

Concepts de limite de quantification

J.M. Mermet

Spectroscopy Forever

Club de Spectrométrie Atomique, 18 juin 2006

Bibliographie (scopus.com)

- ❑ Méthodes de séparation: > 6000
 - ✓ J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (419)
 - ✓ J. of Chromatogr. B: Biomedical Applications (398)
 - ✓ J. of Chromatogr. A (378)
 - ✓ J. of Anal. Toxicology (247)
- ❑ Spectrométrie atomique (ICP): 62
 - ✓ J. of Anal. Atom. Spectrom. (11)
 - ✓ J. of AOAC International (8)
 - ✓ Anal. Chim. Acta (7)
 - ✓ Spectrochim. Acta - Part B (6)
 - ✓ Anal. Chem. (3)
 - ✓ Appl. Spectrosc. (3)

Qualités d'une définition

- ❑ Claire
- ❑ Brève
- ❑ Univoque
- ❑ Sans ambiguïté
- ❑ Universelle
- ❑ Pragmatique et facile à appliquer

Introduction

- ❑ **Détecter**: déceler l'existence de (Petit Robert), déceler l'existence de ce qui est à peine perceptible (Larousse).
- ❑ **Quantifier**: Attribuer une quantité à (Petit Robert), déterminer la quantité de (Larousse).
- ❑ Il y a clairement une différence entre les deux concepts.

Différents concepts

- ❑ La limite de détection (L_{dd}) sera la limite ultime d'un instrument ou d'une méthode, et pourra servir de seuil pour prouver la présence (ou l'absence) d'un analyte.
- ❑ La limite de quantification (L_{dq}) est la concentration à partir de laquelle on va pouvoir fournir un résultat fiable.
- ❑ Tout le problème va être de définir à quoi correspond le mot « fiable ».

Quelques acronymes

- ❑ Ldd: limite de détection
- ❑ Ldq: limite de quantification
- ❑ RSD: écart-type relatif (relative standard deviation)
- ❑ MDL: limite de détection de la méthode (method detection limit)
- ❑ ISO: International Organization for Standardization
- ❑ EPA: Environmental Protection Agency

Multiplicité des approches

- ❑ Chaque organisme (IUPAC, ISO, EPA, ICH, ASTM, DIN, AFNOR...) tient à sa propre approche, avec éventuellement des nomenclatures différentes: limite d'application, limite de dosabilité, limite de détermination...
- ❑ Il existe également une évolution vers une approche métrologique.

EPA terminology

- We use the word "limit" rather than "level" to indicate that the detection and quantitation concepts are directed at the lowest concentration or amount at which an analyte is determined to be present (detection) or may be measured (quantitation).

EPA terminology

- We use the term "quantitation" in this document because of its common usage among analytical chemists, even though we recognize that the term "quantification" (i.e., the act of quantifying) is the term listed in most dictionaries.

Problèmes pour la répétabilité et la reproductibilité

- ❑ Il existe des définitions très générales qui ne répondent pas nécessairement aux problèmes de clarté et d'universalité.
- ❑ En particulier le passage de répétabilité à reproductibilité est ambigu et dépend de la méthode et de l'instrument.

Répétabilité (VIM)

- ❑ Etroitesse de l'accord entre les résultats de mesurage successifs du même mesurande, mesurages effectués dans la totalité des mêmes conditions de mesure. Ces conditions sont appelées conditions de répétabilité.
- ❑ Les conditions de répétabilité comprennent: i) même mode opératoire de mesure; ii) même observateur; iii) même équipement de mesure, utilisé dans les mêmes conditions; iv) même lieu; et v) répétition durant une **courte période de temps**.

Répétabilité (ISO)

- ❑ Fidélité sous des conditions de répétabilité, c'est à dire des conditions où les résultats d'essais sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essai identique dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et **pendant un court intervalle de temps** (ISO 3534-1, ISO 5725-1).

Répétabilité et indépendance

- ❑ En principe, la notion de répétabilité implique des mesures **indépendantes**. On peut considérer que c'est le cas avec des injections en SAA-four. Est-ce le cas avec des répliques successives d'une même aspiration de solution en ICP?
- ❑ *Successive readings from an instrument do not give a valid measure of repeatability. Rather, they are solely an indication of the **instrumental repeatability**. (IUPAC 1995).*

Reproductibilité (VIM)

- Etroitesse de l'accord entre les résultats des mesurages du même mesurande, mesurages effectués en faisant varier les conditions de mesure. Pour qu'une expression de la reproductibilité soit valable, il est nécessaire de spécifier les conditions que l'on fait varier, qui peuvent comprendre: i) principe de mesure; ii) méthode de mesure; iii) observateur; iv) instrument de mesure; v) étalon de référence; vi) **lieu**; vii) conditions d'utilisation, et viii) temps.

Reproductibilité (ISO)

- Fidélité sous des conditions de reproductibilité, c'est à dire des conditions où les résultats d'essais sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essais identiques dans **différents laboratoires**, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents (ISO 3534-1, ISO 5725-1).

Reproductibilité

- ❑ Désaccord: intralaboratoire ou interlaboratoire?
- ❑ Au moins un des paramètres a été modifié **volontairement**:
 - ✓ à l'intérieur d'un laboratoire: opérateur, appareil, mise en solution, temps...
 - ✓ entre laboratoires
- ❑ On devrait toujours spécifier le type de reproductibilité.

Différents concepts de reproductibilité

même laboratoire, paramètre= temps	même labo, mais différents systèmes, opérateurs...	différents labos
Within-lab (intra- lab) reproducibility	Within-lab (intra- lab) reproducibility	Between-lab (inter- lab) reproducibility
Fidélité intermédiaire (Intermediate precision)		

Exemples de définition de la ldq

- **Quantification limits** are performance characteristics that mark the ability of a chemical measurement process to adequately ‘quantify’ an analyte.
- The level above which quantitative results may be obtained with a specified degree of confidence.
- The smallest concentration that can be determined with a defined coefficient of variation (relative standard deviation) using a given analytical procedure.
- (The content) equal to or greater than the lowest concentration point on the calibration curve.
- ❖ The limit of quantitation (LOQ) of the analytical method is the lowest level at which analyte can be reliably measured. Some common definitions of LOQ are three times the LOD and a level at which the %RSD of injection precision is less than 5%.
- ❖ The lowest concentration of an analyte that can be determined with acceptable precision (repeatability) and accuracy under the stated conditions of the test.
- ❖ The ‘**limit of quantitation**’ (LoQ) is strictly the lowest concentration of analyte that can be determined with an acceptable level of repeatability, precision and trueness.
- ❖ The lowest level that can be reliably achieved within the specified limits of precision and accuracy during routine laboratory operating conditions.
- ❖ The overall quantitation limit for IH method will be the smallest amount of analyte that can be quantitated by analytical method (with established detection limit) within the requirements of at least 80 % recovery and a precision of $\pm 20\%$ or better.
- Lowest amount of analyte quantitatively determined with (stated) uncertainty.

Différentes approches

- ❑ Seuil de répétabilité
 - ✓ En partant de la ldd (IUPAC)
 - ✓ En partant du RSD_{net} (Eurachem)
- ❑ Seuil de reproductibilité
 - ✓ En partant de la MDL (EPA)
 - ✓ RSD_{net} intra-laboratoire
- ❑ Seuil répétabilité/reprod. + seuil de justesse
- ❑ Utilisation de la droite d'étalonnage
- ❑ Seuil d'incertitude (Eurachem)

