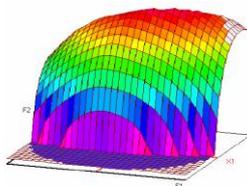


Année Universitaire : 2016-2017



**Master Sciences et Techniques CAC Ageq
Chimiométrie et Analyse Chimique : Application à la gestion de la
qualité**

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et
Techniques**

**Validation analytique par l'approche de l'erreur totale
d'une méthode spectrophotométrique de dosage du
phosphore**

Présenté par:

ANNEMER Saoussan

Encadré par:

- Mme. MECHATTE Asmae Maghreb	ALF AL
- Pr. FARAH Abdellah	FST Fès

Soutenu Le 12 Juin 2017 devant le jury composé de:

- Pr. LHASSANI Abdelhadi	FST Fès
- Pr. MELIANI Abdeslam	FST Fès
- Pr. FARAH Abdellah	FST Fès

Stage effectué à : la société ALF AL Maghreb

Introduction

Le phosphore est un élément essentiel pour la croissance des êtres vivants. Il participe à d'innombrables processus biologiques comme le métabolisme énergétique des cellules ou la croissance osseuse chez les animaux. Il représente de 2 à 2,5 % de la formule totale. Apporté en excès, il peut occasionner divers troubles - dyschondroplasie des poulets, fragilité de coquille des œufs - et contribue à la pollution de l'environnement.

Afin d'y voir plus clair, la nécessité de valider une méthode de dosage du phosphore s'impose.

Ainsi notre travail porte sur la validation analytique d'une méthode de dosage du phosphore par spectrophotométrie UV/Vis, par l'approche de l'erreur totale, combinant l'erreur systématique et celle aléatoire, fondé sur l'estimé des intervalles de tolérances, avec une proportion β de mesures dans les limites d'acceptation λ . Cette dernière est une grandeur définissant les limites d'acceptation, fixé en fonction des contraintes du domaine d'application.

Dans la présente étude, nous avons commencé par la réalisation d'une synthèse sur la société ALF AL Maghreb, ensuite en deuxième partie, nous avons essayé de rapporter l'étude bibliographique dans laquelle figure les différentes notions de validation analytique et plus précisément celle qui nous permet la construction du profil d'exactitude.

Ainsi, en troisième partie, nous avons vérifié la spécificité. Pour passer par la suite à l'élaboration des plans d'étalonnage et de validation, ce qui nous a permis de choisir le modèle d'étalonnage adéquat auprès de plusieurs modèles générés, pour pouvoir enfin calculer les différents critères de validité de cette méthode.

I. Présentation de la société :

La société EL ALF, est l'une des principales entreprises agricoles à Fès, qui se spécialise dans la fabrication et la commercialisation des aliments de bétails et volailles, c'est une société anonyme créée en 1974 par le groupe Chaoui à SIDI BRAHIM à Fès avant de se déplacer au nouveau site, situé au lotissement ENNAMAÉ au quartier industriel BEN SOUDA. La société se décompose en 3 grandes unités :

- ✓ La production : pour la fabrication d'aliments composés équilibrés, présentés sous forme de farine, miettes ou granulés et adaptés pour chaque type d'animal.
- ✓ Le laboratoire : pour les analyses physicochimiques et microbiologiques
- ✓ Le prémix : pour la fabrication d'un pré-mélange appelé prémix ; ce sont des concentrés d'oligoéléments, de vitamines et de minéraux. Ils sont associés en faible pourcentage aux différentes matières premières pour constituer l'aliment complet à destination du bétail.

1) Fiche techniques de la société :

Raison sociale	Société EL ALF
Forme juridique	Société anonyme (S.A)
Directeur de l'entreprise	Mr Ali BERBICH
Date de création	1974
Capital	50.000.000 DH
Tél	035728895
Fax	0 55 65 56 08
Siège social	Lotissement ENNAMAÉ, Quartier industriel BENSOUDA, Fès
Superficie	6000 m ² dont 2500 couverts
Activités	Fabrication des aliments composés pour bovins, ovins et volailles.
Capacité de production	700 tonnes
Destination des produits	Fermes propres à l'entreprise, Revendeurs et Eleveurs
effectifs	144 permanentes 52 temporaires
Certification	ISO 9001 version 2008 et OHSAS 18001
Positionnement	Parmi les leaders nationaux

Tableau 1 : fiche technique de la société

II. Alimentation animale et processus de production :

Les animaux doivent trouver dans leur alimentation des apports quotidiens en énergie, en protéines, en vitamines, en minéraux et en fibres végétales. Ils les trouvent dans les aliments composés où les différentes matières premières sont assemblées en fonction de ce qu'elles apportent dans un dosage équilibré. Pour tous les animaux d'élevage, les céréales constituent la base énergétique de la ration alimentaire. Elles représentent en moyenne près de 50% des matières premières mises en œuvre dans les aliments composés.

1) Alimentation animal :

Les besoins nutritionnels des animaux dépendent de l'espèce, de l'âge, du sexe et de ce qu'ils produisent.

En fonction de ces besoins, le responsable de formulation, compose pour chacun une recette adaptée : un assemblage spécifique de matières premières...Un aliment nutritionnellement équilibré doit aussi être facile à consommer. Pour cela les fabricants adaptent la forme de présentation de l'aliment : farine (poussin, poule), miette (volaille), petit ou gros granulé (porc, bovin) sont distribués aux animaux en fonction de leur taille et de leur morphologie.

Pour élaborer des aliments équilibrés pour tous les animaux, en fonction de leur spécificité, les fabricants doivent très bien connaître :

- ✓ Les besoins des animaux. Cette connaissance doit être très détaillée et très précise
- ✓ La composition des matières premières, en allant jusqu'à chaque nutriment en qualité et en quantité.

2) Contrôle qualité au laboratoire de la société :

Le contrôle de la qualité fait partie des bonnes pratiques de fabrication ; il concerne l'échantillonnage, les spécifications, le contrôle, ainsi que les procédures d'organisation, de documentation et de libération qui garantissent que les analyses nécessaires et appropriées ont réellement été effectuées et que les matières premières, et les produits finis ne sont pas libérés pour l'utilisation, la vente ou l'approvisionnement sans que leur qualité n'ait été jugée satisfaisante.

La qualité des matières premières et des produits finis est contrôlée en permanence. Ces contrôles peuvent porter sur la qualité des produits finis, ou celle des matières premières utilisées, les différentes analyses de contrôle de qualité du laboratoire sont les suivantes :

a) Les analyses physico-chimiques :

Pour chaque matière première et produit fini le service qualité définit des paramètres d'analyse (humidité, température, activité d'eau...) qui vise la valeur nutritionnelle du produit, accompagnée des fréquences d'analyse pour les comparer avec des normes prédéfinies.

✓ **Détermination de l'humidité :**

Après broyage et conditionnement éventuels, la méthode consiste à un séchage du produit à une température de 103°C (ou autre selon le produit) pendant quatre heures.

✓ **Dosage des cendres brutes :**

On entend par cendres brutes, le résidu obtenu après incinération dans les conditions de la norme.

La teneur en matière minérale d'une substance est conventionnellement le résidu de la substance après incinération dans un four pendant six heures à une température de 550°C.

✓ **La teneur en cellulose :**

Cellulose brute : résidu organique obtenu après une double hydrolyse réalisée successivement avec une solution acide et une solution basique. C'est une estimation par excès de la cellulose, car le résidu contient aussi une fraction variable de la lignine et des hémicelluloses

✓ **Détermination de la teneur en protéine brute selon la méthode de Kjeldahl :**

La méthode Kjeldahl consiste à doser la teneur en protéine brute après une minéralisation effectuée à l'aide d'un excès d'acide sulfurique concentré, en présence de catalyseurs pour accélérer la réaction de décomposition.

Après minéralisation, tout l'azote se trouve dans le minéralisât sous une même forme minérale,

Après une l'alcalinisation des produits de la réaction puis distillation, l'azote est ensuite dosé par une solution titrée d'acide sulfurique.

✓ **Dosage de la matière grasse selon la méthode de Soxhlet :**

C'est la méthode de référence utilisée pour la détermination de la matière grasse dans les aliments solides déshydratés. C'est une méthode gravimétrique qui consiste à une extraction préliminaire à l'éther de pétrole de la matière grasse des échantillons.

✓ **Détermination de l'activité de l'eau :**

La méthode Consiste à déterminer l'eau libre dans l'échantillon à l'aide d'un activimètre.

✓ *Dosage de calcium selon la méthode titrimétriques :*

La méthode permet de déterminer la teneur en calcium total des aliments des animaux. L'échantillon est incinéré, les cendres sont traitées par l'acide chlorhydrique. Le calcium est

précipité sous forme d'oxalate de calcium. Après dissolution du précipité dans l'acide sulfurique, l'acide oxalique formé est titré par une solution de permanganate de potassium.

✓ **Activité Uréasique :**

La méthode permet de déterminer l'activité de l'uréase des produits dérivés du Soja et déterminer le degré de cuisson de ces produits. Cette méthode ne s'applique que sur les Tourteaux de Soja et ces dérivés.

✓ **Azote Ammoniacal :**

Détermination de la teneur en bases azotées volatils, exprimées en ammoniac, des farines de poisson ne contenant pratiquement pas d'urée. Elle concerne les farines de poisson.

✓

Détermination des chlorures solubles :

La méthode permet le Dosage du chlore des chlorures solubles dans l'eau, conventionnellement exprimé en chlorure de sodium. Elle s'applique à tous les aliments Volaille et les Farines de poissons.

✓ **Dosage du phosphore total Méthode spectrophotométrique :**

La méthode permet de déterminer le phosphore total dans les aliments des animaux. Minéralisation d'une prise d'essai, soit par voie sèche et mise en solution dans l'acide (dans le cas des aliments organiques), soit par voie humide (dans les composés minéraux et des aliments liquides). Traitement de la solution par le réactif vanado-molybdique et mesurage de l'absorbance de la solution jaune ainsi obtenue, au spectrophotomètre, à 430 nm.

b) Les analyses bactériologiques :

- ✓ **Recherche des moisissures :** La méthode consiste à un dénombrement de moisissures en ensemencant des échantillons sur la gélose Sabourand des différentes dilutions préparées dans l'eau péptonée.
- ✓ **Recherche des salmonelles :** On procède à la recherche de salmonelle parla méthode classique en passant par le pré-enrichissement dans l'eau péptonée tamponnée et enrichissement dans le bouillon sélénite, puis l'ensemencement sur le vert brillant.

c) Analyses de sérologie

- ✓ **Recherche des mycotoxines :** ce sont des métabolites secondaires hautement toxiques produits principalement par les champignons des espèces Fusarium, Aspergillus, et Penicillium. Ce sont des petites molécules de durée de vie dans l'aliment bien plus longue que celles des champignons les ayant synthétisés. Elles sont chimiquement et

thermiquement stables. Le laboratoire de la société s'intéresse à la recherche de trois types de mycotoxine :

L'aflatoxine Total ou AFT, Le déoxynivalénol ou DON et Fumonisine FUM.

Mycotoxine	Denrées	Champignon producteur	Conséquence de l'ingestion
Aflatoxine	Mais, Arachides	<i>Aspergillus</i>	Potentiellement cancérigènes chez l'homme. Effets néfastes sur divers animaux et en particuliers les poulets.
Déoxynivalénol	Blé, Mais et Orge	<i>Fusarium culmorum</i>	Intoxications humaines. Toxiques pour les animaux et en particuliers les porcs.

Tableau 2 : Mycotoxines dans les grains et graines de base

- **Principe du test:**

Le test ELISA est une technique immun-enzymatique de détection, qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps.

La technique ELISA en compétition utilise une protéine à rechercher, immobilisée sur un support plastique et un anticorps spécifique conjugué à une enzyme, qui est révélé par l'addition d'un substrat qui se colore. Ce système de révélation est mis en compétition par une mise en présence préalable d'un échantillon à doser avec l'anticorps conjugué. Ce dernier est alors bloqué par la protéine recherchée et n'est donc pas révélé sur le support plastique. Ce système fonctionne à l'envers dans le sens où plus il ya de protéine présente, moins il y a de coloration.

3) *Processus de fabrication :*

Le processus de fabrication des aliments composés peut se décomposer en plusieurs étapes principales : la réception des matières premières, la fabrication et l'expédition. Elles sont précédées d'une étape de recherche et de formulation pour déterminer les besoins alimentaires des animaux et les caractéristiques des matières premières sont rigoureusement étudiés dans les laboratoires et les centres de recherche afin d'assembler les ingrédients dans des proportions adaptées.

a) Formulation et recherche de la meilleure recette :

Les animaux doivent trouver dans leur alimentation des apports quotidiens en énergie, en protéines, en vitamines, en minéraux et en fibres végétales. Ils les trouvent dans les aliments composés où les différentes matières premières sont assemblées en fonction de ce qu'elles apportent dans un dosage équilibré. C'est cet assemblage, convenablement dosé et proportionné, qui constitue l'étape de la formulation, c'est à dire la détermination de la meilleure recette possible.

Pour tous les animaux d'élevage, les céréales constituent la base énergétique de la ration alimentaire. Elles représentent en moyenne près de 50% des matières premières mises en œuvre dans les aliments composés.

