



Recherche pour la référence

Le profil d'exactitude un outil pour décider et diagnostiquer la validité d'une méthode analytique

M. Laurentie, J.-M. Delmas, Afssa, Fougères (France)

Laurentie M., Delmas J.-M. (2010). Le profil d'exactitude, un outil pour décider et diagnostiquer la validité d'une méthode analytique, EuroReference, n° 3, ER03-10R01. <http://www.afssa.fr/euroreference/numero3/PN5001.htm>



« Validation » de méthode et « détermination des critères de performance » d'une méthode sont souvent confondues. Une commission de la Société française des sciences et techniques pharmaceutiques (SFSTP) a développé un nouvel outil permettant de comparer domaine de validation et domaine de validité. Cet outil, nommé profil d'exactitude, est basé sur l'utilisation de l'erreur totale déterminée à partir des critères de performance tels que justesse et fidélité. Il s'agit d'un outil de décision mais également de diagnostic comme le montre l'exemple d'application.

Introduction

La confusion entre validation des méthodes analytiques et critères de performances d'une méthode analytique est souvent observée. Par exemple dans la clause 5.4.5.1 de la norme ISO 17025 : 2005 la validation est définie de la manière suivante : « la validation est la confirmation par examen et l'apport de preuves objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies » (Feinberg, 2009). Il existe de nombreuses autres définitions, chaque domaine ayant défini par des textes réglementaires ou normatifs ce qu'était la validation des méthodes. Ce qui est moins bien défini est la détermination des critères de performance. Si généralement les critères sont communs et admis (linéarité, répétabilité, justesse, exactitude...) il n'est pas clairement précisé de protocoles ni de règles pour valider la méthode. Le concept de l'erreur totale permet de superposer un intervalle défini par les critères de performance à un intervalle d'acceptation résultant de spécifications réglementaires ou de laboratoires.

Objectifs

L'apport de preuves objectives passe généralement par l'utilisation de statistiques. Cependant ces statistiques ne sont pas toujours correctement utilisées car elles ne font pas l'objet d'une discussion *a priori* entre l'analyste et le statisticien. Différents points de vue sont confrontés :

- l'analyste qui sait, par expérience, que sa méthode est bonne ou pas bonne et qui se la voit accepter ou refuser lors de l'analyse statistique ;
- le statisticien qui veut garantir sur le plan statistique que la méthode soit bonne ;
- le client qui souhaite avoir un bon résultat et que la méthode soit garantie bonne.

Pour concilier ces trois points de vue il faut pouvoir disposer d'un outil qui soit facile à utiliser pour l'analyste, qui garantisse les résultats obtenus et qui soit présentable pour le client.

C'est sur cette constatation qu'une commission de la Société française des sciences techniques et pharmaceutiques (SFSTP) a développé un concept de validation basé sur l'erreur totale et le profil d'exactitude (Hubert *et al.*, 2004 ; Hubert *et al.*, 2007a ; Hubert *et al.*, 2007b ; Hubert *et al.*, 2008 ; AFNOR 2010).

Le profil d'exactitude

L'exactitude est la somme de la justesse (biais en statistique) et de la fidélité (erreur systématique). Ce sont des critères

de performance d'une méthode qui ne garantissent pas que la méthode soit apte pour ce qu'elle doit faire en routine. La validation de la méthode doit permettre de vérifier que les critères de performance sont en adéquation avec l'objectif de la méthode. De plus si à l'issue de l'étude la méthode n'est pas validée, il serait intéressant d'identifier les sources d'erreur. Sur le plan statistique, comment est formalisée cette question ? Pour l'analyste et le statisticien, ainsi que pour le client, une bonne méthode signifie que le résultat fourni ne s'écarte pas trop de la vraie valeur ce qui peut s'écrire (équation 1) :

$$\text{Équation 1} \quad x - \mu_T$$

avec μ_T la valeur vraie.

Pour accepter que cette différence soit faible, il faut que cette différence soit bornée par des limites d'acceptation notées $\pm \lambda$, ce qui peut s'écrire (équation 2) :

$$\text{Équation 2} \quad -\lambda < x - \mu_T < \lambda \iff |x - \mu_T| < \lambda$$

