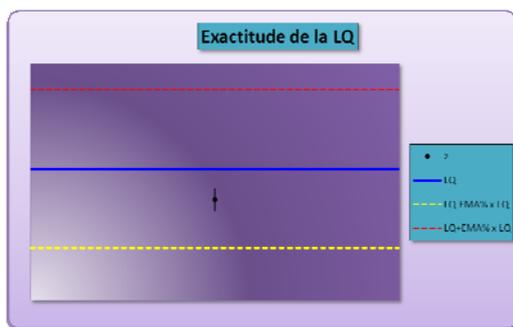
Composé	XP T90-210	NF T90-210	S/N (Tr ± 3 L1/2h)
anthracène	1 ng/L Valeur du critère de justesse: 6,66 Valeur du critère de fidélité : 3,31 EMA recalculé : 15%	1 ng/L EMA observé: 35%	1,3 ng/L
pyrène	1 ng/L Valeur du critère de justesse : 2,92 Valeur du critère de fidélité : 6,08 EMA recalculé : 22%	1 ng/L EMA observé: 27%	2,3 ng/L
B[a]A	1 ng/L Valeur du critère de justesse : 3,86 Valeur du critère de fidélité : 3,60 EMA recalculé : 13%	1 ng/L EMA observé: 53%	1,7 ng/L
B[b]F	1 ng/L Valeur du critère de justesse : 3,48 Valeur du critère de fidélité : 4,10 EMA recalculé : 14%	1 ng/L EMA observé: 25%	1,6 ng/L
B[k]F	1 ng/L Valeur du critère de justesse : 7,25 Valeur du critère de fidélité : 1,96 EMA recalculé : 9%	1 ng/L EMA observé: 35%	0,2 ng/L
B[a]P	1 ng/L Valeur du critère de justesse : 4,40 Valeur du critère de fidélité : 2,15 EMA recalculé : 8%	1 ng/L EMA observé: 30%	0,3 ng/L
D[a,h]A	1 ng/L Valeur du critère de justesse : 2,42 Valeur du critère de fidélité : 2,39 EMA recalculé : 8%	1 ng/L EMA observé: 16%	0,7 ng/L
B[g,h,i]P	1 ng/L Valeur du critère de justesse : 1,09 Valeur du critère de fidélité : 1,49 EMA recalculé : 4%	1 ng/L EMA observé: 28%	0,95 ng/L

Valeurs critiques : critère de justesse : 10
critère de fidélité : 20

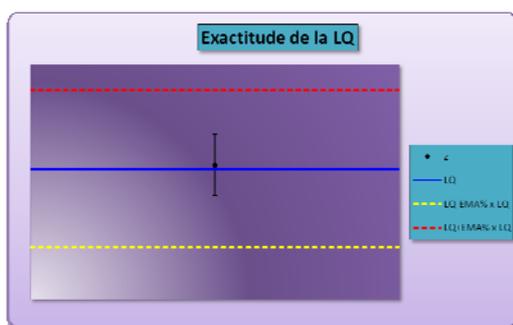
Les limites de quantification déterminées selon l'approche du rapport signal sur bruit diffèrent jusqu'à un facteur 10 en fonction des HAP. En effet, les longueurs d'onde d'excitation et d'émission du fluorimètre sont différentes en fonction du HAP analysé. Or, le bruit de fond varie de manière très sensible selon des longueurs d'onde appliquées.

Ainsi, aux longueurs d'onde d'excitation (300 nm) et d'émission (420 nm) appliqués pour la détection du B[k]F et du B[a]P, le bruit de fond est pratiquement 10 fois inférieur à celui observé aux longueurs d'onde d'excitation (272 nm) et d'émission (392 nm) appliquées pour la détection du pyrène. On peut donc supposer que des limites de quantification plus basses auraient pu être validées selon les approches XP T 90-210 et NF T 90-210 pour le B[k]F et le B[a]P. Il est néanmoins intéressant de remarquer que l'EMA recalculé à la teneur testée de 1 ng/L n'est pas meilleur pour ces deux composés que pour le pyrène.

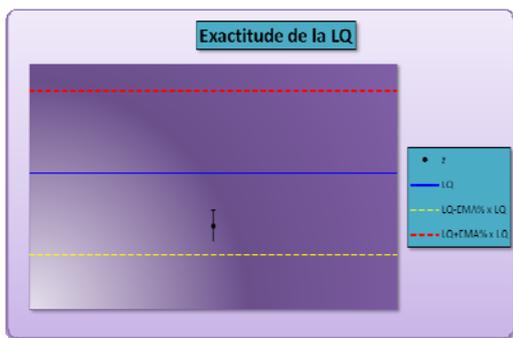
Les représentations graphiques correspondant à l'application de la NF T 90-210 obtenues en conditions de fidélité intermédiaire sont les suivantes :



