

II

(Actes dont la publication n'est pas une condition de leur applicabilité)

COMMISSION

DÉCISION DE LA COMMISSION

du 12 août 2002

portant modalités d'application de la directive 96/23/CE du Conseil en ce qui concerne les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats

[notifiée sous le numéro C(2002) 3044]

(Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)

(2002/657/CE)

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté européenne,

vu la directive 96/23/CE du Conseil du 29 avril 1996 relative aux mesures de contrôle à mettre en œuvre à l'égard de certaines substances et de leurs résidus dans les animaux vivants et leurs produits et abrogeant les directives 85/358/CEE et 86/469/CEE et les décisions 89/187/CEE et 91/664/CEE⁽¹⁾, et notamment son article 15, paragraphe 1, phrase 2,

considérant ce qui suit:

- (1) La présence de résidus dans les produits d'origine animale est un problème de santé publique.
- (2) La décision 98/179/CE de la Commission du 23 février 1998 fixant les modalités de prise d'échantillons officiels pour la recherche de certaines substances et de leurs résidus dans les animaux vivants et leurs produits⁽²⁾ dispose que l'analyse des échantillons prélevés dans le cadre du contrôle officiel doit être exclusivement réalisée par les laboratoires agréés, par l'autorité nationale compétente, pour la recherche des résidus.
- (3) Il est nécessaire d'assurer la qualité et la comparabilité des résultats d'analyse produits par les laboratoires agréés pour le contrôle officiel des résidus. Cet objectif doit être atteint en recourant à des systèmes d'assurance de la qualité et, en particulier, en appliquant des méthodes validées selon des procédures et des critères de performances communs et en veillant à la traçabilité des étalons communs ou communément admis.
- (4) La directive 93/99/CEE du Conseil du 29 octobre 1993 relative à des mesures additionnelles concernant le contrôle officiel des denrées alimentaires⁽³⁾ et la décision 98/179/CE exigent que les laboratoires chargés du
- (5) Un réseau de laboratoires communautaires de référence, de laboratoires nationaux de référence et de laboratoires nationaux de contrôle est opérationnel au titre de la directive 96/23/CE en vue d'améliorer la coordination.
- (6) Du fait des progrès réalisés en chimie analytique depuis l'adoption de la directive 96/23/CE, le concept de méthodes de routine et de méthodes de référence a été supplanté par une approche fondée sur les critères qui définit des critères de performances et des procédures de validation des méthodes de dépistage et de confirmation.
- (7) Il y a lieu de définir des critères communs pour l'interprétation des résultats des tests des laboratoires de contrôle officiel pour garantir une mise en œuvre harmonisée de la directive 96/23/CE.
- (8) Il est nécessaire de prévoir la mise en œuvre progressive de limites de performances minimales requises (LPMR) de la méthode d'analyse pour les substances pour lesquelles aucune limite autorisée n'a été fixée et, en particulier, pour les substances dont l'utilisation n'est pas autorisée ou est spécifiquement interdite dans la Communauté en vue de garantir une mise en œuvre harmonisée de la directive 96/23/CE.

⁽¹⁾ JO L 125 du 23.5.1996, p. 10.

⁽²⁾ JO L 65 du 5.3.1998, p. 31.

⁽³⁾ JO L 290 du 24.11.1993, p. 14.

- (9) La décision 90/515/CEE de la Commission du 26 septembre 1990 arrêtant les méthodes de référence pour la recherche de résidus de métaux lourds et d'arsenic ⁽¹⁾, la décision 93/256/CEE de la Commission du 14 avril 1993 arrêtant les méthodes à utiliser pour la recherche de résidus de substances à effet hormonal et de substances à effet thyrostatique ⁽²⁾, et la décision 93/257/CEE de la Commission du 15 avril 1993 arrêtant les méthodes de référence et la liste des laboratoires nationaux de référence pour la recherche de résidus ⁽³⁾, modifiée en dernier lieu par la décision 98/536/CE ⁽⁴⁾, ont été réexaminées compte tenu de l'évolution des connaissances scientifiques et techniques et jugées dépassées au niveau de leur champ d'application et de leur contenu, et il convient par conséquent qu'elles soient abrogées par la présente décision.
- (10) Pour permettre l'adaptation des méthodes d'analyse des échantillons officiels aux dispositions de la présente décision, il y a lieu de prévoir une période de transition.
- (11) Les mesures prévues dans la présente décision sont conformes à l'avis du comité permanent de la chaîne alimentaire et de la santé animale,

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DÉCISION:

Article premier

Objet et champ d'application

La présente décision fixe les modalités applicables aux méthodes d'analyse utilisées pour l'examen des échantillons officiels prélevés conformément à l'article 15, paragraphe 1, deuxième phrase, de la directive 96/23/CE et définit des critères communs pour l'interprétation des résultats des laboratoires chargés du contrôle officiel de ces échantillons.

La présente décision ne s'applique pas aux substances pour lesquelles des règles plus spécifiques ont été définies dans la législation communautaire.

Article 2

Définitions

Aux fins de la présente décision, les définitions contenues dans la directive 96/23/CE et son annexe sont d'application.

Article 3

Méthodes d'analyse

Les États membres font en sorte que les échantillons officiels prélevés conformément à la directive 96/23/CE soient analysés à l'aide de méthodes qui:

- sont documentées dans des instructions d'essai, de préférence conformément à la norme ISO 78-2 (6);
- sont conformes à la partie 2 de l'annexe à la présente décision;
- ont été validées conformément aux procédures décrites dans la partie 3 de l'annexe;

⁽¹⁾ JO L 286 du 18.10.1990, p. 33.

⁽²⁾ JO L 118 du 14.5.1993, p. 64.

⁽³⁾ JO L 118 du 14.5.1993, p. 75.

⁽⁴⁾ JO L 251 du 11.9.1998, p. 39.

- d) sont conformes aux limites de performances minimales requises (LPMR) correspondantes qui doivent être fixées conformément à l'article 4.

Article 4

Limites de performances minimales requises

La présente décision est réexaminée en vue de fixer progressivement les limites de performances minimales requises (LPMR) applicables aux méthodes d'analyse à utiliser pour les substances pour lesquelles aucune limite autorisée n'a été définie.

Article 5

Contrôle de la qualité

Les États membres veillent à la qualité des résultats de l'analyse des échantillons prélevés en application de la directive 96/23/CE, notamment par des tests de contrôle et/ou les résultats d'étalonnage conformément au chapitre 5.9 de la norme ISO 17025 (1).

Article 6

Interprétation des résultats

- Le résultat d'une analyse est jugé non conforme si la limite de décision de la méthode de confirmation pour l'analyte est dépassée.
- Lorsqu'une limite autorisée a été établie pour une substance, la limite de décision est la concentration au-delà de laquelle il est possible de décider avec une certitude statistique de $1 - \alpha$ que la limite autorisée a été véritablement dépassée.
- Lorsqu'aucune limite autorisée n'a été établie pour une substance, la limite de décision est le niveau de concentration le plus bas auquel une méthode peut distinguer si l'analyte identifié est présent avec une certitude statistique de $1 - \alpha$.
- Pour les substances reprises dans le groupe A de l'annexe I à la directive 96/23/CE, l'erreur α est égale ou inférieure à 1 %. Pour toutes les autres substances, l'erreur α est égale ou inférieure à 5 %.

Article 7

Abrogation

Les décisions 90/515/CEE, 93/256/CEE et 93/257/CEE sont abrogées.

Article 8

Dispositions transitoires

Les méthodes d'analyse des échantillons officiels de substances reprises dans le groupe A de l'annexe I de la directive 96/23/CE qui répondent aux critères définis dans les décisions 90/515/CEE, 93/256/CEE et 93/257/CEE peuvent être utilisées pendant deux ans au maximum après l'entrée en vigueur de la présente décision. Les méthodes appliquées actuellement aux substances reprises dans le groupe B de l'annexe I de la directive doivent être conformes à la présente décision dans un délai de cinq ans au plus tard à compter de la date d'application de la présente décision.

*Article 9***Date d'application**

La présente décision est applicable à partir du 1^{er} septembre 2002.

*Article 10***Destinataires**

Les États membres sont destinataires de la présente décision.

Fait à Bruxelles, le 12 août 2002.

Par la Commission
David BYRNE
Membre de la Commission

ANNEXE

CRITÈRES DE PERFORMANCES, AUTRES EXIGENCES ET PROCÉDURES APPLICABLES AUX MÉTHODES D'ANALYSE**1. DÉFINITIONS**

- 1.1. Exactitude: étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée (2). Elle est déterminée par la justesse et la fidélité.
- 1.2. Erreur alpha (α): probabilité que l'échantillon testé soit conforme, même si une mesure non conforme a été obtenue («décision fondée sur un faux résultat non conforme»).
- 1.3. Analyte: substance devant être détectée, identifiée et/ou quantifiée et dérivés apparaissant au cours de son analyse.
- 1.4. Erreur bêta (β): probabilité que l'échantillon testé soit véritablement non conforme, même si une mesure conforme a été obtenue («décision fondée sur un faux résultat conforme»).
- 1.5. Biais: différence entre l'espérance mathématique des résultats d'essais et la valeur de référence acceptée (2).
- 1.6. Étalon: appareil de mesurage qui représente la quantité de substance concernée d'une manière qui lie sa valeur à une base de référence.
- 1.7. Matériau de référence certifié (MRC): matériau auquel une teneur spécifiée en analyte a été assignée.
- 1.8. Cochromatographie: méthode dans laquelle l'extrait à tester avant la ou les étapes chromatographiques est divisé en deux fractions. Une fraction fait l'objet d'une chromatographie en l'état. La deuxième fraction est mélangée avec l'analyte étalon à mesurer. Ce mélange est ensuite chromatographié. La quantité d'analyte étalon ajoutée doit être similaire à la quantité estimée de l'analyte contenue dans l'extrait. Cette méthode doit améliorer l'identification d'un analyte par des méthodes chromatographiques, surtout lorsqu'il est impossible d'utiliser un étalon interne approprié.
- 1.9. Étude collaborative: analyse du même échantillon selon la même méthode afin de déterminer les caractéristiques de performances de la méthode. L'étude couvre l'erreur de mesure aléatoire et le biais de laboratoire.
- 1.10. Méthode de confirmation: méthodes qui fournissent des informations complètes ou complémentaires qui doivent permettre l'identification univoque de la substance et, le cas échéant, sa quantification au niveau considéré.
- 1.11. Limite de décision (CC α): limite à laquelle et au-delà de laquelle il est permis de conclure avec une probabilité d'erreur α qu'un échantillon est non conforme.
- 1.12. Capacité de détection (CC β): plus petite teneur en substance pouvant être détectée, identifiée et/ou quantifiée dans un échantillon avec une probabilité d'erreur β . Dans le cas des substances pour lesquelles aucune limite autorisée n'a été fixée, la capacité de détection est la concentration la plus faible à laquelle une méthode peut détecter des échantillons véritablement contaminés avec une certitude statistique de $1 - \beta$. Dans le cas des substances pour lesquelles une limite autorisée est fixée, cela signifie que la capacité de détection est la concentration à laquelle la méthode peut détecter des concentrations à la limite autorisée avec une certitude statistique de $1 - \beta$.
- 1.13. Matériau échantillon supplémenté: échantillon enrichi d'une quantité connue d'analyte à détecter.
- 1.14. Étude (comparaison) interlaboratoire: organisation, réalisation et évaluation de tests sur le même échantillon par deux laboratoires ou plus selon des conditions prédéfinies en vue de déterminer les performances des essais. En fonction de son objectif, l'étude est considérée comme étude collaborative ou comme essai d'aptitude.
- 1.15. Étalon interne: substance non contenue dans l'échantillon possédant des propriétés physico-chimiques aussi proches que possible de celles de l'analyte qui doit être identifié et ajoutée à chaque échantillon et à chaque étalon.
- 1.16. Échantillon de laboratoire: échantillon préparé en vue de son expédition au laboratoire et destiné à être examiné ou analysé.
- 1.17. Niveau considéré: concentration de la substance ou de l'analyte dans un échantillon qui est significative pour déterminer sa conformité à la législation.
- 1.18. Limite de performances minimale requise (LPMR): teneur minimale en analyte dans un échantillon qui doit être au moins détectée et confirmée. Elle doit harmoniser les performances analytiques des méthodes applicables aux substances pour lesquelles aucune limite autorisée n'a été fixée.