Deux notions distinctes apparaissent : (i) une limite d'acceptation de performance et (ii) une décision par l'analyste d'accepter ou de rejeter une méthode en fonction de ses performances. Garantir les résultats signifie de fixer le risque attendu de mesures en dehors des limites d'acceptation. Ce risque doit être fixé *a priori* et se traduira par une probabilité (équation 3) :

$$\text{Équation 3} \quad (P | x - \mu_T | < \lambda) \geq \beta$$

avec β la proportion de mesures dans les limites d'acceptation $\pm \lambda$. La réalisation du plan d'expérience pour évaluer les critères de performance implique généralement des répétitions et plusieurs niveaux de concentrations. De ce fait la garantie des résultats doit se faire pour un intervalle de concentration. Pour satisfaire cette condition il convient de construire un intervalle de confiance de mesures attendues sur le domaine couvert par les concentrations. Cet intervalle de confiance de mesures attendues au niveau β s'exprime par (équation 4) :

$$\text{Équation 4} \quad E_{\mu, \sigma} \{ P[|x - \mu_T| < \lambda] / \hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M \} \geq \beta$$

avec E signifiant « valeur attendue » calculée à l'instant des mesures en fonction des estimateurs du biais ($\hat{\mu}_M$) et de la variance ($\hat{\sigma}_M$) à disposition de l'analyste. La figure 1 illustre un profil d'exactitude.



Recherche pour la référence

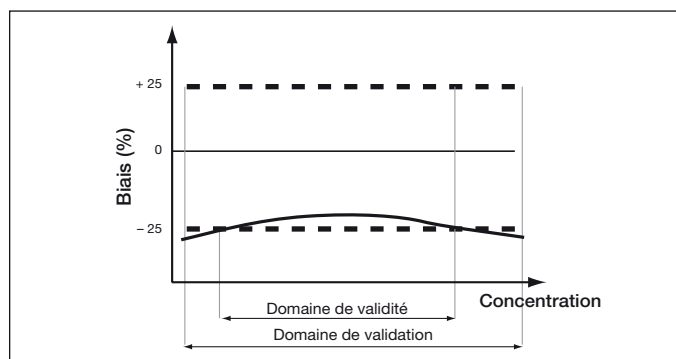


Figure 1 : Les lignes pointillées délimitent l'intervalle d'acceptabilité à $\pm \lambda$, ici $\pm 25\%$, c'est-à-dire où le biais peut varier entre 75 et 125 %. Cet intervalle représente le domaine de validation. Les lignes continues représentent l'intervalle de tolérance ou profil d'exactitude. L'intersection entre les lignes d'acceptabilité et les bornes de l'intervalle de tolérance délimitent le domaine de validité. À l'intérieur de ce domaine la méthode est capable de produire une proportion élevée et connue de résultats acceptables.

Cet outil permet de décider ou non de la validité de la méthode en superposant le domaine de validation souhaité et le domaine de validité acceptable en fonction des critères de performance de la méthode.

Il permet également d'être un outil de diagnostic comme le montre l'exemple suivant.

Exemple d'application: dosage de l'acrylamide dans le plasma de porc

L'acrylamide est un produit neurotoxique néo-formé lors de la cuisson de certains aliments. Il est issu d'une réaction de Maillard par combinaison de sucre (i.e. glucose) et de certains acides aminés comme l'asparagine. Si de nombreuses études documentent la teneur en acrylamide dans les aliments, peu d'études ont permis d'en quantifier l'absorption après ingestion. Une étude de pharmacocinétique, réalisée chez le porc doit permettre de déterminer la biodisponibilité de l'acrylamide. Au préalable une méthode analytique est nécessaire pour quantifier dans le plasma de porc les concentrations en acrylamide. La méthode retenue pour effectuer ce dosage est une méthode HPLC associée à une détection par spectrométrie de masse (SM). La gamme étudiée varie de 10 à 5000 ng/mL, compte tenu de l'absence d'information sur les taux plasmatiques circulants après ingestion d'aliment contenant de l'acrylamide. Deux gammes sont préparées: une gamme standard d'étalonnage et une gamme dans du plasma de porc (standard de validation). À 200 μ L de plasma est ajouté 100 μ L de solution saturée de $ZnSO_4$ puis 1000 μ L d'acétonitrile et 100 μ L de standard interne (acrylamide D5). Après agitation et centrifugation le surnageant est évaporé. L'éluât est repris avec 200 μ L d'acétate d'ammonium 0,01M pH 6. Le volume d'injection est de 50 μ L. Les conditions analytiques utilisées sont un débit chromatographique de 0,2 mL/min à travers une colonne Hypercarb (5 μ 50-2 mm) et une détection SM sur l'ion moléculaire 72 de l'acrylamide. La gamme standard d'étalonnage en acrylamide varie de 10 à 5000 ng/mL et est réalisée dans une solution d'acétate d'ammonium 0,01M ramenée à pH 6 avec de l'acide formique.

Le plan d'expérience utilisé consiste en trois jours, six niveaux et deux répétitions (3x6x2) soit 36 essais pour les standards d'étalonnage et de validation.

La figure 2 présente les réponses obtenues en fonction des concentrations introduites pour la gamme d'étalonnage et pour la gamme de standards de validation.