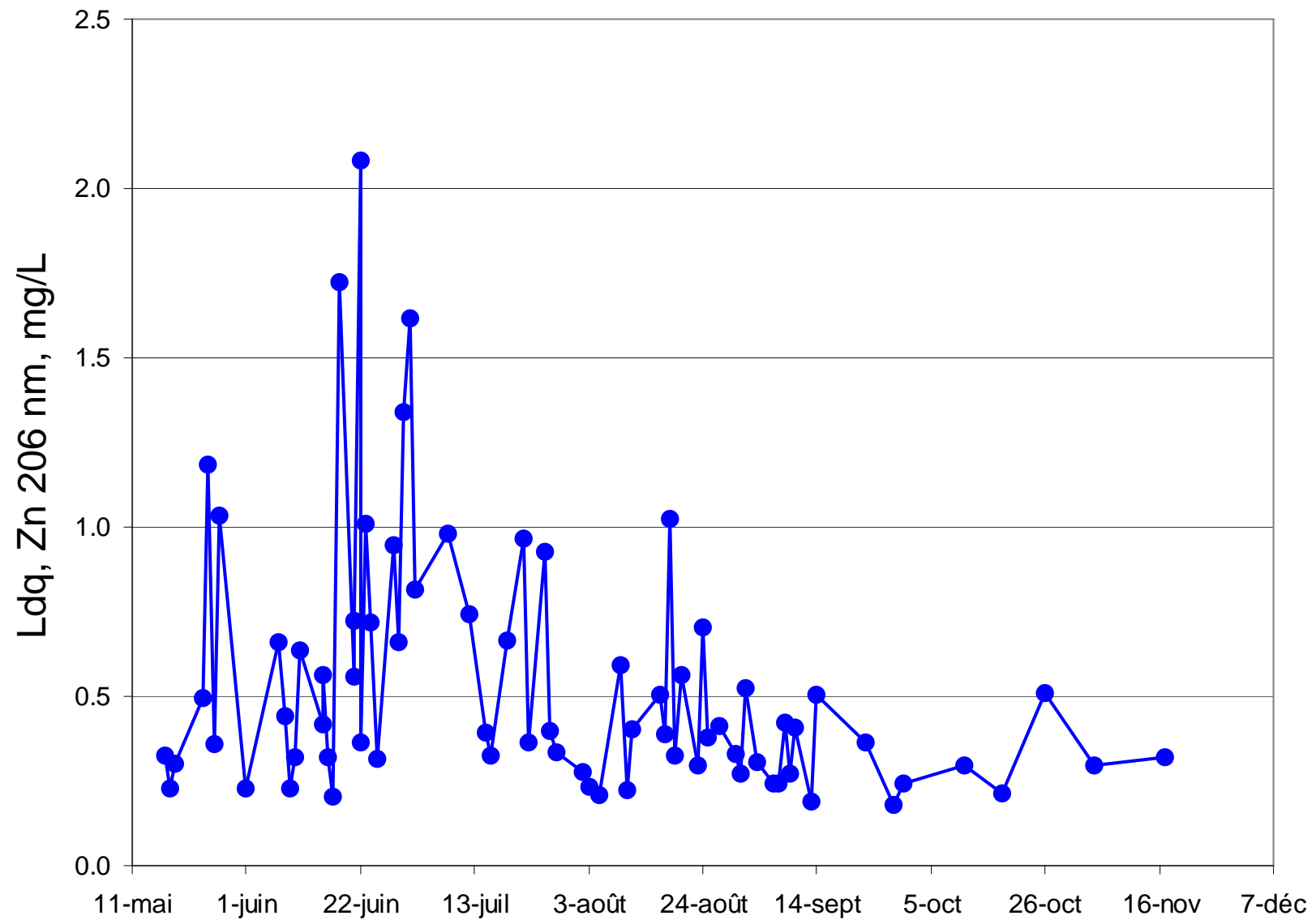
Différentes approches

- ❑ Seuil de répétabilité
 - ✓ En partant de la ldd (IUPAC)
 - ✓ En partant du RSD_{net} (Eurachem)
- ❑ Seuil de reproductibilité
 - ✓ En partant de la MDL (EPA)
 - ✓ RSD_{net} intra-laboratoire
- ❑ Seuil répétabilité/reprod. + seuil de justesse
- ❑ Utilisation de la droite d'étalonnage
- ❑ Seuil d'incertitude (Eurachem)

Historique: répétabilité du fond

- ❑ Historiquement, on trouve cette définition de la L_{dq} qui est la concentration correspondant à un signal égal à 10 fois l'écart-type des fluctuations du fond.
- ❑ Cette limite est à rapprocher de celle de la L_{dd} dont le signal correspond à 3 fois l'écart-type des fluctuations du fond.
- ❑ On aurait donc $L_{dq} = 3,3 \times L_{dd}$.
- ❑ Cette définition fait appel à la répétabilité du fond.
- ❑ C'est une mesure dans des conditions idéales, ce qui conduit à une **limite de quantification instrumentale**.

Ldq en fonction du temps



Différentes approches

- ❑ Seuil de répétabilité
 - ✓ En partant de la ldd (IUPAC)
 - ✓ En partant du RSD_{net} (Eurachem)
- ❑ Seuil de reproductibilité
 - ✓ En partant de la MDL (EPA)
 - ✓ RSD_{net} intra-laboratoire
- ❑ Seuil répétabilité/reprod. + seuil de justesse
- ❑ Utilisation de la droite d'étalonnage
- ❑ Seuil d'incertitude (Eurachem)

RSD du signal net, RSD_{net}

- ❑ H. Zitter and C. God, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 1971, **255**, 1.
- ❑ K. W. Boyer, W. Horwitz, R. Albert, *Anal. Chem.* 1985, **57**, 454-459.
- ❑ Analytical Methods Committee, *Analyst*, 1987, **112**, 199.
- ❑ Quality assurance of Chemical Measurements, J.K. Taylor, Lewis Publishers, Chelsea, chap. 9, 1987.
- ❑ Eurachem and Welac Guidance document n° WG2, 1993; Eurachem: *Accreditation for chemical laboratories*; Eurachem Secretariat: Teddington, U.K., 1993.
- ❑ L. Huber, *LC-GC International*, 96, # Feb. 1998.
- ❑ J. Vial, A. Jardy, *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 2672.

Etude du RSD_{net} dans le cas de l'ICP

- ❑ M. Thompson, *Analyst*, 1988, **113**, 1579.
- ❑ E. Poussel and J.M. Mermet, *Spectrochim. Acta*, **51B**, 75 (1996).
- ❑ M. Carré, S. Excoffier, J.M. Mermet, *Spectrochim. Acta*, **52B**, 2043 (1997).

Limite de quantification fondée sur un seuil de répétabilité

- Plus petite grandeur d'un analyte à examiner dans un échantillon pouvant être déterminée quantitativement dans des conditions expérimentales décrites dans la méthode avec une variabilité définie (coefficient de variation déterminé) (XP T 90-210).

Relation entre RSD_{net} , c_L et c

$$RSD_{net} = \left[\alpha^2 + \frac{2c_L^2}{k^2 c^2} \right]^{1/2}$$

En spectrométrie ICP, l'écart-type s_s est proportionnel au signal S , donc, $s_s = \alpha \cdot S_{net}$, avec α dans la gamme 0,002-0,02, or 0,2%-2%.

c : concentration; c_L : ldd; $k = 3$

A faibles concentrations, $RSD_{net} = f(a/c)$

RSD_{net} au niveau de la limite de détection

$$\text{RSD}_{\text{net}} = \left[\alpha^2 + \frac{2c_L^2}{k^2 c^2} \right]^{1/2}$$

Quand $c \rightarrow c_L$, $c_L/c \rightarrow 1$, et comme $\alpha^2 \ll 2/k^2$

$$\text{RSD}_{\text{net}} = \frac{\sqrt{2}}{k}$$

$$\text{RSD}_{\text{net}} = 47\% \text{ pour } k = 3$$

$$\text{RSD}_{\text{net}} = 70\% \text{ pour } k = 2$$

RSD_{net} au niveau de la limite de détection

- Il est à noter que très souvent il est indiqué un RSD_{net} de 33 % pour $k = 3$.
- Cela vient du fait qu'on ne prend pas en compte la correction de fond, qui introduit un terme en $\sqrt{2}$.

Relation entre la limite de détection (LDD) et la limite de quantification (LDQ)

- Si on prend la condition $k = 3$, on obtient:
 - ✓ RSD = 50% pour $c = c_L (3 \sigma)$
 - ✓ RSD* = 15% pour $c = 3.3 c_L (10 \sigma)$
 - ✓ RSD = 10% pour $c = 5 c_L (15 \sigma)$
 - ✓ RSD = 5% pour $c = 10 c_L (30 \sigma)$
- Très souvent, la LDQ est définie pour 10σ , ce qui donne un RSD_{net} de 15%. Un RSD_{net} de 10 % correspond à 15σ , et 5% à 30σ (soit 10 fois la ldd)

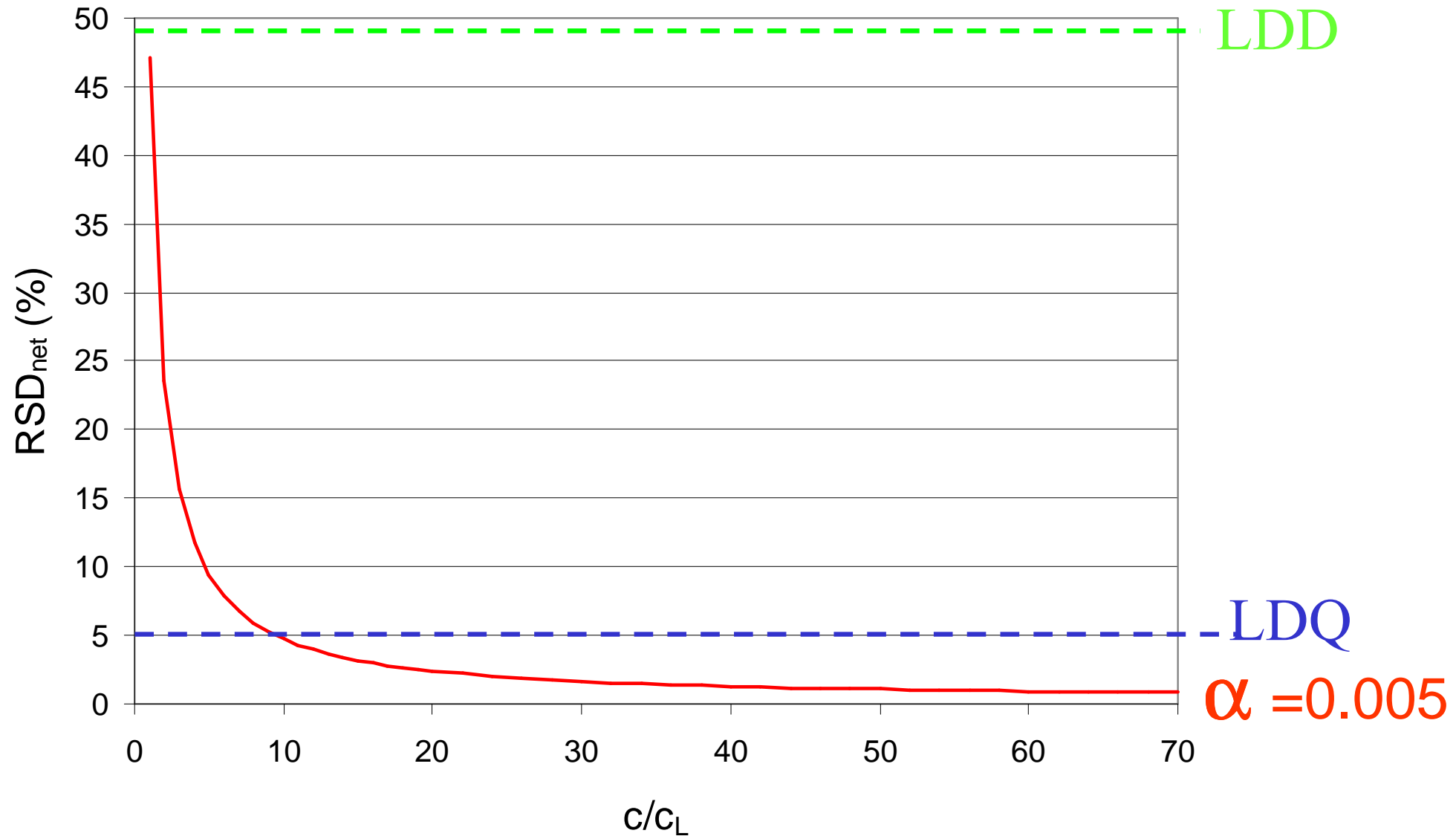
Relation entre la limite de détection (LDD) et la limite de quantification (LDQ)

