Métrologie
Chimiométrie

VALIDATION INTRALABORATOIRE DES METHODES D'ANALYSE

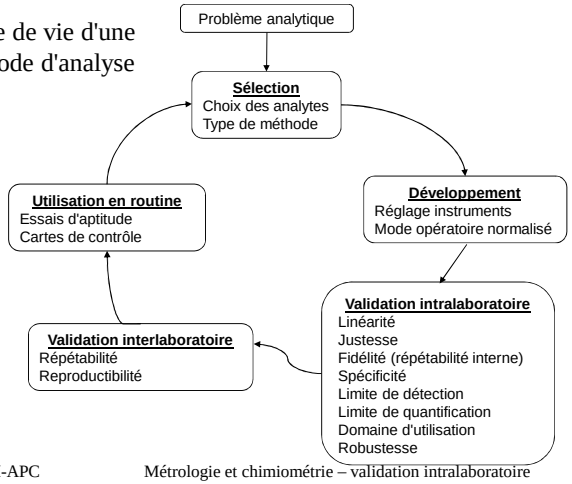
Généralités

I Objectif de la validation

Selon l'ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Genève) *l'objectif de la validation d'une procédure analytique est de démontrer qu'elle est appropriée à l'usage auquel elle est destinée.*

I Objectif de la validation

Cycle de vie d'une méthode d'analyse



II Différents critères de validation

Obligatoire pour le dossier d'AMM :

(module 3 (information chimique, pharmaceutique et biologique pour les médicaments contenant des substances chimiques et/ou biologiques actives) des exigences du dossier standardisé de demande d'autorisation de mise sur le marché (JO directive 2003/63/CE))

-Épreuves d'identification

-Dosage quantitatif des impuretés. Vérification des teneurs limites des impuretés.

-Dosage de la partie active ou d'une ou de plusieurs autres composantes de la substance médicamenteuse ou du produit fini.

Non nécessaire si méthode de la Pharmacopée

II Différents critères de validation

Les différentes critères de validation d'une méthode d'analyse

Sélectivité, Spécificité

Linéarité

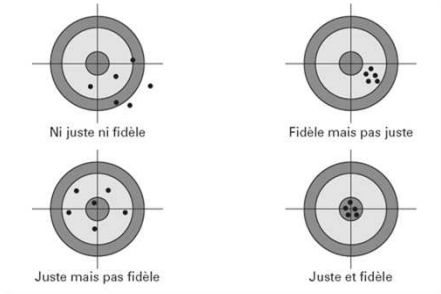
Justesse

Fidélité *répétabilité*
fidélité intermédiaire
reproductibilité

II Différents critères de validation

Les différentes critères de validation d'une méthode d'analyse (suite)

justesse et fidélité



II Différents critères de validation

Les différentes critères de validation d'une méthode d'analyse (suite)

Limite ou seuil de détection

Limite ou seuil de dosage

Domaine d'utilisation

Robustesse

II Différents critères de validation

Caractéristiques à valider

Type d'analyse / Caractéristiques	Identification	Impuretés		Dosage
		Quantification	Teneur limite	-Dissolution (mesure seulement) -Teneur/activité
Justesse	-	+	-	+
Fidélité				
Répétabilité	-	+	-	+
Fidélité intermédiaire	-	+(1)	-	+(1)
Spécificité(2)	+	+	+	+
Limite de détection	-	-(3)	+	-
Limite de dosage	-	+	-	-
Linéarité	-	+	-	+
Domaine d'utilisation	-	+	-	+

(1) Si la reproductibilité est évaluée, il n'est pas nécessaire de déterminer la fidélité intermédiaire.
(2) Si la méthode est insuffisamment spécifique, cette déficience peut être compensée par la spécificité d'une ou de plusieurs autres épreuves complémentaires auxquelles l'échantillon est soumis.
(3) parfois nécessaire

II Différents critères de validation

II-1 Spécificité

"La spécificité est la propriété qui fait qu'une méthode d'analyse rend compte sans ambiguïté de la substance analysée en présence d'autres composantes normalement présentes. Ces dernières peuvent inclure des impuretés, des produits de dégradation, la matrice, etc.