- 1.19. Caractéristique de performances: qualité fonctionnelle qui peut être attribuée à une méthode d'analyse. Ce peut être par exemple la spécificité, l'exactitude, la précision, la fidélité, la répétabilité, la reproductibilité, la récupération, la capacité de détection et la robustesse.
- 1.20. Critère de performances: exigences en matière de caractéristique de performances à partir desquelles il est possible de juger qu'une méthode d'analyse convient pour l'objectif poursuivi et donne des résultats fiables.
- 1.21. Limite autorisée: limite maximale de résidus, teneur maximale ou autre tolérance maximale applicable aux substances et fixée dans d'autres textes de la législation communautaire.
- 1.22. Fidélité: étroitesse d'accord entre des résultats de tests indépendants obtenus dans des conditions stipulées (prédéterminées). La mesure de la fidélité est habituellement exprimée en termes d'infidélité et calculée à partir de l'écart type des résultats d'essais. Une fidélité faible est déterminée par un grand écart type (2).
- 1.23. Essai d'aptitude: analyse du même échantillon en permettant aux laboratoires de choisir leurs propres méthodes pour autant que celles-ci soient utilisées dans des conditions de routine. L'essai doit être réalisé conformément aux guides ISO 43-1 (3) et 43-2 (4) et peut être utilisé pour évaluer la reproductibilité des méthodes.
- 1.24. Méthode qualitative: méthode d'analyse qui identifie une substance sur la base de ses propriétés chimiques, biologiques ou physiques.
- 1.25. Méthode quantitative: méthode d'analyse qui détermine la quantité ou la fraction pondérale d'une substance de manière à pouvoir l'exprimer sous forme de valeur numérique dans les unités appropriées.
- 1.26. Essai à blanc de réactif: ensemble du procédé d'analyse appliqué en l'absence de la fraction à analyser ou moyennant l'utilisation d'une quantité équivalente de solvant approprié en remplacement de la fraction à analyser.
- 1.27. Récupération: pourcentage de la concentration réelle d'une substance récupérée au cours du procédé d'analyse. Elle est déterminée lors de la validation en l'absence de MRC.
- 1.28. Matériau de référence: matériau dont une ou plusieurs propriétés ont été confirmées à l'aide d'une méthode validée, et qui peut donc être utilisé pour étalonner un appareil ou vérifier une méthode de mesure.
- 1.29. Répétabilité: fidélité sous des conditions de répétabilité (2).
- 1.30. Conditions de répétabilité: conditions où les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement (2).
- 1.31. Reproductibilité: fidélité sous des conditions de reproductibilité (2) (4).
- 1.32. Conditions de reproductibilité: conditions où les résultats d'essais sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essai identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents (2) (4).
- 1.33. Robustesse: sensibilité d'une méthode d'analyse aux variations des conditions d'expérience qui peut s'exprimer par une liste des échantillons, des analytes, des conditions d'entreposage, des conditions d'environnement et/ou de préparation de l'échantillon pour lesquels la méthode peut être appliquée telle quelle ou moyennant certaines modifications mineures. Pour toutes les conditions d'expérience qui, dans la pratique, sont sujettes à des variations (par exemple: stabilité des réactifs, composition de l'échantillon, pH, température), on indiquera toutes les variations pouvant influencer le résultat de l'analyse.
- 1.34. Essai à blanc d'échantillon: ensemble du procédé d'analyse appliqué à une fraction à analyser prélevée sur un échantillon ne contenant pas l'analyte.
- 1.35. Méthode de dépistage: méthode servant à détecter la présence d'une substance ou d'une classe de substances au niveau considéré. Ces méthodes présentent une grande capacité de traitement d'échantillons et sont appliquées pour passer au crible de nombreux échantillons en vue de détecter des résultats non conformes potentiels. Elles sont spécialement conçues pour éviter les faux résultats conformes.
- 1.36. Étude monolaboratoire (validation interne): étude analytique impliquant un seul laboratoire utilisant une seule méthode pour analyser des matériaux d'essai identiques ou différents dans des conditions différentes sur des intervalles de temps longs justifiés.
- 1.37. Spécificité: capacité d'une méthode à discerner l'analyte mesuré d'autres substances. Cette caractéristique est essentiellement une fonction de la technique de mesure décrite, mais peut varier selon la classe du composé ou de la matrice.

- 1.38. Ajout dosé: méthode dans laquelle l'échantillon d'essai est divisé en deux fractions à analyser (ou plus). Une fraction est analysée en l'état et des quantités connues de l'analyte étalon sont ajoutées aux autres fractions à analyser avant l'analyse. La quantité d'analyte étalon ajoutée doit se situer entre deux et cinq fois la quantité estimée de l'analyte contenue dans l'échantillon. Cette procédure permet de déterminer le contenu d'un analyte dans un échantillon compte tenu de la récupération de la procédure d'analyse.
- 1.39. Analyte étalon: analyte dont la teneur et la pureté sont connues et certifiées et qui sert de référence lors de l'analyse.
- 1.40. Substance: matière de constitution chimique particulière ou définie et ses métabolites.
- 1.41. Fraction à analyser: quantité de matériau prélevée de l'échantillon d'essai et qui fait effectivement l'objet de l'analyse ou de l'examen.
- 1.42. Échantillon d'essai: échantillon préparé à partir de l'échantillon de laboratoire et dans lequel les fractions à analyser doivent être prélevées.
- 1.43. Justesse: étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essai et une valeur de référence acceptée. La justesse est généralement exprimée en termes de biais (2).
- 1.44. Unités: unités décrites dans ISO 31 (20) et dans la directive 71/354/CEE (19).
- 1.45. Validation: confirmation par examen et fourniture de preuves réelles que les exigences particulières d'un usage projeté donné sont remplies (1).
- 1.46. Reproductibilité intralaboratoire: fidélité obtenue dans le même laboratoire dans des conditions stipulées (prédéterminées) (concernant par exemple la méthode, les matériaux d'essai, les opérateurs, les conditions ambiantes) sur des intervalles de temps longs justifiés.

2. CRITÈRES DE PERFORMANCES ET AUTRES EXIGENCES APPLICABLES AUX MÉTHODES D'ANALYSE

Les méthodes ou combinaisons de méthodes d'analyse autres que celles décrites ci-après ne peuvent être utilisées pour le dépistage ou la confirmation que s'il peut être établi qu'elles remplissent les exigences correspondantes définies dans la présente décision.

2.1. EXIGENCES GÉNÉRALES

2.1.1. Manipulation des échantillons

Les échantillons doivent être obtenus, manipulés et traités de manière telle que les possibilités de détecter la substance soient maximales. Les procédures de manipulation des échantillons doivent empêcher une contamination ou une perte accidentelle d'analytes.

2.1.2. Réalisation des essais

2.1.2.1. Récupération

Au cours de l'analyse des échantillons, la récupération doit être déterminée pour chaque lot d'échantillons si l'on utilise un facteur de correction de récupération fixe. Si la récupération est dans les limites, le facteur de correction fixé peut être utilisé. Dans le cas contraire, le facteur de récupération obtenu pour le lot correspondant doit être utilisé, sauf si le facteur de récupération spécifique de l'analyte dans l'échantillon doit être appliqué, auquel cas la méthode des ajouts dosés (point 3.5) ou un étalon interne doit être utilisé pour la détermination quantitative d'un analyte dans un échantillon.

2.1.2.2. Spécificité

Une méthode doit pouvoir discerner l'analyte d'autres substances dans les conditions d'expérience. Une estimation de cette capacité doit être fournie. Il y a lieu d'appliquer des stratégies pour éviter toute interférence prévisible avec des substances lorsque la technique de mesure est utilisée (par exemple homologues, analogues, métabolites du résidu en cause). Il est de la plus haute importance que toute perturbation pouvant être provoquée par des composants de la matrice soit analysée.

2.2. MÉTHODES DE DÉPISTAGE

Seules les techniques d'analyse dont on peut démontrer, sur la base de preuves identifiables, qu'elles sont validées et ont un taux de faux conformes inférieur à 5 % (erreur β) au niveau considéré doivent être appliquées aux fins de dépistage conformément à la directive 96/23/CE. En cas de résultat non conforme suspect, ce résultat doit être confirmé par une méthode de confirmation.

2.3. MÉTHODES DE CONFIRMATION POUR LES RÉSIDUS ORGANIQUES ET LES CONTAMINANTS

Les méthodes de confirmation pour les résidus organiques et les contaminants doivent fournir des indications sur la structure chimique de l'analyte. Par conséquent, les méthodes basées uniquement sur l'analyse chromatographique et ne prévoyant pas l'utilisation de la détection spectrométrique ne conviennent pas seules comme méthodes de confirmation. Toutefois, si une technique déterminée ne présente pas une spécificité suffisante, la spécificité requise doit être obtenue à l'aide de procédés d'analyse consistant dans des combinaisons appropriées de purification, de séparation(s) chromatographique(s) et de détection spectrométrique.

Les méthodes ou combinaisons de méthodes visées ci-après sont jugées appropriées pour l'identification des résidus organiques ou des contaminants pour les groupes de substances mentionnés.

Tableau 1

Méthodes de confirmation appropriées pour les résidus organiques et les contaminants

Technique de mesure	Substances annexe 1 96/23/CE	Restrictions
CL ou CG avec spectrométrie de masse	Groupes A et B	Uniquement à la suite d'une séparation chromatographique en ligne ou autonome Uniquement si des techniques à balayage complet sont utilisées ou en utilisant au moins 3 (groupe B) ou 4 (groupe A) points d'identification pour les méthodes n'enregistrant pas les spectres de masse complets
CL ou CG avec spectrométrie IR	Groupes A et B	Des exigences spécifiques en matière d'absorption doivent être remplies en spectrométrie IR
CL-full-scan (DAD)	Groupe B	Des exigences spécifiques en matière d'absorption doivent être remplies en spectrométrie UV
CL-fluorescence	Groupe B	Uniquement pour les molécules ayant une fluorescence naturelle et les molécules qui présentent une fluorescence après la transformation ou la dérivatisation
2-D CCM-UV/VIS à balayage complet	Groupe B	La CCMHP à deux dimensions et la cochromatographie sont obligatoires
CG-détection à capture d'électrons	Groupe B	Uniquement si deux colonnes de polarité différente sont utilisées
CL-immunogramme	Groupe B	Uniquement si au moins deux systèmes chromatographiques différents ou une deuxième méthode de détection indépendante sont utilisés
CL-UV/VIS (longueur d'onde unique)	Groupe B	Uniquement si au moins deux systèmes chromatographiques différents ou une deuxième méthode de détection indépendante sont utilisés

2.3.1. Critères de performances et exigences communs

Les méthodes de confirmation doivent fournir des indications sur la structure chimique de l'analyte. Si plusieurs composants donnent la même réponse, la méthode ne permet pas d'établir une distinction entre ces composants. Les méthodes basées uniquement sur l'analyse chromatographique et ne prévoyant pas l'utilisation de la détection spectrométrique ne conviennent pas seules comme méthodes de confirmation.

Lorsqu'il est utilisé dans la méthode, un étalon interne approprié doit être ajouté à la fraction à analyser au début de l'extraction. En fonction des disponibilités, il y a lieu d'utiliser soit des formes de l'analyte marquées d'un isotope stable qui conviennent particulièrement pour la détection par spectrométrie de masse, soit des composés structurellement apparentés à l'analyte.

S'il n'est pas possible d'utiliser un étalon interne approprié, l'identification de l'analyte doit être confirmée par cochromatographie. Dans ce cas, un seul pic doit être obtenu, l'augmentation de la hauteur (ou aire) intensifiée du pic correspondant à la quantité d'analyte ajoutée. Avec la chromatographie en phase gazeuse (CG) ou la chromatographie liquide (CL), la largeur du pic à la moitié de la hauteur maximale doit se situer entre 90 % et 110 % de la largeur initiale, et les temps de rétention doivent être identiques avec une marge de 5 %. Pour ce qui est des méthodes de chromatographie en couche mince (CCM), seule la tache de l'analyte doit être intensifiée; on ne doit pas voir apparaître de nouvelle tache et son aspect ne doit pas changer.

Le matériau de référence ou supplémenté contenant des quantités connues d'analyte, au niveau ou à un niveau proche de la limite autorisée ou de la limite de décision (échantillon de contrôle non conforme), ainsi que les matériaux de contrôle conformes et les blancs de réactifs doivent de préférence être analysés en même temps que chaque lot d'échantillons d'essai analysé en appliquant l'ensemble de la méthode. L'injection des extraits dans l'instrument d'analyse s'effectue dans l'ordre suivant: blanc de réactif, échantillon de contrôle conforme, échantillon(s) à confirmer, de nouveau échantillon de contrôle conforme et, finalement, échantillon de contrôle non conforme. Tout ordre différent doit être justifié.

2.3.2. Critères de performances et exigences supplémentaires applicables aux méthodes d'analyse quantitative

2.3.2.1. Justesse des méthodes quantitatives

En cas d'analyses répétées d'un matériau de référence certifié, l'écart entre la fraction pondérale moyenne corrigée de la récupération déterminée expérimentalement et la valeur certifiée doit se situer dans les limites suivantes.

Tableau 2

Justesse minimale des méthodes quantitatives

Fraction pondérale	Plage
≤ 1 µg/kg	- 50 % à + 20 %
> 1 µg/kg à 10 µg/kg	- 30 % à + 10 %
≥ 10 µg/kg	- 20 % à + 10 %

Lorsqu'aucun MRC de ce type n'est disponible, on peut admettre que la justesse des mesures soit évaluée par la récupération d'ajouts de quantités connues de l'analyte ou des analytes à un blanc de matrice. Les données corrigées de la récupération moyenne ne sont admissibles que si elles se situent dans les intervalles repris au tableau 2.

