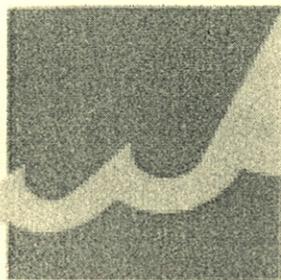


UNIVERSITE



DE LIMOGES

FACULTE  
DE  
PHARMACIE

ANNEE 2000

SCD UNIV. LIMOGES



D 035 033792 2

THESE N° 313/A

Contribution à l'optimisation des méthodologies.  
La validation analytique et ses limites :  
pré-requis, exigences, méthodes, application.



THESE  
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le mercredi 14 juin 2000

PAR

Richard AUBRETON  
Né le 08 mai 1972 à AUBUSSON (23)

EXAMINATEURS DE LA THESE

Monsieur le Professeur Philippe CARDOT  
Madame le Professeur Dominique CHULIA  
Madame Marie Françoise DREYFUSS, Maître de conférence  
Monsieur Florent BRAULT, Docteur en Pharmacie

Président  
Juge  
Juge  
Juge

## Remerciements

---

Mes remerciements s'adressent particulièrement à toutes les personnes qui m'ont aidées et m'ont soutenues pendant toutes mes études : ma famille et mes amis.

Je tiens à remercier les personnes qui se sont impliquées dans la réalisation de ce travail, au laboratoire de chimie analytique et de bromatologie de la faculté de Limoges, Monsieur le Professeur Philippe CARDOT, Madame Marie Françoise DREYFUSS, Maître de Conférence, pour leur aide et leur patience et Igor CLAROT pour son soutien.

Mes remerciements vont également à Madame le Professeur Dominique CHULIA et à Monsieur Florent BRAULT pour leur présence dans le jury de thèse.

Je remercie enfin tous les enseignants de la faculté de Limoges ainsi que mes maîtres de stages pour les connaissances qu'ils m'ont inculquées.

# Université de Limoges - Faculté de Pharmacie

---

DOYEN DE LA FACULTE

Monsieur le Professeur GHESTEM Axel

ASSESEURS

Monsieur le Professeur HABRIOUX Gérard  
Monsieur COMBY Francis

PROFESSEURS

BENEYTOUT Jean-Louis  
BERNARD Michel  
BOSGIRAUD Claudine  
BROSSARD Claude  
BUXERAUD Jacques

CARDOT Philippe  
CHULIA Albert  
CHULIA Dominique  
DELAGE Christiane  
DREYFUSS Gilles  
GHESTEM Axel  
HABRIOUX Gérard  
LACHATRE Gérard  
MOESCH Christian  
OUDART Nicole

BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE  
PHYSIQUE-BIOPHYSIQUE  
BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE  
PHARMACOTECHNIE  
CHIMIE ORGANIQUE CHIMIE &  
THERAPEUTIQUE  
CHIMIE ANALYTIQUE  
PHARMACOGNOSIE  
PHARMACOTECHNIE  
CHIMIE GENERALE et MINERALE  
PARASITOLOGIE  
BOTANIQUE et CRYPTOLOGIE  
BIOCHIMIE FONDAMENTALE  
TOXICOLOGIE  
HYGIENE et SANTE PUBLIQUE  
PHARMACODYNAMIE

POMMARET Maryse

SECRETARIAT GENERAL DE LA FACULTE  
CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

## Table des matières

	<i>Pages</i>
<b>Liste des figures.</b>	<b>7</b>
<b>Liste des graphiques et chromatogrammes.</b>	<b>8</b>
<b>Liste des tableaux.</b>	<b>9</b>
<b>Abréviations.</b>	<b>10</b>
<b>Introduction.</b>	<b>12</b>
<b>I. Validation analytique, aspects réglementaires et recommandations.</b>	<b>15</b>
I.1 Validation analytique : définitions.	15
I.2 Assurance qualité, son respect par la validation des méthodes d'analyse.	18
I.3 Historique de la validation : jusqu'aux recommandations ICH.	21
I.4 Validation des méthodes analytiques et milieu industriel.	23
I.4.1 Les champs d'application.	23
I.4.1.1 <i>Au niveau européen.</i>	23
I.4.1.2 <i>Au niveau américain.</i>	25
I.4.2 Les domaines d'application.	25
I.5 Critères de validation : outils statistiques.	27
I.5.1 Définitions et terminologie.	27
I.6 Rubriques et critères de validation.	29
I.6.1 Matrice des recommandations ICH.	29
I.6.2 Matrice des recommandations SFSTP.	30
I.6.3 Matrice des recommandations USP/NF.	31
I.6.4 Choix des critères de validation.	32
I.7 Le contenu d'un dossier de validation, aspect réglementaire en vue du dépôt d'un dossier d'autorisation de mise sur le marché.	32
<b>II. La place de la validation.</b>	<b>38</b>
II.1 Mise au point et validation initiale.	38
II.2 Mise au point et robustesse de la méthode.	40
II.2.1 Définitions.	40
II.2.2 Robustesse et reproductibilité.	43
II.2.3 Robustesse et tests de conformité.	44
II.2.4 Paramètres opératoires critiques.	44
II.2.5 Utilisation des plans factoriels.	45
II.3 Validation initiale et revalidation.	48
II.3.1 Validation de transfert et validation des méthodes issues d'un compendium.	48
II.3.2 Revalidation des méthodes analytiques.	50
II.3.3 Validation et conformité du système.	55
II.4 Quand ne pas revalider ?	56

<b>III.</b>	<b>Validation statistique des méthodes d'analyse.</b>	<b>59</b>
III.1	Mise en place d'un protocole de validation au laboratoire.	59
	III.1.2 Les procédures opératoires.	59
	III.1.3 Le plan de validation.	62
III.2	Le processus de validation et les pré-requis de la validation.	63
	III.2.1 Les étapes de la validation.	63
	III.2.2 Autre pré-requis de la validation.	65
	III.2.2.1 Stabilité des solutions.	65
	III.2.2.2 Echantillonnage et considérations statistiques.	66
III.3	Critères de validation, méthodologie, évaluation et interprétation.	69
	III.3.1 Etude de la linéarité.	70
	III.3.1.1 Stratégies d'évaluation.	70
	III.3.1.2 Critères d'acceptation.	74
	III.3.2 Intervalle de validité de la linéarité.	77
	III.3.3 Exactitude.	78
	III.3.3.1 Substances de référence, étalons et préparations témoins.	78
	<i>III.3.3.1.1 Les substances de référence.</i>	78
	<i>III.3.3.1.2 Les étalons.</i>	81
	<i>III.3.3.1.3 Les témoins.</i>	83
	III.3.3.2 Protocoles d'étude.	84
	III.3.3.3 Critères d'acceptation.	89
	III.3.4 Etude de la fidélité.	90
	III.3.4.1 Méthodologie.	92
	III 3.4.2 Interprétation des résultats.	94
	III.3.4.3 Fidélité et intervalle de validité de la linéarité.	96
	III 3.4.4 Précision de la méthode et précision du système.	96
III 3.5	Spécificité et sélectivité de la méthode.	98
	III 3.5.1 Principe actif.	98
	<i>III 3.5.1.1 Identification.</i>	98
	<i>III 3.5.1.2 Essai.</i>	99
	<i>III 3.5.1.3 Dosage.</i>	100
	III 3.5.2 Produit fini.	101
III 3.6	Seuil de détection et seuil de quantification.	103
	III 3.6.1 Seuil de détection de la méthode.	103
	III 3.6.2 Seuil de quantification de la méthode.	105
III 3.7	Sensibilité de la méthode.	109
III 3.8	Tests de conformité.	111

<b>IV.</b>	<b>Un exemple d'application, travaux préliminaires : mise au point d'une méthode de séparation d'hydrocarbures polyaromatiques en chromatographie liquide haute performance et illustration de l'utilisation du standard différé.</b>	<b>116</b>
IV.1	Le concept du standard différé.	117
IV.2	Mise au point d'une méthode de séparation des PAHs en CLHP.	119
	IV.2.1 Appareillage, produits purs et réactifs.	119
	IV.2.2 Qualification de l'appareillage.	120
	IV.2.2.1 Qualification de la pompe.	120
	IV.2.2.2 Qualification du détecteur.	123
	IV.2.2.3 Qualification du four.	126
	IV.2.2.4 Etude de la répétabilité de l'injection.	127
	IV.2.3 Vérification de la stabilité des paramètres opératoires.	129
	IV.2.4 Mise au point de la méthode de séparation. des hydrocarbures polyaromatiques.	129
IV.3	Mise en application du concept du standard différé.	134
	IV.3.1 Choix du standard différé.	134
	IV.3.2 Mise en place et illustration du concept du standard différé.	135
	<b>Conclusion.</b>	<b>140</b>
	<b>Annexe 1 : Chromatographie Liquide Haute Performance CLHP. Glossaire des termes techniques.</b>	<b>141</b>
	<b>Annexe 2 : Formules statistiques.</b>	<b>146</b>
	<b>Bibliographie.</b>	<b>163</b>

## Annexes

	<i>Pages</i>
Annexe 1 : Chromatographie Liquide Haute Performance CLHP Glossaire des termes techniques.	141
Annexe 2 : Formules statistiques.	146
1- Paramètres des droites de régression (estimation selon SFSTP (5), (6)) <i>Pente, ordonnée à l'origine et coefficient de corrélation.</i>	I
2- Test de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec zéro (méthode préconisée par la SFSTP (5), (6)).	II
3- Test de Comparaison des pentes des droites $D_1$ et $D_2$ (Selon SFSTP).	III
4- Test de comparaison des ordonnées à l'origine des droites $D_1$ et $D_2$ .	IV
5- Test de l'existence d'une pente significative (SFSTP (5), (6)).	V
6- Test de validité de la droite de régression (SFSTP).	VI
7- Test de validité des moyennes.	VII
8- Paramètres de fidélité d'une méthode.	VIII
9- Test d'homogénéité des variances.	IX
10- Intervalle de confiance (IC).	IX
11- Erreur relative (Er %).	IX
12- Recouvrement (r).	IX
13- Sensibilité de la méthode.	XI
14- Résolution (R).	XII
15- Nombre de plateaux théoriques (N).	XII
16- Facteur de traînée (T).	XIII
17- Facteur de capacité ( $k'$ ).	XIII
18- Test de Dixon, test d'élimination d'une valeur aberrante.	XIV
19- Glossaire.	XV

## Liste des figures

<i>Numéros</i>	<i>pages</i>
N° 1 : Mise au point et validation initiale	39
N° 2 : Validation de transfert et validation des méthodes issues d'un compendium.	49
N° 3 : Les étapes du processus de validation.	63
N° 4 : Etapes de qualification du matériel.	64
N° 5 : Etude de la linéarité.	76
N° 6 : Les étalons.	83
N° 7 : Les différents biais analytiques.	84
N° 8 : Etude de l'exactitude.	87
N° 9 : Etude de la fidélité.	93
N° 10 : Détermination maximale de l'amplitude du signal de base.	106
N° 11 : Hauteurs équivalentes des pics aux seuils de détection et de quantification.	106
N° 12 : Domaines de détection et de quantification.	108

## Liste des graphiques et des chromatogrammes

*Numéros* *pages*

---

### Graphiques

N° 1 : Etude de la corrélation quantité d'eau retrouvée/quantité d'eau théorique.	121
N° 2 : Etude de la corrélation débit appliqué/débit lu.	122
N° 3 : Linéarité de la réponse du détecteur.	124
N° 4 : Cinétique de montée en température du four.	126

### Chromatogrammes

N°1 : Séparation des PAHs, conditions opératoires optimisées.	133
N°2 : Nuage de pics et espace réservé au standard différé.	135
N°3 : Injection du standard différé seul.	136
N°4 : Illustration du concept du standard différé.	137

## Liste des tableaux

<i>Numéros</i>	<i>pages</i>
N° I : Matrice des recommandations ICH.	29
N° II : Matrice des recommandations SFSTP.	30
N° III : Matrice des recommandations USP/NF.	31
N° IV : <i>Typical Analytical Parameters Used In Assay Validation</i> USP/NF XXII (33).	42
N° V : <i>Typical Analytical Parameters Used In Assay Validation</i> USP/NF XXIII (34).	42
N° VI : Modifications "chimiques" de l'analyte ou de la forme pharmaceutique.	51
N° VI <sup>bis</sup> : Modifications "chimiques" de l'analyte ou de la forme pharmaceutique.	52
N° VII : Modifications "méthodologiques" apportées à une méthode de dosage par chromatographie liquide haute performance.	53
N° VIII : Valeurs admissibles des coefficients de variations de répétabilité.	95
N° IX : Paramètres de conformité et recommandations en CLHP.	112
N° X : Mesures des quantités d'eau retrouvées.	120
N° XI : Réponses du détecteur.	124
N° XII : Analyse de la régression.	125
N° XIII : Programmation des températures.	127
N° XIV : Répétabilité de l'injection.	128
N° XV : Concentration des solutions mères de PAHs.	132

## Abréviations utilisées

---

AFNOR	Agence Française de Normalisation
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
AS	Authentic Substances
AVA®	Aide à la Validation Analytique
BPF	Bonnes Pratiques de Fabrication
CEE/EEC	Communauté Economique Européenne
CFR	Codes of Federal Regulation
CLHP/HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
CSP	Comité des Spécialités Pharmaceutiques
CV	Coefficient de Variation
DDL	Degré De Liberté
FCC	Food Chemicals Codex
FDA	Food and Drug Administration
HEPT	Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique
ICH	International Conference on Harmonisation
ID	Internal Diameter
LOD	Limit Of Detection
LOQ	Limit Of Quantification
min	Minutes
mL	Millilitres
PBR	Préparations Biologiques de Référence
PMA	Pharmaceutical Manufacturer's Association
RS	Reference Substance
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAH	Poly Aromatic's Hydrocarburs
QI	Qualification d'Installation
QO	Qualification Opérationnelle
QP	Qualification Performance
QD	Qualification Développement
RS	Reference Standards
Rs	Résolution
RSD	Relative Standard Deviation
SCR	Substances Chimiques de Référence
SFSTP	Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques
Tm	Temps mort
Tr	Temps de rétention
USP/NF	United state Pharmacopoeia/National Formulary
UV	Ultraviolet
Vm	Volume mort
VMM®	Validation Method Management

## Introduction

---

La validation analytique est un sujet qui intéresse les industriels de la pharmacie depuis 1985, d'abord aux Etats-Unis, puis en Europe à partir de 1990.

Les exigences de l'industrie pharmaceutique en terme de qualité sont de plus en plus élevées et les validations des méthodes d'analyse sont des dispositions incontournables des systèmes d'assurance qualité des laboratoires de contrôle.

D'un point de vue réglementaire, la validation des méthodes d'analyse fait partie intégrante de la partie II des dossiers d'autorisation de mise sur le marché d'un produit pharmaceutique et s'applique à toutes les méthodes de contrôle, du contrôle des matières premières (excipients ou principes actifs) au contrôle des produits finis.

La validation doit s'inscrire dans une démarche globale de validation de tous les outils et moyens d'analyse. C'est en tenant compte de la qualification de l'appareillage, du contexte d'utilisation de la méthode, du suivi de ses performances tout au long de son utilisation que l'on doit concevoir une validation.

La validation accompagne la méthode d'analyse. De sa validation initiale (phase de développement analytique) à sa revalidation lorsque celle-ci est modifiée, les performances et les limites d'une méthode d'analyse seront sans cesse réévaluées et redéfinies au cours de sa mise en œuvre et au fil de son évolution.

Le noyau de la validation d'une méthode d'analyse repose sur l'évaluation statistique de certains critères, "véritables outils statistiques" dont l'éventail est fonction du type de méthode, de son utilisation mais aussi des référentiels choisis.

La réalisation d'une validation s'effectue selon des recommandations ou "guidelines". A l'heure actuelle, les méthodologies présentées dans ces guidelines au niveau européen tendent vers une harmonisation dans le choix des critères de validation par le biais des réunions ICH.

Cette phase de validation statistique suppose que tous les pré-requis de la validation analytique soient respectés et notamment que la conformité du système d'analyse, pendant le déroulement de l'analyse, soit vérifiée.

Appliqués à des méthodes de dosage par chromatographie liquide haute performance, système d'analyse instable et en évolution permanente, les paramètres de conformité classiques ne semblent pas suffisants pour juger de la stabilité du système.

La crédibilité du système d'analyse est assurée par l'utilisation des tests de conformité qui valident les résultats obtenus à un instant  $t$ . Ces tests permettent de juger des performances de l'outil d'analyse pendant le déroulement de l'analyse et sont particulièrement bien adaptés à la détection des variations brutales des paramètres opératoires. Leur utilisation à des fins plus précises pour juger des déviations lentes d'un système chromatographique à long terme n'est pas adaptée.

Nous envisagerons, pour pallier ce manque, l'utilisation d'un concept d'étalonnage né du besoin de la validation des systèmes chromatographiques en ligne, "le standard différé", concept qui permet de juger des dérives lentes de l'efficacité du chromatographe.

La validation analytique sera d'abord envisagée sous un aspect réglementaire, des recommandations opératoires à la constitution d'un dossier d'autorisation de mise sur le marché.

La validation sera replacée ensuite dans une démarche globale de validation décrivant les pré-requis de la validation statistique et les stratégies d'évaluation des critères statistiques. Les méthodologies exposées s'appliqueront plus particulièrement aux méthodes d'analyses par chromatographie liquide haute performance.

La dernière partie du document illustre l'emploi du standard différé sur une méthode d'analyse permettant la séparation en chromatographie liquide haute performance d'un mélange d'hydrocarbures polyaromatiques.

## **I. Validation analytique, aspects réglementaires et recommandations.**

## **I. Validation analytique, aspects réglementaires et recommandations.**

### **I.1 Validation analytique : définitions.**

Les définitions réglementaires de la validation d'analyses sont différentes selon les autorités concernées (3). Il s'agit principalement de la définition proposée par la Communauté Economique Européenne (CEE) et celle donnée par les représentants de l'USP/NF (United States Pharmacopoeia/National Formulary).

- définition européenne proposée par le CSP (Comité des Spécialités Pharmaceutiques) Qualité des Médicaments (EEC III/844/87 EN-FINAL août 89) :

"Le but de la validation d'une procédure d'analyse est de démontrer qu'elle correspond bien à l'usage pour lequel elle est prévue".

- définition USP/NF XXIII page 1982 (34)

"La validation analytique est le processus par lequel il est vérifié, par des études documentées, que les performances de la méthode proposée sont en accord avec les exigences requises pour son utilisation future".

La définition européenne relie la validation à la procédure d'analyse tandis que la définition américaine s'adresse à une méthode d'analyse et ses performances.

Une procédure d'analyse est définie comme étant l'ensemble des opérations nécessaires pour effectuer l'analyse de la substance à examiner : préparation de l'échantillon, des matériaux, préparation des produits de référence, des réactifs, emploi de l'appareillage, étalonnage, formule pour le calcul des résultats, nombre de répétitions et mode opératoire pour les répétitions.

Dans tous les cas, la procédure d'analyse inclut la méthode d'analyse.

Trois grands types de procédures d'analyses sont à distinguer (28) :

- La procédure d'analyse spécifique :

"C'est une procédure permettant de mesurer quantitativement un paramètre physico-chimique ou un groupement fonctionnel d'une substance ou de plusieurs substances différentes à examiner dans un même échantillon".

- La procédure d'analyse sélective :

"C'est une procédure permettant de détecter qualitativement une substance à examiner en présence des composants constituant l'échantillon".

- La procédure d'analyse absolue :

"C'est une procédure permettant de mesurer la pureté molaire d'une substance à examiner".

On désigne souvent dans la littérature par le terme de "rubriques" les différents cas d'analyse. Cette distinction est importante dans la stratégie de validation puisque vont dépendre du type d'analyse (rubrique) le choix des critères statistiques à valider (6), (8), (23), (28), (34).

Le choix des critères de validation, en fonction de la rubrique considérée et selon les autorités concernées sera détaillé dans la section "*1.6 Rubriques et critères de validation*".

Les rubriques retenues au niveau européen sont les suivantes :

- Identification : c'est la garantie de l'identité de la substance à analyser. Méthode qui permet de s'assurer de l'identité d'un analyte dans un échantillon. Ceci est généralement réalisé en comparant une propriété de l'échantillon (telle que son comportement chromatographique, spectrophotométrique ou sa réactivité chimique) avec celle de la substance de référence pour l'analyte considéré.
- Les essais : on évalue ici la teneur en impuretés de la substance à analyser. Ils sont de type quantitatif ou semi-quantitatif (essai limite).
- Le dosage : le dosage proprement dit s'intéresse à une mesure provenant de la substance à analyser. La substance à analyser peut également être une impureté. Une méthode de dosage s'applique le plus souvent aux composés majeurs dans une formulation.

La validation statistique doit s'appuyer sur la connaissance de la procédure d'analyse et plus spécifiquement de la méthode d'analyse.

Il faudra en outre replacer dans son contexte la méthode d'analyse et la validation statistique envisagée sera encore différente s'il s'agit :

- d'une méthode issue d'un compendium (USP/NF, Pharmacopée Européenne et autres Pharmacopées des pays membres, Pharmacopée Japonaise),
- d'une méthode développée par un autre laboratoire (validée ou non),
- d'une méthode initiée et développée en interne (issue du développement analytique).

## I.2 Assurance qualité, son respect par la validation des méthodes d'analyse.

La validation des méthodes d'analyse construit la qualité de la méthode assurant ainsi que la méthode ne procure pas de résultats inattendus et répond bien aux objectifs pour lesquels elle a été conçue (3), (27), (33), (34).

### LAROUSSE XX<sup>ème</sup> :

"Est valide ce qui dans des conditions voulues produit son effet légal ou naturel".

### Bonnes Pratiques de Fabrication "BPF" : (chapitre 10, Cinquième édition JUIN 1995)

"Opération destinée à démontrer que tout procédé et toute procédure utilisés pour la fabrication, le conditionnement ou le contrôle d'un produit conduisent effectivement aux résultats attendus.

Cette opération permet de garantir pour un médicament donné :

- la fiabilité et la reproductibilité des principaux procédés prévus au dossier,
- l'obtention de la qualité définie lors de la fabrication, du conditionnement ou du contrôle en routine".

### Food and Drug Administration "FDA" :

"Valider c'est établir à l'évidence, avec un degré de confiance élevé et sous une forme documentée qu'un procédé déterminé permet d'obtenir un produit (ou un service) qui atteint effectivement des spécifications définies à l'avance".

- Le système d'assurance qualité

L'assurance qualité est une part importante du système qualité.

L'assurance qualité est l'ensemble des actions préétablies et systématiques nécessaires pour donner la confiance appropriée en ce qu'un produit ou service satisfera aux exigences données relatives à la qualité (21). Le besoin de validation des procédures analytiques provient de la nécessité de comparer les données provenant de deux assesseurs indépendants, souvent une relation vendeur/acheteur.

La qualité est définie comme "l'ensemble des propriétés et caractéristiques d'un produit ou d'un service qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés ou implicites".

Il existe donc un lien très étroit entre la qualité d'un résultat et la validation de la méthode qui permet de l'obtenir.

Les niveaux de qualité d'une analyse, sont :

- la qualité métrologique : les mesures doivent fournir une valeur qui reflète correctement le contenu vrai de l'échantillon, système que le client ne peut généralement pas vérifier. Pour vérifier cette existence de justesse, il est nécessaire de mettre en place des systèmes externes de contrôle.
- La qualité technique : les analyses sont faites pour prendre des décisions, il faut alors que la fidélité de la méthode soit suffisante pour permettre ces décisions. Le concept de capacité de mesure qui est souvent utilisé pour vérifier et pour évaluer la fiabilité traduit correctement ce besoin.
- La qualité commerciale : qualité d'usage social où les considérations sont d'ordre toxicologiques.

En dernier ressort, la qualité de l'analyse est jugée par celui qui l'utilise, même si elle est préalablement contrôlée par celui qui la produit.

Les résultats doivent être interprétables, c'est à dire qu'ils doivent être valides et présenter les conditions requises pour produire leurs effets et ainsi répondre aux besoins des clients du laboratoire. Ceci fait clairement apparaître le lien très étroit qui existe entre la qualité d'une analyse et la validation de la méthode qui permet de la réaliser.

Il découle de l'approche qualité une soumission aux conditions réglementaires pour répondre aux objectifs assignés.

Le concept de validation d'une méthode d'analyse ne doit pas s'arrêter à l'analyse statistique des données brutes mais tenir compte dans un processus global d'assurance qualité des textes réglementaires, des définitions, des protocoles, des normes, du matériel, du personnel et de l'équipement.

**I.3 Historique de la validation, jusqu'aux recommandations ICH (5), (6), (22), (23), (28).**

En 1985, lors d'une conférence regroupant des industriels du médicament, un processus d'élaboration de recommandations sur la validation analytique est mis en place. Les industriels participant à cette conférence sont des représentants de la Pharmacopée Américaine et de la PMA (Pharmaceutical Manufacturer's Association).

Toujours aux Etats-Unis, en 1986, le texte "*Current concept for the validation of compendial assays*" est publié dans Pharmacopeial Forum.

C'est en juillet 1988 que le texte "*Validation of compendial assays guidelines*" fut rédigé puis inclus dans l'USP/NF XXI en tant que supplément n° 9 en juillet 1989 ; l'application officielle de ce texte est prévue à partir du 1<sup>er</sup> janvier 1990.

Parallèlement, dès février 1987, les "*Guidelines for submitting samples and analytical data for methods evaluation*" furent éditées dans le cadre des CFR (Federal Code of Regulation) sous la référence 21CFR 10.90 pour aider les demandeurs de dossiers d'autorisation de mise sur le marché "AMM" dans la marche à suivre et la présentation des données rendues obligatoires (21 CFR 314.50).

Les parties des CFR faisant référence aux validations analytiques sont les suivantes :

- Part 210 : "*Current good manufacturing practice in manufacturing, processing, packing or holding of drugs*" ;
- Part 211 : "*Current good manufactuirng practice for finished pharmaceuticals*" ;
- Part 820 : "*Current good manufacturing practice for medical devices*".

Avec un décalage au niveau Européen, fut publiée en Août 1989 une note explicative sous la référence III/844/87 FR Final "*Validation analytique*" ; texte élaboré depuis 1987 et émanant de commentaires des industriels européens de la Pharmacopée.

A partir de cette date, des groupes de travail se sont constitués et ne cessent de faire évoluer les textes relatifs à la validation analytique.

Le premier exemple est le guide de validation analytique, rapport d'une commission SFSTP (Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques) qui présente un protocole de validation complet ainsi que des données chiffrées et des interprétations statistiques (5), (6).

Au niveau international, l'aboutissement de cette collaboration, est la publication dans le cadre ICH (5) (International Conference on Harmonisation) de deux notes explicatives :

-Sujet Q2 "*Validation des procédures d'analyses*",  
deux sous-sujets :

- Q2A Définitions et terminologie
- Q2B Extension : méthodologie (23)

Toujours dans le cadre ICH furent rédigés :

- Step 2, ICH3, 29 nov-1dec 1995 Yokohama
- Step 4, 6 nov 96 Consensus Guideline

A l'heure actuelle, l'avancement des textes est au stade ICH 4 draft 3 following Janv-Fev 1999 meeting ICH *Good Manufacturing Practice Guide for active pharmaceutical ingredients* (22).

## **I.4 Validation des méthodes analytiques et milieu industriel.**

La mise sur le marché d'un produit pharmaceutique requiert que toutes les étapes de la conception de ce produit, du développement au conditionnement soit rigoureusement suivies afin d'en assurer une qualité optimale.

La constitution d'un dossier de mise sur le marché d'un produit à usage pharmaceutique nécessite la validation des méthodes d'analyse, du contrôle des matières premières au produit fini.

### **I.4.1 Les champs d'application.**

#### **I.4.1.1 Au niveau européen.**

- Dossiers d'autorisation de mise sur le marché (AMM) (5), (28).

Pour le dépôt d'un dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché, la note explicative III/844/87 définit le champ d'application de la validation analytique à toute procédure d'analyse utilisée dans les chapitres suivants de la documentation chimique, pharmaceutique et biologique définis par la directive 75/318/CEE modifiée en vue de l'octroi de l'AMM d'un médicament :

- *IIA* développement galénique
- *IIB* contrôle en cours de fabrication
- *IIC* contrôle matière première
- *IID* contrôle sur produit intermédiaire en cours de fabrication
- *IIE* contrôle produit fini
- *IIF* essai de stabilité

Les monographies de la Pharmacopée Européenne doivent être considérées comme validées, leurs conditions d'application peuvent faire l'objet si besoin d'une étude de validation.

- Variations au dossier d'autorisation de mise sur le marché (28).

Le Journal Officiel de la Communauté Européenne "JOCE" du 11 mars 1995 publie deux règlements concernant l'examen des modifications des termes de demande d'autorisation de mise sur le marché.

- 1/541/95 AMM délivrées par les états membres (procédure décentralisée)
- 2/542/95 AMM délivrées par la Commission des Communautés (Procédure centralisée).