Si une méthode d'analyse est insuffisamment spécifique, cette déficience peut être compensée par la spécificité de l'une ou de plusieurs des autres analyses complémentaires. (ICH Q2R1)"

"Sélectivité : propriété d'un système de mesure, utilisant une procédure de mesure spécifiée, selon laquelle le système fournit des valeurs mesurées pour un ou plusieurs mesurandes, telles que les valeurs de chaque mesurande sont indépendantes des autres mesurandes ou d'autres grandeurs dans le phénomène, le corps ou la substance en cours d'examen (VIM 2008) "

II Différents critères de validation

II-1 Spécificité (suite)

-indispensable

-absence d'interférence entre l'analyte et les composés de la matrice

-dépend de la matrice

-dépend de la méthode utilisée (préparation des échantillons, détection ± sélective)

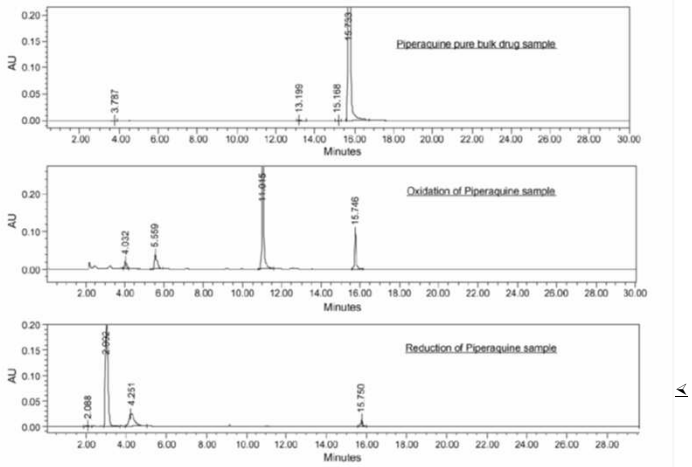
-résultats d'analyses identiques en présence d'ajouts de substances interférentes potentielles

-étude d'échantillons "stressés"

-comparaison avec autre méthode validée

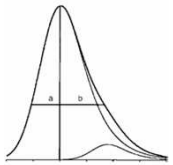
-analyse de la pureté du pic en chromatographie (épaulements, recueil du pic et analyse, UV avec barrettes de diode, spectrométrie de masse)

Spécificité : Analyse d'échantillons "stressés"

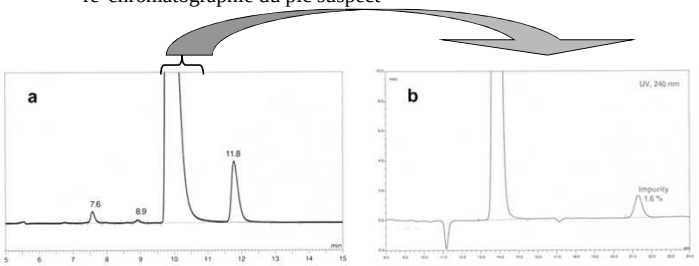


Spécificité : pureté du pic chromatographique (1)

- symétrie du pic

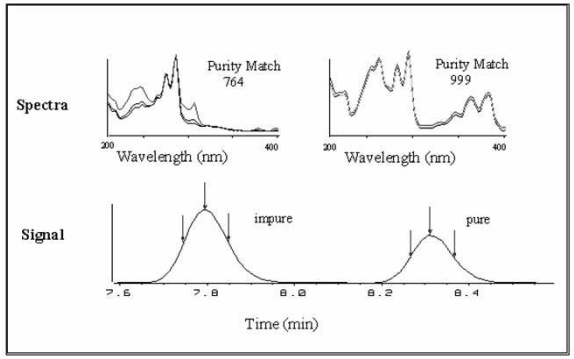


- "re"chromatographie du pic suspect



Spécificité : pureté du pic chromatographique (2)