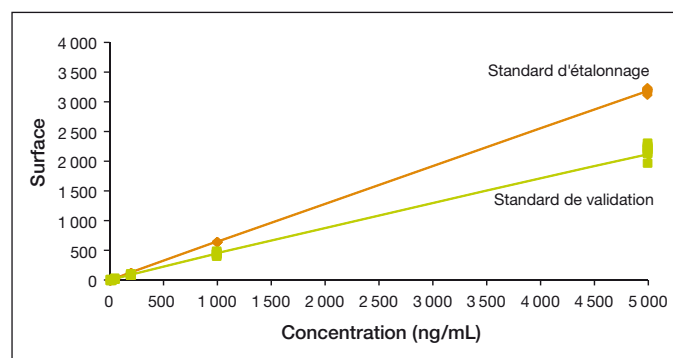


Figure 2. Données brutes observées. Les résultats sont obtenus sur trois jours et pour deux répétitions par niveau. À noter l'effet matrice entre les standards d'étalonnage (en orange) et les standards de validation (en vert).

Les données ont été traitées en trois étapes:

- analyse des données brutes et tracé du profil d'exactitude;
- une analyse pour déterminer le coefficient de correction de l'effet de matrice (soit l'inverse du taux de recouvrement);
- le calcul des profils d'exactitude après correction des concentrations.

Analyse des données brutes

La fonction de réponse utilisée pour décrire la relation entre les concentrations et la réponse est une régression quadratique pondérée (facteur de pondération de type 1/X avec X = concentration introduite).

La figure 3 présente le profil d'exactitude obtenu.

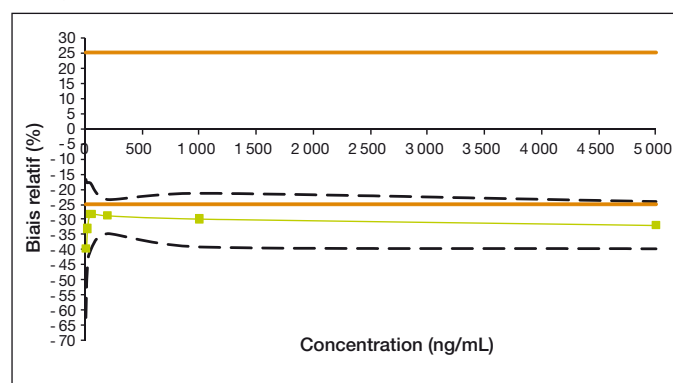


Figure 3. Profil d'exactitude réalisé avec les données brutes. Les résultats sont obtenus avec une régression quadratique pondérée pour modéliser la fonction de réponse.

Un décalage est observé entre le profil d'exactitude et les limites d'acceptabilité qui ont été fixées à 25 %. Ce décalage est dû à l'effet matrice. Il faut donc estimer un facteur de correction correspondant au biais de la méthode.

Pour faire ce calcul une équation de type $ax+b$ entre les valeurs théoriques et les valeurs calculées en retour est utilisée. La pente de l'équation entre les concentrations en retour et les concentrations théoriques correspond à l'inverse du facteur de correction considéré.



Recherche pour la référence

La figure 4 illustre ces calculs.

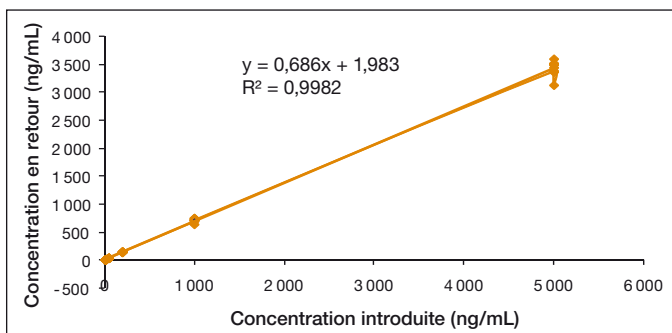


Figure 4. Droite de régression entre les concentrations introduites et les concentrations en retour.

L'équation de la droite est :

$$(\text{Concentration en retour}) = 0,686 * (\text{Concentration introduite}) + 1,983$$

Le coefficient de détermination (r^2) est de 0,9982.

Le facteur de correction (Fc) à appliquer est donc de :

$$Fc = \frac{1}{\text{pente}} = \frac{1}{0,686} = 1,457$$

Un nouveau calcul du profil d'exactitude est réalisé en tenant compte du facteur de correction. La correction est effectuée sur les réponses.

La figure 5 montre le profil d'exactitude obtenu.