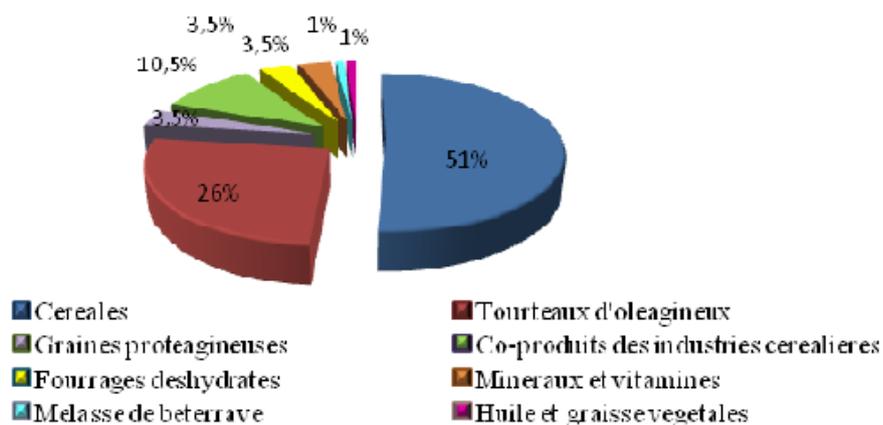


Figure 1 : Composition moyenne d'un aliment

b) Réception des matières premières au sein de l'entreprise

D'origines variées, aussi bien locales, qu'internationales, ces matières premières, à leur arrivée, sont pesées et font l'objet d'un prélèvement d'échantillon destiné au contrôle de leur qualité. Ces échantillons sont conservés pendant trois mois sur le site et permettent une traçabilité complète des produits finis.

Les matières premières livrées sont déversées dans des fosses équipées de trémies qui dirigent les matières premières au moyen d'élévateur à godets vers des silos de stockage

rigoureusement identifiés, pour empêcher les mélanges de différentes matières premières entre elles.

c) Broyage et le pré mélange

Après un passage dans l'une des deux bennes peseuses, La quantité de matière première définie selon la formule de l'aliment à fabriquer, rejoint un broyeur à marteaux permettant ainsi de réduire la taille de la matière première à une granulométrie plus petite afin de réaliser des mélanges homogènes, après passage sur des grilles qui permettent de calibrer la taille du grain, les matières premières rejoignent le mélangeur.

d) Mélange

Après avoir été pesées, broyées et pré mélangées, les matières premières sont dirigées vers une mélangeuse qui permet, suivant la formule à réaliser, l'addition de compléments, des additifs et des liquides nécessaires tels que : l'huile, la choline, méthionine, et vitamines. Cette étape d'une durée de quatre min constitue une étape essentielle permettant d'obtenir une homogénéité parfaite du produit.

Si la composition du produit nécessite l'ajout de mélasse, le mélange obtenu passe par un mélasseur qui assure l'ajout de mélasse de betterave selon la formulation du produit fini. La fabrication des produits utilisés sous forme de farine se termine à cette étape. La fabrication de granulés nécessite une étape supplémentaire de pressage pour l'obtention des granulés.

e) Fabrication des granules :

La farine est dirigée, vers une presse dans laquelle est injectée de la vapeur d'eau pour obtenir une pâte à 85°C. Cette pâte est ensuite poussée vers un anneau d'acier perforé de petits trous qui permet à la pâte de sortir sous forme de bâtonnets qui sont ensuite cassés en morceaux de quelques mm et refroidis, ce qui constitue les granulés. Le tamisage des granulés est l'ultime étape avant le stockage permettant d'éliminer les différentes poussières.

f) Acheminement de l'aliment jusqu'en élevage :

Les aliments sont chargés dans des camions, accompagnés d'une étiquette ou d'un bon de livraison sur lesquels on retrouve obligatoirement la composition de l'aliment, ses garanties nutritionnelles, le mode d'emploi et tous les éléments de traçabilité permettant de remonter à la formule fabriquée et aux matières premières incorporées.

I. Généralité sur la méthode analytique

1) Définition de la méthode analytique :

Le concept de la méthode tire du vocable grec méthodes (« chemin » ou « voie ») et désigne le moyen employé pour parvenir à des fins.

Ainsi, c'est l'ensemble des opérations intellectuelles permettant d'analyser, de comprendre et d'expliquer la réalité étudiée, de la démontrer et la vérifier.

2) *Description d'une méthode d'analyse :*

Une analyse chimique est définies comme étant une suite d'opération élémentaire statistiquement indépendantes les unes des autres, qui commencent au moment de la prise d'essai (prélèvement d'un d'échantillon analytique sur l'échantillon de laboratoire) et aboutissent à l'expression d'un résultat d'analyse qu'il faudra valider pour pouvoir disposer enfin d'une donnée analytique.

De ce fait chaque méthode d'analyse possède un certain nombre de propriétés caractéristique, critères qui qualifient les performances de la méthode qu'il faut examiner et les hiérarchiser en fonction du problème posé, le premier objectif étant toujours d'obtenir une information pertinente au moindre coût. On voit ainsi que le choix d'une méthode d'analyse constitue en tant que tel un problème analytique qu'il va falloir résoudre en empruntant la démarche du qualiticien, ce qui veut dire bien poser le problème au départ et le traduire en terme d'analyse qu'il faudra réaliser

3) *Cycle de vie d'une méthode :*

Le cycle de vie d'une méthode est un concept souligné dans la norme ISO 17025. L'idée de base est qu'une méthode d'analyse n'est pas statique, mais une entité vivante qui passe par plusieurs étapes interdépendantes. Ainsi, pour bien comprendre le rôle et la place de la validation, il convient de décrire les différentes étapes de ce cycle, depuis la création de la méthode analytique jusqu'à son remplacement par une autre. L'exemple d'une méthode de dosage est utilisé ci-après pour illustrer ces différentes étapes. [7]

a) *Sélection de la méthode :*

Cette première étape va permettre de définir les objectifs de la méthode et les conditions opératoires initiales.

L'analyste va choisir parmi les diverses méthodes physico-chimiques possibles, la méthode la plus pertinente pour permettre le dosage de l'analyte à déterminer.

La norme ISO 17025 précise que :

« Le laboratoire doit utiliser des méthodes d'essai et / ou d'étalonnage, y compris des méthodes d'échantillonnage, qui répondent aux besoins du client et qui conviennent aux

essais et/ou étalonnages qu'il effectue, de préférence les méthodes publiées comme normes internationales, régionales ou nationales ».

Ce texte précise qu'il est préférable d'utiliser des méthodes officielles, lorsque cela est possible. Cependant, l'utilisation de méthodes développées par le laboratoire est acceptée.

Dans ce deuxième cas, le développement de la méthode doit être confié à du personnel qualifié, avec des ressources adéquates, et la démarche de développement ainsi que les résultats obtenus doivent être correctement renseignés. [8]

b) Mise au point de la méthode :

Il s'agit d'une étape de développement de la méthode sélectionnée, afin d'optimiser les différents paramètres du protocole opératoire pour les adapter à la matrice des échantillons qui seront dosés ainsi qu'aux conditions opératoires d'utilisation de la méthode.

Il est important, lors de cette étape de développement, de suivre un cheminement précis et non pas de simplement réaliser des expériences aléatoires, afin de maîtriser la programmation des essais et les délais.

En tenant compte de cette remarque, l'analyste peut utiliser des plans d'expériences, qui vont permettre d'optimiser le nombre d'expériences à réaliser pour trouver les valeurs optimales des variables susceptibles d'influencer le paramètre à optimiser.

Au terme de cette seconde étape, l'analyste devrait avoir recueilli des informations de base sur les performances de la procédure analytique, concernant la pertinence du modèle de régression utilisé pour établir la fonction de réponse, la variabilité des résultats, la limite de quantification et l'intervalle de dosage.

Ces prérequis vont ainsi constituer une base pour l'étape suivante, qui est la phase de validation proprement dite [7].

c) Validation de la méthode :

L'étape de validation intervient après le développement d'une nouvelle procédure d'analyse. En effet, les performances de la méthode vont évoluer tout au long du cycle de vie, et plus particulièrement au cours des deux premières étapes. Ainsi, la fiabilité du résultat analytique fourni par la méthode doit être améliorée lors de ces premières phases, pour tendre vers une confiance accrue qui sera attestée durant cette troisième étape de validation. [8]

d) Estimation de l'incertitude et vérification de l'aptitude :

L'estimation de l'incertitude de mesure, tout comme la validation analytique, est une exigence de la norme ISO 17025 qui indique que :

« Les laboratoires d'essais doivent aussi posséder et appliquer des procédures pour estimer l'incertitude de mesure »

L'estimation de l'incertitude de mesure et la validation analytique de la méthode sont des concepts interdépendants, et le protocole développé par la commission SFSTP et publié en 2003-2006 lors de la démarche d'harmonisation des validations analytiques permet de les combiner.

Ainsi, l'utilisation du profil d'exactitude comme outil de décision illustre comment l'incertitude peut être obtenue à partir des résultats de validation. [7]

e) Utilisation en routine :

L'objectif d'une méthode analytique n'est pas sa validation, mais bien son utilisation en routine pour l'analyse d'échantillons de valeur vraie inconnue. Le passage en routine de la méthode s'inscrit dans le cadre d'un système de contrôle de la qualité qui a pour objectifs de valider les résultats obtenus sur des échantillons inconnus, et de contrôler les performances de la méthode analytique au fil du temps. [7]

f) Revalidation :

Au cours de l'utilisation en routine de la méthode analytique, certaines améliorations peuvent être apportées à la méthode. Ces modifications vont alors conduire à une procédure plus ou moins complète de revalidation. Un test simple devra être effectué pour déterminer l'impact de ces modifications. En règle générale, une modification de réglage est considérée comme mineure, tandis qu'une modification affectant le principe de la méthode est considérée comme majeure. Dans ce dernier cas, une procédure de validation complète devra de nouveau être appliquée. [7]

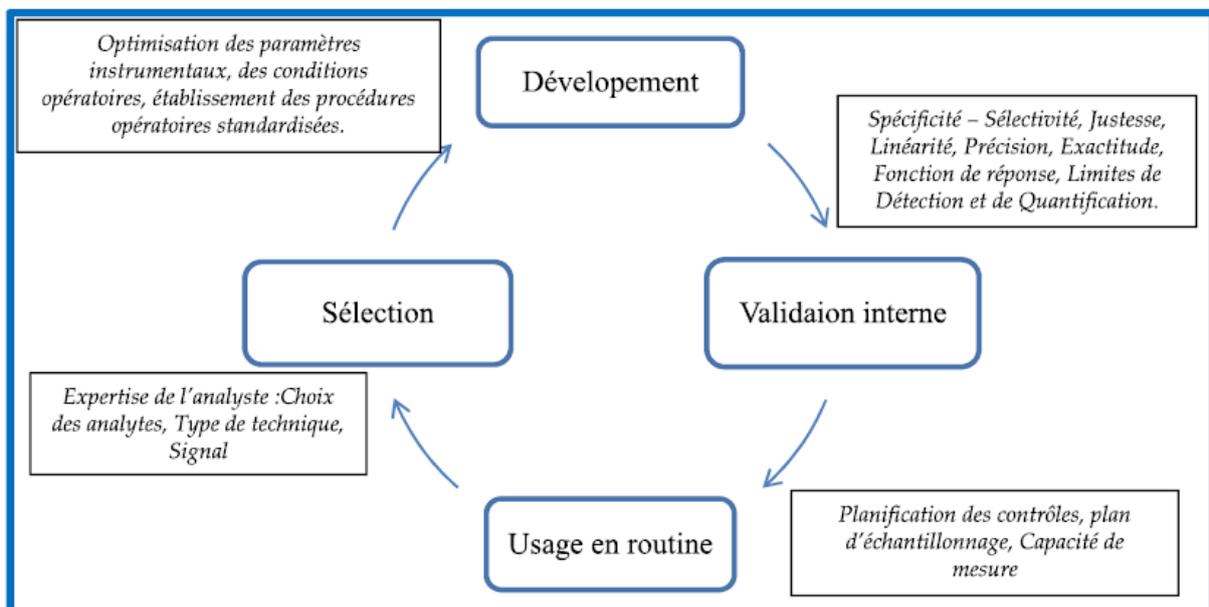


Figure2 : Schéma de cycle de vie d'une méthode analytique

4) Définition et objectif de la validation :

1) Définition :

La validation d'une méthode analytique est l'opération par laquelle on s'assure que ses résultats répondant au problème de manière satisfaisante pour l'utilisateur. Elle s'efforce de détecter et contrôler les sources d'erreurs possibles liées à la méthode étudiée : ca définition dans les normes « Valider une méthode consiste à démontrer, avec un degré de confiance élevé et sous une forme documentée, que la méthode permet d'obtenir un résultat analytique qui atteint les spécifications définis à l'avance » [2]

2) Objectif :

La validation des méthodes analytiques a pour principal objectif de s'assurer qu'une méthode analytique donnée donnera des résultats suffisamment fiables et reproductibles, compte tenu du but de l'analyse. Il faut donc définir correctement à la fois les conditions dans lesquelles la méthode sera utilisée et le but dans lequel elle sera employée. Ces principes s'appliquent à toutes les méthodes utilisées par un fabricant de produits pharmaceutiques, qu'elles soient ou non décrites dans une pharmacopée. Autrement dit : «Le but de la validation d'une procédure analytique est de démontrer qu'elle correspond à l'usage pour lequel elle est prévue». [2]

5) Les critères de la validation analytique :

La validation porte sur les critères suivants : Qu'on va adopter selon le type du test caractéristique.

- ✓ Spécificité
- ✓ Linéarité
- ✓ justesse
- ✓ Fidélité
- ✓ Répétabilité
- ✓ Reproductibilité
- ✓ Exactitude
- ✓ Limite de détection : LOD
- ✓ Limite de quantification : LOQ
- ✓ Intervalle de mesure
- ✓ Robustesse

Type d'analyse	Dosage	Impuretés	Essai limite	Identification
-----------------------	---------------	------------------	---------------------	-----------------------

Justesse	+	+	-	-
Répétabilité	+	+	-	-
Répétabilité intermédiaire	+	+	-	-
Spécificité et sélectivité	+	+	+	+
Limite de détection	-	+	+	-
Limite de quantification	-	+	-	-
Linéarité	+	+	-	-
Intervalle de mesure	+	+	-	-
Exactitude	+	+	-	-
Robustesse	+	+	-	-

Tableau3 : classification des critères de validation selon le type d'analyse (ICH), (-) caractère n'est pas normalement évalué, (+) caractère normalement évalué

➤ **Sélectivité :**

La sélectivité ou spécificité d'une méthode est son aptitude à mesurer la concentration de l'analyte sans interférence de la part des autres constituants de l'échantillon. La sélectivité (ou l'absence de sélectivité) peut s'exprimer par l'erreur systématique constatée dans les résultats obtenus avec l'analyte en présence des concentrations escomptées des autres constituants, par comparaison avec les résultats obtenus en l'absence de ces substances.

