

# Quantifier les imprécisions en travaux pratiques

## Détermination de la précision d'une concentration inconnue obtenue à partir d'une droite d'étalonnage

Emmanuel Curis et Marie-Claude Menet

- Résumé** Coupler des travaux pratiques de chimie analytique et de statistiques amène les étudiants à réfléchir sur la justesse et la précision des valeurs de dosage obtenues après construction d'une droite d'étalonnage. Cet article montre un exemple de réalisation concrète de cette idée. En 3<sup>e</sup> année de pharmacie à l'Université Paris Descartes, le logiciel R est utilisé pour obtenir, à partir de la droite d'étalonnage et des valeurs mesurées pour la solution dosée, un intervalle ayant 95 % de chances de contenir la valeur réelle de la concentration d'une solution de paracétamol. La largeur de cet intervalle permet de définir la précision de la détermination.
- Mots-clés** Enseignement, chimie analytique, statistiques, dosage, courbe étalon, droite étalon, précision, justesse, sensibilité, intervalle de prédiction, intervalle d'étalonnage.
- Abstract** **Determine accuracy and precision of an unknown concentration obtained from calibration line in laboratory**  
This article presents a practical example of how to couple analytical chemistry and statistics laboratory works to show to the students how the determination of the calibration line conditions influences the accuracy and the precision of the results of analytical assays. This is done, in 3<sup>rd</sup> year of pharmaceutical sciences cursus at Paris Descartes University, on acetaminophen assays.
- Keywords** Teaching, analytical chemistry, statistics, assays, calibration line, precision, accuracy, sensibility, prediction interval, calibration interval.

Lors de leur formation, les étudiants sont amenés à construire des droites d'étalonnage pour pouvoir déterminer ensuite la concentration en un composé d'un échantillon de composition inconnue. Cette formation est en particulier offerte aux étudiants en pharmacie, dont certains auront à utiliser ces méthodes quotidiennement. Un aspect important de la construction de ces droites d'étalonnage est le fait qu'étant imprécises par nature, les concentrations auxquelles elles conduisent sont elles-mêmes imprécises. Quantifier cette imprécision fait l'objet de la validation des méthodes d'analyse. Cette validation demande d'utiliser des outils statistiques adaptés, qui sont aussi enseignés aux étudiants en pharmacie, mais dans le cadre de cours de statistiques. Afin de leur montrer l'intérêt du rapprochement entre ces deux disciplines, nous avons depuis trois ans mis en place en 3<sup>e</sup> année du cursus pharmaceutique des travaux pratiques coordonnés entre la chimie analytique et les biomathématiques. Les bases fondamentales ont été posées au cours de la 2<sup>e</sup> année.

En chimie analytique, les étudiants déterminent la pureté d'une poudre constituée de paracétamol. Ils disposent pour cela d'une solution de paracétamol de concentration inconnue, qui provient de la dissolution du paracétamol qu'ils ont eux-mêmes synthétisé lors de travaux pratiques de chimie organique. Ils mesurent la concentration de la solution en établissant une droite d'étalonnage après extraction liquide/solide des échantillons et séparation chromatographique des composés extraits. La qualité de cette droite fait l'objet

d'une analyse statistique, qui leur permet de déterminer non seulement la concentration de la solution inconnue, mais aussi la précision\* de cette concentration au travers d'un intervalle d'étalonnage à 95 % (intervalle qui, dans 95 % des cas, contient la vraie concentration). Cette analyse statistique permet aussi de discuter de la sensibilité\* de la méthode et de sa limite de détection\*.

### Déroulement de la séance de chimie analytique

Les étudiants ont à leur disposition des documents décrivant la manipulation à effectuer (voir annexes 1 et 2\*). Les propriétés physico-chimiques des molécules à analyser leur permettent de comprendre l'intérêt de l'extraction liquide/solide (élimination des produits ionisables à pH acide) et de déterminer *a priori* l'ordre d'élution du paracétamol (le moins hydrophobe) et du 4-hydroxypropionanilide (le plus hydrophobe) en chromatographie en phase liquide à polarité de phases inversée.