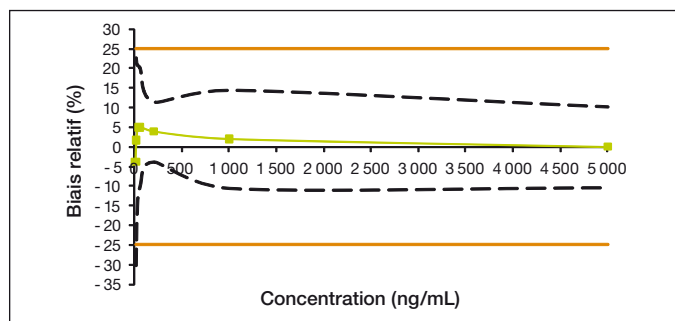


Figure 5. Profil d'exactitude réalisé avec les données corrigées. Les résultats sont obtenus avec une régression quadratique pondérée (type 1/X) pour modéliser la fonction de réponse.

La méthode n'est pas validée sur le domaine étudié. En effet, la borne inférieure du profil d'exactitude est au-delà de la limite d'acceptation fixée (25 %) pour le niveau de concentration égal à 10 ng/mL.

Le calcul de la limite de quantification inférieure et supérieure donne respectivement comme valeur 14,05 ng/mL et 5000 ng/mL. La limite de détection est estimée à 1,02 ng/mL.

Le tableau 1 résume pour l'ensemble des niveaux de concentrations les résultats obtenus.

La validation montre, sur la base d'un modèle de régression quadratique pondérée, que l'intervalle de dosage est établi entre 14,05 et 5000 ng/mL. Il est également montré que l'effet matrice est systématique et que pour le corriger il faut appliquer un facteur de correction de 1,457.

Le profil d'exactitude est un outil de diagnostic permettant de situer le ou les points critiques de la méthode. En effet, la méthode peut être biaisée et dans ce cas le profil d'exactitude permet de valider un facteur de correction. La méthode peut présenter une forte variabilité ce qui se traduira sur le profil par un intervalle de tolérance plus large que le domaine de validation. La décomposition en répétabilité et fidélité intermédiaire permettra d'identifier la source qui provoque cette variabilité.

Références bibliographiques

- Afnor. 2010. Norme Afnor NF V03-110:2010. Protocole de caractérisation en vue de la validation d'une méthode d'analyse quantitative par construction du profil d'exactitude, Afnor, Paris.
- Feinberg M. 2009. Labo-Stat, Guide De Validation Des Méthodes D'analyse. Tec & Doc Lavoisier, Paris, France: 361 pp.
- Hubert P, Nguyen-Huu J, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, Compagnon P, Dewe W, Feinberg M, Lallier M, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Nivet C, Valat L. 2004. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP Proposal – Part I. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 36(3) : 579-586.
- Hubert P, Nguyen-Huu J, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, Compagnon P, Dewe W, Feinberg M, Lallier M, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Nivet C, Valat L, Rozet E. 2007a. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal – Part II. *J. Pharma. Biomed Anal.*, 45(1) : 70-81.
- Hubert P, Nguyen-Huu J, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, Compagnon P, Dewe W, Feinberg M, Lallier M, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Nivet C, Valat L, Rozet E. 2007b. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal – Part III. *J. Pharma. Biomed Anal.*, 45(1) : 82-96.
- Hubert P, Nguyen-Huu J, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, Compagnon P, Dewe W, Feinberg M, Lallier M, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Nivet C, Valat L, Rozet E. 2008. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal. Part IV. Examples Of Application. *J. Pharma. Biomed Anal.*, 48(3) : 760-771.

Tableau 1. Résultats des calculs du profil d'exactitude après correction des données brutes.

		Niveau de concentrations introduites (ng/mL)					
		10	20	50	500	1000	5000
Limite de l'intervalle de tolérance β -expectation	Inférieure	6,98	16,52	44,93	192,5	894,8	4 482
	Supérieure	12,26	24,16	60,07	223,0	1145	5515
Limite de l'intervalle de tolérance β -expectation relative (%)	Inférieure	- 30,18	- 17,40	- 10,14	- 3,77	-10,52	- 10,35
	Supérieure	22,59	20,82	20,15	11,50	14,48	10,30
Écart-type de répétabilité		0,61	0,43	1,62	5,78	32,26	136,7
Écart-type de fidélité intermédiaire		0,99	1,31	2,81	6,32	48,01	199,2
CV répétabilité (%)		6,08	2,14	3,25	2,89	3,23	2,73
CV fidélité intermédiaire (%)		9,92	6,57	5,63	3,16	4,80	3,98
Concentration prédite inverse (ng/mL)		9,62	20,34	52,50	207,7	1020	4999
Biais absolu (ng/mL)		- 0,38	0,34	2,50	7,73	19,78	- 1,35
Biais relatif (%)		- 3,80	1,71	5,00	3,87	1,98	- 0,03
Recouvrement (%)		96,20	101,7	105	103,9	102	99,97