Lorsque tous les autres constituants sont connus et disponibles, la sélectivité peut être déterminée en comparant les résultats obtenus avec l'analyte seul et avec l'analyte additionné des substances soupçonnées de provoquer des interférences. Lorsque ces substances n'ont pu être identifiées ou ne sont pas disponibles, on peut souvent évaluer la sélectivité en ajoutant des quantités connues d'analyte pur à des échantillons dans lesquels la concentration des autres constituants est maintenue constante et en déterminant la quantité d'analyte retrouvée.[9]

➤ **Linéarité :**

La linéarité d'une méthode analytique est sa capacité à donner des résultats directement proportionnels à la concentration de l'analyte dans les échantillons. Le domaine d'utilisation est l'intervalle entre la concentration la plus faible et la concentration la plus élevée dont on a démontré qu'elles pouvaient être déterminées avec une précision, une exactitude et une linéarité acceptables. Ces caractéristiques sont déterminées en appliquant la méthode à une série d'échantillons dont les concentrations en analyte couvrent tout le domaine d'utilisation proposé. [9]

➤ **Justesse :**

La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essais et une valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie, soit comme une valeur de référence acceptée. (Indication sur les erreurs systématiques). [9]

➤ **Fidélité :**

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion, coefficient de variation) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène (résultats d'essais indépendants) dans des conditions prescrites. (Indication sur les erreurs aléatoires).

Il couvre trois niveaux 3 niveaux :

- ✓ Répétabilité
 - ✓ Fidélité intermédiaire (intra-laboratoire)
 - ✓ Reproductibilité (inter-laboratoire)
- ✓ **Répétabilité** : Cette mesure de la variation des résultats au sein d'un même laboratoire caractérise la précision obtenue lorsque la méthode est répétée par le même analyste dans les mêmes conditions (réactifs, matériel, réglage, laboratoire) dans un court intervalle de temps. La répétabilité d'une méthode est évaluée en procédant à des déterminations complètes et distinctes sur des échantillons identiques provenant du même lot homogène de produit. Cela permet d'évaluer la précision de la méthode dans les conditions opératoires normales. [9]
- ✓ **Fidélité intermédiaire (intra-laboratoire)** : Conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essai identiques dans le même laboratoire, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents et pendant un intervalle de temps donné. [9]

✓ **Reproductibilité (inter-laboratoire)** : C'est la précision de la méthode lorsqu'elle est appliquée dans des conditions différentes - généralement dans des laboratoires différents - à des échantillons distincts, théoriquement identiques, prélevés sur le même lot homogène de produit à analyser. Afin de pouvoir comparaison des résultats obtenus par différents analystes, avec un matériel différent, ou à des dates différentes. [9]

➤ **Exactitude :**

L'exactitude correspond au degré de concordance entre la valeur de référence ou la valeur considérée comme véritable par convention et la valeur obtenue.

Valeur trouvée = x_i

Vraie valeur = μ_T

Exactitude du résultat = $x_i - \mu_T$

➤ **Robustesse :**

La robustesse est la qualité d'une méthode capable de donner des résultats d'une exactitude et d'une précision acceptables dans des conditions diverses. Elle permet d'évaluer dans quelle mesure les résultats obtenus sur des échantillons distincts, théoriquement identiques, prélevés sur le même lot homogène de produit à analyser, subissent l'influence des changements apportés aux conditions opérationnelles ou environnementales, dans la limite des spécifications établies pour la méthode. [9]

6) Approche de l'erreur totale

Approche de l'erreur totale est une démarche harmonisée de validation applicable aux différentes procédures analytique quantitatives, et ce indépendamment du secteur d'activité

Le bute principale de cette approche est non uniquement de recadrer les objectifs de la validation en fonction de la finalité de la méthode analytique, de valider telle qu'elle sera utilisée en routine, mais également d'offrir un outil pratique de décision en distinguant notamment les règles de diagnostic et les règles de décision

En effet, cette démarche repose sur l'utilisation du profil d'exactitude, qui intègre de façon statistiquement correcte dans un seul graphique l'ensemble des éléments essentiels de la validation, à savoir le biais, la fidélité, le risque et les limites de quantifier le plus exactement possible chacune des quantités inconnues que le laboratoire aura à déterminer. Autrement dit, c'est que différence entre les résultats rendus (X) et la « vrai valeur » inconnue de

l'échantillon, qui par ailleurs restera toujours inconnus, soit petite ou du moins inférieure à une limite d'acceptation, c'est-à-dire :

$$-\lambda < \mathbf{x} - \mu_T < \lambda \Leftrightarrow |\mathbf{x} - \mu_T| < \lambda \quad \text{eq:(1)}$$

Une « bonne procédure analytique peut être qualifiée d'acceptable si la « garantie » ou la probabilité est suffisamment grande que la différence entre chaque valeur mesurée (x) d'un échantillon et sa « vraie valeur » (μ_T) soit comprise dans les limites d'acceptation que l'analyste s'est fixée. La réalisation de ceci avec un risque connu peut se traduire par la relation suivante :

$$p(|\mathbf{x} - \mu_T| < \lambda) \geq \beta \quad \text{eq:(2)}$$

Avec β la proportion de mesures dans les limites d'acceptation, et λ la grandeur définissant les limites d'acceptation fixées à priori en fonction des contraintes du secteur d'activité. Le risque associé d'une procédure s'évalue par la proportion attendue de mesures en dehors des limites d'acceptation.

Les paramètres l'exactitude, fidélité, la linéarité, etc. ne sont plus que des « statistiques » ou « éléments de calcul » permettant de contribuer pour chiffrer la garantie. Ils aident à poser un diagnostic, c'est-à-dire nous renseignent sur un point particulier de la performance de la méthode étudiée, comme par exemple la linéarité ou le passage de l'ordonnée par 0. Dès lors ces paramètres ne sont plus considérés comme outils de décision mais plutôt outils de diagnostics.

L'outil de décision ou la règle de décision, à la fois pratique et visuelle, repose sur l'intégration du profil d'exactitude dans des limites d'acceptation ($\pm\lambda$), dont l'intérêt a été démontré par la figure ci-dessous. Le profil d'exactitude, construit à partir des intervalles de tolérance représentant les futures mesures attendues, permet donc, de décider de la capacité ou non d'une procédure à fournir des résultats dans les limites d'acceptation

La zone en vert montre l'intervalle de dosage dans lequel la procédure est capable de quantifier avec une exactitude connue et un risque fixe par l'analyste.

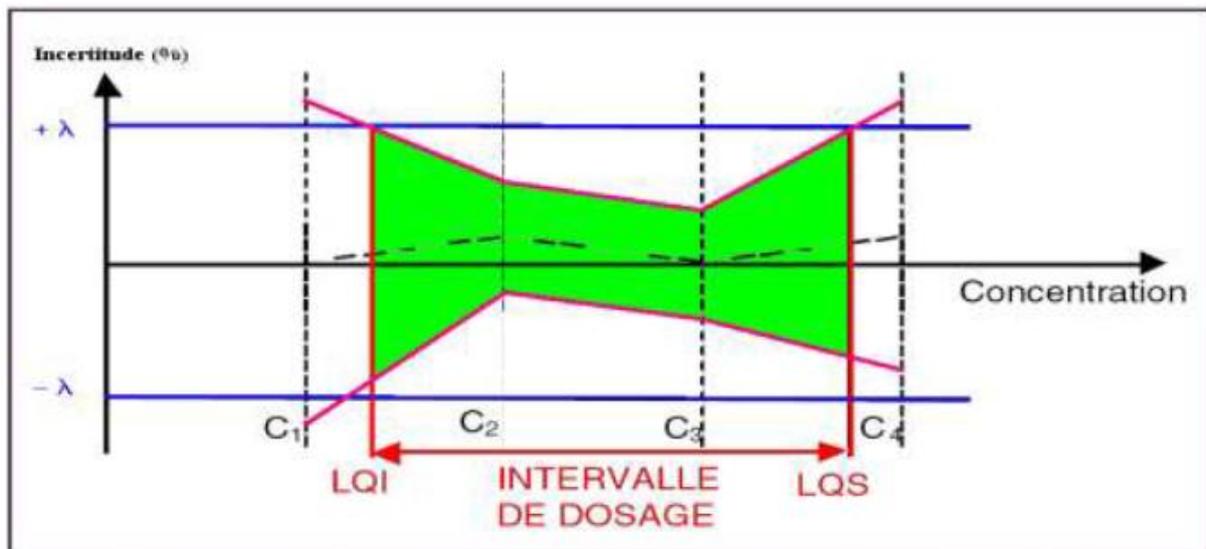


Figure3 :Profil d'exactitude basée sur l'erreur totale

7) **Avantage de l'approche de l'erreur totale :**

La méthode de validation reposant sur le concept de l'erreur totale en combinant les deux erreurs aléatoire et systématique, présente plusieurs avantages par rapport aux approches classiques :

- ↔ Elle est considérée comme une approche globale qui peut être appliquée quel que soit le domaine d'activité et la matrice étudiée.
- ↔ Cette approche propose une méthode d'interprétation graphique très simple et visuelle qui ne s'embarrasse pas de tests statistiques toujours délicats à décrypter. Son objectif est de servir les analystes plutôt que de les transformer en statisticiens.
- ↔ Elle permet de minimiser considérablement le risque d'accepter une procédure qui ne serait pas suffisamment exacte ou, au contraire, de rejeter une procédure qui serait exacte (dans les deux cas il s'agit d'améliorer significativement le rapport cout/efficacité des prestations)
- ↔ Elle permet non seulement de simplifier l'approche de validation d'une procédure mais aussi l'estimation de l'incertitude de mesure sur la base des données de validation.
- ↔ Elle permet de génère différentes modèles d'étalonnage et possibilité de choisir le plus adéquat pour calculer, par la prédiction inverse, la concentration en retour.

II. **Etapes de la validation analytique basée sur le concept de l'erreur totale :**

- ✓ Réalisation des expériences sur deux gammes
 - Une gamme de standards d'étalonnage (échantillons de concentrations connues).

- Une gamme de standards de validation (échantillons reconstitués dans la matrice).
- ✓ Alignement des observations (si pour un niveau de concentration les quantités introduites ne sont pas identiques pour toutes les séries).
- ✓ Sélection des limites d'acceptation en fonction des contraintes du secteur d'activité
- ✓ Choix du modèle adéquat après génération de plusieurs modèles d'étalonnage
- ✓ Calcul des concentrations en retour à partir du modèle sélectionné par prédiction inverse
- ✓ Calcul de la justesse à chaque niveau de concentration
- ✓ Calcul de la fidélité à chaque niveau de concentration
- ✓ Calcul des intervalles de tolérance bilatéraux pour chaque niveau de concentration
- ✓ Etablissement du profil d'exactitude

1) Organisation des essais de validation :

Les standards d'étalonnage (STDE) doivent être préparés selon le protocole qui sera appliqué en routine tant au niveau du mode opératoire que du nombre de niveau de concentration (Point d'étalonnage) et du nombre de répétitions par niveau. Les standards de validation (STDV) doivent être préparés dans la matrice et être des échantillons indépendants (Variance intra-série) dans la mesure où c'est applicable. En effet, ils représentent, en phase de validation, les futurs échantillons que la procédure analytique aura à quantifier, chaque standard de validation est préparé et traité de façon indépendante comme un futur échantillon. Ce caractère d'indépendance est fondamental pour l'estimation correcte de la variance inter-séries.

Dans la pratique, le plus souvent on utilise dans les laboratoires l'effet « jour », mais on pourrait utiliser aussi l'effet « opérateur ». Rappelons qu'il n'est pas nécessaire que ces jours soient consécutifs, pour autant qu'il n'y ait pas de rejets non documentés de résultats intermédiaire prévus au protocole. Il est également à noter que, suivant les contraintes analytiques, l'effet « jour » peut être remplacé par l'effet « série ». [2]

Niveaux	Séries (Jours)	Concentrations des échantillons de validation (valeurs de référence) X	Mesurages (Réponses instrumentales) Y			
			1	2	...	J
1	1	x_{11}	y_{111}	y_{121}	...	y_{1J1}
			
	I		...			
2	1					
	...					
	I					
...				
K	1					
				
	I	x_{IK}				y_{IK}

Tablea

u4 : Organisation des mesures de validation

2) *Fonction de réponse et sélection du modèle :*

En utilisant les données de la gamme des standards d'étalonnage, on va pouvoir générer différents modèles de calibration afin de choisir le plus adéquat.

Cette étape est l'une des étapes les plus importantes du fait que la fiabilité des résultats de validation qui seront obtenus dépend du modèle de régression sélectionné.

Type	Equation	Paramètres
Droite passant par l'origine	$Y = a Z$	A
Droite linéaire	$Y = a Z + b$	a, b
Fonction quadratique	$Y = a Z^2 + bZ + c$	a, b, c
Transformation logarithmique	$\ln(Y) = \alpha \ln(Z) + \beta$	α, β
Transformation racine carrée	$\sqrt{Y} = \delta \sqrt{Z} + \gamma$	δ, γ

Tableau 5 : Types des fonctions de réponse

Le choix du type de fonction de réponse va être selon le plus adéquat après génération des différents modèles.

