



# Métrie Chimométrie

## VALIDATION INTRALABORATOIRE DES METHODES D'ANALYSE

Applications



## I - Exemple d'application selon l'ICH

### Publication :

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

27 (2002) 177–182

A new HPLC method to determine Donepezil hydrochloride  
in tablets

H. Pappa, R. Farru , P. O. Vilanova, M. Palacios, M. T. Pizzorno

## II - Mise en oeuvre pratique (SFSTP)

*Application pratique des critères de linéarité, justesse, fidélité et limites de  
détection et de quantification*

### II-1 Linéarité et justesse

- **intervalle de concentration** : 5 concentrations minimum (ex: 60,  
80,100,120,140 % de la concentration théorique en PA).

- **trois séries** indépendantes de cinq concentrations

- **à raison d'une série par jour**

- simultanément sur Principe Actif seul (PA) et sur la Forme Pharmaceutique

Reconstituée (FPR)

N échantillons de teneur connue  $x_{ij}$  : k groupes (j varie de 1 à k) de n (i varie de 1 à n) (au  
minimum N=15, k=5, n=3)

$y_{ij}$  = signal mesuré

## II-1 Linéarité et justesse

	Valeur théorique $x_{ij}$	Signal mesuré $y_{ij}$
60	$x_{11}$	$y_{11}$
	$x_{21}$	$y_{21}$
	$x_{31}$	$y_{31}$
80	$x_{12}$	$y_{12}$
	$x_{22}$	$y_{22}$
	$x_{32}$	$y_{32}$
100	$x_{13}$	$y_{13}$
	$x_{23}$	$y_{23}$
	$x_{33}$	$y_{33}$
120	$x_{14}$	$y_{14}$
	$x_{24}$	$y_{24}$
	$x_{34}$	$y_{34}$
140	$x_{15}$	$y_{15}$
	$x_{25}$	$y_{25}$
	$x_{35}$	$y_{35}$

## II-1 Linéarité et justesse

Etude de la linéarité sur la forme pharmaceutique reconstituée				Etude de la linéarité sur le PA			
%PA	date de l'analyse	pesée mg = x <sub>ij</sub>	Surface du pic = y <sub>ij</sub>	% PA	date de l'analyse	pesée mg = x <sub>ij</sub>	Surface du pic = y <sub>ij</sub>
60	15.12.04	96.5	76626	60	15.12.04	97.2	76521
	16.12.04	96.8	75154		16.12.04	97	75251
	17.12.04	96.7	76049		17.12.04	96.8	75297
80	15.12.04	130	103197	80	15.12.04	130.5	102749
	16.12.04	129.8	101786		16.12.04	131.2	102210
	17.12.04	129.7	101858		17.12.04	131	102283
100	15.12.04	161.8	128105	100	15.12.04	161.1	126779
	16.12.04	161.5	126865		16.12.04	163	127242
	17.12.04	161.2	127788		17.12.04	161.2	126801
120	15.12.04	195.5	155967	120	15.12.04	194.1	153035
	16.12.04	195.3	153848		16.12.04	194.1	151598
	17.12.04	195.3	153608		17.12.04	194.5	153867
140	15.12.04	227.8	181879	140	15.12.04	226.4	178584
	16.12.04	228.6	180355		16.12.04	225.6	176002
	17.12.04	228.2	180909		17.12.04	225.9	178332

M1S2 SM-APC

Métrologie et chimométrie – validation intralaboratoire - applications

5

## II-1-1 Linéarité

### II-1-1 Linéarité

estimation des droites de régression linéaire (méthode des moindres carrés)

$$\text{FPR} \rightarrow D_1 \quad y = b_1x + a_1$$

$$\text{PA} \rightarrow D_2 \quad y = b_2x + a_2$$

Calcul de la pente (b)

$$b = \frac{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x})(y_{ij} - \bar{y})}{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x})^2}$$

Calcul de l'ordonnée à l'origine (a)

$$a = \bar{y} - b \cdot \bar{x}$$

Calcul du coefficient de corrélation (r)

$$r = \frac{\text{Cov}(x_{ij}, y_{ij})}{S_{x_{ij}} S_{y_{ij}}}$$

$$\text{Cov}(x_{ij}, y_{ij}) = \frac{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x})(y_{ij} - \bar{y})}{N-1} \quad S_{x_{ij}} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x})^2}{N-1}} \quad S_{y_{ij}} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (y_{ij} - \bar{y})^2}{N-1}}$$