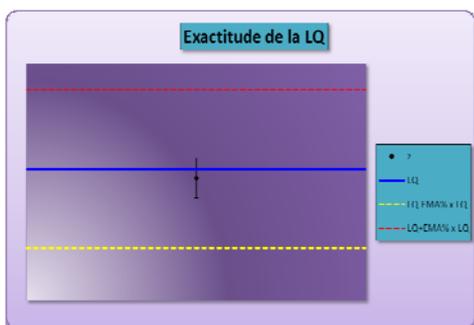
Anthracène



Pyrène

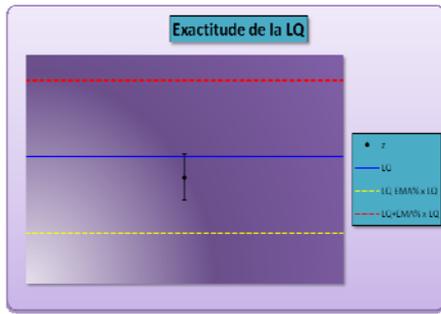


B[a]A

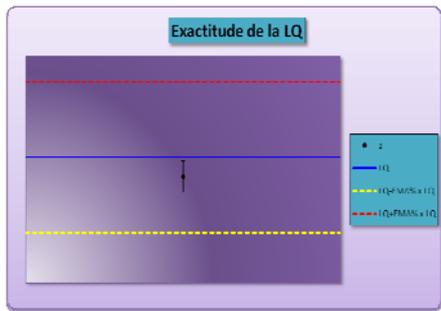


B[b]F

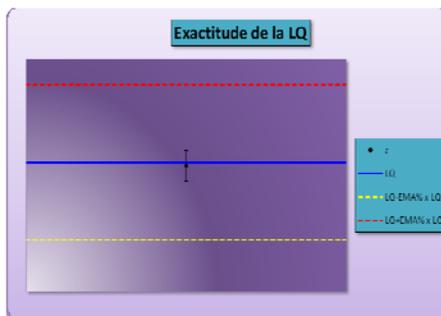
Conséquences de la directive européenne 2009/90/CE sur l'estimation des limites de quantification des méthodes d'analyse chimique



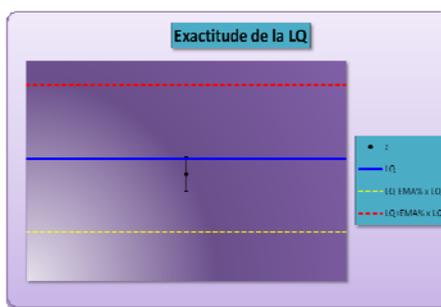
B[k]F



B[a]P



D[a,h]A



B[g,h,i]P

CONCLUSIONS

- Les LQ déterminées selon la méthode du rapport signal/bruit peuvent différer de manière sensible :
 - selon l'étendue de l'intervalle de temps encadrant le temps de rétention du pic considéré (d'un facteur 10 dans le cas du 2,4,5 trichlorophénol) ;
 - selon que la détermination est réalisée sur un blanc dopé ou non dopé en étalons internes lorsque ceux-ci apportent des contaminants (d'un facteur 2 à 6 pour le monobutylétain et le dibutylétain) ;
 - selon le technicien qui trace les lignes de base, plus particulièrement quand un pic parasite est intégré dans la trainée d'un pic d'étalon interne (jusqu'à un facteur 3 pour le tributylétain).
- La méthode qui consiste à valider une LQ pré-supposée fournit généralement une LQ supérieure à celle qui peut être obtenue par la détermination du rapport signal/bruit dans un blanc non pollué par la substance étudiée. En effet, la validation de la LQ pré-supposée est très lourde au niveau technique et le laboratoire ne peut tester un nombre important de niveaux de concentration. La pratique habituelle consiste généralement à tester des niveaux de concentration différents d'un facteur 2. Le niveau de concentration le plus bas satisfaisant au critère fixé est alors retenu comme étant la LQ, alors qu'il est probable que des niveaux de concentration inférieurs pourraient également être validés si ils étaient testés.
- L'étude du bruit de fond sur un intervalle de temps égal à 10 fois la largeur à mi-hauteur du pic du standard et centré sur le temps de rétention de celui-ci ($T_r \pm 10 L/2h$) est contestable, car elle prend en compte des pics parasites parfois élevés et qui ne peuvent pas être confondus avec le composé étudié (cas du 2,4,5 trichlorophénol). Plutôt que de mesurer le bruit de fond sur un intervalle de temps défini comme un multiple de la largeur à mi-hauteur, il pourrait être plus judicieux de le définir à partir d'un multiple de l'écart-type de répétabilité du temps de rétention ou d'une combinaison des deux. En effet, si le composé est très large mais que son temps de rétention est très répétable, il paraît inutile d'estimer le bruit de fond sur un intervalle de temps correspondant à 6 ou 20 fois sa largeur à mi-hauteur. Par contre, si le pic est très fin mais son temps de rétention extrêmement variable, estimer le bruit de fond sur un intervalle de temps limité à 6 fois sa largeur à mi-hauteur peut ne pas être suffisant.
- La solution qui paraît la plus pertinente pour déterminer une limite de quantification est de commencer par « approcher » cette LQ par une estimation du rapport signal/bruit sur un intervalle de temps encadrant le temps de rétention judicieusement choisi, puis de valider de cette LQ estimée par la méthode NF T 90-210.

