



INSTITUT NATIONAL
DE SANTÉ PUBLIQUE
DU QUÉBEC

RAPPORT

Comparaison des limites de détection
déterminées par répétabilité et par
reproductibilité

AUTEUR

Mario Marchand, coordonnateur qualité

Direction de la santé environnementale et de la toxicologie

SOUS LA COORDINATION DE

Normand Fleury, chef d'unité scientifique

Alain LeBlanc, chef de secteur

Sergine Lapointe, responsable qualité

Direction de la santé environnementale et de la toxicologie

Ce document est disponible intégralement en format électronique (PDF) sur le site Web de l'Institut national de santé publique du Québec au : <http://www.inspq.qc.ca>.

Les reproductions à des fins d'étude privée ou de recherche sont autorisées en vertu de l'article 29 de la Loi sur le droit d'auteur. Toute autre utilisation doit faire l'objet d'une autorisation du gouvernement du Québec qui détient les droits exclusifs de propriété intellectuelle sur ce document. Cette autorisation peut être obtenue en formulant une demande au guichet central du Service de la gestion des droits d'auteur des Publications du Québec à l'aide d'un formulaire en ligne accessible à l'adresse suivante : <http://www.droitauteur.gouv.qc.ca/autorisation.php>, ou en écrivant un courriel à : droit.auteur@cspq.gouv.qc.ca.

Les données contenues dans le document peuvent être citées, à condition d'en mentionner la source.

DÉPÔT LÉGAL – 3^e TRIMESTRE 2013
BIBLIOTHÈQUE ET ARCHIVES NATIONALES DU QUÉBEC
BIBLIOTHÈQUE ET ARCHIVES CANADA
ISBN : 978-2-550-68352-0 (VERSION IMPRIMÉE)
ISBN : 978-2-550-68353-7 (PDF)

©Gouvernement du Québec (2013)

Liste des abréviations

ECMS	Enquête canadienne sur les mesures de la santé
LD	Limite de détection
CTQ	Centre de toxicologie du Québec
US EPA	United States Environmental Protection Agency
LQ	Limite de quantification
ICP-MS	Spectrométrie de masse à plasma d'argon induit (<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>)
DRC	Chambre à collisions (<i>Dynamic Reaction Cell</i>)
MR	Matériau de référence
GC-MS-MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
HPLC-MS-MS	Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (<i>High Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry</i>)

Mise en contexte

Il n'y a pas de consensus international sur la procédure de détermination de la limite de détection (LD) d'une méthode d'analyse^{1, 2, 3, 4}. Le Centre de toxicologie du Québec (CTQ) utilise une procédure basée sur la répétabilité déterminée dans une matrice réelle⁵. Cette approche permet d'obtenir rapidement une LD qui, tout en respectant des principes reconnus et documentés en analyses physico-chimiques, n'est pas toujours aussi stable que l'exigent, par exemple, les études de biosurveillance.

Ayant pour objectif de statuer sur une procédure correspondant aux nouvelles demandes de sa clientèle, un projet pilote a été réalisé afin de comparer les LD déterminées par répétabilité avec celles déterminées par reproductibilité et comparer la méthode de calcul utilisée par le CTQ à celle proposée par l'United States environmental protection agency (US EPA)⁶.

Définitions

Limite de détection (LD) : Correspond à la plus basse concentration d'un composé analysé dans une matrice réelle qui, lorsqu'il subit toutes les étapes d'une méthode d'analyse, incluant le prétraitement et les extractions chimiques, produit un signal détectable, avec une fiabilité statistiquement définie, différent de celui produit par un « blanc » de matrice dans les mêmes conditions.

Limite de quantification (LQ) : Correspond à la concentration minimale qui peut être quantifiée à l'aide d'une méthode d'analyse avec une fiabilité définie.

Répétabilité : Étroitesse de l'accord, à un niveau donné, dans la zone quantifiable de la méthode d'analyse, entre les résultats individuels obtenus sur le même échantillon soumis à l'analyse dans le même laboratoire et dans les conditions suivantes : même analyste, même instrument, même jour.

Reproductibilité : Étroitesse de l'accord, à un niveau donné, dans la zone quantifiable de la méthode d'analyse, entre les résultats individuels obtenus sur le même échantillon soumis à l'analyse dans le même laboratoire et dont au moins un des éléments suivants est différent : l'analyste, l'instrument, le jour.