- ❑ Quand on fonde la ldq sur un seuil de répétabilité, il existe donc une relation directe entre la LDD et la LDQ.
- ❑ Toute amélioration de la LDD correspond à une même amélioration de la LDQ.

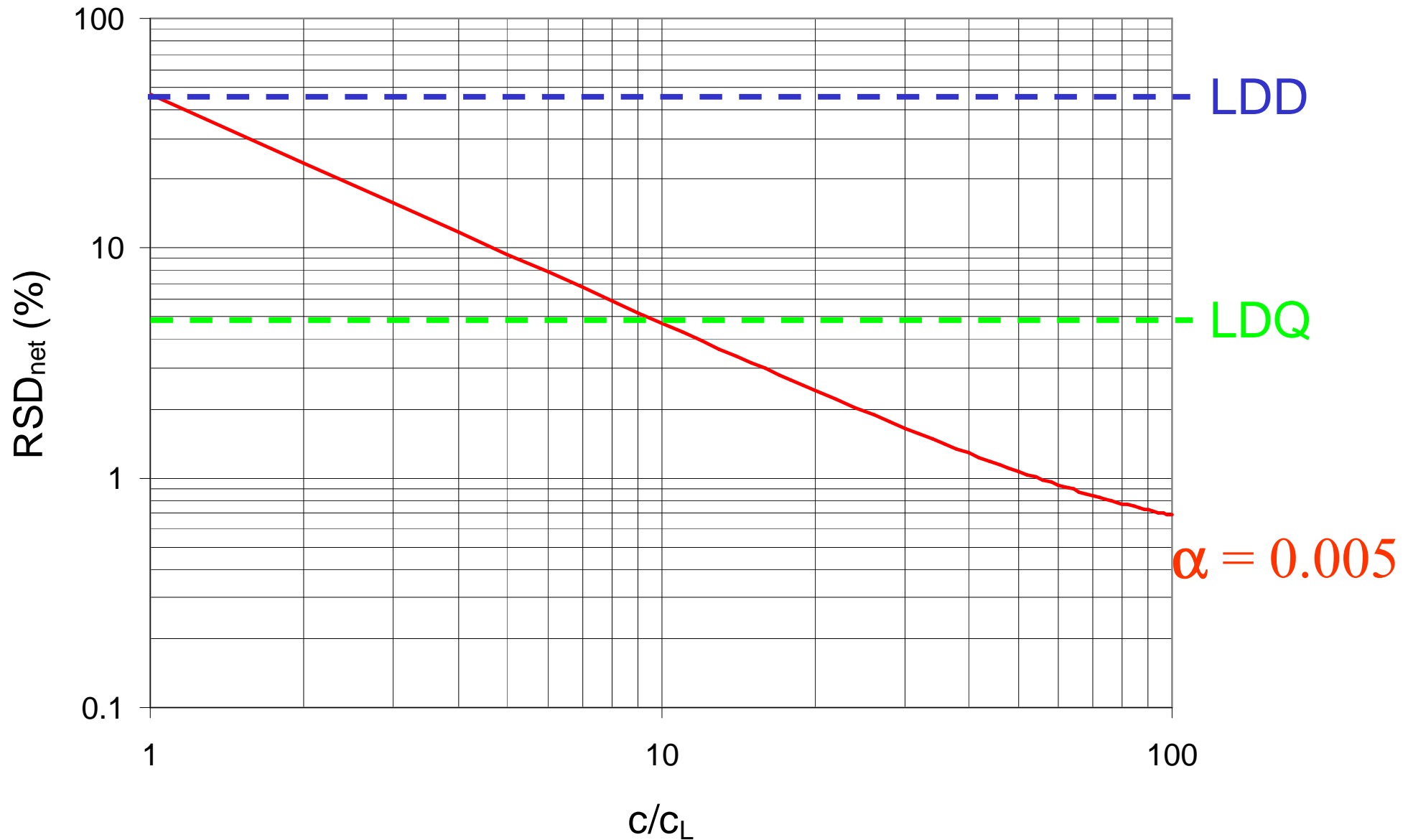
Ldd et ldq en fonction du RSD_{net}

- ❑ Il suffit donc de tracer le RSD_{net} en fonction de la concentration pour des concentrations entre la ldd (si possible légèrement inférieure) et 20-20 fois la ldd.
- ❑ Problèmes des répliques: dépendantes ou indépendantes
- ❑ La ldd correspondra à la concentration donnant un $RSD_{net} = 50\%$ pour $k = 3$.
- ❑ La ldq sera choisie en fonction du problème analytique ($RSD_{net} = 5, 10, 20\%...$)

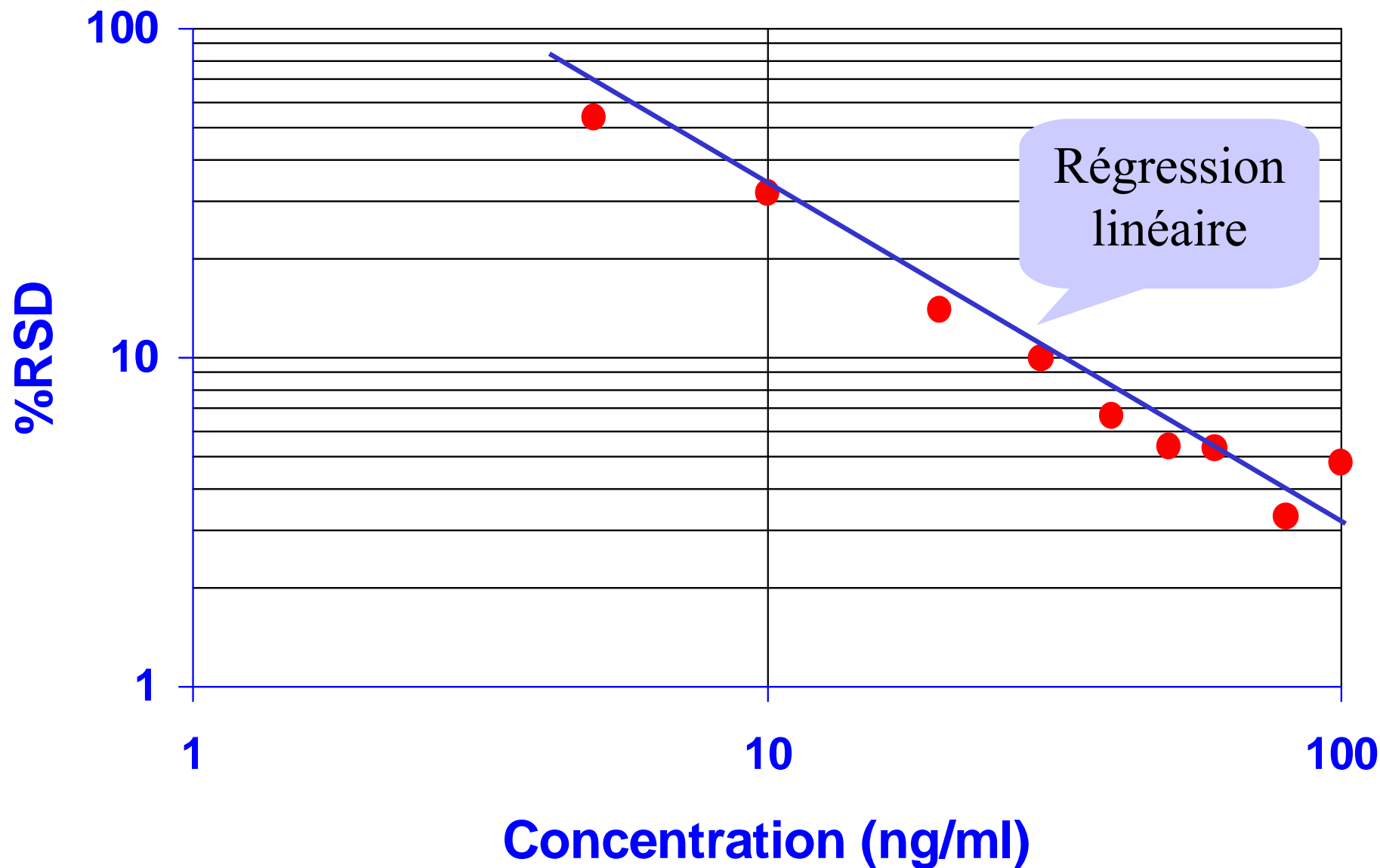
Ecart-type relatif du signal net en fonction de la concentration