Après manipulation par binômes, ils rassemblent les résultats obtenus dans un tableur (typiquement Excel® ou Libre Office) comprenant trois colonnes : une pour les concentrations de la gamme d'étalonnage, une pour les aires obtenues pour le paracétamol dans les échantillons de la gamme d'étalonnage et dans les échantillons à doser, et la dernière pour les aires obtenues pour l'étalon interne dans tous les échantillons.

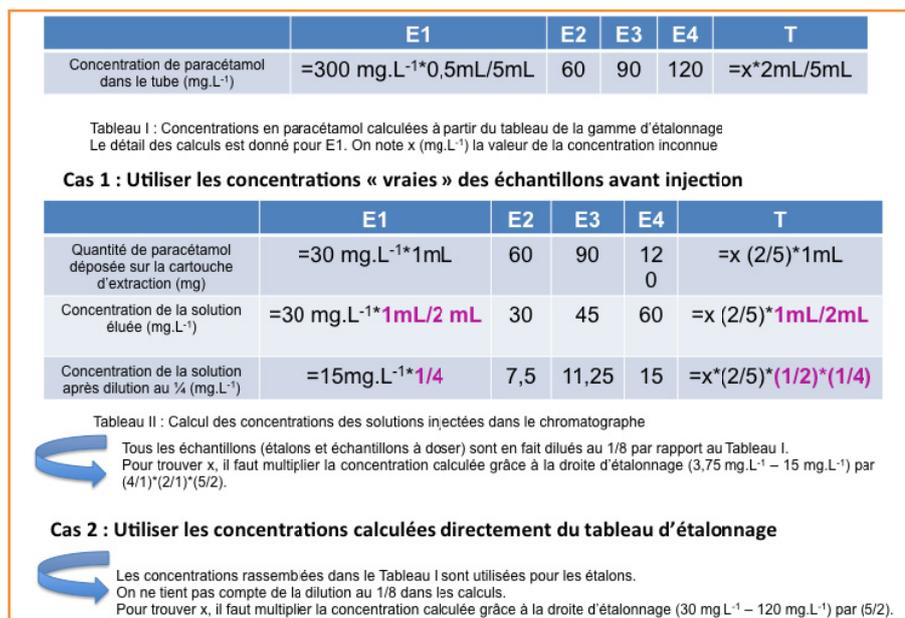


Figure 1 - Calculs des concentrations des solutions étalon.

Deux groupes distincts d'étudiants se détachent quant au choix des valeurs de concentrations à utiliser pour construire la gamme d'étalonnage. Le premier groupe recommande d'utiliser la concentration « vraie » de paracétamol contenu dans les tubes au moment de l'injection dans le chromatographe ; le calcul des concentrations, détaillé sur la figure 1, tient alors compte de toutes les dilutions (cas 1 pour lequel il faut supposer que le rendement d'extraction est de 100 %). Ces concentrations s'étendent de 3,75 à 15 mg.L<sup>-1</sup>. Le second groupe calcule les concentrations des étalons directement à

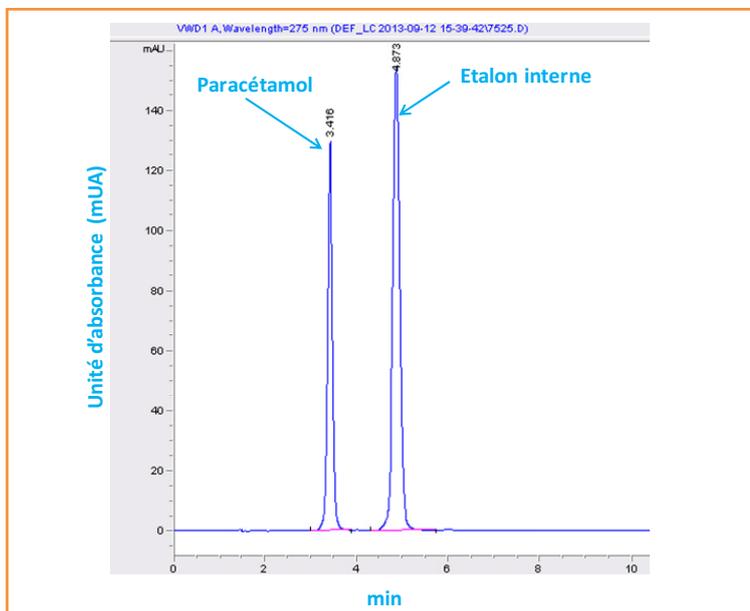


Figure 2 - Chromatogramme.