- utilisation d'un détecteur à barettes de diodes (idem avec spectrométrie de masse à fragmentation)



II Différents critères de validation

II-2 Domaine d'utilisation

"Le domaine d'utilisation d'une méthode d'analyse est l'intervalle entre la concentration la plus élevée et la concentration la plus faible (quantités) de la substance analysée dont on a démontré qu'elles pouvaient être déterminées avec un degré acceptable de fidélité, de justesse et de linéarité. (ICH Q2R1)"

Application de la méthode	Domaine d'utilisation minimal recommandé
Dosage teneur	80-120 % de la concentration analysée
Uniformité de teneur	70-130 % de la concentration analysée
Test de dissolution	± 20% des valeurs limites spécifiées
Dosage d'impuretés	100 à 120 % du seuil de déclaration

II Différents critères de validation

II-3 Linéarité

"La linéarité d'une méthode d'analyse est sa capacité de donner des résultats qui sont directement (à l'intérieur de certaines limites) proportionnels à la concentration (quantité) de la substance analysée dans un échantillon. (ICHQ2R1)"

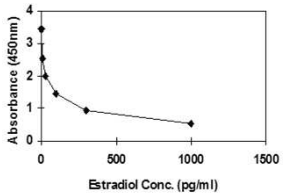
- dosage de la teneur en PA et impuretés
- évaluée sur l'ensemble du domaine d'utilisation
- sur PA et/ou FPR

- examen visuel de la courbe
- outil statistique de régression
- transformation mathématique éventuelle autorisée
- coefficient de corrélation, ordonnée à l'origine, somme des carrés des résidus, graphique des résidus, graphique
- non linéarité possible mais à justifier (test immunologique par ex.)
- au moins 5 concentrations à espacer régulièrement sur tout le domaine d'utilisation

Exemple de non linéarité

Dosage immunologique de l'oestradiol
ELISA compétitif

Courbe d'étalonnage
Absorbance à 450nm en fonction de la concentration en oestradiol



II Différents critères de validation

II-4 Justesse

"La justesse correspond au degré de concordance entre la valeur de la méthode obtenue et la valeur de référence ou la valeur considérée comme véritable par convention. La justesse est aussi désignée comme l'authenticité. La justesse doit être vérifiée dans le domaine d'utilisation de la méthode d'analyse. (ICHQ2R1)"

"**justesse de mesure, justesse :** étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence NOTE 1 La justesse de mesure n'est pas une grandeur et ne peut donc pas s'exprimer numériquement, mais l'ISO 5725 donne des caractéristiques pour l'étroitesse de l'accord. NOTE 2 La justesse de mesure varie en sens inverse de l'erreur systématique mais n'est pas liée à l'erreur aléatoire. NOTE 3 Il convient de ne pas utiliser le terme « exactitude de mesure » pour la justesse de mesure et vice versa. (VIM 2008)"

II Différents critères de validation

II-4 Justesse (suite)

- dosage de la teneur en PA et impuretés
- évaluée sur l'ensemble du domaine d'utilisation

II-4-1 Teneur en PA

II-4-1-1 Matière première

- application méthode à une substance de pureté connue
- comparaison résultat avec autre méthode

II-4-1-2 Produit fini

- application méthode à FPR contenant une quantité connue de PA
- ajout de PA dans le produit fini
- comparaison résultat avec autre méthode

II Différents critères de validation

II-4 Justesse (suite)

II-4-2 Détermination quantitative des impuretés

- application méthode à échantillons enrichis de quantités connues d'impuretés
- comparaison résultat avec autre méthode
- indiquer clairement comment les impuretés sont dosées (individuellement ou globalement, en pourcentage du PA en poids ou en pourcentage d'aire)

