

Université Pierre et Marie Curie
Paris 6

**MÉMOIRE POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME UNIVERSITAIRE
« ASSURANCE QUALITÉ AU LABORATOIRE
DE BIOLOGIE MÉDICALE »**

Validation d'une Méthode Quantitative Portée B
Application au dosage des Vitamines A et E par CLHP

ERMAK Natalia
2012

NOTE AU LECTEUR

« Les mémoires des stagiaires du Diplôme Universitaire » « Assurance Qualité au laboratoire de biologie médicale » sont des travaux réalisés pendant l'année de formation.

Les opinions exprimées n'engagent que les auteurs.

Les travaux ne peuvent faire l'objet d'une publication en tout, ou partie, sans l'accord de l'auteur et du responsable du DU concerné.»

ERMAK Natalia

Praticien Attaché Associé

Groupe Hospitalier Necker Enfants-Malades

Paris

REMERCIEMENTS

Je remercie le Docteur Michel VAUBOURDOLLE et le Docteur Pascal PERNET de m'avoir accueillie au sein de leur enseignement.

Je remercie tous les intervenants du DU « Assurance qualité au laboratoire de biologie médicale » pour la qualité de leurs enseignements.

Je remercie le Docteur Thao NGUYEN KHOA pour m'avoir guidée et donné de précieux conseils dans le domaine étudié et tout au long de la rédaction de mon mémoire.

Je remercie enfin l'ensemble des techniciens et des biologistes pour leur participation.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	2
LISTE DES FIGURES.....	3
LISTE DES TABLEAUX	4
INTRODUCTION.....	5
1. Hôpital Universitaire Necker – Enfants Malades.....	5
1.1 Présentation de l'hôpital	5
1.2 Projet Qualité et Gestion des risques	6
1.3 Pôle Biologie et Produits de Santé	6
1.4 Laboratoire de Biochimie A.....	9
2. Exigences d'accréditation	11
2.1 Vérification / Validation des méthodes	11
2.2 Procédure de validation d'une méthode d'analyse quantitative	13
DEMARCHE ET BUT DE CE TRAVAIL	14
MATERIELS ET METHODES	15
1. Mesurandes : Vitamines A et E.....	15
2. Méthode d'analyse	15
2.1 Préparation des spécimens	15
2.2. Appareillage	16
2.3 Protocole expérimental	17
2.3.1 Fidélité	17
2.3.2 Inexactitude.....	18
2.3.3 Domaine de linéarité.....	18
2.3.4 Comparaison avec méthode déjà utilisé au laboratoire	19
RESULTATS	21
1. Conditions opératoires pour la colonne Kinetex	21
2. Evaluation de la fidélité	22
3. Evaluation de l'inexactitude.....	24
4. Evaluation du domaine de linéarité.....	24
5. Comparaison avec méthode déjà utilisé au laboratoire.....	25
DISCUSSION	27
CONCLUSION	29
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	31
LISTE DES ANNEXES.....	33

LISTE DES ABREVIATIONS

AFSSAPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé

AP – HP : Assistance Publique - Hôpitaux de Paris

ARS : Agence Régionale de Santé

BHN : Acte(s) de Biologie Hors Nomenclature

CEDI : Centre d'Etude des Déficits Immunitaires

CEL : Contrat Éducatif Local

CIQ : Contrôle Interne de Qualité

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique

COFRAC : Comité Français d'Accréditation

CV : Coefficient de Variation

DM-DIV : Dispositifs Médicaux de Diagnostic In Vitro

ET : Ecart Type

GH : Groupes Hospitaliers

HAS : Haute Autorité de Santé

INSERM : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

EBMD : Examens de Biologie Médicale Délocalisée

EEQ : Evaluation Externe de la Qualité

IRNEM : Institut de Recherche Necker-Enfants Malades

LBM : Laboratoire de Biologie Médicale

LD : Limite de Détection

m : Moyenne

MRC : Matériau de Référence Certifié

PBPS : Pôle Biologie et Produits de Santé

SFBC : Société Française de Biologie Clinique

SFVB : Société Francophone Vitamines et Biofacteurs

SMQ : Système de Management de la Qualité

TPER : Tableau Prévisionnel des Emplois Rémunérés

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Organisation de la Cellule Qualité du Pôle PBPS.	8
Figure 2. Stratégie de la Cellule Qualité du PBPS pour 2016.	9
Figure 3. Organigramme des responsabilités du laboratoire de Biochimie A.	10
Figure 4. Performance de particules Core-Shell.	16
Figure 5. Influence de la composition de la phase mobile sur la séparation des composés.....	21
Figure 6. Dosage des vitamines A et E : réduction de la prise d'essai.....	22
Figure 7. Dosage plasmatique des vitamines A et E : Domaine de linéarité.....	25
Figure 8. Dosage de vitamine A : Comparaison de deux techniques (Kinetex <i>versus</i> Satisfaction).....	26
Figure 9. Dosage de vitamine E : Comparaison de deux techniques (Kinetex <i>versus</i> Satisfaction).....	26

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Dosage plasmatique des vitamines A et E : évaluation de la répétabilité.	23
Tableau 2. Dosage plasmatique des vitamines A et E : évaluation de la reproductibilité.....	23
Tableau 3. Dosage plasmatique des vitamines A et E : évaluation de l'inexactitude	24
Tableau 4. Dosage des vitamines A et E : Limite de détection.....	25

INTRODUCTION

1. Hôpital Universitaire Necker – Enfants Malades

1.1 Présentation de l'hôpital

L'hôpital universitaire Necker-Enfants Malades, l'un de 12 groupes hospitaliers (GH) de l'Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), est l'hôpital pédiatrique de référence en France ¹.

Il est né du regroupement en 1926 de l'hôpital Necker – lieu d'invention du stéthoscope et de la réalisation de la première greffe de rein – et de l'hôpital des Enfants Malades, créé en 1802 et premier établissement au monde dédié aux enfants. Situé entre la rue de Sèvres et la rue Vaugirard dans le XVème arrondissement de Paris, il participe activement au sein de l'AP-HP, à la réorganisation de la périnatalité et de la pédiatrie dans l'ouest parisien et a fêté début 2011, la 500^{ème} greffe rénale. L'hôpital Necker-Enfants malades dispose aujourd'hui de l'ensemble des spécialités médicales et chirurgicales pour les enfants et d'une sélection de services spécialisés pour les adultes.

