

TP N° 4 : Validation d'une méthode de dosage par spectrophotométrie (Calcul de justesse, fidélité, LOD, LOQ).

1. Introduction

La spectrophotométrie UV permet une détermination quantitative fiable à condition de maîtriser les paramètres expérimentaux. L'étude de la **justesse** et de la **fidélité** est essentielle pour valider une méthode analytique.

2. Objectifs du TP

- Comprendre les notions de **justesse** (trueness) et de **fidélité** (précision) d'une méthode analytique.
- Appliquer ces notions à des mesures réalisées en **spectrophotométrie UV-Visible**.
- Calculer les indicateurs statistiques associés : moyenne, écart-type, coefficient de variation, biais.
- Interpréter les résultats obtenus au regard des performances analytiques.

3. Rappels théoriques

3.1 Spectrophotométrie UV-Visible

La spectrophotométrie UV-Visible repose sur la **loi de Beer-Lambert** :

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C$$

avec :

- A : absorbance (sans unité)
- ε : coefficient d'extinction molaire ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)
- l : longueur de la cuve (cm)
- C : concentration de la solution ($mol \cdot L^{-1}$)

Dans ce TP, la concentration d'un analyte est déterminée à partir de l'absorbance mesurée à une longueur d'onde donnée.

4. Calcul de la justesse et de la fidélité

En spectrophotométrie UV, la **justesse** évalue l'écart entre la moyenne des mesures et la valeur vraie (biais), calculée par (**Moyenne - Valeur de Référence**), tandis que la **fidélité** mesure la dispersion des mesures répétées (répétabilité/reproductibilité) autour de cette moyenne, souvent via l'écart-type (S) ou le coefficient de variation (%CV). On les calcule en

mesurant des étalons certifiés (pour la justesse) et en répétant les mesures d'un même échantillon, puis on compare l'écart-type à des seuils (ex: $\pm 0.005A$) ou on intègre les aléas de justesse et de fidélité pour déterminer l'incertitude totale.

4.1. Calcul de la Justesse (Biais)

La **justesse** exprime la proximité entre la valeur mesurée et la valeur vraie (ou de référence).

On l'évalue par le **biais** ou par le **biais relatif**

- **Principe** : Évaluer si les mesures tendent vers la valeur vraie.
- **Calcul** :

1. Mesurer plusieurs fois (n) un étalon de référence certifié (concentration connue).
2. Calculer l'absorbance ou la concentration moyenne (\bar{A}) de ces n mesures
3. Calculer le biais (ou Biais relatif (%)) :

$$\mathbf{Biais} = \bar{A} - A_{ref}$$

$$\mathbf{Biais\ relatif\ (\%)} = (\bar{A} - A_{ref}) / A_{ref} \times 100$$

avec :

- \bar{A} : moyenne des valeurs mesurées
- A_{ref} : valeur de référence (connue)

Remarque : Vérifier si le biais est nul ou s'il est inférieur aux limites acceptables (ex: $\pm 0.005 A$ ou un %Biais défini).

4.2. Calcul de la Fidélité (Précision)

La **fidélité** traduit la dispersion des résultats entre eux lors de mesures répétées.

Elle est évaluée par : **Écart-type** et **Coefficient de variation (CV)**

- **Principe** : Mesurer la dispersion des résultats entre eux pour des mesures répétées.
- **Types** :
 - **Répétabilité (même opérateur, même jour, même appareil)** : Calculer l'écart-type (S) des n mesures de l'étalon.
 - **Reproductibilité (conditions différentes)** : Répéter l'expérience avec d'autres jours/opérateurs.

Calcul :

1. Calculer l'écart-type (S) à partir des n mesures

$$s = \sqrt{\frac{(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

2. Calculer le **Coefficient de Variation (CV)** : $CV = (S / \bar{x}) \times 100$

- **Remarque** : Vérifier que S ou CV est inférieur aux spécifications (ex: $S < 0.005$ A ou $CV < 1-2\%$ ou $< 5\%$).