Méthodologie

L'étude de la procédure de détermination de la LD proposée par l'US EPA montre que la principale différence avec celle utilisée par le CTQ se situe au niveau de la méthode de calcul. En effet, dans les deux cas, la LD est déterminée dans une matrice réelle, contenant les analytes d'intérêt présents à une concentration détectable, et qui passe par toutes les étapes de la méthode d'analyse. La variation dans le nombre de réplicas, soit un minimum de sept pour l'US EPA et dix pour le CTQ, étant prise en compte dans le calcul, il a été décidé de valider l'impact de la différence entre les deux méthodes de calcul seulement.

1. L'étude pilote a d'abord été effectuée en utilisant la méthode d'analyse M-572 (*Méthode d'analyse pour doser les métaux et autres éléments dans le sang par spectrométrie de masse à plasma d'argon induit (ICP-MS), DRC II*)⁷. Les analytes suivants ont servi à l'étude : cadmium, cobalt, manganèse, mercure, nickel, plomb, sélénium et zinc. Un MR, contenant les analytes d'intérêt, dont la concentration est égale à environ deux fois la LQ, a été analysé dix fois dans des conditions de reproductibilité (même instrument, analyste et jour différents). Les résultats ont été compilés dans un chiffrier Excel modélisant les deux méthodes de calcul (CTQ et US EPA).
2. Dans un deuxième temps, dans le but de vérifier l'effet sur les LD sur une plus longue période et permettre d'évaluer différents types de matrices et d'analytes, le chiffrier Excel a été modifié pour inclure trente réplicas de reproductibilité et le projet pilote a été étendu aux méthodes d'analyse suivantes :
 - E-465 (*Méthode d'analyse pour doser les Hydroxy-Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) dans l'urine par GC-MS-MS*)⁸
 - C-561 (*Méthode d'analyse pour doser le NNAL dans l'urine par HPLC-MS-MS*)⁹. Seulement 19 données ont été récoltées, compte tenu de l'arrêt de la méthode d'analyse pour transfert technologique durant la période de collecte des données.
 - Pour la méthode d'analyse M-572, précédemment citée, l'étude a été reprise avec trente réplicas pour trois analytes seulement, soit le cadmium, le mercure et le plomb.

Calculs

Méthode de calcul du CTQ

- LD déterminée = 3 x écart-type des réplicas

Méthode de calcul de l'US EPA

- LD déterminée = $T_{(n-1, 1-\alpha = 0.99)}$ x écart-type des réplicas

Où :

$T_{(n-1, 1-\alpha = 0.99)}$ = la valeur appropriée de T de Student à un niveau de confiance de 99 % pour un écart type estimé avec un degré de liberté unilatéral de n-1

Nombre de réplicas	Degré de liberté unilatéral (n-1)	Valeur de T à 99 % de niveau de confiance
10	9	2.821
19	18	2.552
30	29	2.462

Résultats

Les tableaux de compilation (1 à 4) présentent les résultats des limites de détection déterminées par répétabilité, selon la procédure actuellement en cours au CTQ, et les LD déterminées par reproductibilité selon les méthodes de calcul du CTQ et de l'US EPA. Pour la méthode d'analyse M-572, les tableaux 1 et 2 présentent respectivement les résultats obtenus avec dix et trente réplicas.

Tableau 1 Métaux et autres éléments dans le sang (méthode d'analyse M-572)- 8 analytes

Analyte	LD CTQ répétabilité 10 réplcas	LD CTQ reproductibilité 10 réplcas	Écart entre LD CTQ reproductibilité et LD CTQ répétabilité	LD US EPA reproductibilité 10 réplcas	Écart entre LD US EPA reproductibilité et LD CTQ reproductibilité
Cadmium (nmol/L)	0.3488	0.9723	62 %	0.9143	-6.0 %
Cobalt (nmol/L)	0.5456	0.5250	-4 %	0.4937	-6.0 %
Manganèse (nmol/L) -endogène-	6.6633	12.2515	46 %	11.5205	-6.0 %
Mercure (nmol/L)	0.667	0.9820	32 %	0.9234	-6.0 %
Nickel (nmol/L)	3.8632	11.4837	66 %	10.7985	-6.0 %
Plomb (µmol/L)	0.0017	0.0062	73 %	0.0058	-6.5 %
Sélénium (µmol/L) -endogène-	0.1070	0.3837	72 %	0.3608	-6.0 %
Zinc (µmol/L) -endogène-	2.8844	17.7403	84 %	16.6818	-6.0 %