Centre de référence pour de nombreuses maladies rares et pour des pathologies lourdes et complexes, l'hôpital Necker-Enfants Malades rayonne au-delà de Paris et de l'Île-de-France : plus de 20% des patients hospitalisés viennent de province ou de l'étranger. Voici quelques chiffres clés pour l'année 2011 :

- 3 976 personnes travaillent à l'hôpital Necker-Enfants Malades : 828 médecins, 2 549 soignants, 599 personnels administratifs, professionnels ouvriers et techniques ;
- 61 406 hospitalisations, 305 330 consultations, 73 458 urgences ;
- 400 lits consacrés à la Pédiatrie et 200 lits pour le pôle Adulte spécialisé ;
- 2 626 naissances ;
- 311 greffes d'organes ;
- 20 unités de recherche (INSERM, CNRS, IRNEM), 900 chercheurs ;
- 1000 publications par an (5,6% des publications nationales) ;
- 32 centres de référence labellisés par le Ministère de la Santé ;
- Budget : 381 millions d'euros.

Fin 2012, l'hôpital Necker sera un grand hôpital moderne, recomposé autour d'un nouveau bâtiment « Pôle Mère-Enfant » de 5 étages et près de 50 000 m², lumineux et ouvert. Il abritera la chirurgie pédiatrique, la réanimation infantile, les urgences, l'imagerie pédiatrique, la cardiologie, la néphrologie, la gastro-entérologie, la maternité et la néonatalogie.

1.2 Projet Qualité et Gestion des risques

Un projet Qualité et Gestion des risques s'inscrit dans la perspective de la préparation de la certification en juin 2013 et dans des différentes réorganisations liées au plan stratégique qui doivent être accompagnées par un plan qualité exigeant et une politique rigoureuse de prévention des risques ¹. Le projet qualité définit 4 axes de travail :

- manager transversalement la qualité à l'échelle de l'hôpital et la décliner au sein de chaque pôle (référents qualité et gestion des risques) ;
- impulser une dynamique forte au service de la qualité et de la sécurité des soins : déclaration des événements indésirables, évaluation des Pratiques Professionnelles, évaluation des index de morbidité-mortalité, sécurisation du circuit du médicament et des produits sanguins ;
- prévenir les risques, gérer les crises : cartographie des risques, plans de prévention actualisés, exercices de simulation ;
- mieux répondre aux attentes des usagers : qualité de l'accueil et de la prise de rendez-vous, qualité hôtelière et marque AP, traitement des réclamations et des plaintes.

1.3 Pôle Biologie et Produits de Santé

L'hôpital Necker-Enfants Malades est organisé autour de 9 pôles d'activité médicale :

Pôle 1 – Pédiatrie générale et multidisciplinaire

Pôle 2 – Médico-chirurgical pédiatrique

Pôle 3 – Périnatalogie et cardiologie pédiatrique

Pôle 4 – Imagerie

Pôle 5 – Biologie et produits de santé

Pôle 6 – Hématologie, Immunologie, Infectiologie

Pôle 7 – Réanimations, urgences et anesthésies

Pôle 8 – Rein, Œil, Cœur

Pôle 9 – Santé publique et Recherche Clinique

Les contrats de pôle déclinent les objectifs institutionnels de l'hôpital et dégagent des axes de travail pour les quatre années à venir sur plusieurs thèmes : amélioration des filières de soins, optimisation des plateaux techniques, stratégie médicale et de recherche, recrutement et gestion du personnel, qualité et gestion des risques.

Le Pôle Biologie et Produits de Santé (PBPS) regroupe les services suivants :

- Immunologie biologique
- Anatomie – pathologie
- Biochimie métabolique
- Biochimie générale
- Génétique médicale
- Hématologie biologique
- Bactériologie, virologie, parasitologie et hygiène
- Histologie embryologie cytogénétique
- Pharmacie

Cet ensemble de disciplines constitue un plateau technique de haute technologie au service des patients de l'hôpital Necker-Enfants Malades. Sur l'année 2010, ce pôle a réalisé 2,7 millions d'actes soit 138 millions de B/BHN avec un TPER permanent de 312 membres.

L'ensemble des laboratoires du pôle est engagé dans l'accréditation NF EN ISO 15189, une Cellule Qualité a été constituée en 2009. Les membres de la Cellule Qualité se réunissent toutes les 6 à 8 semaines en suivant un planning et un ordre du jour pré-établis.