Une faible valeur du CV indique une bonne fidélité.

4.3. l'écart-type

Pour calculer l'écart-type (**S**) de **n** mesures, calculez d'abord la moyenne \bar{x} des mesures, puis trouvez la somme des carrés de chaque mesure à cette moyenne, divisez cette somme par (**n-1**) pour la variance de l'échantillon, et enfin, prenez la racine carrée de ce résultat pour obtenir l'écart-type (**S**), une mesure de la dispersion des valeurs autour de la moyenne.

Étapes détaillées

1. **Calcul de la moyenne (\bar{x})** :

- Additionnez toutes les mesures : $\sum x_i$.
- Divisez la somme par le nombre de mesures (**n**) : $\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$.

2. **Calcul des écarts au carré** :

- Pour chaque mesure x_i , calculez l'écart par rapport à la moyenne : $(x_i - \bar{x})$.
- Élevez chaque écart au carré : $(x_i - \bar{x})^2$.

3. **Somme des écarts au carré** :

- Additionnez tous les résultats de l'étape précédente : $\sum (x_i - \bar{x})^2$.

4. **Calcul de la variance de l'échantillon (s^2)** :

- Divisez la somme par (**n - 1**) (pour un échantillon) : $s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$.

5. **Calcul de l'écart-type (**S**)** :

- Prenez la racine carrée de la variance : $S = \sqrt{s^2}$.

Formule complète (pour un échantillon)

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

5. Matériel et réactifs

- Spectrophotomètre UV-Visible
- Cuves en quartz ($l = 1 \text{ cm}$)
- Solution étalon de concentration connue (C_0)
- Solutions à analyser
- Pipettes jaugées, fioles jaugées
- Eau distillée

6. Protocole expérimental

1. Régler le spectrophotomètre à la longueur d'onde d'absorption maximale (λ_{max}) de l'analyte.
2. Effectuer le blanc avec l'eau distillée.
3. Mesurer l'absorbance de la solution étalon.
4. Mesurer **n fois** (au moins 5) l'absorbance de la solution à analyser dans les mêmes conditions.
5. Convertir chaque absorbance en concentration à l'aide de la droite d'étalonnage.

7. Exploitation des résultats

7.1 Tableau de résultats

Mesure	Absorbance	Concentration ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
1		
2		
3		
4		
5		

7.2 Calculs statistiques

- Calculer la **moyenne** des concentrations.
- Calculer l'**écart-type**.
- Calculer le **coefficient de variation (CV)**.
- Calculer le **biais** et le **biais relatif** par rapport à la concentration de référence.

8. Exemple

Une solution de référence a une concentration connue :

$$C_{\text{réf}} = 20,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$$

Les concentrations obtenues après 5 mesures successives par spectrophotométrie UV sont :

Mesure	Concentration (mg·L ⁻¹)
1	19,8
2	20,1
3	19,9
4	20
5	20,2

1. Calcul de la moyenne

- $\bar{x} = (19,8 + 20,1 + 19,9 + 20,0 + 20,2) / 5 = 20,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

2. Calcul de l'écart-type

- $s = 0,16 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

3. Coefficient de variation (fidélité)

- $CV = (0,16 / 20,0) \times 100 = 0,8 \%$

➔ La fidélité est très bonne ($CV < 5 \%$).

4. Calcul du biais (justesse)

- $\text{Biais} = \bar{x} - C_{\text{réf}} = 0,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

- $\text{Biais relatif} = 0 \%$

➔ La méthode est juste.

9. Interprétation générale

- La fidélité est excellente (faible dispersion des mesures).
- La justesse est confirmée par l'absence de biais.
- La méthode analytique est donc valide pour cette gamme de concentration.