**Extraction** : l'extraction liquide/solide va permettre d'éliminer l'impureté de synthèse principale, l'aminophénol. Elle s'effectue en utilisant des cartouches Bond Elut® contenant de la silice greffée octadécylsilylée, placées sur une cuve à extraction 12 positions. Après conditionnement de la phase stationnaire (support d'extraction) par 2 mL de méthanol suivis de 2 mL d'eau, 1 mL du contenu de chaque tube est ajouté dans les cartouches et percolé à travers le support, à pression atmosphérique. La cartouche est ensuite rincée avec 2 mL d'eau acidifiée puis asséchée pendant 2 minutes. Les composés (paracétamol et étalon interne) retenus par le support d'extraction sont élués par 2 mL de méthanol. Chaque éluat est ensuite dilué au quart dans de la phase mobile. **Chromatographie** : les étudiants injectent toutes les solutions successivement dans le chromatographe, repèrent les composés par leur temps de rétention et répertorient les aires des pics pour les calculs.

partir du tableau de la gamme d'étalonnage (voir détails dans l'annexe 1\*) ; le calcul est détaillé sur la figure 1 (cas 2). Celles-ci s'étendent de 30 à 120 mg.L<sup>-1</sup>. À l'usage, les étudiants comprennent très rapidement qu'utiliser ces dernières concentrations facilite les calculs. Le chromatogramme est présenté sur la figure 2.

Une seconde discussion porte sur le type d'étalonnage, externe ou interne (voir annexe 3\*), à utiliser. L'exploitation statistique des résultats, décrite ci-après, permet de fonder le choix du type d'étalonnage sur un critère objectif : obtenir la valeur de concentration la plus précise possible (intervalle d'étalonnage le plus étroit possible).

À l'issue de ces mesures, les étudiants se rendent en salle informatique et, par binômes, réalisent l'analyse statistique de leurs résultats sur ordinateur. Ces analyses, réalisées ici avec le logiciel gratuit R, pourraient être faites avec n'importe quel logiciel de statistiques. Un script d'analyse typique est disponible en annexe 4\*.

## Déroulement de la séance d'analyse statistique des données

Après avoir entré et représenté les données de leur droite d'étalonnage dans R, les étudiants recherchent la droite d'étalonnage, d'équation  $y = \alpha C + \beta$ , où  $y$  est la grandeur mesurée (aire des pics, rapport des aires, absorbance...) et  $C$  la concentration. Les valeurs de  $\alpha$  et  $\beta$ , inconnues, sont estimées par la pente  $a$  et l'ordonnée à l'origine  $b$  obtenues par la méthode des moindres carrés (régression linéaire). La qualité de cette droite est alors étudiée au moyen de deux indicateurs : les *taux de recouvrement*, qui renseignent sur la justesse\* de la méthode, et la *zone de prédiction* de la droite, qui renseigne sur sa précision\*.

Le taux de recouvrement de la mesure  $i$ ,  $t_i$ , correspond au pourcentage de la concentration réelle  $C_i$  de l'échantillon étalon  $i$  retrouvé en utilisant la valeur mesurée pour cet échantillon,  $y_i$ , et l'équation de la droite d'étalonnage pour la recalculer, soit :

$$t_i = 100 \times \frac{y_i - b}{a C_i}$$

Idéalement, il devrait valoir 100 % ; ainsi l'analyse des taux de recouvrement renseigne sur la justesse\* de la méthode. En représentant graphiquement  $t_i$  en fonction de  $C_i$  et en indiquant sur ce graphique les limites d'acceptabilité de la méthode (écart relatif maximal, entre concentration réelle et concentration mesurée, acceptable pour que le résultat soit utilisable en pratique), les étudiants peuvent juger immédiatement de la qualité de leur droite d'étalonnage et de son aptitude à donner des valeurs justes de la concentration. Quelques exemples de graphiques obtenus par les étudiants sont donnés en figure 3 : bien qu'à première vue les quatre points paraissent raisonnablement alignés lorsque les droites d'étalonnage des différents binômes sont tracées, on constate une assez grande disparité entre les binômes pour ce qui est de la variation du taux de recouvrement entre les différentes concentrations de la gamme.