II-4-3 Recommandations concernant les données

- au moins 9 résultats (3 concentrations avec 3 échantillons chacune)
- expression de la justesse : pourcentage de recouvrement avec intervalle de confiance
- recouvrement calculé proche de 100%
- recouvrement variable en fonction de la teneur

II Différents critères de validation

II-4 Justesse (suite)

II-4-3 Recommandations concernant les données (suite)

Analyte %	Fraction d'analyte	Unité	Recouvrement (%)
100	1	100 %	98-102
10	10^{-1}	10 %	98-102
1	10^{-2}	1 %	97-103
0,1	10^{-3}	0,1 %	95-105
0,01	10^{-4}	100 ppm	90-107
0,001	10^{-5}	10 ppm	80-110
0,0001	10^{-6}	1 ppm	80-110
0,00001	10^{-7}	100 ppb	80-110
0,000001	10^{-8}	10 ppb	60-115
0,0000001	10^{-9}	1 ppb	40-120

II Différents critères de validation

II-5 Fidélité

"La fidélité d'une méthode correspond au degré d'accord (degré de dispersion) entre les résultats des mesures obtenues par l'analyse individuelle de plusieurs prélèvements d'un même échantillon homogène, prélevés dans des conditions prescrites. La fidélité peut s'évaluer à trois niveaux: répétabilité, fidélité intermédiaire et reproductibilité.

L'évaluation de la fidélité doit se faire au moyen d'échantillons homogènes et authentiques. S'il est impossible d'obtenir des échantillons homogènes, on peut utiliser des échantillons préparés artificiellement ou une solution d'échantillon.

La fidélité est généralement exprimée par la variance, l'écart-type ou le coefficient de variation d'un ensemble de mesures. (ICHQ2R1)"

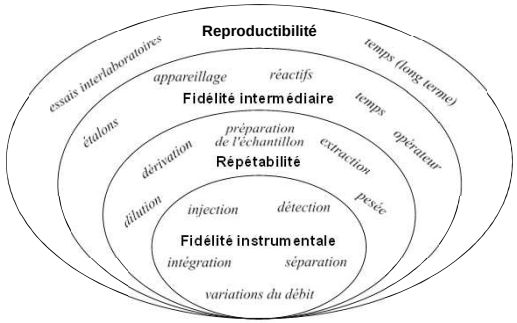
II Différents critères de validation

II-5 Fidélité (suite)

"fidélité de mesure, fidélité : étroitesse de l'accord entre les indications ou les valeurs mesurées obtenues par des mesurages répétés du même objet ou d'objets similaires dans des conditions spécifiées NOTE 1 La fidélité est en général exprimée numériquement par des caractéristiques telles que l'écart-type, la variance ou le coefficient de variation dans les conditions spécifiées. NOTE 2 Les conditions spécifiées peuvent être, par exemple, des conditions de répétabilité, des conditions de fidélité intermédiaire ou des conditions de reproductibilité (voir ISO 5725-3:1994). NOTE 3 La fidélité sert à définir la répétabilité de mesure, la fidélité intermédiaire de mesure et la reproductibilité de mesure. NOTE 4 Le terme « fidélité de mesure » est quelquefois utilisé improprement pour désigner l'exactitude de mesure. (VIM 2008)"

- dosage de la teneur en PA et impuretés
- évaluée sur l'ensemble du domaine d'utilisation ou à 100% de la teneur attendue

Les différents niveaux de fidélité



II Différents critères de validation

II-5-1 Répétabilité

"La répétabilité est une expression de la fidélité de l'analyse lorsque celle-ci est reprise dans les mêmes conditions de réalisation, après un court intervalle de temps. La répétabilité est aussi désignée fidélité intra-analyse.(ICHQ2R1)"