10. sources d'erreurs possibles en spectrophotométrie UV pouvant affecter la justesse ou la fidélité

- Mauvaise préparation du blanc (justesse)

- Mauvais réglage de la longueur d'onde (justesse)
- Variations de manipulation (fidélité)
- Cuves sales ou rayées (fidélité et justesse)

II. Calcul de LOD et LOQ

1. Définitions

- **LOD (Limit of Detection / Limite de Détection) :** Limite de Détection c'est :
 - La plus petite concentration détectable, mais **non quantifiable avec précision**. Ou
 - La concentration minimale d'un analyte qui peut être **détectée** (signal significativement différent du bruit) mais pas nécessairement quantifiée avec précision.
- **LOQ (Limit of Quantification / Limite de Quantification) :** Limite de Quantification c'est :
 - La Plus petite concentration **quantifiable avec une fidélité et une justesse acceptables**. Ou
 - La concentration minimale d'un analyte qui peut être **quantifiée** avec une précision et une exactitude acceptables.

2 Principe en spectrophotométrie UV

En UV-Visible, on travaille avec la **droite d'étalonnage** :

$$A = a \cdot C + b$$

où :

- A = absorbance
- C = concentration
- a = pente de la droite
- b = ordonnée à l'origine

2. Méthodes de calcul en UV-Vis

À partir de la courbe d'étalonnage (Méthode recommandée)

1. **Construire la courbe d'étalonnage** : Mesurer l'absorbance de solutions de concentrations connues et tracer un graphe Absorbance = f(Concentration).
2. **Calculer la pente (S) et l'erreur standard (σ)** : Utiliser la régression linéaire pour obtenir la pente (a) et l'erreur standard de l'ordonnée à l'origine (σ).

3 Formules usuelles (ICH, ISO)

La méthode la plus utilisée (à partir de l'écart-type du blanc ou de la régression)

$$LOD = \frac{3,3 \times \sigma}{a}$$

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{a}$$

où :

- σ = écart-type :
 - soit des mesures du **blanc**
 - soit des résidus de la droite d'étalonnage
- a = pente de la droite d'étalonnage

4 Étapes pratiques en UV

Étape 1 : Mesure du blanc

- Mesurer l'absorbance du blanc **au moins 10 fois**
- Calculer l'écart-type σ

Étape 2 : Droite d'étalonnage

- Préparer plusieurs solutions étalon
- Tracer $A = f(C)$
- Déterminer la pente (a)

Étape 3 : Calcul

Appliquer directement les formules LOD et LOQ.

5 Exemple numérique

Supposons :

- Pente de la droite : $a = 0,050 \text{ UA} \cdot \text{L} \cdot \text{mg}^{-1}$
- Écart-type du blanc : $\sigma = 0,002 \text{ UA}$

□ LOD

$$LOD = \frac{3,3 \times 0,002}{0,050} = 0,132 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$$

□ LOQ

$$LOQ = \frac{10 \times 0,002}{0,050} = 0,40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$$

6 Interprétation

- En dessous de **0,132 mg·L⁻¹** → non détectable
- Entre **0,132 et 0,40 mg·L⁻¹** → détectable mais non quantifiable
- Au-dessus de **0,40 mg·L⁻¹** → quantification fiable

Exemple de calcul l'écart-type du blanc

Le calcul de l'écart-type du blanc se fait à partir de **mesures répétées du signal du blanc** (sans analyte)

➤ On mesure le blanc n fois : B_1, B_2, \dots, B_n

(ex : absorbance, intensité, concentration apparente...)

➤ Moyenne du blanc $\bar{B} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n B_i$

➤ Écart-type du blanc $\delta = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (B_i - \bar{B})^2}{n - 1}}$

On utilise $n - 1$ car il s'agit d'un échantillon expérimental

4.3. Exemple numérique

Mesures du blanc (absorbance) : 0,002; 0,003; 0,001; 0,002; 0,0040

Moyenne : $\bar{B} = \frac{0,012}{5} = 0,0024$

$$= \sqrt{\frac{(0,002 - 0,0024)^2 + \dots + (0,004 - 0,0024)^2}{4}} \approx 0,0011$$

Écart-type : δ

Calcul de la pente de la droite d'étalonnage

La **pente de la droite d'étalonnage** représente la **sensibilité** de la méthode analytique.