M1S2 SM-APC

Métrologie et chimométrie – validation intralaboratoire - applications

6

## II-1-1 Linéarité

Valeur théorique x <sub>ij</sub>	Valeur mesurée y <sub>ij</sub>	(x <sub>ij</sub> - $\bar{x}$ )	(x <sub>ij</sub> - $\bar{x}$ ) <sup>2</sup>	(y <sub>ij</sub> - $\bar{y}$ )	(y <sub>ij</sub> - $\bar{y}$ ) <sup>2</sup>	(x <sub>ij</sub> - $\bar{x}$ ) × (y <sub>ij</sub> - $\bar{y}$ )
60	x <sub>11</sub>	y <sub>11</sub>				
	x <sub>21</sub>	y <sub>21</sub>				
	x <sub>31</sub>	y <sub>31</sub>				
80	x <sub>12</sub>	y <sub>12</sub>				
	x <sub>22</sub>	y <sub>22</sub>				
	x <sub>32</sub>	y <sub>32</sub>				
100	x <sub>13</sub>	y <sub>13</sub>				
	x <sub>23</sub>	y <sub>23</sub>				
	x <sub>33</sub>	y <sub>33</sub>				
120	x <sub>14</sub>	y <sub>14</sub>				
	x <sub>24</sub>	y <sub>24</sub>				
	x <sub>34</sub>	y <sub>34</sub>				
140	x <sub>15</sub>	y <sub>15</sub>				
	x <sub>25</sub>	y <sub>25</sub>				
	x <sub>35</sub>	y <sub>35</sub>				
$\bar{x}$	$\bar{y}$	$\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x})$	$\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x})^2$	$\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (y_{ij} - \bar{y})$	$\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (y_{ij} - \bar{y})^2$	$\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x}) \times (y_{ij} - \bar{y})$

M1S2 SM-APC

Métrologie et chimométrie – validation intralaboratoire - applications

7

## II-1-1 Linéarité

%PA	pesée mg	Surface du pic	(x <sub>ij</sub> - $\bar{x}$ )	(x <sub>ij</sub> - $\bar{x}$ ) <sup>2</sup>	(y <sub>ij</sub> - $\bar{y}$ )	(y <sub>ij</sub> - $\bar{y}$ ) <sup>2</sup>	(x <sub>ij</sub> - $\bar{x}$ ) × (y <sub>ij</sub> - $\bar{y}$ )
60	96.5	76626	-65.8	4331.4	-51640.3	2666717141	3398618
	96.8	75154	-65.5	4292.0	-53112.3	2820912870	3479562
	96.7	76049	-65.6	4305.1	-52217.3	2726642938	3426149
80	130	103197	-32.3	1044.2	-25069.3	628468131	810072
	129.8	101786	-32.5	1057.1	-26480.3	701204523	860962
	129.7	101858	-32.6	1063.6	-26408.3	697396548	861262
100	161.8	128105	-0.5	0.3	-161.3	26007	83
	161.5	126865	-0.8	0.7	-1401.3	1963548	1140
	161.2	127788	-1.1	1.2	-478.3	228739	532
120	195.5	155967	33.2	1101.4	27700.7	767330627	919295
	195.3	153848	33.0	1088.1	25581.7	654425080	843856
	195.3	153608	33.0	1088.1	25341.7	642203448	835939
140	227.8	181879	65.5	4288.5	53612.7	2874325175	3510919
	228.6	180355	66.3	4393.9	52088.7	2713236140	3452789
	228.2	180909	65.9	4341.1	52642.7	2771257373	3468454
162.3	128266.3	0.0	32396.6	0.0	20666338291	25869631	