3) *Prédiction inverse :*

Les calculs de la justesse et la fidélité se fait avec les concentrations prédites et non pas avec les réponses. La prédiction inverse se s'effectue via la fonction inverse de la fonction de réponse choisie à partir des données de calibration, selon le modèle mathématique suivant :

$$Z_{cal} = f^{-1}(Y) \quad \text{eq:(3)}$$

Avec :

Z_{cal} est la concentration calculée ou concentration retrouvée

$f^{-1}(Y)$ est l'équation de prédiction inverse dans notre cas : $Y = aZ + b$

Le tableau ci-dessous donne un exemple de fonction inverse pour le calcul de la concentration par la prédiction inverse.

Type de fonction de réponse	Equation	Concentration calculée
Droite passant par l'origine	$y = aZ$	$Z_{cal} = \frac{Y}{a}$
Droite linéaire	$Y = aZ + b$	$Z_{cal} = \frac{Y-b}{a}$
Fonction quadratique	$Y = aZ^2 + bZ + c$	$Z_{cal} = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4a(c-Y)}}{2a}$
Transformation logarithmique	$\ln(Y) = \alpha \ln(Z) + \beta$	$Z_{cal} = e^{\frac{\ln(Y) - \beta}{\alpha}}$
Transformation racine carrée	$\sqrt{Y} = \delta\sqrt{Z} + \gamma$	$Z_{cal} = \left(\frac{\sqrt{Y} - \gamma}{\delta}\right)^2$

Tableau6 : Prédiction inverse de concentration à partir de différent fonction de réponses

4) *Calcul de la fidélité :*

La fidélité de la méthode se caractérise par le coefficient de variation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire, donc il faut :

Calculer pour chaque niveau k les critères de fidélité :

- ✓ L'écart-type de répétabilité, noté s_r ;
- ✓ L'écart-type inter-séries, noté S_b ;
- ✓ L'écart-type de fidélité intermédiaire $S_{FI} = \sqrt{S_L^2 + S_r^2}$ eq:(4)
- ✓ Coefficient de variation de la répétabilité $CV_r = \frac{s_r}{\bar{Z}} \times 100$ eq:(5)
- ✓ Coefficient de variation de la fidélité intermédiaire $CV_{FI} = \frac{S_{FI}}{\bar{Z}} \times 100$ eq:(6)

Calculer la moyenne générale d'un niveau par le biais de la formule suivante :

$$\bar{\bar{Z}} = \frac{1}{I \times J} \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J Z_{ij} \quad \text{eq:(7)}$$

Calculer les écarts-types de répétabilité, inter-séries et de fidélité intermédiaire en effectuant l'analyse de la variance (ANOVA) d'un modèle à effet aléatoire, selon les principes décrits de la norme ISO 5725, à savoir une décomposition de la somme des carrés des écarts totale en deux sommes des carrés d'écarts

$$\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (Z_{ij} - \bar{Z})^2 = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (Z_{ij} - \bar{Z}_i)^2 + \sum_{i=1}^I J(\bar{Z}_i - \bar{Z})^2 \quad \text{eq:(8)}$$

Cette équation est traditionnellement écrite sous une forme abrégée, faisant appel à trois sommes de carrés d'écarts (*SCE*).

$SCE_t = SCE_B + SCE_r$ Équation générale de l'analyse de variance

Où chacune des sommes est définie comme suit pour faciliter l'interprétation :

- ✓ *SCE_t* Somme totale des écarts à la moyenne générale du niveau
- ✓ *SCE_B* Somme des écarts inter-sérient
- ✓ *SCE_r* Somme des écarts intra-série

Comme le propose la norme ISO 5725, il n'est pas nécessaire de développer les trois sommes de carrés pour effectuer les calculs ; le calcul de *SCE_B* se fait par différence. Cette méthode peut poser des problèmes si le résultat est négatif : forcer alors la valeur de *SCE_B* à 0.

$SCE_B = SCE_t - SCE_r$ si $SCE_B > 0$

$SCE_B = 0$ si $SCE_B \leq 0$

Calculer la variance de répétabilité du niveau, à partir des répétitions z_{ij} :

$$S_r^2 = \frac{SCE_r}{J(I-1)} \quad \text{eq:(9)}$$

Donc l'écart type de répétabilité

$$S_r = \sqrt{S_r^2} \quad \text{eq:(10)}$$

Calculer la variance inter-séries notée S_B^2 , comme suit :

$$S_B^2 = \frac{SCE_B}{J(I-1)} - \frac{S_r^2}{J} \quad \text{eq:(11)}$$

Donc l'écart type inter-série noté

$$S_B = \sqrt{S_B^2} \quad \text{eq:(12)}$$

Calculer la variance de fidélité intermédiaire du niveau :

$$S_{FI}^2 = S_L^2 + S_r^2 \quad \text{eq:(13)}$$

Donc L'écart-type de fidélité intermédiaire

$$S_{FI} = \sqrt{S_L^2 + S_r^2} \quad \text{eq:(14)}$$

5) Calcul de la justesse :

La justesse fournit une indication sur les erreurs systématiques de la procédure analytique.

Elle peut s'exprimer de différentes façons. Les trois paramètres présentés, mesurent en réalité des défauts de justesse.

Les paramètres de la justesse	Equation
Biais absolu	$B_{\text{biais}} = Z_j - X_j$
Biais relatif	$B_{\text{biais}} = \frac{ Z_j - X_j }{X_j} * 100$
Taux de recouvrement ou de récupération	$R_j(\%) = \frac{Z_j}{X_j} * 100$

Tableau 7 : Calcul de biais et recouvrement

Avec :

X_j : La valeur de référence d'un échantillon (concentration introduite)

Z_j : est la moyenne de mesurages répétés sur ce même échantillon (concentration calculée).

6) *Calcul des intervalles de tolérance :*

- La méthode de calcul proposée par Mee (1984) est celle qui a été choisie pour cette procédure. Elle a aussi été adoptée par une commission de la Société des sciences et techniques pharmaceutiques (SFSTP - 2003, 2006). Le calcul se fait à partir des données du critère de fidélité et de justesse par niveau, indépendamment pour chaque niveau de concentration k . Pour des raisons de simplification des formules, l'indice k est omis dans les formules suivantes.
- Exprimer l'intervalle de tolérance comme un intervalle symétrique autour de la concentration retrouvée moyenne \bar{Z} du niveau :

$$\bar{Z} \pm K_{\text{tol}} S_{IT} \quad \text{eq:(15)}$$

Calculer l'écart-type de l'intervalle de grâce aux formules suivantes :

$$S_{IT} = S_{FI} \times \sqrt{\left(1 + \frac{1}{I \times J \times B^2}\right)} \quad \text{eq:(16)}$$

$$B = \sqrt{\frac{R+1}{R \times J + 1}} \quad \text{eq:(17)}$$

$$R = \frac{S_L^2}{S_r^2} \quad \text{eq:(18)}$$

La quantité k_{tol} est appelé **facteur de couverture de l'intervalle de tolérance** et vaut :

$$K_{\text{tol}} = t_{v, \frac{1+\beta}{2}} \quad \text{eq:(19)}$$

$t_{v, \frac{1+\beta}{2}}$ Est le quantile de la distribution t de Student pour v degrés de liberté β et la probabilité du contenu de l'intervalle de tolérance. Le nombre de degrés de liberté v est calculé selon méthode d'approximation et donne :

$$V = \frac{(R+1^2)}{\frac{(R+\frac{1^2}{J})}{I-1} + \frac{1-\frac{1}{J}}{IJ}} \quad \text{eq:(20)}$$

$$L_j = \text{biais}(\%) - K_{tol} \quad \text{eq:(21)}$$

$$U_j = \text{biais}(\%) + K_{tol} \quad \text{eq:(22)}$$

Donc l'intervalle de tolérance est un moyen statistique commode d'exprimer l'erreur totale puisqu'il combine simultanément les erreurs aléatoires et systématiques.

7) Construire le profil d'exactitude :

Le profil d'exactitude peut être construit de différentes façons, en fonction du type de données traité. La méthode la plus classique, lorsqu'on a à faire à des concentrations relatives, est celle présentée à la **figure 4** où les performances sont exprimées de façon relative, par un taux de recouvrement. Mais si les données sont des comptages exprimés en logarithmes, il vaut mieux exprimer les performances, comme des différences entre 2 logarithmes, ce qui est équivalent à un rapport. [2]

Pour construire le profil d'exactitude, réaliser les étapes suivantes :

– à reporter sur l'axe horizontal

1) Les valeurs de référence moyennes.

– à reporter sur l'axe vertical

2) Les limites de tolérance basses relatives ;

3) Les limites de tolérance hautes relatives ;

4) Les taux de recouvrement moyens ;

5) Les limites d'acceptabilité basses relatives ;

6) Les limites d'acceptabilité hautes relatives.

Reporter ces données sur un graphique en utilisant les valeurs de référence moyennes pour dessiner l'axe des abscisses, comme l'illustre la **figure 4**.

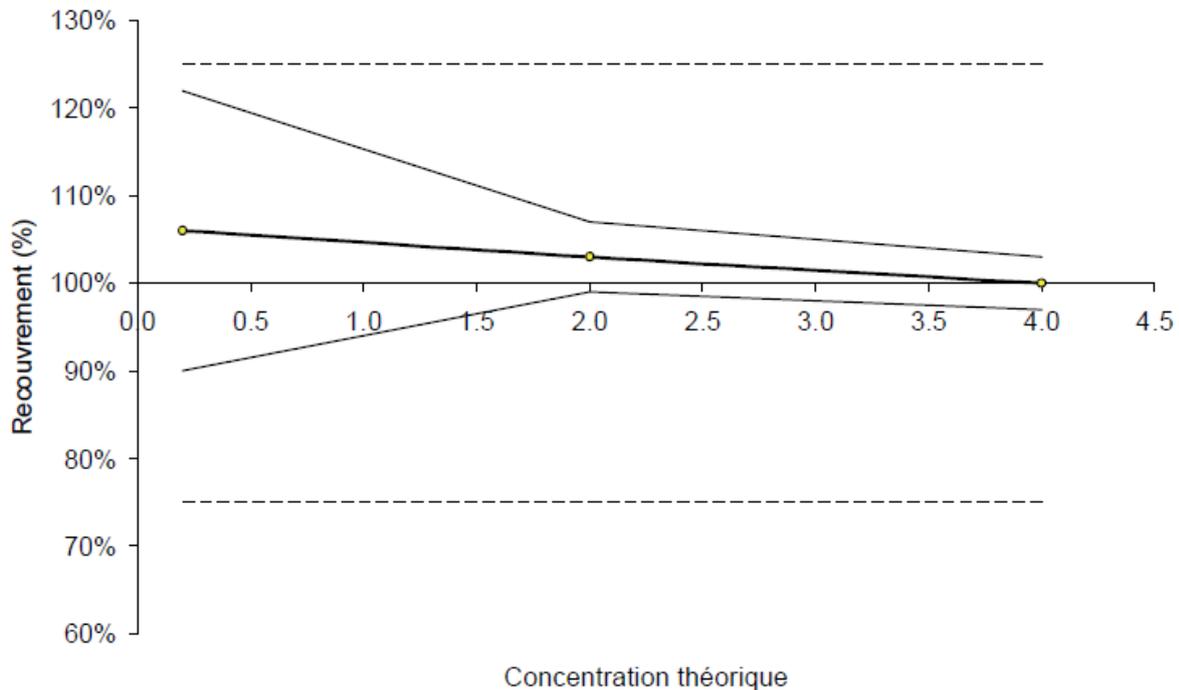


Figure 4: Profil d'exactitude exprimé par le taux de recouvrement

8) *La limite de quantification :*

La LOQ peut être obtenue exactement en calculant l'abscisse du point d'intersection. Mais les calculs doivent être réalisés sur les valeurs absolues des limites d'acceptabilité et de tolérance car le fait de passer aux valeurs relatives, utilisées en pratique pour la représentation graphique du profil, introduit une interpolation hyperbolique. En effet, le calcul des coordonnées du point d'intersection de deux droites est un problème d'algèbre bien connu. [2]

Pour calculer la LOQ entre deux niveaux notés A et B,

- _Z les valeurs absolues lues sur l'axe des ordonnées ;
- _X les valeurs de référence fournies par l'axe des abscisses ;
- _xA et xB les abscisses des deux niveaux A et B ;
- _xAt et xBt les ordonnées sur la limite supérieure (ou inférieure) de l'intervalle de tolérance;
- _xAa et xBa les ordonnées sur la limite supérieure (ou inférieure) d'acceptabilité ;

Les deux droites peuvent être représentées à l'aide d'un système de deux équations, dont la première traduit la limite de l'intervalle de tolérance (paramètres t_0 l'ordonnée à l'origine et t_1 la pente) et la seconde la limite d'acceptabilité (paramètres a_0 et a_1) :

$$Z = t_0 + t_1 X \quad \text{eq:(23)}$$

$$Z = a_0 + a_1 X \quad \text{eq:(24)}$$

On peut noter que :

_ a_0 doit être égal à 0 puisque la limite de l'intervalle d'acceptabilité passe toujours par le zéro.