2.3.2.2. Fidélité des méthodes quantitatives

Le coefficient de variation (CV) interlaboratoire pour l'analyse répétée d'un matériau de référence ou supplémenté dans les conditions de reproductibilité ne doit pas dépasser le niveau calculé avec l'équation d'Horwitz ci-après:

$$CV = 2^{(1 - 0,5 \log C)}$$

dans laquelle C représente la fraction de la masse exprimée en puissances (exposant) de 10 (par exemple 1 mg/g = 10⁻³). Des exemples figurent au tableau 3.

Tableau 3

Exemples de CV de reproductibilité pour les méthodes quantitatives dans une plage de fractions pondérales de l'analyte

Fraction pondérale	CV reproductibilité (%)
1 µg/kg	(*)
10 µg/kg	(*)
100 µg/kg	23
1 000 µg/kg (1 mg/kg)	16

(*) Pour les fractions pondérales inférieures à 100 µg/kg, l'application de l'équation d'Horwitz donne des valeurs élevées inadmissibles. Par conséquent, les CV pour les concentrations inférieures à 100 µg/kg doivent être aussi bas que possible.

Pour les analyses effectuées dans les conditions de répétabilité, le CV intralaboratoire doit généralement se situer entre la moitié et les deux tiers des valeurs visées ci-dessus. Pour les analyses effectuées dans les conditions de reproductibilité intralaboratoire, le CV intralaboratoire ne doit pas excéder le CV de reproductibilité.

Dans le cas de substances pour lesquelles une limite autorisée est fixée, la méthode doit obtenir une reproductibilité intralaboratoire qui n'est pas supérieure au CV de reproductibilité correspondant à une concentration de 0,5 × la limite autorisée.

2.3.3. Critères de performances et autres exigences applicables à la détection par spectrométrie de masse

Les méthodes de spectrométrie de masse peuvent être prises en considération comme méthodes de confirmation uniquement à la suite d'une séparation chromatographique en ligne ou autonome.

2.3.3.1. Séparation chromatographique

Pour les procédures CG-SM, la séparation chromatographique en phase gazeuse doit s'effectuer à l'aide de colonnes capillaires. Pour les procédures CL-SM, la séparation chromatographique doit s'effectuer à l'aide de colonnes CL adaptées. Dans tous les cas, le temps de rétention minimal admissible pour l'analyte étudié doit être de deux fois le temps de rétention correspondant au volume vide de la colonne. Le temps de rétention (ou temps de rétention relatif) de l'analyte dans la fraction à analyser doit correspondre à celui de l'étalon dans une fenêtre de temps de rétention donnée. La fenêtre de temps de rétention doit être proportionnelle au pouvoir de résolution du système chromatographique. Le rapport entre le temps de rétention chromatographique de l'analyte et celui de l'étalon interne, c'est-à-dire le temps de rétention relatif de l'analyte, doit correspondre à celui de la solution d'étalonnage avec une tolérance de $\pm 0,5\%$ pour la CG et de $\pm 2,5\%$ pour la CL.

2.3.3.2. Détection par spectrométrie de masse

La détection par spectrométrie de masse doit être effectuée à l'aide de techniques de SM telles que l'enregistrement de spectres de masse complets (balayage complet ou full scan) ou la mesure d'ions sélectionnés (Selected Ion Monitoring, SIM), ainsi que des techniques SM-SMⁿ comme la mesure de réactions sélectionnées (Selected Reaction Monitoring, SRM), ou d'autres techniques SM ou SM-SMⁿ adaptées, associées aux modes d'ionisation appropriés. En spectrométrie de masse à haute résolution (SMHR), la résolution caractéristique doit être supérieure à 10 000 pour toute la plage de masse avec une vallée de 10 %.

Balayage complet (full scan): si la détermination par spectrométrie de masse est effectuée en enregistrant des spectres complets, la présence de tous les ions diagnostiques mesurés (ion moléculaire, adduits caractéristiques de l'ion moléculaire, ions fragments caractéristiques et ions isotopes), avec une intensité relative supérieure à 10 % dans le spectre de référence de l'étalon, est obligatoire.

SIM: si la détermination par spectrométrie de masse est effectuée par fragmentographie, l'ion moléculaire doit être de préférence l'un des ions diagnostiques sélectionnés (ion moléculaire, adduits caractéristiques de l'ion moléculaire, ions fragments caractéristiques et tous leurs ions isotopes). Les ions diagnostiques ne doivent pas provenir exclusivement de la même partie de la molécule. Le rapport signal-bruit pour chaque ion diagnostique doit être $\geq 3:1$.

Balayage complet et SIM: les intensités relatives des ions détectés, exprimées en pourcentage de l'intensité de l'ion le plus intense ou de la transition la plus intense, doivent correspondre à celles de l'étalon, à partir de solutions d'étalon ou d'échantillons supplémentés, à des concentrations comparables, mesurées dans les mêmes conditions, dans les limites des tolérances suivantes.

Tableau 4

Tolérances maximales admissibles pour les intensités ioniques relatives dans un ensemble de techniques de spectrométrie de masse

Intensité relative (% du pic de base)	EI-CG-SM (relative)	CI-CG-SM, CG-SM ⁿ CL-SM, CL-SM ⁿ (relative)
> 50 %	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$
> 20 % à 50 %	$\pm 15\%$	$\pm 25\%$
> 10 % à 20 %	$\pm 20\%$	$\pm 30\%$
$\leq 10\%$	$\pm 50\%$	$\pm 50\%$

Interprétation des données des spectres de masse: les intensités relatives des ions diagnostiques et/ou des paires d'ions précurseurs/produits doivent être identifiées en comparant les spectres ou en intégrant les signaux des traces de masse isolées. Lorsqu'une correction de fond est appliquée, elle doit l'être uniformément sur l'ensemble du lot (point 2.3.1, paragraphe 4) et être clairement indiquée.

Balayage complet: si des spectres complets sont enregistrés en SM simple, un minimum de quatre ions doit être présent avec une intensité relative $\geq 10\%$ du pic de base. L'ion moléculaire doit être inclus s'il est présent dans le spectre de référence avec une intensité relative $\geq 10\%$. Au moins quatre ions doivent se situer dans les tolérances maximales admissibles pour les intensités ioniques relatives (tableau 5). La recherche en bibliothèque assistée par ordinateur peut être utilisée. Dans ce cas, la comparaison des données spectrales des échantillons d'essai avec celles de la solution d'étalonnage doit dépasser un facteur de correspondance critique. Ce facteur est déterminé au cours de la procédure de validation pour chaque analyte sur la base des spectres pour lesquels les critères ci-après sont remplis. La variabilité des spectres induite par la matrice et les performances du détecteur doit être vérifiée.

SIM: lorsque des fragments de masse sont mesurés à l'aide de techniques autres que le balayage complet, un système de points d'identification doit être utilisé pour interpréter les données. Pour la confirmation des substances reprises dans le groupe A de l'annexe 1 de la directive 96/23/CE, un minimum de 4 points d'identification est requis. Pour la confirmation des substances reprises dans le groupe B de l'annexe 1 de la directive 96/23/CE, un minimum de 3 points d'identification est requis. Le tableau figurant ci-dessous indique le nombre de points d'identification que permet d'obtenir chacune des techniques de base en spectrométrie de masse. Cependant, pour remplir les conditions requises pour les points d'identification nécessaires pour la confirmation et la somme des points d'identification qui doit être calculée:

- a) au minimum un rapport ionique doit être mesuré;
- b) tous les rapports ioniques pertinents mesurés doivent remplir les critères décrits plus haut;
- c) trois techniques distinctes au maximum peuvent être combinées pour obtenir le nombre minimal de points d'identification.

Tableau 5**Lien entre diverses classes de fragment de masse et les points d'identification obtenus**

Technique SM	Points d'identification obtenus par ion
Spectrométrie de masse à faible résolution (FR)	1,0
FR-SM ⁿ Ion précurseur	1,0
FR-SM ⁿ Produits de transition	1,5
SMHR	2,0
HR- SM ⁿ Ion précurseur	2,0
HR-SM ⁿ Produits de transition	2,5

Notes:

- (1) Chaque ion ne peut être compté qu'une seule fois.
- (2) La CG-SM avec ionisation à impact électronique est considérée comme une technique différente de la CG-SM à ionisation chimique.
- (3) Plusieurs analytes peuvent être utilisés pour accroître le nombre de points d'identification uniquement si les dérivés présentent des chimies de réaction différentes.
- (4) Pour les substances reprises dans le groupe A de l'annexe 1 de la directive 96/23/CE, lorsqu'une des techniques ci-après est utilisée dans la procédure d'analyse: CLHP couplée à la spectrophotométrie à réseau de diodes (DAD) en balayage complet, CLHP couplée à la détection fluorimétrique, CLHP couplée à un immunogramme, la CCM 2D couplée à la détection spectrométrique, elle peut contribuer à un seul point d'identification au maximum, pour autant que les critères applicables à ces techniques soient remplis.
- (5) Les produits de transition comprennent les produits fils et petit-fils.

Tableau 6**Exemples de nombre de points d'identification obtenus pour un ensemble de techniques et de couplages de techniques (n = nombre entier)**

Technique(s)	Nombre d'ions	Points d'identification
CG-SM (EI ou CI)	N	n
CG-SM (EI ou CI)	2 (EI) + 2 (CI)	4
CG-SM (EI ou CI) 2 dérivés	2 (dérivé A) + 2 (dérivé B)	4
CL-SM	N	n
CG-SM-SM	1 précurseur et 2 fils	4
CL-SM-SM	1 précurseur et 2 fils	4
CG-SM-SM	2 précurseurs, avec 1 fils chacun	5
CL-SM-SM	2 précurseurs, avec 1 fils chacun	5
CL-SM-SM-SM	1 précurseur, 1 fils et 2 petits-fils	5,5
SMHR	N	2 n
CG-SM et CL-SM	2 + 2	4
CG-SM et SMHR	2 + 1	4

2.3.4. Critères de performances et autres exigences applicables à la chromatographie couplée à la détection infrarouge

Pics adéquats: les pics adéquats sont des maxima d'absorption dans le spectre infrarouge d'un étalon remplissant les conditions visées ci-après.

2.3.4.1. Détection infrarouge

Maximum d'absorption: il doit se situer dans le nombre d'onde allant de 4 000 à 500 cm^{-1} .

Intensité d'absorption: elle ne doit pas être inférieure à:

- a) une absorbance molaire spécifique de 40 par rapport à la ligne de base du pic, ou
- b) à une absorbance relative de 12,5 % de l'absorbance du pic le plus intense dans la zone 4 000-500 cm^{-1} ,

lorsque les deux sont mesurées par rapport à l'absorbance nulle, et à 5 % de l'absorbance du pic le plus intense dans la zone de 4 000-500 cm^{-1} lorsque les deux sont mesurées par rapport à la ligne de base de leur pic.

Note bien que des pics appropriés déterminés conformément au point a) puissent être préférés en théorie, les pics prévus au point b) sont plus faciles à déterminer dans la pratique.

Le nombre de pics dans le spectre infrarouge de l'analyte dont les fréquences correspondent à un pic adéquat dans le spectre de l'étalon, à $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$ près, est indiqué.

2.3.4.2. Interprétation des données du spectre infrarouge

L'absorption doit être présente dans toutes les zones du spectre de l'analyte qui correspondent à un pic adéquat du spectre de référence de l'étalon. Un minimum de 6 pics adéquats est exigé dans le spectre infrarouge de l'étalon. S'il existe moins de 6 pics adéquats (7), le spectre infrarouge en cause ne doit pas être utilisé comme spectre de référence. Le «résultat», c'est-à-dire le pourcentage de pics adéquats trouvé dans le spectre infrarouge de l'analyte, doit être d'au moins 50. Lorsqu'il n'existe pas de correspondance exacte avec un pic adéquat, la région appropriée du spectre de l'analyte doit correspondre à la présence d'un pic de même niveau. La procédure n'est applicable qu'aux pics d'absorption dans le spectre de l'échantillon ayant une intensité d'au moins trois fois la hauteur du bruit de fond.

2.3.5. Critères de performances et autres exigences applicables à la détermination d'un analyte par CL associée à d'autres techniques de détection

2.3.5.1. Séparation chromatographique

Un étalon interne doit être utilisé si le matériau approprié est disponible. Il doit s'agir de préférence d'un étalon apparenté ayant un temps de rétention proche de celui de l'analyte. L'analyte doit éluer au temps de rétention caractéristique de l'étalon correspondant, dans les mêmes conditions expérimentales. Le temps de rétention minimal admissible pour un analyte doit être de deux fois le temps de rétention correspondant au volume vide de la colonne. Le rapport entre le temps de rétention de l'analyte et celui de l'étalon interne, c'est-à-dire le temps de rétention relatif de l'analyte, doit être égal à celui de l'étalon dans la matrice appropriée, à $\pm 2,5 \%$ près.

2.3.5.2. Détection UV/VIS à balayage complet

Les critères de performances applicables aux méthodes CL doivent être remplis.