Annexe 4

Exemples proposés par le BRGM

OBJECTIF

Les objectifs des essais réalisés sur deux méthodes d'analyse chimique sont les suivants :

- Estimer les limites de quantification de ces méthodes suivant les principes de la norme ISO/TS 13530 et appliquer la méthode de vérification de ces LQ suivant l'annexe A (informatif) de ce texte.
- Estimer les limites de quantification de ces méthodes suivant les principes de la norme NF T90-210.
- Comparer les différentes estimations

METHODES D'ANALYSE ET METHODOLOGIE D'ESTIMATION DES LQ

Analyses d'éléments traces par ICPMS

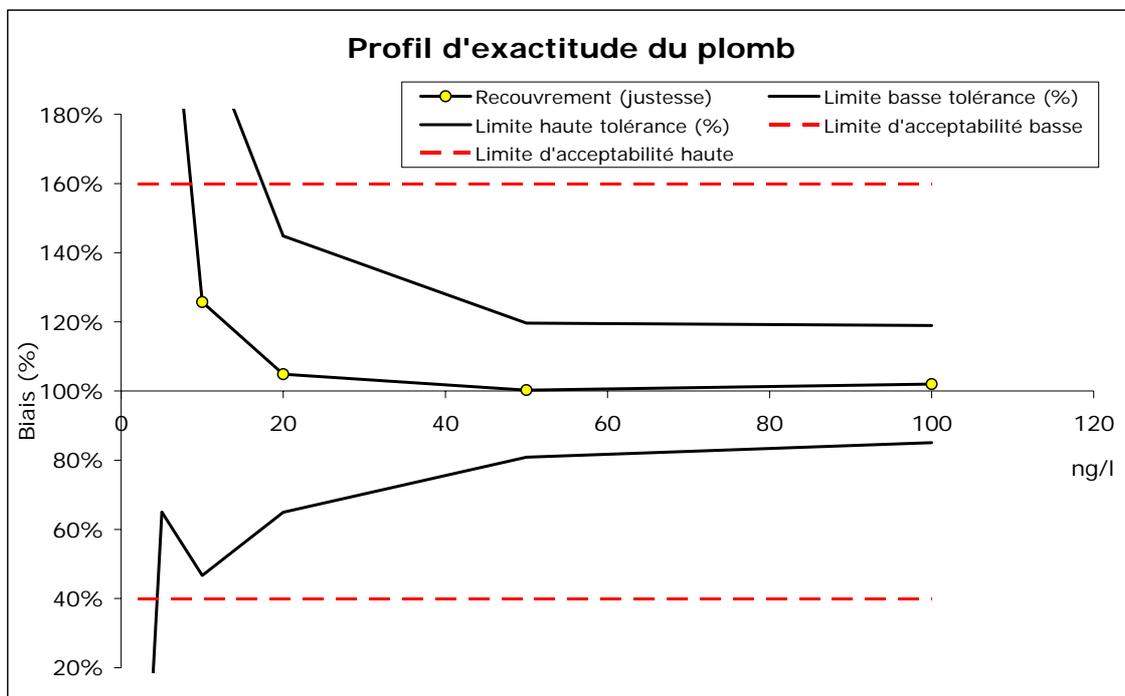
Les éléments Cr, Co, Cu, Ni, Zn, Cd et Pb ont été analysés par ICPMS. L'appareil utilisé est un ICPMS Série X disposant d'une cellule de collision réaction. Trois standards internes sont utilisés.

Norme NF T90-210

Un échantillon d'eau de source a été dopé à 6 niveaux de concentration : 2, 5, 10, 20, 50 et 100 ng/l. Les 6 échantillons ont été acidifiés et ont été analysés en conditions de fidélité intermédiaire sur 5 séries (5 jours différents). Dans chaque série les analyses sont effectuées en double.

Les résultats sont ensuite exploités comme dans la norme NF T90-210. La moyenne des résultats ainsi que l'écart-type de fidélité intermédiaire S_{FI} sont calculés pour chaque niveau. Des graphes représentant, en fonction de la concentration, l'exactitude de la méthode sont tracés (cf exemple ci-dessous pour le plomb). Le niveau de confiance pour ces graphes est d'environ 90% afin de respecter le facteur d'élargissement arbitraire de 2 fixé par la norme NF T90-210.

Ces profils d'exactitude permettent d'estimer la limite de quantification : celle-ci est définie dans la norme par une limite de tolérance de 60% (exactitude inférieure à 60%). Quand la valeur de 60% est dépassée entre 2 niveaux de concentrations, le niveau le plus élevé a été choisi comme étant la LQ dans les résultats ci-dessous). Dans l'exemple du plomb, la LQ est validée à 20 ng/l.



Norme ISO/TS 13530 (paragraphe 4.4.2)

Dix analyses d'une eau ultra pure ainsi que 10 analyses de l'eau de source non dopée utilisée pour les tests de la norme NF T90-210 ont été effectuées dans une même série analytique. L'écart-type sur les 10 résultats ainsi que la moyenne ont été calculés afin de déterminer la limite de quantification comme dans la norme ISO/TS13530.

Le test de vérification de la limite de quantification (Annexe informative A – cf paragraphe 3.2.5 du rapport) a également été appliqué. Pour cela, après estimation de la limite de quantification suivant la méthode des blancs, les résultats obtenus pour la méthode NF T90-210 sur les échantillons dopés ont été exploités pour le niveau correspondant à cette LQ. La vérification a été effectuée à partir uniquement de 5 résultats pris au hasard dans les séries. Comme décrit dans la norme ISO/TS 13530, il a été vérifié que l'écart-type sur ces 5 valeurs était inférieur à 27% (attention, les conclusions pourraient être très différentes suivant le nombre de résultats pris en compte. C'est d'ailleurs selon nous un des défauts de cette méthode).