Le JOCE affecte de "modifications mineures" des validations de méthodes analytiques, (que l'on soit en procédure centralisée ou décentralisée) les variations suivantes apportées à un dossier d'AMM :

- Changement de la méthode de contrôle relative au principe actif.
- Changement des méthodes de contrôle relatives au médicament.
- Changement des méthodes de contrôle applicables aux excipients ne figurant pas dans la Pharmacopée.
- Changement de la méthode de contrôle applicable au conditionnement primaire.
- Changement de la méthode de contrôle applicable au dispositif d'administration.

#### **I.4.1.2 Au niveau américain** (5), (28).

Les procédures analytiques et les normes USP/NF constituent des références légales. Les utilisateurs de procédures analytiques décrites dans l'USP/NF ne sont pas tenus de vérifier la justesse et la fiabilité de ces méthodes mais en revanche doivent vérifier leur adéquation dans les conditions d'utilisation proposées.

S'il s'agit de soumettre à l'USP/NF de nouvelles procédures d'analyse ou des révisions de procédures déjà existantes, les dossiers de soumission devront comporter suffisamment d'informations pour permettre au comité de révision de l'USP/NF d'évaluer les performances relatives de ces différentes procédures. Il permet à tout analyste de reproduire la méthode et permet dans le cadre de révision de procédure de comparer les limites de la procédure par rapport aux avantages offerts par la méthode proposée.

Au niveau européen comme au niveau américain, les résultats de la validation de la méthode montrent que la nouvelle méthode de contrôle est au moins équivalente à l'ancienne.

#### **I.4.2 Les domaines d'application.**

Les secteurs impliqués dans la validation analytique sont tous les secteurs industriels qui utilisent directement ou indirectement des méthodes analytiques.

Les principaux intervenants sont les laboratoires de développement analytique, les laboratoires de contrôle (cas d'analyses en routine) et les sites de production disposant de moyens d'analyse automatisés.

- A titre individuel ces unités s'intéressent à la validation de méthodes d'analyse utilisées classiquement en routine, à la validation de méthodes d'analyses des produits en étude de stabilité, à des dosages d'impuretés, ou encore à des validations de méthodes d'analyse utilisées pour les procédures de validations de nettoyage.
- En collaboration, les validations analytiques sont nécessaires pour les études de transfert de méthode, lors des transferts des produits en cours de développement, pour une étude de reproductibilité inter laboratoire, lors de l'évaluation d'une méthode alternative d'analyse quantitative par rapport à une méthode de référence ou pour la validation analytique dans les phases de développement pré-clinique.

Ces différentes applications requièrent un choix judicieux et spécifique des paramètres à valider.

Nombreuses sont les recommandations (Guidelines) permettant une sélection standardisée de ces paramètres ou critères de validation en fonction du type de procédure d'analyse à valider.

## **I.5 Critères de validation : outils statistiques.**

### **I.5.1 Définitions et terminologie selon ICH (5), (6), (23), (28).**

- Fidélité : la fidélité d'une procédure d'analyse exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures obtenue à partir de multiples prises d'essais d'un même échantillon homogène dans des conditions définies.

La fidélité s'exprime à trois niveaux différents : répétabilité, fidélité intermédiaire et reproductibilité.

La fidélité d'une procédure analytique est exprimée par le coefficient de variation d'une série de mesure.

- Répétabilité : dans un court temps d'analyse (une même séquence d'analyse) une série de mesure est effectuée, les conditions opératoires sont rigoureusement identiques (équipement, analyste, laboratoire...)
  - Fidélité intermédiaire : le coefficient de répétabilité intermédiaire traduit les variations inter jours des résultats obtenus dans des conditions opératoires chaque jour différentes (analystes ou équipements différents...) au sein d'un même laboratoire.
  - Reproductibilité : autrefois désignant la fidélité intermédiaire, le terme de reproductibilité est désormais réservé à des études de fidélité inter laboratoires.
- Limite de détection : la limite de détection correspond à la plus petite quantité d'analyte dans un échantillon pouvant être détectée mais pas nécessairement quantifiée comme une valeur vraie.

- Limite de quantification : la limite de quantification correspond à la plus petite quantité de produit pouvant être quantifiée avec une exactitude et une fidélité (en terme de répétabilité) connues.
- Linéarité : la linéarité d'une procédure analytique est sa capacité à l'intérieur d'une certaine gamme de concentrations à fournir des résultats directement proportionnels à la quantité d'analyte présent dans l'échantillon.
- Intervalle de validité : intervalle compris entre la plus petite et la plus grande concentration en analyte pour laquelle il a été démontré que la procédure d'analyse a un niveau acceptable en terme de fidélité, d'exactitude et de linéarité.
- Exactitude : l'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie (étalon de référence utilisé au sein d'une firme) soit comme une valeur de référence (étalon international, substances de références, SCR par exemple) et la valeur moyenne trouvée en appliquant la procédure d'analyse un certain nombre de fois.
- Spécificité : La spécificité d'une procédure analytique est sa capacité à permettre l'évaluation univoque de la substance à analyser, en présence des composés susceptibles de l'accompagner.

Une procédure d'analyse spécifique permet de mesurer quantitativement un paramètre physico-chimique ou un groupement fonctionnel d'une ou plusieurs substances dans l'échantillon.

La spécificité est une mesure du degré d'interférence d'autres composants (excipients, produits de dégradation, impuretés...) contenus dans l'échantillon assurant que le signal mesuré provient exclusivement de la substance à analyser.

## I.6 Rubriques et critères de validation (22), (23), (29), (33), (34).

Une procédure analytique se valide par l'intermédiaire de critères de validation fonction de la rubrique considérée. Les différents critères énumérés ne s'appliquent pas nécessairement tous à chaque procédure d'analyse.

### I.6.1 Matrice des recommandations ICH (1).

Le tableau suivant présente la matrice de validation proposée par le consensus ICH pour une validation de type "initiale".

Tableau n° I : Matrice des recommandations ICH.

Type de procédure	Identification	Contrôle des impuretés		Dosage
		<i>Essai Limite</i>	<i>Essai Quantitatif</i>	
<i>Critères</i>				
Spécificité	X	X	X	X
Linéarité	-	-	X	X
Exactitude	-	-	X	X
Fidélité				
- répétabilité	-	-	X	X
- intermédiaire	-	-	X	X
- inter laboratoire	-	-	-	-
Sensibilité	-	-	-	-
Seuil de détection	-	X	-	-
Seuil de quantification	-	-	X	-
Robustesse	-	-	-	-

**X** : cette caractéristique fait normalement l'objet d'une évaluation

- : cette caractéristique ne fait normalement pas l'objet d'une évaluation

D'après : AVA Version 3.0 – Aide Contextuelle – Logiciel d'évaluation statistique.

### I.6.2 Matrice des recommandations SFSTP (1).

La matrice de validation SFSTP, pour une validation de type "initiale" est présentée par le tableau n° II.

Tableau n° II : Matrice des recommandations SFSTP.

Type de procédure	Identification	Contrôle des impuretés		Dosage
Critères		Essai Limite	Essai Quantitatif	
Spécificité	X	X	X	X
Linéarité	-	-	X	X
Exactitude	-	-	X	X
Fidélité*				
- répétabilité	-	-	X	X
- Intermédiaire	-	-	X	X
- inter laboratoire	-	-	-	-
Sensibilité	-	-	-	X
Seuil de détection	-	X	-	-
Seuil de quantification	-	-	X	-
Robustesse	-	-	-	-

**X** : cette caractéristique fait normalement l'objet d'une évaluation

- : cette caractéristique ne fait normalement pas l'objet d'une évaluation

D'après : AVA Version 3.0 – Aide Contextuelle – Logiciel d'évaluation statistique.

L'étude de la sensibilité requise par la SFSTP n'a pas été retenue dans la matrice des critères à valider par ICH.

L'étude de la robustesse est mentionnée sur les deux matrices ICH et SFSTP mais ce critère n'est pas retenu en tant que critère à valider pour la validation statistique d'une méthode d'analyse dans le cadre d'un dépôt d'un dossier d'AMM.

### I.6.3 Matrice des recommandations USP (1), (24), (33), (34), (38).

Le tableau n° III, intitulé "Matrice des recommandations USP/NF" ou "Data element required for assay validation" regroupe l'éventail des critères de validation mentionnés pour une validation de méthode d'analyse de type initiale selon l'USP/NF.

Tableau n° III : Matrice des recommandations USP/NF.

Analytical Performance Parameter	Assay category I	Assay category II		Assay category III
		<i>Quantitative</i>	<i>Limit tests</i>	
Precision	X	X	-	X
Accuracy	X	X	*	*
LOD <sup>1</sup>	-	-	X	*
LOQ <sup>2</sup>	-	X	-	*
Specificity	X	X	X	*
Range	X	X	*	*
Linearity	X	X	-	*
Ruggedness	X	X	X	X

- X : cette caractéristique fait normalement l'objet d'une évaluation  
 - : cette caractéristique ne fait normalement pas l'objet d'une évaluation  
 \* : signifie que ce test peut être requis selon la nature de l'essai.

D'après : USP/NF XXIII

- "Assay I" : le composé à étudier est le composé majeur. L'analyte est présent en relative abondance et la détermination du seuil de détection (LOD<sup>1</sup>:Limit Of Detection) et du seuil de quantification (LOQ<sup>2</sup>: Limit Of Quantification) n'est donc pas nécessaire.
- "Assay II" : concerne les impuretés ou les produits de dégradation. La possibilité que la quantité d'analyte puisse être relativement faible augmente l'importance de l'évaluation de la sensibilité. Si une information quantitative est désirée, une détermination de la limite de détection n'est pas nécessaire mais tous les autres critères sont requis ; situation inverse, si aucune information quantitative n'est requise, il est suffisant de démontrer la spécificité et la robustesse de la méthode.
- "Assay category III" : regroupe les critères nécessaires à l'évaluation des performances des essais pharmacotechniques comme les essais de dissolution par exemple.

#### **I.6.4 Choix des critères de validation.**

Il semble prudent de considérer comme un "critère de validation systématique", un critère qui serait mentionné et retenu (sigle X ) dans la matrice de validation de référence : ICH, SFSTP ou USP/NF.

Les critères de validation facultatifs seraient alors les critères mentionnés mais non retenus (sigle -) dans la matrice de référence choisie.

Les choix des critères de validation selon les recommandations (matrices de validation) est facilement transposable dans le cas d'une validation initiale mais plus difficilement réalisable lors d'une révision de méthode, d'une revalidation de méthode ou d'un transfert de méthode.

### **I.7 Le contenu d'un dossier de validation, aspect réglementaire en vue du dépôt d'un dossier d'autorisation de mise sur le marché.**

Le contenu d'un dossier de validation sans être standardisé, doit fournir de nombreux éléments qui vont refléter la stratégie d'étude, la méthodologie et l'analyse des résultats (22), (28).

Le cas typique est la rédaction d'un rapport de validation, destiné à être intégré dans un dossier d'AMM (partie II).

A une courte description du principe essentiel de la procédure (les procédures d'analyse doivent être décrites de telle façon qu'elles puissent être évaluées et reproduites par les experts gouvernementaux ou experts d'un laboratoire d'état si ces derniers le jugent nécessaire), sont généralement associés les éléments suivants :

- La description précise et détaillée de l'appareillage (qu'il soit disponible ou non dans le commerce),
- Les conditions exactes de l'analyse, y compris les précautions à prendre, les réactifs, les matériaux et préparations de référence,
- La vérification de la procédure d'analyse dans des conditions opératoires définies, par exemple vérification du pouvoir séparateur d'un système chromatographique (essai de conformité),
- Le choix du référentiel, la justification des critères statistiques et les critères d'acceptation,
- Les formules explicites pour le calcul des résultats, y compris l'évaluation statistique si nécessaire.

Ces éléments sont à considérer comme des éléments de transparence de la validation vis à vis des autorités compétentes.

Pour des méthodes pharmacotechniques (par exemple essais de désagrégation, de dissolution...) et pour des procédures d'analyses décrites dans des documents officiels et reconnus, la référence à la littérature suffit.

Les essais dans les monographies des matières premières décrites dans les pharmacopées sont considérés comme étant validés, on justifie de l'adéquation des conditions opératoires et des tests de conformité des analyses.

Les matériaux et préparations propres à la firme doivent être caractérisés et évalués pour l'usage auquel ils sont destinés, par des méthodes complémentaires à celles utilisées en routine :

- Ceci n'est pas à refaire pour les matériaux et préparations de référence d'une pharmacopée ou d'autres organismes officiels.
- Si un étalon de travail est utilisé, il devra être caractérisé avec l'étalon de référence.

Il convient également d'indiquer les données complètes qui ont conduit à la validation des procédures d'analyse.

Dans tous les cas, les méthodes ou procédures d'analyse proposées doivent tenir compte du progrès technique et scientifique et doivent permettre le contrôle de la matière première, des produits intermédiaires ou du produit fini suivant des méthodes scientifiques généralement acceptées (article 9 de la directive 65/65/CEE modifiée).

Des recommandations générales ont été publiées par la FDA en 1987 dans un fascicule intitulé "Guidelines for submitted samples and analytical data for method validation", (Appendix A, page 14).

Ainsi, les imperfections les plus couramment retrouvées sont (11), (28) :

- Absence de dosage d'échantillon contenant une impureté critique, un produit de dégradation ou une référence interne nécessaire pour s'assurer de l'adéquation de la méthode.
- Absence d'indication de toutes les spécifications de la méthode, ou sélection inappropriée des spécifications.
- Domaine de validité déclaré trop large et ne pouvant pas être justifié par les données.
- Des spécifications qui ne relèvent pas des limites de la procédure analytique.
- Documentation insuffisante ou choix inacceptable de méthodes, réactifs, équipement comme l'utilisation de corrections arithmétiques arbitraires ou l'utilisation d'une instrumentation non commercialement disponible et sans description complète permettant de la reconstituer.
- Utilisation de colonnes chromatographiques d'une seule source, sans spécifications permettant leur duplication.
- Utilisation d'outils spécialisés ou d'un équipement non disponible dans le commerce pour la préparation de l'échantillon.
- Utilisation d'un réactif ou d'une référence interne non disponible dans le commerce.
- Absence d'essai de conformité en chromatographie ("System Suitability Tests").

- Données soumises incomplètes ou illisibles (chromatogrammes, spectres non référencés ou échantillons non identifiés, courbes avec abscisses et ordonnées non précisées).
- Matériaux de référence non caractérisés.

La FDA n'a pas rencontré de problèmes relatifs à des méthodes ou à des procédures d'analyse qui ne tiennent pas compte du progrès technique et scientifique et n'a donc pas mis en exergue ce qui pour les Européens reste une obligation. La plupart des problèmes rencontrés par la FDA ont été évoqués dans les recommandations générales élaborées par le groupe de travail du CSP Qualité des médicaments.

## II. La place de la validation.

---

## **II. La place de la validation.**

### **II.1 Mise au point et validation initiale.**

Il est important de faire la distinction entre la mise au point d'une méthode et sa validation.

Lorsque l'on développe une méthode, il est nécessaire de l'adapter, de la tester et d'évaluer rapidement ses performances. La méthode alors proposée est confrontée au test de robustesse avant la phase de validation statistique proprement dite. Cette période d'essais permet d'optimiser la méthode souvent en fonction du temps dont on dispose. Cette étape indispensable doit être clairement séparée de la validation.

On ne doit envisager la validation que lorsque la méthode a été optimisée et que les différents essais ou "pré-run" sont concluants. La validation se réalise donc sur une procédure d'analyse figée et non à l'état d'ébauche afin d'éviter les cycles successifs de validation en cas d'échecs.

La validation permet de prouver la fiabilité d'une méthode qui sera utilisée telle quelle, en routine et sans aucune modification. Il est recommandé de réaliser cette étude de façon continue et dans un temps raisonnable.

Par conséquent, la validation ne doit pas être perçue comme une simple formalité et il faut avoir à l'esprit que la méthode peut ne pas être validée. Si la validation n'est pas acceptée, il faut alors envisager de modifier la procédure de la méthode qui fera l'objet d'une nouvelle validation ou de revoir l'usage futur de cette méthode.

Le tableau suivant schématise l'enchaînement des étapes lors de la validation d'une méthode d'analyse après sa mise au point et jusqu'à sa validation initiale.

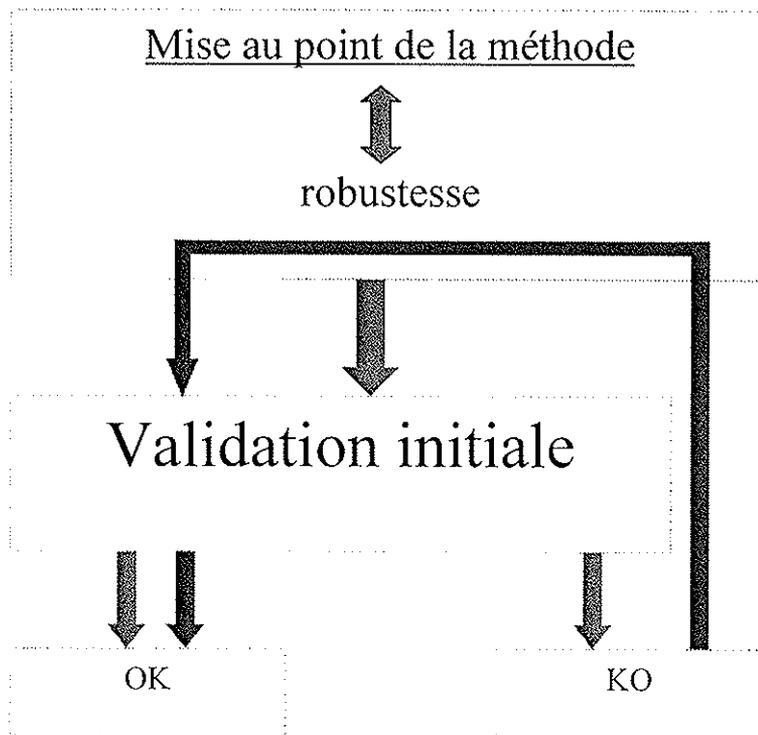


Figure n° 1 : Mise au point et validation initiale.

## **II.2 Mise au point et robustesse de la méthode.**

### **II.2.1 Définitions** (5), (6), (8), (28), (36).

La robustesse d'une procédure d'analyse est sa capacité à rendre des résultats exacts en présence de faibles changements de conditions expérimentales susceptibles de se produire lors de l'utilisation de cette procédure.

L'étude de la robustesse permet de définir les variations admissibles de chacun des paramètres opératoires critiques qui sont sans effet sur la validité des résultats fournis : la robustesse doit démontrer la stabilité de la méthode lorsque des variations délibérées sont appliquées à la méthode d'analyse.

L'évaluation de la robustesse doit être considérée pendant la phase de développement et dépend du type de procédure en cours d'étude.

- Au niveau européen :

L'étude de la robustesse n'est pas requise en temps que critère de validation par la note explicative CEE III/844/87-FR-FINAL d'août 1989.

- Au niveau américain :

- A l'USP/NF XXII, le terme de "Ruggedness" est utilisé pour définir la robustesse de la méthode en terme de reproductibilité et complète l'étude de la fidélité de la méthode.

La méthode de détermination préconise que cette mesure de la reproductibilité «laboratoire / laboratoire, analyste / analyste, instrumentation / instrumentation ... », doit être comparée à l'essai de fidélité ("Precision") dans des conditions normales d'utilisation pour obtenir une évaluation de la robustesse.

La robustesse telle qu'elle est définie à l'USP/NF XXII sous la terminologie "Ruggedness" est une comparaison des coefficients de variations obtenus par l'utilisation de la même méthode après développement et mise au point dans différents laboratoires, chaque laboratoire possédant ses propres spécifications (analystes, instrumentations ou réactifs...).

Il est à noter que l'étude de la fidélité à l'USP/NF XXII ne fait pas la différence entre répétabilité, fidélité intermédiaire et reproductibilité. Le terme de "Ruggedness" ainsi défini est une première définition de la reproductibilité et complète l'étude de la fidélité telle que présentée à l'USP/NF XXII.

- A l'USP XXIII/NF, l'étude de la fidélité de la méthode se définit désormais à trois niveaux : répétabilité, fidélité intermédiaire et reproductibilité. Le terme "Ruggedness" est décrit comme le degré de reproductibilité de l'analyse dans des conditions normales d'utilisation dans différents laboratoires et s'exprime par un coefficient de variation.

La terminologie "Robustness" ajoutée à l'USP/NF XXIII (38) semble se rapprocher de la définition européenne (processus ICH) de la robustesse : capacité d'une méthode à rester stable lorsque de faibles variations délibérées lui sont appliquées.

Les tableaux suivants (n° IV et V) sont extraits du chapitre *General Information/Validation of compendial Method* <1225> éditions XXII et XXIII de l'USP/NF.

Tableau n° IV : *Typical Analytical Parameters Used In Assay Validation. USP/NF XXII (33).*

Precision
Accuracy
Limit Of Detection
Limit Of Quantification
Selectivity
Range
Linearity
Ruggedness

Tableau n° V : *Typical Analytical Parameters Used In Assay Validation. USP/NF XXIII (34).*

Accuracy
Precision
Specificity
Limit Of Detection
Limit Of Quantification
Linearity
Range

- A l'USP/NF XXII, le terme "Ruggedness" est équivalent à celui de la reproductibilité mais n'est pas inclus dans le paramètre "Precision" et figure donc comme paramètre complémentaire à l'étude de la fidélité de la méthode. La précision n'est pas encore définie sur trois niveaux de mesure.
- A l'USP/NF XXIII, le terme "Precision" regroupe répétabilité, fidélité intermédiaire et reproductibilité. L'étude de la reproductibilité "Ruggedness" n'apparaît plus en tant que paramètre classique de validation mais fait désormais partie intégrante de l'étude de la fidélité de la méthode.

La traduction la plus juste de la robustesse serait "Robustness" : ce terme n'apparaît pas dans les matrices de validation proposées à l'USP/NF XXII et XXIII. L'étude de la robustesse "Robustness" n'est pas un paramètre classique d'étude pour la validation d'une méthode de dosage.

L'étude de la robustesse tant au niveau européen qu'au niveau américain est un paramètre important qui trouve toute son utilité lors de la mise au point d'une méthode analytique.

### **II.2.2 Robustesse et reproductibilité.**

Le développement à terme d'une méthode d'analyse résulte souvent d'études menées en collaboration entre plusieurs laboratoires.

L'application de cette méthode dans ces laboratoires doit produire des résultats identiques malgré d'inévitables modifications (conditions expérimentales, changements d'appareillage, de réactifs, environnements différents). Il est indispensable, avant d'entreprendre une étude inter laboratoire, de procéder à un test de robustesse, afin d'examiner le comportement de la méthode en présence de faibles changements des conditions opératoires et pour chaque laboratoire de pouvoir fournir des résultats fiables.

Le test de robustesse rend compte de cette variabilité maximale des résultats en terme de prévisions mathématiques (par l'utilisation des plans factoriels) et permet ainsi d'évaluer l'effet d'un facteur ou d'une combinaison d'événements.

Les résultats de l'étude de robustesse permettent de préciser les détails techniques susceptibles d'engendrer un défaut de reproductibilité, et de fixer les paramètres opératoires pour une nouvelle validation de la méthode.

L'étude de reproductibilité mesure la variabilité maximale des résultats de façon concrète (fidélité inter laboratoire) sur des paramètres fixés par l'expérimentateur, ces paramètres étant jugés critiques d'après l'étude de robustesse initiée en phase de développement analytique.

Ainsi la comparaison des coefficients de variation de robustesse et de fidélité est un critère important dans l'évaluation de la fiabilité de la méthode.

### **II.2.3 Robustesse et tests de conformité.**

Si les mesures dans les conditions d'analyse sont sensibles aux variations imposées, les conditions d'analyse devront être contrôlées et des précautions d'utilisation pourraient être incluses dans la procédure opératoire.

La robustesse permet de fournir une série de paramètres de conformité spécifiques à la méthode en cours de développement pour assurer pendant la phase de validation puis lors de l'utilisation en routine le bon déroulement opératoire de l'analyse.

### **II.2.4 Paramètres opératoires critiques (8), (36), (38).**

On entend par faible changement de conditions opératoires expérimentales tout écart d'un paramètre opératoire par rapport à sa valeur nominale telle quelle est définie dans la méthode d'analyse.

On peut distinguer deux grands types de modification : les paramètres opératoires qualitatifs et les paramètres quantitatifs.

Les paramètres qualitatifs rapprochent l'étude de la robustesse de celle de la reproductibilité. Ces paramètres non quantifiables (dont il n'est pas possible de fixer une valeur nominale) ne sont pas sans effet sur la stabilité d'une méthode d'analyse. Le changement d'opérateur ou la modification des séquences d'injections sont des paramètres qualitatifs à prendre en compte pour l'étude de robustesse.

Les paramètres opératoires quantitatifs à considérer sont les paramètres dont l'écart par rapport à la valeur nominale fixée est susceptible d'influer sur le résultat final. La valeur nominale correspond à la meilleure valeur du paramètre considéré à un certain stade de développement. La complexité de la procédure d'analyse augmente généralement le nombre de ces paramètres, nous verrons l'importance de l'utilisation des plans factoriels. Le premier des paramètres quantitatifs introduit est souvent la teneur en substance à analyser, à cause de ses interactions possibles avec les autres paramètres.

Le choix des paramètres opératoires à étudier peut être déterminé grâce aux écarts observés lors de l'étude de reproductibilité s'il s'agit d'une révision de méthode. L'étude de ces écarts précisera la valeur de l'écart admissible de ces paramètres à inclure dans les essais des plans factoriels.

Dans le cas d'une étude de robustesse au stade de développement de la méthode d'analyse, le choix des critères à étudier ainsi que leur variation maximale ne peuvent être connus, l'orientation se porte alors vers des paramètres opératoires "classiques". Ces paramètres opératoires sont ceux pris en compte lors de la mise au point de la méthode.

L'appréciation de la robustesse d'une méthode d'analyse pourra s'effectuer en choisissant au minimum deux niveaux (haut/bas) pour chacun des paramètres opératoires critiques, c'est à dire ceux dont les valeurs par rapport à leur valeur nominale sont susceptibles d'influer sur le résultat final. Les écarts par rapport aux conditions normales doivent rester faibles afin de travailler dans des conditions opératoires proches des conditions optimales.

- Variations classiques en Chromatographie Liquide Haute Performance CLHP (8) :
  - influence de la variation du pH
  - variation de la composition de la phase mobile
  - modification du type de phase stationnaire (lots ou fournisseurs)
  - température
  - débit
  - pression

### **II.2.5 Utilisation des plans factoriels** (5), (6), (8), (14), (25), (36).

Afin d'évaluer la robustesse d'une procédure d'analyse, il faut appliquer cette méthode sur un échantillon homogène en faisant varier les paramètres retenus.

Les premiers modèles d'études préconisaient de modifier un à un les paramètres critiques tout en maintenant les autres constants. Ces modèles se résumaient souvent à l'étude de trois ou quatre paramètres sans leurs interactions : au-delà le nombre d'expérience que cela impliquait rendait rapidement l'opération irréalisable.

Un test de robustesse permettant d'étudier  $N$  paramètres, sans leurs interactions, nécessite  $N+1$  essais. L'étude simultanée des effets individuels et de leurs interactions nécessite, elle,  $2^N$  essais.

L'utilisation de la technique des plans factoriels qui consiste à faire varier plusieurs paramètres en même temps, mais aussi de négliger certains paramètres ou certaines interactions ont permis, non seulement de diminuer de façon significative le nombre d'essais mais aussi d'étudier les interactions entre ces paramètres tout en augmentant le nombre de paramètres testés. Le domaine des variations admissibles pour chacun des facteurs est déterminé en fonction des conditions expérimentales attendues dans les différents laboratoires (étude de reproductibilité). Les écarts par rapport aux conditions normales doivent rester faibles afin de travailler dans des conditions opératoires proches des conditions optimales.

L'expérimentation factorielle consiste à faire varier simultanément les facteurs sur un nombre minimum d'essais planifiés de façon rationnelle. Le nombre total d'analyse à effectuer  $N$  dépend du nombre de facteurs critiques et du nombre de niveaux.

Pour un plan complet à deux niveaux (haut +1 et bas -1) :

- trois facteurs sont testés avec  $N=2^3=8$  expériences
- quatre facteurs sont testés avec  $N=2^4=16$  expériences

De nombreux modèles de plan d'expériences ont été publiés (25), tels que les modèles de Plackett et Burman, Youden et Steiner ou encore Tagushi.

Certains plans factoriels fractionnés minimisent le nombre d'essais : 7 facteurs testés à deux niveaux représentent 8 essais, 7 facteurs testés à 3 niveaux représentent 15 essais. Ils requièrent une expérience au niveau 0 où tous les facteurs sont à leur condition de base (valeur nominale) et ne permettent pas de détecter les interactions.