La longueur d'onde d'absorption maximale de l'analyte dans le spectre doit être identique à celle de l'étalon avec une marge déterminée par la résolution du système de détection. Pour la détection par barrette de diodes, cette valeur se situe typiquement dans un intervalle de $\pm 2 \text{ nm}$. Pour les parties des deux spectres dont l'absorbance relative est égale ou supérieure à 10 %, le spectre de l'analyte au-dessus de 220 nm ne doit pas être différent visuellement du spectre de l'étalon. Ce critère est rempli lorsque, premièrement, les mêmes maxima sont présents et, deuxièmement, lorsque la différence des deux spectres n'est, en aucun point observé, supérieure à 10 % de l'absorbance caractéristique de l'étalon. En cas de recherche et de comparaison dans une bibliothèque, la comparaison des données spectrales des échantillons d'essai avec celles de la solution d'étalonnage doit dépasser un facteur de correspondance critique. Ce facteur est déterminé au cours de la procédure de validation pour chaque analyte sur la base des spectres pour lesquels les critères ci-dessus sont remplis. La variabilité des spectres induite par la matrice et les performances du détecteur doit être vérifiée.

2.3.5.3. Critères de performances applicables à la détection fluorimétrique

Les critères de performances applicables aux méthodes CL doivent être remplis.

Ceci s'applique aux molécules ayant une fluorescence naturelle et aux molécules qui présentent une fluorescence après la transformation ou la dérivation. La sélection des longueurs d'onde d'excitation et d'émission en combinaison avec les conditions chromatographiques doit être effectuée de manière à minimiser l'apparition de composants perturbateurs dans les extraits de blancs.

Le maximum du pic le plus proche dans le chromatogramme doit être séparé du pic de l'analyte par au moins une largeur totale de pic à 10 % de la hauteur maximale du pic de l'analyte.

2.3.5.4. Critères de performances applicables à la détermination d'un analyte par immunogramme-CL

L'immunogramme CL ne convient pas seul comme méthode de confirmation.

Les critères applicables aux méthodes CL doivent être remplis.

Les paramètres de contrôle de la qualité prédéfinis, par exemple la liaison non spécifique, la liaison relative des échantillons de contrôle, la valeur d'absorbance du blanc, doivent être dans les limites obtenues au cours de la validation de l'essai.

L'immunogramme doit se composer d'au moins cinq fractions.

Chaque fraction doit être inférieure à la moitié de la largeur de pic.

La fraction présentant la teneur maximale en analyte doit être identique pour l'échantillon suspect, l'échantillon de contrôle non conforme et l'étalon.

2.3.5.5. Détermination d'un analyte par CL avec détection UV/VIS (longueur d'onde unique)

La CL avec détection UV/VIS (longueur d'onde unique) ne convient pas seule comme méthode de confirmation.

Le maximum du pic le plus proche dans le chromatogramme doit être séparé du pic de l'analyte par au moins une largeur totale de pic à 10 % de la hauteur maximale du pic de l'analyte.

2.3.6. Critères de performances et autres exigences applicables à la détermination d'un analyte par CCM 2D couplée à une détection spectrométrique UV/VIS à balayage complet

La CCMHP à deux dimensions et la cochromatographie sont obligatoires.

Les valeurs R_f de l'analyte doivent correspondre aux valeurs R_f des étalons dans une marge de $\pm 5\%$.

L'aspect de l'analyte ne doit pas pouvoir être distingué de celui de l'étalon.

Pour les taches de la même couleur, le centre de la tache la plus proche doit être séparé de celui de la tache de l'analyte par une distance correspondant au moins à la moitié de la somme des diamètres des taches.

Le spectre de l'analyte ne doit pas être visuellement différent de celui de l'analyte étalon, selon la description de la détection UV/VIS à balayage complet.

En cas de recherche et de comparaison dans une bibliothèque, la comparaison des données spectrales des échantillons d'essai avec celles de la solution d'étalonnage doit dépasser un facteur de correspondance critique. Ce facteur est déterminé au cours de la procédure de validation pour chaque analyte sur la base des spectres pour lesquels les critères ci-dessus sont remplis. La variabilité des spectres induite par la matrice et les performances du détecteur doit être vérifiée.

2.3.7. Critères de performances et autres exigences applicables à la détermination d'un analyte par CG avec détection à capture d'électrons

Un étalon interne doit être utilisé si le matériau approprié est disponible. Il doit s'agir de préférence d'une substance apparentée ayant un temps de rétention proche de celui de l'analyte. L'analyte doit éluer à un temps de rétention caractéristique de l'étalon correspondant, dans les mêmes conditions expérimentales. Le temps de rétention minimal admissible pour un analyte doit être de deux fois le temps de rétention correspondant au volume vide de la colonne. Le rapport entre le temps de rétention de l'analyte et celui de l'étalon interne, c'est-à-dire le temps de rétention relatif de l'analyte, doit être égal à celui de l'étalon dans la matrice appropriée, à $\pm 0,5\%$ près. Le maximum du pic le plus proche dans le chromatogramme doit être séparé du pic de l'analyte par au moins une largeur totale de pic à 10 % de la hauteur maximale du pic de l'analyte. Une cochromatographie peut être utilisée pour obtenir des informations supplémentaires.

2.4. MÉTHODES DE CONFIRMATION APPLICABLES AUX ÉLÉMENTS

Les analyses de confirmation pour les éléments chimiques doivent être fondées sur le concept de l'identification univoque et de la quantification exacte et précise au moyen des propriétés physico-chimiques caractéristiques de l'élément chimique considéré (par exemple longueur d'onde du rayonnement émis ou absorbé, masse atomique) au niveau considéré.

Les méthodes ou combinaisons de méthodes ci-après sont jugées appropriées pour l'identification des éléments chimiques.

Tableau 7

Méthodes de confirmation appropriées pour les éléments chimiques

Technique	Paramètre mesuré
DPASV	Signal électrique
Spectrométrie d'absorption atomique	
Flamme	Longueur d'onde d'absorption
Génération d'hydrures	Longueur d'onde d'absorption
Vapeur à froid	Longueur d'onde d'absorption
Atomisation électrothermique (four à graphite)	Longueur d'onde d'absorption
Spectrométrie d'émission atomique	
Plasma à couplage inductif	Longueur d'onde d'émission
Spectrométrie de masse	
Plasma à couplage inductif	Rapport masse-charge

2.4.1. Critères de performances communs et autres exigences applicables aux méthodes de confirmation

Le matériau de référence ou supplémenté contenant des quantités connues d'analyte, au niveau ou à un niveau proche de la limite maximale autorisée ou de la limite de décision (échantillon de contrôle non conforme), ainsi que les matériaux de contrôle conformes et les blancs de réactifs doivent de préférence être analysés en même temps que chaque lot d'échantillons d'essai analysé en appliquant l'ensemble de la méthode. Il est recommandé d'injecter les extraits dans l'instrument d'analyse dans l'ordre suivant: blanc de réactif, échantillon de contrôle conforme, échantillon à confirmer, échantillon de contrôle conforme et, finalement, échantillon de contrôle non conforme. Tout ordre différent doit être justifié.

En règle générale, la plupart des techniques d'analyse exigent la digestion complète de la matrice organique pour obtenir des solutions avant la détermination de l'analyte. Elle peut être obtenue à l'aide de procédures de minéralisation à micro-ondes qui minimisent le risque de perte et/ou de contamination des analytes concernés. Des récipients en téflon décontaminés de bonne qualité doivent être utilisés. Si d'autres méthodes de digestion humide ou sèche sont utilisées, des preuves identifiables doivent permettre d'exclure de possibles phénomènes de perte ou de contamination. Au lieu de la digestion, des procédés de séparation (par exemple extraction) peuvent, dans certaines conditions, être retenus pour séparer les analytes des composants de la matrice et/ou concentrer les analytes en vue de les introduire dans l'équipement d'analyse.

En ce qui concerne l'étalonnage, qu'il soit externe ou basé sur la méthode des ajouts dosés, il y a lieu de veiller à ne pas dépasser la zone de travail fixée pour l'analyse. Dans le cas de l'étalonnage externe, il est obligatoire que les étalons soient préparés dans une solution dont la composition est aussi proche que possible de celle de la solution d'échantillon. La correction de fond doit également être appliquée si les conditions d'analyse spécifiques l'exigent.

2.4.2. Critères de performances et autres exigences supplémentaires applicables aux méthodes d'analyse quantitative

2.4.2.1. Justesse des méthodes quantitatives

En cas d'analyses répétées d'un matériau de référence certifié pour des éléments, l'écart entre la teneur moyenne déterminée expérimentalement et la valeur certifiée doit se situer dans la limite de $\pm 10\%$. Lorsqu'aucun MRC de ce type n'est disponible, on peut admettre que la justesse des mesures soit évaluée par la récupération d'ajouts de quantités connues de l'élément aux échantillons non connus. L'attention est attirée sur le fait que, contrairement à l'analyte, l'élément ajouté n'est pas chimiquement lié dans la matrice réelle et que, par conséquent, les résultats obtenus par cette méthode ont une validité moindre que les résultats obtenus en utilisant des MRC. Les données de récupération sont uniquement admissibles lorsqu'elles se situent dans une limite de $\pm 10\%$ de la valeur cible.

2.4.2.2. Fidélité des méthodes quantitatives

En cas d'analyses répétées d'un échantillon effectuées dans les conditions de reproductibilité intralaboratoire, le coefficient de variation (CV) intralaboratoire de la moyenne ne doit pas dépasser les valeurs suivantes:

Tableau 8

CV pour les méthodes quantitatives dans une plage de fractions pondérales de l'élément

Fraction pondérale	CV (%)
≥ 10 µg/kg à 100 µg/kg	20
> 100 µg/kg à 1 000 µg/kg	15
≥ 1 000 µg/kg	10

2.4.3. Exigences spécifiques applicables à la voltamétrie à redissolution anodique par polarographie à impulsion différentielle (DPASV)

La destruction complète des matières organiques dans les échantillons avant le dosage par DPASV est de la plus haute importance. Aucun signal large résultant de la présence de matières organiques ne doit être visible dans les voltammogrammes. Le niveau des pics en DPASV peut être influencé par les constituants inorganiques de la matrice. Aussi la quantification doit-elle être réalisée par la méthode des ajouts dosés. Des spécimens de voltammogrammes types d'une solution d'échantillon doivent être fournis avec la méthode.

2.4.4. Exigences spécifiques applicables à la spectrométrie d'absorption atomique (AAS)

Cette technique est fondamentalement monoélément et requiert par conséquent d'optimiser les conditions d'expérience en fonction de l'élément quantifié. Autant que possible, les résultats doivent faire l'objet d'une vérification qualitative et quantitative en recourant à d'autres lignes d'absorption (idéalement deux lignes d'absorption différentes doivent être sélectionnées). Les étalons doivent être préparés dans une matrice liquide aussi proche que possible de la solution à mesurer (par exemple, en termes de concentration d'acide ou de composition des agents de modification). Pour minimiser les valeurs de blanc, tous les réactifs doivent être de la plus grande pureté disponible. Différents types d'AAS peuvent être distingués en fonction de la méthode retenue pour vaporiser et/ou atomiser l'échantillon.

2.4.4.1. Exigences spécifiques applicables à l'AAS-flamme

Les réglages des instruments doivent être optimisés pour chaque élément. En particulier, il y a lieu de vérifier la composition et les débits de gaz. Pour éviter les perturbations dues à l'absorption de fond, il y a lieu d'utiliser un correcteur à source continue. Dans le cas des matrices inconnues, il y a lieu de vérifier si une correction de fond est requise.

2.4.4.2. Exigences spécifiques applicables à l'AAS-four à graphite

La contamination présente dans le laboratoire influence souvent la précision dans le travail à l'état d'ultratraces dans le four à graphite. Par conséquent, il y a lieu d'utiliser des réactifs de pureté élevée, de l'eau déminéralisée et un matériel en plastique inerte pour la manipulation des échantillons et des étalons. Les réglages des instruments doivent être optimisés pour chaque élément. En particulier, il y a lieu de vérifier les conditions de prétraitement et d'atomisation (température, temps) et la modification de la matrice.

Le travail dans les conditions d'atomisation isotherme [par exemple, tube graphite à chauffage transversal avec plate-forme de L'vov intégrée (8)] réduira l'influence de la matrice en ce qui concerne l'atomisation de l'analyte. La modification de la matrice combinée à la correction de fond Zeeman (9) permet la quantification au moyen d'une courbe d'étalonnage reposant sur la mesure de solutions étalons aqueuses.

2.4.5. Exigences spécifiques applicables à la spectrométrie d'absorption atomique à génération d'hydrures

Les composés organiques contenant des éléments tels que l'arsenic, le bismuth, le germanium, le plomb, l'antimoine, le sélénium, l'étain et le tellure peuvent être très stables et nécessitent une décomposition par oxydation pour obtenir des résultats corrects pour la teneur totale en éléments. Aussi la digestion par micro-ondes ou la calcination à haute pression sous conditions fortement oxydantes est-elle recommandée. Le plus grand soin doit être apporté à la conversion complète et reproductible des éléments dans leurs hydrures respectifs.