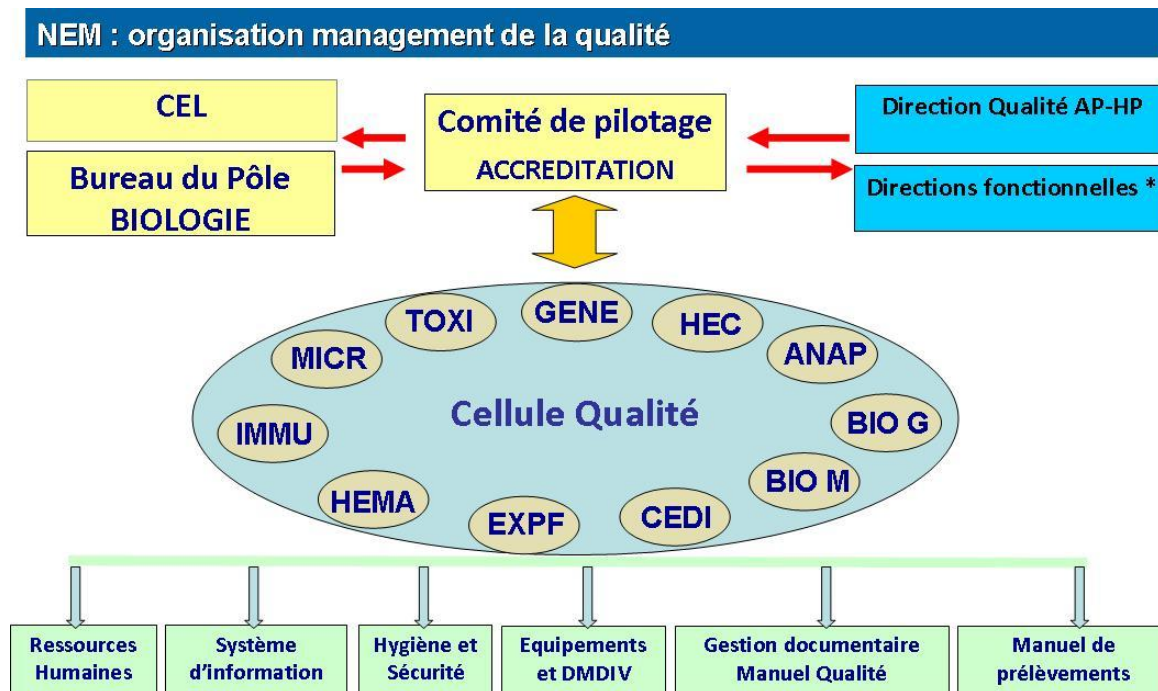


Figure 1. Organisation de la Cellule Qualité du Pôle PBPS.

ANAP : Anatomo-cyto-fœtopathologie ; BIO G : Biochimie Générale ; BIO M : Biochimie Métabolique ; CEDI : Centre d'exploration des déficits immunitaires ; EXPF : Explorations fonctionnelles ; GENE : Génétique ; HEC : Histo-embryologie-cytogénétique ; HEMA : Hématologie ; IMMU : Immunologie ; MICR : Microbiologie ; TOXI : Toxicologie.

La Cellule Qualité missionne des groupes transversaux pour travailler sur les items communs du pôle. Ainsi, sont définis les groupes de travail suivants :

- Système qualité
- Gestion documentaire et Manuel Qualité
- Système d'information
- Hygiène et Sécurité
- Manuel de prélèvement
- Examens délocalisés
- Ressources Humaines
- Instrumentation – métrologie
- Evaluation de la satisfaction des utilisateurs

Les responsables des groupes de travail sont des membres permanents de la Cellule Qualité. Les groupes de travail rendent compte régulièrement de l'avancée des travaux de leur groupe en séance plénière de la Cellule Qualité.

La stratégie de la Cellule Qualité du pôle pour 2016 est la suivante :

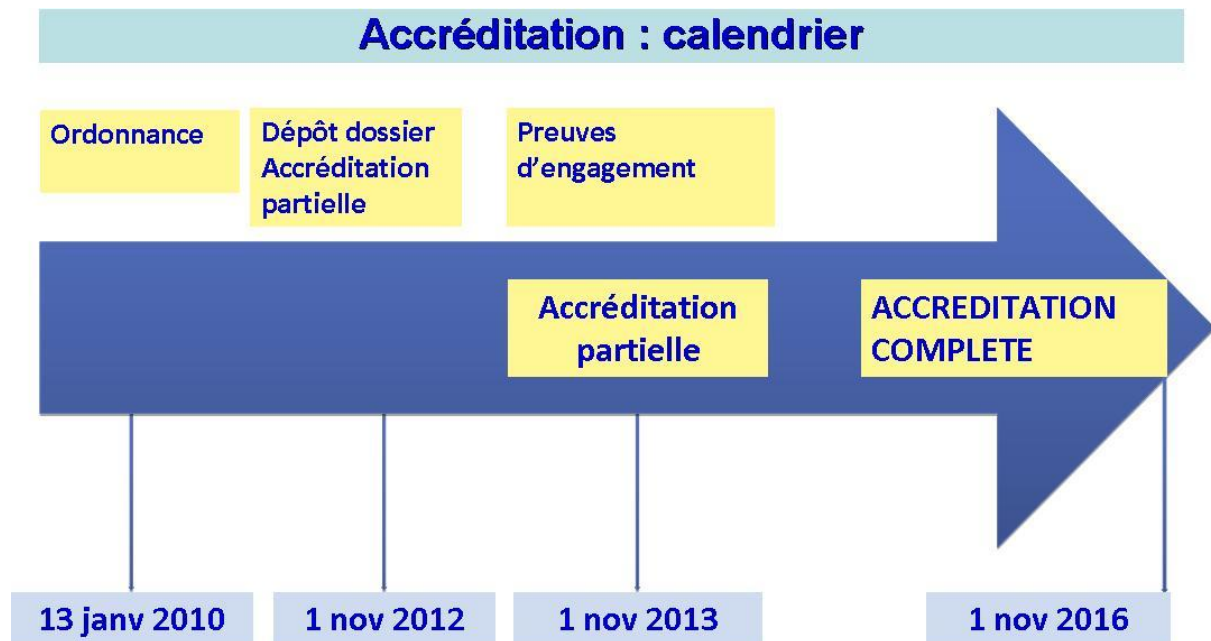


Figure 2. Stratégie de la Cellule Qualité du PBPS pour 2016.

- ✓ Déposer un seul dossier de demande d'accréditation auprès du Comité Français d'Accréditation (COFRAC). Ainsi, le pôle devient un laboratoire et chaque service le constituant (Biochimie, Hématologie, Microbiologie, Cytogénétique) devient un secteur d'activité de ce laboratoire.
- ✓ Pour l'accréditation partielle en 2013, 3 secteurs d'activité sont choisis : 2 secteurs spécialisés (les Explorations Fonctionnelles et la Génétique Médicale) et un secteur dit de Biologie classique (le secteur Biologie Moléculaire du laboratoire de Microbiologie). Au 1^{er} Novembre 2013, le pôle doit obtenir l'accréditation partielle de ces 3 secteurs et sa preuve d'engagement dans la norme NF EN ISO 15189.
- ✓ Jusqu'en 2016, suivra le dépôt des dossiers des autres secteurs du pôle, afin d'obtenir l'accréditation complète du pôle qui deviendra ainsi un laboratoire unique avec autant de sous-secteurs que de disciplines existantes dans ce laboratoire (Biochimie A, Biochimie B, Hématologie, Microbiologie, Cytogénétique, Explorations Fonctionnelles, Immunologie, etc...).