D'autres modèles de plans factoriels "complets" existent également pour l'étude des interactions. Dans un plan complet, il est possible de tester un plus grand nombre de facteurs critiques en faisant des substitutions, "ou aliasés" sur les interactions d'ordre 3 ou 4 qui ont une très faible probabilité de se produire (une interaction d'ordre 3 ou 4 est alors remplacée par un facteur). Un plan factoriel complet à 8 essais permet de tester 4 facteurs critiques, un plan à 16 essais permet de tester jusqu'à neuf facteurs critiques tout en conservant le contrôle des interactions d'ordre 2.

## **II.3 Validation initiale et revalidation.**

### **II.3.1 Validation de transfert et validation des méthodes issues d'un compendium (11).**

Une validation de transfert doit être menée pour des méthodes issues d'un compendium ou provenant d'un autre laboratoire et qui ont déjà fait l'objet d'une validation par ce laboratoire.

La validation initiale doit avoir étudié les critères précédemment cités.

Si l'un des paramètres n'a pas été validé, la méthode est considérée comme non validée et fera l'objet d'une revalidation de "type validation initiale" ou au moins d'un complément de validation portant sur les paramètres négligés.

La limite entre revalidation et complément de validation dépend du type de méthode étudiée mais aussi des critères négligés ou non retenus.

A titre d'exemple, un complément d'information sur une étude de spécificité peut être nécessaire si de nouvelles données sont accessibles (impuretés disponibles ou utilisation d'un détecteur à barrette de diodes). L'évaluation d'un critère mentionné mais non retenu dans une matrice de validation peut être un complément d'information.

Par contre, le fait de négliger un paramètre mentionné et retenu : exactitude par exemple, entraînerait alors une validation de type initiale sur les critères de linéarité, d'exactitude et de fidélité.

Les méthodes issues d'un compendium : USP/NF, Pharmacopée Européenne, Pharmacopée française, Pharmacopée allemande (DAB), BP, Pharmacopée Japonaise, AFNOR, AOAC sont considérées comme validées mais feront l'objet d'une validation de transfert destinée à démontrer l'adéquation de la méthode dans ses nouvelles conditions d'application comme l'indique la figure n°2.

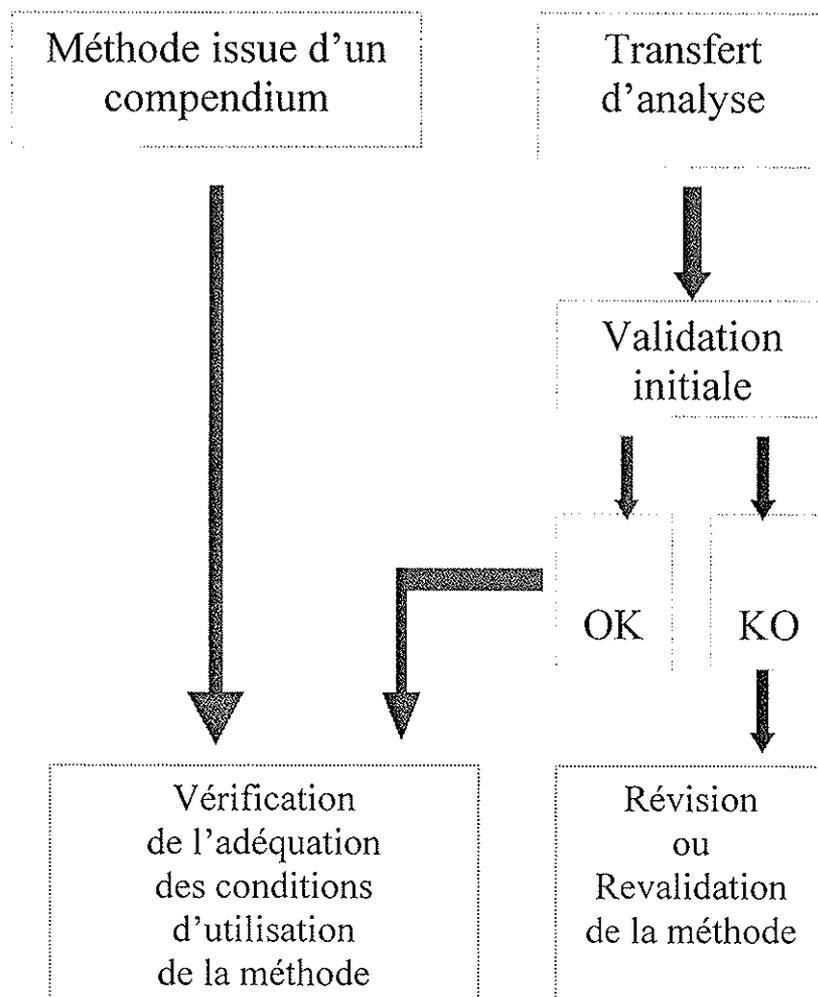


Figure n° 2 : Validation de transfert et validation des méthodes issues d'un compendium.

### **II.3.2 Revalidation des méthodes d'analyse. (18), (20), (21), (38)**

Une méthode ne doit être considérée comme validée que dans des conditions d'utilisation données, avec un appareillage donné. Des essais documentés doivent être effectués lorsque des changements significatifs sont apportés au matériel ou aux conditions d'analyse, ou lorsque le produit pharmaceutique ou la substance à analyser sont modifiés. Toute modification apportée à une méthode d'analyse entraîne une révision de la méthode. La révision doit mentionner si la modification nécessite une revalidation. Toute revalidation doit faire l'objet d'un protocole précisant les changements apportés à la méthode initiale ou au produit étudié, les conséquences éventuelles sur les performances de la méthode et les paramètres qui seront revalidés.

D'une façon plus générale, la revalidation d'une procédure d'analyse peut être nécessaire dans certains cas (29), par exemple :

- Transfert d'une procédure d'analyse du développement au contrôle de qualité,
- Changement significatif dans le procédé d'obtention d'une matière première,
- Changement de la composition du produit fini,
- Changement de la méthodologie d'analyse :
  - Préparation des échantillons, exemple de modifications : conditions d'extraction, dérivation, centrifugation, mélange, pH, filtration...
  - Modification du système chromatographique : détection (géométrie de la cellule), type de détecteur, système d'intégration, d'acquisition, injecteur automatique...
  - Modification des conditions chromatographiques : colonne (fournisseur, type de colonne, géométrie), débit, volume d'injection, température de la colonne, phase mobile...

Le degré de revalidation dépend de la nature du changement (21). Les tableaux n<sup>os</sup> VI, VI<sup>bis</sup> orientent le choix des critères de performance (critères de validation) à réévaluer ou non en fonction des modifications chimiques de l'analyte ou de la forme pharmaceutique.

Tableau n° VI : Modifications "chimiques" de l'analyte ou de la forme pharmaceutique.

Critère de performance analytique	Nouvelle source ou synthèse de principe actif (nouvelles impuretés présentes)		
	Principe actif	Impuretés et/ou Produits de dégradation	
		quantitatif	Tests limites
Précision du système	X	X	Non
Précision de la méthode	Oui	Oui	*
Exactitude	Oui	Oui	*
LOD	Non	Oui	Oui
LOQ	Non	Oui	Non
Sélectivité/Spécificité	Oui	Oui	Oui
Intervalle de validité	Non	Oui	Non
Linéarité	Non	Oui	Non
Robustesse	**	Oui	Oui

D'après : "Health Protection Branch Health and Welfare Canada.  
ACCEPTABLE METHODS Drugs directorate guidelines".

*\* peut être requis, dépend de la présence ou non de la présence d'une nouvelle impureté ou produit de dégradation et de la nature du test.*

*X fait partie des tests de conformité.*

*\*\* peut être requis en cas de mauvaise résolution entre pics impuretés / principe actif.*

Tableau n° VI<sup>bis</sup> : Modifications "chimiques" de l'analyte ou de la forme pharmaceutique.

Critère de performance analytique	Changement de produit			Modification du processus de fabrication
	pureté	Nouveaux excipients	Modification niveaux des excipients	
Précision du système	X	X	X	X
Précision de la méthode	Oui	Oui	Oui	*
Exactitude	Oui	Oui	Oui	*
LOD	Non	Non	Non	Non
LOQ	Non	Non	Non	Non
Sélectivité/Spécificité	Non	Oui	Non	Non
Intervalle de validité	Oui	Non	Non	Non
Linéarité	Oui	Non	Non	Non
Robustesse	Non	Non	Non	Non

D'après : "Health Protection Branch Health and Welfare Canada.  
ACCEPTABLE METHODS Drugs directorate guidelines".

*\* peut être requis, dépend de la présence ou non de la présence d'une nouvelle impureté ou produit de dégradation et de la nature du test.*

*X fait partie des tests de conformité.*

*\*\* peut être requis en cas de mauvaise résolution entre pics impuretés / principe actif.*

A titre d'exemple, le tableau n°VII nous indique les critères de validation à évaluer ou à réévaluer en fonction des modifications "méthodologiques" apportées à une méthode de dosage par chromatographie liquide haute performance (18).

Tableau n° VII : Modifications "méthodologiques" apportées à une méthode de dosage par chromatographie liquide haute performance.

Critère de performance analytique	Changement de méthodologie impliquant :		
	Préparation des échantillons	Composants du système chromatographique (sauf colonne de même type)	Conditions chromatographiques
Précision du système	X	Oui	X
Précision de la méthode	Oui	Oui	*
Exactitude	Oui	Oui	Oui
LOD	Non	*	*
LOQ	Non	*	*
Sélectivité/ Spécificité	Non	*	Oui
Intervalle de validité	Non	*	Oui
Linéarité	Non	*	Oui
Robustesse	Oui	*	Oui

D'après : "Health Protection Branch Health and Welfare Canada.  
ACCEPTABLE METHODS Drugs directorate guidelines".

*\* peut être requis, dépend de la présence ou non de la présence d'une nouvelle impureté ou produit de dégradation et de la nature du test.*

*X fait partie des tests de conformité.*

Si l'on considère les changements d'appareillage et/ou de conditions d'analyses, on distingue les changements mineurs des changements majeurs nécessitant une revalidation.

- Changements mineurs :

Ce type de modification d'appareillage n'a souvent qu'une influence limitée sur les performances de la méthode et la revalidation se limitera, si nécessaire à l'étude du ou des paramètre(s) pouvant être affecté(s) par ces modifications. Si les résultats obtenus pour la conformité du système sont équivalents à ceux obtenus lors de la validation initiale, la méthode peut être considérée comme validée. Selon le type de modification, le technicien ou le responsable du laboratoire jugera, sur la base des connaissances de la méthode (étude de robustesse), de la pertinence de réaliser des essais supplémentaires.

Modifications considérées comme mineures (CLHP) :

- Changement de colonne (phase identique mais fournisseur différent).
- Modification de la phase mobile.
- Changement de fournisseur de solvant.
- Changement de température de la colonne.

L'étude de la robustesse présente un intérêt certain dans le choix des paramètres critiques à revalider ou à revoir. L'étude de robustesse permet de prévoir l'effet de la modification d'un ou plusieurs paramètres sur la stabilité de l'analyse.

- Changements majeurs :

L'utilisation d'un appareil de mesure de conception différente de celui préconisé dans la méthode initiale correspond à un changement majeur d'appareillage pouvant avoir des répercussions sur les performances de la méthode. Un changement majeur d'appareillage peut donner lieu à une revalidation selon la procédure destinée à la validation initiale des méthodes d'analyse (cf. tableau VII).

Modifications considérées comme majeures (CLHP) :

- Remplacement d'un détecteur UV-Visible par un détecteur fluorimétrique ou coulométrique.
- Changement qualitatif du type de phase mobile.
- Modification quantitative des composants de la phase mobile.
- Remplacement d'une méthode isocratique par un gradient.

### **II.3.3 Validation et conformité du système (38).**

La conformité du système est le moyen de contrôler le bon fonctionnement et les performances du matériel d'analyse.

La validation étant réalisée selon la procédure d'analyse, il est indispensable de s'assurer du respect des conditions de conformité requises par la procédure, quelle que soit la méthode.

La précision du système doit être équivalente ou supérieure à celle de la méthode initiale. Les critères de conformité définis dans la validation initiale devront être étudiés durant toute la validation de transfert.

Certains paramètres, après justification, pourront être ajustés (temps de rétention). Dans le cas de méthodes chromatographiques, des critères complémentaires jugés pertinents pourront être ajoutés : facteur de traînée, facteur de capacité, résolution ...

Les paramètres qui n'apparaissent pas dans la validation initiale devront figurer dans le rapport de validation.

Il est à noter que les monographies de l'USP/NF proposent un certain nombre de critères de performances (paramètres chromatographiques) à vérifier avant la mise en œuvre de la méthode d'analyse. Ces critères de performance à atteindre peuvent être assimilables à des tests de conformité et permettent de vérifier les conditions d'application de la méthode proposée dans un nouvel environnement.

#### **II.4 Quand ne pas revalider ? (3)**

Lorsqu'une technique validée pour son utilisation sur une substance donnée est utilisée pour la première fois par un laboratoire, il serait utile de vérifier que les résultats obtenus concordent avec ceux mentionnés dans le dossier de validation, notamment pour la fidélité et l'exactitude.

La revalidation ne s'impose pas si la concordance est établie mais s'impose dans le cas contraire.

Une méthode d'analyse mise au point et développée à un temps  $t$  subit tout au long de son utilisation de nombreuses modifications. L'évolution du système chromatographique, les modifications majeures ou mineures apportées à la méthode ne sont plus en accord avec les résultats de la validation initiale.

La revalidation s'impose donc pour assurer la pérennité de la méthode pendant toute sa durée d'utilisation.

La validation de type "initiale" largement détaillée et décrite dans les méthodologies ne présente en général pas de difficulté dans sa réalisation et dans l'interprétation de ces résultats. Il n'en est pas de même pour des revalidations partielles ou des compléments de validation où le seul juge est l'expérimentateur qui grâce à ses connaissances et son intuition devra qualifier de majeures ou de mineures les modifications apportées. A lui de nouveau de juger de la pertinence des compléments d'informations à fournir.

### **III. Validation statistique des méthodes d'analyse.**

---

### **III. Validation statistique des méthodes d'analyse.**

#### **III.1 Mise en place d'un protocole de validation au laboratoire.**

Les validations de méthodes d'analyse sont réalisées en suivant les recommandations externes (directives ou "Guidelines") qui sont des supports pour l'élaboration des procédures opératoires.

Les directives européennes ont pour référentiels les textes ICH. Ces textes sont rédigés par des experts du groupe. Ces personnes se réunissent régulièrement pour la mise à jour de ces recommandations et pour discuter des problèmes rencontrés lors des validations des méthodes d'analyses.

La mise en application de ces directives au laboratoire commence par la rédaction (ou la mise à jour) de procédures opératoires visant à décrire les différents paramètres de la validation des méthodes d'analyse physico-chimique, leurs applications, les tests statistiques à appliquer et les critères d'acceptation.

#### **III.1.2 Les procédures opératoires (9), (11), (27).**

Des procédures (procédures opératoires standardisées) internes, détaillées, élaborées et directement accessibles au laboratoire sont préférables aux recommandations développées par des personnes extérieures au service. Le rédacteur (ou le groupe de travail) de ces procédures doit, par sa connaissance du protocole complet de validation et conformément aux référentiels (SFSTP/ICH/USP/NF) ne laisser aucune ambiguïté sur les modalités opératoires de l'analyse.

Il semble important d'inclure dans le groupe de travail des futurs opérateurs. Ainsi le risque de mauvaise interprétation du protocole est minimisé et le relais de formation des autres opérateurs est assuré.

Au laboratoire, chaque critère statistique peut faire l'objet d'une procédure approuvée par l'assurance qualité.

Les procédures établissent la liste des documents relatifs à la validation et précisent pour chacun d'eux les points essentiels qui devront y figurer (protocoles, fiches d'essais, formulaires de déviation, rapport de validation...).

Le document définit les méthodes usuelles auxquelles s'appliquent les validations. Les procédures permettent la distinction entre les validations initiales, les revalidations ou les validations de transfert. La procédure opératoire envisage le cas où le protocole ne pourrait être respecté et demande que toute déviation à un protocole soit enregistrée et documentée grâce aux formulaires de déviations prévues à cet effet.

La procédure définit enfin les responsabilités :

- Le responsable du laboratoire de contrôle est responsable de l'application de cette procédure,
- Le responsable qualité est responsable de son approbation et de l'application des protocoles et rapports de validation qui en découlent,
- Le technicien doit respecter cette procédure lors de la réalisation des validations.

Pour chaque critère d'évaluation statistique, la procédure donne la définition du paramètre étudié, son estimation statistique et l'interprétation des résultats. Il est nécessaire de prévoir un système de consigne des données brutes et de traçabilité des résultats intermédiaires. En effet si chaque paramètre peut être évalué indépendamment à partir de données brutes communes, la réussite ou l'échec d'un test peut conditionner la réalisation d'un autre.

Ainsi dans la rédaction des procédures les paramètres suivants sont pris en compte :

- La terminologie des critères est conforme aux référentiels.
- Une procédure générale spécifie la liste exhaustive des critères statistiques susceptibles d'être validés. Cette liste peut se référer à une matrice type ICH, SFSTP ou USP/NF. La matrice indique alors les tests à effectuer en fonction du type de dosage spécifié ; à chaque critère correspond une procédure spécifique.
- La rédaction des procédures doit permettre un enchaînement aisé des critères à valider.
- Des tableaux de consigne des données brutes sont prévus.
- Les formules de calcul sont indiquées même si l'utilisation d'un logiciel spécifique est nécessaire.
- L'échantillonnage est spécifié pour chaque critère.
- Les critères d'acceptation sont définis.

### **III.1.3 Le plan de validation** (20), (38).

Le plan de validation est rédigé par une personne habilitée puis approuvé par les différentes personnes impliquées dans la validation de la méthode.

Ce plan précise :

- Le but de la validation,
- La méthode d'analyse à valider,
- Le produit fini ou les matières premières impliquées,
- Le descriptif des tests,
- Les objectifs et les critères d'acceptation concernant les résultats de la validation,
- Le ou les responsables des tests de validation,
- Les dates prévues de la validation.

Si des problèmes sont rencontrés lors d'une validation initiale, un complément de validation ou une modification de la méthode peut être demandée. Toute modification sera suivie d'un nouveau cycle de validation.

Le rapport de validation est rédigé puis approuvé par les personnes impliquées.

En dernier lieu et après approbation, la méthode peut-être utilisée en routine pour l'analyse du produit concerné.

## III.2 Le processus de validation.

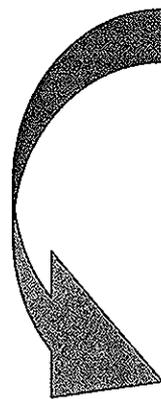
### III.2.1 Les étapes de la validation (20), (38).

La validation analytique prend une part importante dans le système d'assurance qualité.

Le processus de validation implique tous les éléments qui permettront finalement de prouver l'aptitude d'une méthode à fournir les résultats attendus mais surtout d'assurer un déroulement optimum des expériences en vue de la validation statistique proprement dite.

Le processus de validation peut se décomposer en quatre étapes distinctes, (étapes présentées en figure n°3), chacune étant critique pour la réussite de la validation.

- **Qualification du matériel**
- **Qualification fonctionnelle de la partie logicielle**
- **Tests de conformité**
- **Méthodologie de validation**



**Validation**

Figure n° 3 : Les étapes du processus de validation.

- Qualification du matériel :

Le processus de validation débute avec un système qualifié. L'effort déployé pour la qualification du matériel et la validation de la partie logicielle n'a rien de spécifique à la validation analytique (11).

A titre d'exemple, la prise en charge de l'équipement suit le schéma général suivant (38), les différentes étapes de la qualification du matériel, de la qualification de développement QD à la qualification de performance QP chez l'utilisateur.

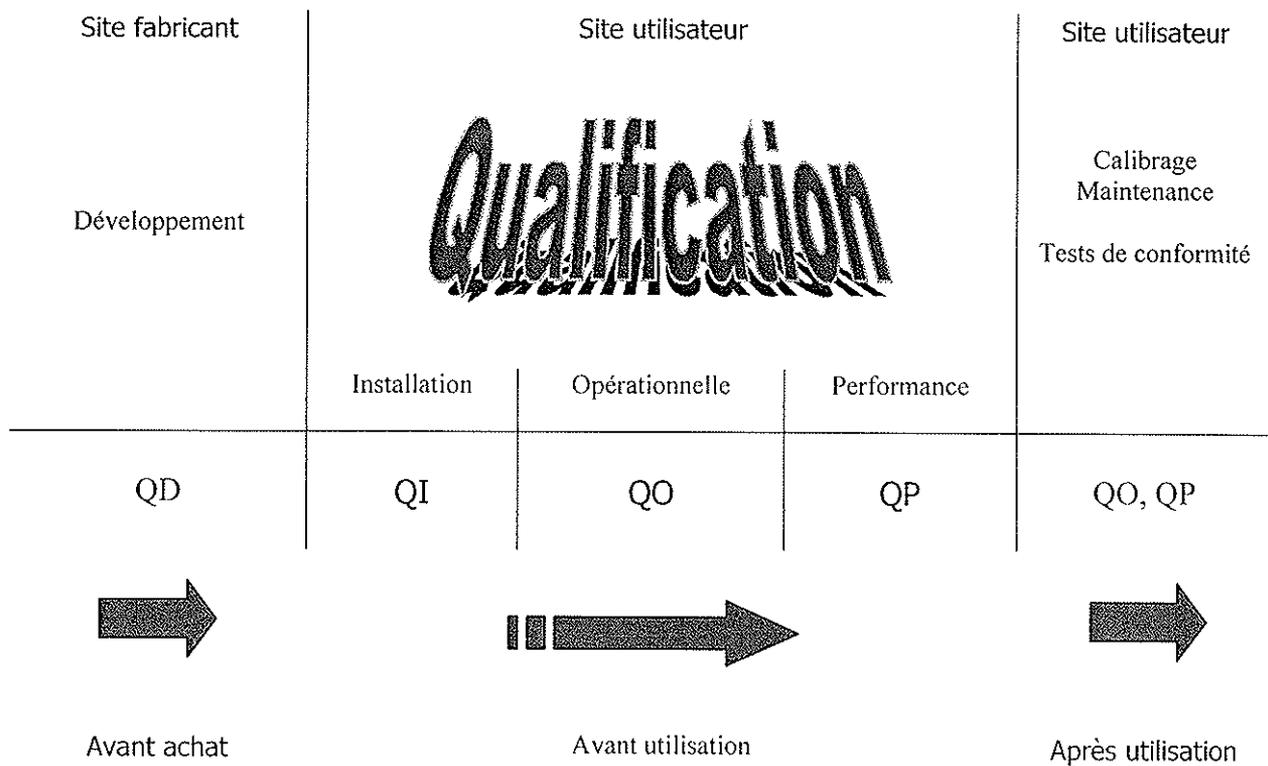


Figure n° 4 : Etapes de qualification du matériel.

D'après : WATERS Compagny. "Introduction to validation".

- Validation de la partie logicielle :

La validation de la partie logicielle suit les mêmes pré-requis que la partie instrumentale. Etroitement liée à l'instrumentation pour des tâches comme la gestion des séquences d'injection, l'acquisition, le traitement des données ou encore l'archivage des dossiers d'analyse, une qualification d'installation puis fonctionnelle des logiciels est indispensable.

Cependant le rôle de l'informatique ne s'arrête pas à la gestion des tâches permettant l'obtention des données brutes mais s'étend également à l'analyse statistique des ces données (29). En effet si les critères d'acceptation des valeurs statistiques calculées font partie intégrante du protocole de validation, la certitude d'obtenir des résultats exacts ne peut passer que par l'utilisation de moyens informatiques adaptés et validés.

Aux pré-requis matériels s'ajoutent des pré-requis "chimiques" tels que la stabilité des solutions, des paramètres de conformité ou encore des considérations plus statistiques telles que l'échantillonnage.

### **III.2.2 Autres pré-requis de la validation.**

#### **III.2.2.1 Stabilité des solutions** (7), (11), (38).

La stabilité des solutions ne constitue pas en elle-même une partie intégrante de la validation. La stabilité des solutions est un pré-requis de la validation. L'utilisation de solutions stables pendant la durée de l'analyse est un paramètre critique qui ne doit pas être négligé.

Cependant, la détermination de la stabilité des solutions à plus ou moins long terme nécessite l'utilisation de méthodes validées. Même si la phase de développement s'appuie sur une étude de robustesse des paramètres opératoires, la stabilité des méthodes sera vérifiée à court terme et l'on préférera parler "d'aptitude à l'automatisation" avant de conclure à la validité de la méthode.

L'aptitude à l'automatisation, permet de s'assurer de la stabilité des solutions à analyser pendant toute la durée de la séquence d'injections avant une étude plus approfondie de stabilité.

Une dégradation rapide est un problème lorsque la réponse de l'analyte est affectée entre l'injection et la fin de la séquence d'injection. Ceci est vrai quand les composés sont sensibles à des stimuli extérieurs ou lorsque les composants de la matrice réagissent ou se lient à la phase stationnaire ou à la verrerie.

La plupart des laboratoires disposent d'injecteurs automatiques qui peuvent fonctionner pendant plusieurs heures avant la fin du test. Dans des cas où la durée d'analyse dépasserait 24 heures, des mesures appropriées devraient être mises en place pour vérifier la stabilité des solutions.

Une procédure opératoire visant à déterminer la stabilité des solutions peut être intégrée au plan de validation.

#### **III.2.2.2 Echantillonnage et considérations statistiques.**

L'échantillonnage (5), (6) est un paramètre crucial pour assurer la validité des valeurs statistiques calculées et donc l'interprétation des résultats.

Sur un plan statistique, à de très rares exceptions près, il est impossible d'étudier la totalité des unités d'un lot. L'étude devra donc porter sur une fraction de cette population : l'échantillon.

Pour qu'un contrôle statistique sur l'échantillon soit valable, il est nécessaire que le mode de calcul soit convenablement choisi et adapté aux besoins mais il faut également que l'échantillon analysé soit représentatif du lot : ses caractéristiques doivent être aussi proches que possible de celles de la population étudiée. Le simple prélèvement au hasard d'un nombre quelconque d'unités ou de répétitions dans le cas de la validation ne suffit pas pour assurer une représentativité convenable.

Le choix d'un échantillonnage précisément adapté aux données du problème est indispensable si l'on veut procéder à une validation dont les résultats assureront un maximum de garanties. Ainsi, lorsqu'un protocole de validation original est mis en place au laboratoire, l'utilisation d'un plan d'échantillonnage est encouragée afin de vérifier la représentativité des échantillons qui vont être analysés.

Il est évident que l'échantillonnage ne répond pas aux nécessités de l'industrie en terme de temps, de coût et de productivité. Pour ces raisons et pour la surcharge de travail que peut représenter la validation statistique pour un laboratoire, les protocoles de validation (protocoles publiés) font intervenir un échantillonnage minimum. Ces protocoles ne devraient alors subir aucun autre compromis dans leur réalisation. De plus, sauf utilisation d'un logiciel spécialement dédié à la validation statistique des méthodes d'analyse (1), (29) (AVA<sup>®</sup> ou VMM<sup>®</sup> par exemple) qui invalide les calculs en cas de non-représentativité de l'échantillonnage, la qualité de l'échantillonnage n'est pas un facteur limitant au calcul des différents critères de validation (utilisation de tableurs qui ne sont validés que par l'exactitude et non la conformité des résultats qu'ils procurent).

- Autres considérations statistiques :

Les mesures individuelles sont supposées être indépendantes, de caractère aléatoire et de distribution normale.

La vérification de la normalité requiert la réalisation de tests préliminaires parfois décrits dans les recommandations. Ce caractère est cependant vérifiable à posteriori.

En outre, les variances des mesures individuelles à l'intérieur des groupes sont supposées former un ensemble homogène.

### **III.3 Critères de validation, méthodologie, évaluation et interprétation.**

Les recommandations internationales ne proposent pas de protocoles d'études statistiques complets standardisés.

Les recommandations définissent chaque critère et informent les utilisateurs sur les performances à atteindre. Si les matrices de validation permettent de choisir l'éventail des critères à valider, il reste à l'expérimentateur à déterminer la façon d'évaluer chacun des critères et de constituer un protocole complet d'étude.

En 1992, un groupe de travail réunissant des acteurs de la Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques a publié un protocole complet présentant un exemple de validation initiale d'une méthode de dosage d'un principe actif dans un produit fini (5), (6), par chromatographie liquide haute performance. Ce protocole présente également un exemple concret de réalisation, des formules de calculs, et des critères d'acceptation.

Ce protocole est appliqué depuis des années et répond aux objectifs réglementaires de la validation statistique à tel point que la méthodologie développée pour la validation a été reprise par la plupart des utilisateurs.

Il a été développé ultérieurement un logiciel d'aide à la validation analytique qui traite les données brutes recueillies à partir du protocole de la SFSTP. Le logiciel AVA<sup>®</sup> a gagné la confiance des autorités qui le considère comme valide pour l'interprétation statistique.