La formation de l'hydrure d'arsenic dans une solution d'acide chlorhydrique avec NaBH_4 dépend de l'état d'oxydation de l'arsenic (As III: formation rapide, As V: formation plus longue). Pour éviter une perte de sensibilité pour la détermination d'As V par la technique d'injection de flux, provoquée par le temps de réaction court dans ce système, As V doit être réduit en As III après la décomposition par oxydation. L'iode de potassium/acide ascorbique ou la cystéine sont appropriés à cet effet. Les blancs, les solutions d'étalonnage et les solutions d'échantillon doivent être traités de la même manière. Un système de lots permet de déterminer les deux types d'arsenic sans influencer la précision. En raison de la période de formation plus longue de l'hydrure d'As V, l'étalonnage doit être effectué par intégration des aires de pics. Les réglages des instruments doivent être optimisés. Le flux de gaz qui transfère l'hydrure à l'atomiseur est particulièrement important et doit être contrôlé.

2.4.6. Exigences spécifiques applicables à la spectrométrie d'absorption atomique en phase vapeur à froid

La vapeur à froid s'emploie uniquement avec le mercure. Les pertes de mercure élémentaire par volatilisation et adsorption imposent une attention particulière tout au long de l'analyse. La contamination par les réactifs ou l'environnement doit être soigneusement évitée.

Les composés organiques contenant du mercure nécessitent une décomposition par oxydation pour obtenir des résultats corrects pour la teneur totale en mercure. Pour la décomposition, il y a lieu d'utiliser des systèmes scellés à digestion à micro-ondes ou calcination à haute pression. Le nettoyage de l'équipement en contact avec le mercure requiert un soin particulier.

La technique d'injection de flux offre des avantages. Pour les limites de décision inférieures, l'adsorption du mercure élémentaire sur un adsorbant or/platine suivie d'une désorption thermique est recommandée. Le contact de l'adsorbant ou de la cellule avec de l'humidité perturbe la mesure et doit être évité.

2.4.7. Exigences spécifiques applicables à la spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (ICP-AES)

La spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (10) est une méthode multiélément qui permet la mesure simultanée de plusieurs éléments. Pour utiliser l'ICP-AES, les échantillons doivent être digérés auparavant pour décomposer les matrices organiques. Des systèmes scellés à digestion à micro-ondes ou calcination à haute pression doivent être utilisés. Pour que l'analyse ICP-AES soit efficace, l'étalonnage de l'instrument et la sélection des éléments ou des longueurs d'ondes sont essentiels. Pour l'étalonnage de l'instrument, dans le cas de courbes d'étalonnage linéaires, il est habituellement nécessaire de mesurer les solutions d'étalonnage pour quatre concentrations seulement étant donné que les courbes d'étalonnage en ICP-AES sont généralement linéaires sur quatre à six ordres de grandeur de concentration. L'étalonnage du système ICP-AES doit normalement s'effectuer avec un étalon multiélément qui doit être préparé dans une solution contenant la même concentration d'acide que la solution de mesure. Les concentrations des éléments doivent être vérifiées pour la courbe linéaire.

La sélection des longueurs d'ondes pour la mesure de l'émission à partir des analytes est appropriée pour les concentrations des éléments à déterminer. Lorsque la concentration de l'analyte sort de la zone de travail d'une ligne d'émission, il y a lieu d'utiliser une autre ligne d'émission. La ligne d'émission la plus sensible (sans perturbation) doit être sélectionnée en premier lieu, puis une ligne moins sensible. Lorsque l'on travaille à la limite de détection ou à proximité, le meilleur choix est habituellement la ligne d'émission la plus sensible pour l'analyte correspondant. En ICP-AES, les principales difficultés proviennent des perturbations spectrales ou de fond. Les perturbations possibles sont, par exemple, le décalage du bruit de fond, la dérive du bruit de fond, une mauvaise résolution spectrale et les variations aléatoires du bruit de fond. Chaque perturbation a ses propres causes et remèdes. En fonction des matrices, les corrections des perturbations et l'optimisation des paramètres de fonctionnement doivent être appliquées. Certaines perturbations peuvent être évitées par la dilution ou par l'adaptation des matrices. Pour chaque lot d'échantillons d'essai analysés, le matériau de référence et supplémenté contenant des quantités connues de l'analyte ou des analytes ainsi que le matériau blanc doivent être traités de la même manière que les échantillons d'essai. Pour contrôler une dérive, l'étalon doit être vérifié après 10 échantillons par exemple. Tous les réactifs et le gaz plasma doivent être de la plus grande pureté disponible.

2.4.8. Exigences spécifiques applicables à la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) (11)

La détermination d'éléments-traces de masse atomique moyenne tels que le chrome, le cuivre et le nickel peut être fortement perturbée par d'autres ions isobares et polyatomiques. Ce phénomène est uniquement évitable lorsqu'un pouvoir de résolution de 7 000-8 000 au moins est disponible. Les difficultés associées aux techniques de SM sont notamment la dérive de l'instrument, les effets de matrice et les perturbations ioniques moléculaires ($m/z < 80$). L'étalonnage interne multiple couvrant la même plage de masse que les éléments à déterminer est nécessaire pour corriger la dérive de l'instrument et les effets de matrice.

La décomposition complète des matières organiques dans les échantillons est nécessaire avant les mesures par ICP-MS. Comme dans l'AAS, après la digestion dans des récipients scellés, les éléments volatils, par exemple l'iode, doivent être transférés vers un état d'oxydation stable. La perturbation la plus importante résulte des combinaisons ioniques moléculaires de l'argon (gaz plasma), de l'hydrogène, du carbone, de l'azote et de l'oxygène (acides de dissolution, impuretés du gaz plasma et gaz atmosphériques entraînés) et de la matrice de l'échantillon. La digestion complète, les mesures du fond, le choix approprié des masses analysées parfois associées à une abondance inférieure (limite de détection plus faible) et des acides de dissolution, par exemple l'acide nitrique, sont indispensables pour éviter les perturbations.

Pour les éléments à déterminer, les perturbations doivent être exclues par la sélection appropriée des masses analysées spécifiques, y compris la confirmation des rapports isotopiques. La réponse de l'instrument compte tenu des facteurs de Fano doit être vérifiée pour chaque mesure en utilisant des étalons internes.

3. VALIDATION

La validation doit démontrer que la méthode d'analyse est conforme aux critères applicables pour les caractéristiques de performances correspondantes.

Des objectifs de contrôle différents exigent des catégories de méthodes différentes. Le tableau suivant détermine la caractéristique de performances à vérifier en fonction du type de méthode.

Tableau 9

Classification des méthodes d'analyse par caractéristiques de performances à déterminer

		Limite de détection CC β	Limite de décision CC α	Justesse/ Récupération	Fidélité	Sélectivité/ Spécificité	Applicabilité/ Robustesse/ Stabilité
Méthodes qualitatives	S	+	-	-	-	+	+
	C	+	+	-	-	+	+
Méthodes quantitatives	S	+	-	-	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+

S = méthodes de dépistage; C = méthodes de confirmation; += détermination obligatoire.

3.1. PROCÉDURES DE VALIDATION

Le présent chapitre contient des exemples et/ou des références concernant les procédures de validation des méthodes d'analyse. D'autres approches peuvent être utilisées pour démontrer que la méthode d'analyse répond aux critères de performances applicables aux caractéristiques de performances pour autant qu'elles fournissent un niveau et une qualité d'informations équivalents.

La validation peut aussi être effectuée en procédant à une étude interlaboratoire telle qu'elle est définie par le *Codex alimentarius*, ISO ou l'IUPAC (12), ou par d'autres méthodes telles que les études monolaboratoires ou la validation interne (13) (14). Le présent chapitre se concentre sur les études monolaboratoires (ou validation interne) et adopte une approche modulaire. Cette approche consiste en:

- 1) un ensemble de caractéristiques de performances communes indépendantes du modèle de validation utilisé, et
- 2) des procédures plus spécifiques liées au modèle conformément à la description du tableau 10.

Tableau 10

Paramètres de performances indépendants et dépendants du modèle

Validation		
Paramètres de performances indépendants du modèle	Paramètres de performances dépendants du modèle	
Caractéristiques de performances communes (3.1.1)	Validation classique (3.1.2)	Validation interne (3.1.3)
Spécificité	Récupération	Récupération
Justesse	Répétabilité	Répétabilité
Robustesse: variations mineures	Reproductibilité intralaboratoire	Reproductibilité intralaboratoire
Stabilité	Reproductibilité	Reproductibilité
	Limite de décision (CC α)	Limite de décision (CC α)
	Capacité de détection (CC β)	Capacité de détection (CC β)
	Courbes d'étalonnage	Courbe d'étalonnage
	Robustesse: variations significatives	Robustesse

3.1.1. Caractéristiques de performances indépendantes du modèle

Quelle que soit l'approche retenue pour la validation, les caractéristiques de performances ci-après doivent être déterminées. Pour réduire la charge de travail, une approche bien conçue et statistiquement valide peut être utilisée pour combiner les expériences réalisées en vue de déterminer les divers paramètres.

3.1.1.1. Spécificité

Pour les méthodes d'analyse, la capacité de discrimination entre l'analyte et des substances proches (isomères, métabolites, produits de dégradation, substances endogènes, constituants de la matrice, etc.) est importante. Deux approches sont nécessaires pour vérifier l'existence de perturbations.

Par conséquent, les substances potentiellement perturbatrices doivent être sélectionnées et les échantillons blancs correspondants doivent être analysés pour détecter la présence de perturbations éventuelles et en estimer les effets:

- sélectionner un ensemble de composés chimiquement apparentés (métabolites, dérivés, etc.) ou d'autres substances susceptibles d'être rencontrées avec le composé concerné qui peuvent être présents dans les échantillons,
- analyser un nombre approprié d'échantillons blancs représentatifs ($n \geq 20$) et contrôler la présence de perturbations (signaux, pics, traces d'ions) dans la zone concernée où l'analyte cible est supposé éluer,
- de plus, des échantillons blancs représentatifs doivent être supplémentés à une concentration correspondante avec des substances susceptibles de perturber l'identification et/ou la quantification de l'analyte,
- après analyse, voir si:
 - la présence de perturbations peut aboutir à une fausse identification,
 - la présence d'une ou plusieurs perturbations empêche l'identification de l'analyte cible, ou
 - la quantification est influencée de façon notable.

3.1.1.2. Justesse

Le point présent décrit la détermination de la justesse (qui est un élément de l'exactitude). La justesse peut uniquement être déterminée au moyen d'un matériau de référence certifié (MRC). Lorsqu'un MRC est disponible, il doit être utilisé. La procédure est décrite en détail dans ISO 5725-4 (5). Un exemple est repris ci-dessous:

- analyser 6 répliqués du MRC conformément aux instructions d'essai applicables à la méthode,
- déterminer la concentration de l'analyte présent dans chaque échantillon des répliques,
- calculer la moyenne, l'écart type et le coefficient de variation (%) pour ces concentrations,
- calculer la justesse en divisant la concentration moyenne détectée par la valeur certifiée (mesurée en concentration) et multiplier par 100 pour exprimer le résultat en pourcentage.

Justesse (%) = concentration moyenne détectée corrigée de la récupération $\times 100$ /valeur certifiée.

En l'absence de MRC, la récupération peut être déterminée à la place de la justesse conformément à la description du point 4.1.2.1.

3.1.1.3. Applicabilité/robustesse (variations mineures)

Ce type d'expériences recourt à l'introduction délibérée de variations mineures raisonnables par le laboratoire et à l'observation de leurs conséquences.

Les études préalables doivent être réalisées en sélectionnant les facteurs de prétraitement, de purification et d'analyse de l'échantillon susceptibles d'influer sur les résultats des mesures. Ces facteurs peuvent être l'opérateur, la source et l'âge des réactifs, les solvants, les étalons et les extraits d'échantillon, la vitesse de chauffage, la température, le pH et de nombreux autres facteurs susceptibles d'apparaître dans le laboratoire. Ces facteurs doivent être modifiés dans un ordre de grandeur correspondant aux écarts habituellement rencontrés entre différents laboratoires.

- Identifier les facteurs éventuels susceptibles d'influencer les résultats.
- Faire varier légèrement chaque facteur.

- Réaliser un test de robustesse selon la méthode de Youden (15) (16). (D'autres méthodes agréées peuvent être utilisées à ce stade. Cependant, l'approche de Youden minimise le temps et le travail requis.) L'approche de Youden est un modèle factoriel fractionné. Les interactions entre les différents facteurs ne sont pas détectables.
- Lorsqu'un facteur influence notablement les résultats des mesures, réaliser des expériences supplémentaires pour déterminer les limites d'acceptabilité de ce facteur.
- Les facteurs qui influencent les résultats de manière significative doivent être clairement identifiés dans le mode opératoire de la méthode.

Le concept de base n'est pas d'étudier une variation à la fois, mais d'introduire plusieurs variations simultanément. Par exemple, désignons par A, B, C, D, E, F et G les valeurs nominales de 7 facteurs différents susceptibles d'influencer les résultats si leurs valeurs nominales sont légèrement modifiées. Désignons leurs autres valeurs par les minuscules correspondantes a, b, c, d, e, f et g. Cela donne 2⁷ ou 128 combinaisons différentes potentielles.

Il est possible de sélectionner un sous-ensemble de huit de ces combinaisons présentant un équilibre entre majuscules et minuscules (tableau 11). Huit déterminations utilisant une combinaison des facteurs retenus (A-G) doivent être effectuées. Les résultats des déterminations sont indiqués par les lettres S à Z au tableau 11.