1.4 Laboratoire de Biochimie A

Le laboratoire est ouvert 24h/24. Il assure les examens de biochimie générale parmi lesquels certains sont demandés en urgence (par exemple, gaz du sang, ionogrammes, marqueurs inflammatoires et cardiaques, etc). D'autres examens plus spécialisés y sont pratiqués, tels que :

- les électrophorèses des protéines sériques, urinaires et du Liquide CéphaloRachidien (LCR),
- les dosages de l'hémoglobine glyquée (HbA1c) et de l'hémoglobine S par Chromatographie Liquide Haute Pression (CLHP) ionique,
- les dosages des vitamines liposolubles (A et E) par CLHP inverse couplée à la détection Ultra-Violet (UV), les dosages de la vitamine C hydrosoluble par CLHP couplée à la détection coulométrique,
- les dosages des marqueurs sériques maternels avec la détermination du risque de trisomie 21,
- la lecture au microscope des cristalluries,
- la réalisation des tests de la sueur au lit du malade et dans le cadre du dépistage néonatal de la mucoviscidose.

Le personnel médical et d'encadrement figure sur l'organigramme du laboratoire (Figure 3).

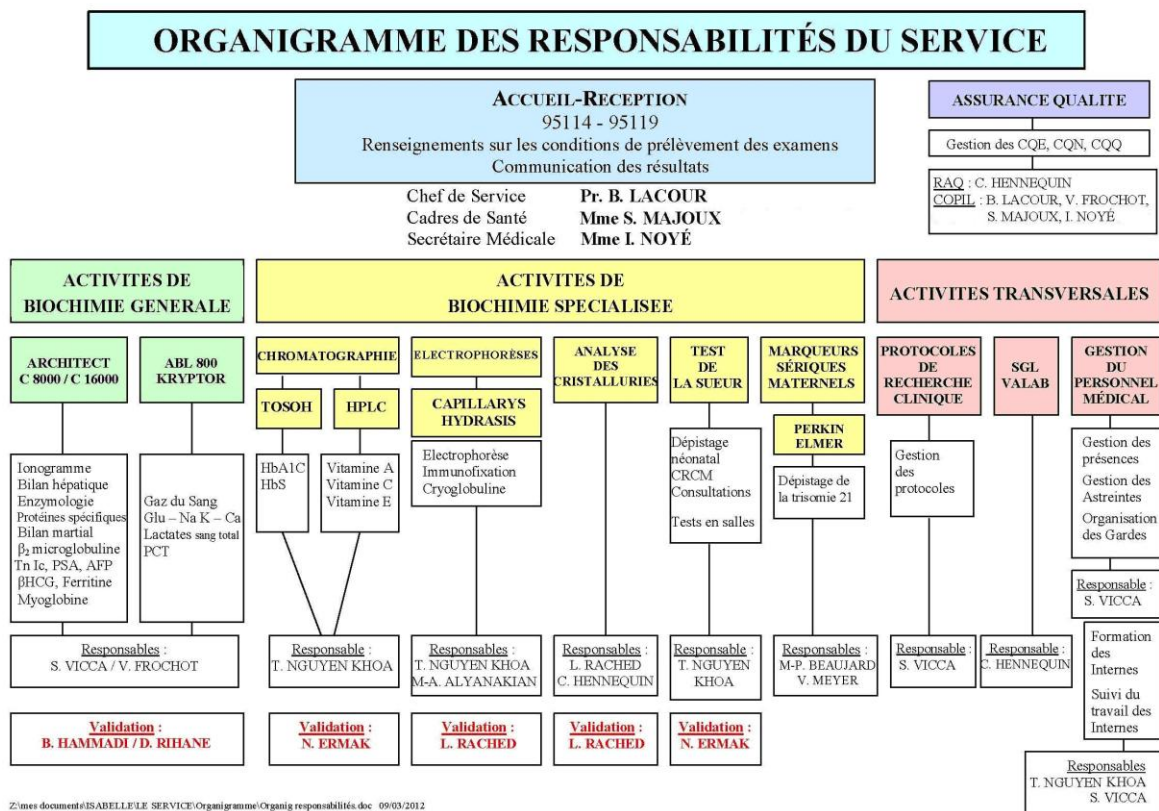


Figure 3. Organigramme des responsabilités du laboratoire de Biochimie A.

Pour assurer une meilleure prise en charge des examens biologiques, le PBPS est en pleine restructuration. En effet, avec la modernisation du GH et bientôt l'ouverture du nouveau bâtiment Laennec « Pôle Mère-Enfant », le Laboratoire de

Réponse Rapide (LRR) se réorganise avec une réception centralisée des examens biologiques et équipée d'un réseau de pneumatiques la reliant avec les Unités de Soins. Cette organisation s'inscrit dans la démarche de l'efficience et de l'amélioration continue de la qualité au service du patient. L'hôpital s'est fixé 4 objectifs majeurs à atteindre sur le court et moyen terme :

- 1 : Améliorer la qualité des prestations pré-analytiques (prise en charge d'une demande, volume de prélèvement pour les analyses demandées, etc...) ;
- 2 : Garantir la pleine maîtrise des processus analytiques ;
- 3 : Développer les compétences du personnel et capitaliser le savoir-faire du laboratoire ;
- 4 : Impliquer davantage le personnel dans la démarche qualité.

2. Exigences d'accréditation

L'ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 institue un régime d'accréditation obligatoire des Laboratoires de Biologie Médicale ². Chaque laboratoire (privé ou public, universitaire ou non) doit prouver son entrée dans la démarche au plus tard le 1^{er} novembre 2016 avec une période intermédiaire au 1^{er} novembre 2013. Cette accréditation concerne l'ensemble des domaines de la biologie, afin de renforcer la qualité et la sécurité des examens.

Le COFRAC est l'unique organisme réalisant cette procédure, sur la base des normes **NF EN ISO 15189 et 22870**. Toutefois, la Haute Autorité de Santé (HAS) joue un rôle essentiel à ses côtés et veille à la cohérence des procédures avec la politique de santé nationale. L'HAS assure notamment l'articulation avec la procédure de certification des établissements de santé.