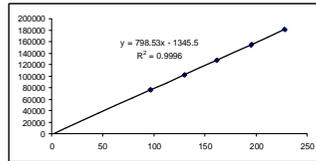
M1S2 SM-APC

Métrologie et chimométrie – validation intralaboratoire - applications

8

## II-1-1 Linéarité

Courbe de tendance



Fonction droitereg

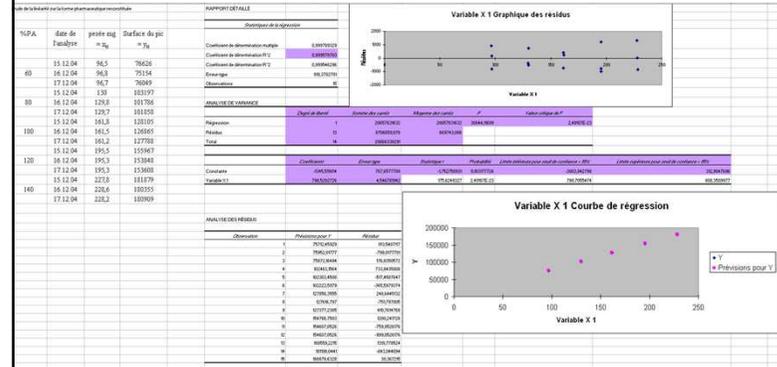
Etude de la linéarité sur la forme pharmaceutique reconstituée

%PA	date de l'analyse	pesée mg = $x_0$	Surface du pic = $y_0$
60	15.12.04	96,5	76626
60	16.12.04	96,8	75154
60	17.12.04	96,7	76049
60	15.12.04	130	103197
60	16.12.04	129,8	101786
60	17.12.04	129,7	101858
100	15.12.04	161,8	128105
100	16.12.04	161,5	126865
100	17.12.04	161,2	127288
120	15.12.04	195,5	155967
120	16.12.04	195,3	153848
120	17.12.04	195,3	153608
140	15.12.04	228,8	181879
140	16.12.04	228,6	180355
140	17.12.04	228,2	180909

798.53  
4.55  
-1345.52  
787.66  
1.00  
818.38  
30844.11699  
13  
20657631632  
8706659.078

## II-1-1 Linéarité

Utilitaire d'analyse  
Régression linéaire



## II-1-1 Linéarité

Test de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0

Comparaison des pentes et des ordonnées à l'origine des droites  $D_1$  et  $D_2$

Changement de variable

Test d'homogénéité des variances

Test de l'existence d'une pente significative

## II-1-1 Linéarité

Test de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0

$$S_a^2 = S_{Res}^2 \left[ \frac{1}{N} + \frac{\frac{m^2}{X}}{\sum_{j=1}^m \sum_{i=1}^m (x_{ij} - \bar{x})^2} \right]$$

$$avec S_{Res}^2 = \frac{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^m (y_{ij} - \bar{y})^2 - b^2 \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^m (x_{ij} - \bar{x})^2}{N - 2} = \frac{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^m (y_{ij} - y'_{ij})^2}{N - 2}$$

Comparaison des pentes et des ordonnées à l'origine des droites  $D_1$  et  $D_2$

$$a_1 = a_2 \Rightarrow \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{S_a^2 + S_a^2}} (t_{(\alpha, N_1 + N_2 - 4)})$$

$$b_1 = b_2 \Rightarrow \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{S_b^2 + S_b^2}} (t_{(\alpha, N_1 + N_2 - 4)})$$

$$S_b^2 = \frac{S_{Res}^2}{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^m (x_{ij} - \bar{x})^2} \text{ variance de la pente}$$

## II-1-1 Linéarité

### Changement de variable

$$\bar{X}_j = \frac{\sum_{i=1}^{n_j} x_{ij}}{n_j}$$

$$y_{ij} = a + b \cdot x_{ij} \quad (1)$$

$$Y_{ij} = a + b \cdot \bar{X}_j \quad (2)$$

$$(2) - (1)$$

$$Y_{ij} = b \cdot (\bar{X}_j - x_{ij}) + y_{ij}$$

### Test d'homogénéité des variances

$$C = \frac{s_{\max}^2}{\sum_{j=1}^k s_j^2} \cdot C_{(\alpha; k; n)}$$

$s_j^2$  = variance du groupe j

$s_{\max}^2$  = variance la plus élevée des k groupes j

M1S2 SM-APC

Métrologie et chimométrie – validation intralaboratoire - applications

13

## II-1-1 Linéarité

### Test de l'existence d'une pente significative

Variations	DDL	Somme des carrés	Variance	F calculé
Variation totale	N-1	$\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (Y_{ij} - \bar{Y})^2$		$F_1 = \frac{s_1^2}{s_R^2}$
Variation due à la régression	1	$\sum_{j=1}^k I^2 = b^2 \sum_{j=1}^k n_j (\bar{X}_j - \bar{X})^2$	$s_1^2 = \sum I^2$	
Variation résiduelle	N-2	$\sum R^2 = \sum T^2 - \sum I^2$	$s_R^2 = \frac{\sum R^2}{(N-2)}$	

