



Marie Lafargue, Marie-Philippe Seiller*

Les matériaux de référence : définitions, disponibilité, sélection et utilisation

RÉSUMÉ

La fourniture de simples résultats d'analyse, sans aucune information sur leur qualité et leur traçabilité, n'est plus jugée satisfaisante : les laboratoires doivent démontrer la fiabilité de leurs mesures, depuis la phase d'échantillonnage jusqu'au résultat final figurant sur le rapport d'analyse. Pour cela divers outils sont à leur disposition, dont l'utilisation de matériaux de référence (MR). Cette utilisation suppose une bonne connaissance des différentes définitions des MR, certifiés ou non, pour sélectionner le matériau le mieux adapté. Des documents normatifs définissant les MR et des banques de données sont disponibles pour aider les utilisateurs à faire leur choix. Avec ces MR, les laboratoires vont pouvoir dans le cadre de leur système d'assurance qualité, notamment pour l'accréditation Cofrac, étalonner leurs équipements de mesure, valider leurs méthodes d'analyse, établir des cartes de contrôle pour suivre la stabilité de leurs systèmes de mesure et évaluer leurs incertitudes de mesure.

MOTS CLÉS

Matériaux de référence, traçabilité, contrôle qualité.

Reference materials : definitions, availability, selection and utilization

SUMMARY

Analysis results without information about their quality and traceability is not satisfying : laboratories must demonstrate the reliability of their measurements, from the sampling until the final result in the analysis report. For that, various ways are available, especially the use of reference materials (RM). This use assumes a well understanding of the different definitions of RM, certified or not, to select the most suited material. Standard documents defining the RM and data bases are available to help the users. As part of the assurance quality system and for the Cofrac accreditation, laboratories can with the RM : calibrate their equipments, validate the analysis methods, built quality charts to check the stability of the measurement systems and assess the measurements uncertainties.

KEY WORDS

Reference materials, traceability, quality control.

I – Introduction

Les laboratoires d'analyse sont soumis à un nombre croissant d'exigences touchant la fiabilité des

résultats qu'ils fournissent aux prescripteurs d'analyses. Ceci est particulièrement vrai dans le domaine agroalimentaire où la demande des consommateurs, confrontés à diverses « crises », est

* Bureau interprofessionnel d'études analytiques (BIPEA) – 6/14, avenue Louis Roche – 92230 Gennevilliers – Tél. : 01 47 33 54 60 – Fax : 01 40 86 92 59
– E-mail : mlafargue@bipea.org – www.bipea.org



venue s'ajouter à la demande industrielle. La réponse des laboratoires a été de se doter de systèmes d'assurance qualité reconnus, tel que la démarche d'accréditation qui est coordonnée en France par le Comité Français d'Accréditation (COFRAC).

La fourniture de simples résultats, sans aucune information sur leur qualité ou leur traçabilité, n'est plus jugée satisfaisante : les laboratoires doivent démontrer la fiabilité de leurs mesures, depuis la phase d'échantillonnage jusqu'au résultat final figurant sur le rapport d'analyse.

Parmi les divers outils permettant au laboratoire de démontrer et/ou de contrôler la fiabilité de leurs résultats, l'utilisation de matériaux de référence et la participation à des essais d'aptitude ont un rôle bien spécifique puisqu'ils touchent à la justesse et à la traçabilité. La première solution nécessite l'existence de matériaux de référence adaptés aux méthodes d'analyse à suivre, aux analytes et aux matrices concernées.

II – Définitions

Dans la littérature et dans les documents normatifs, on retrouve un grand nombre de termes pour qualifier un matériau de référence et donc également un grand nombre de définitions. Le guide ISO datant de 1992 (1) a défini et distingué les matériaux de référence (MR) et les matériaux de référence certifiés (MRC) de la façon suivante.

- Un Matériau de référence (MR) est un matériau ou substance dont une (ou plusieurs) valeur(s) de la (des) propriété(s) est (sont) suffisamment homogène(s) et bien définie(s) pour permettre de l'utiliser pour l'étalonnage d'un appareil, l'évaluation d'une méthode de mesure ou l'attribution de valeurs aux matériaux.

- Un Matériau de référence certifié (MRC) est un MR, accompagné d'un certificat, dont une ou plusieurs valeur(s) de la ou (des) propriété(s) est (sont) certifiée(s) par une procédure qui établit son raccordement à une réalisation exacte de l'unité dans laquelle chaque valeur certifiée est accompagnée d'une incertitude à un niveau de confiance indiqué.