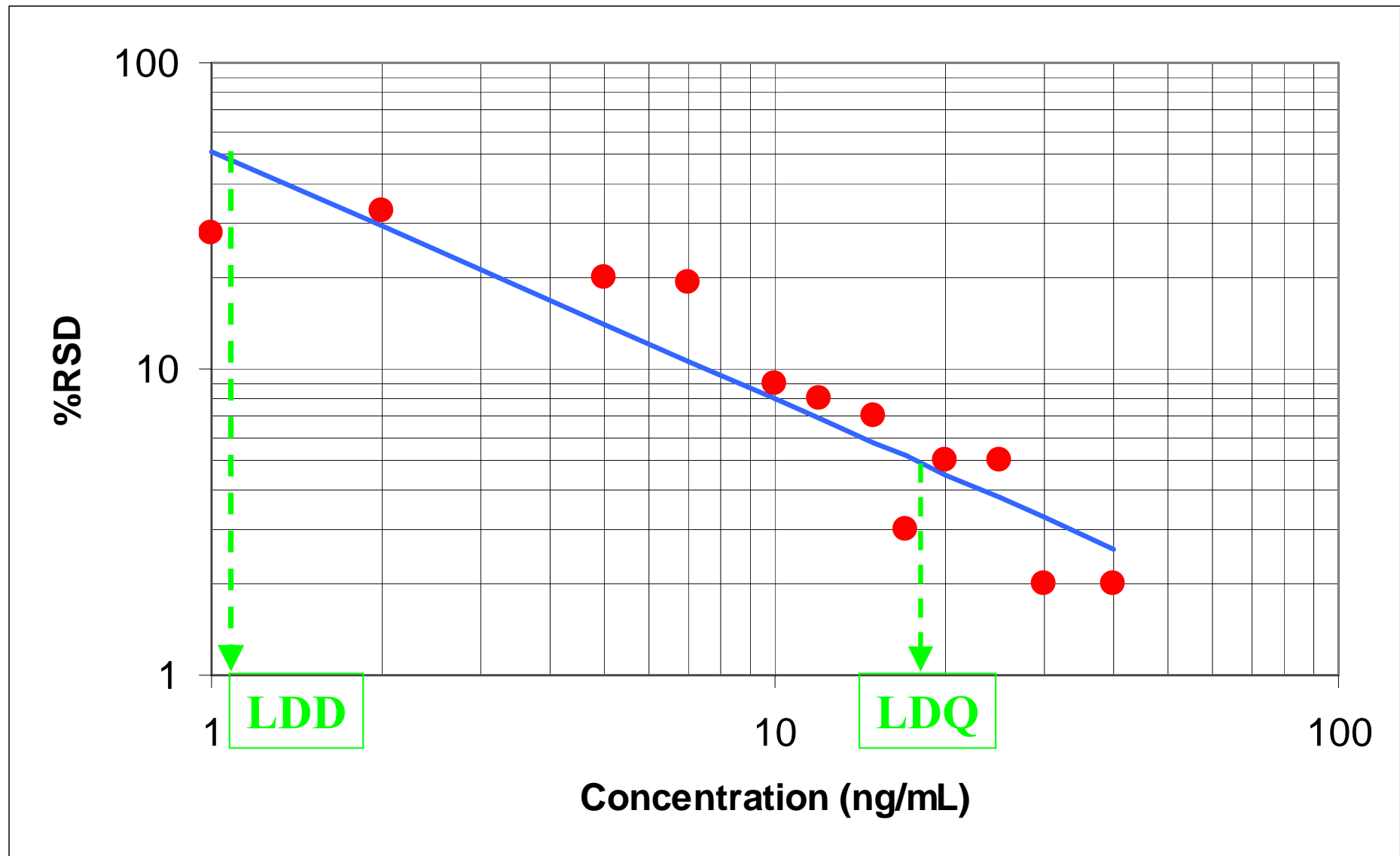
Ecart-type relatif du signal net en fonction de la concentration (échelles log-log)



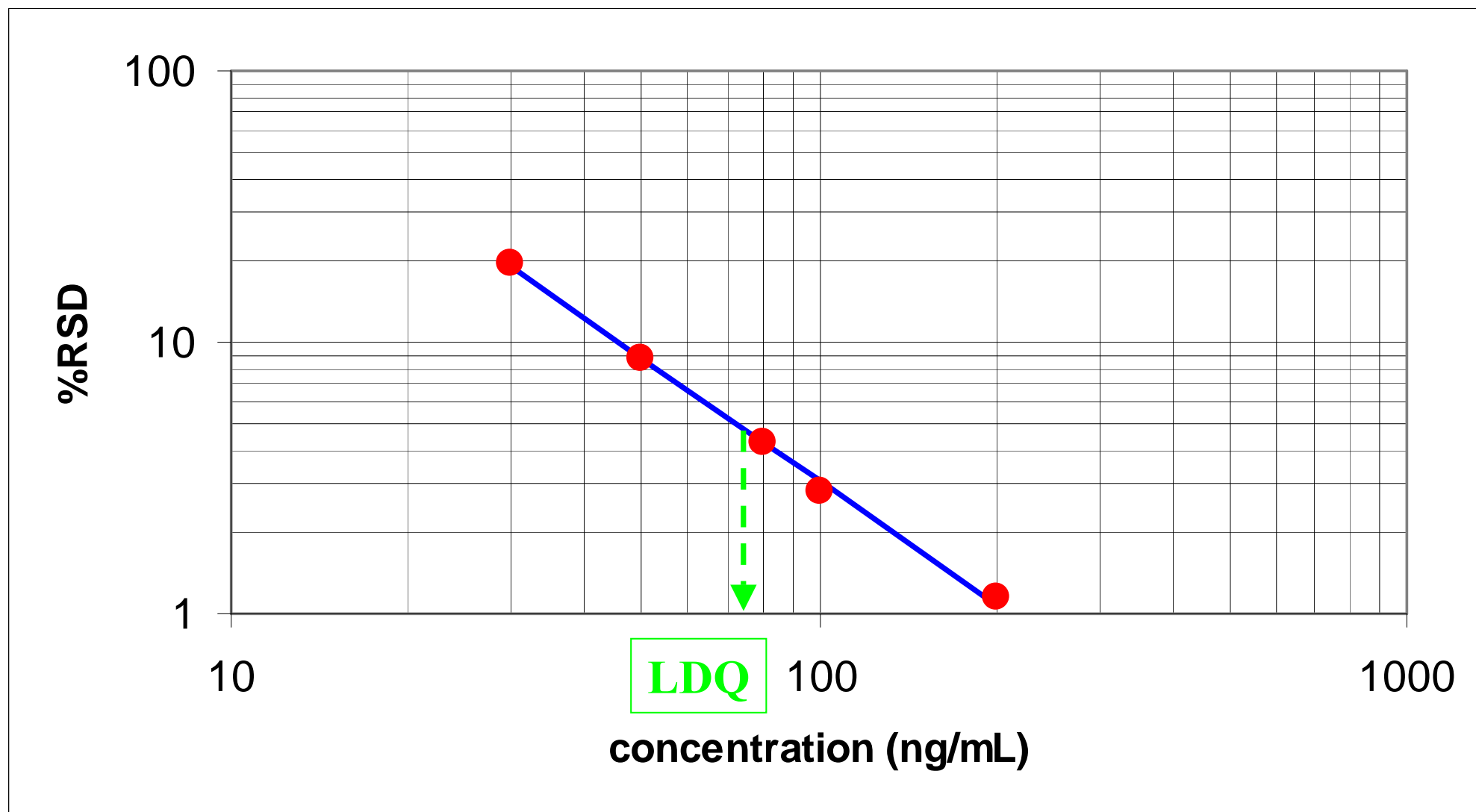
RSD_{net} de Al en fonction de la concentration (JY 38)