Tableau 2 Métaux et autres éléments dans le sang (méthode d'analyse M-572)- 3 analytes

Analyte	LD CTQ Répétabilité 10 réplcas	LD CTQ reproductibilité 30 réplcas	Écart entre LD CTQ reproductibilité et LD CTQ répétabilité	LD US EPA reproductibilité 30 réplcas	Écart entre LD US EPA reproductibilité et LD CTQ reproductibilité
Cadmium (nmol/L)	0.3488	0.8748	60 %	0.7180	-18 %
Mercure (nmol/L)	0.667	1.3129	49 %	1.0775	-18 %
Plomb (µmol/L)	0.0017	0.0126	87 %	0.0103	-18 %

Tableau 3 HAP dans l'urine (méthode d'analyse E-465)

Analyte	LD CTQ répétabilité 10 répliques (µg/L)	LD CTQ reproductibilité 30 répliques (µg/L)	Écart entre LD CTQ reproductibilité et LD CTQ répétabilité	LD US EPA reproductibilité 30 répliques (µg/L)	Écart entre LD US EPA reproductibilité et LD CTQ reproductibilité
1-OH-benz[a] anthracène	0.0023	0.0033	30 %	0.0027	-18 %
3-OH-benz[a] anthracène	0.0033	0.0049	33 %	0.0040	-18 %
3-OH-benzo[a]pyrène	0.0014	0.0053	74 %	0.0043	-19 %
2-OH-chrysène	0.0028	0.0035	20 %	0.0029	-17 %
3-OH-chrysène	0.0025	0.0041	39 %	0.0034	-17 %
4-OH-chrysène	0.0033	0.0041	20 %	0.0033	-20 %
6-OH-chrysène	0.0027	0.0043	37 %	0.0035	-19 %
3-OH-fluoranthène	0.0020	0.0037	46 %	0.0030	-19 %
2-OH-fluorène	0.0018	0.0194	91 %	0.0159	-18 %
3-OH-fluorène	0.0007	0.0087	92 %	0.0072	-17 %
9-OH-fluorène	0.0027	0.0283	90 %	0.0232	-18 %
1-OH-phénanthrène	0.0020	0.0122	84 %	0.0100	-18 %
2-OH-phénanthrène	0.0016	0.0074	78 %	0.0061	-18 %
3-OH-phénanthrène	0.0016	0.0068	76 %	0.0056	-18 %
4-OH-phénanthrène	0.0007	0.0058	88 %	0.0048	-17 %
9-OH-phénanthrène	0.0030	0.0163	82 %	0.0133	-18 %
1-OH-pyrène	0.0014	0.0094	85 %	0.0077	-18 %
1-naphtol	0.026	0.0957	73 %	0.0785	-18 %
2-naphtol	0.040	0.1525	74 %	0.1252	-18 %

Tableau 4 NNAL dans l'urine (méthode d'analyse C-561)

Analyte	LD CTQ répétabilité 10 répliques	LD CTQ reproductibilité 19 répliques	Écart entre LD CTQ reproductibilité et LD CTQ répétabilité	LD US EPA reproductibilité 19 répliques	Écart entre LD US EPA reproductibilité et LD CTQ reproductibilité
NNAL (pg/mL)	1.1815	0.9473	-25 %	0.8058	-15 %

Discussion

Sauf pour le NNAL (effectué avec 19 réplicas, voir tableau 4) et le cobalt (effectué avec 10 réplicas, voir tableau 1), les LD obtenues sont plus élevées lorsqu'elles sont déterminées par reproductibilité plutôt que par répétabilité. Dans le cas des analytes de nature endogène (voir tableau 1), à l'exception du manganèse, l'écart est accentué. L'impact est cependant moindre pour ces analytes, car les concentrations mesurées sont beaucoup plus élevées que les LD déterminées.