Résultats et interprétation

Les résultats des essais sont présentés dans le tableau ci-dessous. Il s'agit des limites de quantification estimées suivant les deux méthodes.

	Cr	Co	Ni	Cu	Zn	Cd	Pb
NF T90-210	50	5	100	100	100	5	20
ISO/TS13530 (eau ultra pure)	5	3	15	30	60	5	20
ISO/TS13530 (eau de source)	15	4	120	150	70	2	15
Critère de performance vérifié (eau de source) n=5	non	oui	oui	oui	oui/non ⁽¹⁾	oui	oui

(1) le critère est vérifié à 100 mais pas à 50 ng/l

Ces résultats montrent que :

- les estimations peuvent être très différentes pour la norme 13530 entre une eau ultra pure et une eau à matrice. Cependant cette différence peut être considérée comme « artificielle » car les éléments qui sont pris en compte dans l'estimation des blancs sont certainement liés plus à la présence des éléments considérés dans l'échantillon qu'à l'influence de la matrice elle-même. Pour ces éléments (Ni, Cu) il est très difficile de trouver des matrices non contaminées.
- de façon générale, les estimations entre les deux méthodes en prenant en compte l'eau de source sont du même ordre de grandeur (excepté pour Cr). Si on considère l'eau ultra pure, les estimations de la norme 13530 sont pour certains éléments beaucoup plus faibles.
- Comme décrit dans le rapport (cf 3.2.5), la vérification de LQ suivant la norme ISO/TS 13530 est satisfaite dans tous les cas lorsque les LQ sont du même ordre de grandeur que celles vérifiées par la NF T90-210. Par contre, elle n'est pas satisfaite pour le chrome pour lequel la LQ

estimée est beaucoup plus faible. Ceci traduit le fait que quelle que soit l'estimation effectuée, c'est la vérification du critère de performance associé qui prime (dès lors que la normalisation en impose un ce qui est le cas dans la norme NF T90-210 et dans la norme ISO/TS 13530 hormis le fait que les critères fixés dans cette dernière norme sont informatifs et peu pertinents).

Analyses de pesticides par LC MSMS

Les échantillons d'eau (prise d'essai 1L) ont été extraits par extraction en phase solide (cartouche OASIS HLB, 500 mg de phase) à pH neutre. Un traceur d'extraction (atrazine d5) a été introduit avant la phase d'extraction et un traceur d'analyse (simazine d10) est ajouté avant analyse. Les extraits ainsi obtenus ont été analysés par UPLC/MS/MS (ultraHigh pressure liquid chromatography, mass spectrometry) sur le modèle Quattro Premier XE (Waters Instrument) en mode MRM (MultiReaction monitoring) par utilisation d'une transition de quantification et une transition de qualification pour chaque molécule analysée. La calibration est vérifiée par une solution croisée de contrôle et des points de contrôle de gamme sont effectués tous les 10 échantillons.

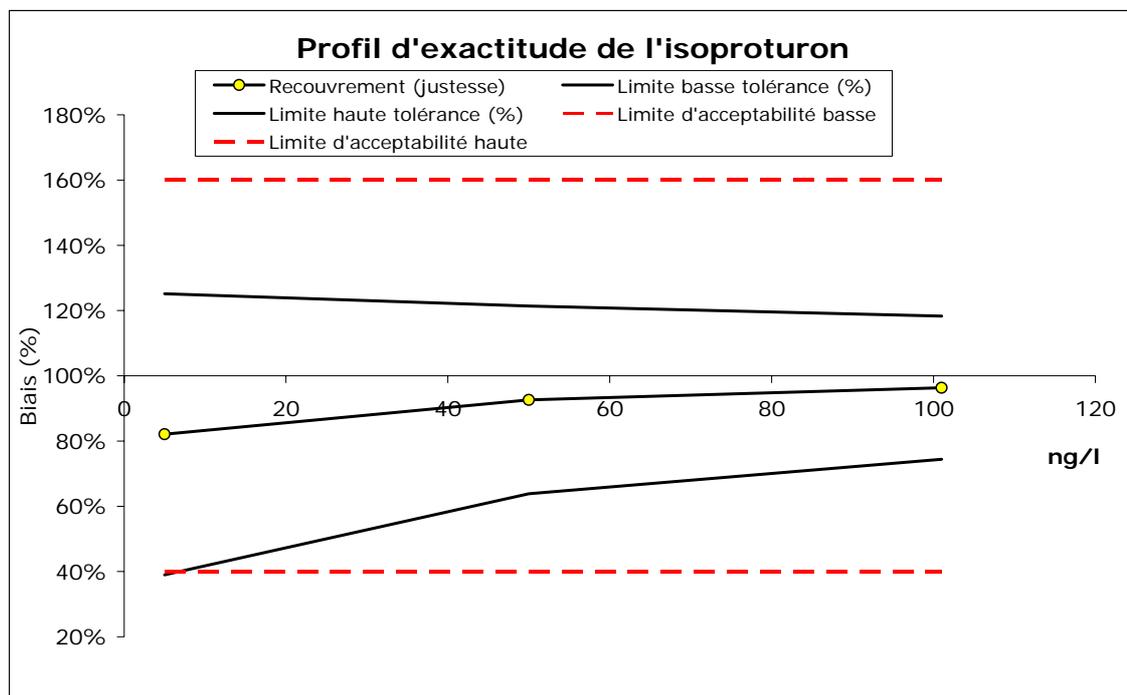
La colonne chromatographique utilisée est de type BEH-C18, 150mm (1.7µm film thickness).