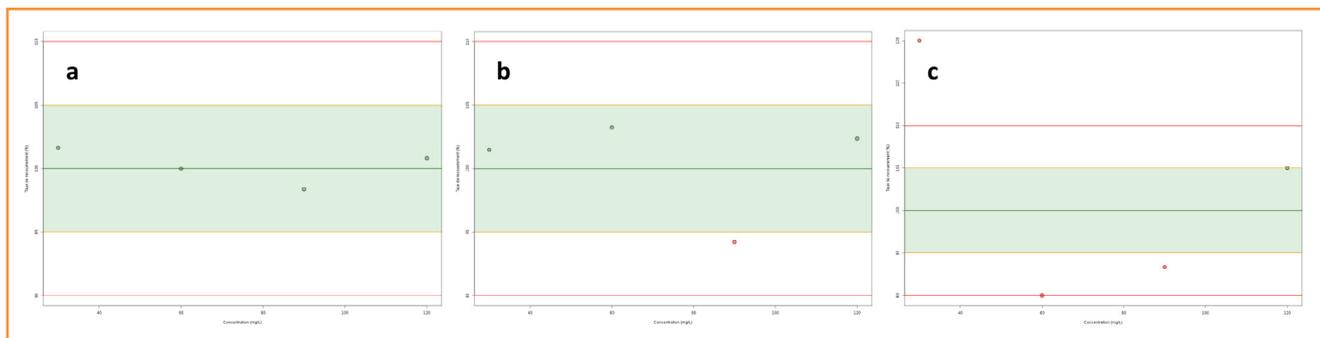


Figure 3 - Exemples de taux de recouvrement obtenus par les étudiants.

a) Les taux de recouvrement sont tous dans la région acceptable de  $\pm 5\%$  de la valeur réelle (bande verte) : la méthode est suffisamment juste pour cette application ; b) un taux de recouvrement est compris entre 5 et 10 % : la justesse\* n'est pas très bonne ; c) les taux de recouvrement ne sont pas acceptables, avec des écarts de plus de 10 % : la méthode n'est pas suffisamment juste.

L'étude de la précision\* de la concentration obtenue est fondée sur la recherche des valeurs de concentrations qui auraient pu donner la valeur  $y$  effectivement mesurée : c'est l'intervalle d'étalonnage. Pour le déterminer, il « suffit » de pouvoir prédire, pour une concentration  $C$  donnée, quelles valeurs de  $y$  peuvent être observées (avec une certaine probabilité, en général 95 %) : si la valeur observée fait partie des valeurs prédites, la concentration  $C$  est compatible avec la mesure expérimentale et appartient donc à l'intervalle d'étalonnage. Dans le cas contraire, la concentration  $C$  est incompatible avec la mesure expérimentale et ne fera pas partie de cet intervalle. Les résultats classiques de régression linéaire permettent justement de construire, connaissant  $C$  et l'équation de la droite, un intervalle qui a 95 % de chances de contenir la valeur  $y$  réellement obtenue, appelé *intervalle de prédiction* à 95 %. Cet intervalle tient compte à la fois de la variabilité des mesures d'une même solution, toutes choses

égales par ailleurs, et de l'imprécision des coefficients de la droite. En répétant cette opération pour plusieurs concentrations de la gamme, on obtient une *zone de prédiction* de la droite, pour la moyenne de deux mesures, comme celle représentée en *figure 4* (ici pour une gamme construite avec six points de gamme et trois mesures par solution étalon). C'est cette zone de prédiction qui permet de déduire l'intervalle d'étalonnage, mesurant la précision\* de la méthode. Ainsi,