La publication de ce guide de validation et l'utilisation simultanée de ce logiciel représentent un outil efficace et sûr pour la validation statistique des méthodes d'analyse.

Il existe cependant d'autres méthodes moins conventionnelles que la validation "type AMM" du guide de la SFSTP pour estimer les critères de validation. Pour chacun des critères qui sera présenté, nous verrons en plus de la validation type "AMM" de la SFSTP les stratégies les plus courantes qu'il est possible d'adopter.

### **III.3.1 Etude de la linéarité.** (3), (4), (5), (6), (23), (26), (28), (34), (37)

La linéarité d'une procédure analytique est sa capacité, à l'intérieur d'un intervalle donné, à fournir des résultats directement proportionnels à la concentration (quantité) de substance présente dans l'échantillon.

#### **III.3.1.1 Stratégies d'évaluation.**

L'étude de la linéarité représente en fait une étude de régression. La méthode consiste à étudier la liaison et sa représentation par un modèle mathématique lorsque l'une des grandeurs n'est pas aléatoire et peut être fixée au gré de l'expérimentateur.

Dans le cas d'une validation de dosage par chromatographie, on va vérifier si la relation entre les quantités injectées (non aléatoires mais fixées par l'expérimentateur) et les réponses obtenues sont proportionnelles. La représentation la plus simple de cette proportionnalité est le modèle linéaire.

Si le modèle linéaire n'est pas la seule représentation mathématique utilisable, le cas idéal serait une droite, cette droite pouvant passer par zéro.

- Linéarité et coefficient de corrélation ( $r$ ) (26), (37).

Le coefficient de corrélation est le reflet de la puissance de la liaison entre deux caractères quantitatifs (concentrations "y" et réponses "x").

Le calcul du coefficient de corrélation n'est intéressant que pour vérifier l'absence de liaison. L'interprétation du coefficient de corrélation est peu précise pour vérifier l'existence d'une liaison forte. En effet si  $r$  est voisin de l'unité, l'écart entre le  $r$  calculé et  $r = 1$  peut-être dû soit à une variance résiduelle élevée soit à une régression non linéaire (cas d'une courbe en S dans laquelle il faudra déterminer la zone de linéarité).

Pour toutes ces raisons l'utilisation et l'interprétation du coefficient de corrélation ne constituent pas un paramètre critique de l'étude de linéarité mais doit être considérée comme un paramètre d'appréciation de la linéarité lorsqu'il est associé à un examen visuel de la droite.

- Linéarité et coefficient de détermination ( $r^2$ ) (1), (26), (37).

Le coefficient de détermination peut être interprété comme la proportion de la variance de  $y$  imputable à la variance de  $x$ . Il compare les valeurs  $y$  estimées aux valeurs  $y$  réelles et varie entre 0 et 1. Un coefficient de détermination égal à 1 indique une corrélation parfaite (aucune différence entre les valeurs  $y$  estimées et réelles).

Comme l'interprétation du coefficient de corrélation, la seule évaluation du coefficient de détermination n'est pas suffisante pour démontrer la linéarité de la relation entre concentrations  $x$  et réponses  $y$ . On utilise un test de Fisher  $F$  (*Annexe 2 : 6 - Test de validité de la droite de régression.*) pour déterminer si la relation observée entre les variables dépendantes et indépendantes est due au hasard.

- Linéarité et facteur de réponse de la droite de régression (24).

Une approche peu commune de la vérification de la linéarité consisterait à calculer le coefficient de variation du facteur de réponse de la droite de régression.

Si la relation concentration/réponse dans une zone déterminée est une droite et que chacune des mesures à chaque niveau de concentration répond aux conditions de répétabilité, le facteur de réponse sera constant quelles que soient les valeurs des couples. Dans ce cas, un coefficient de variation inférieur à 0,5% assure avec certitude une relation linéaire.

- Stratégie SFSTP (5), (6).

La stratégie la plus courante (validation type SFSTP) (3), (4) pour estimer la linéarité d'une méthode (sur un intervalle de concentration centré sur la valeur cible) est d'effectuer un test de dépendance linéaire (test de *Fisher* (5), (6)) afin de vérifier la liaison des valeurs entre elles.

La validité de la droite de régression est vérifiée par un second test de *Fisher* d'ajustement linéaire, ce test permet d'estimer l'erreur expérimentale.

Un test de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec zéro permet de vérifier si la droite de régression passe par zéro (test de *Student* (5), (6)).

Le test de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec zéro lorsqu'il est significatif permet de mesurer l'effet éventuel de l'existence d'un biais.

(Les tests sont présentés en Annexe 2).

Quelques précautions sont cependant nécessaires quant au choix de l'intervalle de linéarité :

- l'intervalle de mesure doit obligatoirement englober l'intervalle de l'uniformité de teneur accepté pour le composé étudié.
- il ne doit pas être trop étendu sous peine de rejet d'une méthode pour laquelle un intervalle de linéarité existerait bien mais à l'intérieur de l'intervalle préalablement choisi trop large.

L'harmonisation des critères de validation analytique sur le plan international préconise les gammes de concentration suivantes (24) :

- Pour un dosage : entre 70% et 130 % ou 80%-120% de la concentration de travail est préconisé.
- Pour un essai limite quantitatif : entre la concentration égale à la limite de quantification et 50% ou 120% de la spécification.
- Pour un essai de dissolution : entre 80% du pourcentage minimal et 120% du pourcentage maximal.
- Pour une uniformité de teneur : entre 70% et 130% de la concentration de travail.

Puisque la linéarité s'exprime au moyen d'un calcul statistique, il faut donc un nombre minimum de résultats d'analyse (données brutes) avant de pouvoir l'apprécier. On admet qu'il faut au moins travailler sur 5 échantillons de concentrations différentes, répartis sur tout le domaine de validité recherché.

Chaque échantillon faisant l'objet d'une étude de répétabilité comportant au moins trois essais répliqués. La linéarité se déterminera sur au moins 15 points de mesure couvrant tout le domaine de validité supposé de la méthode d'analyse.

Le calcul statistique impose également que les solutions à analyser soit obtenues à partir de pesées indépendantes dont l'écart de pesée par rapport à la valeur cible doit être inférieur à 5%.

L'homogénéité des variances (test de *Cochran* (5), (6) ou de *Bartlett* (25)) sera vérifiée pour les trois mesures à chaque niveau de concentration.

L'étude de la linéarité consiste en l'étude parallèle d'une gamme de concentrations obtenues à partir de la forme pharmaceutique reconstituée et d'une gamme obtenue à partir de la solution de référence du principe actif à étudier. La comparaison statistique des deux droites de régression (comparaison des pentes par un test *t* de *Student* (5), (6)) permet de déceler un éventuel effet matrice.

### **III.3.1.2 Critères d'acceptation.**

Les valeurs statistiques obtenues sont à comparer aux valeurs statistiques tabulées au risque statistique considéré.

Les critères suivants seront vérifiés :

- Le test de l'existence d'une pente doit être significatif (généralement la valeur calculée est hautement significative),
- Le test de validité de l'ajustement doit être non significatif,
- Le test de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec zéro est idéalement non significatif.

Une alternative à l'utilisation du test de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec zéro existe et consiste à admettre une erreur relative sur l'axe des ordonnées proportionnelle à la teneur en analyte. L'ordonnée à l'origine ne devrait pas différer de zéro de plus ou moins deux fois la précision intermédiaire de la méthode. Par exemple si la précision intermédiaire pour l'essai est de 2,5 % (+/- 5%) et que la concentration nominale en analyte est de 50,0 mg/comprimé, la variation permise pour l'interception avec l'axe des ordonnées serait de +/- 2,5 mg.

- Une valeur largement négative pour l'ordonnée à l'origine indiquerait une possible quantification des résultats en dessous de la limite de quantification de la méthode, les valeurs alors obtenues ne sont pas viables.
- Une valeur largement positive indiquerait un problème de sélectivité de la méthode.

La consultation des graphiques (graphiques des résidus, droites de régression, droites de régression cumulées) permet de vérifier l'alignement des points, de comparer les droites de régression ou de suspecter une valeur aberrante.

En outre, l'analyse des résidus permet de vérifier que la linéarité s'applique de façon identique à la totalité du domaine de concentration étudié qui définit l'intervalle de validité de la linéarité.

Les formules permettant l'évaluation des paramètres des droites de régression, à savoir, la détermination de la pente, de l'ordonnée à l'origine ainsi que le coefficient de corrélation sont représentées en annexe 2.

La démarche de détermination de la linéarité selon la SFSTP est représentée par la figure suivante (Figure n° 5).

# Etude de la linéarité (type SFSTP)

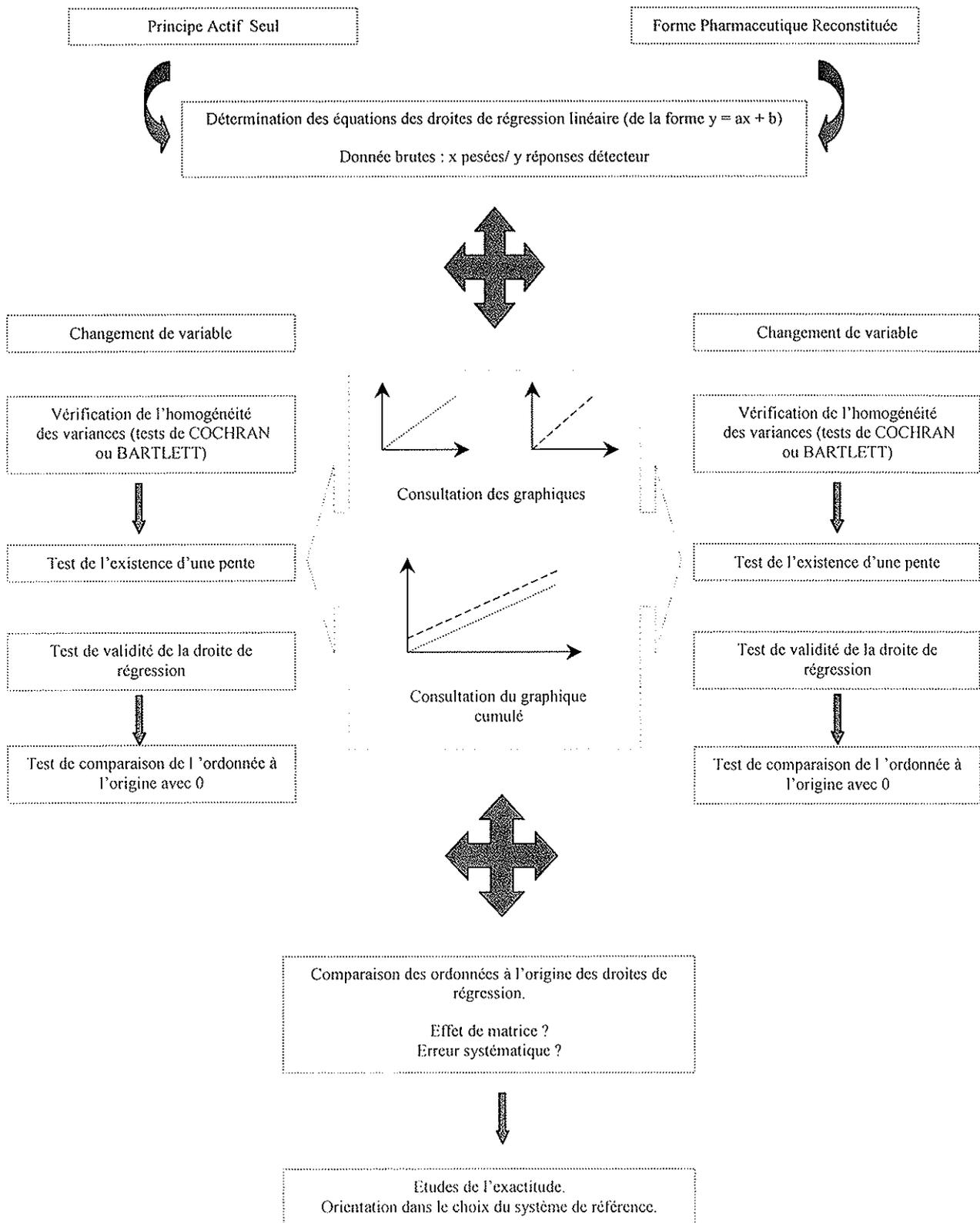


Figure n° 5 : Etude de la linéarité.

### **II.3.2 Intervalle de validité de la linéarité (18), (28).**

L'intervalle de validité d'une procédure d'analyse est le domaine déterminé par les valeurs supérieures et inférieures de substance à doser pour lequel il a été démontré que la procédure est appropriée quant à sa répétabilité, son exactitude et sa linéarité.

Dans beaucoup de cas l'intervalle de linéarité et l'intervalle de validité de la linéarité est à tort assimilé au même critère. L'intervalle de validité se réfère aux valeurs extrêmes de la méthode qui sont comprises dans l'intervalle de linéarité (points de concentrations limites) avec une exactitude et une précision connues jugées acceptables.

L'intervalle de validité est inclus dans l'intervalle de linéarité : un intervalle de validité peut donc ne représenter qu'une portion de l'intervalle de linéarité.

Tout le travail consiste à déterminer les valeurs supérieures et inférieures de substance à doser pour lesquelles la procédure d'analyse reste acceptable (au niveau de ces trois critères de validation) pour le but recherché.

La détermination de l'intervalle de validité de la linéarité trouve tout son sens pour des essais limites de "type quantitatif". C'est le cas de l'analyse de traces (impuretés ou détermination de taux résiduels dans le cas des validations des procédures de nettoyage).

Dans ce cas, la teneur en principe actif ou en impureté recherchée doit être inclus dans l'intervalle de validité de la linéarité de la méthode. L'intervalle de validité permet alors d'avoir une estimation de la précision de la méthode pour des concentrations égales ou supérieures à la limite de quantification.

A des niveaux de concentrations plus élevés, cas d'un dosage d'un principe actif dans un produit fini par exemple où l'intervalle de linéarité est large, la détermination de l'intervalle de validité de la linéarité n'apporte pas d'information essentielle, le calcul d'un intervalle de confiance centré sur la valeur théorique à rechercher est suffisante.

### **III.3.3 Exactitude** (3), (4), (5), (6), (23), (26), (28), (34).

L'exactitude d'une procédure analytique exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur acceptée comme conventionnellement vraie (étalon de référence utilisé au sein d'une firme) ou comme valeur de référence (étalon international, SCR par exemple) et la valeur trouvée.

La comparaison des valeurs est déterminée en appliquant la procédure d'analyse un certain nombre de fois.

#### **III.3.3.1 Substances de référence, étalons et préparations témoins** (28).

D'après : J.M. NIVET "Validation des procédures d'analyse" (28).

##### **III.3.3.1.1 Les substances de référence.**

###### **1-Définition (guide ISO 30-1981) :**

"Matériau ou substance de référence dont une ou plusieurs propriétés sont suffisamment bien définies pour permettre de l'utiliser pour l'étalonnage d'un appareil, l'évaluation d'une méthode de mesurage ou l'attribution de valeurs aux matériaux".

En général ces propriétés sont définies par une autorité (organisme de certification) et portées à la connaissance de l'utilisateur par un certificat d'accompagnement de la substance, délivré par l'organisme de certification ; on a alors un matériau de référence certifié.

Le degré de reconnaissance de l'organisme de certification est important ; il confère aux matériaux de référence certifiés une qualité différente.

## 2-Les substances de référence à la PHARMACOPEE EUROPEENNE :

Pour la Pharmacopée Européenne, une substance de référence est une substance qui a été établie et vérifiée par la Commission Européenne de Pharmacopée en vue de son utilisation comme standard de comparaison tel que prescrit dans les monographies de la Pharmacopée.

Ceci signifie qu'une substance de référence n'est mise à la disposition des utilisateurs par le secrétariat technique de la Pharmacopée que pour des tests ou dosages déterminés dans la notice qui leur est jointe et n'est pas nécessairement appropriée à d'autres fins.

La Commission Européenne de Pharmacopée a défini :

- des substances chimiques de référence (SCR)
- des préparations biologiques de référence (PBR)
- des spectres de références (pour substances réglementées, stupéfiants, psychotropes...) qui sont qualifiés « d'étalons officiels à utiliser en cas de litige ».

L'abréviation SCR<sub>fr</sub> (30) indique une substance chimique de référence de la Pharmacopée française établie par la commission nationale de Pharmacopée des SCR. L'analyse des SCR est effectuée selon la monographie de la Pharmacopée. Des déterminations complémentaires sont éventuellement réalisées. Elles concernent l'identification, la pureté, le dosage, la teneur en eau et le suivi de la stabilité.

### 3-Les substances de référence à la PHARMACOPEE AMERICAINE (7), (14) :

Pour la Pharmacopée américaine (USP/NF XXIII) il existe des substances de référence certifiées qui sont qualifiées "d'additionnelles" (par rapport aux étalons de référence USP/NF désignés par "USP Reference standard") et qui sont fournies sous la supervision de l'USP Reference Standard Committee.

Ils se divisent en trois groupes :

- USP Reference standard et NF Reference standard : ces derniers ne sont plus utilisés dans la dernière édition de l'USP/NF même si la demande continue d'exister.

L'USP/NF XXIII (general notice page 4 et general requirements <11> page 1652) précise que les USP reference standards (désignés par "RS") sont d'authentiques spécimens de substances dont la conformité pour l'utilisation en tant qu'étalon de comparaison dans les tests et dosages de la Pharmacopée, a été vérifiée. Leur haute qualité métrologique a été prise en compte puisque ces spécimens dérivent de «substances sélectionnées pour leur haute pureté, leurs caractéristiques essentielles et leur adéquation pour l'usage supposé ».

- FCC Reference standards (FCC = Food Chemicals Codex)
- AS ou Authentic substances

### 4-Substances de référence OMS :

L'OMS délivre des substances de référence pour des produits figurant à la Pharmacopée internationale.

### III.3.3.1.2 Les étalons.

Définition selon la norme ISO 7525\*-1986 (F)

"Mesure matérialisée, appareil de mesure, système de mesure destiné à définir, réaliser, conserver ou produire une unité, ou une ou plusieurs valeurs connues d'une grandeur pour les transmettre par comparaison à d'autres instruments de mesure".

Etalon national :

"Un étalon est national s'il est reconnu par une décision officielle nationale pour servir de base dans un pays donné".

Etalon international :

"Un étalon est international s'il est reconnu par un accord international pour servir de base internationale à la fixation des valeurs de tous les autres étalons de la grandeur concernée".

Etalons utilisés en analyse chimique (tous degrés de reconnaissance confondus) :

- Etalon de référence

Définition ISO 3725-1986 (F)

"Etalon, en général de la plus haute qualité métrologique et disponible en un lieu donné, duquel dérivent les mesurages effectués en ce lieu".

C'est la "Reference Standard" pour les pays anglo-saxons.

Pour la Pharmacopée européenne, il s'agit "d'étalons officiels à utiliser en cas de litige".

- Etalons absolus

Ils représentent des étalons de référence mais comme il est fait abstraction de leur disponibilité et de leur utilisation en un lieu donné, on les qualifie d'absolus.

- Etalon primaire

*"Etalon qui présente les plus hautes qualités métrologiques dans un domaine spécifié".*

(définition ISO 5725-1986 (F) 6.04)

- Etalon secondaire

*"Etalon dont la valeur est fixée par comparaison avec un étalon primaire".*

(définition ISO 5725-1986) (F) 6.05)

- Etalon de travail

Ils dérivent de l'étalon de référence.

*"Etalon qui, habituellement étalonné par comparaison à un étalon de référence, est utilisé couramment pour étalonner ou contrôler des mesures matérialisées ou des appareils de mesure".*

(définition ISO 5725-1986 (F) 6.09)

Le degré de reconnaissance, la représentation et l'utilisation des différents étalons est illustré sur la figure n°6.

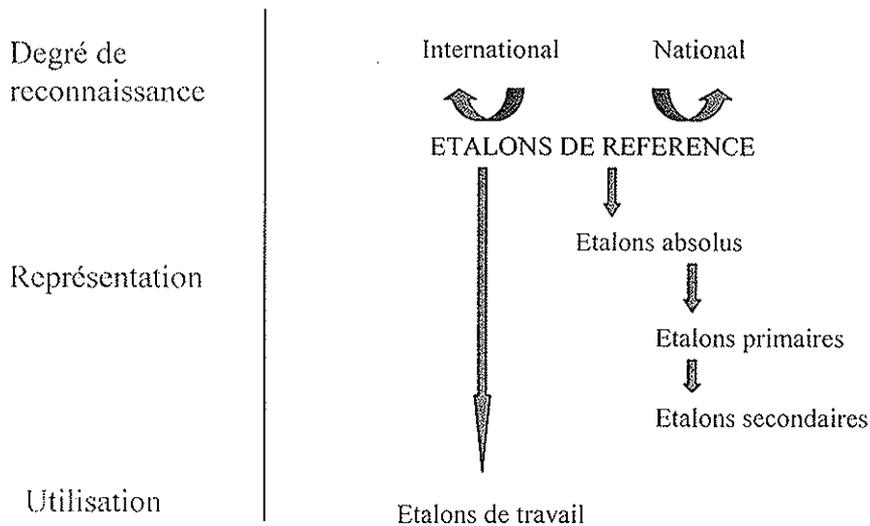


Figure n° 6 : " Les étalons ".

D'après : J.M. NIVET. Validation des procédures d'analyse,  
 Faculté de Pharmacie de Paris V, Pharmacia & Upjohn. Mai 1997.

### III.3.3.1.3 Les témoins

Un témoin est une préparation (le plus souvent extemporanée) effectuée à partir d'une substance de référence qualifiée de convenable pour l'utilisation à laquelle elle est destinée, dans les monographies de la Pharmacopée.

L'absence de référence (valeur ou étalon de référence) ou de caractérisation de l'étalon utilisé est une erreur couramment retrouvée lors de l'étude de l'exactitude.

### III.3.3.2 Protocoles d'étude.

L'exactitude fournit une indication sur les erreurs systématiques, c'est-à-dire qu'elle exprime le décentrement moyen des valeurs obtenues par rapport à la valeur conventionnellement vraie qu'il faudrait obtenir si la méthode était exacte.

Un biais résulte de la comparaison entre une concentration trouvée par rapport à une concentration théorique sur le domaine de validité supposé de la méthode.

Les différents types de biais que l'on peut rencontrer sont tracés sur la figure suivante (28) :

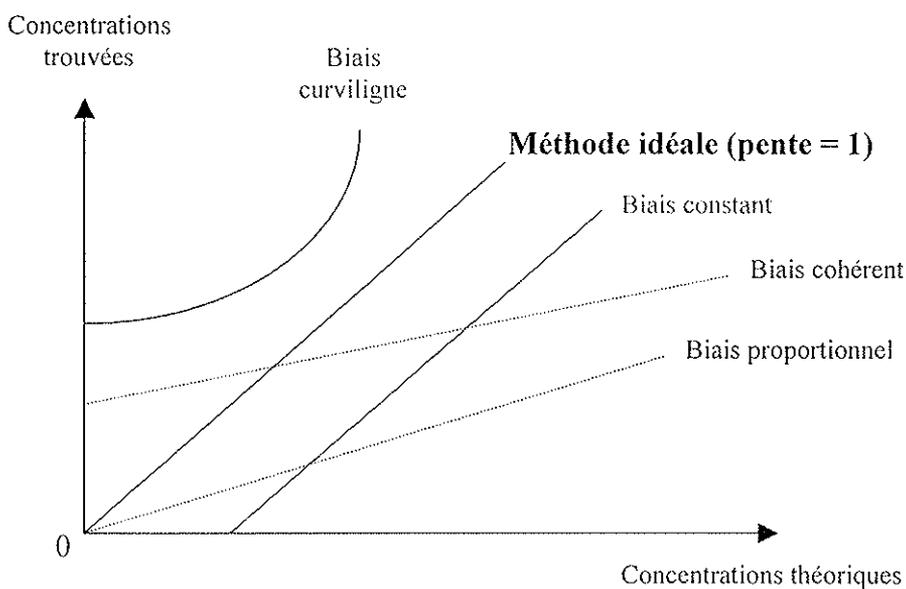


Figure n° 7 : Les différents biais analytiques.

D'après : J.M. NIVET. "Validation des procédures d'analyse" (28).

L'exactitude d'une méthode peut varier à l'intérieur de l'intervalle de validité. Il faut donc rechercher l'existence toujours possible d'un biais.

La méthode idéale ne présentant aucun biais serait telle que la pente de la droite serait de 1, l'interception sur l'axe des y au point 0 et un coefficient de corrélation de 1,00.

• **Etude de l'exactitude : plan de validation étendu sur trois jours (type SFSTP) (4).**

L'exactitude est étudiée sur l'intervalle de linéarité supposé de la méthode.

La détermination de l'exactitude consiste à comparer entre elles les droites de régression principe actif seul (gamme ayant valeur de référence) et forme pharmaceutique reconstituée. Ces deux gammes répondent indépendamment aux conditions de linéarité, l'homogénéité des variances pour chaque groupe est vérifiée.

L'étude statistique est basée sur les recouvrements entre les pesées retrouvées et les pesées introduites. Les pesées retrouvées sont calculées à partir des pesées effectives grâce au système de référence considéré (on effectue alors un changement de variable).

Le choix du système de référence est "imposé" par l'étude de linéarité. En effet, si les ordonnées à l'origine des deux droites ne diffèrent pas entre elles, elles peuvent quand même présenter une différence significative par rapport au point 0.

- Dans le cas où le test de comparaison des ordonnées à l'origine avec le point 0 est non significatif, le système de référence considéré est l'étalon 100% ; cette méthode permet d'évaluer l'exactitude dans les conditions de dosage routinières.
- Dans le cas contraire, la confiance accordée à la valeur 100% n'est pas suffisante et il est nécessaire de considérer la droite de régression dans sa totalité comme système de référence.

Le test de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec le point zéro n'est donc pas un test dont la conclusion est déterminante pour la validité de la méthode.

Cependant, il est compréhensible qu'une méthode ne présentant aucun biais soit préférable et plus rassurante à l'utilisation quotidienne qu'une méthode pour laquelle un facteur de correction doit être appliqué.

Lorsque ces tests sont vérifiés, il est possible de calculer la valeur du recouvrement moyen (moyennes de valeurs retrouvées à la concentration cible 100% par rapport au système de référence considéré) et son intervalle de confiance (au risque considéré).

La figure n° 8 retrace la démarche de détermination de l'exactitude d'une méthode d'analyse selon la SFSTP.

## Etude de l'exactitude Démarche type SFSTP

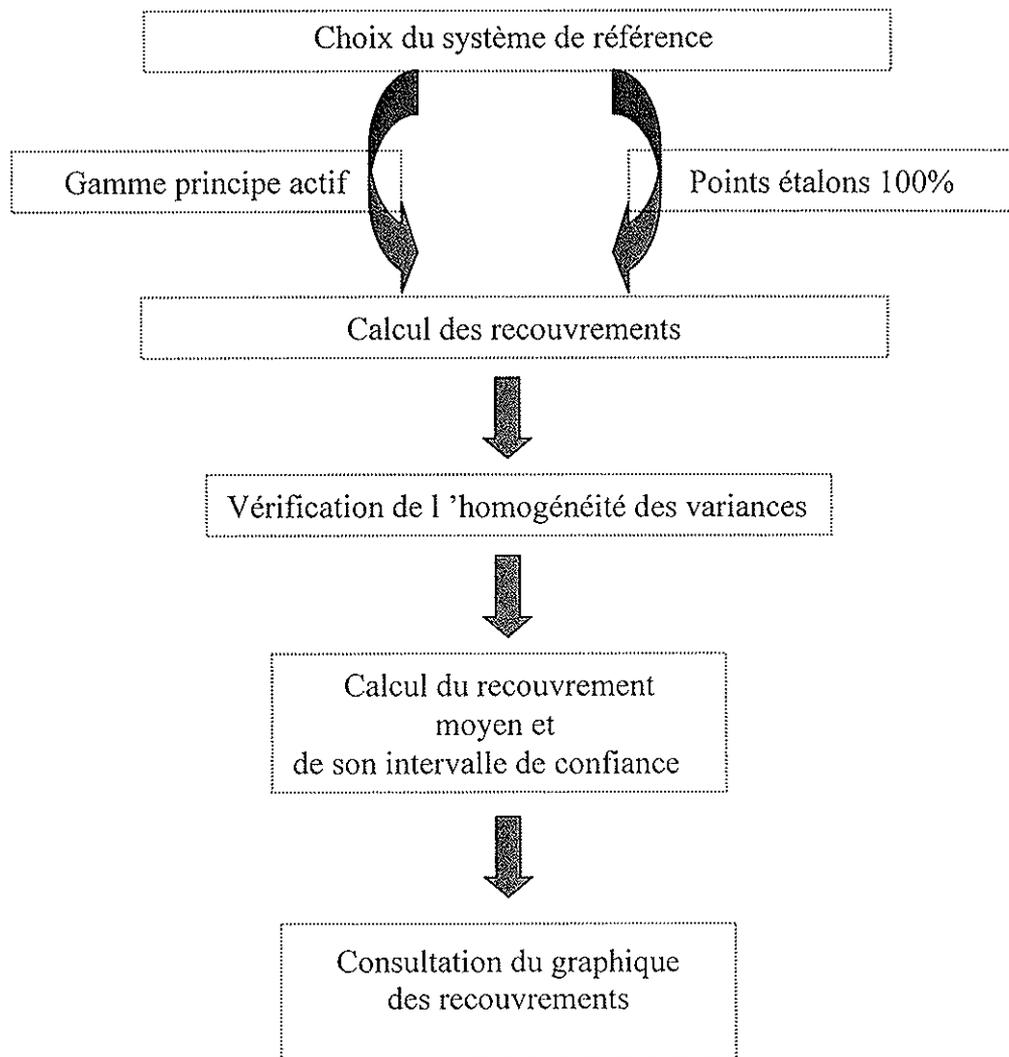


Figure n° 8 : Etude de l'exactitude.