"condition de répétabilité : condition de mesurage dans un ensemble de conditions qui comprennent la même procédure de mesure, les mêmes opérateurs, le même système de mesure, les mêmes conditions de fonctionnement et le même lieu, ainsi que des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires pendant une courte période de temps. NOTE 2 En chimie, on utilise quelquefois le terme « condition de fidélité intra-série » pour désigner ce concept. (VIM2008)"

- au moins 9 mesures englobant le domaine d'utilisation de la méthode (3 concentrations de 3 échantillons chacune

ou

- au moins 6 mesures d'une concentration à 100% de la teneur escomptée

II Différents critères de validation

II-5-2 Fidélité intermédiaire

"La fidélité intermédiaire correspond aux variations survenant dans un même laboratoire : analyses effectuées des jours différents, par des personnes différentes, au moyen d'appareils différents, etc. (ICHQ2R1)"

"condition de fidélité intermédiaire : condition de **mesurage** dans un ensemble de conditions qui comprennent la même **procédure de mesure,** le même lieu et des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires pendant une période de temps étendue, mais peuvent comprendre d'autres conditions que l'on fait varier NOTE 1 Les conditions que l'on fait varier peuvent comprendre de nouveaux **étalonnages, étalons,** opérateurs et **systèmes de mesure.** NOTE 2 Il convient qu'une spécification relative aux conditions contienne, dans la mesure du possible, les conditions que l'on fait varier et celles qui restent inchangées. NOTE 3 En chimie, on utilise quelquefois le terme « condition de fidélité inter-série » pour désigner ce concept. (VIM 2008) "

- influence de phénomènes aléatoires sur la fidélité
- plan d'expérience éventuellement

II Différents critères de validation

II-5-3 Reproductibilité

"La reproductibilité correspond à la concordance entre laboratoires (travaux de collaboration visant généralement l'uniformisation de la méthodologie). (ICHQ2R1)"

"**condition de reproductibilité** : condition de mesurage dans un ensemble de conditions qui comprennent des lieux, des opérateurs et des systèmes de mesure différents, ainsi que des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires NOTE 1 Les différents systèmes de mesure peuvent utiliser des procédures de mesure différentes. NOTE 2 Il convient qu'une spécification relative aux conditions contienne, dans la mesure du possible, les conditions que l'on fait varier et celles qui restent inchangées. (VIM 2008)"

-s'évalue lors d'analyses interlaboratoires

-non évaluée dans un dossier d'AMM

II-5-4 Recommandations concernant les données

- écart-type, écart-type relatif (CV%, RSD), intervalle de confiance.

II Différents critères de validation

II-6 Sensibilité, limites de détection, de quantification

II-6-1 Sensibilité

"**sensibilité** : quotient de la variation d'une indication d'un système de mesure par la variation correspondante de la valeur de la grandeur mesurée (VIM 2008)"

Pente de la droite d'étalonnage

Détermination non obligatoire

II Différents critères de validation

II-6 Sensibilité, limites de détection, de quantification

II-6-2 Limite de détection (LD)

"*La limite de détection d'une méthode d'analyse individuelle correspond à la plus faible quantité de la substance analysée que la méthode permet de détecter, sans nécessairement fournir la valeur exacte. (ICHQ2R1)"*

***"limite de détection :** valeur mesurée, obtenue par une procédure de mesure donnée, pour laquelle la probabilité de déclarer faussement l'absence d'un constituant dans un matériau est β, étant donnée la probabilité α de déclarer faussement sa présence NOTE 1 L'UICPA recommande des valeurs par défaut de α et β égales à 0,05. NOTE 3 Le terme « sensibilité » est à proscrire au sens de limite de détection. (VIM 2008)"*

II Différents critères de validation

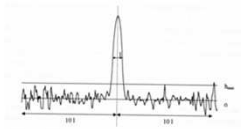
II-6 Sensibilité, limites de détection, de quantification

II-6-2 Limite de détection (LD) (suite)