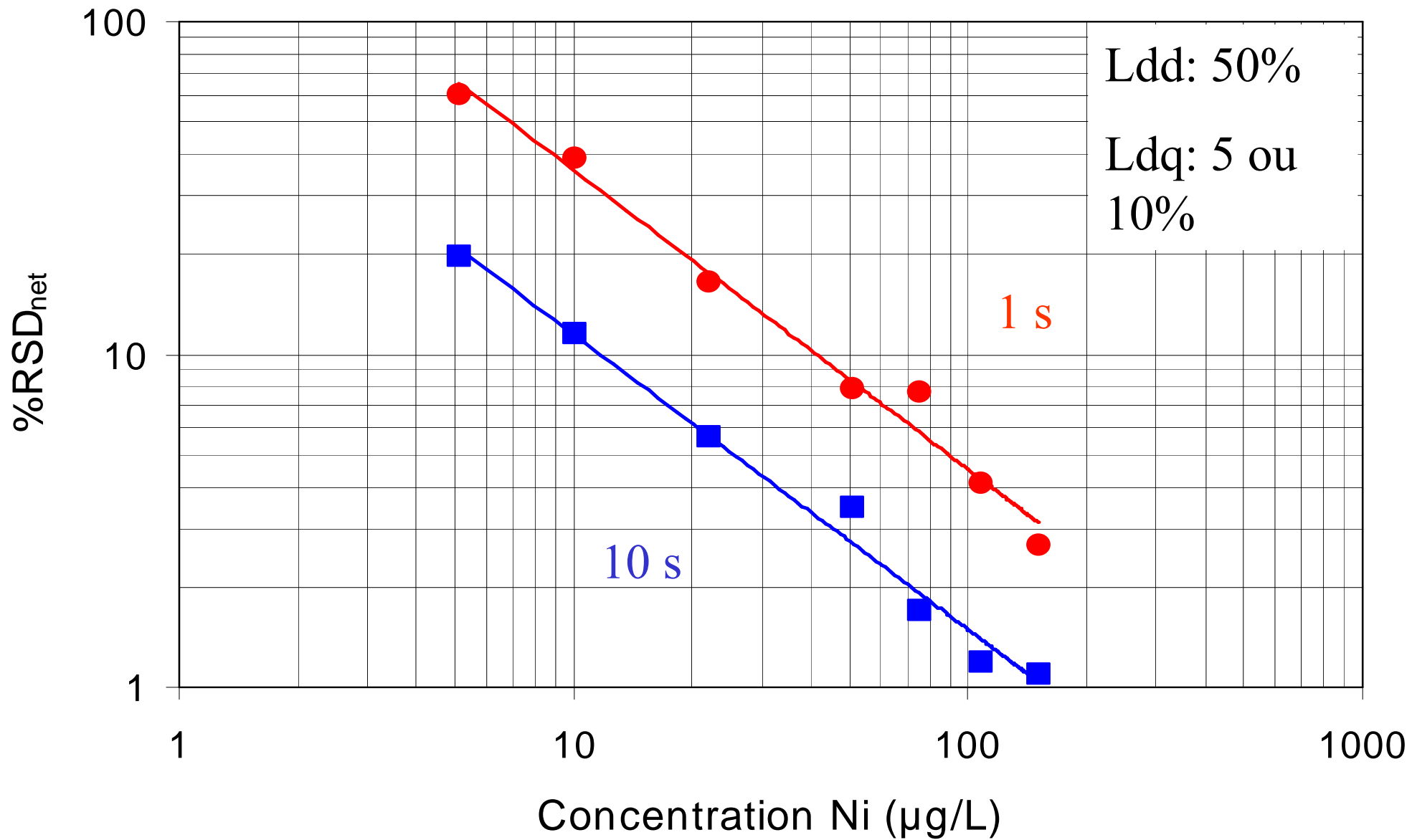
RSD_{net} de Cu 324 nm en fonction de la concentration (Maxim)



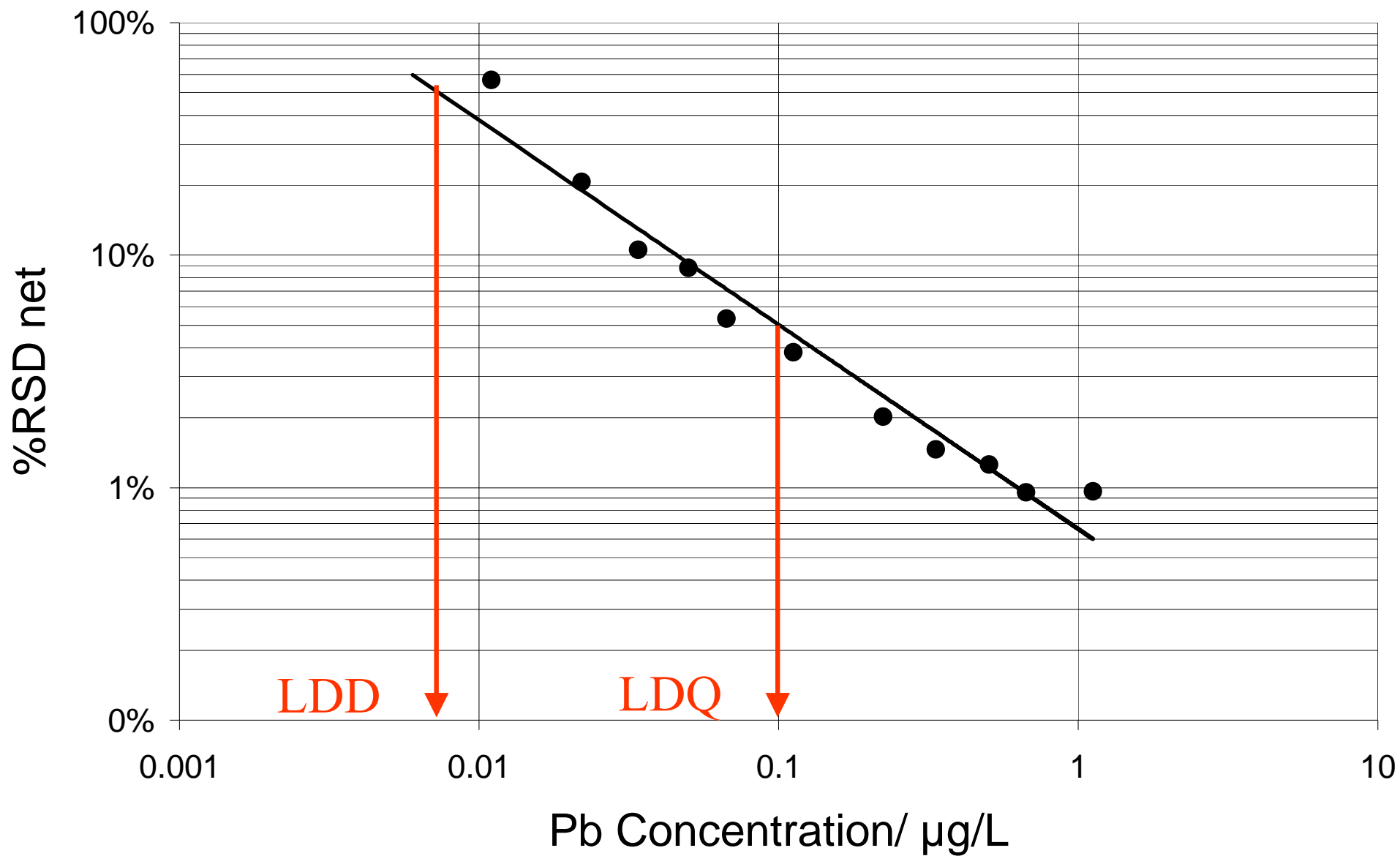
RSD_{net} de Ni 231 nm en fonction de la concentration (Optima, axial)



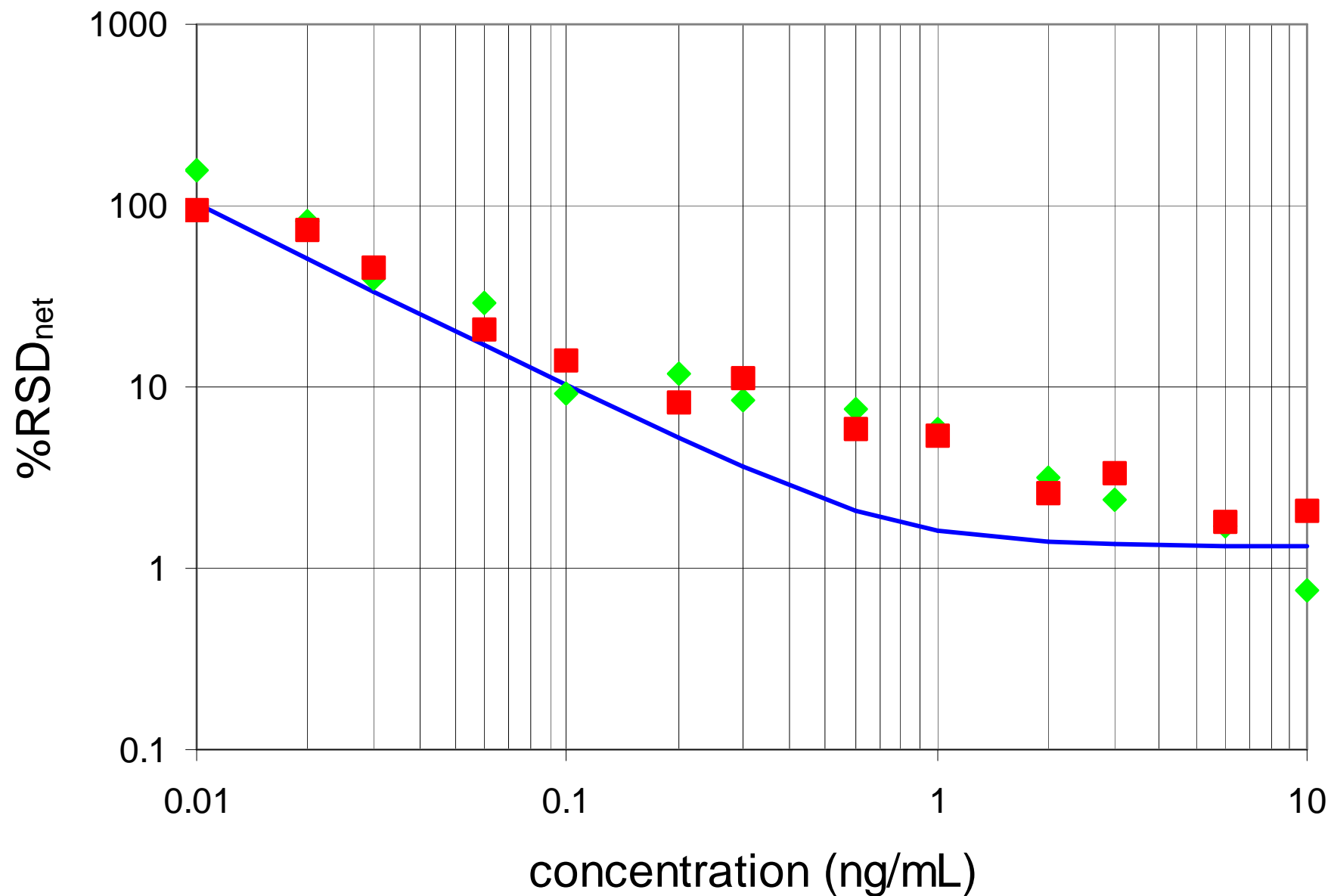
RSD_{net}: influence temps d'intégration