• **Etude de l'exactitude : exemple de plan de validation réalisable sur une journée (variante SFSTP).**

L'exactitude est étudiée sur la forme pharmaceutique, les échantillons sont préparés par la méthode des ajouts dosés. Trois concentrations (haute, moyenne et basse) sont utilisées à l'intérieur de l'intervalle de linéarité, chacun est analysé six fois et répond aux conditions de répétabilité.

Après vérification de l'homogénéité des variances pour chaque groupe de mesures (test de *Cochran* (5), (6) ou test de *Bartlett* (25)), un recouvrement moyen est déterminé à chaque niveau de concentration.

Une analyse de variance permet de vérifier si un effet concentration influence les résultats :

- Si l'influence du facteur concentration ne peut être démontrée, l'intervalle de recouvrement moyen global, son coefficient de variation et l'intervalle de confiance sont calculés. Si la valeur 100% est comprise dans les limites de l'intervalle de confiance, la méthode est considérée comme exacte.
- Si la concentration influence les résultats (en terme de pourcentage de recouvrement), on calcule la plus petite différence significative où deux concentrations sont considérées comme différentes si la différence entre leur moyenne est supérieure à la plus petite différence significative.
- Si une ou deux concentrations influent sur les résultats, un test statistique est appliqué afin de prouver (ou non) l'exactitude de la méthode à ces concentrations.
- Si les trois concentrations ont une influence, un test de proportionnalité est effectué en comparant par un test de *Student* les termes indépendants de la droite de calibrage obtenue (avec ces trois concentrations) avec la valeur théorique 0, ou bien en

comparant si la valeur 0 est à l'intérieur de l'intervalle de confiance de l'ordonnée à l'origine. Si une erreur proportionnelle est démontrée, la méthode peut être utilisée en appliquant la courbe de calibrage calculée auparavant avec ces trois concentrations.

#### **III.3.3.3 Critères d'acceptation .**

L'intervalle de confiance du recouvrement moyen calculé contient de préférence la valeur théorique (100%).

La valeur de l'intervalle de recouvrement acceptable est à définir en interne en fonction du type de procédure d'analyse et du nombre d'échantillons.

Le paramètre le plus important réside dans la détection éventuelle d'un biais expérimental.

### **III.3.4 Etude de la fidélité** (3), (4), (5), (6), (16), (23), (26), (28), (34).

- Le premier niveau de fidélité est la répétabilité. La répétabilité exprime la fidélité sous des conditions opératoires identiques : analystes, équipements, réactifs dans un court intervalle de temps.

La répétabilité est un paramètre de dispersion qui exprime la variabilité minimale d'une procédure analytique. La répétabilité s'exprime par le calcul de l'intervalle de confiance de la valeur moyenne et du coefficient de variation de répétabilité.

Dans ce contexte, les valeurs individuelles proviennent d'une répétition de la totalité de la procédure évaluée (de la préparation des échantillons jusqu'au résultat final) à partir d'un échantillon initial homogène.

- Autrefois assimilée à la reproductibilité, la fidélité intermédiaire consiste à établir les effets d'événements aléatoires sur la fidélité de la procédure d'analyse au sein d'un même laboratoire.

Des essais effectués sur des produits identiques, dans des circonstances présumées identiques, ne conduisent pas toujours à des résultats identiques. Cela est dû à l'existence d'erreurs à caractère aléatoire inhérente à toute méthode d'analyse. Les facteurs susceptibles d'influer sur le résultat d'un essai ne peuvent pas en effet être tous contrôlés. Dans l'interprétation pratique des résultats d'un essai, il est nécessaire de tenir compte de cette variabilité.

En dehors des erreurs de type systématique, de nombreux facteurs peuvent contribuer à la variabilité d'une méthode comme l'opérateur, l'équipement utilisé, l'étalonnage de l'équipement, l'environnement, le temps ou encore les réactifs.

Cette variabilité est plus grande lorsque les essais à comparer ont été effectués par des opérateurs et/ou avec des instruments différents que lorsqu'ils ont été obtenus par le même opérateur utilisant le même équipement. La fidélité intermédiaire de la méthode peut être partiellement assurée par un suivi des paramètres opératoires preuve du bon déroulement de l'analyse.

- La reproductibilité étudie la variation des résultats obtenus lors d'études inter-laboratoires (12).

La variabilité de la méthode est alors testée dans des conditions maximales.

La principale difficulté dans l'estimation de la reproductibilité réside dans la distribution de l'échantillon initial homogène entre les différents laboratoires concernés.

L'utilisation d'un plan expérimental est encouragée par ICH (22), (23). On dispose de plusieurs groupes d'essais répondant aux conditions de reproductibilité. A l'intérieur de chaque groupe, on a effectué  $n$  déterminations indépendantes répondant aux conditions de répétabilité. L'étude statistique porte généralement sur des formes reconstituées, un étalon à la même concentration est utilisé.

*Remarque :*

Pour l'étude de la fidélité, les textes préconisent d'utiliser un même échantillon d'un lot homogène ou d'un reconstitué. Dans le cas d'une validation initiale, la validation de la méthode peut être réalisée avant la validation du processus de fabrication et il est ainsi difficile d'être sûr de l'homogénéité du lot, excepté s'il existe une méthode de dosage absolue.

Si les reconstitués sont en général de simples mélanges de composés, ils ne sont pas équivalents à un produit formulé qui peut subir lors de sa fabrication des modifications physico-chimiques.

L'étude de la reproductibilité ne doit pas être fournie pour la constitution d'un dossier d'AMM (ICH3 doc 29.11.95, Step 2).

### **III.3.4.1 Méthodologie.**

L'étude de la fidélité est effectuée à partir d'un minimum de six mesures par série sur un reconstitué à la concentration cible.

De façon classique, il est effectué une série de mesures par jour, soit trois séries si l'on suit le protocole SFSTP.

- Chaque série répond aux conditions de répétabilité, les six échantillons sont analysés par un opérateur et dans des conditions opératoires identiques.
- Entre elles, les différentes séries répondent aux conditions de fidélité intermédiaire ou de reproductibilité.

Les coefficients de variations (répétabilité, fidélité intermédiaire ou reproductibilité) sont estimés sur des pourcentages de recouvrement. Le calcul des quantités retrouvées nécessite donc le choix d'un système de référence, le choix s'effectue de la même façon que pour l'étude de l'exactitude.

La variance de répétabilité est calculée en effectuant la moyenne des variances de chaque groupe de mesures (sous réserve que celles ci soient homogènes), mesures obtenues pour chaque série dans des conditions opératoires identiques.

S'il s'agit de comparer des groupes de mesures obtenues dans des conditions différentes (fidélité intermédiaire ou reproductibilité), la variance des résultats se calcule en ajoutant à la variance de répétabilité la variance inter-groupe des résultats.

(Formules en annexe 2)

Les grandes étapes de la méthodologie SFSTP, en vue de l'appréciation des paramètres de fidélité sont retracées sur la figure n°9.

## Etude de la fidélité d'une méthode d'analyse (type SFSTP)

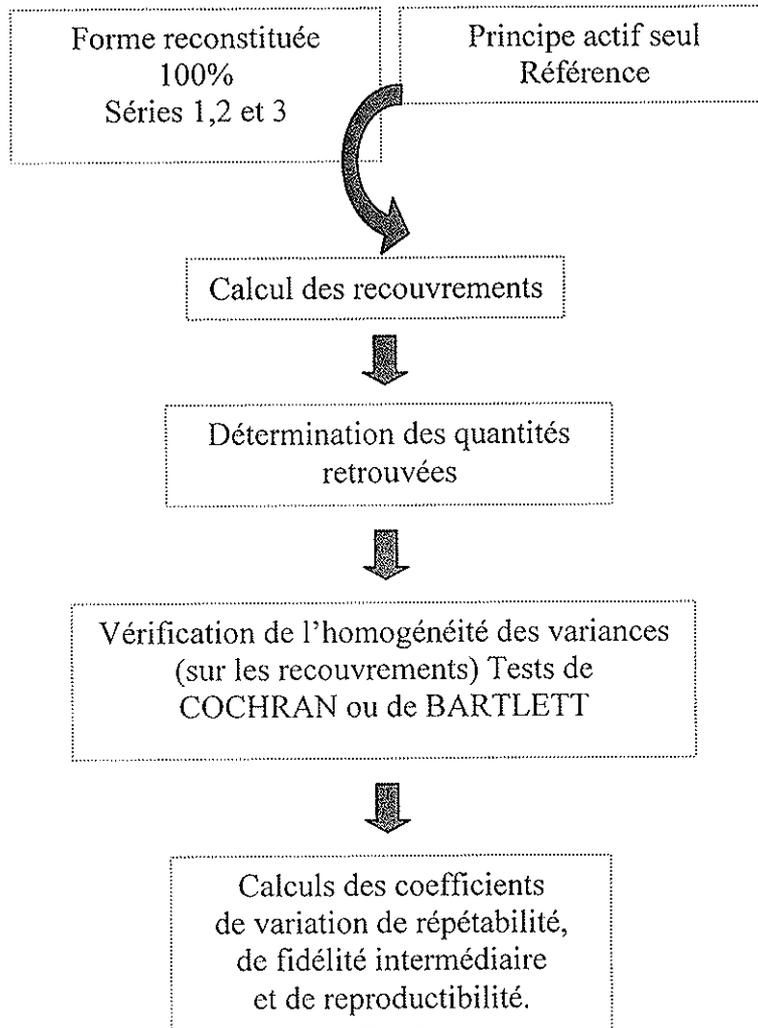


Figure n° 9 : Etude de la fidélité .

### **III 3.4.2 Interprétation des résultats.**

Plus la méthode est précise plus l'écart type est faible.

Le coefficient de variation de répétabilité est généralement égal à la moitié ou au tiers de la valeur du coefficient de variation de fidélité intermédiaire. Certains auteurs relient le critère de fidélité avec l'intervalle d'acceptation. Par exemple pour 95-105%, la fidélité intermédiaire recommandée est de 2%, elle est de 4% lorsque l'intervalle est 90-110%.

Il est important de relier la valeur du coefficient de variation calculé avec le nombre de répétitions effectuées. Plus le nombre d'échantillons analysés pour une même concentration est important plus les coefficients de variation (%) doivent être faibles pour une même méthode de dosage.

Ainsi une méthode avec un grand coefficient de variation (%) devrait pouvoir être utilisée si le nombre d'essais est augmenté (41).

Si l'on excepte le cas où les coefficients de variation de répétabilité et de fidélité intermédiaire sont calculés à différents niveaux, il est généralement constaté qu'à la concentration 100% la valeur du coefficient de variation de répétabilité (calculée sur trois séries d'essais, chacune de six essais répliqués) est inférieure à 2%.

L'incertitude d'un résultat analytique peut être minimisée :

- En diminuant la variabilité, c'est à dire en augmentant la précision (répétabilité),
- En accroissant le nombre de résultats (16).

Il existe une dualité entre fidélité et nombre de résultats quant à l'appréciation de l'incertitude d'un résultat analytique.

L'interprétation des coefficients de variation doit également tenir compte de la concentration en analyte dans l'échantillon à analyser. A titre d'exemple, le tableau n° VIII regroupe les coefficients de variation de répétabilité admissibles en fonction de la concentration en analyte dans l'échantillon.

Tableau n° VIII : Valeurs admissibles des Coefficients de Variations de répétabilité.

Pourcentage d'analyte dans l'échantillon	CV maximum (%) <i>Kolthoff</i> (n=10)	CV maximum (%) <i>Horwitz</i> (n=10)
100	0.1 à 0.3%	2
50	0.3%	2.2
10	1%	2.8
1	2 à 5	4
0.1	5 à 10	5.7
0.01 à 0.001	10	8 à 11.3
0.0001	-	16

n : nombre d'échantillons

D'après : M.A.CAMACHO SANCHEZ – "Validation protocol of analytical methods for finished pharmaceutical products" (4).

Ainsi l'interprétation d'un coefficient de variation doit impérativement tenir compte du nombre d'échantillons, de la concentration en analyte dans chaque échantillon et du type de fidélité demandé (répétabilité, fidélité intermédiaire ou reproductibilité inter laboratoire).

### **III.3.4.3 Fidélité et intervalle de validité de la linéarité (4).**

Une étude de répétabilité aux points extrêmes de la gamme de linéarité permet d'accéder à l'intervalle de validité de la linéarité.

Cette méthode consiste à analyser au moins trois solutions de concentrations différentes : limite basse, limite haute et concentration moyenne.

Pour chacune de ces concentrations, six échantillons indépendants obtenus à partir d'un même échantillon homogène seront analysés.

Un coefficient de variation de répétabilité est calculé à chaque niveau testé. Les coefficients de variation de répétabilité calculés sont généralement d'autant plus importants que les concentrations des solutions testées sont faibles et que l'on se rapproche de la limite de quantification.

### **III 3.4.4 Répétabilité de la méthode et répétabilité du système**

(18), (26).

Quelquefois confondu à tort, la répétabilité du système ne fait pas partie intégrante d'un protocole de validation. Cependant, sa détermination est nécessaire pour vérifier le bon déroulement ou la conformité d'une analyse.

Au moins deux mesures de la répétabilité doivent alors être définies : la répétabilité de la méthode et la répétabilité du système : répétabilité de l'injection.

Il est à noter que la répétabilité de l'injection est souvent désignée sous l'appellation "précision" de l'injection. Le mot précision est directement hérité de l'anglicisme "precision" qui désigne le terme générique de fidélité. L'emploi des termes "précision instrumentale" ou "précision" de l'injection permet d'éviter la confusion entre répétabilité de la méthode et la répétabilité de l'injection.

La différence essentielle réside dans le traitement des échantillons : une même prise d'essai est suffisante pour la détermination du coefficient de variation de précision instrumentale. Le coefficient de variation obtenu sur les différentes mesures reflète l'ensemble des variations instrumentales sans tenir compte de la méthode d'analyse.

La "précision du système" est une opération qui reflète seulement les performances analytiques de l'instrumentation alors que la répétabilité de la méthode est relative à tous les aspects et toutes les étapes de la procédure d'analyse.

*Remarque :*

La répétabilité de la méthode et d'autant plus grande que "la précision du système" est élevée. S'il est nécessaire de tenir compte du nombre d'échantillons considérés pour l'interprétation des coefficients de variations, il en est de même lorsque l'on compare entre eux des coefficients de réponse pour des témoins de calibrage.

On admet que "la précision instrumentale" n'excède pas 1% (pour  $n \geq 5$ ), et que la différence entre les témoins ne doit pas dépasser 2% (lors de la validation d'une séquence d'injection par la méthode du "bracketting" où des injections témoins encadrent les essais). Cette valeur limite, généralement acceptée pour tous types de méthode de dosage est fixée sans tenir compte du coefficient de variation obtenu lors de la détermination de la précision instrumentale. La valeur limite acceptable (en pourcentage) obtenue sur les coefficients de réponse devrait être modulée en fonction du type de méthode de dosage, des coefficients de variations de fidélité et de la précision du système et non fixée de façon conventionnelle.

### **III 3.5 Spécificité et Sélectivité** (3), (4), (5), (6), (23), (28), (33), (34).

La spécificité permet de mesurer quantitativement un paramètre physico-chimique ou un groupement fonctionnel d'une ou plusieurs substances à examiner en présence de composants pouvant être présentes dans l'échantillon.

La sélectivité permet de détecter qualitativement une substance à examiner en présence de composants pouvant être présents dans l'échantillon.

La différence entre la sélectivité et la spécificité n'est pas toujours établie. Ainsi à l'heure actuelle le terme "spécificité" est utilisé par la Pharmacopée Européenne et l'USP/NF XXIII alors que le terme "selectivity" était utilisé à l'USP/NF XXII sans pour autant que la définition donnée n'ait changé dans l'édition XXIII.

L'attribution d'une valeur exacte à une propriété chimique d'un échantillon est facilitée si la réponse de l'échantillon peut être distinguée des autres.

La méthodologie varie selon la rubrique à laquelle elle s'applique (28) :

#### **III 3.5.1 Principe actif.**

##### **III 3.5.1.1 Identification.**

Pour une identification, cela signifie simplement la garantie de l'identité de la substance à analyser.

Des tests d'identification ne sont valables que s'ils permettent une discrimination entre les substances de structures proches.

La garantie de l'identité de la substance à identifier sera obtenue :

- par des résultats positifs (comparaison directe avec une substance de référence) à partir d'échantillons contenant la substance à identifier,
- par des résultats négatifs à partir d'échantillons ne contenant pas la substance à identifier.

Ces comparaisons se feront par rapport à des substances de structures proches, choisies de façon adéquate en considérant les interférences possibles.

#### III 3.5.1.2 Essai.

La spécificité représente la garantie que toutes les méthodes d'analyse exécutées permettent une évaluation de la teneur en impuretés de la substance à analyser (13).

Par exemple :

- essai de substances apparentées
- métaux lourds
- teneur en solvants organiques

Ces techniques ne sont pas spécifiques, d'où leur juxtaposition pour démontrer la spécificité globale de l'essai.

- **Impuretés disponibles :**

La discrimination pourra être établie à partir d'échantillons comportant des impuretés intentionnellement rajoutées en montrant soit la séparation des impuretés individuellement ou par rapport à d'autres composants de l'échantillon, avec une exactitude et une fidélité acceptables.

- **Impuretés non disponibles :**

La discrimination pourra s'établir à partir de procédés Pharmacopée ou à partir d'autres méthodes validées. On pourra ainsi comparer des profils d'impuretés obtenus sur des échantillons correctement conservés et sur d'autres intentionnellement dégradés (lumière, chaleur, humidité, hydrolyse, oxydation...). Un pic chromatographique pourra utilement être analysé (spectrométrie de masse, CLHP à barrette de diodes...).

### III 3.5.1.3 Dosage.

Pour un dosage (teneur ou activité), la procédure d'analyse sera dite spécifique lorsqu'on aura la garantie que le signal mesuré provient seulement de la substance à analyser.

- **Impuretés disponibles :**

La spécificité peut s'exprimer comme le degré de biais sur les résultats, engendré par l'analyse d'échantillons comportant des impuretés intentionnellement rajoutées, ou des produits de dégradation, ou des substances de structures chimiques proches, par rapport aux résultats obtenus sur des échantillons ne comportant pas ces additifs.

- **Impuretés non disponibles :**

La discrimination pourra s'établir à partir de procédures Pharmacopées ou à partir d'autres méthodes validées. Les résultats seront comparés.

### **III 3.5.2 Produit fini.**

La spécificité représente ici le degré d'interférence provenant d'autres substances (principes actifs, autres composants, substances apparentées, produits de dégradation, solvants) présentes dans la matrice complexe que peut représenter un produit fini. Il est également à démontrer l'absence d'interférence entre les composés à analyser et les éventuels étalons internes (étalon interne ou standard différé) utilisés.

#### **Autres recommandations :**

- En CLHP et en l'absence de coélution, une mesure de la résolution reflète le degré d'interférence entre les pics chromatographiques.
- Selon la source des matières premières et si la composition du produit fini n'est pas absolue, il peut être recommandé d'effectuer différentes analyses avec des matières premières différentes.
- La méthode des ajouts dosés peut-être appliquée à l'évaluation de la spécificité (12), (18), (26). Avec cette approche, les essais sont comparés à des concentrations différentes. Certains auteurs recommandent autant de niveaux d'analyse que de points de gamme pour l'étude de la linéarité et de l'exactitude.

- La soumission de données de stress (dégradation forcée, chaleur, lumière, oxydants) de la substance et d'un placebo sont recommandées (12), (18), (23), (26). Une étude de sélectivité par l'addition de composés connus supplémentaires devrait être soumise.

En pratique :

- La spécificité démontrée vis à vis des solvants, des composants de la matrice, de l'étalon interne.

Un blanc d'analyse (solution préparée en substituant le volume d'échantillon à doser par le solvant préconisé) est préparé puis comparé à un mélange placebo (mélange de tous les composants qualitativement et quantitativement égaux à la forme pharmaceutique étudiée, excepté le principe actif à doser).

Les différents échantillons sont traités de façon identique. Dans le cas de méthodes instrumentales, la spécificité peut être exprimée comme le biais en pourcentage engendré sur le signal mesuré.

### **III.3.6 Seuil de détection et seuil de quantification.**

Selon la note explicative CEE, les seuils de détection (LOD :Limit Of Detection) et de quantification (LOQ :Limit Of Quantification) sont des critères de validation pour des essais de teneurs en impuretés. Dans l'USP XXIII le seuil de détection est requis pour les tests limites en impuretés ou en produits de dégradation et le seuil de quantification est requis pour le dosage des impuretés ou des produits de dégradation.

#### **III.3.6.1 Seuil de détection de la méthode** (5), (6), (28), (33), (34), (38).

Le seuil de détection est généralement un paramètre à définir pour les essais limites.

La détermination de la limite de détection de la méthode est intéressante lorsqu'il est nécessaire d'évaluer avec une précision suffisante un intermédiaire de synthèse dans une matière première ou un produit de dégradation dans un produit fini.

Cette détermination expérimentale est faite à partir d'enregistrements chromatographiques.

Pour cela, on réalise un blanc (forme pharmaceutique reconstituée à la paille mais ne contenant pas de principe actif, ni de produit de dégradation, ni d'intermédiaire de synthèse) que l'on traitera dans les conditions expérimentales du dosage pour évaluer l'amplitude du signal de base. On vérifiera ainsi l'absence d'interférence. Le même blanc sera supplémenté à l'aide de l'intermédiaire de synthèse ou du produit de dégradation, de sorte que le pic observé soit mesurable et qu'il représente un rapport signal/bruit supérieur à 3.

Le seuil de détection est exprimé soit en concentration soit en quantité et dérive de la plus petite quantité  $x$  qui puisse être détectée avec une certitude suffisante pour une procédure d'analyse.

Selon le type de procédure d'analyse deux méthodes sont proposées. La méthode fournit un enregistrement graphique : le seuil de détection est estimé à partir du bruit de fond de l'enregistrement, dans le cas contraire, la méthode ne fournit pas d'enregistrement graphique mais seulement des valeurs chiffrées : le seuil de détection est estimé à partir de ces valeurs.

- L'estimation visuelle nécessite l'enregistrement de plusieurs blancs d'analyse, en suivant la procédure complète d'analyse sur un échantillon contenant l'ensemble des composants à l'exception de la substance à rechercher.

L'amplitude maximale du signal de base  $h_{\max}$  est à déterminer sur une distance égale à 20 fois la largeur (L) du pic à mi-hauteur du pic correspondant à la substance à rechercher. La substance à rechercher est à la concentration cible indiquée dans la méthode de dosage (100%).

La concentration équivalente au seuil de détection de la méthode est atteinte lorsque le signal obtenu pour le produit concerné a une hauteur égale à trois fois l'amplitude du signal de base précédemment déterminé.

- La détermination basée sur le rapport signal/bruit nécessite n mesures ( $n \geq 6$ ) sur des échantillons contenant l'ensemble des constituants, à l'exception de la substance à rechercher.

L'écart type  $\delta_{blanc}$  doit être calculé. Le seuil de détection est alors estimé par :

$$LOD = 3 \times \delta_{blanc}$$

Le rapport signal bruit est donc de 3 / 1 (2/1 peut être acceptable selon ICH3, document 29.11.95).

Le facteur de réponse 3 correspond à un risque de 0,13% de conclure à la présence de la substance alors qu'elle est absente (5), (6).

La détermination de la limite de détection de la méthode nécessite obligatoirement une stabilisation du système chromatographique aussi parfaite que possible.

**III 3.6.2 Seuil de quantification de la méthode** (5), (6), (28), (33), (34).

Il existe également plusieurs façons d'apprécier la limite de quantification :

- L'estimation visuelle est basée sur l'utilisation de la valeur  $h_{\max}$  utilisée pour le seuil de détection. Le seuil de quantification est égal à dix fois la hauteur équivalente à l'amplitude maximale du signal de base.
  - Le calcul de l'écart type  $\delta_{blanc}$  obtenu précédemment pour le seuil de détection est utilisé pour la détermination du seuil de quantification :
- $$LOQ = 10 \times \delta_{blanc}$$
- Une troisième façon de déterminer la limite de quantification est basée sur le calcul de l'écart type de la réponse et sur la pente. Dans ce cas,  $\delta_{blanc}$  est l'écart type de la réponse du blanc,  $b$  la pente de la droite de calibrage.

Le seuil de quantification est alors calculé à partir de la relation suivante :

$$LOQ = 10 \times \delta_{blanc} / b$$

Le facteur 10 est à remplacer par 3.3 pour la détermination de la limite de détection.

Les figures n<sup>os</sup> 10 et 11 représentent la façon de déterminer visuellement les limites de détection et de quantification en fonction de l'amplitude maximale du signal de base  $h_{\max}$ .

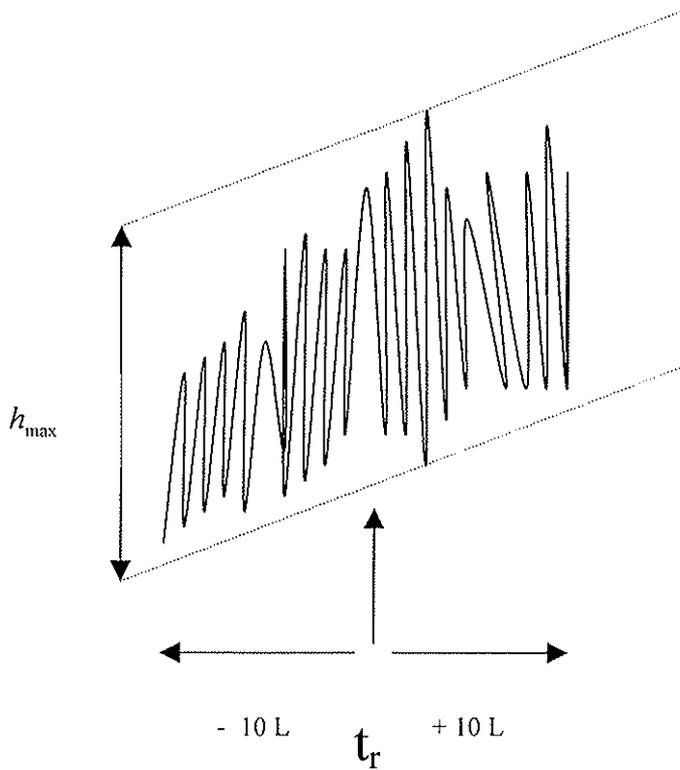
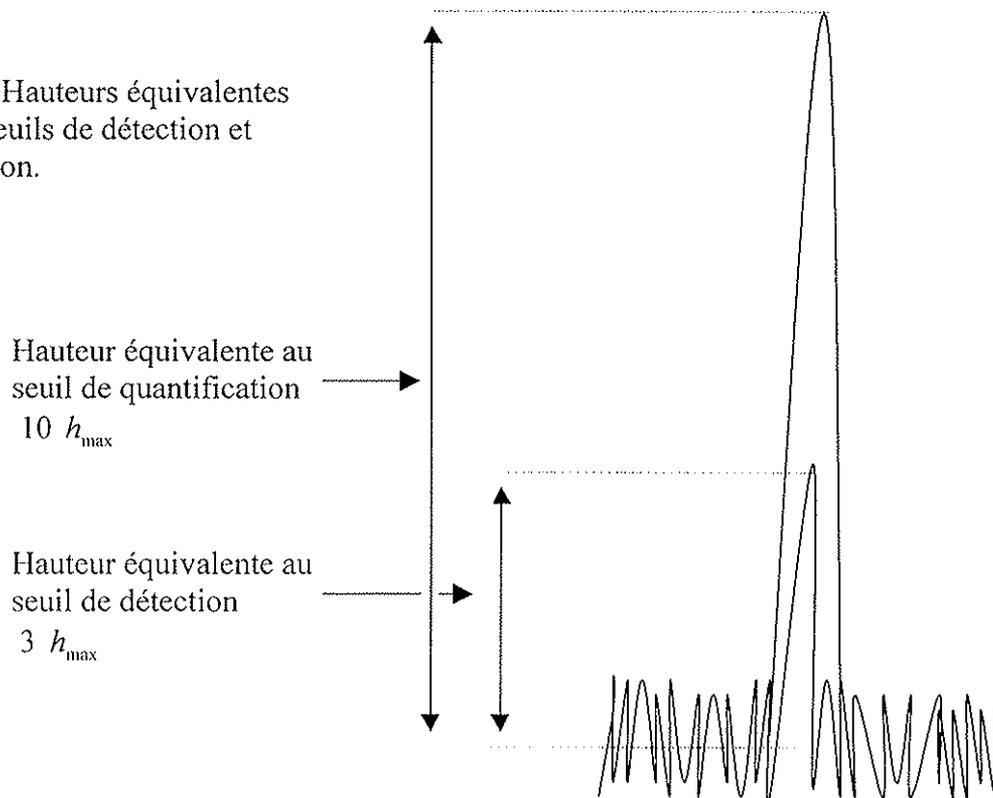


Figure n° 10: Détermination maximale de l'amplitude du signal de base.