_ Si on cherche l'intersection avec la limite supérieure d'acceptabilité $Z_{At} = x_A(1 + \lambda)$; il faudra prendre $1 - \lambda$ si on recherche l'intersection avec la limite inférieure.

$$t_1 = \frac{Z_{Bt} - Z_{At}}{x_B - x_A} \quad \text{eq:(25)}$$

Pour l'ordonnée à l'origine t_0 , on l'obtient à partir de la première équation du système :

$$t_0 = Z_{At} - x_A \times t_1 \quad \text{eq:(26)}$$

De façon symétrique :

$$a_1 = \frac{Z_{Ba} - Z_{Aa}}{x_B - x_A} \quad \text{eq:(27)}$$

$$a_0 = Z_{Aa} - x_A \times a_1 \quad \text{eq:(28)}$$

Pour résoudre ce système d'équations, poser :

$$t_0 + t_1 X = a_0 + a_1 X \quad \text{eq:(29)}$$

$$X(t_1 - a_1) = a_0 - t_0 \quad \text{eq:(30)}$$

On obtient ainsi la valeur de x_{LQ} :

$$x_{LQ} = \frac{a_0 - t_0}{t_1 - a_1} \quad \text{eq:(31)}$$

III. La méthode des Ajouts Dosés :

Cette méthode est utilisée lorsque les effets de matrice sont importants et dans les cas où la substance d'intérêt peut difficilement être extraire de la matrice. Dans ce cas, la matrice va être analysée seule puis avec des supplémentaires –ou ajouts- connues en substance à doser. [6]

La droite de réponse du détecteur en fonction de la concentration sur la figure. Son équation est la suivante :

$$Reponse_{totale} = a \times C_{ajout} + Reponse_X \quad \text{eq:(32)}$$

Avec :

a : pente de la droite d'étalonnage

C_{ajout} : Concentration de l'ajout réalisé

$Reponse_{totale}$: Réponse du détecteur

$Reponse_X$: Réponse du détecteur pour la solution inconnue sans ajout

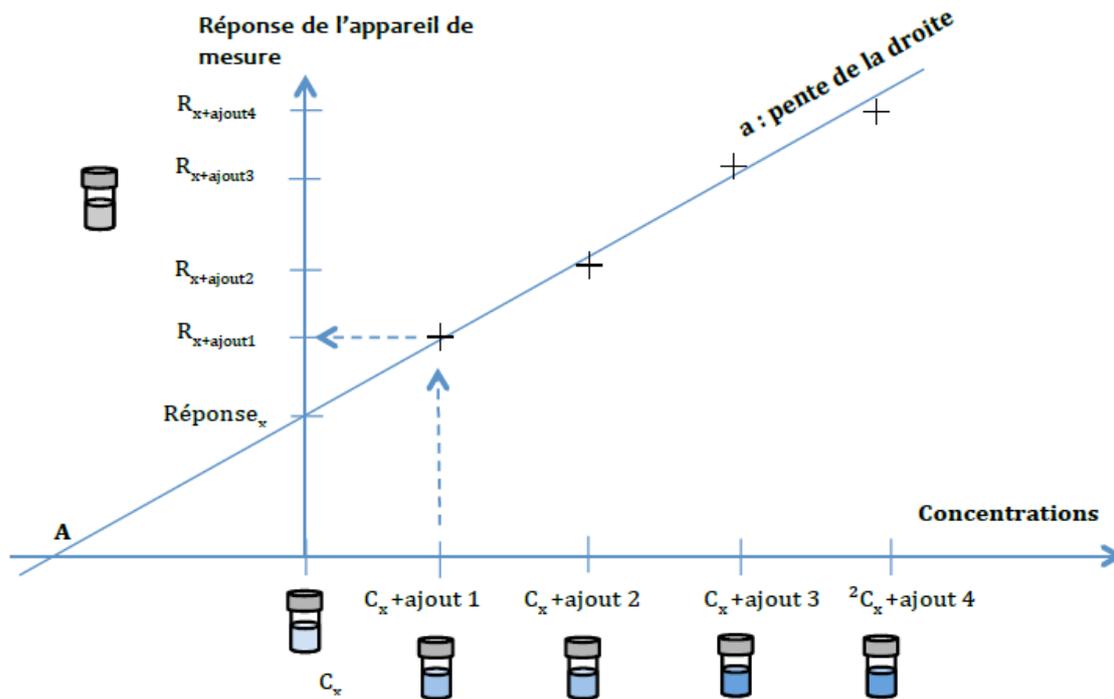


Figure 5 : Représentation graphique de l'étalonnage par ajouts dosés

Par ailleurs, la concentration totale des solutions dosées est égale à la concentration de la solution inconnue à laquelle il faut ajouter la concentration de l'ajout.

Soit :

Sur cette droite, pour le point particulier A, où la réponse du détecteur est nulle, la concentration totale est également nulle :

$$Reponse_{totale} = 0 \text{ et } C = 0$$

Soit :

$$a \times C_{ajout} + Reponse_x = 0 \text{ et } C_x + C_{ajout} = 0$$

Soit donc :

$$C_{ajout} = -Reponse_x/a \text{ et } C_x = -C_{ajout}$$

$$C_x = Reponse_x/a \text{ eq:(33)}$$

I. Mode opératoire :

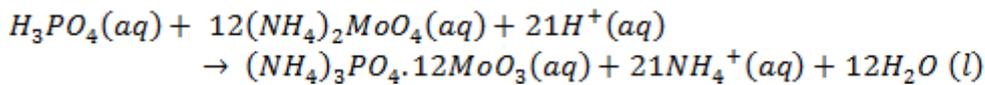
Ce travail consiste à examiner les facteurs de validation analytique tout en passant par un mode opératoire bien déterminé avec des conditions expérimentales prédéfinies à l'avance.

Pour la réalisation des essais on a adopté le mode opératoire suivant :

✓ PRINCIPE :

La méthode consiste à doser la teneur en phosphore dans le produit fini (alimentation animale). Après minéralisation d'une prise d'essai, par voie humide (élimination la matière organique) le traitement de la solution se fait par le réactif vanado-molybdique (mélange de solution d'acide nitrique concentré, de vanadate d'ammonium et de molybdate d'ammonium).

Les ions phosphate PO_4^{3-} forment en milieu acide avec les ions molybdate un complexe phosphomolybdique de coloration jaune suivant une réaction quantitative :



Complexe de coloration jaune

Plus la concentration de ce complexe est grande, plus l'intensité de la couleur jaune est importante.

Mesurage de l'absorbance de la solution jaune ainsi obtenue, au spectrophotomètre, à 430 nm.

✓ APPAREILLAGE :

- Four à moufle électrique $550 \pm 20^\circ\text{C}$
- Creusets à incinération en quartz ou en porcelaine
- Spectrophotomètre à 430 nm, cuves de 10 mm



Figure 6 : Spectrophotomètre

- Balance analytique



Figure 7 : Balance analytique

- Ballon de kjeldahl de 250ml de capacité



Figure 8 : Ballon de kjeldahl de 250ml

✓ **REACTIFS :**

- Acide nitrique concentré $d=1.38$
- Acide sulfurique concentré $d=1.84$
- Réactifs vanado-molybdique
- Hyptamolybdate d'ammonium solution
- Monovanadate d'ammonium solution
- Solution étalon de phosphore

✓ **PREPARATION :**

- Peser à 1 mg près, 1 g ou plus de l'échantillon. Introduire la prise d'essai dans un matras de Kjeldahl.

- Ajouter 20 ml d'acide sulfurique, agiter pour imprégner complètement la matière d'acide et éviter qu'elle n'adhère aux parois du ballon.
- Chauffer et maintenir pendant 10 min à ébullition. Laisser refroidir légèrement, ajouter 2 ml d'acide nitrique concentré.
- Chauffé doucement, laissé refroidir légèrement, ajouter à nouveau un peu d'acide nitrique concentré et porter à ébullition.
- Répéter ces opérations jusqu'à obtention d'une solution incolore.
- Refroidir, ajouter un peu d'eau, transvaser le liquide dans un ballon jaugé de 500 ml en rinçant le matras à l'eau chaude. Laisser refroidir, compléter au volume avec de l'eau, homogénéiser et filtrer.

✓ **Développement de la coloration et mesurage de l'absorbance :**

- Diluer une partie aliquote du filtrat obtenu. Pour obtenir une concentration en phosphore atteignant au maximum 40 μ g/ml.
- Introduire 10 ml de cette solution dans un tube à essai et y ajouter 10 ml du réactif vanadomolybdique.
- Homogénéiser et laisser reposer 10 min au moins à la température de 20°C (en général à la température du laboratoire).
- Mesurer la densité optique au spectrophotomètre à 430 nm par comparaison avec une solution obtenue par addition de 10 ml de réactif vanadomolybdique à 10 ml d'eau.

✓ **Etablissement de la courbe d'étalonnage :**

- Préparer à partir de la solution étalon des solutions contenant respectivement 5, 10, 20, 30, 40 μ g de phosphore par ml.
- Prélever 10 ml de chacune de ces solutions et y ajouter 10 ml du réactif vanadomolybdique.
- Homogénéiser et laisser reposer 10 min au moins à la température de 20°C (en général à la température du laboratoire).
- Mesurer la courbe d'étalonnage en portant en ordonnée les valeurs de la densité optique et en abscisse les quantités correspondantes de phosphore. La courbe est linéaire pour les concentrations comprises entre 0 et 40 μ g/ml.

✓ **EXPRESSION DES RESULTATS :**

La teneur en phosphore total, exprimée en pourcentage en masse du produit tel quel est égale à :

$$\frac{X \times 500 \times F \times 100}{m \times 10} = \frac{X \times 500}{\frac{m}{100000}} \times 100$$

X : est la teneur en phosphore, en microgrammes par millilitre, de la partie aliquote de la solution d'essai, déterminée à partir de la courbe d'étalonnage.

M : est la masse, en gramme, de la prise d'essai.

F : est l'inverse du facteur de dilution de la partie aliquote.

II. Validation analytique :

1) Spécificité et interférences :

Avant la préparation des deux gammes standard d'étalonnage et standard de validation il faut vérifier la spécificité.

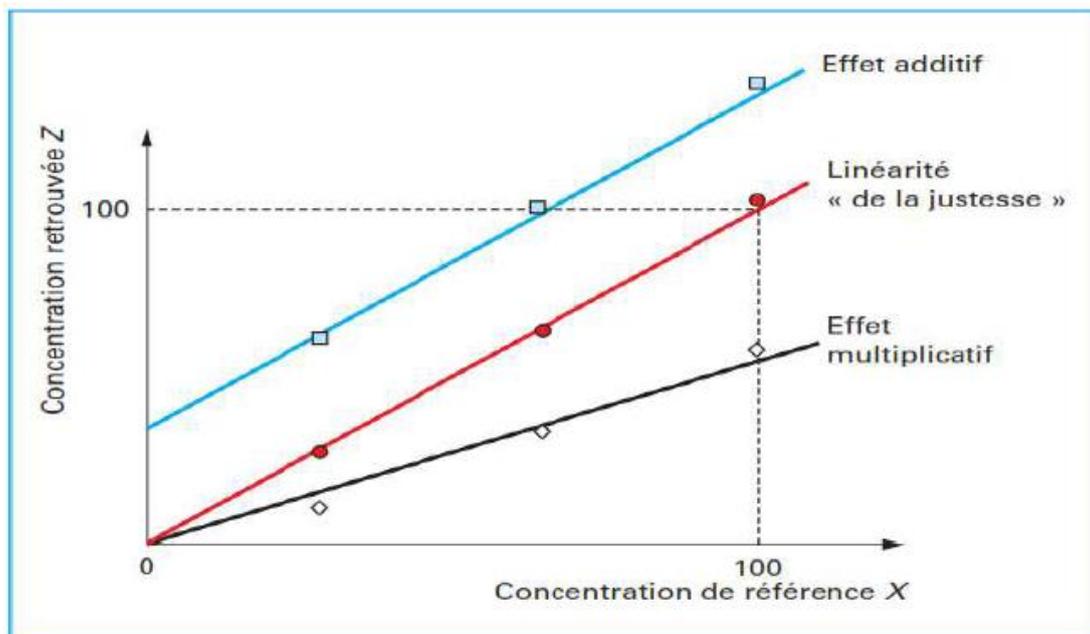
Une procédure d'analyse est dite « spécifique » lorsqu'elle permet de garantir que le signal mesure provient seulement de la substance à analyser ou qu'elle permet de mesurer quantitativement un paramètre physicochimique ou un groupement fonctionnel d'une ou de plusieurs substance dans l'échantillon.

Le critère de spécificité sont plutôt qualitatifs et ne pourront pas vraiment être calculés. En outre, il est assez évident qu'ils sont à l'origine d'un manque de justesse et participeront quantitativement à ce qu'on appelle globalement l'erreur de mesure ou erreur totale.

Il est facile de comprendre que la cause principale d'une « non-spécificité » est la présence d'interférences. Donc, le manque de spécificité ou les interférences sont une des causes d'erreur de justesse. En dehors d'une origine instrumentale, un nombre d'interférences sont dues à la présence d'autre constituant majoritaire dans l'échantillon : on parle alors d'effet de matrice.

Pratiquement les interférences ont deux conséquences néfastes. Soit, elles entraînent une surestimation de la concentration de l'échantillon, car la réponse est plus élevée que ce qu'elle devrait être. Soit, elles causent une sous-estimation de la concentration, car le signal est partiellement masqué. Dans les deux cas, elles occasionnent donc un biais de justesse (erreur systématique).

Dans le cas d'un dosage dans une matrice qu'on ne maîtrise pas des composantes, la méthode graphique reste la meilleure solution pour démontrer l'absence d'interférences.



Graph 1 : Représentation graphique de concentration introduction en fonction de concentration retrouvée, visualisant l'effet de matrice sous ces différents aspects, additifs et multiplicatifs

La figure illustre un exemple de cette droite de justesse selon trois situations hypothétiques :

- ✓ Les cercles pleins produisent une droite confondue avec la première bissectrice ; la spécificité est parfaite ;
- ✓ Les carrés illustrent un décalage systématique des concentrations retrouvées ; on parle d'effet additif ;
- ✓ Les losanges illustrent une situation dans laquelle le biais est proportion à la concentration ; on parle d'effet multiplicatif.