Des nombreuses classifications des MR ont été effectués, en fonction de différents critères et des exemples sont repris ci-dessous.

Le guide de l'AFNOR (2), spécifique au domaine de l'agroalimentaire, distingue les matériaux de référence en trois catégories en fonction de la façon dont les valeurs de référence ont été établies :

- Matériaux de référence certifiés (MRC) : matériau de référence dont les valeurs certifiées ont été établies au cours de campagnes de certification incluant des études inter-laboratoires, des tests de stabilité et d'homogénéité, accompagné d'un certificat délivré par un organisme reconnu.

- Matériaux de référence externes (MRE) : matériau de référence dont les valeurs de consensus ont été déterminées à la suite d'étude inter-laboratoires, comme les essais d'inter-comparaisons organisés pour évaluer les performances des laboratoires.

- Matériaux de référence internes (MRI) : matériau de référence dont les valeurs de référence sont attribuées par l'utilisateur par comparaison aux valeurs certifiées d'un matériau de référence, ou par ajout d'une quantité connue de l'analyte à la matrice exempte de cet analyte.

Dans un ouvrage récent, M. Quevauviller propose une classification des matériaux de référence en 4 catégories, qui se distinguent notamment par leur utilisation (3) :

- Substances ou solutions pures : utilisées pour l'étalonnage et/ou l'identification de substances, caractérisés (MR) ou certifiés (MRC) par l'établissement de la quantité maximale, en fractions de masse, des impuretés restantes dans la substance purifiée et/ou de sa composition isotopique; avec également l'évaluation de la stoechiométrie.

- Matériaux à composition connue : destinés à l'étalonnage de certains types d'instruments de mesure préparés sur une base gravimétrique par un laboratoire spécialisé; la certification est basée sur une procédure de pesée après évaluation de la pureté et de la stoechiométrie.

- Matériaux de référence de matrice : réservés à la validation d'une procédure de mesure, constitués par un échantillon à matrice naturelle, dans lequel les teneurs d'un certain nombre de substance peuvent être certifiés; ils peuvent être certifiés (MRC) ou non certifiés (MR).

- Matériaux de référence définis de manière opérationnelle : utilisés pour valider une partie du système de mesure, comme l'étape d'extraction par exemple, avec des valeurs cibles ou certifiés directement liées à la méthode appliquée; mais également pour associer le paramètre déterminé à une certaine propriété (ex. : fraction mobilisable d'éléments) ou pour déterminer une activité (ex. : activité enzymatique) plutôt qu'une concentration.

M. Quevauviller rappelle que la différence entre les MR non certifiés et les MRC est que quelques paramètres dans les MRC sont connus avec une grande justesse et sont garantis par le producteur. Un MRC comporte en effet toujours un caractère juridique avec fourniture d'un certificat, ce qui n'est pas systématique pour les MR.

Pour finir avec la classification des MR, le guide Eurachem (4) présente les 5 classes de MR en fonction des propriétés caractérisées :

- substances pures : caractérisés par une pureté chimique et/ou la présence de traces d'impuretés.

- solutions étalons et mélanges de gaz : souvent préparé par gravimétrie à partir de substances pures.

- MR à matrices : caractérisés pour la composition en constituants majeurs, mineurs ou sous forme de traces.

- MR physico-chimiques : caractérisés pour des propriétés de viscosité, de densité optique par exemple.

- Objets de référence : caractérisés pour des propriétés telles que le goût, l'odeur, la dureté par exemple.

Ce même guide définit une échelle des MR en fonction de leurs niveaux de traçabilité. Plus le niveau de traçabilité augmente, plus les niveaux des incertitudes

de mesure sont faibles : plus on s'approche de la « vérité »... À chaque valeur de référence d'un MR est en effet associée une incertitude de mesure. En principe, elle doit inclure l'incertitude des analyses ayant permis l'établissement des valeurs de référence mais également les incertitudes liées à l'homogénéité intra et inter-échantillon et à la stabilité. Pour cela, des études d'homogénéité et de stabilité doivent être réalisées par les producteurs de MR pour évaluer toutes les composantes de l'incertitude des valeurs de référence de la phase de préparation jusqu'à la phase finale d'analyse. Dans le cadre de MRC, ces études sont bien sûr plus pointues que dans le cas de MR non certifiés. Le guide ISO 35 (5) décrit les concepts et aspects pratiques relatifs à la certification des MR avec en particulier l'estimation des incertitudes de mesure et l'étude de l'homogénéité des matériaux. D'autres termes peuvent être trouvés dans la bibliographie pour nommer les MR : matériaux de référence de laboratoires, matériaux de contrôle de qualité...