Tableau 11

Plan d'expérience pour les études de robustesse (variations mineures)

Valeur facteur F	Nombre de combinaisons de déterminations							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
Résultat observé R	S	T	U	V	W	X	Y	Z

Pour les calculs, voir les exemples d'essai de robustesse au point 3.3.

3.1.1.4. Stabilité

Il a été observé qu'une stabilité insuffisante de l'analyte ou des constituants de la matrice dans l'échantillon pendant l'entreposage ou l'analyse pouvait produire des écarts significatifs au niveau du résultat de l'analyse. Il y a lieu en outre de contrôler la stabilité de l'étalon en solution. Généralement, la stabilité de l'analyte est bien caractérisée dans différentes conditions d'entreposage. Le contrôle des conditions d'entreposage fera partie du système normal d'agrément des laboratoires. Lorsque la stabilité est inconnue, elle peut être déterminée conformément aux exemples visés ci-après.

Stabilité de l'analyte en solution

- Préparer des solutions de base fraîches de l'analyte ou des analytes et diluer conformément aux instructions d'essai pour obtenir des aliquotes en nombre suffisant (par exemple: quarante) de chaque concentration sélectionnée (proche de la limite de performances minimale requise pour les substances pour lesquelles aucune limite autorisée n'est fixée ou proche de la limite autorisée pour les autres substances). Préparer des solutions de l'analyte utilisées pour le renforcement et dans la solution d'analyse finale ainsi que toute autre solution intéressante (par exemple: étalons dérivatisés).
- Mesurer la teneur en analyte dans la solution fraîchement préparée conformément aux instructions d'essai.
- Verser des volumes adéquats dans des récipients adaptés, étiqueter et entreposer selon le plan figurant ci-dessous:

Tableau 12

Plan de détermination de la stabilité de l'analyte en solution

	- 20 °C	+ 4 °C	+ 20 °C
Ombre	10 aliquotes	10 aliquotes	10 aliquotes
Lumière			10 aliquotes

- Le temps d'entreposage retenu doit être de 1, 2, 3 et 4 semaines ou plus si nécessaire, par exemple, jusqu'au moment où les premiers phénomènes de dégradation sont observables lors de l'identification et/ou de la quantification. Le temps d'entreposage maximal et les conditions d'entreposage optimales doivent être consignés.
- Le calcul de la concentration de l'analyte ou des analytes dans chaque aliquote doit s'effectuer en prenant comme concentration à 100 % la solution de l'analyte fraîchement préparée au moment de l'analyse.

$$\text{Analyte résiduel (\%)} = C_i \times 100 / C_{\text{fraîche}}$$

C_i = concentration à l'instant considéré

$C_{\text{fraîche}}$ = concentration de la solution fraîche.

Stabilité de l'analyte ou des analytes dans la matrice

- Autant que possible, des échantillons naturellement contaminés doivent être utilisés. À défaut de matériau naturellement contaminé, il y a lieu d'utiliser une matrice supplémentée avec l'analyte.
- Avec un matériau naturellement contaminé, la concentration dans le matériau doit être déterminée pendant que le matériau est encore frais. D'autres aliquotes du matériau doivent être prélevées après 1, 2, 4 et 20 semaines et les concentrations doivent être déterminées. Le matériau doit être entreposé au minimum à - 20 °C ou à une température inférieure si nécessaire.
- À défaut de matériau naturellement contaminé, prélever du matériau ne contenant pas l'analyte et l'homogénéiser. Diviser le matériau en 5 aliquotes. Supplémenter chaque aliquote avec l'analyte qui doit de préférence être préparé dans une petite quantité de solution aqueuse. Analyser une aliquote immédiatement. Entreposer les aliquotes restantes à au moins - 20 °C ou à une température inférieure si nécessaire et les analyser après 1, 2, 4 et 20 semaines.

3.1.1.5. Courbes d'étalonnage

Lorsque des courbes d'étalonnage sont utilisées pour la quantification:

- cinq niveaux au moins (zéro compris) doivent être utilisés pour construire la courbe,
- la zone de travail de la courbe d'étalonnage doit être décrite,
- le modèle mathématique de la courbe et l'ajustement des données à la courbe doivent être décrits,
- les plages d'acceptabilité des paramètres de la courbe doivent être décrites.

Lorsqu'un étalonnage en série basé sur une solution étalon est nécessaire, les plages admissibles doivent être indiquées pour les paramètres de la courbe d'étalonnage qui peuvent varier d'une série à l'autre.

3.1.2. Procédures de validation classiques

Le calcul des paramètres selon les méthodes classiques exige de réaliser plusieurs expériences. Chaque caractéristique de performances doit être déterminée pour chaque variation importante (voir plus haut sous applicabilité/robustesse). Pour les méthodes multianalytes, plusieurs analytes peuvent être analysés simultanément si les perturbations correspondantes éventuelles sont écartées au préalable. Plusieurs caractéristiques de performances peuvent être déterminées de la même manière. Aussi, pour réduire la charge de travail, il est recommandé de combiner autant que possible les expériences (par exemple répétabilité et reproductibilité intralaboratoire avec spécificité, analyse des blancs pour déterminer la limite de décision et essai de spécificité).

3.1.2.1. Récupération

En l'absence de MRC, la récupération doit être déterminée par des expériences à l'aide d'un blanc de matrice supplémenté en appliquant par exemple le plan suivant:

- sélectionner 18 aliquotes d'un matériau blanc et, toutes les 6 aliquotes, renforcer avec 1, 1,5 et 2 fois la limite de performances minimale requise ou 0,5, 1 et 1,5 fois la limite autorisée,
- analyser les échantillons et calculer la concentration présente dans chaque échantillon,

- à l'aide de l'équation figurant ci-dessous, calculer la récupération pour chaque échantillon,
- calculer la récupération moyenne et le CV pour les six résultats à chaque niveau,
- % récupération = $100 \times \text{teneur mesurée/niveau de renforcement}$.

Cette méthode classique de détermination de la récupération est une variante de la méthode des ajouts dosés décrites au point 3.5 lorsque:

- l'échantillon est considéré comme un blanc plutôt qu'un échantillon à analyser,
- on considère que le rendement ⁽¹⁾ et la récupération ⁽²⁾ sont identiques pour les deux fractions à analyser,
- les échantillons d'essai ont les mêmes masses et les extraits de la fraction à analyser les mêmes volumes,
- la quantité d'étalon ajoutée à la deuxième fraction à analyser (supplémentée) est désignée par x_{ADD} ($x_{\text{ADD}} = \rho_A \cdot V_A$),
- x_1 est la valeur mesurée pour le blanc et x_2 la valeur mesurée pour la deuxième fraction à analyser (supplémentée),
- d'où, % récupération = $100 (x_2 - x_1)/x_{\text{ADD}}$.

Lorsqu'une des conditions précitées est (ou est supposée) irréalisable, la procédure complète de détermination de la récupération par la méthode des ajouts dosés décrite sous 3.5 doit être effectuée.

3.1.2.2. Répétabilité

- Préparer un ensemble d'échantillons de matrices identiques, supplémentés avec l'analyte de manière à obtenir des concentrations équivalant à 1, 1,5 et 2 fois la limite de performances minimale requise ou 0,5, 1 et 1,5 fois la limite autorisée.
- À chaque niveau, l'analyse doit être réalisée avec six réplicats au minimum.
- Analyser les échantillons.
- Calculer la concentration détectée dans chaque échantillon.
- Déterminer la concentration moyenne, l'écart type et le coefficient de variation (%) des échantillons supplémentés.
- Répéter ces opérations à deux autres occasions au moins.
- Calculer le total des concentrations moyennes et des CV pour les échantillons supplémentés.

3.1.2.3. Reproductibilité intralaboratoire

- Préparer un ensemble d'échantillons de matériau d'essai spécifié (matrices identiques ou différentes), supplémentés avec le ou les analytes de manière à obtenir des concentrations équivalant à 1, 1,5 et 2 fois la limite de performances minimale requise ou 0,5, 1 et 1,5 fois la limite autorisée.
- À chaque niveau, l'analyse doit être réalisée avec six réplicats au minimum.
- Répéter ces opérations à deux autres occasions au moins avec des opérateurs différents, dans des environnements différents, par exemple, des lots différents de réactifs, de solvants, etc., des températures ambiantes différentes, des instruments différents, etc., si possible.
- Analyser les échantillons.
- Calculer la concentration détectée dans chaque échantillon.
- Déterminer la concentration moyenne, l'écart type et le coefficient de variation (%) des échantillons supplémentés.

3.1.2.4. Reproductibilité

Lorsque la reproductibilité doit être vérifiée, les laboratoires doivent participer à des études collaboratives conformément à la norme ISO 5725-2 (5).

3.1.2.5. Limite de décision (CCa)

La limite de décision doit être fixée conformément aux exigences en matière d'identification ou d'identification et de quantification définies dans les «Critères de performances et autres exigences applicables aux méthodes d'analyse» (partie 2).

⁽¹⁾ Rendement: fraction de la masse de l'analyte contenue dans l'échantillon qui est présente dans l'extrait final.

⁽²⁾ Récupération (ici): fraction de la masse de l'analyte ajoutée à l'échantillon qui est présente dans l'extrait final. Dans la suite du document, le rendement et la récupération sont supposés identiques et seul le terme «récupération» est utilisé.

Dans le cas de substances pour lesquelles aucune limite autorisée n'a été fixée, la limite de décision peut être déterminée:

- soit par la procédure de la courbe d'étalonnage selon la norme ISO 11843 (17) (ici dénommée valeur critique de la variable nette d'état). Dans ce cas, il y a lieu d'utiliser un échantillon blanc, supplémenté au niveau de performances minimal requis et au-delà, par pas équidistants. Analyser les échantillons. Après identification, comparer le signal à la concentration ajoutée. La limite de décision est égale à la concentration correspondante à l'intercept y plus 2,33 fois l'écart type de la reproductibilité intralaboratoire de l'intercept. Ceci s'applique uniquement aux déterminations quantitatives ($\alpha = 1\%$),
- soit en analysant au moins 20 matériaux blancs par matrice pour être en mesure de calculer le rapport signal-bruit dans la fenêtre où est attendu l'analyte. On peut utiliser comme limite de décision la valeur correspondant à trois fois le rapport signal-bruit. Ceci s'applique aux déterminations quantitatives et qualitatives.

Dans le cas de substances pour lesquelles une limite autorisée est fixée, la limite de détection peut être déterminée:

- soit par la procédure de la courbe d'étalonnage (ici dénommée valeur critique de la variable nette d'état) selon la norme ISO 11843 (17). Dans ce cas, il y a lieu d'utiliser un échantillon blanc, supplémenté à un niveau proche de la limite autorisée par pas équidistants. Analyser les échantillons. Après identification, comparer le signal à la concentration ajoutée. La limite de décision est égale à la concentration correspondante à la limite autorisée plus 1,64 fois l'écart type de la reproductibilité intralaboratoire ($\alpha = 5\%$), ou
- ou en analysant au moins 20 matériaux blancs par matrice, supplémentés avec le ou les analytes à la limite autorisée. La limite de décision est égale à la concentration à la limite autorisée plus 1,64 fois l'écart type correspondant ($\alpha = 5\%$).

Voir également article 5 et point 3.2.

3.1.2.6. Capacité de détection ($CC\beta$)

La limite de détection doit être déterminée conformément aux exigences en matière de dépistage, d'identification ou d'identification et de quantification définies dans la partie 2.

Dans le cas de substances pour lesquelles aucune limite autorisée n'a été fixée, la capacité de détection peut être déterminée:

- par la procédure de la courbe d'étalonnage (ici dénommée valeur minimale détectable de la variable d'état nette) selon la norme ISO 11843 (17). Dans ce cas, il y a lieu d'utiliser un matériau blanc représentatif, supplémenté au niveau de performances minimal requis et au-delà, par pas équidistants. Analyser les échantillons. Après identification, comparer le signal à la concentration ajoutée. La limite de détection est égale à la concentration correspondante à la limite de décision plus 1,64 fois l'écart type de la reproductibilité intralaboratoire pour la teneur moyenne mesurée à la limite de décision ($\beta = 5\%$),
- en analysant au moins 20 matériaux blancs par matrice, supplémentés avec le ou les analytes à la limite de décision. Analyser les échantillons et identifier les analytes. La limite de détection est égale à la valeur de la limite de décision plus 1,64 fois l'écart type de la reproductibilité intralaboratoire pour la teneur mesurée ($\beta = 5\%$),
- en l'absence de résultats quantitatifs, la capacité de détection peut être déterminée par l'étude du matériau blanc supplémenté à la limite de décision et au-delà. Dans ce cas, la capacité de détection de la méthode est égale au niveau de concentration où il ne reste que 5 % ou moins de faux résultats conformes. Par conséquent, au moins 20 tests doivent être effectués pour au moins un niveau de concentration en vue d'obtenir une base fiable pour cette détermination.