Soit X la valeur introduction et Z la concentration retrouvée par étalonnage inverse, ces trois droites correspondent aux équations suivantes :

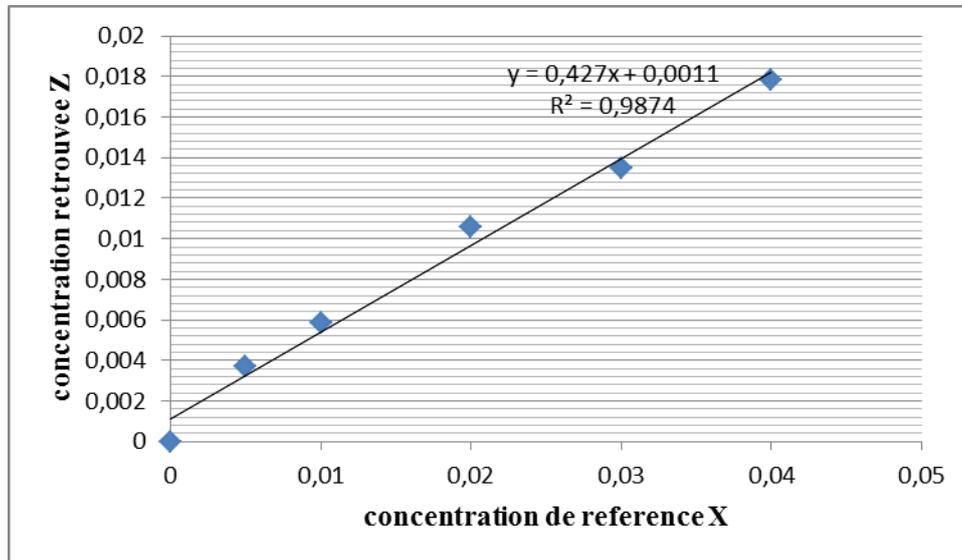
- Absence d'effet : $Z = X$
- Effet multiplicatif : $Z = b X$
- Effet additif : $Z = a + X$

Mais, on peut aussi supposer qu'il existe des situations où ces effets se combinent :

- Combinaison des effets : $Z = a + b X$

2) Etude de la spécificité les interférences :

Elles sont estimées par la méthode des ajouts dosés. On observe un décalage systématique entre la concentration retrouvée et la concentration introduit (effet additif et effet multiplication) donc la méthode non spécifique, et la présence des interférences.



Graph2 : Représentation graphique de la concentration introduite en fonction de la concentration retrouvée

3) Réalisation des gammes STD d'étalonnage, STD de validation :

Standard d'étalonnage : les solutions de standard d'étalonnage ont été analysées pendant trois jours différents ($p=3$), avec des niveaux de concentration ($m=5$), chaque niveau étant répété trois fois ($n=3$), les concentrations introduits sont exprimer en mg/ml.

On prépare 5 concentrations réparties sur l'intervalle d'étude avec 3 essais par niveau.

D'après le calcul on a trouvé les résultats suivants :

Niveau j	Concentration (mg/ml)	Absorbance		
		série 1	série 2	série 3
1	0,0050	0,095	0,079	0,091
		0,119	0,085	0,076
		0,089	0,07	0,09
2	0,0100	0,164	0,15	0,184
		0,18	0,161	0,273
		0,195	0,16	0,183
3	0,0200	0,339	0,301	0,34
		0,344	0,328	0,439
		0,355	0,312	0,352
4	0,0300	0,515	0,481	0,5
		0,531	0,502	0,485
		0,503	0,487	0,509
5	0,0400	0,671	0,624	0,648
		0,678	0,669	0,631
		0,656	0,647	0,682

Tableau 8 : Gamme de standard d'étalonnage



Figure9 : Gammes de standards de validation et d'étalonnage

Standard de validation : les solutions de standard de validation ont été analysées pendant trois jours différents ($p=3$), avec des niveaux de concentration ($m=5$), chaque niveau étant répété trois fois ($n=3$), les concentrations introduits sont exprimer en mg/ml.

Puisque la concentration du phosphore est inconnue dans l'échantillon on propose la méthode des ajouts dosés.

On prépare 5 concentrations réparties sur l'intervalle d'étude avec 3 essais par niveau(dopé par la solution étalon) plus le blanc qui comporte l'échantillon seul (sans ajout).

D'après le calcul on a trouvé les résultats suivants :

Niveau j	Concentration (mg/ml)	Absorbance		
		série 1	série 2	série 3
1	0,00495	0,181	0,176	0,173
		0,223	0,178	0,178
		0,192	0,178	0,19
2	0,01000	0,25	0,247	0,266
		0,284	0,254	0,375
		0,298	0,268	0,283
3	0,02048	0,425	0,398	0,422
		0,448	0,421	0,541
		0,458	0,42	0,452
4	0,03125	0,601	0,578	0,582
		0,635	0,595	0,587
		0,606	0,595	0,609
5	0,03977	0,757	0,721	0,73
		0,782	0,762	0,733
		0,759	0,755	0,782
0	sans ajout	0,086	0,097	0,082
		0,104	0,093	0,102
		0,103	0,108	0,1

Tableau9 : Gamme de standard de validation

3) Réalisation des étapes du concept de l'erreur totale :

a) Fonction de réponse :

En utilisant les données de la gamme des standards d'étalonnage, on va pouvoir générer différents modèles de calibration afin de choisir le plus adéquat. Le tableau suivant regroupe les résultats statistiques des modèles générés.

Modèle	séries	a1	a0	a2	R ²	R ² ajusté	Erreur type	p-value pente
Simple	1	16,3	0,0189	0	0,997	0,997	0,0123898	0
	2	16,4	-0,00631	0	0,997	0,997	0,0126354	0
	3	15,6	0,0375	0	0,969	0,966	0,0386603	0
Simple pondérée 1/X	1	16,4	0,0184	0	0,995	0,994	0,11884	0
	2	16,3	-0,00453	0	0,997	0,997	0,0854498	0
	3	16,5	0,019	0	0,96	0,957	0,3394	0
Tran ln	1	0,921	2,55	0	0,99	0,99	0,0738052	0
	2	1,02	2,85	0	0,997	0,996	0,0488859	0
	3	0,951	2,68	0	0,965	0,963	0,145943	0
racine carré	1	3,91	0,0374	0	0,995	0,995	0,0136733	0
	2	4,08	-0,0113	0	0,997	0,997	0,010621	0
	3	3,85	0,0481	0	0,967	0,964	0,0361465	0
quadratique	1	17,1	0,0131	-17,4	0,997	0,997	0,0126667	0
	2	15,9	-0,0033	9,1	0,997	0,996	0,0130902	0
	3	20,9	-0,0015	-118	0,974	0,969	0,0367886	0

Tableau 10 : Résultats statistique obtenu au prés de chaque model généré

Les résultats obtenus après prédiction

Concentration (mg/ml)	Concentration prédite		
	série 1	série 2	série 3
0,00495	0,01278797	0,01353471	0,01225834
0,00495	0,01266565	0,01377934	0,01219432
0,00495	0,01266565	0,01322892	0,01200224
0,01000	0,01523445	0,01543059	0,01437119
0,01000	0,01517329	0,01561406	0,01449925
0,01000	0,01529562	0,0155529	0,01443522
0,02048	0,01957696	0,02056782	0,0191091
0,02048	0,02012742	0,02105708	0,01878898
0,02048	0,02031091	0,02148518	0,01821274
0,03125	0,02587666	0,02521579	0,02205429
0,03125	0,02557085	0,02497116	0,02365494
0,03125	0,02526504	0,02613315	0,02327078
0,03977	0,02985219	0,02870177	0,02640805
0,03977	0,02746687	0,02943566	0,02595987
0,03977	0,02844546	0,02974145	0,02595987
sans ajout	0,0093629	0,01102725	0,00854484
	0,00960754	0,01096609	0,0086729
	0,00966871	0,01084377	0,00873692

Tableau 11 : Résultats des concentrations retrouvées par prédiction inverse

Après la prédiction en soustraire le blanc (échantillon seul) de la concentration prédite (échantillon + étalon) d'après la relation suivante :

$$C_{recuperer} = C_{predite} - C_{blanc} \quad \text{eq:(34)}$$

Les résultats obtenus après la soustraction

Concentration récupérer		
série 1	série 2	série 3
0,00342508	0,00250746	0,0037135
0,0030581	0,00281325	0,00352142
0,00299694	0,00238514	0,00326532
0,00587156	0,00440334	0,00582635
0,00556575	0,00464797	0,00582635
0,00562691	0,00470913	0,0056983
0,01021407	0,00954057	0,01056426
0,01051988	0,01009099	0,01011608
0,0106422	0,01064141	0,00947582
0,01651376	0,01418854	0,01350945
0,0159633	0,01400507	0,01498204
0,01559633	0,01528938	0,01453386
0,0204893	0,01767452	0,0178632
0,01785933	0,01846957	0,01728697
0,01877676	0,01889767	0,01722295

Tableau 12 : Résultats des concentrations retrouvées après la soustraction du blanc

b) Calcul de la justesse :

La justesse fournit une indication sur les erreurs systématiques de la procédure analytique.

Concentration récupérer			Moy gle (mg/ml)	Biais Abs (mg/ml)	Biais %	Rec %
série 1	série 2	série 3				
0,00342508	0,00250746	0,0037135	0,003	0,002	-37,854	62,146
0,0030581	0,00281325	0,00352142				
0,00299694	0,00238514	0,00326532				
0,00587156	0,00440334	0,00582635	0,005	0,005	-46,471	53,529
0,00556575	0,00464797	0,00582635				
0,00562691	0,00470913	0,0056983				
0,01021407	0,00954057	0,01056426	0,010	0,010	-50,192	49,808
0,01051988	0,01009099	0,01011608				
0,0106422	0,01064141	0,00947582				
0,01651376	0,01418854	0,01350945	0,015	0,016	-52,149	47,851
0,0159633	0,01400507	0,01498204				
0,01559633	0,01528938	0,01453386				
0,0204893	0,01767452	0,0178632	0,018	0,021	-54,030	45,970
0,01785933	0,01846957	0,01728697				
0,01877676	0,01889767	0,01722295				

Tableau 13 : Calcul des biais et recouvrement

On observe un biais systématique important dû à un taux de recouvrement moyen inférieur à 100 %, on peut alors proposer d'appliquer un facteur de correction sur les réponses instrumentales, pour corriger ce biais systématique.

c) Calcul de la fidélité :

Niveau j	Concentration récupérer			Moy	S ² _{rép}	S _{rép}	CV _{rép}	S ² _B	S ² _{FI}	S _{FI}	CV _{FI}
	série 1	série 2	série 3								
1	0,0034	0,0025	0,0037	0,0031	5,09E-08	2,26E-04	7,34E+00	2,05E-07	2,56E-07	5,06E-04	1,65E+01
	0,0031	0,0028	0,0035								
	0,0030	0,0024	0,0033								
2	0,0059	0,0044	0,0058	0,0054	1,93E-08	1,39E-04	2,59E+00	4,36E-07	4,55E-07	6,75E-04	1,26E+01
	0,0056	0,0046	0,0058								
	0,0056	0,0047	0,0057								
3	0,0102	0,0095	0,0106	0,0102	2,00E-07	4,48E-04	4,39E+00	0,00E+00	2,00E-07	4,48E-04	4,39E+00
	0,0105	0,0101	0,0101								
	0,0106	0,0106	0,0095								
4	0,0165	0,0142	0,0135	0,0150	4,22E-07	6,49E-04	4,34E+00	7,25E-07	1,15E-06	1,07E-03	7,16E+00
	0,0160	0,0140	0,0150								
	0,0156	0,0153	0,0145								
5	0,0205	0,0177	0,0179	0,0183	7,64E-07	8,74E-04	4,78E+00	3,76E-07	1,14E-06	1,07E-03	5,84E+00
	0,0179	0,0185	0,0173								
	0,0188	0,0189	0,0172								

Tableau 14 : Calcul des différentes variances pour le calcul de la fidélité et les CV de répétabilité, fidélité intermédiaire

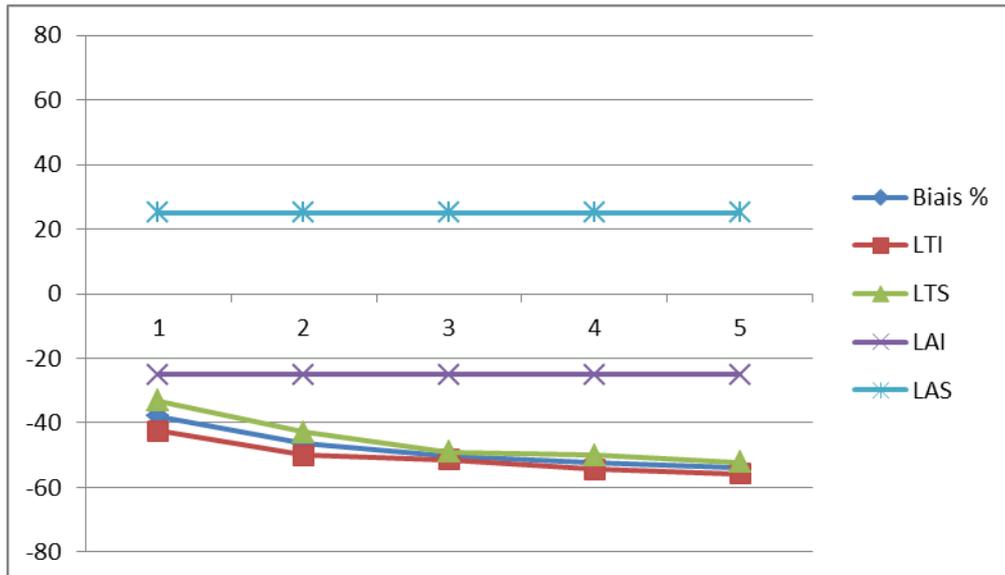
D'après le tableau on constate que la valeur des écarts types de répétabilité augmente plus qu'on s'approche du dernier niveau. Pour le premier niveau le CV est important de l'ordre de 7%, montre une grande variation entre les résultats, or on observe pour les autres niveaux même si l'écart type devient important le coefficient de variation nous rassure, montrant des valeurs inférieures à 6%. Ce qui explique le fait d'avoir des limites de tolérance qui rétrécissent tout en convergeant vers le niveau maximum.

d) Calcul des intervalles de tolérance :

Niveau j	Concentration	Biais %	CV FI %	LTI	LTS	LAI	LAS
1	0,005	-37,853639	16,4515564	-4,26E+01	-3,31E+01	-25	25
2	0,01	-46,4714905	12,6048553	-5,00E+01	-4,30E+01	-25	25
3	0,02048	-50,1924486	4,38938508	-5,14E+01	-4,90E+01	-25	25
4	0,03125	-52,1487147	7,16276741	-5,43E+01	-5,00E+01	-25	25
5	0,03977	-54,0300428	5,83940386	-5,58E+01	-5,22E+01	-25	25

Tableau 15 : Critères d'établissement du profil d'exactitude

e) Profil d'exactitude :



Graph 3 : Profil d'erreur totale par la fonction droite linéaire

On observe que les limite de tolérance à 80% ne sont pas comprise entre les limite d'acceptabilité dans un domaine de validité s'étend de 0,005 mg/ml à 0,04mg/ml, la méthode n'est pas encore valide dans ce domaine.