III – Disponibilités et sélection

Cette profusion de termes et de définitions peut gêner les utilisateurs dans le choix de matériaux de référence. Il existe un comité européen dédié aux travaux sur les MR : le REMCO (COMmittee on REFerence Materials) de l'ISO. Créé il y a presque 30 ans, ce comité a pour objectif principal d'encourager les efforts internationaux pour l'harmonisation, la promotion et la production de MR. Ce comité a rédigé les guides ISO 30 à 35 publiés entre 1989 et 1996. Ces guides ont pour but d'aider les producteurs de MR mais aussi les utilisateurs. Le guide ISO 31 (6) liste par exemple les informations devant figurer sur un certificat d'un MRC : le nom du matériau, le nom du fabricant et code du matériau, une description générale du produit, l'utilisation prévue, les instructions pour une utilisation appropriée, les conditions de stockage, les valeurs des propriétés certifiées et les incertitudes de mesure, les méthodes utilisées pour obtenir les propriétés et la durée de validité des valeurs certifiées.

Comme source d'information pour les utilisateurs de MR, il existe plusieurs revues traitant des MR mais en particulier, le RMreport édité par IM Publications. Cette revue, payante, donne des informations sur les MR et les producteurs et présente une liste des dernières publications parues sur le sujet des MR. À titre d'information, le numéro de RMreport de janvier-février 2003 liste près de 110 références parues dans 14 revues différentes (www.report.com). Ce grand nombre de publications sur le sujet montre bien que l'activité autour des MR est intense et reflète le besoin en MR.

Toujours pour aider les utilisateurs dans le choix des MR, une base de données internationale, appelée COMAR (COde of REFerence MAterials), a été créée à la fin des années 70 à l'initiative du LNE (Laboratoire National d'Essais, France). Cette base de données est depuis mars 2003 consultable gratuitement sur le Web après enregistrement sur le

site (www.comar.bam.de). À la date de septembre 2003, COMAR comptait plus de 10 500 matériaux provenant de 248 producteurs différents répartis dans 24 pays. Pour chacun des MR les informations disponibles sont : nom et description générale du matériau, nom et adresse du producteur, forme du matériau, propriétés certifiées et valeurs, domaine d'application.

Lors de la sélection d'un MR pour un analyse donné, plusieurs aspects sont pris en compte par l'utilisateur, notamment : le degré de certification, la nature de la matrice, les niveaux de concentrations, la quantité disponible, la durée de vie, la disponibilité et bien sûr le coût. Le choix se fait en fonction des besoins de l'analyste, des objectifs à atteindre et des moyens. Pour se fournir en MR, de nombreux producteurs sont présents sur le marché. Les principaux producteurs de MRC sont les suivants :

- IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements), institut de la Communauté Européenne, anciennement BCR, Belgique (www.irmm.jrc.be);
- BAM, Allemagne (www.bam.de);
- IAEA (International Atomic Energy Agency), Autriche (www.iaea.org);
- NIST (National Institute for Standards and Technology), États-Unis (<http://ts.nist.gov>).

En ce qui concerne les MRE, matériaux comme on l'a vu précédemment présentant un niveau de traçabilité moindre que les MRC, des organismes d'essais d'inter-comparaisons, tel que le Bipea, proposent des MRE.

L'objectif d'un essai d'aptitude est de permettre aux laboratoires d'analyses de contrôler la justesse des méthodes d'analyse, c'est-à-dire qu'ils vont pouvoir comparer leurs résultats à ceux d'autres laboratoires et évaluer si les écarts observés entre leurs résultats et des valeurs dites « assignées » sont acceptables. Cette technique implique que chaque laboratoire analyse un échantillon comparable pour la détermination de caractéristiques analytiques données. À partir des résultats des laboratoires, un traitement statistique permet d'établir pour chaque critère une valeur de référence, appelée valeur assignée à laquelle est associée un écart toléré à la valeur assignée. Les méthodes statistiques utilisées pour déterminer ces valeurs assignées et ces écarts sont calculées selon la norme PR NF ISO 13528 (7). Une fois l'essai d'aptitude réalisé, les matériaux préparés pour l'essai d'aptitude, sont donc associés à des valeurs assignées et peuvent être considérés comme des matériaux de référence externe. Le Bipea propose donc pour chacun de ces circuits d'essais d'aptitude ces MRE. Par exemple, il est possible de se procurer des MRE de farine avec des valeurs de référence pour la teneur en protéines, la teneur en eau, la teneur en cendre, etc.