Dans le cas de substances pour lesquelles une limite autorisée a été fixée, la capacité de détection peut être déterminée:

- soit par la procédure de la courbe d'étalonnage (ici dénommée valeur minimale détectable de la variable nette d'état) selon la norme ISO 11843 (17). Dans ce cas, il y a lieu d'utiliser un échantillon blanc représentatif, supplémenté à un niveau proche de la limite autorisée par pas équidistants. Analyser les échantillons et identifier le ou les analytes. Calculer l'écart type de la teneur moyenne mesurée à la limite de décision. La capacité de détection est égale à la concentration correspondante à la valeur de la limite de décision plus 1,64 fois l'écart type de la reproductibilité intralaboratoire ($\beta = 5\%$), ou
- en analysant au moins 20 matériaux blancs par matrice, supplémentés avec le ou les analytes à la limite de décision. La capacité de détection est égale à la valeur de la limite de décision plus 1,64 fois l'écart type correspondant ($\beta = 5\%$).

Voir également le point 3.2.

3.1.2.7. Robustesse (variations significatives)

La méthode d'analyse doit être testée dans des conditions d'expérience différentes, ce qui comprend notamment des espèces différentes, des matrices différentes ou des conditions d'échantillonnage différentes. Les variations introduites doivent être significatives. L'importance de ces variations peut être évaluée en utilisant par exemple l'approche de Youden (15) (16). Chaque caractéristique de performances doit être déterminée pour toutes les variations significatives pour lesquelles un effet notable sur les performances de l'essai a été démontré.

3.1.3. Validation sur la base d'autres modèles

Lorsque d'autres méthodes de validation sont appliquées, il y a lieu de définir le modèle et la stratégie de base avec les prérequis, les hypothèses et les formules correspondantes dans le protocole de validation ou au moins d'en indiquer les références. Un exemple de méthode de remplacement est repris ci-après. Lorsque le modèle de validation interne, par exemple, est appliqué, les caractéristiques de performances sont déterminées de manière à permettre la validation pour les variations significatives dans la même procédure de validation. Ceci requiert de définir un plan d'expérience pour la validation.

3.1.3.1. Plan d'expérience

Un plan d'expérience doit être établi en fonction du nombre d'espèces et de facteurs différents étudiés. Par conséquent, la première étape de la procédure de validation doit étudier les populations d'échantillons qui seront analysées ensuite dans le laboratoire pour sélectionner les espèces les plus importantes et les facteurs susceptibles d'influer sur les résultats de mesure. La plage de concentration doit ensuite être sélectionnée en fonction de l'objectif conformément au niveau considéré.

Exemple

- Plusieurs analytes peuvent être étudiés simultanément par la méthode d'analyse en cours de validation.
- Deux variations du facteur principal ont été identifiées (A et B). Les facteurs principaux forment la base à partir de laquelle les niveaux des facteurs sont combinés. Ces facteurs principaux peuvent comprendre des facteurs tels que l'espèce ou la matrice. Dans cet exemple, le facteur principal a été modifié sur deux niveaux, autrement dit deux espèces différentes (espèces A et B) ont été considérées. En général, il est possible de faire varier les facteurs principaux sur plus de deux niveaux ce qui ne fait qu'accroître le nombre d'analyses à effectuer.
- Les facteurs retenus doivent être modifiés sur deux niveaux (indiqués par + ou -).

Tableau 13

Exemples de facteurs jugés importants pour une procédure de validation

Sexe de l'animal	(facteur 1)
Race	(facteur 2)
Conditions de transport	(facteur 3)
Conditions d'entreposage	(facteur 4)
Fraîcheur de l'échantillon	(facteur 5)
Conditions d'engraissement	(facteur 6)
Opérateurs différents ayant une expérience différente	(facteur 7)

Tableau 14

Plan d'expérience possible pour l'exemple ci-dessus

Espèce	Facteur 1	Facteur 2	Facteur 3	Facteur 4	Facteur 5	Facteur 6	Facteur 7	Facteur 8
A	+	+	+	+	-	+	-	1
A	+	+	-	-	+	-	-	2
A	+	-	+	-	-	-	+	3
A	+	-	-	+	+	+	+	4
A	-	+	+	-	+	+	+	5
A	-	+	-	+	-	-	+	6
A	-	-	+	+	+	-	-	7
A	-	-	-	-	-	+	-	8

Espèce	Facteur 1	Facteur 2	Facteur 3	Facteur 4	Facteur 5	Facteur 6	Facteur 7	Facteur 8
B	+	+	+	+	+	-	+	9
B	+	+	-	-	-	+	+	10
B	+	-	+	-	+	+	-	11
B	+	-	-	+	-	-	-	12
B	-	+	+	-	-	-	-	13
B	-	+	-	+	+	+	-	14
B	-	-	+	+	-	+	+	15
B	-	-	-	-	+	-	+	16

Chaque échantillon (chaque combinaison de niveaux de facteurs) devant être supplémenté à quatre concentrations différentes proches du niveau considéré et un échantillon blanc devant être analysé pour chaque niveau, il faut réaliser $5 \times 16 = 80$ analyses pour l'ensemble de l'expérience de validation.

Ces 80 résultats de mesure permettent de calculer (13) (14).

Récupération

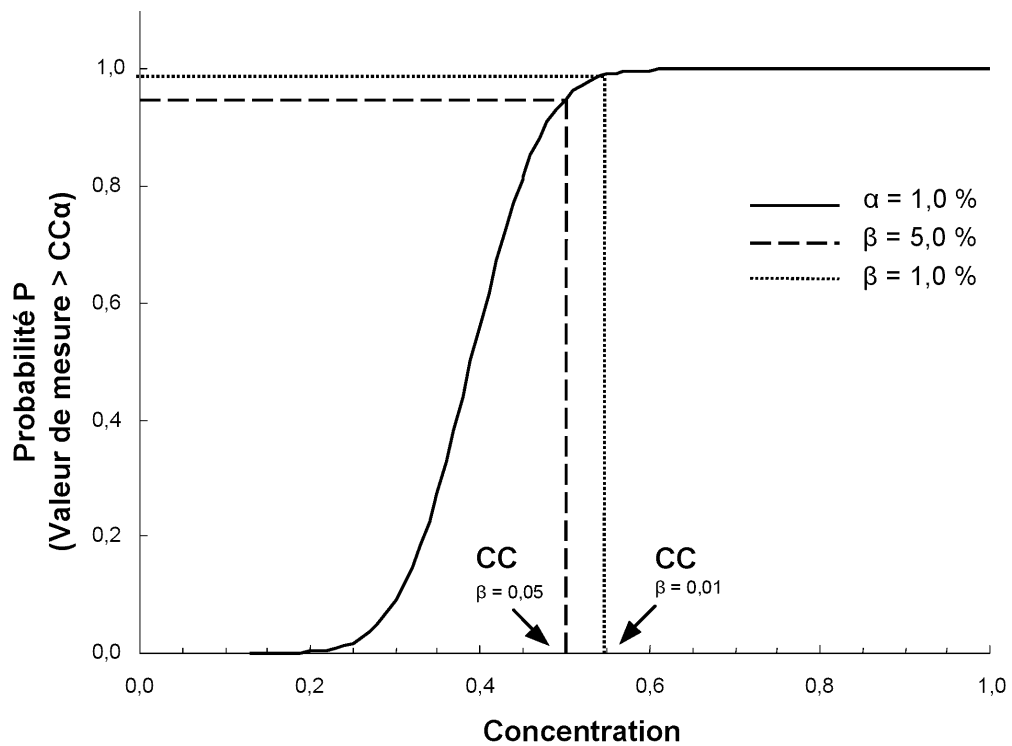
- la répétabilité par niveau de concentration (S_{ir}),
- la reproductibilité intralaboratoire par niveau de concentration (S_{ir}),
- la limite de décision ($CC\alpha$),
- la capacité de détection ($CC\beta$),
- la courbe de puissance (taux d'erreur β par rapport à la concentration, voir point 3.1.3.2),
- la robustesse (variations significatives); la robustesse pour les variations mineures peut être déterminée conformément au point 3.1.1.3,
- 16 courbes d'étalonnage liées à l'échantillon,
- 1 courbe d'étalonnage globale,
- l'intervalle de prédiction de la courbe d'étalonnage globale,
- les écarts induits par la matrice (S_{mat}),
- les écarts induits par la suite (S_{run}),
- l'incidence des différents facteurs sur les résultats de mesure.

Ces caractéristiques de performances permettent l'évaluation complète du niveau de performances de la méthode étant donné que non seulement l'influence des différents facteurs est étudiée, mais aussi les combinaisons correspondantes de ces facteurs. À l'aide de ce plan d'expérience, il est possible de décider si l'un ou l'autre des facteurs retenus doit être exclu de la courbe d'étalonnage globale parce qu'il s'écarte significativement des écarts types des autres facteurs.

3.1.3.2. Courbe de puissance

La courbe de puissance fournit des informations sur la capacité de détection de la méthode dans la plage de concentration retenue. Elle fait référence au risque d'erreur β lorsque la méthode étudiée est appliquée. La courbe de puissance permet de calculer les capacités de détection pour les différentes catégories (dépistage, confirmation) ou types (qualitatif ou quantitatif) de méthodes pour une erreur β donnée (par exemple: 5 %).

Figure 1
Courbe de puissance



La figure 1 donne un exemple de représentation graphique de la capacité de détection ($CC\beta$) d'une méthode d'analyse. Cette méthode a un risque résiduel de fausse décision de 5 % à une concentration de 0,50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. À une concentration de 0,55 $\mu\text{g}/\text{kg}$, le risque de faux résultat conforme descend à 1 %.

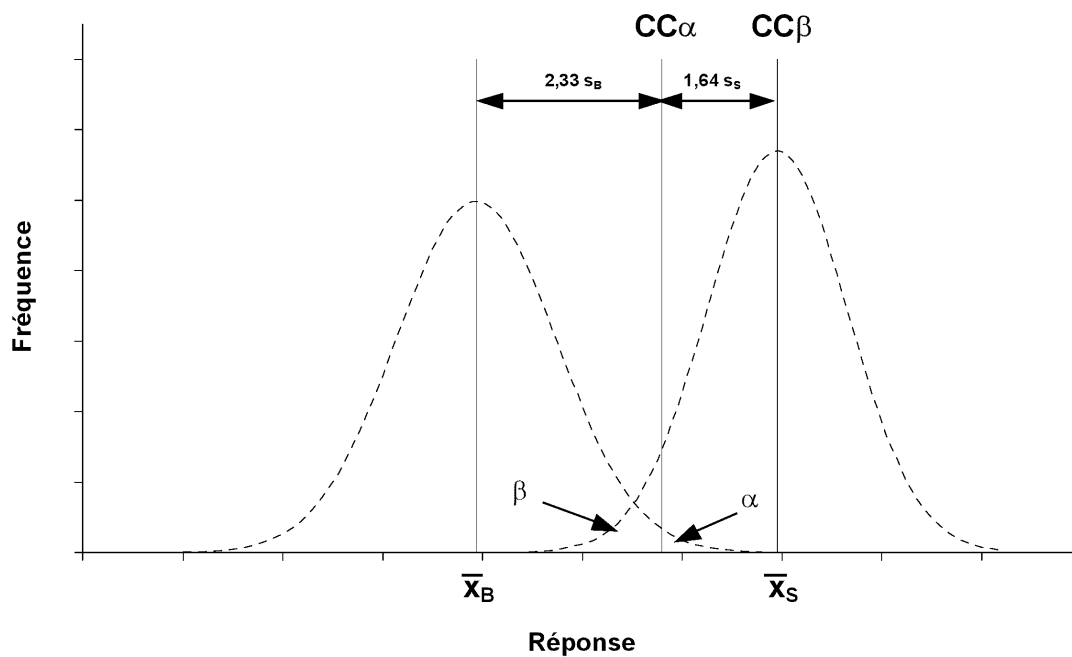
3.1.3.3. Reproductibilité

La détermination de la reproductibilité d'une méthode par le concept des études monolaboratoires (validation interne) nécessite de participer à des essais d'aptitude conformément aux guides ISO 43-1 (3) et 43-2 (4). Les laboratoires peuvent choisir leurs propres méthodes pour autant que celles-ci soient utilisées dans des conditions de routine. L'écart type du laboratoire peut être utilisé pour évaluer la reproductibilité de la méthode.