La détermination de la LD effectuée avec trente réplicas calculée selon la méthode du CTQ donne des concentrations supérieures constantes de 18 % (6 % avec 10 réplicas et 15 % avec 19 réplicas) par rapport à la procédure de l'US EPA. Cette différence s'explique par le fait que la méthode de calcul du CTQ utilise un facteur fixe de trois fois l'écart-type des réplicas pour déterminer la LD (par répétabilité et par reproductibilité), alors que celle de l'US EPA utilise la table T de Student dont le facteur varie en fonction du nombre de réplicas. Pour trente réplicas le facteur, selon la table T en mode unilatéral, est de 2.462 (2.821 pour 10 réplicas et 2.552 pour 19 réplicas), pour un niveau de confiance de 99 %, avec un degré de liberté de n-1.

Conclusion

Suite aux résultats obtenus lors du projet pilote, le laboratoire de toxicologie du CTQ a choisi de déterminer la LD de ses méthodes d'analyse par reproductibilité. Elle s'effectuera par la compilation d'un minimum de trente réplicas d'un MR dont la concentration se situe près de la LQ. En présence d'analytes de nature endogène, un MR se situant soit à deux fois la LQ, soit au point le plus bas du domaine d'étalonnage ou au bas de l'intervalle thérapeutique (pour les analyses de médicaments) sera utilisé. Pour les nouvelles méthodes d'analyse, la LD sera déterminée par répétabilité, jusqu'à la disponibilité des trente réplicas du MR.

Bien que la détermination de la LD par reproductibilité effectuée avec trente réplicas, selon la méthode de calcul du CTQ, donne des concentrations supérieures de 18 % à celle de l'US EPA, la différence ne nous apparaît pas suffisante pour justifier les efforts à consentir dans les modifications de nos procédures pour migrer vers cette dernière. La méthode de calcul du CTQ, utilisant un facteur fixe de trois fois l'écart-type des réplicas, est conservée.

La détermination de la LD par reproductibilité sera beaucoup plus stable, répondant ainsi aux demandes de notre clientèle. Une fois le changement appliqué aux procédures concernées, il s'appliquera à toutes les méthodes d'analyse effectuées au laboratoire de toxicologie, à l'exception des analytes auxquels une valeur de « cutoff » est attribuée ou pour répondre à des besoins particuliers des clients.

Références

- 1 WESTGARD, James O., *Basic Method validation*, 3rd Edition, Westgard QC, Inc., Madison, 2008.
- 2 National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS), *Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantification; Approved Guideline*, NCCLS document EP17-A [ISBN 1-56238-551-8], NCCLS, Pennsylvania USA, 2004.
- 3 International Conference on Harmonisation (ICH), *Guidance for Industry Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology*, USA, November 1996.
- 4 MERMET, J.M., *Concepts de limite de quantification*, Spectroscopy Forever, Club de Spectrométrie Atomique, 18 juin 2006, <http://www.extpdf.com/limite-de-quantification-pdf.html#pdf#a1>.
- 5 Centre de Toxicologie du Québec, Laboratoire de toxicologie, *Procédure de validation des méthodes d'analyse*, PL-010 rev. 8, Québec, 2012.
- 6 US EPA, Code of federal regulation (CFR) *Title 40: Protection of environment, Chapter 1- Environmental protection agency, Part 136- Guidelines establishing test procedures for the analysis of pollutants, Appendix B to part 136- Definition and Procedure for the Determination of the Method Detection Limit- Revision 1.11*, B 7-1-03 Edition, http://www.epa.gov/region9/ga/pdfs/40cfr136_03.pdf.
- 7 Centre de toxicologie du Québec, Laboratoire de toxicologie, *Méthode d'analyse pour doser les métaux et autres éléments dans le sang par spectrométrie de masse à plasma d'argon induit (ICP-MS), DRC II*, Méthode d'analyse M-572-E, Québec, 2011.
- 8 Centre de toxicologie du Québec, Laboratoire de toxicologie, *Méthode d'analyse pour doser les Hydroxy-Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) dans l'urine par GC-MS-MS*, Méthode d'analyse E-465-B, Québec, 2012.
- 9 Centre de toxicologie du Québec, Laboratoire de toxicologie, *Méthode d'analyse pour doser le NNAL dans l'urine par HPLC-MS-MS*, Méthode d'analyse C-561-B, Québec, 2010.



EXPERTISE
CONSEIL



INFORMATION



FORMATION

www.inspq.qc.ca



RECHERCHE
ÉVALUATION
ET INNOVATION



COLLABORATION
INTERNATIONALE



LABORATOIRES
ET DÉPISTAGE

Institut national
de santé publique

Québec