Pour tenter de synthétiser les avantages et les inconvénients des différents types de référence, la figure 1 schématise les points positifs et négatifs des MRC, MRE et MRI. Il faut tout d'abord rappeler que les MRC et les MRE permettent une validation externe contrairement aux MRI qui ne se pas raccordés à l'extérieur. Les MRC, offrant une



garantie plus grande sur les valeurs de référence que les MRE et sont donc plus coûteux et souvent disponibles en petite quantité. De plus, ce sont souvent des matériaux lyophilisés, peu représentatifs des échantillons de routine, excluant donc une validation de la partie préparation de l'échantillon avant l'analyse proprement dite. Les MRE sont souvent plus proches des analyses de routine mais leur stabilité n'est pas toujours garantie et la durée de la validité des valeurs de référence est plus courte que pour les MRC.

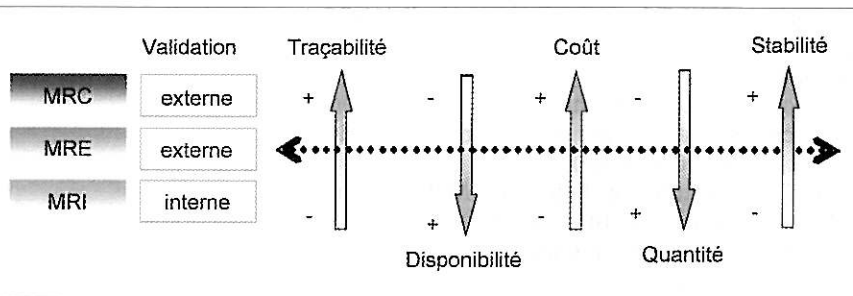


Figure 1
Avantages et inconvénients des différents niveaux de matériaux de référence.

IV – Utilisations des MR

La demande croissante de résultats de mesure fiables, d'origine connue, acceptables pour les clients, requiert de la part des laboratoires une attention grandissante pour la traçabilité métrologique. La traçabilité est définie comme étant la propriété d'un résultat de mesurage ou d'un étalon tel qu'il puisse être relié à des références déterminées, généralement des étalons nationaux ou internationaux, par l'intermédiaire d'une chaîne ininterrompue de comparaisons ayant toutes des incertitudes déterminées (8). Cette traçabilité doit être démontrée contrairement à l'incertitude de mesure qui doit être calculée.

Pour répondre à cet objectif de traçabilité, les laboratoires ont besoin de matériaux de référence. Sans eux, il n'est pas possible d'établir la chaîne de la traçabilité. De façon concrète, les MR sont utilisés pour l'étalonnage des équipements de mesure, pour le contrôle qualité des résultats de mesure, pour la mise au point et la validation de méthode. Pour aider les laboratoires des documents ont été élaborés pour l'utilisation des MR. Le document AFNOR FD V 03-115 (1) décrit les différentes utilisations des MR pour l'analyse des produits agricoles et les illustre par des exemples.

Lorsqu'une procédure d'analyse est utilisée dans un laboratoire, il est nécessaire de suivre sa stabilité grâce à des matériaux de référence et des cartes de contrôle. Les cartes de contrôle ont été développées dans les années 30 par Shewhart pour l'industrie afin de fournir un outil simple et pratique qui permettrait de vérifier si un procédé de fabrication était maîtrisé statistiquement. Depuis, elles ont été intégrées aux systèmes de contrôle de la qualité qui se sont mis en place dans les laboratoires (9). Il existe

même une norme AFNOR concernant le principe, la construction et l'utilisation de ces cartes (10).