## Lexique

Plusieurs termes sont utilisés pour décrire l'incertitude d'une mesure, se focalisant sur différentes origines et interprétation de cette incertitude\*. En voici quelques-uns (repérés par un astérisque\* lorsqu'ils apparaissent dans l'article) avec leur définition et une transposition possible en termes statistiques. Pour définir cette transposition, on note  $\theta$  la valeur théorique que l'on cherche à mesurer,  $X$  la variable aléatoire modélisant le résultat de la mesure,  $E(X) = \mu$  son espérance,  $V(X) = \sigma^2$  sa variance et  $x$  la valeur effectivement mesurée, qui est la réalisation de  $X$ .

**Exactitude** : combinaison de la justesse\* et de la précision\* ; plus une méthode est juste et précise, et plus elle est exacte.

**Fidélité intermédiaire** : précision\* de la méthode lorsque l'on contrôle certaines sources de variabilité, mais pas toutes (par exemple, même expérimentateur avec plusieurs appareils).

**Incertainité** : contraire de l'exactitude\*.

**Justesse** : propriété d'une méthode analytique qui donne, en moyenne, la valeur réelle de la concentration cherchée. Elle se mesure par l'écart entre la valeur espérée en faisant la mesure et la valeur théoriquement mesurée,  $\mu - \theta$  ; on appelle cet écart *biais* de la mesure (en statistique, c'est le biais de l'estimateur  $X$  de la valeur  $\theta$ ). La justesse traduit l'absence d'erreur systématique de la méthode. Elle peut être évaluée, dans notre exemple d'une courbe d'étalonnage, à l'aide des taux de recouvrement.

**Limite de détection** : plus petite valeur de concentration que l'on puisse détecter (distinguer d'une solution de concentration nulle) par la méthode.

**Limite de quantification** : plus petite valeur de concentration que l'on puisse déterminer avec une précision\* suffisante par la méthode.

**Précision** : écart espéré entre la valeur mesurée,  $x$ , et la valeur espérée,  $\mu$ . Elle est mesurée par l'écart-type de  $X$ ,  $\sigma$  (racine carrée de la variance). On parle aussi de *fidélité* et d'erreur statistique, ou de bruit.

**Répétabilité** : précision\* de la méthode lorsque l'on contrôle le maximum de sources de variabilité (le même expérimentateur utilise le même appareil, dans le même laboratoire, avec les mêmes solutions étalons, le même jour).

**Reproductibilité** : précision\* de la méthode lorsque l'on ne contrôle aucune source de variabilité (plusieurs expérimentateurs, plusieurs appareils, plusieurs laboratoires...).

**Sensibilité** : capacité à distinguer deux concentrations différentes.

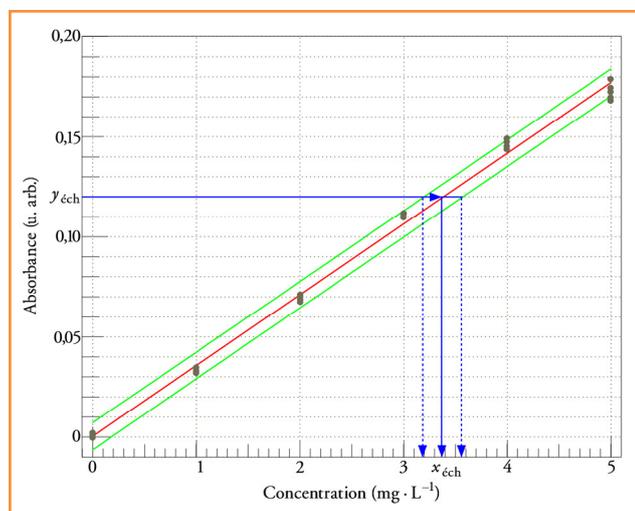


Figure 4 - Méthode graphique d'obtention de l'intervalle d'étalonnage.

