

## Chapitre 4

### Paramètres de validation d'une méthode analytique

#### 1. Spécificité

**Définition :** Aptitude d'une méthode analytique à mesurer sans ambiguïté l'analyte en présence d'autres composants susceptibles d'être présents (rende compte sans ambiguïté de la substance analysée en présence d'autres composés présents)

Ces composants peuvent être : impuretés, produits de dégradation.....

#### 2. Sélectivité

**Définition :** capacité à différencier et quantifier l'analyte cible en présence d'interférents dans l'échantillon.

#### 3. Linéarité

**Définition :** C'est la capacité d'une méthode d'analyse, à l'intérieur d'un certain intervalle, à obtenir des résultats directement proportionnels à la quantité ou à la concentration de substance à doser.

Elle traduit l'existence d'une relation de type :  $y = a \cdot x + b$

#### 4. Intervalle de linéarité (Gamme)

**Définition :** Intervalle de linéarité est l'intervalle compris entre la concentration la plus élevée et la plus faible de l'échantillon dans lequel il a été démontré que la méthode d'analyse présente une fidélité, une exactitude et une linéarité satisfaisante.

Il est **borné** par :

- une **limite basse** (souvent  $\geq$  LOQ)
- une **limite haute** (saturation, déviation à Beer-Lambert)

#### *Exemple en UV-Visible (Beer-Lambert)*

La loi de Beer-Lambert :

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C$$

□ Valable **uniquement dans un intervalle limité**.

#### Exemple

- Linéarité observée entre **2 et 10 mg·L<sup>-1</sup>**

- Au-delà : saturation, lumière parasite → non-linéarité

## Différence à ne pas confondre

Notion	Signification
Linéarité	Qualité de la relation
Intervalle de linéarité	Domaine où cette relation est valide

### 5. Vérification de la linéarité d'une méthode analytique

1. Préparer une gamme étalon
2. Mesurer la réponse analytique
3. Tracer la droite d'étalonnage
4. Analyser le Coefficient de corrélation ( $R^2$ )

#### ❖ Coefficient de corrélation ( $R^2$ )

Le coefficient de détermination  $R^2$  mesure la qualité de l'ajustement linéaire entre :

- $x$  : concentration
- $y$  : réponse instrumentale (absorbance, aire HPLC...)

$$0 \leq R^2 \leq 1$$

- $R^2 = 1$  → relation parfaitement linéaire
- $R^2$  proche de 1 → très bonne linéarité
- $R^2$  faible → mauvaise corrélation

$$R^2 = 1 - \frac{(y_i - \hat{y}_i)^2}{(y_i - \bar{y})^2}$$

Où :

- $y_i$  : valeur mesurée
- $\hat{y}_i$  : valeur prédite par la droite
- $\bar{y}$  : moyenne des réponses

## Remarque

Un coefficient de corrélation  $R^2$  proche de 1 garantit que la méthode est linéaire.

## 6. Justesse, fidélité (répétabilité et reproductibilité).

### 6.1. Justesse

**Définition :** La justesse exprime la différence entre un ensemble de valeurs mesurées (la valeur moyenne des mesures) à l'infini et une valeur de référence. La vraie valeur de la justesse est déterminée par rapport à un matériau de référence certifié (MRC). Dans le cas d'absence de MRC, une valeur qui est acceptée comme une valeur conventionnellement vraie peut être utilisée.

Il existe plusieurs modes d'expression de la justesse car le paramètre de validation qui la caractérise est **le biais**, qui peut être exprimé de façon **absolue ou relative**.

$$\text{Biais} = \bar{x} - x_{\text{réf}}$$

**MRC :** Les matériaux de référence certifiés

### Exemple UV-Visible

- Dosage d'un principe actif
- Concentration théorique : 10 mg/L
- Moyenne mesurée : 10,2 mg/L

$$\text{Biais} = 10,2 - 10 = 0,2 \text{ mg/L} \longrightarrow (\text{Justesse} = 2\%)$$