Pb dans sang, ICP-MS (PE 6100)



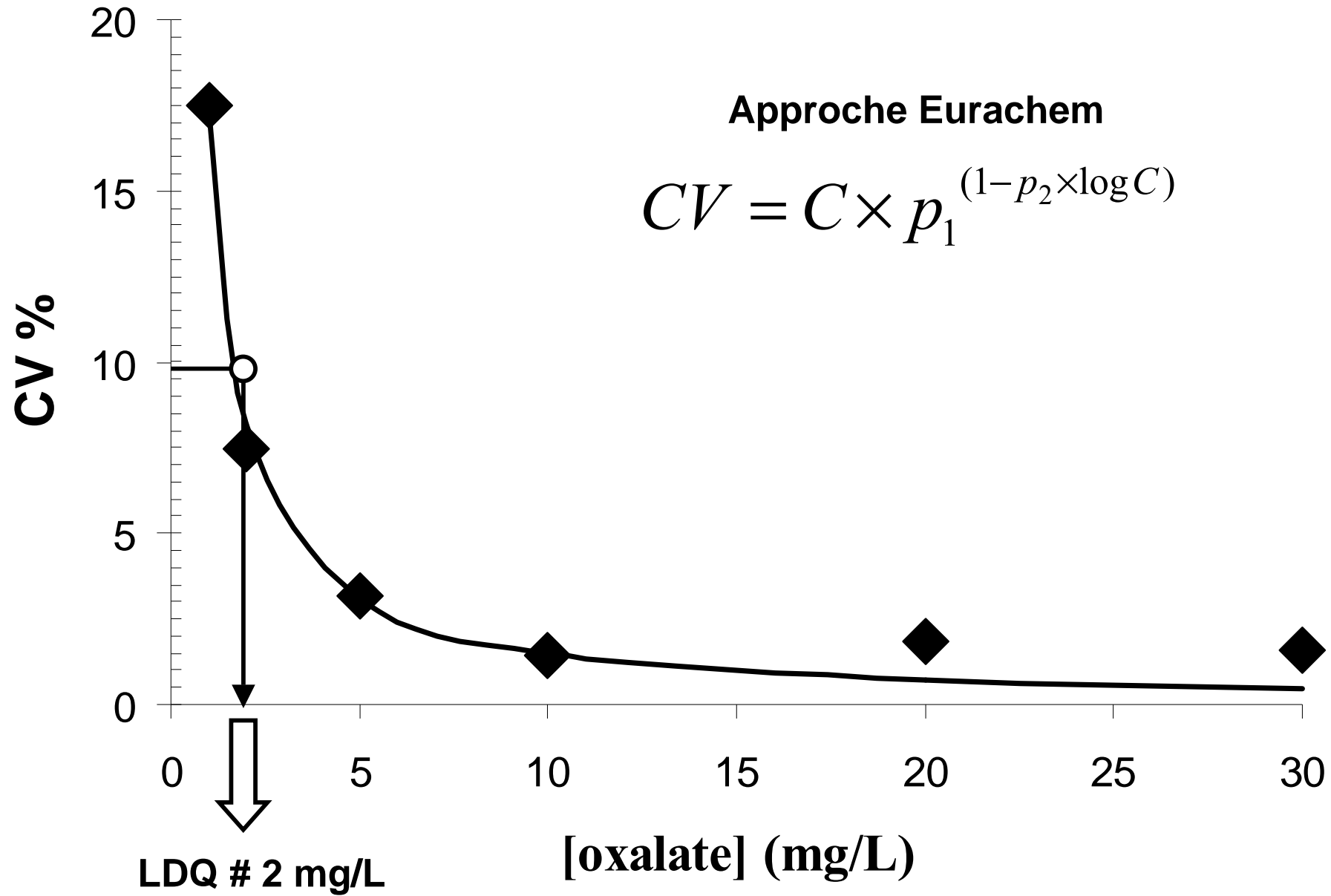
RSD_{net} en ICP-MS (Elan 5000, ⁹⁵Mo)



Remarque sur l'approche RSD_{net}

- ❑ Elle nécessite de travailler réellement à basses concentrations.
- ❑ Elle prend en compte toute une série de concentrations et non pas une seule, comme pour la ldd.
- ❑ Elle permet de déterminer dans la même expérience la limite de détection et la limite de quantification.
- ❑ Elle est largement utilisée dans d'autres techniques.
- ❑ C'est la seule approche qui prenne en compte une possible corrélation temporelle entre la mesure du signal et celle du fond.

Limite de quantification



Différentes approches

- ❑ Seuil de répétabilité
 - ✓ En partant de la ldd (IUPAC)
 - ✓ En partant du RSD_{net} (Eurachem)
- ❑ Seuil de reproductibilité
 - ✓ **En partant de la MDL (EPA)**
 - ✓ RSD_{net} intra-laboratoire
- ❑ Seuil répétabilité/reprod. + seuil de justesse
- ❑ Utilisation de la droite d'étalonnage
- ❑ Seuil d'incertitude (Eurachem)

EPA: Revised Assessment of Detection and Quantitation Approaches October 2004

- ❑ EPA Method 200.7 (metals by ICP/AES)

Limite de détection de la méthode (method detection limit, MDL)

- ❑ La MDL est la concentration minimum d'un analyte qui, dans une matrice donnée et avec une méthode spécifique, a une probabilité de 99 % d'être identifiée qualitativement ou quantitativement, comme étant plus grande que zéro.
- ❑ La MDL n'implique pas justesse ou fidélité.
- ❑ La MDL est fondée sur des ajouts pour pallier l'éventuelle absence de fond avec certaines méthodes (discrimination, seuil...), donc de fluctuations.

Limite de détection de la méthode

- ❑ On **suppose** que l'amplitude de l'écart-type du signal est très similaire à celui du blanc, lorsqu'on est proche de la Ldd (discutable).
- ❑ Au moins 7 répliques d'ajout doivent être utilisées. Les ajouts sont préparés à 1-5 fois la MDL supposée à partir d'un blanc de réactifs.
- ❑ Les ajouts doivent subir toutes les étapes de la méthode analytique.

Limite de détection de la méthode

- A partir des mesures des n ajouts, un écart-type s , exprimé en concentration, est obtenu.
- Avec la valeur t du coefficient de Student pour $n-1$ degrés de liberté et un taux de confiance $1-\alpha$, la MDL est:

$$\text{MDL} = s \times t_{(n-1, 1-\alpha)}$$

$t = 3.14$ pour $n = 7$ and 99%

Limite de détection de la méthode

- ❑ La MDL produirait seulement 1 % de faux positifs.
- ❑ C'est une limite réaliste, car les ajouts sont à des concentrations très proches des limites de détection, et plusieurs répliques sont utilisées tout au long de la méthode analytique.
- ❑ Les contaminations potentielles sont ainsi prises en compte, à condition qu'elles restent faibles par rapport à l'ajout.

Ldq: niveau minimum (Minimum level, ML)

- ❑ A partir de la MDL, on peut déduire un niveau minimum, ML, qui est alors le point le plus bas de la droite d'étalonnage (voir EPA 200.7).
- ❑ $ML = 3.18 \times MDL$.
- ❑ La valeur est ensuite arrondie au plus près de 2, 5, ou 10×10^n , où n est un entier.

Différentes approches

- ❑ Seuil de répétabilité
 - ✓ En partant de la ldd (IUPAC)
 - ✓ En partant du RSD_{net} (Eurachem)
- ❑ Seuil de reproductibilité
 - ✓ En partant de la MDL (EPA)
 - ✓ RSD_{net} intra-laboratoire
- ❑ Seuil répétabilité/reprod. + seuil de justesse
- ❑ Utilisation de la droite d'étalonnage
- ❑ Seuil d'incertitude (Eurachem)

ICP-MS: Pb dans sang (repro sur 5 jours)

			<i>reproductibilité</i>	<i>biais</i>
0.056 µg/L	sans pondération	sans EI	113%	-30%
		avec EI	20%	20%
	avec pondération	sans EI	12%	-1%
		avec EI	9%	1%
0.558 µg/L	sans pondération	sans EI	2%	-3%
		avec EI	1%	-1%
	avec pondération	sans EI	3%	0%
		avec EI	1%	0%

Différentes approches

- ❑ Seuil de répétabilité
 - ✓ En partant de la ldd (IUPAC)
 - ✓ En partant du RSD_{net} (Eurachem)
- ❑ Seuil de reproductibilité
 - ✓ En partant de la MDL (EPA)
 - ✓ RSD_{net} intra-laboratoire
- ❑ Seuil répétabilité/reprod. + seuil de justesse
- ❑ **Utilisation de la droite d'étalonnage**
- ❑ Seuil d'incertitude (Eurachem)