Les points gris correspondent aux mesures expérimentales (3 mesures par concentration de la gamme ; 6 points de gamme), pour une méthode de dosage fondée sur la mesure de l'absorbance. La ligne rouge correspond à la droite d'étalonnage obtenue par régression linéaire classique (méthode des moindres carrés). Les deux lignes vertes correspondent aux limites de la zone de prédiction à 95 % de la moyenne de deux mesures d'absorbance : une solution de concentration donnée peut conduire, en moyennant deux mesures d'absorbance, à n'importe quelle absorbance comprise entre ces deux limites. Le trait horizontal bleu correspond à la valeur moyenne des deux mesures expérimentales de l'absorbance de la solution inconnue (ici,  $y_{\text{éch}} = 0,12$ ) : son point d'intersection avec la ligne rouge donne la concentration nominale de cette solution (trait vertical bleu continu ; ici, environ 3,35 mg/L) ; ses intersections avec les lignes vertes donnent les concentrations extrêmes compatibles avec cette absorbance (traits verticaux bleus pointillés) : ce sont les bornes de l'intervalle d'étalonnage à 95 %, ici environ [3,19 ; 3,55] mg/L.

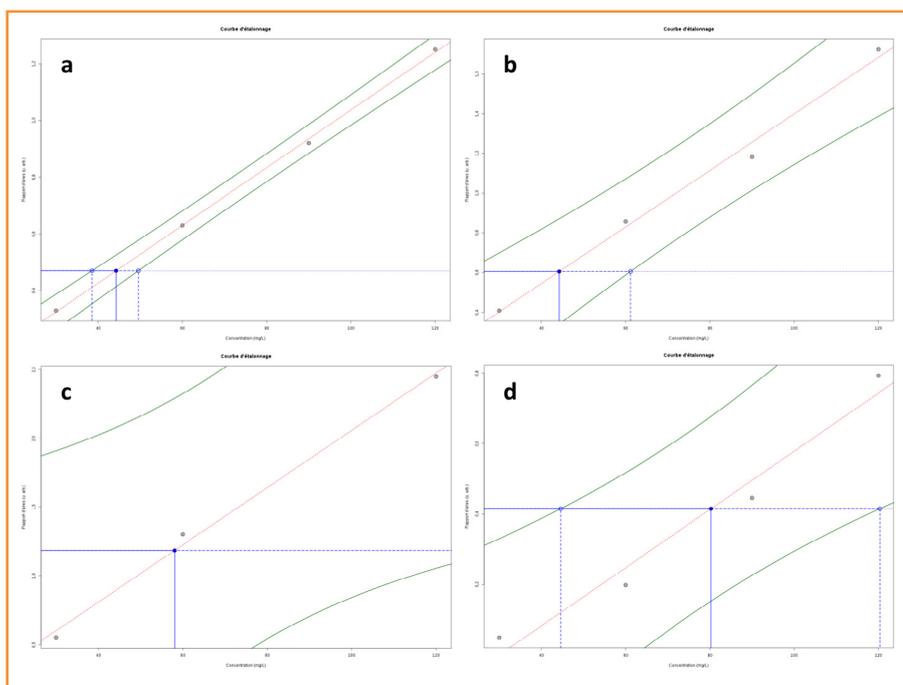


Figure 5 - Quelques situations rencontrées à l'issue de la validation de la méthode de dosage.

a) La droite d'étalonnage donne un intervalle d'étalonnage assez large, mais convenable. b) La gamme est utilisable, mais la concentration de la solution inconnue conduit à des rapports d'aires trop faibles, on ne peut pas déterminer la borne basse de l'intervalle d'étalonnage (qui est hors gamme) : la concentration est en dessous de la limite de quantification\* ; elle est inférieure à 60 mg/L. c) Le binôme a décidé d'ôter un point jugé aberrant ; la gamme avec les trois points restants est inexploitable : l'intervalle d'étalonnage couvre l'ensemble de la gamme, quel que soit le rapport d'aire mesuré. d) Les points ne sont pas bien alignés, conduisant à une méthode très imprécise (et biaisée, comme l'indiquent les taux de recouvrement illustrés figure 3c). Remarque : dans ce dernier cas, une relation parabolique permettrait d'utiliser la gamme... au prix d'une complexité mathématique plus grande. Les codes couleurs sont les mêmes que pour la figure 4.