Les substances qui ont été analysés sont données dans le tableau des résultats.

Norme NF T90-210

Un échantillon d'eau de source a été dopé à 3 niveaux de concentrations : 5, 50 et 100 ng/l. Les dopages ont été effectués avant chaque série d'analyse. Les échantillons dopés ont été analysés dans 5 séries effectuées dans des conditions de fidélité intermédiaire. Dans chaque série, les échantillons ont été analysés 2 fois (répétition de la totalité du mode opératoire y compris l'extraction).

Les résultats sont ensuite exploités comme dans la norme NF T90-210. La moyenne des résultats ainsi que l'écart-type de fidélité intermédiaire S_{FI} sont calculés pour chaque niveau. Des graphes représentant, en fonction de la concentration, l'exactitude de la méthode sont tracés (cf exemple ci-dessous pour l'isoproturon). Le niveau de confiance pour ces graphes est d'environ 90% afin de respecter le facteur d'élargissement arbitraire de 2 fixé par la norme NF T90-210.



Les profils d'exactitude permettent d'estimer la limite de quantification : celle-ci est définie dans la norme par une limite de tolérance de 60% (exactitude inférieure à 60%). Quand la valeur de 60% est dépassée entre 2 niveaux de concentrations, le niveau le plus élevé a été choisi comme étant la LQ dans les résultats ci-dessous). Dans l'exemple de l'isoproturon, la LQ a été validée « à la limite » à 5 ng/l. Dans quelques cas, même à 5 ng/l, les 60% d'exactitude ne sont pas dépassés. Dans ce cas, les LQ ont été données comme « <5 ».

Norme ISO/TS 13530 (paragraphe 4.4.2)

Les paragraphes 4.4.2 et 4.4.4 de la norme ont été appliqués.

Le paragraphe 4.4.2 correspond à l'estimation de la LQ à partir de 10 répétitions d'un échantillon blanc ne contenant pas l'analyte. Cette estimation a été faite sur deux solutions : une solution de solvant et une solution d'une eau de source extraite. Sur l'eau de source extraite, certains pesticides étaient présents dans l'échantillon d'où des estimations de la LQ très certainement surestimées.

Le paragraphe 4.4.4 correspond à une estimation de la LQ basée sur la détermination de la concentration d'analyte qui donne un rapport signal sur bruit de 10. Le positionnement de la zone d'estimation du bruit a été fait de façon manuelle (une incertitude relativement forte peut être liée à ce positionnement) Cette estimation n'a été appliquée que sur quelques molécules.

La méthode de vérification des LQ estimées n'a pas été appliquée sur ces essais.

Résultats et interprétation

Les résultats pour les 3 types d'essais suivant la norme ISO/TS 13530 et pour les essais de la norme NF T90-210 sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Limites de quantification en ng/l	ISO/TS 13530			NF T90-210
	Méthode des blancs (solvant)	Méthode des blancs (échantillon extrait)	Rapport signal/bruit	Méthode de l'exactitude
DIA	3	7 (1)	0,5	<5
DEA	2	15 (1)	0,6	<5
Simazine	2	7 (1)	0,4	<5
Atrazine	2	10 (1)	-	<5
Propazine	0,4	3	0,5	<5
Desmetryne	1	4 (1)	-	<5
Prometryne	1	2	0,5	<5
Ametryne	0,9	2 (1)	-	<5
Isoproturon	1	4 (1)	0,3	5
Chlortoluron	3	2	-	5
Diuron	2	2,0	-	<5
Linuron	3	2	-	50
Metazachlore	4	2	-	20
Metolachlore	1	3	-	<5
Alachlore	1	5	1,4	50
Acetochlore	4	7 (1)	-	50
Propyzamide	4	12	2,3	50

(1) : le résultat est artificiellement élevé en raison de la présence du composé dans l'échantillon extrait.

Les conclusions suivantes peuvent être faites :

- De façon générale, les estimations faites par la méthode des blancs sur solvant sont inférieures (au maximum d'un facteur 10) ou du même ordre de grandeur que les estimations faites sur échantillon extrait.
- L'estimation par le rapport signal/bruit donne les résultats les plus faibles de toutes les méthodes (exception alachlore et propazine).
- Les résultats basés sur l'étude des blancs donnent des résultats plus faibles ou du même ordre de grandeur que ceux obtenus par l'étude type NF T90-210 pour les molécules dont il a été possible de définir la LQ (isoproturon,

chloroluron, Linuron, ...). Pour les autres molécules, il est simplement possible de dire que les résultats sont compatibles. La méthode des blancs ne donne jamais de résultats plus forts.

- Pour certaines substances les écarts entre estimations de LQ sont importants. Par exemple, pour l'alachlore la LQ suivant la méthode du signal sur bruit est inférieur d'un facteur 30 à l'estimation type NF T90-210 et l'estimation suivant la méthode des blancs est inférieure d'un facteur 10 à l'estimation type NF T90-210.