L'utilisation par un laboratoire d'une méthode alternative, à la place d'une méthode de référence, doit s'accompagner d'une validation. Une méthode alternative peut avoir un principe totalement différent de la méthode de référence ou simplement comporter quelques variantes dans son protocole. La procédure à suivre est décrite dans la norme NF V 03-110 (11). Dans un premier temps, l'analyste doit caractériser la méthode alternative en s'intéressant à sa répétabilité, sa linéarité, sa sensibilité, à sa spécificité et à ses seuils de détection et de quantification. Ensuite, les performances de la méthode alternative en terme de fidélité et de justesse doivent être comparées à celles de la méthode de référence. Pour être validée, la méthode alternative doit au moins être aussi performante que la méthode de référence. Elle peut alors être utilisée dans le cadre des programmes d'accréditation COFRAC à la place des méthodes de référence citées dans ces programmes. Comme précédemment, toutes les étapes de la validation de la méthode alternative nécessitent l'utilisation de MR. Plus récemment, l'introduction du concept d'incertitudes de mesure dans les laboratoires a rajouté un besoin supplémentaire en MR. En effet, pour estimer toutes les composantes des incertitudes de mesure (12) et pour évaluer l'incertitude de mesure par la reproductibilité intra-laboratoire, il est nécessaire de réaliser des plans d'expérience avec des MR.

Pour illustrer ces utilisations, un exemple d'étalonnage proche infrarouge (PIR), pour la prédiction de la teneur en eau de farine de blé, réalisé avec des MRE est présenté ci-dessous. L'analyse de la farine se fait en mode réflexion diffuse avec un spectromètre PIR. Pour utiliser la méthode SPIR à des fins de quantification, il est nécessaire de réaliser un calibrage. À la différence des méthodes analytiques classiques, le signal enregistré est multidimensionnel, ce qui va se répercuter sur les méthodes utilisables pour construire le modèle d'étalonnage ou de prédiction. L'étalonnage consiste à calculer un modèle prédictif des valeurs de concentration de l'analyte choisi, ici la teneur en eau, à partir de valeurs d'absorbances mesurées sur les échantillons, à l'aide d'une technique statistique multidimensionnelle, la régression par les moindres carrés partiels ou Partial Least Squares PLS (13). Le modèle est validé par validation croisée ou « cross validation » (14). Une erreur quadratique de validation croisée ou Root Mean Square Error of Cross Validation (RMSECV) est calculée pour juger de la qualité du modèle.

Pour élaborer le modèle, 109 MRE de farine, issus du circuit d'essais d'aptitude « Farine » du Bipea sont analysés avec 3 répétitions complètes par MRE, soit un total de 327 spectres. Pour chacun de ces MRE, on dispose d'une valeur de référence pour la teneur en eau et la gamme s'étale entre 11,76 et 15,80%. Un modèle de régression est construit à partir de ces spectres. La figure 2 reprend les teneurs en eau prédites de la farine par le modèle en fonction des teneurs en eau des MRE. Le RMSECV, erreur de

Les matériaux de référence : définitions, disponibilité, sélection et utilisation

prédiction, est égal à 0,05 et le coefficient de détermination est égal à 0,99. Le modèle pourra être utilisé pour prédire des teneurs en eau d'échantillons de farine inconnues, sous réserve que leurs teneurs en eau soient dans le domaine d'application de l'étalonnage (teneurs en eau comprises entre 11,70 et 15,80%). Cet exemple illustre une utilisation de MRE pour la construction d'étalonnage PIR, qui a évité de faire analyser chaque farine par la méthode de référence dans un laboratoire.

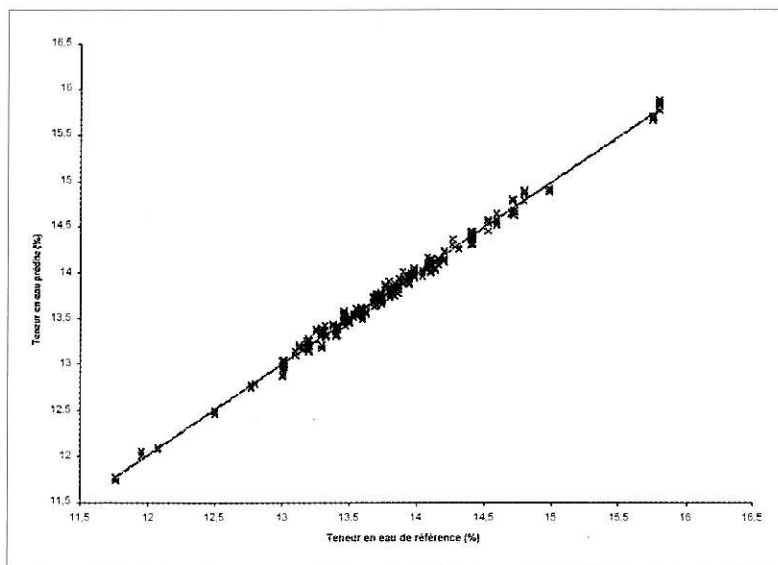


Figure 2

Teneur en eau prédite (%) en fonction de la teneur en eau de référence (%) des MRE de farine.