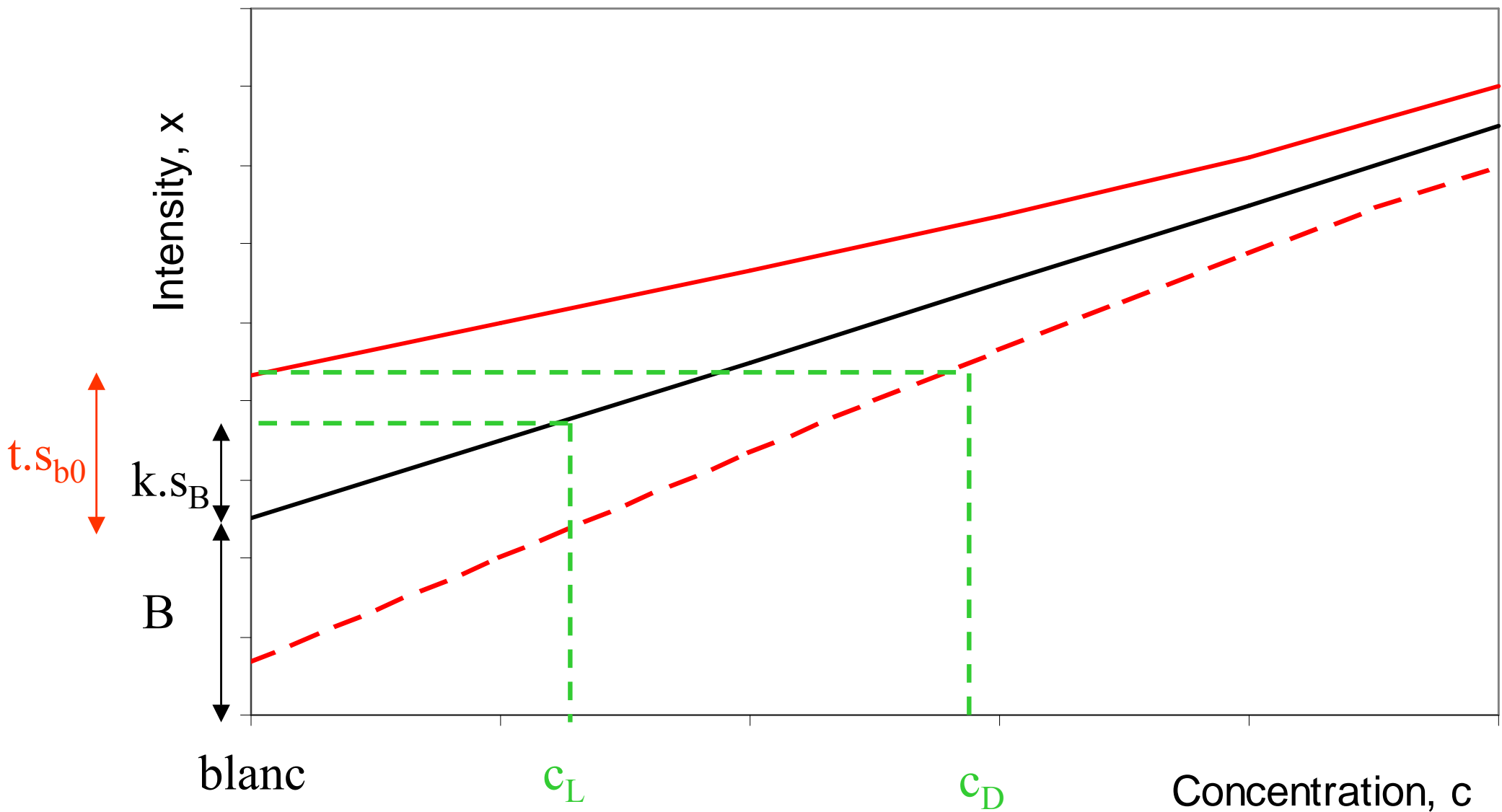
Limite de quantification fondée sur les bandes de prédiction

- ❑ A. Hubaux and G. Vos, *Anal. Chem.*, **36**, 849 (1970).
- ❑ L. Oppenheimer, T.P. Capizzi, R.M. Weppelman, H. Mehta, *Anal. Chem.*, **55**, 638 (1983).

Paramètres d'une droite d'étalonnage

- ❑ x_i : valeur de la concentration d'une solution étalon,
- ❑ y_i : intensité du signal correspondant à une concentration x_i ,
- ❑ n : nombre de concentrations x_i utilisées pour l'étalonnage,
- ❑ p : nombre de répliques pour la détermination de chaque y_i ,
- ❑ x_m : moyenne (centroïde) des concentrations,
- ❑ y_m : moyenne (centroïde) des intensités,
- ❑ b_0 : ordonnée à l'origine de la droite d'étalonnage,
- ❑ b_1 : pente de la droite d'étalonnage (correspondant à la sensibilité de la méthode),
- ❑ t : coefficient de Student,
- ❑ $s_{y/x}$: erreur-type d'estimation de y sur x ,
- ❑ s : incertitude.

Utilisation des bandes de prédiction



Limite de quantification fondée sur les bandes de prédiction

- ❑ C'est la seule méthode qui prenne réellement en compte la droite d'étalonnage et ses bandes de prédiction.
- ❑ Cela oblige à élaborer la droite d'étalonnage à des faibles concentrations.
- ❑ La limite de quantification va dépendre de:
 - ✓ nombre et position des étalons
 - ✓ utilisation d'une pondération ou non.
- ❑ Comparaison de $k \cdot s_B$ avec $t \cdot s_{b0}$.

Limite de quantification fondée sur les bandes de prédiction

$$\text{LDD}_{band} = \frac{t}{b_1} \left[s_{b_0} + s_{y/x} \left(\frac{x_m^2}{\sum (x_i - x_m)^2} + \frac{1}{p} + \frac{1}{n} \right)^{1/2} \right]$$

Une bonne approximation est:

$$\text{LDD}_{band} = \frac{2 \cdot t \cdot s_{b_0}}{b_1}$$

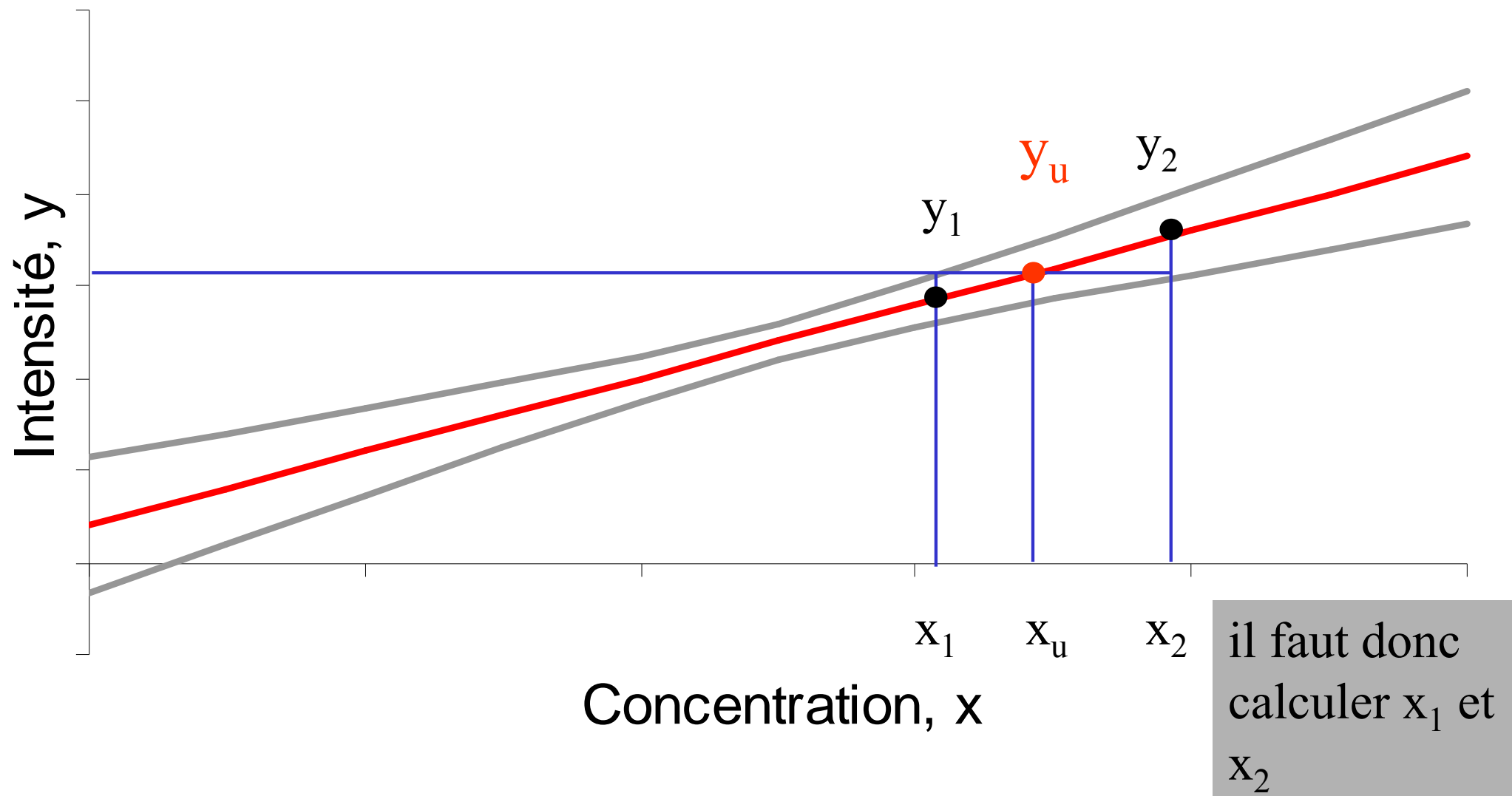
Différentes approches

- ❑ Seuil de répétabilité
 - ✓ En partant de la ldd (IUPAC)
 - ✓ En partant du RSD_{net} (Eurachem)
- ❑ Seuil de reproductibilité
 - ✓ En partant de la MDL (EPA)
 - ✓ RSD_{net} intra-laboratoire
- ❑ Seuil répétabilité/reprod. + seuil de justesse
- ❑ Utilisation de la droite d'étalonnage
- ❑ **Seuil d'incertitude (Eurachem)**