❖ En général, on dit que la méthode est **Just** ou bien **n'pas Just**

### 6.2. Fidélité (Precision)

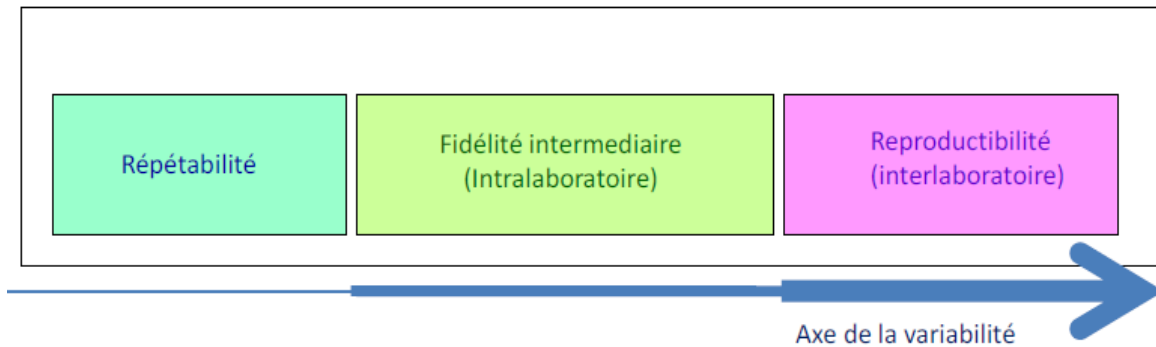
**Définition :** La fidélité est la proximité des résultats obtenus entre eux lorsqu'une mesure est répétée dans les mêmes conditions ou dans des conditions différentes.

- La fidélité peut être évaluée à trois niveaux (figure 1) : la répétabilité, la fidélité intermédiaire (intra-laboratoire) et la reproductibilité (interlaboratoires).
- La fidélité n'indique pas la justesse, mais la dispersion des mesures.

➤ La fiabilité est exprimée par écart-type ou coefficient de variation (CV%).

a) Écart-type  $s_r$  
$$s_r = \sqrt{\frac{(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

b) Coefficient de variation CV(%) 
$$CV(\%) = \frac{s_r}{\bar{x}} \times 100$$



## 6.3. Types de fidélité

### 6.3.1. La répétabilité

**Définition :** La répétabilité est le degré d'accord entre des résultats obtenus par la même méthode, sur des échantillons identiques, dans des conditions identiques :

❖ *Conditions de répétabilité*

- même opérateur
- même appareil
- même laboratoire
- court intervalle de temps

❖ Elle correspond à la **fidélité à court terme**.

### 6.3.2. La reproductibilité

**Définition :** La reproductibilité est l'aptitude d'une méthode de mesure à donner des résultats proches entre eux lorsque la mesure est réalisée dans des conditions différentes.

➤ C'est une mesure de la fidélité (precision), pas de la justesse.

❖ **Conditions de reproductibilité**

Les mesures sont réalisées :

- par **des opérateurs différents**
- avec **des instruments différents**
- dans **des laboratoires différents**
- à des **dates différentes**

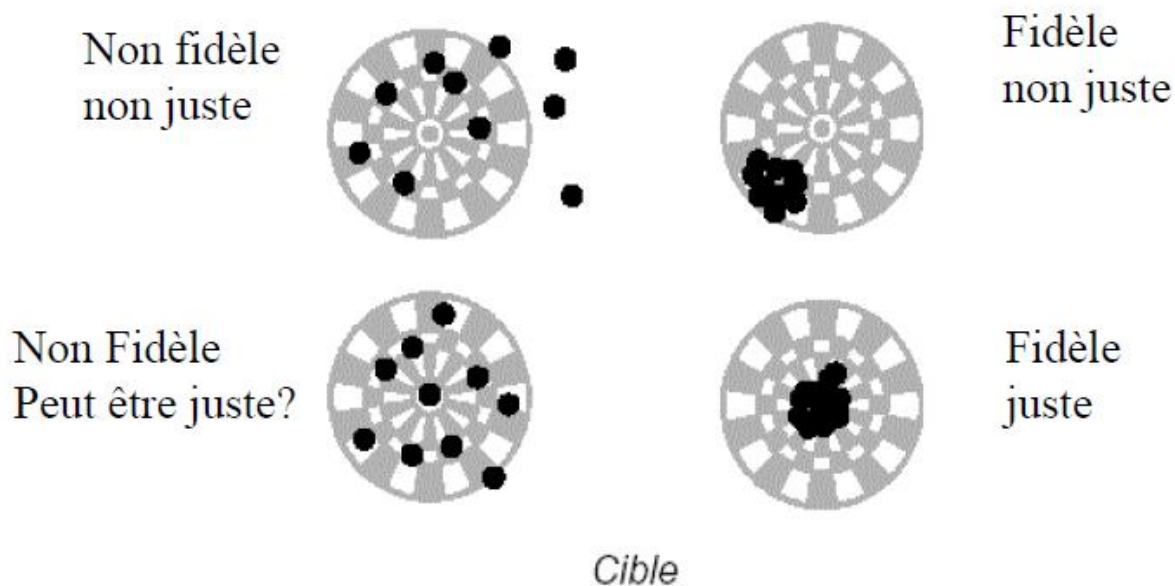
☐ C'est le **cas le plus défavorable** de la fidélité.