Pour cette raison, nous avons introduit un facteur de correction en se basant sur Le taux de recouvrement moyen est de 51,861 %, on peut prendre un facteur $1/0,518 \approx 1,93$ et l'appliquer à tous les résultats.

coefficient de correction 1,92824117

f) Calcul de la justesse après correction :

Concentration récupérer corriger			Moy gle (mg/ml)	Biais Abs (mg/ml)	Biais %	Rec %
série 1	série 2	série 3				
0,00660437	0,00483498	0,00716052	0,0059	-0,001	19,833	119,833
0,00589676	0,00542462	0,00679015				
0,00577883	0,00459913	0,00629632				
0,01132178	0,0084907	0,01123461	0,0103	0,000	3,216	103,216
0,01073211	0,00896241	0,01123461				
0,01085004	0,00908034	0,01098769				
0,01969518	0,01839653	0,02037044	0,0197	0,001	-3,959	96,041
0,02028486	0,01945786	0,01950624				
0,02052073	0,0205192	0,01827167				
0,03184251	0,02735893	0,02604947	0,0288	0,002	-7,731	92,269
0,0307811	0,02700516	0,02888899				
0,03007349	0,02948161	0,02802479				
0,03950831	0,03408074	0,03444456	0,0353	0,005	-11,359	88,641
0,03443709	0,03561379	0,03333345				
0,03620612	0,03643927	0,03320999				

Tableau16 : Calcul des biais et recouvrement après correction

Nous remarquons que le biais relatif après correction devenu inférieur à celui collecté, avant correction démontrant ainsi l'efficacité du facteur de correction à minimiser le biais donnant plus d'exactitude à notre méthode. Le taux de recouvrement il dépasse le 100% pour le 1^{er} est le 2^{ème} niveau explique une surestimation de la concentration, pour les niveaux 3, 4,5 le taux de recouvrement est inférieure à 100% c.à.d. une sous-estimation de la concentration.

g) Calcul de la fidélité après correction :

La fidélité de la méthode se caractérise par le coefficient de variation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire

Niveau j	Concentration récupérer corriger			Moy	S ² _{rép}	S _{rép}	CV _{rép}	S ² _B	S ² _{FI}	S _{FI}	CV _{FI}
	série 1	série 2	série 3								
1	0,0066	0,0048	0,0072	0,0059	1,89E-07	4,35E-04	7,34E+00	7,63E-07	9,52E-07	9,76E-04	1,65E+01
	0,0059	0,0054	0,0068								
	0,0058	0,0046	0,0063								
2	0,0113	0,0085	0,0112	0,0103	7,17E-08	2,68E-04	2,59E+00	1,62E-06	1,69E-06	1,30E-03	1,26E+01
	0,0107	0,0090	0,0112								
	0,0109	0,0091	0,0110								
3	0,0197	0,0184	0,0204	0,0197	7,45E-07	8,63E-04	4,39E+00	0,00E+00	7,45E-07	8,63E-04	4,39E+00
	0,0203	0,0195	0,0195								
	0,0205	0,0205	0,0183								
4	0,0318	0,0274	0,0260	0,0288	1,57E-06	1,25E-03	4,34E+00	2,70E-06	4,27E-06	2,07E-03	7,16E+00
	0,0308	0,0270	0,0289								
	0,0301	0,0295	0,0280								
5	0,0395	0,0341	0,0344	0,0353	2,84E-06	1,69E-03	4,78E+00	1,40E-06	4,24E-06	2,06E-03	5,84E+00
	0,0344	0,0356	0,0333								
	0,0362	0,0364	0,0332								

Tableau 17 : Calcul des différentes variances pour le calcul de la fidélité et les CV de répétabilité, fidélité intermédiaire après correction

On constate d'après le calcul présenté dans le tableau, que les valeurs des écarts types de répétabilité reste inchangées, elle augmente plus on s'approche du dernier niveau.

h) Calcul des intervalles de tolérance après correction :

Le calcul se fait à partir des données du critère de fidélité et de justesse par niveau, indépendamment pour chaque niveau de concentration k .

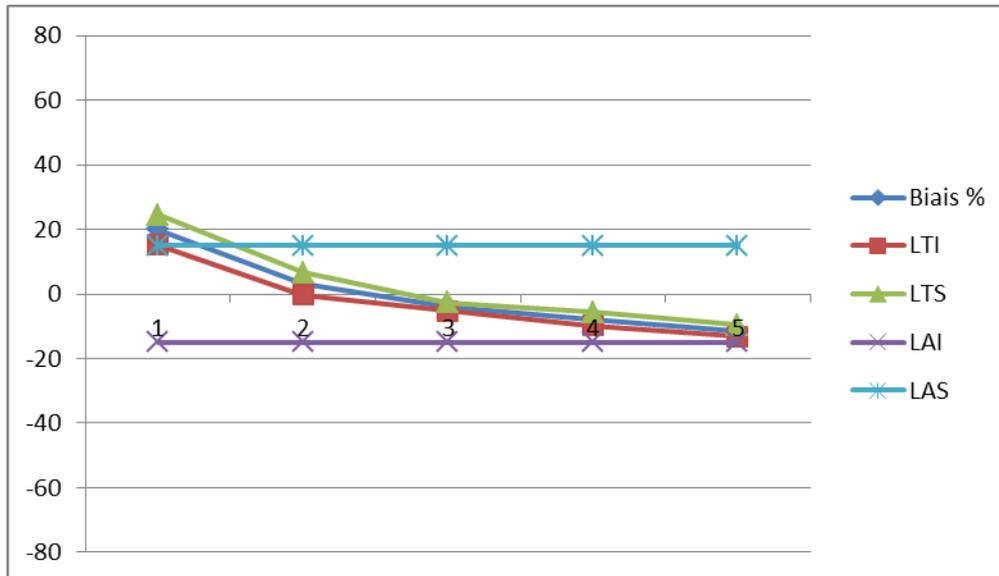
Niveau j	Concentration	Biais %	CV FI %	LTI	LTS	LAI	LAS
1	0,005	19,8331716	16,45155642	1,51E+01	2,46E+01	-25	25
2	0,010	3,21587553	12,60485534	-2,96E-01	6,73E+00	-25	25
3	0,020	-3,95902909	4,389385078	-5,18E+00	-2,74E+00	-25	25
4	0,031	-7,73118194	7,162767414	-9,90E+00	-5,57E+00	-25	25
5	0,040	-11,3588361	5,839403864	-1,32E+01	-9,55E+00	-25	25

Tableau 18 : Critères d'établissement du profil d'exactitude après correction

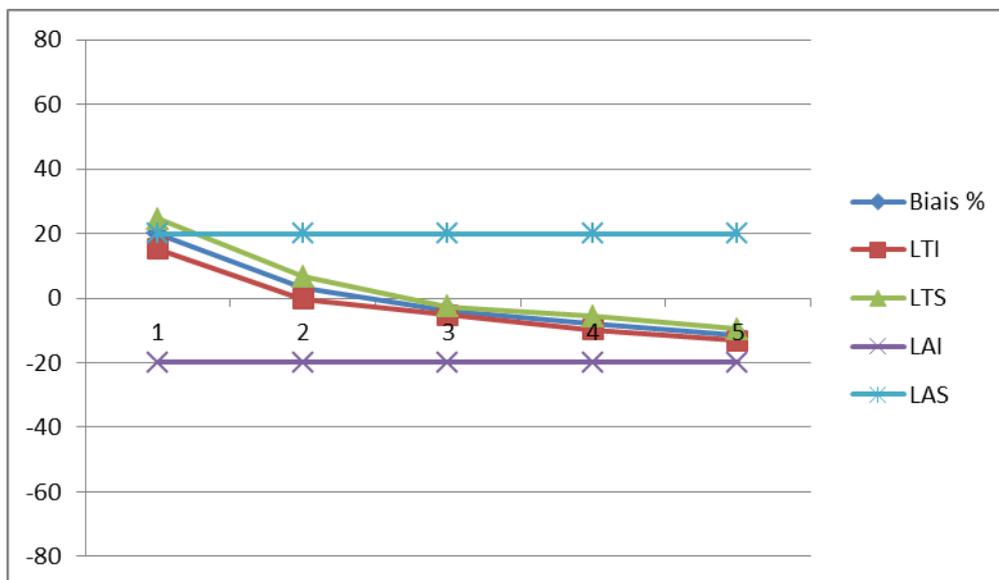
Les résultats nous démontrant que le facteur de correction est efficace pour s'affranchir du biais de justesse, permettant de valider la méthode.

i) Profil d'exactitude après correction :

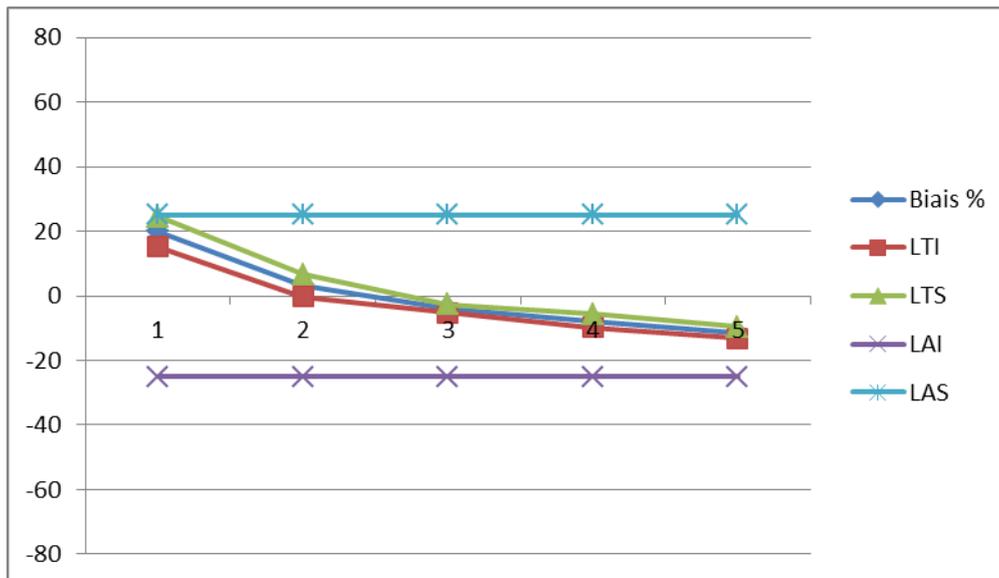
Après l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA), on travaille avec des limites d'acceptation de 15%, cependant avec des limites on est bien loin de valider nos résultats. Nous propose d'élargir ces limites à 20, puis à 25%, cette dernière est une valeur d'acceptation qui nous permet d'avoir un intervalle élargi dans on espère avoir une proportion de 80% des résultats futurs, inclus. Les profils suivants le montrent clairement :



Graph 4: Profil d'erreur totale par la fonction droite linéaire après correction à $\beta=80\%$ et $\lambda=+15\%$



Graph 5: Profil d'erreur totale par la fonction droite linéaire après correction à $\beta=80\%$ et $\lambda=+20\%$



Graph 6 : Profil d'erreur totale par la fonction droite linéaire après correction à $\beta=80\%$ et $\lambda=+25\%$

Nous constatons après avoir élargi notre intervalle d'acceptation à 25%, qu'on peut estimer avoir les résultats inclus avec leurs intervalles de tolérance.

La méthode peut dès lors être considérée comme exacte (valide) au niveau de confiance $\beta=80\%$ et l'intervalle de tolérance est inclus dans limite $[-25\%,25\%]$.

j) Limite de quantification :

Calculée à partir de la solution du système d'équations. Contribuant à la prise de décision sur la quantité minimale quantifiable de la méthode avec exactitude.