- paramètre des essais limites
- plusieurs méthodes proposées
  - évaluation visuelle
  - examen de l'enregistrement
  - valeurs du blanc
  - droite d'étalonnage
- indication de la limite de détection en précisant la méthode utilisée (joindre l'enregistrement graphique le cas échéant)

Limite de détection : examen de l'enregistrement graphique (CLHP par ex)

- blanc d'analyse → h_{max}



- injection de dilutions
- détermination de la limite de détection

$$S/N = 3 = \frac{2\,h_{LD}}{h_{max}}$$

$$R = \frac{q_{inj}}{h_{pic}}$$

$$LD = 3 \times \frac{h_{max}}{2} \times R$$

Limite de détection : absence d'enregistrement graphique

- valeurs du blanc
- analyse de n blancs (n≥6)
- calcul de s_{blanc}
- $LD = \frac{3{,}3 \cdot s_{blanc}}{p}$ avec p=pente de la droite d'étalonnage

- droite d'étalonnage
- s_{blanc} remplacé par l'écart-type de l'ordonnée à l'origine ou l'écart-type des résidus

II Différents critères de validation

II-6 Sensibilité, limites de détection, de quantification (suite)

II-6-3 Limite de quantification (LQ)

"La limite de quantification d'une méthode d'analyse individuelle correspond à la plus faible quantité de la substance analysée que la méthode permet de doser avec un degré acceptable de fidélité et de justesse. La limite de dosage est un paramètre des analyses quantitatives des composés présents en faibles quantités dans les matrices d'échantillon; elle est plus particulièrement utilisée dans le dosage des impuretés et (ou) des produits de dégradation. (ICHQ2R1)"

-détermination identique à précédemment en remplaçant le facteur 3 ou 3,3 par 10

-indication de la limite de quantification en précisant la méthode utilisée (joindre l'enregistrement graphique le cas échéant)

-vérification de la fidélité et de l'exactitude pour un échantillon de teneur proche de la LQ (calcul des recouvrement (justesse) et répétabilité (fidélité) sur n analyses d'un même échantillon (n≥6))

II Différents critères de validation

II-7 Robustesse

"La robustesse d'une méthode d'analyse est une mesure de sa capacité à supporter sans conséquences de petites variations apportées délibérément aux paramètres de la méthode; elle donne une idée de la fiabilité de la méthode aux conditions normales d'utilisation. (ICHQ2R1)"

- à effectuer durant la phase de mise au point
- démonstration de la fiabilité lors de variations de paramètres opératoires critiques
- liée à la notion de reproductibilité

- paramètres opératoires à considérer = paramètres quantifiables dont l'écart par rapport à la valeur nominale est susceptible d'influer sur le résultat final

II Différents critères de validation

II-7 Robustesse (suite)

- stabilité des solutions
- durée d'extraction

CLHP
- variations du pH de la phase mobile
- variations de la composition de la phase mobile
- colonnes différentes
- température
- débit de la phase mobile

CPG
- colonnes différentes
- température du four
- débit du gaz vecteur

- grand nombre d'essai à réaliser → technique des plans factoriels (plan d'expérience) permet de diminuer le nombre (4 essais pour 2 paramètres, 8 essais pour 3 ou 4 paramètres……)

II Différents critères de validation

II-8 Vérification de la compétence du système

"La vérification de la compétence du système fait partie intégrale de nombreuses méthodes d'analyse. Elle suppose que l'équipement et l'électronique, les opérations d'analyse et les échantillons constituent parties prenantes du système et peuvent être évaluées comme telles. Les critères en fonction desquels on détermine si le système est approprié dépendent de la méthode à valider. Les pharmacopées donnent de plus amples détails à ce sujet. (ICHQ2R1)"

USP (N, Rs, T, répétabilité injections)

Ph.Eur. (As, répétabilité injections, limites de détection et de quantification)

Métrologie Chimiométrie

FIN DE
VALIDATION INTRALABORATOIRE
DES METHODES D'ANALYSE

Généralités