graphiquement (figure 4), en traçant une droite horizontale d'ordonnée  $y = y_{\text{obs}}$ , on obtient la borne basse (abscisse du premier point d'intersection avec la zone de prédiction, « entrée »), la valeur centrale (abscisse du point d'intersection avec la droite elle-même) et la borne haute de l'intervalle d'étalonnage (abscisse du second point d'intersection avec la zone de prédiction, « sortie »). On trouvera dans l'exemple de script R une version algorithmique de cette méthode (annexe 4\*). Là encore, la largeur de l'intervalle ainsi obtenu permet de qualifier ou non la méthode par rapport à un cahier des charges indiquant la précision\* que l'on souhaite atteindre sur la concentration.

### Discussion de quelques situations typiques possibles

La construction d'une droite d'étalonnage à partir des données des étudiants peut conduire à plusieurs situations, dont les plus fréquentes, discutées ci-après, sont illustrées en figure 5. Ces différentes situations permettent de montrer l'importance de cette qualification et des limites des droites d'étalonnage.

Dans la figure 5a, la droite d'étalonnage est de bonne qualité : la précision\* et la justesse\* de la méthode sont acceptables. Cette situation, autorisant un usage réel de la méthode d'étalonnage, permet de discuter de la sensibilité\* de la méthode : une fois l'intervalle de la concentration inconnue construit, quelle est la concentration suivante qui s'en distingue, c'est-à-dire dont l'intervalle ne chevauche pas le précédent ?

Dans la figure 5b, la valeur mesurée pour la solution inconnue se trouve en bas de la gamme. De ce fait, il est possible

de déterminer la borne haute de l'intervalle, mais pas la borne basse : on ne peut donc que conclure que « la concentration est inférieure à (environ) 60 mg/L ». Cet exemple permet de discuter de l'importance de bien choisir l'étendue de la gamme ou bien la prise d'essai de la solution à doser (dans ce cas, volume prélevé supérieur aux 2 mL indiqués dans le protocole) pour que la valeur inconnue soit à peu près au centre de la gamme (région la plus précise), ainsi que de la notion de limite de détection\* ou de quantification\*.

Dans la figure 5c, la précision\* de la droite n'est pas suffisante : quelle que soit la valeur mesurée pour  $y$ , l'intervalle de la concentration inconnue couvre l'ensemble de la gamme et l'on ne peut donc rien dire sur elle, bien que le calcul donne une valeur... Cette situation permet de discuter de l'importance d'avoir suffisamment de points de gamme (au moins cinq selon les recommandations de l'ICH [1]).

Dans la figure 5d, l'alignement des points n'est pas parfait. Cela permet de discuter de la notion de points aberrants et de la possibilité de les ôter ou non. Un point ne peut être ôté que si l'on documente la raison pour laquelle il n'est normalement pas possible de l'obtenir dans l'usage courant de la méthode. En effet, dans le cas contraire, on se place dans un cas optimal et l'on ne peut être certain que la méthode

soit validée en situation réelle. Dans ce cas précis, de toute façon, la méthode de dosage sera au final disqualifiée, soit pour des raisons de justesse\* (point conservé), soit pour des raisons de précision\* très insuffisante (dans les deux cas).

### Conclusion

Ces séances de travaux pratiques couplés s'avèrent extrêmement enrichissantes pour les étudiants, qui peuvent apprécier la qualité de leur travail grâce à la validation statistique de leur droite d'étalonnage. La confrontation des résultats des différents binômes leur permet de mieux appréhender l'influence d'écarts, même apparemment mineurs, à la linéarité sur la précision\* de la méthode, ainsi que de l'importance d'avoir une gamme d'étalonnage correctement choisie puis construite.