Conclusion générale

Les conclusions de ces essais montrent :

- Que les estimations de limite de quantification peuvent être très diverses suivant les méthodes utilisées
- De façon générale, les estimations basées sur la norme ISO/TS 13530 sont du même ordre de grandeur ou plus faibles que les estimations basées sur la norme NF T90-210.
- Les estimations basées sur une évaluation du rapport signal sur bruit sont faibles. Il n'a pas été vérifié dans ces essais que les critères de vérification de ces LQ étaient vérifiés suivant la norme ISO/TS 13530 (annexe A).
- Dans tous les cas, il paraît indispensable de fixer des critères de performances que le laboratoire devra vérifier pour valider l'estimation de la limite de quantification. Des critères de performance sont parfaitement définis dans la norme NF T90-210. Des critères de performance existent dans la norme ISO/TS 13530 mais ils sont informatifs et ne paraissent pas pertinents.

Annexe 5

Exemples proposés par l'IFREMER

EXEMPLE D'UTILISATION DES NORMES NF T90-210 ET ISO/TS 13530 POUR L'ESTIMATION ET LA VERIFICATION DES LIMITES DE QUANTIFICATION, APPLICATION AU DOSAGE DU MERCURE TOTAL DANS DES ORGANISMES ET DES SEDIMENTS MARINS.

Ifremer, Centre de Nantes - Département « Biogéochimie et Ecotoxicologie »

Brach-Papa C., Crochet S., Cossa D. et Chiffolleau J.F.

OBJECTIF DE L'ETUDE

L'objectif de cette étude, effectuée pour Aquaref (groupe de travail : modes d'estimation des LQ), consiste à appliquer et comparer les approches décrites dans les normes NF T90-210 et ISO/TS 13530. Ces deux documents proposent différentes méthodes pour l'estimation d'une limite de quantification et la vérification d'une limite présumée (issue d'une détermination expérimentale, fixée par une exigence réglementaire ou par l'analyste).

A titre d'illustration ces approches sont appliquées au dosage du mercure total dans des organismes et des sédiments marins selon la méthode Ifremer. Cette méthode repose sur l'utilisation d'un analyseur semi-automatique AMA-254 (Altec Ltd.). L'échantillon est introduit dans l'analyseur puis calciné. Le mercure contenu est volatilisé puis amalgamé sur un piège de sable doré. Enfin, le mercure est libéré par chauffage puis quantifié par spectrométrie d'absorption atomique. Le matériel et les réactifs utilisés dans cette étude sont décrits dans un fascicule Ifremer (*D. Cossa, M. Coquery, K. Nakhlé, et D. Claisse ; Dosage du mercure et du monoéthylmercure dans les organismes et les sédiments marins, Edition Ifremer (2002)*). Les méthodologies utilisées pour l'acquisition des données et leur traitement sont présentées dans les différentes sections ci-dessous.

ORGANISATION DES ESSAIS

Les essais effectués à chaque série sont résumés dans le tableau 1 ci dessous. Cette série d'essais est répétée une fois par jour pendant 5 jours (n=5). La nature des échantillons et le nombre d'analyses sont fixés de manière à produire un jeu de données compatible avec les conditions fixées par les normes NF T90-210 et ISO/TS 13530. L'ensemble des essais est réalisé dans des conditions de fidélité intermédiaire les plus proches possibles de celles rencontrées lors des analyses de routine.

Tableau 1 : Plan d'organisation des essais

	Etalonnage	Mesures de Hg dans matrices «blanches»	Mesures de Hg dans matrice « blanche dopée ».	Mesures échantillons « biote » proche LQ
série n	p= 5, r =1	-eau Milli-Q (r =2) -sédiment (r =2)	sédiment dopé (r = 2)	MRC proche LQ (r = 2)

avec :

p = nombre de niveaux utilisés pour l'étalonnage

r = nombre de répétitions des mesures pour chaque série (n)

Au cours de l'étude, plusieurs types d'échantillons sont utilisés:

- de l'eau Milli-Q utilisée comme matrice « blanche » en l'absence de tout échantillon de type « biote » dépourvu de Hg et disponible en quantité suffisante.
- un sédiment très faiblement concentré assimilé à une « matrice blanche ». Lors de son analyse, le signal produit par ce matériau est 3 fois plus grand que le bruit de fond de l'instrument et 15 fois plus faible que le signal résultant du premier niveau de la gamme d'étalonnage.
- un échantillon contenant une quantité de mercure proche de la limite de quantification présumée. Cet échantillon est constitué d'un matériau de référence certifié sous la forme de tissus de moules broyés et lyophilisés, le NIST SRM 2976 ([Hg] = $61 \pm 3,6 \mu\text{g.kg}^{-1}$). En considérant une prise d'essai de 30 mg, la quantité de Hg introduite dans l'analyseur est du même ordre de grandeur que le premier niveau de la gamme d'étalonnage.
- une matrice blanche dopée à une valeur proche de la limite de quantification. Cet échantillon, préparé avant chaque analyse, est constitué de 30 mg de sédiment dopé avec 1,5 ng de mercure (ajout de 30 μl d'une solution à 50 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de Hg).

L'analyseur est étalonné au début de chaque journée d'utilisation. Le principe de l'étalonnage repose sur la modélisation de la réponse du détecteur lors de l'analyse de quantités croissantes de mercure. Dans le cadre de cette application, l'étalonnage est effectué à l'aide du modèle linéaire présenté ci-dessous :

$$A = m_{Hg} \times b_1 + b_0 \quad (\text{Equation 1})$$

avec :

A = signal mesuré (u.a.)