Détermination de l'amplitude maximale du signal de base sur une largeur équivalente à 20 fois la largeur du pic à mi-hauteur ( $L$ ).

*L'intervalle de mesure est centré sur le temps de rétention théorique ( $t_r$ ) du composé étudié ( $\pm 10$  fois  $L$ ).*

Figure n° 11 : Hauteurs équivalentes des pics aux seuils de détection et de quantification.



### **Domaine de quantification** (5), (28).

Un complément d'information est nécessaire lorsque l'on désire accéder au domaine de quantification. Puisqu'une quantification est possible à ce niveau de concentration, il est intéressant de connaître les performances de la méthode en terme d'exactitude et de répétabilité de la méthode.

Le protocole est identique dans tous les cas. Il faut préparer n échantillons indépendants ( $n \geq 6$  si au moins deux séries sont préparées,  $n \geq 10$  si une seule série est utilisée) contenant la substance à identifier à la concentration déterminée pour le seuil de quantification et appliquer la procédure analytique sur chaque échantillon.

- La fidélité en terme de répétabilité est représentée par un coefficient de variation.

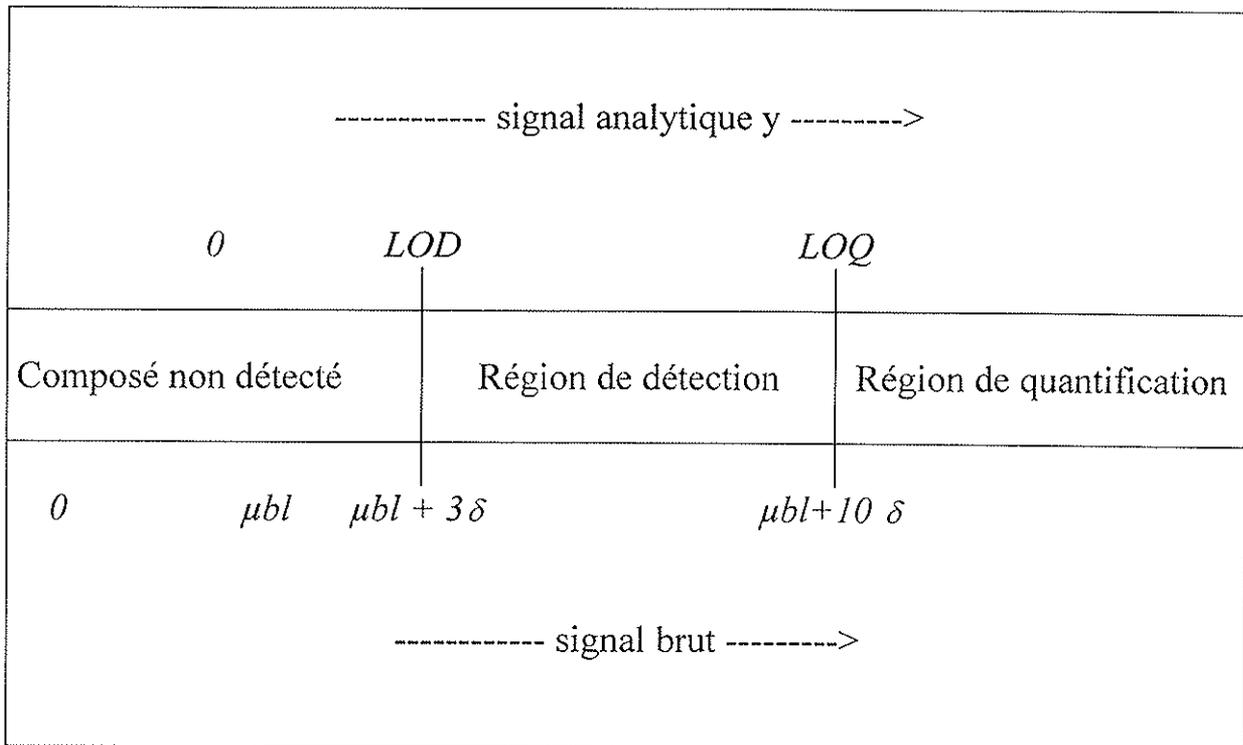
L'exactitude est déterminée classiquement par un taux de recouvrement moyen auquel on associe un intervalle de confiance.

Le seuil de quantification représente la limite inférieure du domaine possible de quantification.

L'étude de ce domaine peut être réalisée selon les règles générales de validation d'une méthode de dosage.

Selon la figure n° 12 (page suivante) :

- La limite de détection est définie comme la concentration à partir de laquelle la valeur mesurée est supérieure à  $3 * (\delta \text{ des blancs}) + (\mu_{bl})$ .
- La limite de quantification est définie comme la concentration à partir de laquelle la valeur mesurée est supérieure à  $10 * (\delta \text{ des blancs}) + (\mu_{bl})$ .



$\delta$  : écart-type d'un blanc d'analyse.

$\mu_{bl}$  : moyenne des blancs

Figure n° 12 : Domaines de détection et de quantification.

D'après : Guide de validation analytique - Rapport d'une commission SFSTP –  
II. Exemples d'applications.

Remarque :

En chromatographie liquide haute performance, la mesure de la limite de détection et de quantification est influencée par l'efficacité de la colonne et la forme du pic.

### **III 3.7 Sensibilité de la méthode** (4), (5), (6), (7), (8), (28).

La sensibilité d'une méthode est un critère statistique retenu et mentionné dans la matrice de validation SFSTP dans le cas d'un dosage. Ce critère est mentionné mais non retenu dans la matrice ICH, il est absent des critères de validation de l'USP/NF.

La sensibilité d'une méthode d'analyse est définie au niveau européen par la note explicative CEE III/844/87-FR :

"Variation minimale qu'il faut imposer à la concentration en substance à examiner dans un échantillon pour obtenir une variation significative du signal mesurée".

- Estimation de la sensibilité, méthode SFSTP (5), (6).

La sensibilité sera déterminée à l'intérieur du domaine de validité de la procédure. Elle est fonction de sa répétabilité. Son estimation s'effectue à partir des données obtenues sur l'étude de linéarité.

La sensibilité d'une méthode s'exprime par la variation minimale  $\delta_x$  qu'il faut imposer à la concentration en substance à examiner dans un échantillon pour obtenir une variation significative du signal mesurée, soit une différence de concentration entre deux valeurs  $x_1$  et  $x_2$ . Ces deux valeurs ( $x_1$  et  $x_2$ ) correspondent à des réponses vraies (aires par exemple) qui sont estimées par les mesures  $y_1$  et  $y_2$ .

La différence entre les valeurs vraies et les valeurs mesurées représente les fluctuations des mesures du signal.

La détermination numérique de  $\delta_x$  s'effectue selon la formule présentée en annexe 2.

La distribution de la fluctuation des signaux suit une loi normale, de moyenne égale à 0 et d'écart-type  $\delta \exp.\sqrt{2}$ .

La loi de distribution de la différence des valeurs mesurées va permettre de déterminer l'importance de l'écart observé à partir duquel les valeurs  $x_1$  et  $x_2$  seront différentes.

*Remarque :*

Certains auteurs appellent capacité de discrimination la valeur  $\delta_x$ . Ils réservent alors le terme de sensibilité analytique d'une méthode d'analyse à l'inverse de la valeur  $\delta_x$  (4).

### **III 3.8 Tests de conformité** (5), (6), (33), (34), (35), (38), (39).

Aux critères de validité cités précédemment viennent s'ajouter les tests de conformité propres à la technique utilisée. Les tests de conformité incluent tous les paramètres qui permettent de vérifier une bonne réponse du système pendant le déroulement de l'analyse.

Lorsque les instruments sont qualifiés et les méthodes validées, les tests de conformité assurent un bon déroulement de l'analyse au moment de l'utilisation. A l'USP/NF, un bon nombre de monographies nous indiquent des critères de performances pour le matériel et la méthode. Les tests de conformité permettent ici de vérifier l'adéquation permanente du matériel avec les pré-requis de validité de la méthode. Le plus souvent, il s'agit de tests utilisés pour vérifier que la résolution et la répétabilité instrumentale sont adéquates pour l'analyse dans les conditions prescrites.

Les paramètres de conformité (ou "System Suitability Tests") sont basés sur le principe que l'équipement, l'électronique, les opérations analytiques et les échantillons constituent un système intégral et doivent être évalués comme un ensemble.

Des paramètres comme le nombre de plateaux théoriques, le facteur de traînée, la résolution et la reproductibilité (coefficients de variation sur les temps de rétention et les aires pour six essais) sont déterminés et comparés aux spécifications de la méthode (des recommandations sont données à titre indicatif dans le tableau n° IX)

Tableau n° IX : Paramètres de conformité et recommandations en CLHP.

Paramètres	Recommandations
Facteur de capacité K'	Le pic doit être bien résolu des autres pics et du volume mort de plus de $K' > 2,0$
Répétabilité de l'injection	$CV\% \leq 1,0\%$ pour $n \geq 5$
Temps de rétention relatif	Pas essentiel si la résolution est testée
Résolution Rs	$R_s > 2,0$ entre le pic à analyser et le produit potentiellement interférents.
Facteur de traînée T	$T \leq 2$
Nombre de plateaux théoriques N	En général $N > 2000$

D'après : Health Protection Branch Health and Welfare Canada.

ACCEPTABLE METHODS Drugs directorate guidelines. 20 August 1993.

La précision du système peut être vérifiée sur les points de mesures constituant les essais à analyser (en routine) ou sur des points spécifiquement constitués à ces fins (à la valeur 100% et analysés en double). Les coefficients de variation doivent être interprétés différemment pour chaque méthode d'analyse, en fonction de la concentration du produit à doser et selon son facteur de réponse.

La documentation du système de conformité doit être effectuée par l'utilisation d'un logiciel spécialement dédié à cette tâche. Le système devrait permettre la mise en place de bases de données utilisées pour la comparaison pic/pic ou système/système nécessaire à l'établissement de la performance du système.

L'utilisation et l'analyse des paramètres de conformité permettent à l'analyste de détecter des problèmes inhérents à l'instrumentation. Les tests de conformité trouvent des applications intéressantes dans le suivi des performances des colonnes chromatographiques, la vérification de la précision du système ou la validation des points de calibrage.

- Si une dégradation à long terme d'une colonne de chromatographie n'est pas un problème puisqu'elle sera changée en fonction des spécifications de la procédure d'analyse, une dégradation rapide de la colonne en cours d'analyse n'est pas acceptable. Le suivi de l'efficacité de la colonne est ainsi réalisé en temps réel, une mesure du nombre de plateaux théoriques est effectuée sur chaque injection.

La validité de la séquence d'injection et des témoins de calibrage est assurée par la méthode du "bracketting" (simple ou double) où des solutions étalons encadrent les essais. L'étude des coefficients de réponse pré et post analyses en tant que paramètres de conformité permet de valider l'utilisation des points de calibrage et la "précision du système" pour toute la séquence d'injection.

Au stade de développement d'une méthode d'analyse, les pré-requis sont la qualification du matériel, l'étude de stabilité des solutions et l'étude de l'influence des paramètres opératoires sur le résultat final, préambule à une étude de robustesse.

Vient ensuite la validation statistique proprement dite de la méthode d'analyse où l'évaluation des critères statistiques s'applique à la méthode d'analyse pour valider son utilisation future en routine.

Si les exigences réglementaires sont alors respectées, la pratique montre que des déviations et sources d'erreurs peuvent survenir malgré la vérification systématique des tests de conformité.

La méthode de dosage chromatographique proposée dans notre étude utilise le concept du standard différencié. La mise au point de cette méthode qui permet la séparation de composés polyaromatiques est la première étape d'un travail de détermination d'un marqueur de l'efficacité des colonnes chromatographiques.

Ce marqueur de bon fonctionnement des systèmes d'analyses par chromatographie serait alors capable de fournir des informations précieuses sur les dérives lentes d'un tel système, augmentant ainsi la crédibilité de l'analyste et la fiabilité des résultats.

**IV. Un exemple d'application, travaux préliminaires :  
mise au point d'une méthode de séparation d'hydrocarbures  
polyaromatiques en chromatographie liquide haute performance et  
illustration de l'utilisation du concept du standard différé.**

---

#### **IV. Un exemple d'application, travaux préliminaires :**

#### **mise au point d'une méthode de séparation d'hydrocarbures polyaromatiques en chromatographie liquide haute performance et illustration de l'utilisation du concept du standard différé.**

- Objectif :

Après qualification de l'appareillage, mise au point et validation de la méthode de séparation d'un mélange d'hydrocarbures polyaromatiques (PAHs) en CLHP, le concept du standard différé sera appliqué en vue de l'étude de la stabilité de colonnes chromatographiques.

La mise en œuvre de l'étude de stabilité des colonnes chromatographiques demande une maîtrise et une connaissance de l'ensemble des phénomènes (physico-chimiques et instrumentaux ) à l'origine d'une perte d'efficacité de la colonne, paramètre étudié pour juger de l'état d'une colonne chromatographique. (10), (15)

Elément de confirmation de la crédibilité et de la fiabilité de l'analyseur en temps réel, la technique du standard différé (15) trouve ici une application intéressante.

- Perspective :

Détermination d'un marqueur significatif des performances d'une colonne chromatographique permettant de suivre l'évolution de son efficacité et juger des dérives lentes d'un système chromatographique.

#### **IV.1 Le concept du standard différé (15).**

Les études préliminaires de qualification et de validation sont des étapes obligatoires mais non suffisantes pour s'assurer de la validité des résultats analytiques. En effet, un système valide peut évoluer et dévier progressivement par rapport aux spécifications définies lors de la validation.

Le concept du standard différé est né du besoin de suivi et de diagnostic des systèmes chromatographiques en ligne. A la manière des cartes de contrôles, le concept du standard différé permet de vérifier en temps réel l'état du système d'analyse et de mettre en évidence ses dérives progressives. Le standard différé est utilisé comme marqueur de bon fonctionnement d'un système chromatographique. Le chromatographe est alors capable de donner une mesure de la répétabilité de l'analyse dans chaque séquence analytique par application du concept du standard différé.

La validation des systèmes chromatographiques en ligne (2) s'effectue périodiquement à partir d'un étalon ou d'un échantillon de référence. Le bon état du système d'analyse s'appuie sur l'étalonnage, et ne vaudra que ce valent l'étalon et la méthode d'étalonnage. De plus, l'utilisation du mélange étalon sous-entend que soit connue la fiabilité de l'instrumentation pendant la séquence analytique.

Le standard différé consiste en l'injection d'un composé pur dans chaque séquence d'analyse, l'injection étant différée par rapport à celle de l'échantillon à analyser, de telle sorte que son élution se fasse sans interférence avec les pics de l'échantillon à analyser. Il apparaît donc comme un étalon unique et permanent de la seule chaîne chromatographique.

Le chromatogramme fournit alors trois informations simultanées : la mesure analytique, la mesure de la fiabilité et de la crédibilité du système d'analyse chromatographique (le degré de répétabilité du standard différé qui conditionne la précision analytique de la séquence concernée peut être connu en temps réel). La mesure analytique peut être automatiquement validée.

Stratégies d'utilisation :

- Contrôle et suivi des caractéristiques d'un système chromatographique en ligne, système chromatographique automatisé.

Si la répétabilité des caractéristiques du standard différé (en terme de quantité retrouvée et de profil d'élution) est démontrée, le système est valide. Le fait que le standard différé soit répétable d'une séquence à l'autre limite la nécessité d'un ré-étalonnage périodique.

Témoin permanent, le standard différé permet la validation des résultats quantitatifs sans recours systématique au mélange étalon.

- Contrôle, suivi et utilisation dans l'analyse quantitative.

Les injections du standard différé étant en théorie répétables et reproductibles, le standard différé permet la validation des résultats. La qualification du système sera réalisée par la méthode de la double injection, la première étant l'injection du ou des étalons et la seconde, l'injection du standard différé.

Le standard différé cumule les caractéristiques positives des deux principales méthodes quantitatives utilisées en chromatographie : le standard externe et le standard interne.

- Du standard externe, le standard différé possède l'indépendance entre l'échantillon et le standard puisqu'il est injecté avec un certain retard mais est présent dans la séquence analytique.
- Du standard interne, le standard différé subit la dépendance de la séquence analytique bien qu'indépendant de l'échantillon.

## **IV.2 Mise au point d'une méthode de séparation des PAHs en CLHP.**

La méthode de séparation des PAHs sert de base à l'illustration de la mise en place du concept du standard différé.

### **IV.2.1 Appareillage, produits purs et réactifs.**

- Appareillage :
  - intégrateur : SPECTRA PHYSICS Chromjet Integrator
  - four : DUPONT INSTRUMENTS Colonne Oven
  - détecteur : KRATOS DIVISION Spectroflow 783 Gradient Controller
  - injecteur automatique : SPECTRA PHYSICS Echantillonneur SP 8775 AutoSampler
  - pompe : LKB BROMA 2150 Pump HPLC
  - thermocouple : METRIX Type K Metrix TH 1408-K
  - débitmètre : BROOKS SHO-RATE
  - colonne chromatographique : PEEK
  - purificateur d'eau : ELGA Water Purifier Option 4
  
- Produits purs et réactifs :
  - anthracène pur PROLABO Lot 73348 N°21443
  - benzo(a)pyrène 98% SIGMA Réactif Lot A006183601
  - biphényle 99% ACROS Organics Lot A00973/502
  - chrysène 98% ACROS Organics Lot A008326101
  - fluorène 98% ACROS Organics Lot A009627301
  - naphthalène pur PROLABO Lot 25751 N°73069
  - pyrène CA 96% ACROS Lot A009685202
  - eau purifiée bidistillée
  - méthanol redistillé
  - acétonitrile HYPERSOLV BDH laboratory Supplies N°200835
  - silice HYPERSIL ODS 5µm
  - dichromate de potassium RP-NORMAPUR PROLABO

## IV.2.2 Qualification de l'appareillage.

### IV.2.2.1 Qualification de la pompe.

- Données brutes

Les prélèvements sont effectués en bout de chaîne chromatographique, la colonne est absente du système.

Le fluide permettant les mesures est de l'eau purifiée bidistillée.

La masse d'eau recueillie pendant le temps d'analyse déterminé et selon le débit appliqué est pesée dans une fiole de taille adaptée. La fiole vide constitue la tare. Le tableau suivant (n° X) regroupe les données pour l'évaluation de la corrélation quantité d'eau théorique/quantité d'eau recueillie.

Tableau n° X : Mesures des quantités d'eau retrouvées.

Temps de mesure (min)	Débit appliqué (mL / min)	Masse d'eau retrouvée (g)	Masse d'eau théorique (g)			Erreur D'approximation (%)
			d =1	Erreur Expéri-mentale (%)	d = 0,9986*	
20	0,50	9,87	10,00	1,30	9,99	0,10
15	0,75	11,15	11,25	0,90	11,23	0,18
10	1,00	9,79	10,00	2,10	9,99	0,10
10	1,25	12,21	12,50	2,32	12,48	0,16
5	1,50	7,35	7,50	2,00	7,49	0,13
5	2,00	9,71	10,00	2,90	9,99	0,10

\*Densité de l'eau à 18°C d = 0,9986

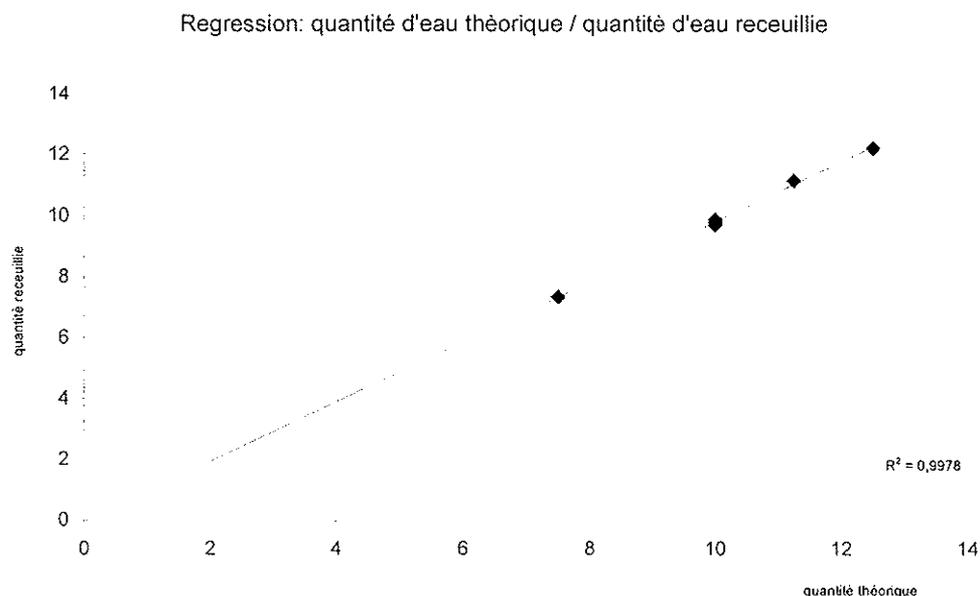
L'approximation faite sur la densité de l'eau égale à 1 à la température du laboratoire est conservée. En effet, l'erreur expérimentale est beaucoup plus importante que l'erreur engendrée par cette approximation. A 1,00 mL/min, l'erreur d'approximation est de 0,10%, l'erreur expérimentale de 2,10%.

- Etude de la corrélation quantité d'eau retrouvée/quantité d'eau théorique.

On peut conclure à un fonctionnement correct de la pompe en fonction du débit appliqué.

L'erreur entre la quantité d'eau théorique et la quantité d'eau recueillie étant minime et suffisante sur tous les points de mesures, la pompe est valide pour l'utilisation prévue.

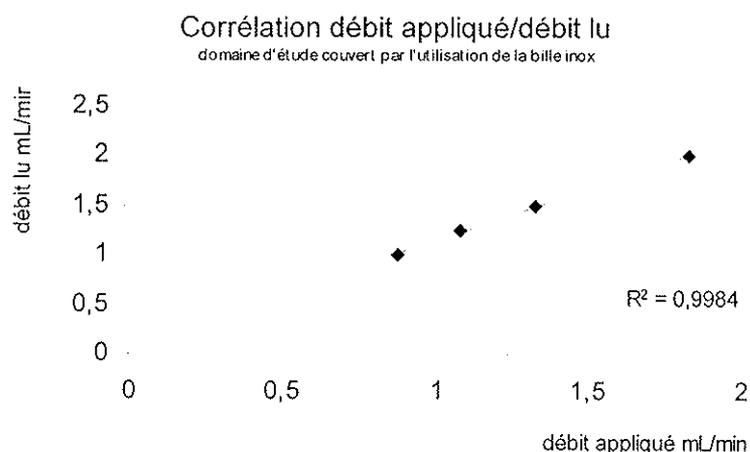
Le graphique n°1 utilise les données brutes du tableau n°X pour l'étude de la régression quantité d'eau théorique/quantité d'eau retrouvée.



Graphique n° 1 : Etude de la corrélation quantité d'eau retrouvée/quantité d'eau théorique.

- Etude de la corrélation débit appliqué/débit lu

La valeur du débit appliqué est vérifiée sur un débitmètre à bille. La bille employée est une bille en acier inoxydable de densité 0,804. Son domaine d'utilisation ne permet cependant pas une étude des débits inférieurs à 0,75mL/min. De plus, l'utilisation de ce type de débitmètre nécessite un temps de stabilisation très long avant d'obtenir la valeur finale.



Graphique n° 2 : Etude de la corrélation débit appliqué/débit lu.

Le graphique nous indique une bonne corrélation entre les mesures de débit pour des valeurs comprises entre 0,75 mL/min et 2,00 mL/min.

Cependant, la correspondance entre les valeurs en mL/min pour les débits appliqués et les débits lus n'est pas démontrée. Ceci pourrait être du à la grande sensibilité du débitmètre à bille qui, placé à la sortie de l'injecteur, subit les variations de pression de l'ensemble de la chaîne chromatographique.

La stabilité du débit et la correspondance des valeurs retrouvées entre les deux systèmes de mesures nous permettent de considérer comme qualifiée la pompe LKB BROMA 2150 Pump HPLC.

#### **IV.2.2.2 Qualification du détecteur.**

- Vérification de la linéarité de la réponse du détecteur.

La proportionnalité entre la réponse du détecteur en UA (unités d'absorbance) et la quantité en analyte est déterminée en mesurant les absorbances d'une solution de bichromate de potassium à différentes concentrations. Les absorptions des solutions de bichromate de potassium préparées sont mesurées à la longueur d'onde préconisée dans la littérature soit  $\lambda = 254 \text{ nm}$ .

A partir d'une solution mère de bichromate de potassium (dilution 1,0 correspondant à 60,00 mg de bichromate de potassium desséché dans 100,00 mL de phase mobile), des solutions filles sont préparées aux concentrations suivantes :

- dilution 1,0
- dilution 1/2
- dilution 1/5
- dilution 1/10
- dilution 1/15
- dilution 1/20

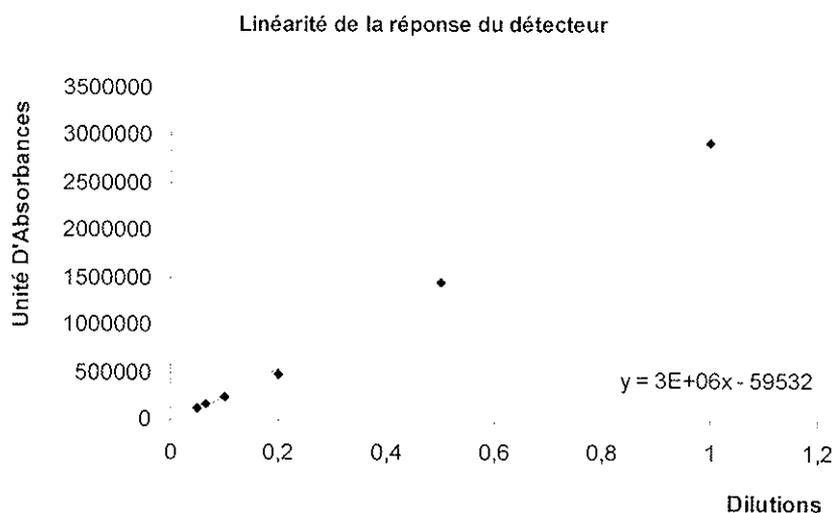
Chacune de ces solutions est injectée dans le système chromatographique, la colonne est préalablement remplacée par une union.

Les valeurs d'absorbances obtenues par l'analyse des solutions ainsi constituées sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau n° XI : Réponses du détecteur.

Dilutions	Réponses du détecteur (UA)
1,0	2931054
1/2,0	1443716
1/5,0	476234
1/10,0	236890
1/15,0	165528
1/20,0	113656

A partir de ces données brutes (Tableau n° XI), une détermination de la linéarité de la réponse du détecteur est effectuée. La représentation de la droite de régression figure sur le graphique n° 3, les résultats de cette étude de régression sont consignés dans le tableau n°XII.



Graphique n° 3 : Linéarité de la réponse du détecteur.

L'analyse de régression effectuée consiste en la détermination du coefficient de corrélation ( $r$ ), du coefficient de détermination ( $r^2$ ). L'existence d'une pente est démontrée par un test de *Fisher*, un test de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec zéro complète cette étude (tableau suivant).

Tableau n° XII : Analyse de la régression.

Observations	6		
Coefficient $r^2$	0,9991		
Coefficient $r$	0,9995		
Erreur-type	35708,80		
	ddl	SCE	F*
Régression	1	6,20E+12	4856,50
Résidus	4	5,10 <sup>E</sup> +10	
Total	5	6,20E+12	
M. Statistique $t^*$	-2,98		
Probabilité	0,04		

Le test de l'existence d'une pente est Hautement Significatif (Test F\*) au risque statistique considéré (5%).