La présentation faite dans cet article reprend la structure des travaux pratiques réalisés en 3<sup>e</sup> année de pharmacie à la Faculté de pharmacie de l'Université Paris Descartes. Toutefois, l'idée en est généralisable à toute séance de travaux pratiques faisant intervenir la construction d'une droite d'étalonnage et la détermination d'une concentration inconnue. La partie statistique se fait, sous la forme présentée ici, en environ 2 h, les étudiants ayant quelques notions de R datant de l'année précédente. Elle se prête à des enrichissements, en fonction des objectifs d'enseignement. Ainsi, on peut introduire la comparaison de courbes d'étalonnage avec les outils statistiques appropriés (analyse de covariance) pour rechercher un effet manipulateur, un effet machine... et faire toucher du doigt l'importance de refaire régulièrement des courbes d'étalonnage. Il est aussi possible d'adapter ces séances en fonction du contexte professionnel que

rencontreront les étudiants : laboratoires d'analyse médicale, laboratoires industriels, assurance qualité...

Les auteurs remercient Jean-Michel Delacotte, maître de conférences en chimie organique, pour avoir fourni les poudres à analyser, ainsi que Philippe Lebfèvre, Sabine Letellier, Blandine Maupas et Pierre Sandouk, enseignants de chimie analytique, et Annie Leyris et Christiane Pelage, techniciennes du laboratoire de travaux pratiques de chimie analytique. Ils remercient les enseignants et étudiants en thèse chargés de mission d'enseignement du service de biostatistiques qui se sont impliqués dans le bon déroulement des séances d'analyse : Ioannis Nicolis, Mohammed Chiadmi, Mailys de Sousa et Benjamin Ravaux, et les nombreux étudiants de 3<sup>e</sup> année de pharmacie qui ont été enthousiasmés par ces séances couplées, au point de ne pas vouloir quitter la salle avant d'avoir terminé l'analyse, malgré les horaires tardifs.

\* Annexes téléchargeables librement à partir de la page liée à cet article sur le site www.lactualitechimique.org

[1] International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH), Validation of analytical procedures: text and methodology, 1994-1996 (www.ich.org/

products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html, rubrique « Q2 Analytical Validation », fichier Q2(R1), pdf téléchargeable librement, consulté le 21/01/2015).



E. Curis

**Emmanuel Curis**

(auteur correspondant)

est maître de conférences au Laboratoire de biomathématiques de la Faculté de pharmacie, Université Paris Descartes\*.

**Marie-Claude Menet**

est maître de conférences au Service de chimie analytique de la Faculté de pharmacie, Université Paris Descartes\*\*.



M.-C. Menet

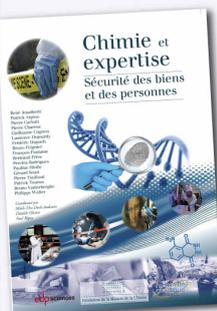
\* Laboratoire de biomathématiques, Faculté de pharmacie, Université Paris Descartes, 4 avenue de l'Observatoire, F-75006 Paris. Courriel : emmanuel.curis@parisdescartes.fr

\*\* Service de chimie analytique, Faculté de pharmacie, Université Paris Descartes, 4 avenue de l'Observatoire, F-75006 Paris. Courriel : marie-claude.menet@parisdescartes.fr

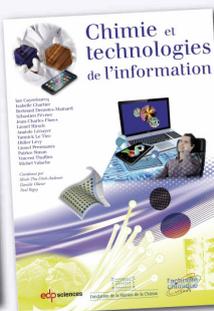
# Collection L'Actualité Chimique-Livres



Sept. 2015 - 216 p. - 25 €



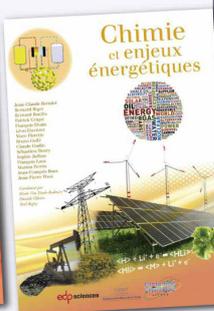
Janvier 2015 - 292 p. - 25 €



Sept. 2014 - 234 p. - 25 €



Janvier 2014 - 272 p. - 24 €



Sept. 2013 - 274 p. - 24 €



Octobre 2012 - 300 p. - 24 €



Octobre 2011 - 292 p. - 24 €



Janvier 2011 - 264 p. - 24 €



Octobre 2010 - 292 p. - 24 €



Juin 2010 - 244 p. - 24 €



Janvier 2010 - 182 p. - 19 €



Août 2009 - 208 p. - 24 €

À commander chez votre libraire ou sur [laboutique.edpsciences.fr](http://laboutique.edpsciences.fr)