$$F_1 = \frac{s_1^2}{s_R^2} \cdot F_{(\alpha; 1; n-2)}$$

$s_1^2$  = variance due à la régression

$s_R^2$  = variance résiduelle ou variance des résidus

### Méthodes de linéarisation

M1S2 SM-APC

Métrologie et chimométrie – validation intralaboratoire - applications

14

## II-1-2 Justesse

### II-1-2 Justesse

#### Se calcule sur la FPR

#### Calcul des recouvrements

$$\text{recouvrement} = \frac{\text{teneur expérimentale}}{\text{teneur théorique}} \cdot 100$$

#### Systeme de référence : D<sub>2</sub>

$$re_{ij} = \frac{y_{ij} - a_2}{b_2 \cdot x_{ij}} \cdot 100$$

#### Systeme de référence : étalon à 100%

$$re_{ij} = \frac{y_{ij} \cdot x_{100}}{y_{100} \cdot x_{ij}} \cdot 100$$

#### Vérification homogénéité des variances (test de Cochran)

#### Détermination du taux de recouvrement moyen et de son intervalle de confiance

$$Ire = re \pm \frac{t_{(\alpha; N-1)} \cdot S}{\sqrt{N}}$$

M1S2 SM-APC

Métrologie et chimométrie – validation intralaboratoire - applications

15

## II-1-2 Justesse

Etude de l'exactitude sur la forme pharmaceutique reconstituée (référence : droite de régression PA seul)									
%pA	date de l'analyse	pesée mg = x <sub>i</sub>	Surface du pic = y <sub>i</sub>	re					
							a	b	
	15.12.04	96,5	76626	100,96			-353,4589	790,1091	
60	16.12.04	96,8	75154	99,92	0,46701224		16.12.04	-659,8276	783,823
	17.12.04	96,7	76949	101,21			17.12.04	-2332,6355	800,8935
	15.12.04	130	103197	100,81					
80	16.12.04	129,8	101786	100,89	0,0713943				
	17.12.04	129,7	101858	100,30					
	15.12.04	161,8	128105	100,48					
100	16.12.04	161,5	126865	100,74	0,02687005				
	17.12.04	161,2	127788	100,79					
	15.12.04	195,5	155967	101,20					
120	16.12.04	195,3	153848	100,93	0,642941				
	17.12.04	195,3	153608	99,70					
	15.12.04	227,8	181879	101,25					
140	16.12.04	228,6	180355	101,02	0,26718633				
	17.12.04	228,2	180909	100,26					
				$s^2$	0,47		$s^2_{max}/2s^2$	0,317	$C_{(0,95; 2)}$
				$m$	100,69				0,88
Intervalle de confiance		$Ire \pm \frac{t_{0,05; 14} \cdot S}{\sqrt{N}}$							
$t_{0,05; 14}$	2,145								
Intervalle de confiance	100,69	$\pm$	0,26816811						
	100,7±0,3								

M1S2 SM-APC

Métrologie et chimométrie – validation intralaboratoire - applications

16

## II - Mise en oeuvre pratique (SFSTP)

### II-1 Linéarité et justesse

#### II-1-1 Linéarité

#### II-1-2 Justesse

### II-2 Fidélité

- **trois séries** indépendantes de six déterminations à 100% de la concentration théorique

- à raison d'une série par jour (fidélité intermédiaire) ou dans des laboratoires différents (reproductibilité)

- sur la **Forme Pharmaceutique Reconstituée (FPR)** ou sur un lot homogène du **produit fini**

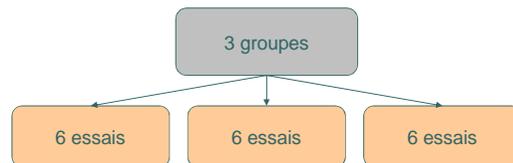
N échantillons de teneur connue  $x_{ij}$  : k groupes (j varie de 1 à k) de n (i varie de 1 à n) (au minimum N=18, k=3, n=6)