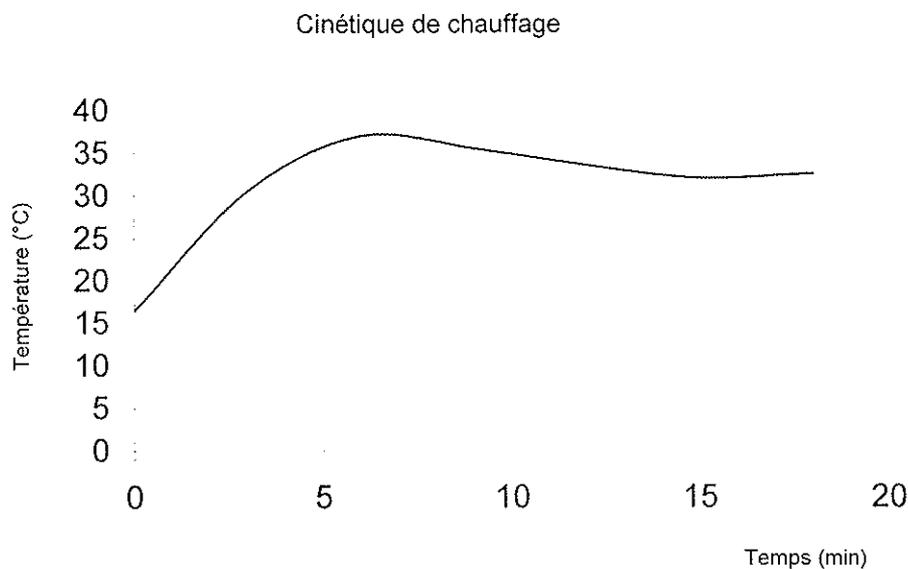
Le Test  $t$  de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec zéro Non Significatif à la probabilité 0,04.

La qualification du détecteur "KRATOS DIVISION Spectroflow 783 Gradient Controller" est démontrée par la linéarité de sa réponse.

### IV.2.2.3 Qualification du four

- Cinétique de montée en température

Le graphique ci dessous (graphique n°4) nous indique le temps minimum avant stabilisation à la température finale programmée sur le four (35°C). Le choix de la température (étude à 35°C) est motivé par les données bibliographiques, cette température étant celle préconisée pour une séparation optimale des PAHs (3), (4). Cependant la stabilité de la température après 15 minutes a été constatée en pratique pour une valeur programmée de 40°C par la vérification en temps réel sur le thermocouple pendant la phase de mise au point de la méthode de séparation.



Graphique n° 4 : Cinétique de montée en température.

Il faut compter 15 minutes avant que le four n'atteigne une température d'équilibre stable.

Il existe une différence de température entre la valeur programmée sur le four et la valeur affichée. Cette différence tend à décroître dans le temps et avec l'augmentation de valeur programmée. Le tableau n° XIII regroupe une série de mesures, la température programmée sur le four est comparée à la température affichée sur le thermocouple après stabilisation des systèmes (15 min. minimum).

Tableau n° XIII : Programmation des températures.

Température programmée (°C)	Température affichée (°C)
34,5	32,5
40,0	41,0
45,0	44,0
50,0	49,0
55,0	54,5

Même si des différences de température existent, la stabilité à une température programmée, condition nécessaire pour la robustesse des paramètres opératoires est suffisante pour nous permettre d'effectuer des mesures dans des conditions répétables.

#### **IV.2.2.4 Etude de la répétabilité de l'injection.**

L'étude de la répétabilité de l'injection est le reflet de la fiabilité du système d'analyse.

Un coefficient de variation est déterminé sur dix injections d'un même échantillon obtenu à partir d'une solution mère unique de bichromate de potassium.

Une séquence de dix injections à partir de dix flacons d'injection différents est programmée, le volume d'injection est fixé à 20  $\mu\text{L}$ .

Cet essai permet de vérifier simultanément le fonctionnement de l'échantillonneur, de juger de la répétabilité de l'injection et de la répétabilité du détecteur (dans sa zone de linéarité). Les résultats de cette étude de répétabilité de l'injection (ou "précision instrumentale") sont consignés dans le tableau suivant.

Tableau n° XIV : Répétabilité de l'injection.

N° de l'injection	Réponse du détecteur (UA)
1	699278
2	698753
3	702743
4	700246
5	692961
6	721389
7	696413
8	702767
9	701000
10	703695
Moyenne des réponses	701387,82
Ecart-type	7392,70
Coefficient de variation	1,05%

La répétabilité de l'injection, représentée par un coefficient de variation satisfaisant (1,05%) est suffisante pour conclure à une bonne fiabilité du système.

### **IV.2.3 Vérification de la stabilité des paramètres opératoires.**

L'utilisation en parallèle d'un débitmètre, d'un thermocouple et de la vérification en temps réel de la perte de charge du système nous permettent de vérifier la stabilité mécanique de l'outil d'analyse.

Si la valeur entre le débit programmé et le débit lu ainsi que la valeur entre la température affichée par le four et celle donnée par le thermocouple ne sont pas toujours identiques, il existe bien une corrélation entre les mesures données par ces instruments.

Ces outils seront alors utilisés pendant la mise au point de la méthode puis pendant l'utilisation de la méthode comme "indicateurs" de variations des paramètres opératoires.

### **IV.2.4 Mise au point de la méthode de séparation des hydrocarbures polyaromatiques.**

- Les Hydrocarbures Polyaromatiques (PAHs)

Les hydrocarbures polyaromatiques sont considérés comme des polluants majeurs de l'environnement. Leur abondance dans les différents milieux (air, eau, sol) et leur danger potentiel font de ces composés des molécules très recherchées et très étudiées.

L'importance de la bibliographie qui leur est réservée et le faible coût de ces produits font des PAHs des composés aisément utilisables pour l'étude de l'optimisation des systèmes chromatographiques.

- Le système chromatographique

Les modules chromatographiques utilisés sont les éléments précédemment décrits et qualifiés.

La colonne chromatographique utilisée est préparée au laboratoire. Une colonne Peek 150\*3mm ID est remplie de silice de type HYPERSIL<sup>®</sup> ODS 5µm. A sa mise en service, l'efficacité de la colonne mesurée par le nombre de plateaux théoriques (mesure de la largeur du pic à sa base), celui-ci équivaut à 5600 plateaux/mètre.

Pour des raisons pratiques, la phase mobile utilisée sera un mélange binaire méthanol/eau. Le méthanol est redistillé au laboratoire, l'eau est de l'eau purifiée préparée au laboratoire.

- Données bibliographiques

Les paramètres opératoires de départ sont issus de la littérature (3), (4).

- longueur d'onde optimale de détection ( $\lambda$ ) : 254 nanomètres
- volume d'injection : 20µl
- débit : 0,50 mL/min
- composition de la phase mobile : méthanol/eau 80/20(v/v)
- milieu de dissolution des PAHs : mélange Acétonitrile/Eau 90/10 v/v
- température du four : 35°C

Le choix des paramètres à optimiser est basé sur les profils chromatographiques des essais préliminaires obtenus à partir des paramètres opératoires de départ issus de la littérature (données bibliographiques).

- Optimisation des paramètres opératoires :

- composition de la phase mobile
- température du four
- concentrations des solutions de PAHs
- débit de la phase mobile

La composition de la phase mobile est le premier paramètre opératoire sur lequel va porter l'optimisation de la méthode de séparation. Une première approche va consister à diminuer la force éluante de la phase mobile afin d'optimiser la séparation des composés.

De nombreux essais ont été nécessaires afin d'obtenir une résolution correcte entre les PAHs d'une part et de trouver d'autre part un emplacement pour une élution sans interférence de l'étalon différé.

La température du four va être augmentée de 5°C pour des raisons matérielles, en effet, à 35°C, le four est à sa valeur minimale de régulation, une meilleure stabilité en température sera obtenue à 40°C sans incidence sur la stabilité des solutions (stabilité vérifiée par comparaison des coefficients de réponses d'une même solution analysée à différentes températures). La stabilité de la température concourt à la robustesse des paramètres opératoires et à la reproductibilité des résultats.

La faible solubilité du Benzo(a)Pyrène et du Chrysène et leurs temps de rétention beaucoup trop importants nous conduisent à éliminer ces composés du mélange de PAHs.

Dans un second temps, les concentrations des solutions mères de PAHs seront préparées de façon à obtenir une réponse sensiblement équivalente pour chaque composé.

Pour des raisons de durée d'analyse, le débit sera ajusté à 1mL/min. Nous n'avons à ce stade aucune indication sur le débit optimal permettant d'obtenir une efficacité maximale de la colonne.

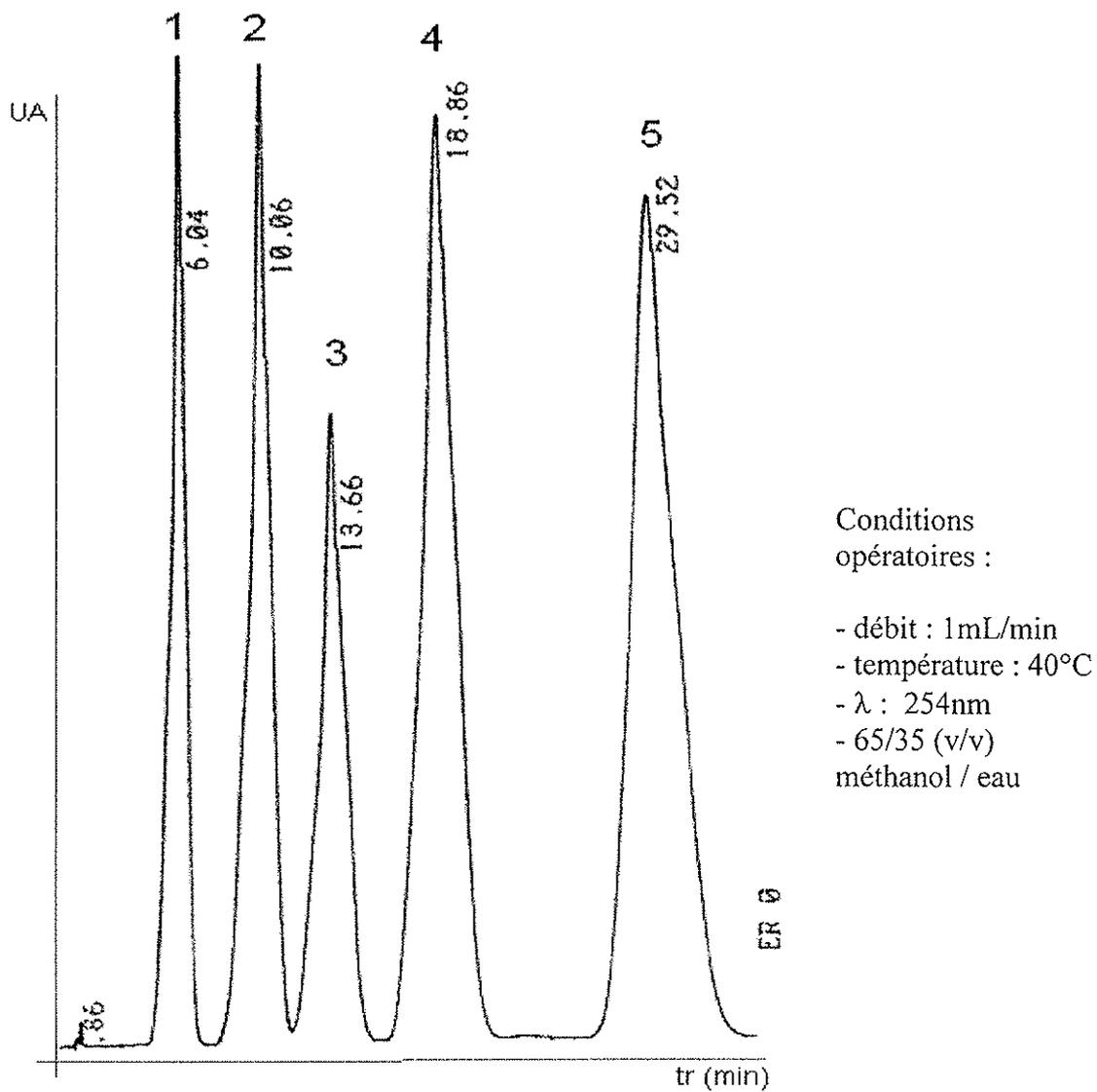
- Paramètres opératoires optimisés pour la méthode de séparation des PAHs :

La composition des solutions mères : (PAHs en solution dans un mélange 90/10 v/v acétonitrile/eau) est donnée dans le tableau suivant.

Tableau n° XV : Concentration des solutions mères de PAHs.

Composés	Solutions mères g/L	Solutions filles g/L	Dilution avant analyse
-1- Naphthalène	5,58	2,78	1/5
-2- Biphényle	1,47	0,74	1/5
-3- Fluorène	1,42	0,71	1/5
-4- Anthracène	3,48	1,74	1/5
-5- Pyrène	5,72	2,86	1/5

Le mélange analysé est constitué de 10,00 mL de chaque PAH. Le chromatogramme n°1 représente la séparation des PAHs (concentrations correspondantes aux solutions filles) dans les conditions opératoires optimisées.



Chromatogramme n° 1 : Séparation des PAHs, conditions opératoires optimisées.

Parmi les nombreux critères d'optimisation testés, l'obtention d'une résolution correcte était nécessaire entre tous les pics. De plus, de nombreux essais ont été menés en vue d'obtenir une fenêtre de temps convenable entre deux pics en vue de l'insertion du standard différé.

### **IV.3 Mise en application du concept du standard différé.**

Le standard différé est un composé pur injecté indépendamment des autres échantillons mais qui constitue avec eux une seule séquence d'analyse.

La méthode de séparation des PAHs en CLHP sert de base à l'illustration du concept du standard différé.

#### **IV.3.1 Choix du standard différé.**

Notre choix se porte sur un composé aromatique : le toluène.

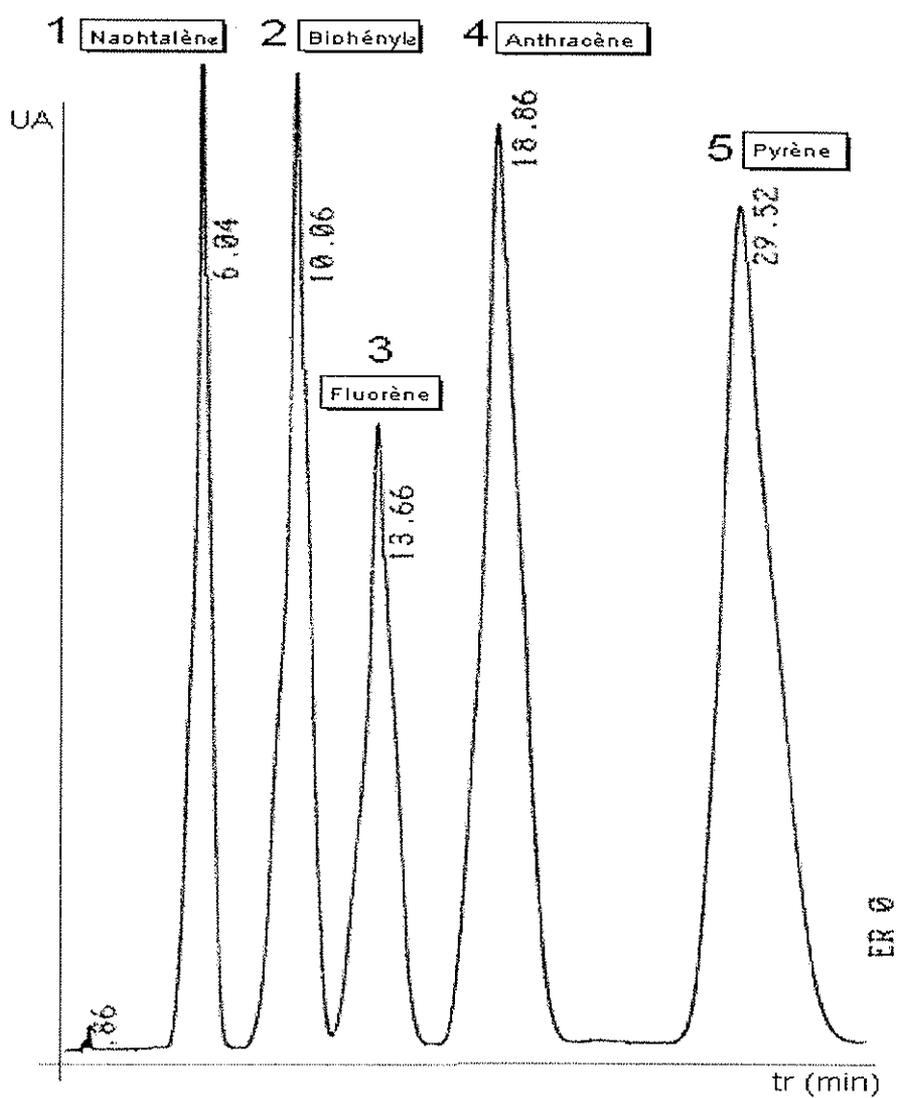
L'éluion de l'étalon différé se fait au milieu des PAHs et ne doit pas interférer dans la séparation de ces composés.

Le choix du Toluène se justifie par :

- un temps de rétention faible (4,08 min) et donc une largeur de bande faible ce qui minimise les risques d'interférences avec les autres pics.
- le faible facteur de capacité de ce composé nous permet d'intercaler le pic de toluène et le signal dû au volume mort (à  $t_0 = 0,86$  min) entre les pics -4- et -5- qui présentent la meilleure résolution.

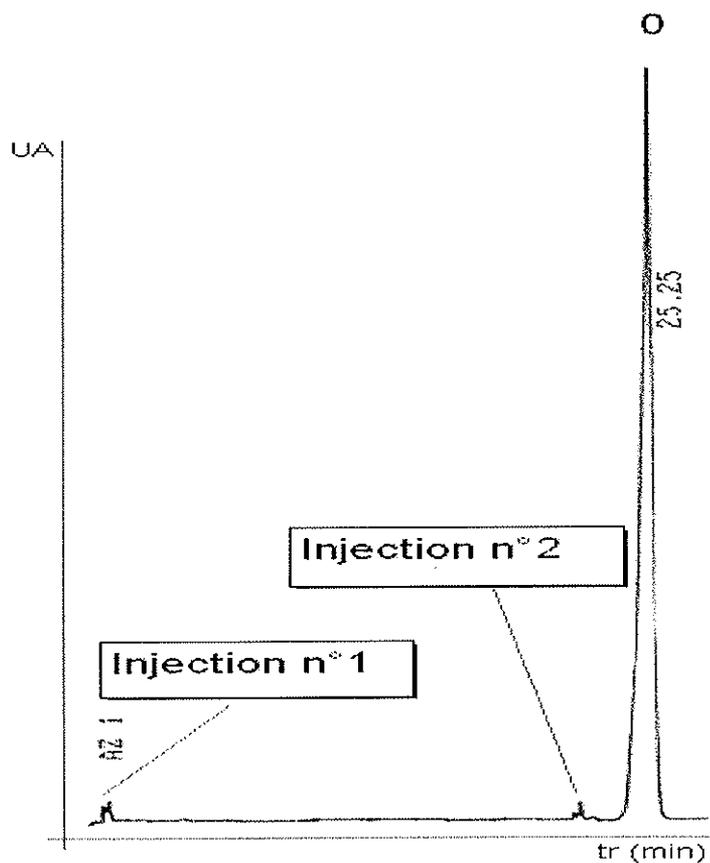
#### IV.3.2 Mise en place et illustration du concept du standard différé.

L'espace réservé à l'étalon différé se situe entre le pic de l'anthracène -4- et celui du pyrène -5- comme le montre le chromatogramme suivant.



Chromatogramme n° 2 : Nuage de pics et espace réservé au standard différé.

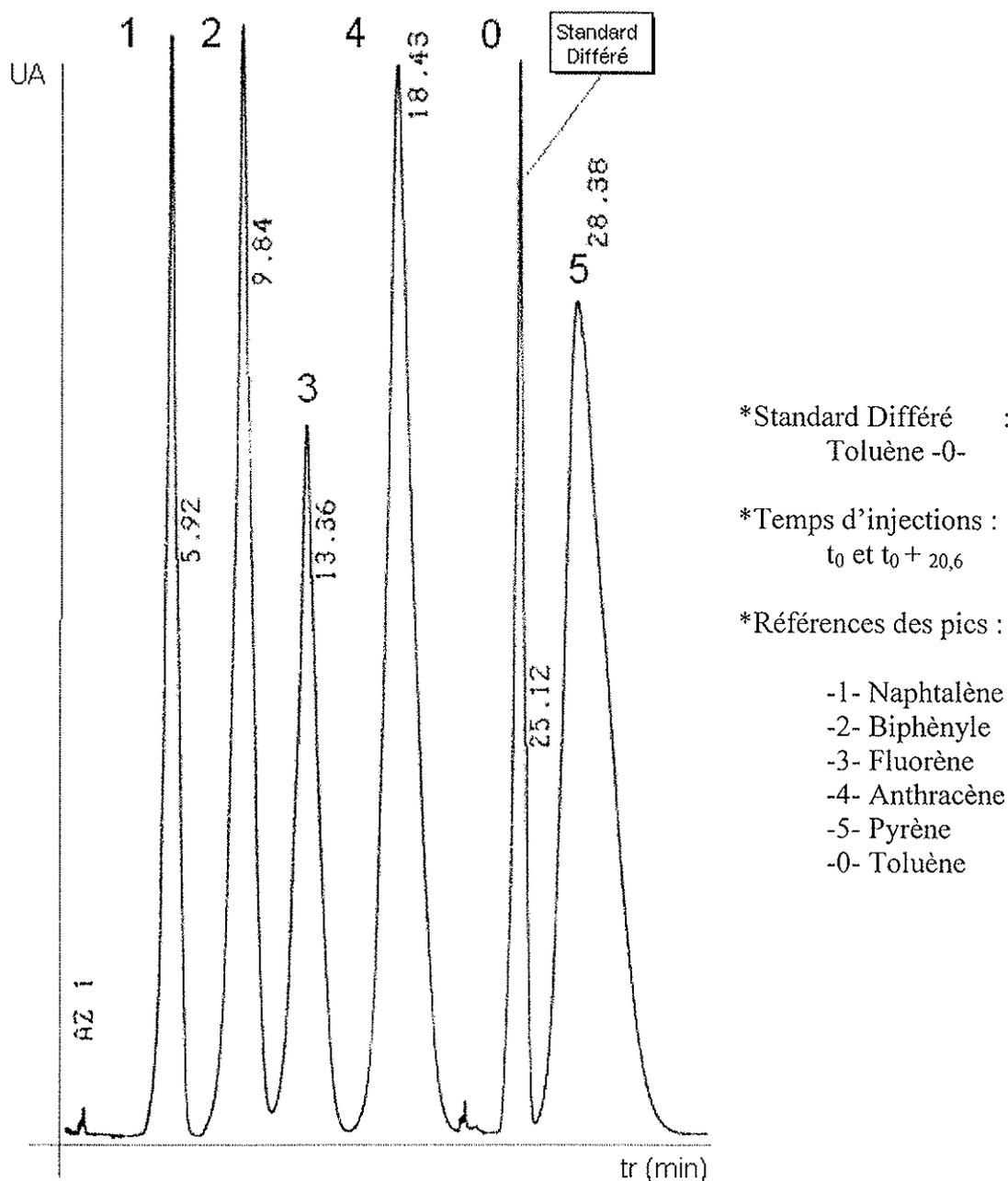
Les deux injections successives, injection n°1 (phase mobile) et injection n°2 (Standard différé) sont visualisées chacune par une perturbation du signal de base à  $t_0$  (0,86 minutes) pour l'injection de phase mobile puis au second temps d'injection  $t+t_0$  pour l'injection du standard différé.



Chromatogramme n° 3 : Injection du standard différé seul.

La perturbation du signal de base lors de la seconde injection est un paramètre important à prendre en compte lors de la mise au point de l'utilisation du standard différé. De nombreuses mises au point ont été nécessaires avant de trouver le délai optimal d'injection. Un délai d'injection trop court ou trop long diminue la sélectivité avec les pics environnants.

Le délai imposé à l'injecteur automatique entre les deux séquences est ici de 20,6 minutes (meilleur compromis de sélectivité entre les pics - 4 -, - 5 -, et le standard différencié). Ce temps d'injection nous permet d'obtenir une meilleure résolution dans la fenêtre des temps de rétention -4- et -5- comme le montre le chromatogramme n°4.



Chromatogramme n° 4 : Illustration du concept du standard différencié.

L'élution du standard différé doit se faire de préférence au milieu du nuage des autres pics. La perturbation du signal de base lors de la seconde injection et la résolution entre les pics sont des paramètres déterminants dans le choix et l'emplacement du standard différé.

Le développement d'une telle méthode doit intégrer au plus tôt le concept du standard différé. Les caractéristiques du standard (bien qu'injecté de façon indépendante et en différé) doivent répondre aux caractéristiques générales des pics en terme de spécificité et de résolution.

Si les informations apportées par l'utilisation du standard différé permettent de juger de la validité de l'analyse, l'optimisation des paramètres opératoires, la vérification de la robustesse de ces paramètres, une étude approfondie de la stabilité des solutions et la validation de la méthode sont des éléments indispensables pour assurer une utilisation optimale de la méthode, éléments qui feront l'objet d'un développement ultérieur.

Les travaux préliminaires réalisés ont apporté un certain nombre d'informations pratiques pour l'approche et la mise en œuvre du standard différé, en vue d'études plus approfondies (perspectives envisagées au laboratoire) ou dans sa mise en œuvre quotidienne pour l'optimisation du suivi des performances des méthodes d'analyse chromatographique.

## Conclusion

---

## Conclusion

---

La pérennité d'utilisation d'une méthode d'analyse en routine passe par sa validation initiale au stade de développement analytique de la méthode puis par sa revalidation à chaque modification apportée.

La validation statistique consiste en l'évaluation de critères statistiques. L'industriel est alors guidé dans cette étape par les recommandations de plus en plus nombreuses ces dernières années, "Guidelines" qui convergent vers une harmonisation dans le choix de l'éventail des critères à valider et la méthodologie.

Si différentes démarches existent pour la validation statistique d'une méthode d'analyse, le guide de validation de la Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques fait référence dans le domaine et a conquis la plupart des industriels désireux de valider leurs méthodes d'analyse en vue du dépôt d'un dossier d'AMM. Cependant les différentes méthodologies publiées se bornent souvent à une validation purement statistique des données brutes obtenues. Les utilisateurs, à travers leurs procédures opératoires, doivent intégrer au plus tôt ces recommandations dans le processus global d'assurance qualité du laboratoire de contrôle.

La validation d'une méthode d'analyse précise les performances et les limites de cette méthode, paramètres qui sont établis à un instant donné sur un système chromatographique dont les performances ne sont pas ou plus équivalentes à celui du chromatographe utilisé en routine au moment de l'analyse.

La mise en œuvre du standard différé peut permettre de pallier ce manque et de juger des déviations lentes des performances d'un système chromatographique que les tests de conformités ne suffisent pas à détecter.

La méthode de séparation des hydrocarbures polyaromatiques illustre l'utilisation du concept du standard différé et sert de base à un travail qui envisage la détermination d'un marqueur de vieillissement des colonnes chromatographiques.

## **Annexe 1 : Chromatographie Liquide Haute Performance CLHP**

### **- Glossaire des termes techniques -**

---

# Chromatographie Liquide Haute Performance CLHP

## - Glossaire des termes techniques -

---

La chromatographie est une technique par laquelle des composants d'un échantillon, entraînés par une phase mobile liquide (chromatographie liquide) ou gazeuse (chromatographie gazeuse) sont séparés par des étapes d'adsorption/désorption sur une phase stationnaire.

La séparation des composés par Chromatographie Liquide Haute Performance est basée sur des interactions et les différences de partage de l'échantillon entre la phase mobile liquide et la phase stationnaire. Parmi les différentes techniques chromatographiques, la technique de chromatographie à polarité de phases inversées reste la plus utilisée, associée à une détection UV, méthode de détection la plus commune.

- Les phases stationnaires utilisées dites " à polarité de phases inversées " sont des phases greffées apolaires (espèces organiques liées chimiquement à une surface solide).
- Les phases mobiles sont des mélanges de composés polaires (eau, ou solvants organiques : méthanol, acétonitrile par exemple), la phase mobile se déplace à travers la phase stationnaire sous l'impulsion de pompe haute pression, entraînant l'analyte avec elle.

**Chromatogramme** : graphique d'une fonction de la concentration en soluté en fonction du temps d'élution ou du volume d'élution.

**Eluant** : solvant ou mélange de solvant utilisé pour entraîner les constituants d'un mélange à travers une phase stationnaire.

**Elution** : processus au cours duquel des solutés sont entraînés à travers une phase stationnaire par le mouvement d'une phase mobile.

**Facteur d'asymétrie** :  $A_s$  permet de mesurer la déformation du pic expérimental par rapport au pic idéal, symétrique.

**Facteur de capacité** :  $k'$  rapport des quantités (ou des masses) d'un composé présentes à l'équilibre dans les deux volumes des phases stationnaire et mobile adjacentes. Il est lié à la vitesse de progression du composé étudié dans une colonne.