Les décisions du COFRAC sont transmises à la HAS, à l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS), à l'Agence de Biomédecine (ABM) et à l'Agence Régionale de Santé (ARS), selon une disposition de l'ordonnance.

2.1 Vérification / Validation des méthodes

Dans la norme NF EN ISO 15189, la validation est abordée au niveau des § 5.3 et 5.5 ³.

NF EN ISO 15189 & 22870 § 5.3.2 :

Ce paragraphe indique qu' « Il doit être démontré (lors de l'installation et au cours de l'utilisation courante) que le matériel est capable d'atteindre les performances requises et qu'il est conforme aux spécifications se rapportant aux analyses concernées. La direction du laboratoire doit élaborer un programme de surveillance régulière permettant de démontrer l'adéquation de l'étalonnage et du fonctionnement des instruments, des réactifs, et des systèmes analytiques. Elle doit également instaurer un programme de maintenance préventive documenté et enregistré respectant, au minimum, les recommandations du fabricant. ».

NF EN ISO 15189 § 5.3.4 :

Ce paragraphe indique que le laboratoire doit conserver « les enregistrements de la performance du matériel et la conformité aux spécifications et à l'utilisation ».

NF EN ISO 15189 § 5.5.2 :

« Les méthodes et les procédures sélectionnées doivent être évaluées et donner des résultats satisfaisants avant d'être utilisées pour les analyses médicales. Une revue des procédures par le directeur – Biologiste Médical - du laboratoire ou une personne désignée – Personne du laboratoire sous la responsabilité du Biologiste Médical - doit être réalisée à l'origine à intervalles définis. Ces revues sont généralement effectuées une fois par an. Ces revues doivent être documentées. »

NF EN ISO 15189 § 5.5.3:

« Les performances et l'aptitude à l'emploi prévues de chaque nouvelle version des trousse de réactifs prêts à l'emploi présentant des modifications importantes en termes de réactifs ou de procédure doivent être vérifiées. Tout changement de la procédure doit être daté et faire l'objet d'une autorisation comme pour les autres procédures ».

D'autre part, le COFRAC considère que, conformément au document SH REF 08 ⁴ :

- les méthodes reconnues (DM-DIV marqués CE ou méthodes «fournisseur») sont a priori validées dans leur domaine d'application. Dans le cadre des normes NF EN ISO 15189 & 22870, le LBM doit pour ses méthodes, vérifier qu'elles sont utilisées dans leur domaine d'application, qu'elles correspondent aux besoins de ses clients

(patients/prescripteurs) et qu'elles sont maîtrisées au sein du laboratoire («vérification de méthodes – portée A»);

- en revanche, le LBM doit caractériser les critères de qualité de la méthode et la valider («validation de méthode-portée B») dès lors qu'il ne s'agit pas d'une méthode reconnue ou que celle-ci est employée hors de son domaine d'application (modification de la prise d'essai ou de la matrice/milieu biologique, etc ...).

2.2 Procédure de validation d'une méthode d'analyse quantitative

La vérification/validation d'une méthode comprend une phase initiale, avant sa mise en œuvre effective en routine, et une phase de vérification continue et de confirmation des performances, dans le cadre du fonctionnement normal et quotidien du laboratoire ⁵.

Cette vérification comprend 3 étapes :

- 1) l'étude de documents bibliographiques ;
- 2) la détermination des critères de performance pertinents à établir et le choix des limites d'acceptabilité correspondantes pour la méthode ;
- 3) la réalisation des vérifications expérimentales selon la procédure établie par le LBM.

Il est fondamental de souligner que : « *Le choix des critères de performances (fidélité, justesse, linéarité) et limites d'acceptabilité (seuils) pour une méthode donnée doit se faire PREALABLEMENT à l'étude expérimentale. Il doit refléter l'état de l'art et la pertinence clinique. Il peut s'appuyer sur des recommandations de sociétés savantes, de groupes de travail de conférences de consensus, de publications scientifiques, sur des valeurs limites utilisées pour la gestion des Contrôles Internes de Qualité (CIQ), sur des résultats de campagnes de comparaisons inter-laboratoires, et sera confronté aux données du fournisseur. Ce choix est du ressort du biologiste médical, mais il appliquera les recommandations fournies par l'HAS et les consensus internationaux.* »

DEMARCHE ET BUT DE CE TRAVAIL

Dans le laboratoire de Biochimie A, le dosage plasmatique simultané des vitamines A et E est réalisé par CLHP couplée à la détection UV.

Le dosage des vitamines A et E est régulièrement prescrit par les services de dermatologie, de gastro-entérologie et de pédiatrie générale et en particulier pour le suivi nutritionnel des enfants traités par nutrition entérale ou parentérale.

Au cours de l'année 2011, 923 analyses de vitamines ont été réalisées au laboratoire. Une augmentation d'activité de l'ordre de 10% a été relevée pour le premier semestre 2012.

Un injecteur automatique a récemment été mis en place sur le système CLHP, ce qui a modifié l'organisation du travail du technicien au laboratoire. Pour optimiser le temps technicien, un changement de colonne de séparation est proposé.

Ce mémoire présente le protocole expérimental et les méthodes statistiques utilisés pour valider la nouvelle méthode de dosage des vitamines A et E.

MATERIELS ET METHODES

1. Mesurandes : Vitamines A et E

- *Biopathologie*

Pour les vitamines A et E les valeurs usuelles chez l'adulte sont de 0,42 à 0,68 mg/l et de 6,6 à 12,9 mg/l respectivement ^{6,7}. Les concentrations plasmatiques des vitamines A et E augmentent de la naissance à l'âge adulte, elles sont plus basses chez le prématuré par rapport au nouveau-né à terme en raison de l'immaturation hépatique.

Chez le sujet âgé sans pathologie associée et sans dénutrition, les valeurs usuelles sont identiques à celles de l'adulte.

- *Echantillon*

Sang veineux recueilli sur anticoagulant (héparinate de sodium, lithium ou ammonium).