**6.4. Reproductibilité vs répétabilité**

Critère	Répétabilité	Reproductibilité
Dispersion	Dispersion lors de mesures immédiates	Dispersion sur plusieurs jours
Opérateur	Même	Différent
Instrument	Même	Différent
Lieu	Même labo	Labo différent
Temps	Court	Long
Variabilité	Faible	Plus élevée

**6.5. Lien Justesse vs Fidélité**

Fidélité	Justesse	Interprétation
Bonne	Bonne	Méthode fiable ✓
Bonne	Mauvaise	Méthode fidèle mais biaisée ✗
Mauvaise	Bonne	Résultats dispersés malgré valeur moyenne correcte
Mauvaise	Mauvaise	Méthode inutilisable ✗



## 7. LOD (limite de détection) et LOQ (limite de quantification).

Les limites de détection (LOD) et/ou de quantification (LOQ) sont des valeurs systématiquement rapportées dans les dossiers de validation. Les définitions sont nombreuses et il en a été recensé plus d'une cinquantaine

### 7.1. LOD (limite de détection)

**Définition :** La LOD est la plus faible quantité ou concentration d'un analyte détectable, mais non quantifiable avec précision.

- On peut dire : "présent / absent".

### 7.2. LOQ (limite de quantification)

**Définition :** La LOQ est la plus faible quantité ou concentration d'un analyte pouvant être détecté et quantifiée avec une fidélité et une justesse acceptables.

- On peut dire : "présent et mesurable correctement".

*« La LOD correspond à la concentration minimale détectable tandis que la LOQ correspond à la concentration minimale quantifiable avec une précision acceptable. »*

- ✓ LOD = détecter
- ✓ LOQ = quantifier

### 7.3. Relation fondamentale

$$\boxed{\text{LOQ} > \text{LOD}}$$

□ En pratique :

$$\text{LOQ} \approx 3 \times \text{LOD}$$

### 7.4. Méthodes de détermination (ICH Q2(R1))

#### 7.4.1. Méthode statistique (la plus utilisée)

$$\boxed{\text{LOD} = \frac{3,3 \sigma}{S}} \quad ; \quad \boxed{\text{LOQ} = \frac{10 \sigma}{S}}$$

Où :

- $\sigma$  = écart-type du blanc **ou** des résidus
- S = pente de la droite d'étalonnage

#### ❖ Exemple chiffré (UV-Visible)

Droite d'étalonnage :

$$A = 0,250C + 0,002$$

- Pente S = 0,250
- Écart-type du blanc  $\sigma = 0,004$

Calcul :

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \times 0,004}{0,250} = 0,053$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times 0,004}{0,250} = 0,16$$

✓ Résultat :

- **LOD = 0,053 mg/L**
- **LOQ = 0,16 mg/L**

## 8. Robustesse et stabilité.

### 8.1. Robustesse

**Définition :** Aptitude d'une méthode analytique à rester précise et juste lorsqu'elle est soumise à de petites variations délibérées de paramètres expérimentaux, telles celles susceptibles de se produire lors de sa mise en oeuvre par un autre opérateur, sur un autre matériel ou dans un autre laboratoire.

#### L'objectif :

- Évalue la **fiabilité de la méthode** face aux **conditions normales d'usage**
- Permet d'identifier les **paramètres critiques**

#### Exemples de variations testées

- pH du tampon
- Température
- Vitesse de rotation d'un agitateur
- Longueur d'onde de mesure ( $\pm 1$  nm)
- Volume de prélèvement

### 8.2. Stabilité

**Définition :** Capacité d'un analyte à conserver ses caractéristiques (concentration, structure) dans des conditions définies pendant un temps donné

#### L'objectif :

- Évalue la **conservation de l'échantillon** ou de la **solution standard**
- Évalue le stockage **des échantillons**

☒ **Lien avec la validation (ICH Q2(R1))**

Paramètre	Rôle
Robustesse	Garantir la fiabilité malgré variations mineures de procédure
Stabilité	Garantir que l'échantillon ou la solution n'évolue pas pendant la mesure

Dans un **plan de validation**, on fait généralement :

- Tests de robustesse  $\pm$  variations  $\pm$  paramètres critiques
- Tests de stabilité sur échantillons et standards pendant la période prévue d'utilisation