**Facteur de sélectivité** :  $\alpha$  pour les solutés A et B est défini par le rapport du coefficient de distribution du soluté qui est retenu le plus fort B au coefficient de distribution du composé A.

**Hauteur d'un pic** :  $H$  (en mV ou en unités d'absorbances) est proportionnelle à la concentration maximale du composé dans le détecteur, et à son coefficient d'absorption à la longueur d'onde choisie (pour un détecteur UV). Elle varie avec la concentration de la solution injectée et avec le facteur de dilution que subit le pic lors de sa migration à travers la colonne. Tant que l'élargissement des pics dans la colonne ne change ni avec le temps ni avec la quantité injectée, la hauteur de chaque pic sera proportionnelle à la concentration dans l'échantillon.

**Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique** :  $HEPT$  mesure standardisée de la largeur d'un pic qui tient compte du fait que la largeur (en unités de temps) croît comme une fonction racine carrée avec le temps de rétention ou avec la longueur de la colonne  $L$ .  $H$  ne dépend pas des dimensions de la colonne et varie théoriquement peu d'un composé à un autre. La mesure de  $HEPT$  reflète principalement l'homogénéité du remplissage de la colonne et est ainsi une mesure de l'efficacité de celle-ci.

**Nombre de plateaux théoriques** :  $N$  est également une mesure de l'efficacité de la colonne. Le nombre de plateaux est obtenu en divisant la longueur de la colonne par la hauteur  $H$  d'un plateau. Plus le nombre de plateaux est grand, meilleures sont les séparations.

**Perte de charge** :  $\Delta p$  d'une colonne est la différence de pression entre l'entrée et la sortie de la colonne. Elle est souvent assimilée à la pression affichée sur la pompe, qui cependant contient également les pertes de charge dans les tubulures de l'injecteur et du détecteur. La pression nécessaire pour assurer le débit souhaité dépend du débit, de la longueur de la colonne, de la viscosité de l'éluant et du diamètre des particules.

**Résolution** :  $R_s$  la résolution d'une colonne chromatographique est une mesure quantitative de son aptitude à séparer les analytes A et B.

**Surface ou aire d'un pic** :  $A$  est obtenue à l'aide d'un intégrateur ou logiciel d'intégration qui détecte le début et la fin de chaque pic dans le chromatogramme et calcul l'aire sous le pic entre ces deux bornes. Le résultats est proportionnel à la hauteur du pic (en mV) et à sa largeur (en min ou s) et indiquée en unités de surface (par exemple  $\mu V.s$ ). Tant que le débit reste stable, la surface sera donc proportionnelle à la quantité injectée, même si la forme du pic change. Les résultats quantitatifs obtenus par l'intégration de la surface seront moins sensibles aux variations des conditions chromatographiques que la mesure de la hauteur.

**Temps mort** :  $t_0$  temps nécessaire pour qu'un espèce non retenue traverse une colonne de chromatographie avec la vitesse de la phase mobile. Le temps mort est alors le temps nécessaire pour remplacer le volume de phase mobile contenue dans la colonne (le volume mort). Il dépend des dimensions de la colonne et du débit de la phase mobile.

**Temps de rétention** :  $t_r$  temps qui s'écoule entre l'injection de l'échantillon et l'apparition d'un pic de soluté sur le détecteur du système chromatographique. Il dépend des propriétés du composé et du choix des phases stationnaire et mobile mais aussi des dimensions de la colonne et du débit de la phase mobile.

**Volume mort** :  $v_0$  volume de phase mobile écoulé pendant le temps mort  $t_0$ .

## Annexe 2 : Formules statistiques

---

## Formules statistiques

---

### 1-Paramètres des droites de régression (estimation selon SFSTP (5), (6)).

*Pente, ordonnée à l'origine et coefficient de corrélation*

- Calcul de la pente d'une droite (b)

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

- Calcul de l'ordonnée à l'origine (a)

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

- Calcul du coefficient de corrélation (r)

- calcul de la covariance  $Sx_{ij}y_{ij}$

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

- calcul du coefficient de corrélation

$$r = Sx_{ij}y_{ij} / Sx_{ij} \cdot Sy_{ij}$$

**2-Test de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec zéro (méthode préconisée par la SFSTP (5), (6)).**

On vérifie l'inégalité suivante :

$$\frac{|a|}{\delta_a} < t_{(\alpha, N-2)}$$

Si cette relation est vérifiée, on peut affirmer au seuil de probabilité  $1 - \alpha$  que l'ordonnée à l'origine n'est pas significativement différente de zéro.

$a$  ordonnée à l'origine

$\delta_a$  écart type de l'ordonnée à l'origine

$|a|$  valeur absolue de l'ordonnée à l'origine

$$\delta_a^2 = \delta_R^2 \left[ \frac{1}{N} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x})^2} \right]$$

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

### 3-Test de Comparaison des pentes des droites $D_1$ et $D_2$ (Selon SFSTP).

$\delta^2 b_1$  variance de la pente  $b_1$

$\delta^2 b_2$  variance de la pente  $b_2$

$$\delta^2_b = \frac{\delta^2_R}{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x})^2}$$

La comparaison des pentes s'effectue à l'aide d'un test  $t$

$$t = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{\delta^2 b_1 + \delta^2 b_2}}$$

Si  $t < t(\alpha; N1 + N2 - 4)$  lu dans la table de *Student*, on peut affirmer que les pentes ne sont pas significativement différentes entre elles au risque  $\alpha$ .

### 4-Test de comparaison des ordonnées à l'origine des droites $D_1$ et $D_2$ .

La comparaison des ordonnées à l'origine s'effectue par un test  $t$  de *Student*.

$$t = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{\delta^2 a_1 + \delta^2 a_2}}$$

Si  $t < t(\alpha; N1 + N2 - 4)$  lu dans la table de *Student*, on peut affirmer que les ordonnées à l'origine ne sont pas significativement différentes entre elles au risque  $\alpha$ .

**5-Test de l'existence d'une pente significative (SFSTP (5), (6)).**

Ce test est une analyse de variance où les variances dues à la régression (variation résiduelle) et aux erreurs expérimentales et d'ajustement (variation résiduelle) sont comparées entre elles par un test F de *Fisher*.

<i>Variations</i>	<i>DDL</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Variances</i>	<i>F calculé</i>
Variation totale	N-1	$\sum T^2 = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (Y_{ij} - \bar{Y})^2$		
Variation due à la régression	1	$\sum I^2 = b^2 \sum_{j=1}^k n_j (X_j - \bar{X})^2$	$S^2_I = \sum I^2$	$F_1 = \frac{S^2_I}{S^2_R}$
Variation résiduelle	N-2	$\sum R^2 = \sum T^2 - \sum I^2$	$S^2_R = \frac{\sum R^2}{N-2}$	

$$F_1 = \frac{S^2_I}{S^2_R} > F_{(\alpha;1;N-2)}$$

Si  $F_1$  est significatif, on conclut à l'existence d'une pente, donc à une dépendance linéaire au seuil de probabilité considéré.

## 6-Test de validité de la droite de régression (SFSTP).

Ce test permet de comparer les erreurs d'ajustement  $S^2_L$  et expérimentales  $S^2_E$ .

Variations	DDL	Somme des carrés	Variances	F calculé
Erreur expérimentale	N-k	$\sum E^2 = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (Y_{ij} - \bar{Y}_j)^2$	$S^2_E = \frac{\sum E^2}{N-k}$	$F^2 = \frac{S^2_L}{S^2_E}$
Erreur de la régression	k-2	$\sum L^2 = \sum R^2 - \sum E^2$	$S^2_L = \frac{\sum L^2}{k-2}$	

$$F_2 = \frac{S^2_L}{S^2_E} > F_{(\alpha; k-2; N-k)}$$

Si  $F_2$  est significatif, l'ajustement est considéré comme valide au seuil de probabilité considéré.

## 7-Test de validité des moyennes.

Le test de validité des moyennes est un test F de comparaison des variances dues aux erreurs inter groupes et intra groupes.

$S^2_T$  variance totale

$S^2_E$  variance intra-groupe

$S^2_C$  variance inter-groupe

Variations	DDL	Somme des carrés	Variances	F Calculé
Variation totale	N-1	$\sum T^2 = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (Y_{ij} - Y)^2$	$S^2_T = \frac{\sum T^2}{N-1}$	
Variation intra-groupe	N-k	$\sum E^2 = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (Y_{ij} - Y_j)^2$	$S^2_E = \frac{\sum E^2}{N-k}$	
Variation inter-groupe	k-1	$\sum C^2 = \sum T^2 - \sum E^2$	$S^2_C = \frac{\sum C^2}{k-1}$	$F_3 = \frac{S^2_C}{S^2_E}$

$$F_3 = \frac{S^2_C}{S^2_E} < F_{(\alpha, k-1, N-k)}$$

Si l'inégalité est vérifiée, on peut dire au risque considéré que les variations des observations observées entre les groupes sont dues aux erreurs expérimentales.

## 8-Paramètres de fidélité d'une méthode.

- coefficient de Variation (RSD: Relative Standard Deviation) : pourcentage de variation dans une série de nombres par rapport à leur moyenne.

$$CV_{\%} = \frac{\delta}{\bar{x}} \times 100$$

$\delta$  écart-type sur n mesures x

$\bar{x}$  moyenne des x mesures

- variance de répétabilité ( $S_r^2$ )

$$S_r^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n_j} (Y_{ij} - m_j)^2}{n_j - 1}$$

Nombre de degré de liberté (ddl)  $(\sum_{j=1}^k n_j) - k$

- variance intergroupes

$$Sg2 = \frac{\sum_{j=1}^k [n_j (m_j - \bar{m})^2]}{k - 1} - S_r^2$$

### 9-Test d'homogénéité des variances.

$$C = S^2 \max / \sum_{j=1}^k S^2 j$$

$S^2 j$  variance du groupe  $j$

$S^2 \max$  variance la plus élevée des  $k$  groupes  $j$

### 10-Intervalle de confiance (IC).

$$(IC) = m \pm t \frac{\delta}{\sqrt{n}}$$

$m$  : moyenne

$\delta$ : écart type

$n$  : nombre de valeurs

### 11-Erreur relative (Er %).

$$Er = \frac{Ci - Cr}{Cr} * 100 (\%)$$

$c_i$  concentration calculée

$c_r$  concentration réelle

## 12-Recouvrement (r).

$$r = \frac{C_i}{C_r} * 100 = 100 + Er$$

$c_i$  concentration calculée

$c_r$  concentration réelle

$Er$  erreur relative

## 13- Sensibilité de la méthode.

$\delta x$  est la variation minimale qu'il faut imposer à la concentration en substance à examiner dans un échantillon pour obtenir une variation significative du signal mesurée, soit une différence de concentrations entre deux valeurs  $x_1$  et  $x_2$ .

Ces deux valeurs ( $x_1$  et  $x_2$ ) correspondent à des réponses vraies (aires par exemple) qui sont estimées par les mesures  $y_1$  et  $y_2$ .

La différence entre les valeurs vraies et les valeurs mesurées représente les fluctuations des mesures du signal.

La distribution de la fluctuation des signaux suit une loi normale, de moyenne égale à 0 et d'écart-type  $\delta_{\text{exp}} \cdot \sqrt{2}$ .

La loi de distribution de la différence des valeurs mesurées va permettre de déterminer l'importance de l'écart observé à partir duquel les valeurs  $x_1$  et  $x_2$  seront différentes.

La variation minimale  $\delta x$  est donnée par la formule suivante:

$$\delta x = \frac{(t \frac{\alpha}{2} + t\beta) \cdot \delta_{\text{exp}} \cdot \sqrt{2}}{b}$$

$b$  pente de la droite de regression

$\delta_{\text{exp}}$  racine carrée de la variance expérimentale (valeur obtenue dans l'analyse de variance de la linéarité).

$\alpha$  risque de première espèce (bilatéral)

$\beta$  risque de seconde espèce (unilatéral)

#### 14- Résolution (R).

Mesure de l'efficacité de la séparation de deux constituants d'un mélange.

$$R = 2 \frac{(t_2 - t_1)}{W_2 + W_1}$$

$t_1$  et  $t_2$  sont les temps de rétention des deux constituants.

(même unité)

$W_1$  et  $W_2$  sont les largeurs correspondantes de la base des pics, obtenues par extrapolation des côtés des pics à la ligne de base.

(même unité)

### 15- Nombre de plateaux théoriques (N).

Quantité sans dimensions, servant à exprimer la performance d'une colonne, dans des conditions spécifiées.

$$N = 16 \left( \frac{t}{W} \right)^2 \quad \text{ou} \quad N = 5,54 \left( \frac{t}{W_{h/2}} \right)^2$$

t est le temps de rétention mesuré depuis le moment de l'injection jusqu'à l'élution du maximum du pic.

W est la largeur du pic mesurée en extrapolant les côtés relativement droits à la ligne de base.

$W_{h/2}$  est la largeur à mi-hauteur du pic.

t, W et  $W_{h/2}$  sont exprimés dans la même unité.

### 16- Facteur de traînée (T).

mesure de l'asymétrie du pic.

$$T = \frac{W_{0,10}}{2f}$$

$W_{0,10}$  est la largeur du pic à 10 p. 100 de hauteur.

f est la distance entre le bord antérieur du pic et la perpendiculaire par rapport au maximum du pic.

$W_{0,10}$  et f sont mesurés avec la même unité de mesure.

### 17- Facteur de capacité (k').

quantité sans dimension équivalent au rapport entre le temps de rétention d'un composé et celui d'un composé non retardé, dans des conditions spécifiées.

$$k' = \frac{t_a}{t_b} - 1$$

$t_a$  est le temps de rétention du composé étudié du pic.

$t_b$  est le temps de rétention du constituant non retardé (temps mort).

### 18-Test de DIXON.

**(test statistique de recherche des mesures aberrantes)**

Le test de DIXON est particulièrement adapté aux petites séries, lorsque le nombre de mesures n est compris entre 4 et 10.

On peut suspecter l'existence d'une valeur aberrante dans un groupe de données lorsque le test de COCHRAN appliqué à ce groupe est significatif (la valeur numérique donnée par le rapport entre la variance  $\delta^2_{\max}$  et la somme des variances de ce groupe est supérieure à la valeur théorique lue dans la table de COCHRAN).

Réalisation du test (5), (6):

- on classe les observations Y par ordre croissant, soit  $Y_1, Y_2, Y_3, \dots, Y_n$ .
- la mesure incriminée est alors soit la valeur  $Y_1$ , soit la valeur  $Y_n$  puisque ce sont elles qui s'écartent le plus de la médiane.

Lorsque le nombre de mesures individuelles est impair, la médiane correspond à la valeur centrale des données classées.

Lorsque le nombre de mesures individuelles est pair, la médiane correspond à la moyenne arithmétique de deux valeurs centrales des données classées.

- le critère à utiliser est Q.

$Q_{\text{calculé}} = Y_2 - Y_1 / Y_n - Y_1$  si la valeur incriminée est  $Y_1$ .

$Q_{\text{calculé}} = Y_n - Y_{n-1} / Y_n - Y_1$  si la valeur incriminée est  $Y_n$ .

- 3 cas peuvent alors se présenter:

1-  $Q_{\text{calculé}}$  est inférieur à la valeur critique de la table au seuil 5%, le test de DIXON n'est pas significatif et aucune observation ne peut être suspectée.

2-  $Q_{\text{calculé}}$  est compris entre les valeurs critiques de la table aux seuils 5% et 1%, la valeur est dite "suspecte".

3-  $Q_{\text{calculé}}$  est supérieur à la valeur critique de la table au seuil 1%, la valeur est jugée aberrante.

En pratique, le test de DIXON est appliqué sur la série de données dont la variance est la plus grande : série  $\delta^2_{\text{max}}$ .

Il n'y a pas lieu de suspecter l'existence d'une valeur aberrante dans un groupe de mesures lorsque le test d'homogénéité des variances de COCHRAN n'est pas significatif.

Par contre, si la valeur C de COCHRAN est comprise entre les valeurs critiques de la table aux seuils 5 et 1%, la variance  $\delta^2_{\max}$  est dite "suspecte", de la même façon, si la valeur C de COCHRAN est supérieure à la valeur critique au seuil 1%, la variance  $\delta^2_{\max}$  du groupe est considérée comme provisoirement "aberrante".

Dans ces deux derniers cas, on appliquera le test de DIXON au groupe de valeurs ayant la plus grande variance  $\delta^2_{\max}$ .

- Si le test de DIXON appliqué à ce groupe n'est pas significatif, la suite des calculs est compromise, aucune valeur ne peut être directement mise en cause.

- Le test de DIXON est significatif, on peut alors éliminer la valeur jugée précédemment "suspecte" ou "provisoirement aberrante". Il est nécessaire de recalculer la nouvelle variance du groupe ainsi que le test de COCHRAN.

Dans le cas d'un calcul de fidélité, il faut également recalculer les paramètres  $Sr^2$ ,  $Sg^2$ ,  $SR^2$ , la moyenne générale  $m$  et le nombre moyen de déterminations par groupe avec le nouveau nombre de mesures.

Remarque:

Le nombre de valeurs aberrantes ne doit pas dépasser deux au sein d'un même groupe de mesures.

## 19-Glossaire.

$x_{ij}$	valeur brute indépendante
$y_{ij}$	valeur brute dépendante
$n_j$	nombre d'observations du groupe $j$
$m_j$	moyenne des $n_j$ valeurs du groupe $j$
$\bar{m}$	moyenne des moyennes des groupes
$n$	nombre moyen de valeurs par groupe
$j$	indice de groupe
$k$	nombre de groupe
$i$	indice des valeurs individuelles dans le groupe $j$
$\bar{y}$	moyenne générale des valeurs $x_{ij}$ des $k$ groupes
$\bar{x}$	moyenne générale des observations $y_{ij}$ des $k$ groupes
$\bar{X}_j$	moyenne des valeurs $x_{ij}$ des $k$ groupes
$\bar{Y}_j$	moyenne des observations $Y_{ij}$ dans chaque groupe $j$
$S^2$	variance
$\delta$	écart-type
$N$	nombre total de mesures
$Y$	moyenne des valeurs $Y_j$ des $k$ groupes
$\bar{\bar{X}}$	moyenne des valeurs $\bar{X}_j$ des $k$ groupes
$t$	test de <i>Student</i>
$F$	test de <i>Fisher</i>
$k$	nombre de groupes

## Bibliographie

---

## Bibliographie

---

- 1- AVA Version 3.0 – Aide Contextuelle – Logiciel d'évaluation statistique de la SFSTP
- 2- S.R.BAKALYAR and R.A.ENRY. Variables affecting precision and accuracy in high-performance liquid chromatography.  
*Journal of Chromatography*, 1976, (126), 327-345
- 3- M. BASCHUNG-BERTRAND, R.BEAUTEMPS, R. BOUTIN, J. BROHON, E. BRUNA, J. COULON, A. GADEFAIT, A.M. GALLOT, P. GRELET, M. GUILLOTEAU, M.C. LAUBIGNAT, J.B LOISEAU, S. MICHEAU, F. PELLERIN, P.POLGE, F.PHILLIPON, J.C. PLANTEFEVE, F. SORRAING, J. de SMET, M. TOUCHOT, et F. WILLEMOT. Validation analytique – Commentaire sur la note explicative européenne et exemple d'application – Rapport d'une commission SFSTP.  
*S.T.P. Pharma Pratiques*, 1990, 6 (8), 588-594
- 4- M.A. CAMACHO SANCHEZ, A.L TORRES SUAREZ, M.E. GIL ALEGRE, M.M OBREGON SANCHEZ and V. RUZ PALOMAR. Validation protocol of analytical methods for finished pharmaceutical products.  
*S.T.P. Pharma Pratiques*, 1993, 3 (3), 197-202
- 5- J. CAPORAL-GAUTIER, J.M NIVET, P. ALGRANDI, M. GUILLOTEAU, M. HISTE, M. LALLIER, J.J. N'GUYEN-HUU et R. RUSSOTTO. Guide de validation analytique - Rapport d'une commission SFSTP – I. Méthodologie.  
*S.T.P. Pharma Pratiques*, 1992, 2 (4), 205-226
- 6- J. CAPORAL-GAUTIER, J.M NIVET, P. ALGRANDI, M. GUILLOTEAU, M. HISTE, M. LALLIER, J.J. N'GUYEN-HUU et R. RUSSOTTO. Guide de validation analytique - Rapport d'une commission SFSTP – II. Exemples d'applications.  
*S.T.P. Pharma Pratiques*, 1992, 2 (4), 227-239
- 7- Center for Drug Evaluation and Research. Validation of chromatographic methods – reviewer Guidance. November 1994
- 8- P. CHEMINADE, S.FERAUD, A. BAILLET et D. FERRIER. Validation d'une méthode analytique de dosage par CLHP - Test de robustesse et validation de la méthode. *S.T.P. Pharma Pratiques*, 1995, 5 (1), 17-35
- 9- L. De GALAN. An industrial view on method validation.  
*Analisis Magazine*, 1994, 22 (5), 17-18

- 10- R. DOMELIER. Etude de la stabilité d'une colonne de chromatographie de diamètre réduit. DEA Physico-Chimie et Bioqualité Option Physico-Chimie Analytique, 1999
- 11- FDA Guide to inspections of Pharmaceutical quality control laboratories. July, 1993
- 12- M. FEINBERG. Interlaboratory study technique.  
*Analisis Magazine*, 1994, 22 (5), 34-37
- 13- M. GACHON. Validation d'une méthode de recherche et d'évaluation des impuretés d'un principe actif. *S.T.P. Pharma Pratiques*, 1986, 2 ( hors série), 837-839
- 14- Y.L. GRIZE. A review of robust process design approaches.  
*Journal of Chemometrics*, 1995, (9), 232-262
- 15- C.L. GUILLEMIN. Le point sur la validation des résultats chromatographiques en ligne ou au laboratoire. *Analisis Magazine*, 1993, 21 (4), 39-43
- 16- C. HARTMAN. Increasing precision by replicate measurements.  
*Analisis Magazine*, 1994, 22 (5), 19-21
- 17- C. HARTMANN, D.L MASSART and R.D McDOWALL. An analysis of the Washington Conference report on bioanalytical method validation. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 1994, 12 (11), 1337-1343
- 18- Health Protection Branch Health and Welfare Canada. ACCEPTABLE METHODS Drugs directorate guidelines. 20 August 1993
- 19- Y.V. HEYDEN. The Ruggedness of analytical methods. *Analisis Magazine*, 1994, 22 (5), 27-29
- 20- G. C. HOKANSON. A life Cycle approach to the Validation of Analytical Methods during Pharmaceutical Product Developpement - Part I: The initial Method Validation Process. *Pharmaceutical technology*, September 1994
- 21- G. C. HOKANSON. A life Cycle approach to the Validation of Analytical Methods during Pharmaceutical Product Developpement – Part II : Changes and Needs for Additional Validation. *Pharmaceutical technology* October 1994

- 22- ICH Draft 3 Following Jan 99 Meeting Good Manufacturing Practice. Guide for Active Pharmaceutical Ingredient. February 1999
- 23- ICH Topic Q2B Validation of Analytical Procedures :Methodology – Note for guidance on validation of analytical procedures :methodology. Step 4, Consensus Guideline, 6 November 1996
- 24- D.R. JENKE. Chromatophic Method Validation : A Review of Current Pratices and Procedures. *J.Liq.Chrom.&Rel.Technol*, 1996, 19(5), 719-736
- 25- S. KAROLAK. Validation d'une méthode de dosage – Méthodologie des plans d'expérience, Faculté de Pharmacie de Paris XI. Janvier 1999
- 26- D. LECOMPTE. Validation d'une méthode de dosage par chromatographie liquide. *S.T.P. Pharma Pratiques*, 1986, 2 (hors série), 843-849
- 27- P. LOTTEAU. La qualité par la validation des méthodes. *S.T.P. Pharma Pratiques*, 1986, 2 (hors série), 828-830
- 28- J.M. NIVET. Validation des procédures d'analyse, Faculté de Pharmacie de Paris V. Mai 1997
- 29- J.M NIVET. Validation analytique et présentation du logiciel statistique de la SFSTP. *S.T.P. Pharma Pratiques*, 1993, 3 (5), 341-344
- 30- F.PELLERIN, S.ARMEL, F.BIGEARD *et al.* Substances de référence d'origine chimique Rapport d'une commission SFSTP. *S.T.P. Pharma Pratiques*, 1992, 2 (6) 491-195
- 31- PHIRA. Contrôle d'un spectrophotomètre. Test 2B. Vérification de la linéarité des absorbances. Page 4/7
- 32- B. RENGER, H. JEHLÉ, M. FISCHER. Validation of Analytical Procedures in Pharmaceutical Analytical Chemistry : HPTLC Assay of theophylline in an effervescent tablets. *Journal of Planar chromatography*, July/August 1995, (8)
- 33- USP XXII. VALIDATION OF COMPENDIAL METHODS General Information. <1225>, 1710-1712
- 34- USP XXIII. VALIDATION OF COMPENDIAL METHODS General Information. <1225>, 1982-1984
- 35- BGM. VANDEGINSTE, JFA. QUALT. Statistical quality control. *Analisis Magazine*, 1994, 22 (5), 30-33

- 36- J.LVIRLICHIE et A.AYACHE. Application d'un modèle d'étude de la robustesse à la validation d'une méthode d'analyse CLHP. *S.T.P. Pharma Pratiques*, 1995, 5 (1), 37-48
- 37- C.VUAGNAT, J.CAUQUIL et J.R. MATHIEU. Etalonnage et calibration linéaire. *S.T.P. Pharma Pratiques*, 1992, 2 (3), 149-158
- 38- WATERS Compagny. Introduction to validation, [http://www.waters.com/Waters\\_Website/Applications/validate/Vld\\_intr.htm](http://www.waters.com/Waters_Website/Applications/validate/Vld_intr.htm)
- 39- WATERS Compagny . WATERS Millennium Guide System Suitability User's Guide. Appendix A System Suitability Equations
- 40- B.W. WENCLAWIAK and T.HEES. Optimization of High Performance Liquid Chromatography and solvent parameters for the separation of polyaromatic hydrocarbons compared with supercritical fluid chromatography with UV detection. *Journal of Chromatography*, 1994, (660), 61-65
- 41- S.A. WISE, L.C. SANDER and W.E. MAY. Determination of polycyclic aromatics hydrocarbons by liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 1993, (642), 329-349



Contribution à l'optimisation des méthodologies.  
La validation analytique et ses limites : pré-requis, exigences, méthodes et application.

---

La validation des méthodes d'analyse est une étape essentielle pour tout laboratoire pharmaceutique désireux de se conformer aux exigences réglementaires pour la constitution d'un dossier d'autorisation de mise sur le marché.

Au quotidien, la validation analytique procure une fiabilité et une crédibilité des résultats obtenus par l'application de la méthode d'analyse, l'utilisateur devant d'ailleurs connaître les performances et les limites de la méthode en cours d'utilisation.

L'industriel est guidé dans sa démarche de validation par des recommandations internationales (processus ICH) mais aussi par la publication de nombreuses méthodologies. Il devra alors composer un protocole de validation complet fonction du type de méthode à valider, de son utilisation, veiller au respect des pré-requis de la validation et vérifier l'adéquation de la méthode avec les performances du matériel d'analyse.

Les outils d'analyse chromatographique sont des systèmes instables et les performances des colonnes chromatographiques sont sujettes à des fluctuations. L'emploi du standard différencié permet de juger des déviations lentes d'un système chromatographique et complète l'étude des tests de conformité de l'analyse. Sa mise en œuvre est illustrée par une méthode de séparation en chromatographie liquide haute performance d'hydrocarbures polyaromatiques, méthode qui sera utilisée dans la perspective de déterminer un marqueur du vieillissement des colonnes chromatographiques.

---

Contribution to optimization of methodologies.  
Analytical validation and its limits : pre-requisites, demands, methods and application.

---

Validation of analytical method is an essential step for pharmaceutical laboratories to meet the requirements of the regulation in order to obtain a Marketing Authorization Application.

Daily, analytical validation brings reliability and credibility to results obtained by the application of the analytical method, giving the user, information about performances and limits.

The industrialist is guided in his validation's process by international recommendations (ICH process) but also by publication of many methodologies. He will then to compose a complete protocol of validation in accordance with the type of method, its use, to see to the respect of validation requirements and to check the suitability of the method with the performances of the analyser.

System of chromatographic analyse are unstable and performances are able to fluctuate. The use of the differed standard allow to verify if low variations of the system of chromatography exist and complete the study of system suitability tests. Its realization is illustrated on a chromatographic method used to separate polyaromatic hydrocarbons by High Performance Liquid Chromatography. This method will be used in view to determine a marker of ageing process of chromatographic columns.

---

Mots-clés : Chromatographie - Méthodologies - Statistiques - Standard différencié - Validation

Key-words : Chromatography - Differed standard - Methodology - Statistics - Validation

---

Laboratoire de Chimie Analytique et de Bromatologie  
Faculté de Pharmacie  
2, rue du Docteur Marcland  
87025 LIMOGES CEDEX