Le calcul des limites de quantification et de détection est établi comme suit :

	Niveau A	Niveau B
cenc moy theorique	0,005	0,01
Limite Tolérance haute	0,24557718	0,06727266
Limite Acceptabilité haute	0,255	0,26
droite	pente	origine
IT	-35,6609035	0,42388169
LA Haute	1	0,25
LQ	0,00474297	
LD	0,00143726	

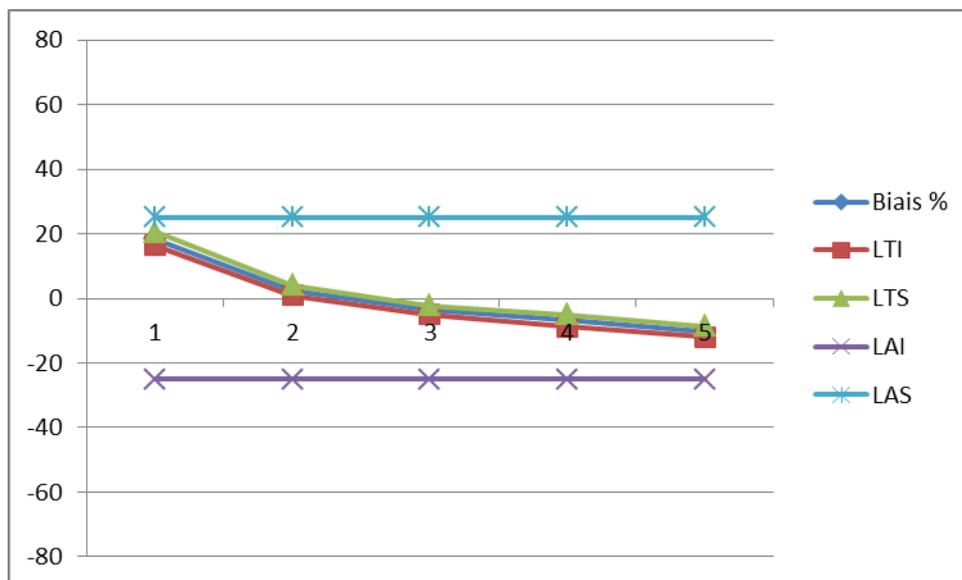
Tableau 19 : Calcul des limites de quantification et de détection

D'après le profil et le calcul de la limite de quantification on peut conclure que la méthode de dosage de phosphore totale est valide dans le domaine de validité entre 0,005mg/ml et

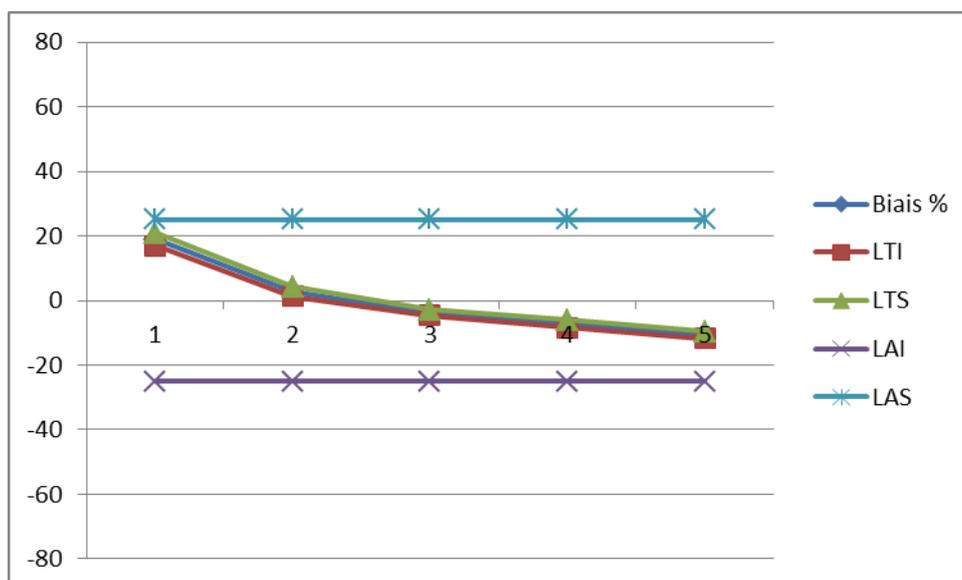
0,04mg/ml ; vu que les intervalles de tolérance sont compris dans l'intervalle d'acceptabilité fixé à 25% pour une proportion $\beta=80\%$. Donc on peut conclure que la méthode est capable de fournir des résultats acceptables.

4) *Génération de profil d'exactitude par la fonction de réponse transformation logarithmique, racine carré, quadratique et linéaire pondérée :*

Par le même principe adopté pour la fonction de réponse droite linéaire on va calculer les paramètres de la régression linéaire après transformation mathématique des concentrations et des réponses, par les mêmes étapes d'approche de l'erreur totale déjà mentionner, les figures suivantes montrent le profil d'exactitude après transformation logarithmique, racine carré, quadratique et linéaire pondérée.

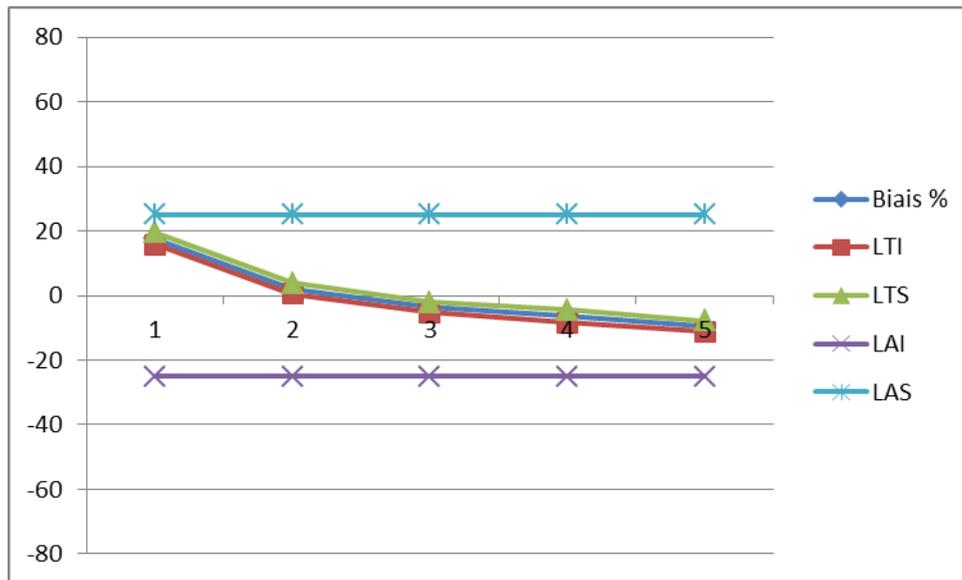


Graph 7 : Profil d'erreur totale par la fonction de réponse transformation logarithmique après correction à $\beta=80\%$ et $\lambda=+25\%$



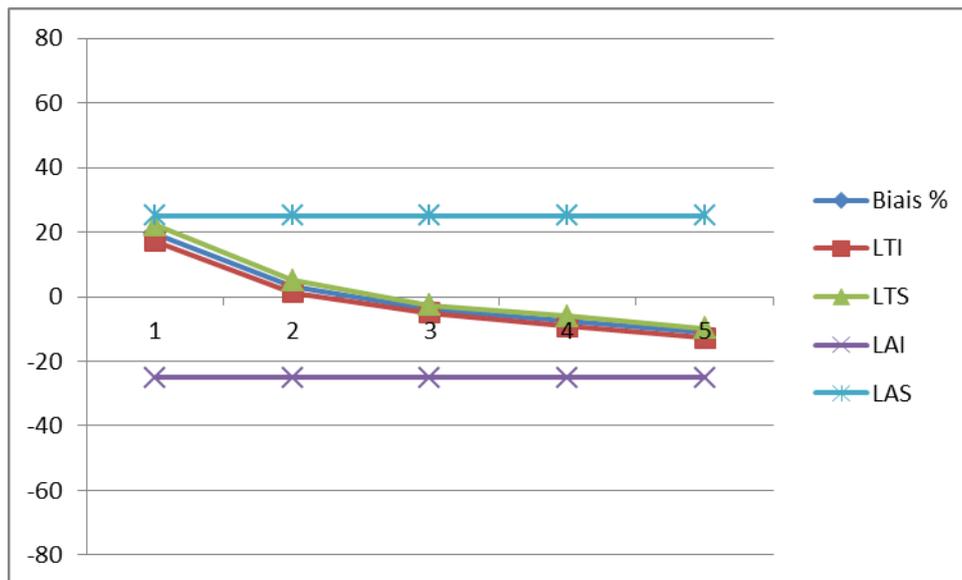
Graph 8 : Profil d'erreur totale par la fonction de réponse racine carré après correction à $\beta=80\%$ et

$\lambda=\pm 25\%$



Graph 9 : Profil d'erreur totale par la fonction de réponse quadratique après correction à $\beta=80\%$ et

$\lambda=\pm 25\%$



Graph 10 : Profil d'erreur totale par la fonction de réponse linéaire pondéré après correction à $\beta=80\%$

et $\lambda=\pm 25\%$

D'après le profil d'exactitude, les fonctions de réponse transformation logarithmique, racine carré, quadratique et linéaire pondéré montrent presque la même exactitude de la méthode donc on peut déclarer que la méthode est validée quelque soit la fonction de réponse choisie.



Sommaire

Introduction 2

Partie 1: Présentation de la Société ALF AL Maghreb

I. Présentation de la société : 3

1) Fiche techniques de la société : 3

II. Alimentation animale et processus de production : 4

1) Alimentation animal: 4

2) Contrôle qualité au laboratoire de la société 4

a) Les analyses physico-chimiques: 5

b) Les analyses bactériologiques : 6

c) Analyses de sérologie 6

3) Processus de fabrication : 7

a) Formulation et recherche de la meilleure recette : 8

b) La réception des matières premières au sein de l'entreprise 8

c) Le broyage et le prémélange 9

d) Le mélange 9

e) Fabrication des granules : 9

f) L'acheminement de l'aliment jusqu'en élevage : 9

Partie 2: Etude Bibliographique

I. Généralité sur la méthode analytique définition de la méthode analytique 9

1) Définition de la méthode analytique : 9

2) Description d'une méthode d'analyse : 10

3) Cycle de vie d'une méthode : 10

a) Sélection de la méthode : 10

b) Mise au point de la méthode : 11



c) Validation de la méthode :.....	11
d) Estimation de l'incertitude et vérification de l'aptitude :	11
e) Utilisation en routine :	12
f) Revalidation :.....	12
4) Définition et objectif de la validation :.....	13
1) Définition:.....	12
2) Objectif :	13
5) Les critères de la validation analytique :.....	13
6) Approche de l'erreur totale.....	16
II. Etapes de la validation analytique basée sur le concept de l'erreur totale :.....	18
1) Organisation des essais de validation :.....	19
2) Fonction de réponse et sélection du modèle :.....	20
3) Prédiction inverse :.....	20
4) Calcul de la fidélité :	21
5) Calcul de la justesse :	22
6) Calcul des intervalles de tolérance :.....	23
7) Construire le profil d'exactitude :	24
8) La limite de quantification :	25
III. La méthode des Ajouts Dosées :	26

Partie 3:Etude Expérimentale

I. Mode opératoire :.....	28
II. Validation analytique :.....	31
1) Spécificité et interférences :	31
2) Etude de la spécificité les interférences :	32
3) Réalisation des gammes STD d'étalonnage, STD de validation :.....	33
3) Réalisation des étapes du concept de l'erreur totale :	35



a) Fonction de réponse :.....	35
b) Calcul de la justesse :.....	37
c) Calcul de la fidélité :.....	38
d) Calcul des intervalles de tolérance :	38
e) Profil d'exactitude :	39
f) Calcul de la justesse après correction:	40
g) Calcul de la fidélité après correction :	41
h) Calcul des intervalles de tolérance après correction :.....	41
i) Profil d'exactitude après correction :	42
j) Limite de quantification :.....	43
4) Génération de profil d'exactitude par la fonction de réponse transformation logarithmique, racine carré, quadratique et linéaire pondérer :	44
Conclusion	50



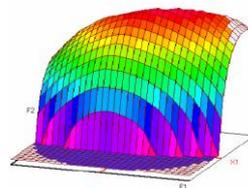
Conclusion

Dans le cadre du projet de fin d'études, réalisé au laboratoire de la société ALF AL Maghreb, nous avons travaillé sur la validation analytique du dosage de phosphore par spectrophotométrie, Afin de garantir la qualité de produits finie (alimentation animale).

Nous avons utilisé alors la méthodologie de l'erreur totale. Les résultats obtenus montrent que les différents critères de validation analytique ont été acceptables ce qui a permis de prendre la décision que la méthode du dosage est validée et nous pourrions garantir que 80% des futures mesures fournies par celle-ci seront comprises dans les limites d'acceptation fixées à 25%.

Ce stage nous a permis de mieux comprendre la validation analytique et avoir une idée réelle sur l'application des études statistiques à l'échelle industrielle.

Finalement Je tiens à exprimer ma satisfaction d'avoir pu travailler dans de bonnes conditions, ce qui permet une favorable intégration et d'avoir bons contacts. C'était une bonne expérience qui va me permettre d'avoir d'autre opportunité dans le future.



Master ST CAC Ageq

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Nom et prénom: ANNEMER Saoussan

Année Universitaire : 2016/2017

Titre: Validation analytique par l'approche de l'erreur total d'une méthode spectrophotométrique de dosage du phosphore

Résumé

La validation analytique est réalisée en utilisant une nouvelle approche. Cependant, cette nouvelle stratégie est basée sur l'erreur totale (erreur systématique + erreur aléatoire), il consiste à construire un outil de décision, appelé profil de l'exactitude. Les résultats collectés sous les conditions de la fidélité intermédiaire permettent de calculer l'intervalle de tolérance où une proportion élevée des résultats futurs sera comprises dans les limites acceptables.

Dans le but de valider la méthode de dosage du phosphore par spectrophotométrie UV/VIS dans un produit d'ALF notre travail au sein du laboratoire de la société ALF AL Maghreb, a été destiné spécialement à exploiter deux réactions, l'une de transformation du phosphore en orthophosphate et l'autre de complexation de l'orthophosphate et vanadomolybdique qui prend une coloration jaune, ce qui lui confère une absorption dans le domaine visible.

L'ensemble des résultats obtenus, confirme que notre méthode analytique est déclarée valide et fiable pour quantifier les échantillons d'une manière exacte et fidèle que le laboratoire aura à analyser.

Mots clés: Validation, profil d'exactitude, erreur total, spectrophotométrie UV/Vis, phosphore.