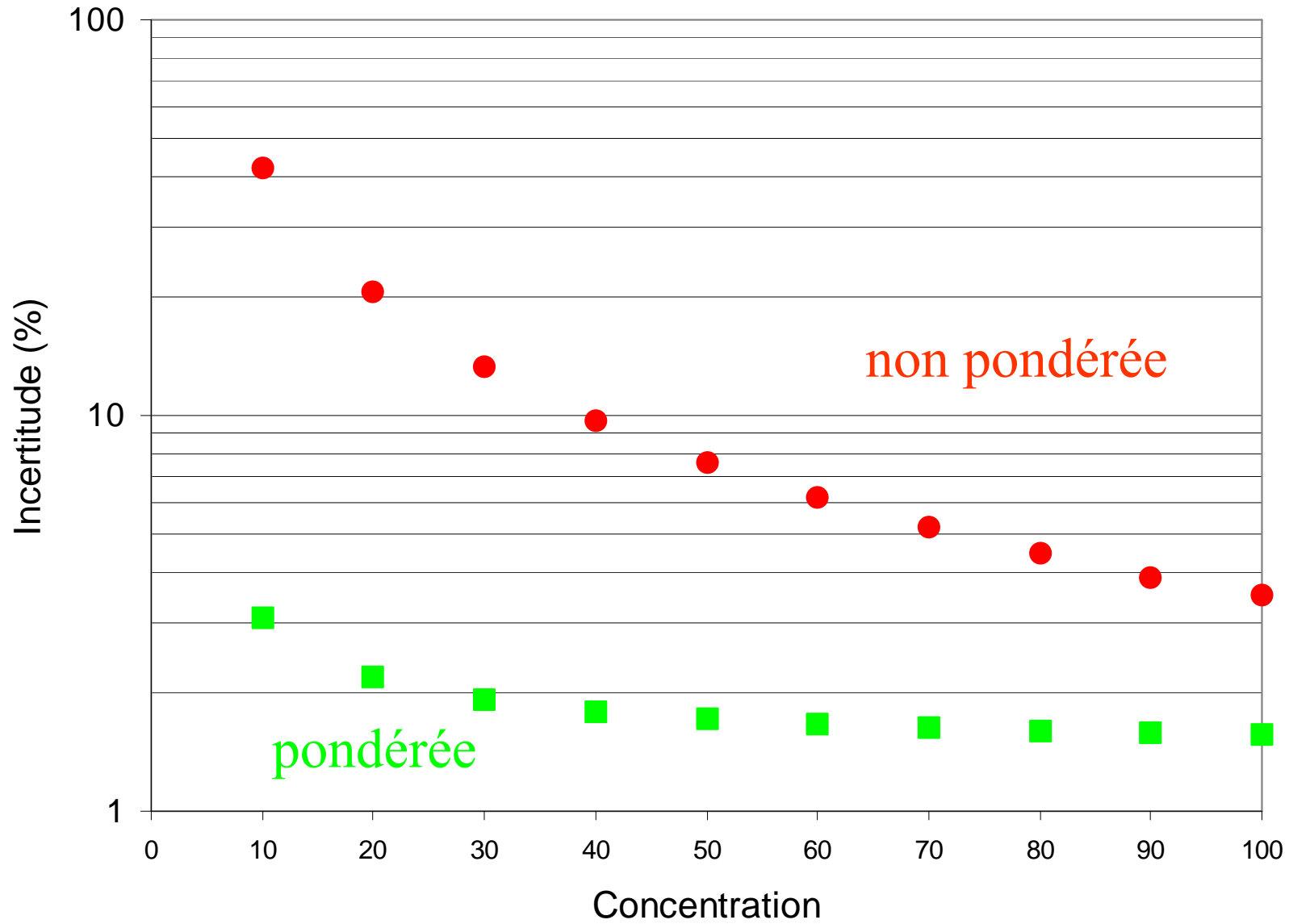
Incertitude

- ❑ En toute rigueur, il faudrait établir un bilan d'incertitude en fonction de la concentration, en particulier en tendant vers la ldd.
- ❑ En régression non pondérée, la procédure d'étalonnage est certainement la principale cause d'incertitude sur la concentration.
- ❑ Dans ce cas, on peut donc avoir une estimation plausible de la variation de l'incertitude en considérant celle due à l'étalonnage.

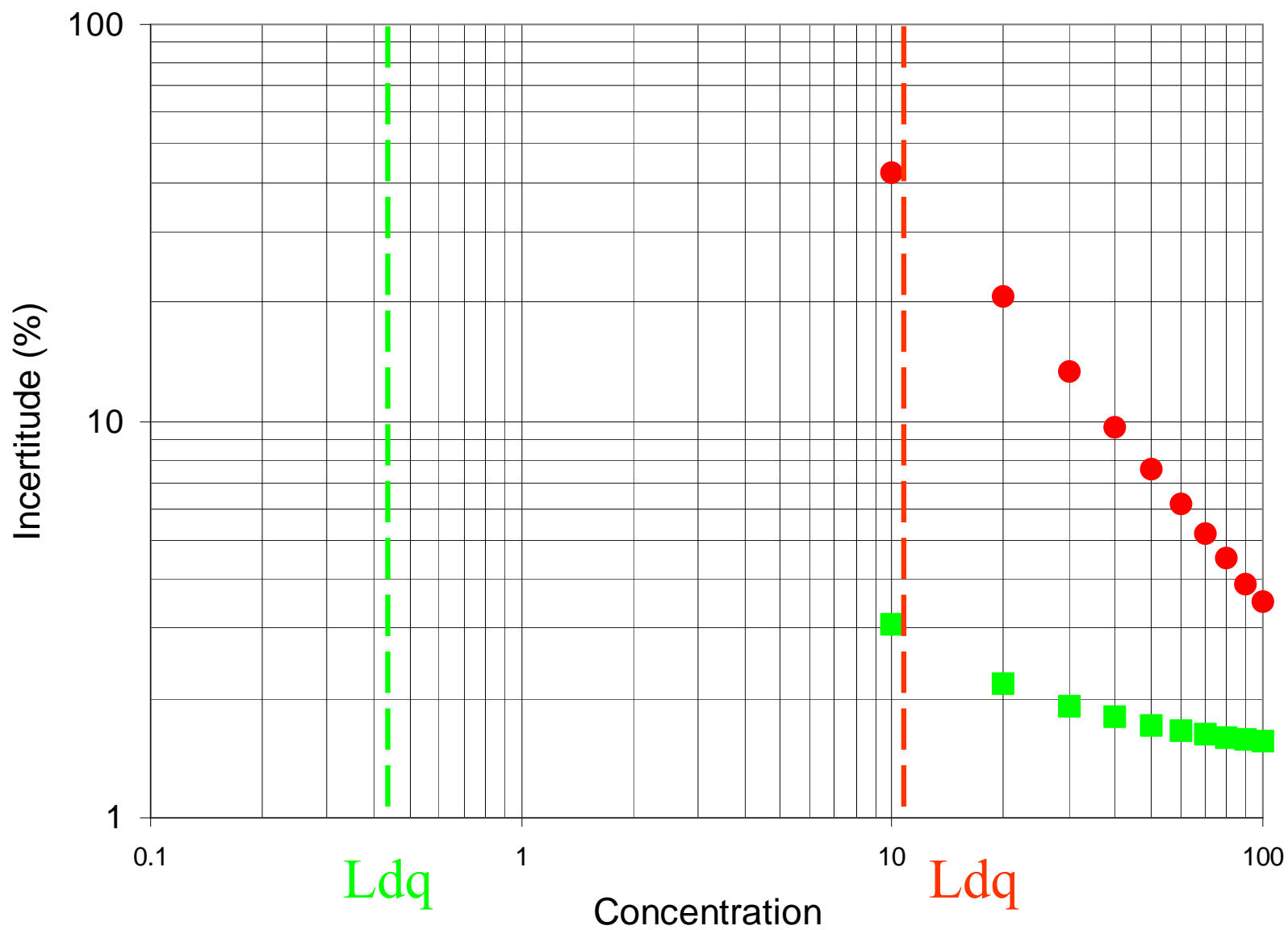
Incertitude sur x_u à partir des intervalles de prédiction



Incertitude = f(c)



Incertitude = f(c) et ldq (bandes de prédiction)



Comparaisons



Ldq instrum.	Facile Limite ultime	Problème évaluation s Repro?
RSD_{net}	Conditions réelles Plusieurs concentrations	Long
ML	Même si blanc = 0 Réaliste, contamination	s varie avec c Très long
Repro signal net	Conditions réelles Plusieurs expériences	Très long
Etalonnage	Tient compte de la droite	Dépend des étalons, pondération
Incertitude	But ultime de l'analyse	Difficile si bilan global

Conclusions

- ❑ Le concept de ldq ne répond à aucun critère en ce qui concerne clarté et absence d'ambiguïté.
- ❑ Quant à la facilité d'application (!!!!).
- ❑ De façon pratique, la majorité des publications se réfère à $10\ s$ (3.3 ldd), sans aucune justification.
- ❑ Bien que rejetée par l'EPA, et sans compter la complexité de son évaluation, la ldq fondée sur l'incertitude devrait être la définition la plus réaliste.
- ❑ Besoin d'un grand nombre d'expériences pour comparer toutes ces définitions.