- *Particularités*

Les vitamines A et E sont sensibles à la lumière. Les échantillons doivent rapidement parvenir au laboratoire enveloppés dans une feuille du papier d'aluminium). Les analytes sont stables pendant 8 heures à température ambiante et un mois à -20°C. Il est nécessaire de centrifuger rapidement les échantillons, de fractionner le plasma et de le conserver immédiatement à -20°C.

2. Méthode d'analyse

Le dosage simultané des vitamines A et E est effectué par CLHP en phase inverse recommandée par la Société Française de Biologie Clinique (SFBC). La détection est réalisée par mesure de l'absorbance à 325 nm pour la vitamine A et à 292 nm pour la vitamine E ⁶.

2.1 Préparation des spécimens

Après déprotéinisation par l'éthanol (170 µl) de 200 µl de plasma additionné de 30 µl d'étalon interne (acétate de tocophérol à 2,5 g/l), les vitamines A et E sont extraites par 500 µl d'hexane (1 minute au vortex). La phase organique est ensuite

évaporée à l'aide d'un Speed Vac pendant une heure et à l'abri de la lumière. L'extrait sec est repris par 100 µl de l'éthanol.

La description détaillée des différentes opérations nécessaires pour le dosage est décrite dans la fiche technique jointe en annexe I.

2.2. Appareillage

Le système CLHP comprend :

- une pompe P680 Dionex (Dionex SA, Voisins Le Bretonneux, France) délivrant la phase mobile à un débit de 2 ml/min,
- un injecteur automatique thermostaté Autosampler 717 Waters (Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France),
- une colonne de séparation,
- un détecteur UV 170U Dionex,
- et un logiciel de traitement du signal Chroméléon™ version 6.80 (Dionex).

La méthode d'origine utilise une colonne de silice greffée C18 Satisfaction RP18AB (4,6 x 250 mm, granulométrie 5 µm, Cluzeaux CIL, Puteaux, France). La colonne à tester est une colonne de silice greffée C18 Kinetex (4,6 x 75 mm, granulométrie 2,6 µm, Phenomenex, Le Pecq, France).

- Les avantages de la colonne Kinetex®

La société Phenomenex a développé des particules Core-Shell à noyau solide de gel de silice non poreux entouré d'une couche de gel de silice poreux, améliorant le transfert de masse⁸ (Figure 4).

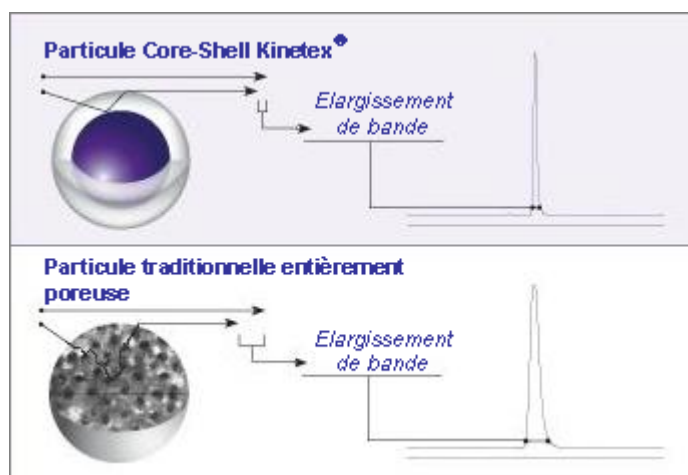


Figure 4. Performance de particules Core-Shell.

La colonne Kinetex 2,6 µm présente alors l'efficacité d'une colonne traditionnelle inférieure à 2 µm avec une contre-pression inférieure à 400 bars compatible avec les systèmes CLHP traditionnels. La réduction du parcours des mesurandes dans les particules Core Shell améliore leurs temps de rétention. De ce fait la réduction du temps d'analyse contribue à la diminution de la consommation de solvant organique dont l'élimination couteuse doit passer par une société extérieure de traitement déchets. Dans notre utilisation, la bonne résolution permet de réduire la prise d'essai de moitié.

2.3 Protocole expérimental

Nous avons analysé les différents paramètres nécessaires à la validation d'une méthode quantitative de portée B.

2.3.1 Fidélité

- *Répétabilité*

L'essai de répétabilité consiste à analyser un même échantillon dans les conditions suivantes : même opérateur, mêmes réactifs, même instrument, même étalonnage dans un délai le plus court possible. L'objectif est de caractériser la meilleure performance possible, dans des conditions optimales et de vérifier le bon fonctionnement du système (instrument/réactif) pour le paramètre concerné ⁵.

Quatre niveaux de concentration de la gamme d'étalonnage ont été analysés. Le nombre d'essais est de 20 pour chaque niveau.

L'exploitation des résultats consiste à calculer la moyenne (m), l'écart-type (ET) et le coefficient de variation (CV) des valeurs expérimentales de chaque série.

$$\text{CV (\%)} = [(\text{ET}) / m] \times 100$$

Le CV calculé permet une évaluation de la répétabilité de la méthode exprimée en %. Lors de la vérification, le CV calculé est comparé au CV limite admissible, préalablement déterminé.

- *Fidélité intermédiaire*

L'essai de fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire) consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs : l'opérateur, le temps, le lot de réactifs, l'étalonnage ⁵.

La fidélité intermédiaire a été évaluée à l'aide des CV calculés à partir des résultats de la gamme d'étalonnage. L'essai est réalisé sur 15 jours avec 15 déterminations et à 4 niveaux de concentration. Les modalités de calcul de la moyenne, de l'écart-type et du CV sont identiques à celles de la répétabilité sur les valeurs expérimentales de chaque série ; le CV calculé est comparé au CV limite admissible de fidélité intermédiaire choisi au préalable.

2.3.2 Inexactitude

Une étude de justesse nécessite la comparaison de la moyenne de plusieurs dosages d'un même échantillon à une valeur cible. L'écart observé correspond au biais. Le biais ne peut être établi qu'à l'aide de l'externalisation des CIQ. En absence d'externalisation des CIQ, le laboratoire établit l'inexactitude de sa méthode en comparant les valeurs obtenues sur des échantillons d'EEQ (Evaluation Externe de la Qualité) aux valeurs cibles ⁵.