V – Conclusion

Le référentiel utilisé par les organismes d'accréditation, tel que COFRAC, qui reconnaissent la compétence des laboratoires est la norme 17025 (15). Cette norme contient toutes les exigences que doivent satisfaire les laboratoires s'ils veulent apporter la preuve qu'ils gèrent un système qualité, qu'ils sont techniquement compétents et qu'ils sont capables de produire des résultats techniquement fiables. Dans la clause « Assurer la qualité des résultats d'essais et d'étalonnages », il est mentionné qu'un des moyens pour surveiller la qualité des résultats est l'utilisation régulière de MRC et/ou maîtrise de la qualité interne à l'aide de MR secondaires ainsi que la participation aux essais d'aptitude. Un référentiel COFRAC 2002 spécifiquement destiné à l'accréditation des organisateurs de comparaisons interlaboratoires en vue d'évaluer la capacité des laboratoires à réaliser des essais avec compétence, a récemment été publié. Il s'adresse aux organismes qui souhaitent démontrer leurs compétences à des fins d'accréditation en respectant un ensemble d'exigences en matière de planification et de mise en place de programmes de comparaisons in-

ter-laboratoires. Cette accréditation vise à s'assurer que les comparaisons inter-laboratoires sont correctement mises en place, en accord avec des exigences définies. Dans le futur, on peut imaginer que le COFRAC propose un référentiel ayant pour but la reconnaissance de la compétence d'un organisateur de comparaisons interlaboratoires à établir les caractéristiques d'un MR, en lui attribuant une valeur de référence accompagnée de son incertitude. Les laboratoires ont de plus en plus besoin de MR mais le développement des matériaux de référence est une opération coûteuse, nécessitant des connaissances techniques et une expérience importante. Cependant, la variété de composés, de concentrations et de matrices rend impossible la couverture totale de tout le domaine de la chimie analytique. Le développement de nouveaux matériaux de référence est effectué en fonction des priorités définies par la société et ses pressions sanitaires et économiques.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ISO guide 30. Termes et définitions utilisés en rapport avec les matériaux de référence, ISO Genève, 1989.
- (2) NF FD V 03-115. Analyse des produits agricoles et alimentaires – Guide pour l'utilisation des matériaux de référence, AFNOR Paris-La Défense, 1996.
- (3) QUEVAUVILLER P. Matériaux de référence pour l'environnement. Paris, édition TEC & DOC, 2002.
- (4) EURACHEM. The selection and use of reference materials – A basic guide for laboratories and accreditation bodies, 2002.
- (5) ISO guide 35. Certification des matériaux de référence – Principes généraux et statistiques, ISO Genève, 1989.
- (6) ISO guide 31. Matériaux de référence – Contenu des certificats et étiquettes, ISO Genève, 2000.
- (7) PR NF ISO 13528. Méthodes statistiques utilisées dans les essais d'aptitude par comparaisons interlaboratoires, ISO Genève, 2002.
- (8) NF X 07-001. Normes Fondamentales – Vocabulaire international des termes fondamentaux et généraux de métrologie, AFNOR, Paris-La Défense, 1994.
- (9) MULLINS E. Introduction to control charts in the analytical laboratory. Analyst, 119, 369-375, 1994.
- (10) NF X 06-031-1. Application de la statistique – Cartes de contrôle – Parties 1 à 4 AFNOR, Paris-La Défense, 1995.
- (11) NF V 03-110. Protocole d'évaluation d'une méthode alternative d'analyse quantitative par rapport à une méthode de référence, AFNOR, Paris-La Défense, 1993.
- (12) NF EN V 13005. Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure, AFNOR, Paris-La Défense, 1999.
- (13) NAES T., ISAKSSON T., FEARN T., DAVIES T. Multivariate calibration and classification, NIR, Royaume-Uni, 2002.
- (14) STONE M. Cross-validation choice and assessment of statistical prediction. Journal of the Royal Statistical Society, 39, 111-133, 1974.
- (15) NF EN ISO/CEI 17025 (2000). Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais, AFNOR, Paris-La Défense.