M_{Hg} = masse de mercure introduite dans l'analyseur (ng)

b_1 = coefficient pour la pente ou sensibilité

b_0 = coefficient pour l'ordonnée à l'origine

Les étalonnages sont établis avec un minimum de (p=5) niveaux compris entre 1,5 et 20 ng. Le mercure est introduit dans l'analyseur sous la forme d'ajouts de solutions diluées. Les volumes ajoutés sont compris entre 30 et 200 μ l. Les solutions utilisées sont préparées, à chaque nouvel étalonnage, par dilutions successives dans de l'acide nitrique (3% V/V) d'un aliquote d'une solution certifiée à 1g.l⁻¹. Un exemple de modélisation de la courbe de réponse du détecteur est présenté sur la figure 1 ci dessous.

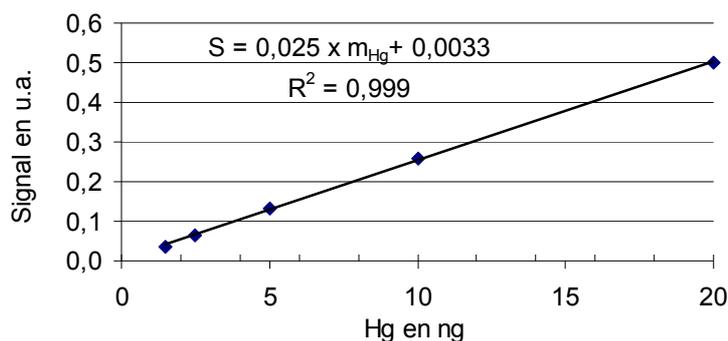


Figure 1 : Exemple de courbe de réponse du détecteur

Les échantillons, à l'exception des standards utilisés pour l'étalonnage et le dopage des matrices « blanches », sont introduits dans l'analyseur sous la forme d'une poudre lyophilisée et tamisée. Dans le cadre de cette étude, la prise d'essai est fixée à 30 mg. La quantité de mercure contenue dans l'échantillon est calculée à l'aide de la courbe de réponse du détecteur (Equation 1). Les résultats sont systématiquement corrigés pour les quantités de mercure contenues dans les « blancs de matrice ».

Les résultats obtenus au cours de l'étude, exprimés en ng de Hg, sont rassemblés dans le tableau 2 ci dessous :

Tableau 2 : Résultats des mesures de Hg dans les matrices « blanches » et les échantillons faiblement concentrés (ng)

	Hg dans matrice « blanche »: eau Milli-Q »		Hg dans matrice « blanche » : sédiment		Hg dans matrice « blanche dopée » à LQ		Hg dans échantillon proche de LQ	
Jour 1	-0,17	-0,17	-0,12	-0,11	1,26	1,32	2,05	1,90
Jour 2	-0,13	-0,14	-0,06	-0,08	1,30	1,37	2,35	1,98
Jour 3	-0,25	-0,24	-0,20	-0,21	1,25	1,24	1,84	1,84
Jour 4	-0,09	-0,09	-0,02	-0,05	1,37	1,37	2,07	2,14
Jour 5	0,01	-0,00	0,03	0,03	1,43	1,36	1,95	1,82

TRAITEMENT DES DONNEES ET INTERPRETATION DES RESULTATS.

Evaluation des limites de quantification (X_{LQ}) à partir des méthodologies décrites dans la norme ISO/TS 13530.

La limite de quantification (X_{LQ}) est définie comme un multiple de la limite de détection (X_{LD}) selon la relation suivante :

$$X_{LQ} = 3 * X_{LD} \quad (\text{Equation 2})$$

Plusieurs méthodes d'estimation de la limite de détection sont proposées :

A - Evaluation de X_{LD} à partir des mesures des blancs :

Les résultats des estimations de la LQ pour les 2 matrices « blanches » utilisées sont rassemblés dans le tableau 3 :

Tableau 3: Evaluation de X_{LD} et X_{LQ} à partir des mesures des matrices blanches

Matrices « blanches »	Ecart type (s_o) des mesures ($n \times r = 10$)	$X_{LD} = 3s_o + X_{bl}$	X_{LQ} (d'après Eq. 2)
eau Milli-Q	0,075	0,224 ng	0,63 ng
sédiment	0,085	0,255 ng	0,72 ng

Remarque : Le terme X_{bl} , correspondant à la quantité moyenne de mercure mesurée dans les blancs, est négligé en raison de la correction systématique pour les blancs.

B - Evaluation de X_{LQ} à partir l'écart type de la méthode (s_{x_0}).

Le calcul de X_{LQ} selon cette approche est présenté dans le tableau 4 :

Tableau 4 : calcul de la XLQ à partir de s_{x_0}

$s_{y/x}$	$X_{LD} = 4 \cdot s_{x_0}$	X_{LQ} (d'après Eq. 2)
0,0078	0,60 ng	1,79 ng

Remarque : Le terme s_{x_0} est déduit de $s_{y/x}$ (écart type résiduel) calculé à partir de l'ensemble des données obtenues pour les 5 étalonnages.

Les limites de quantification évaluées selon les différentes approches testées sont comprises entre 0,63 et 1,79 ng de Hg. L'approche signal sur bruit, également présentée dans l'ISO/TS 13530 semble peu appropriée à ce type d'analyse. Par conséquent, elle n'a pas été testée. Dans le cadre de cette étude, la limite de quantification présumée (ou à vérifier) est fixée à 1,5 ng. Cette valeur est du même ordre de grandeur que l'estimation la plus « haute » et représente le premier niveau de la gamme d'étalonnage.