$y_{ij}$  = signal mesuré

## II-2 Fidélité

Groupe	pesée mg = $x_{ij}$	Surface du pic = $y_{ij}$
1	162.8	129250
	162.3	128913
	163	129414
	162.9	129463
	162.5	129145
	162.1	129739
	161.8	128105
2	162	127696
	162.3	128179
	160.6	126673
	161.2	127474
	161.1	126867
	161.6	127375
	161.5	126865
3	161.7	127775
	162.5	128688
	162.7	128784
	163.5	128907
	162.9	128633
	161.5	127535
	161.2	127788

## II-2 Fidélité



6 essais → Conditions de répétabilité

$$CV_r = 100 \cdot \frac{S_r}{m}$$

3 groupes → Conditions de fidélité intermédiaire  
Conditions de reproductibilité si labos différents

$$CV_R = 100 \cdot \frac{S_R}{m}$$

## II-2 Fidélité

### Calcul des recouvrements

$$\text{recouvrement} = \frac{\text{teneur expérimentale}}{\text{teneur théorique}} \cdot 100$$

☉ **Système de référence :  $D_1$**

$$re_{ij} = \frac{y_{ij} - a_1}{b_1 \cdot x_{ij}} \cdot 100$$

☉ **Système de référence : étalon à 100%**

$$re_{ij} = \frac{y_{ij} \cdot x_{100}}{y_{100} \cdot x_{ij}} \cdot 100$$

**Analyse de variances (ANOVA) à un facteur contrôlé**



### III - Le profil d'exactitude

#### Validation par construction du profil d'exactitude NF V03-110 (Mai 2010)

- évaluation simultanée de la justesse et de la fidélité
- outil visuel de décision sur les performances globales d'une méthode

S'appuie sur deux concepts complémentaires :

**L'intervalle d'acceptabilité (ou limite d'acceptabilité) :** spécification de la performance exigée pour la méthode, exprimée comme un écart acceptable autour de la valeur de référence. Les limites de l'intervalle sont fixées par le client ou par une obligation réglementaire, parfois en fonction du niveau de concentration. Elles sont notées  $\pm \lambda$  en valeurs absolues et dans l'unité du mesurande ou  $(1 \pm \lambda) \times 100$  en valeurs relatives

**L'intervalle de tolérance d'espérance  $\pi$  (intervalle de tolérance) :** intervalle qui contient en moyenne une proportion  $\pi$  % définie de futurs mesurages, obtenus selon un mode opératoire donné et pour une concentration donnée. NOTE 1 Les limites de l'intervalle sont obtenues par le calcul à partir d'essais réalisés en vue de la validation. NOTE 2 Une valeur de  $\pi$  de 80 % signifie qu'en moyenne un résultat sur cinq sera en-dehors des limites de l'intervalle au niveau de la limite de quantification.

$$\Pr(|V_{ref} - V_{mes}| < \lambda) \geq \pi$$

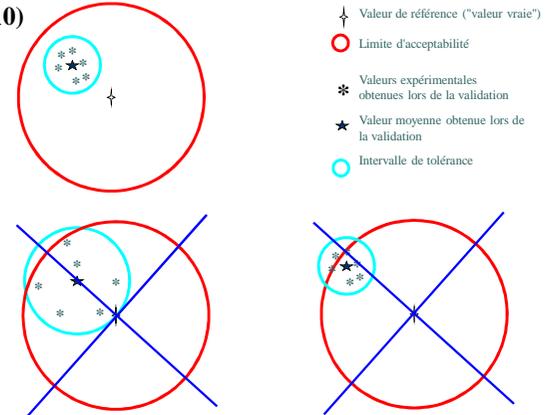
M1S2 SM-APC

Métrologie et chimométrie – validation intralaboratoire - applications

25

### III - Le profil d'exactitude

#### Validation par construction du profil d'exactitude NF V03-110 (mai 2010)



M1S2 SM-APC

Métrologie et chimométrie – validation intralaboratoire - applications

26

### III - Le profil d'exactitude

#### Validation par construction du profil d'exactitude NF V03-110 (Mai 2010)

Étapes de réalisation d'un profil d'exactitude :