Notre laboratoire participe au contrôle de qualité externe de la Société Francophone Vitamines & Biofacteurs (SFVB). L'inexactitude est obtenue à partir des résultats des EEQ. La valeur cible retenue est la moyenne des résultats obtenus avec la même méthode (groupe de pairs).

$$\text{Inexactitude (\%)} = \frac{(x - v)}{v} \times 100$$

x : valeur trouvée pour l'EEQ

v : valeur cible

L'évaluation de l'inexactitude est d'autant plus pertinente que le nombre d'échantillons d'EEQ est élevé.

2.3.3 Domaine de linéarité

- *Limite de détection*

Il s'agit de la quantité minimale détectable pour laquelle la réponse (en signal mesuré) peut être distinguée avec une probabilité donnée d'un blanc de réaction. En chromatographie, la limite de détection peut être déterminée comme étant égale au triple de l'écart-type obtenu à partir du signal correspondant à la ligne de base mesurée 10 fois ⁵.

Pour l'estimer, nous avons effectués 10 mesures répétées des blancs (diluant) dans une même série, et nous avons calculés la moyenne obtenue (m_b) et l'écart-type (ET) exprimé en concentration de ces 10 mesures.

La limite de détection est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Limite de détection} = 3 \times \text{ET}$$

- *Limites de linéarité*

L'évaluation des limites de linéarité permet de déterminer l'intervalle de concentrations à l'intérieur duquel les mesures peuvent être effectuées avec fidélité et justesse⁹. Au-delà de la limite supérieure, une dilution de l'échantillon dans un solvant approprié doit être pratiquée. La limite de quantification est la plus petite quantité à examiner dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une fidélité et une justesse définies. Elle correspond généralement à la limite inférieure de linéarité de la méthode⁹.

La limite de linéarité a été évaluée à l'aide de dilutions d'un étalon de concentration très élevée. Les dilutions au nombre de 11 (cf. annexe IV) sont réparties sur l'ensemble du domaine de mesure à explorer. Chaque dilution a été analysée 10 fois.

2.3.4 Comparaison avec méthode déjà utilisé au laboratoire

Colonne	Phase mobile (v/v)
<u>utilisée</u> : Satisfaction 4,6 x 250 mm, granulométrie 5 µm	Méthanol (100)
<u>à tester</u> : Kinetex 4,6 x 75 mm, granulométrie 2,6 µm	Méthanol / Eau (97:3)

La comparaison de deux méthodes permet d'estimer la comparabilité des résultats obtenus par ces méthodes et de définir s'il existe un biais entre elles⁹.

Pour comparer les résultats de la méthode utilisant la colonne Kinetex (à tester) avec de la méthode utilisant la colonne Satisfaction (utilisée au laboratoire), nous avons analysé 82 échantillons de patients couvrant de façon homogène l'étendue du domaine physiopathologique. Les échantillons sont analysés en simple par les deux techniques dans un délai de 24h.

La comparaison des résultats obtenus sur les deux colonnes, a été effectuée selon la méthode de Bland et Altman (logiciel Method Validator).

RESULTATS

1. Conditions opératoires pour la colonne Kinetex

Dans un premier temps, nous avons optimisé les conditions opératoires pour obtenir une séparation satisfaisante des vitamines A et E sur la colonne Kinetex. La composition de la phase mobile (méthanol/eau) a été testée (cf. annexe II).

La figure 5 montre l'influence de la composition de la phase mobile sur le temps de rétention (t_r) des composés.