1. Équation de la droite d'étalonnage

La relation entre le signal et la concentration est :

$$Y = a x + b$$

- y : signal mesuré (absorbance, aire de pic, etc.)
- x : concentration
- a : **pente**
- b : ordonnée à l'origine

2. Calcul de la pente a

Cas général (plusieurs points d'étalonnage)

$$a = \frac{n \cdot \sum (xy) - \sum x \cdot \sum y}{n \cdot \sum (x^2) - (\sum x)^2}$$

avec :

- n : nombre de points d'étalonnage
- x : concentrations
- y : réponses analytiques

Cas simple

3. Exemple (Spectrophotométrie UV)

C (mg/L) = x	A = y
2	0,12
4	0,25
6	0,37
8	0,51

n = 4 (4 mesure)

$$\sum x = 20 \quad \sum y = 1,25 \quad \sum xy = 8,88 \quad \sum x^2 = 120$$

$$a = \frac{4(8,88) - (20)(1,25)}{4(120) - (20)^2} = \frac{35,52 - 25}{480 - 400} = \frac{10,52}{80} = 0,1315$$

Pente = 0,1315 A·L·mg⁻¹

4. Interprétation

- **Pente élevée** → méthode plus sensible
- **Pente faible** → faible variation du signal avec la concentration

Calcul de la pente de la droite d'étalonnage (méthode TP)

Données expérimentales

Concentration C (mg/L)	Absorbance A
1	0,08
2	0,16
4	0,33
6	0,49
8	0,65

Étape 1 : Calcul des grandeurs nécessaires

	C = (x)	A = (y)	C·A = (xy)	C ² = (x ²)
	1	0,08	0,08	1
	2	0,16	0,32	4
	4	0,33	1,32	16
	6	0,49	2,94	36
	8	0,65	5,20	64
Σ	21	1,71	9,86	121

$$\Sigma C = 21 \quad \Sigma A = 1,71$$

$$\Sigma (CA) = 9,86 \quad \Sigma C^2 = 121$$

$$n = 5$$

Étape 2 : Formule de la pente

$$a = \frac{n \cdot \Sigma (CA) - \Sigma C \cdot \Sigma A}{n \cdot \Sigma C^2 - (\Sigma C)^2}$$

Étape 3 : Application numérique

$$a = \frac{5(9,86) - (21)(1,71)}{5(121) - 21^2}$$

$$a = \frac{49,30 - 35,91}{605 - 441}$$

$$a = \frac{13,39}{164}$$

$$a = 0,0816$$

Résultat final

□ Pente de la droite d'étalonnage :

$$a = 0,0816 \text{ A} \cdot \text{L} \cdot \text{mg}^{-1}$$

Interprétation (TP)

- La pente représente la **sensibilité de la méthode**
- Plus la pente est grande, plus la méthode est sensible
- En UV-visible, elle dépend de ϵ , l'épaisseur de cuve et la longueur d'onde

Équation complète de la droite d'étalonnage

On utilise :

$$Y = ax + b \longrightarrow A = aC + b$$

Nous avons déjà : $a = 0,0816$

Calcul de l'ordonnée à l'origine b

$$b = \frac{\sum A - a \sum C}{n}$$

$$b = \frac{1,71 - (0,0816 \times 21)}{5}$$

$$b = \frac{1,71 - 1,7136}{5} \approx -0,0007 \approx 0$$

Équation finale :

$$A = 0,0816 C$$

Droite conforme à la **loi de Beer-Lambert** (passe par l'origine).

4. Calcul du coefficient de corrélation R^2

$$R = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{(\sum (x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum (y_i - \bar{y})^2)}}$$

-**Excellente linéarité** (conforme aux exigences analytiques).

- $R^2 \geq 0,995 \rightarrow$ acceptable
- $R^2 \geq 0,998 \rightarrow$ excellent