Vérification d'une limite de quantification présumée.

A - Utilisation du test d'exactitude décrit dans la norme NF T 90-210.

La limite de quantification présumée de 1,5 ng est vérifiée de 2 manières différentes en utilisant le test d'exactitude décrit dans la norme NF T 90-210. Le test est d'abord appliqué à une série de mesures d'un sédiment « dopé » avec 1,5 ng de Hg, puis à une série de mesures d'un échantillon de 30 mg contenant une quantité de mercure proche de la LQ. Les résultats des vérifications sont présentés sur la figure 2. Les termes \bar{x} (grandeur moyenne calculée) et S_{LQ} (écart-type de fidélité intermédiaire) ont été calculés à partir de la feuille de calcul proposée en annexe de la norme NF T 90-210. Le critère d'exactitude, fixé à 60%, est une valeur conventionnelle. Il peut être modifié en fonction de toute autre exigence.

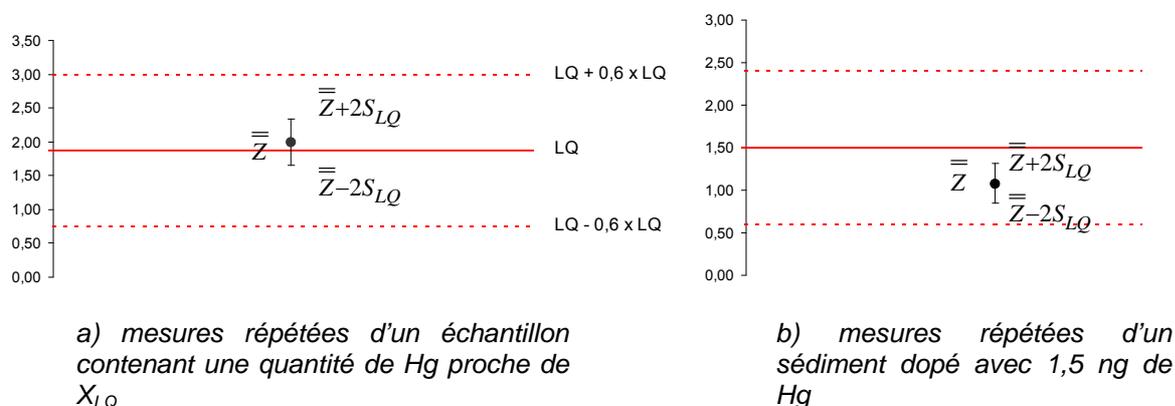


Figure 2 : Vérification d'une LQ présumée par rapport à (+/- 60% x LQ)

La figure 2 montre parfaitement que le critère d'exactitude à la LQ défini dans la norme est respecté. La limite de quantification $X_{LQ} = 1,5$ ng de Hg est donc vérifiée. Les résultats, pour la matrice « biote » et sédiment, suggèrent également que la limite de quantification peut être abaissée sans aucune modification de la méthode utilisée.

B - Utilisation de la méthodologie décrite dans la norme ISO/TS 13530

La limite de quantification est vérifiée à partir des mesures répétées ($n \times r = 10$) de la matrice « blanche » sédiment et de la matrice « blanche dopée » à la LQ. Les résultats de la vérification sont rassemblés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Vérification de X_{LQ} selon l'ISO/TS 13530 à partir des résultats des mesures de la matrice « blanche » et de la matrice « blanche dopée »

	Signal max (u.a.)	Signal moyen (u.a.)	Hg moyen calculé (ng)	Ecart type sur Hg calculé	$s = \frac{X_{LQ} \sqrt{n}}{3 \cdot t_{f=n-1; \alpha=0,05}}$
Matrice blanche	0,0028				
Matrice blanche dopée 1.5 ng	-	0,0373	1,07	0,11	0,69

La valeur de l'écart type (expérimental) sur Hg calculé est inférieure à la valeur limite du terme (s) calculé selon les instructions de la norme ISO/TS 13530. La valeur de X_{LQ} présumée est ainsi vérifiée.

CONCLUSION

Les normes NF T 90-210 et ISO/TS 13530 proposent chacune d'elle une méthodologie pour la vérification d'une limite de quantification présumée. Seule l'ISO/TS 13530 propose plusieurs approches permettant une estimation expérimentale de la limite de quantification. Au cours de cette étude, les 2 normes ont été appliquées à un même jeu de données. Il a été ainsi possible de montrer que quelle que soit la méthodologie utilisée, les conclusions quant à la vérification de la LQ présumée sont similaires pour cet exemple d'application. Toutefois, il est important de rappeler que ces deux normes sont à la base destinées à l'analyse des eaux. Leur application « stricte » à des matrices solides peut s'avérer particulièrement délicate. En effet, la préparation de matériaux solides dopés est bien plus complexe (différence entre les formes physico-chimiques de l'analyte dans l'ajout et les échantillons, homogénéité et stabilité du dopage...). Il peut être également difficile de disposer, pour des matrices de type « biote » ou sédiments, d'échantillons dépourvus en analyte considéré et en quantité suffisante de manière à réaliser tous les essais nécessaires.



Centre scientifique et technique
Service Météorologie, Monitoring, Analyse
3, avenue Claude-Guillemin
BP 36009 – 45060 Orléans Cedex 2 – France – Tél. : 02 38 64 34 34