- 1 - Définition domaine de validation, de la limite d'acceptabilité, de la probabilité  $\pi$
- 2 - Sélection échantillons de validation de valeurs de référence connues
- 3 - Choix du plan d'expérience de validation
- 4 - Choix du plan d'expérience d'étalonnage
- 5 - Collecte des données de validation et d'étalonnage (calcul des coefficients des modèles d'étalonnage)
- 6 - Calcul des critères de validation (fidélité, justesse, intervalles de tolérance)
- 7 - Construction du profil d'exactitude
- 8 - Interprétation des résultats

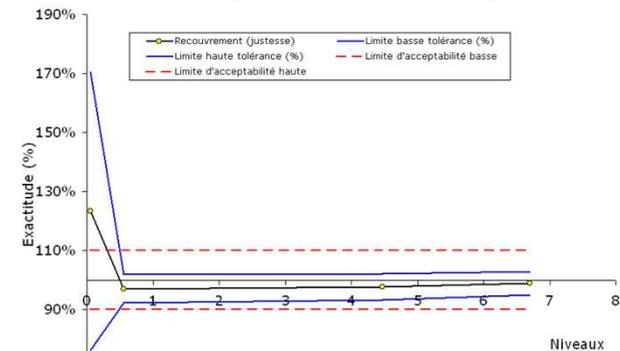
M1S2 SM-APC

Métrologie et chimométrie – validation intralaboratoire - applications

27

### III - Le profil d'exactitude

**profil d'exactitude :** combinaison, sous une forme graphique, d'un ou plusieurs intervalles de tolérance d'espérance  $\pi$  calculés à différents niveaux de concentration et d'un ou plusieurs intervalles d'acceptabilité.



M1S2 SM-APC

Métrologie et chimométrie – validation intralaboratoire - applications

28

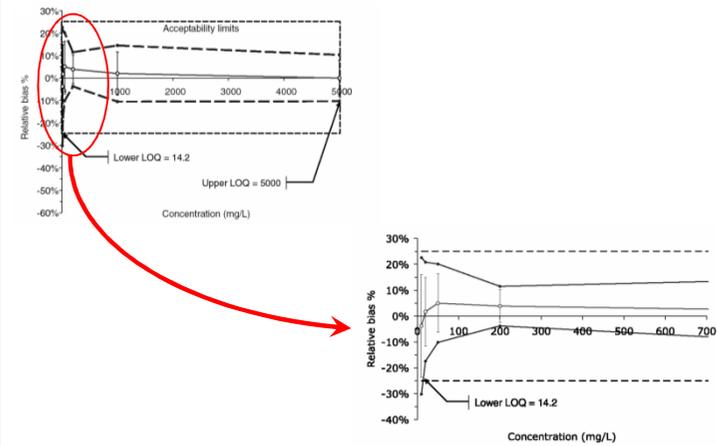
### III - Le profil d'exactitude

#### Validation par construction du profil d'exactitude NF V03-110 (Mai 2010)

Exemple d'application :

- travail dans des conditions de **fidélité intermédiaire**  
exemple : 6 concentrations réparties sur le domaine de validation, 5 jours d'analyse, 2 analyses par jour et par concentration
- analyse d'étalons (courbe d'étalonnage, 60 analyses) et de standards de validation (ajout connu dans matrice, 60 analyses) dans ces conditions de fidélité intermédiaires
- détermination de la courbe d'étalonnage (pas forcément linéaire)
- calcul du recouvrement pour chaque standard de validation
- calcul de la répétabilité (2 analyses par jour), de la fidélité intermédiaire (2 injections sur 5 jours)
- représentation graphique du biais en % (recouvrement - 100%) et de l'intervalle de tolérance associé pour chaque concentration.

### III - Le profil d'exactitude



### III - Le profil d'exactitude

#### Validation par construction du profil d'exactitude NF V03-110 (Mai 2010)

- une seule série de manipulation → méthode adaptée ou non
- prise de décision simple, immédiate, visuelle
- outil visuel de décision sur les performances globales d'une méthode

## Métrie Chimométrie

FIN DE  
VALIDATION INTRALABORATOIRE  
DES METHODES D'ANALYSE

Applications