3.2. REPRÉSENTATION GRAPHIQUE DES DIFFÉRENTES LIMITES D'ANALYSE

Figure 2

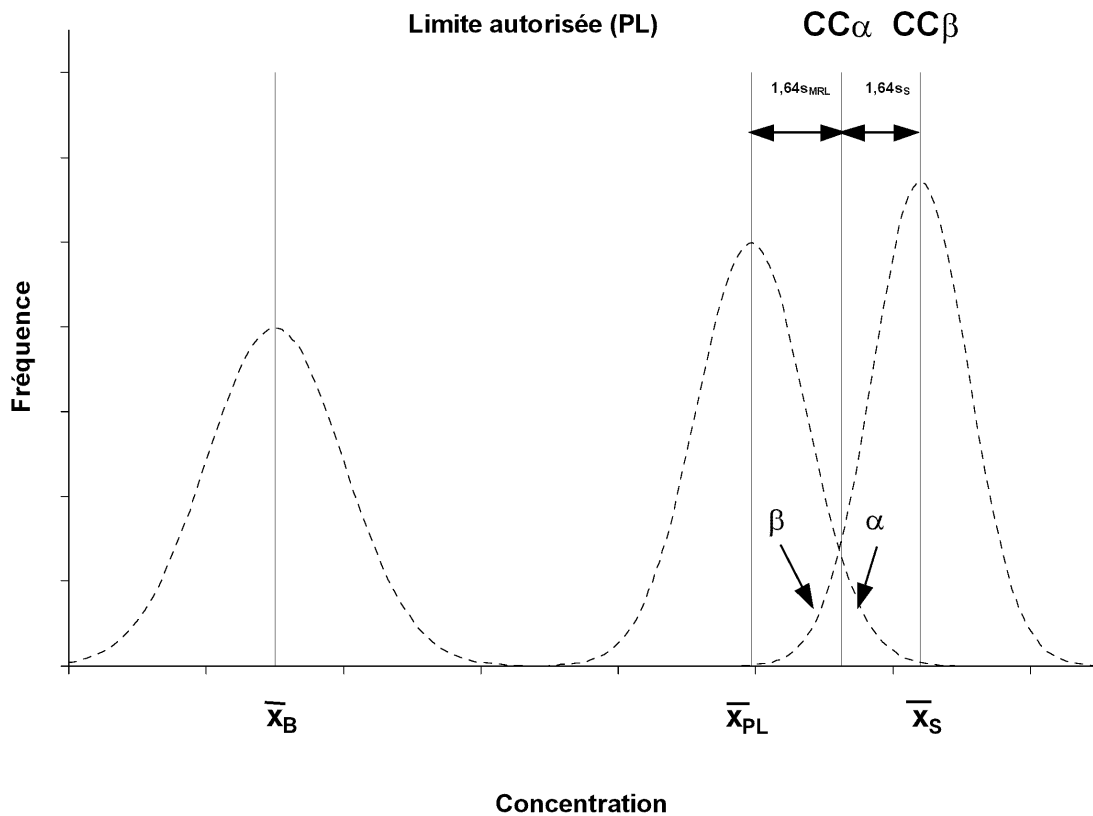
Substances pour lesquelles aucune limite autorisée n'est fixée



- \bar{x}_S Valeur de réponse moyenne de l'échantillon contaminé
- s_B Écart type de l'échantillon blanc (déterminé sous conditions de reproductibilité intralaboratoire)
- s_S Écart type de l'échantillon contaminé (déterminé sous conditions de reproductibilité intralaboratoire)
- α Taux de faux résultats non conformes
- β Taux de faux résultats conformes
- $CC\alpha$ Réponse avec une erreur α donnée et une erreur β de 50 %
- $CC\beta$ Réponse avec une erreur α très faible et une erreur β donnée

Figure 3

Substances avec limite autorisée



- \bar{x}_B «Concentration» moyenne de l'échantillon blanc
- \bar{x}_{PL} Concentration moyenne de l'échantillon contenant l'analyte à la limite autorisée
- \bar{x}_S Concentration moyenne de l'échantillon contaminé
- s_{PL} Écart type de l'échantillon contenant l'analyte à la limite autorisée (déterminé sous conditions de reproductibilité intralaboratoire)
- s_S Écart type de l'échantillon contaminé (déterminé sous conditions de reproductibilité intralaboratoire)
- α Taux de faux résultats non conformes
- β Taux de faux résultats conformes
- CC α Réponse avec une erreur α donnée et une erreur β de 50 %
- CC β Réponse avec une erreur α très faible et une erreur β donnée

3.3. EXEMPLE DE CALCUL POUR LA DÉTERMINATION DE LA ROBUSTESSE AVEC DES VARIATIONS MINEURES SELON L'APPROCHE DE YOUDEN (16)

Comparaison des moyennes (A)

$A_A = \Sigma(A_i)/4$	Comparer les moyennes des majuscules (A_A à A_G) aux moyennes des minuscules correspondantes (A_a à A_g). Si un facteur a un effet, la différence sera significativement plus grande que les différences des autres facteurs.
$A_B = \Sigma(B_i)/4$	
$A_C = \Sigma(C_i)/4$	
$A_D = \Sigma(D_i)/4$	
$A_E = \Sigma(E_i)/4$	
$A_F = \Sigma(F_i)/4$	
$A_G = \Sigma(G_i)/4$	
$A_a = \Sigma(a_i)/4$	Une méthode robuste ne doit pas être influencée par les variations rencontrées avec une quasi-certitude entre laboratoires.
$A_b = \Sigma(b_i)/4$	
$A_c = \Sigma(c_i)/4$	
$A_d = \Sigma(d_i)/4$	
$A_e = \Sigma(e_i)/4$	
$A_f = \Sigma(f_i)/4$	
$A_g = \Sigma(g_i)/4$	

En l'absence de différence exceptionnelle, la mesure la plus réaliste de l'erreur aléatoire est donnée par les sept différences.

Différences (D_i)

$D_a = A - a = \Sigma(A_i) - \Sigma(a_i)$
$D_b = B - b = \Sigma(B_i) - \Sigma(b_i)$
$D_c = C - c = \Sigma(C_i) - \Sigma(c_i)$
$D_d = D - d = \Sigma(D_i) - \Sigma(d_i)$
$D_e = E - e = \Sigma(E_i) - \Sigma(e_i)$
$D_f = F - f = \Sigma(F_i) - \Sigma(f_i)$
$D_g = G - g = \Sigma(G_i) - \Sigma(g_i)$

Carrés des différences (D_i^2)

$D_a^2 =$ valeur a
$D_b^2 =$ valeur b
$D_c^2 =$ valeur c
$D_d^2 =$ valeur d
$D_e^2 =$ valeur e
$D_f^2 =$ valeur f
$D_g^2 =$ valeur g

Écart type des différences $D_i(S_{D_i})$

$$S_{D_i} = \sqrt{2 * \Sigma(D_i^2 / 7)}$$

Lorsque le S_{D_i} est significativement plus grand que l'écart type de la méthode appliquée dans les conditions de reproductibilité intralaboratoire (voir précédemment), la conclusion prévisible est que tous les facteurs considérés ensemble ont une incidence sur le résultat, même si aucun facteur isolé n'a d'influence significative, et que la méthode n'est pas suffisamment robuste par rapport aux variations retenues.

3.4. EXEMPLES DE CALCUL POUR LA PROCÉDURE DE VALIDATION INTERNE

Exemples et calculs pour le protocole de validation interne tel que décrit au point 3.1.3. Validation sur la base d'autres modèles (13) (14).

3.5. EXEMPLES DE CALCUL POUR LA MÉTHODE DES AJOUTS DOSÉS

Un échantillon d'essai ayant une teneur T de l'analyte est divisé en deux fractions à analyser 1 et 2 de masses m_1 et m_2 . La fraction à analyser 2 est supplémentée d'un volume V_A d'une solution de concentration ρ_A de l'analyte. Deux extraits des fractions à analyser de volumes V_1 et V_2 sont obtenus après les phases d'extraction et de purification de la méthode. La récupération de l'analyte est supposée être rc . Les deux extraits sont testés avec une méthode de sensibilité b et donnent respectivement une réponse analytique x_1 et x_2 .

En supposant que rc et b sont identiques pour l'analyte dans l'échantillon natif et dans l'échantillon supplémenté, la teneur T peut être calculée comme suit:

$$T = x_1 \cdot V_1 \cdot \rho_A \cdot V_A / (x_2 \cdot V_2 \cdot m_1 - x_1 \cdot V_1 \cdot m_2)$$

La méthode permettra de déterminer la récupération rc . Ensuite, en plus de l'essai décrit ci-dessus, une partie de l'extrait de la fraction à analyser 1 (volume V_3) est supplémentée d'une quantité connue $\rho_B \cdot V_B$ d'analyte et testée. La réponse analytique est x_3 et la récupération:

$$rc = x_2 \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot \rho_B \cdot V_B / [x_3 \cdot V_1 \cdot V_3 (T \cdot m_2 + \rho_A \cdot V_A) - x_2 \cdot V_2 \cdot T \cdot m_1 (V_3 - V_B)]$$

Il est également possible de calculer la sensibilité b comme suit:

$$b = x_1 \cdot V_1 / rc \cdot T \cdot m_1$$

Toutes les conditions d'application et les indications ont été décrites (18).

4. ABRÉVIATIONS UTILISÉES

AAS	Spectrométrie d'absorption atomique
AES	Atomic Emission Spectrometry, spectrométrie d'émission atomique
AOAC-I	Association of Official Analytical Chemists INTERNATIONAL, Association des chimistes analytiques officiels
B	Bound fraction, fraction liée (immuno-essais)
CI	Ionisation chimique
MRC	Matériau de référence certifié
CV	Coefficient de variation
2 D	À deux dimensions
DAD	Détection à réseau de diodes
DPASV	Voltamétrie à redissolution anodique par polarographie à impulsion différentielle
ECD	Détection à capture d'électrons
EI	Electronic Impact Ionisation, ionisation à impact électronique
GC	Chromatographie en phase gazeuse
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
CCMHP	Chromatographie en couche mince à haute performance
SMHR	Haute résolution (spectrométrie de masse)
ICP-AES	Spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif
ICP-MS	Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif
IR	Infrarouge
ISO	International Standard Organisation, Organisation internationale de normalisation
CL	Chromatographie liquide
FR (SM)	Faible résolution (spectrométrie de masse)
LPMR	Limite de performances minimale requise
SM	Spectrométrie de masse
m/z	Rapport masse/charge
RF	Migration relative vers le front de solvant (CCM)
RSDL	Écarts types relatifs du laboratoire
SIM	Mesure d'ions sélectionnés
UV	Rayonnement ultraviolet
VIS	Rayonnement visible

5. RÉFÉRENCES

- (1) ISO 17025: 1999 Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais.
- (2) ISO 3534-1:1993 Statistiques — Vocabulaire et symboles — Partie 1: Probabilité et termes statistiques généraux.
- (3) ISO 43-1:1997 Essais d'aptitude des laboratoires par intercomparaison — Partie 1: Développement et mise en œuvre de systèmes d'essais d'aptitude.
- (4) Guide ISO 43-2:1997 Essais d'aptitude des laboratoires par intercomparaison — Partie 2: Sélection et utilisation de systèmes d'essais d'aptitude par des organismes d'accréditation de laboratoires.
- (5) ISO 5725:1994 Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure — Partie 1: Principes généraux et définitions; ISO 5725-2 Partie 2: Méthode de base pour la détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode de mesure normalisée; Partie 4: Méthodes de base pour la détermination de la justesse d'une méthode de mesure normalisée.

- (6) ISO 78-2:1999 Chimie — Plans de normes — Partie 2: Méthodes d'analyse chimique.
 - (7) W. G. de Ruig and J. M. Weseman «A new approach to confirmation by infrared spectrometry» *J. Chemometrics* 4 (1990) 61-77.
 - (8) Voir par exemple May, T. W., Brumbaugh, W. G., 1982, Matrix modifier and L'vov platform for elimination of matrix interferences in the analysis of fish tissues for lead by graphite furnace atomic absorption spectrometry: *Analytical Chemistry* 54(7):1032-1037 (90353).
 - (9) Applications of Zeeman Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry in the Chemical Laboratory and in Toxicology, C. Minoia, S. Caroli (Eds.), Pergamon Press (Oxford), 1992, p. xxvi + 675.
 - (10) Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry, A. Montaser, D. W. Golightly (Eds.), VCH Publishers, Inc. (New York), 1992.
 - (11) Plasma Source Mass Spectrometry Developments and Applications, G. Holland, S. D. Tanner (Eds.), The Royal Society of Chemistry, 1997, p. 329.
 - (12) IUPAC (1995), Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, *Pure & Applied Chem*, 67, 331.
 - (13) Jülicher, B., Gowik, P. and Uhlig, S. (1998) Assessment of detection methods in trace analysis by means of a statistically based in-house validation concept. *Analyst*, 120, 173.
 - (14) Gowik, P., Jülicher, B. and Uhlig, S. (1998) Multi-residue method for non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma using high performance liquid chromatography-photodiode-array detection. Method description and comprehensive in-house validation. *J. Chromatogr.*, 716, 221.
 - (15) OAC-I Peer Verified Methods, Policies and Procedures, 1993, AOAC International, 2200 Wilson Blvd, Suite 400, Arlington, Virginia 22201-3301, USA.
 - (16) W. J. Youden; Steiner, E. H.; «Statistical Manual of the AOAC — Association of Official Analytical Chemists», AOAC-I, Washington DC: 1975, p. 35 et suivantes.
 - (17) ISO 11843: 1997 Capacité de détection — Partie 1: Termes et définitions, Partie 2: Méthodologie de l'étalonnage linéaire.
 - (18) R. W. Stephany & L. A. van Ginkel: «Yield or recovery: a world of difference». Proceedings 8th Euro Food Chem, Vienna, Austria September 18-20 (1995) Federation of European Chemical Societies, Event 206. ISBN 3-900554-17X, p. 2 à 9.
 - (19) Directive 71/354/CEE du Conseil du 18 octobre 1971 concernant le rapprochement des législations des États membres relatives aux unités de mesure (JO L 243 du 29.10.1971, p. 29).
 - (20) ISO 31-0: 1992 Grandeurs et unités — Partie 0: Principes généraux.
-