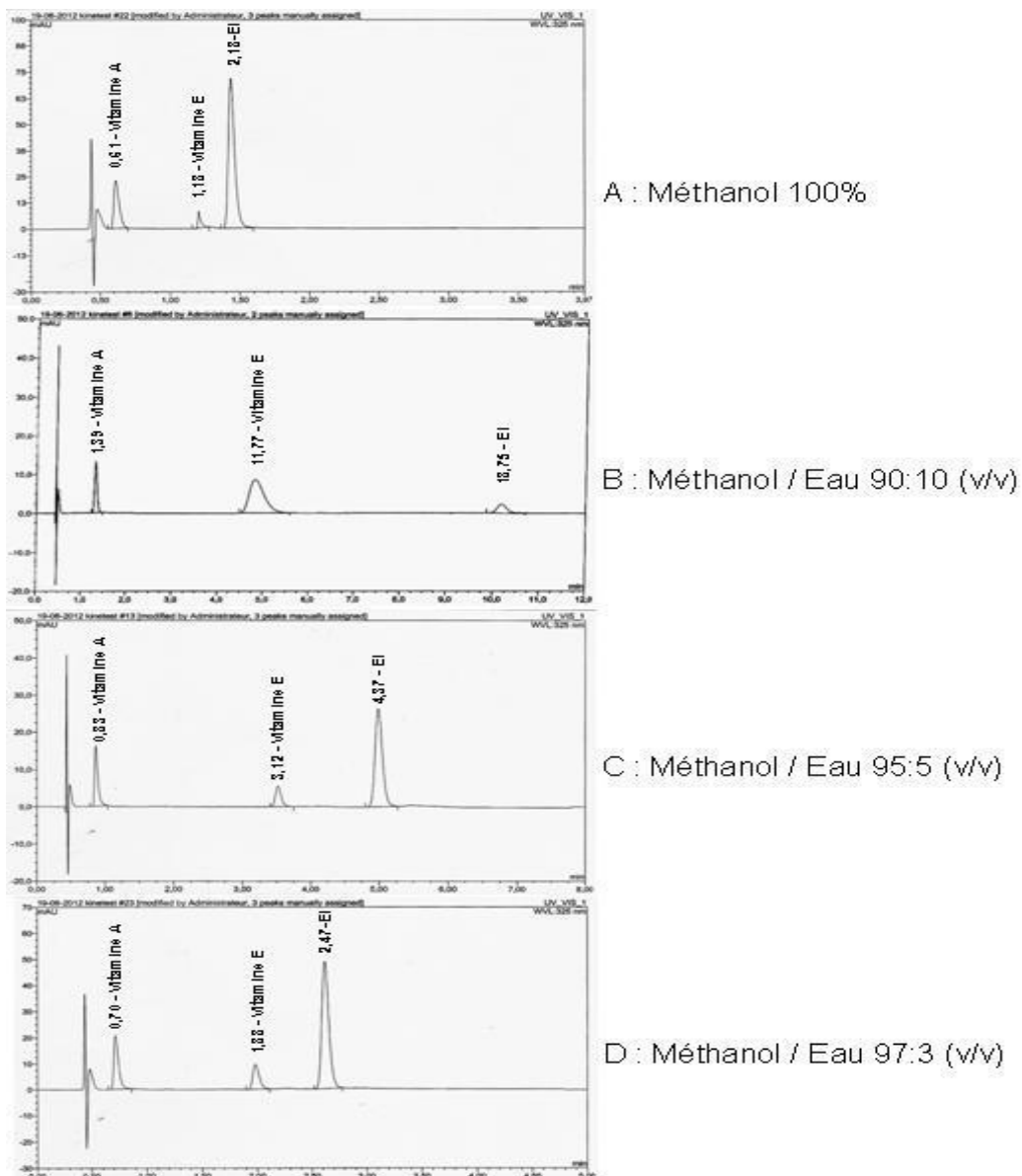
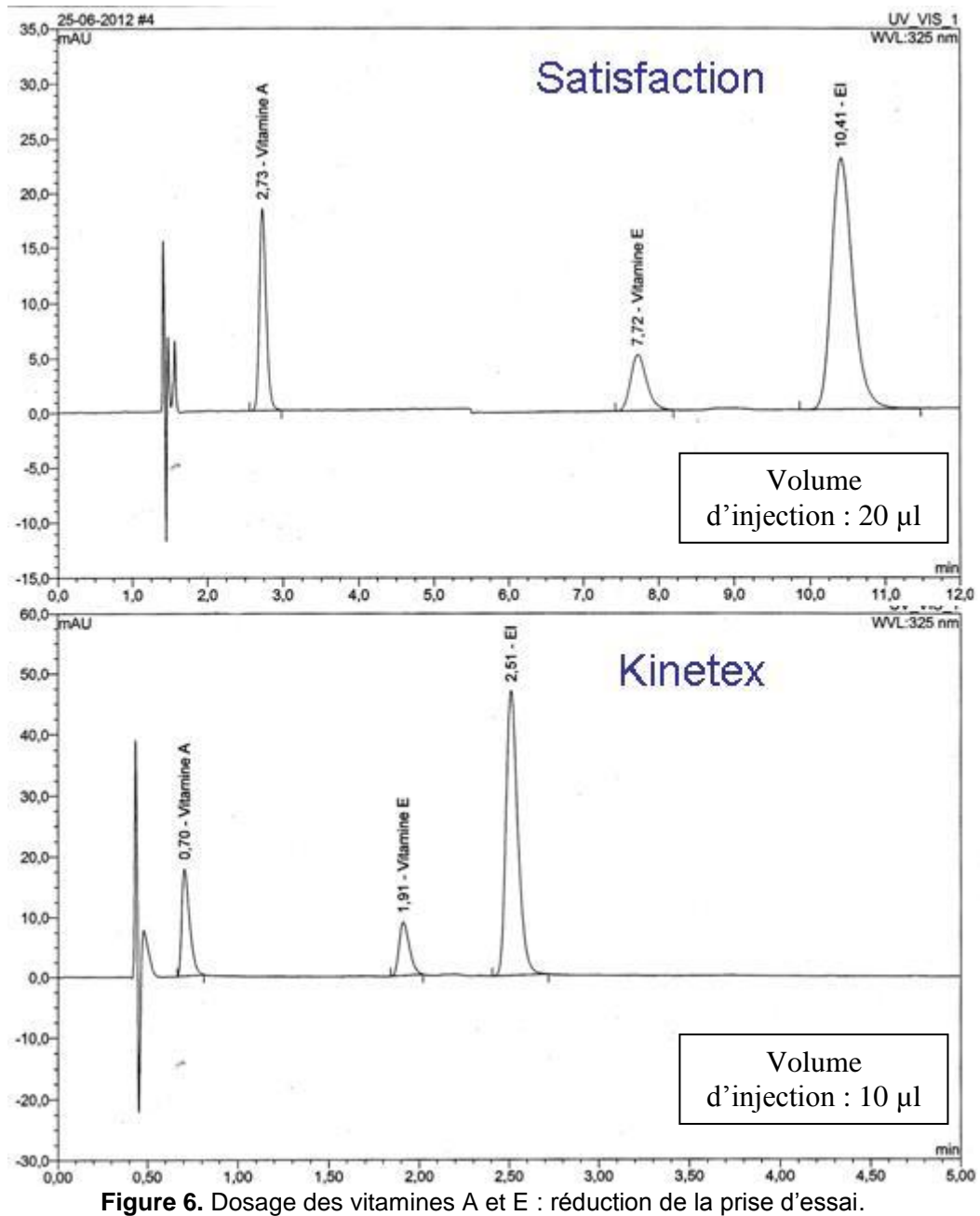


Figure 5. Influence de la composition de la phase mobile sur la séparation des composés.

Nous avons choisi la phase mobile de composition méthanol/eau 97:3 (v/v) (D, figure 5). Avec cette phase, nous avons minimisé le temps de l'analyse, fixé par

le temps du dernier composé élué, tout en préservant une bonne résolution. Le délai d'analyse est passé de 12 min à 3,5 min (Figure 6).



La bonne résolution nous a également permis de réduire la prise d'essai de 20 µl à 10 µl (Figure 6).

2. Evaluation de la fidélité

✓ *Répétabilité*

Nous avons utilisé 4 niveaux de concentration de la gamme d'étalonnage. Ces niveaux sont choisis en fonction des valeurs physiopathologiques. Le nombre de d'essais est de 20 pour chaque niveau (Tableau 1).

Tableau 1. Dosage plasmatique des vitamines A et E : évaluation de la répétabilité.

Vitamine A						
Echantillon	Nombre (n)	Moyenne (m) mg/l	Ecart type (ET) mg/l	CV %	Limites acceptable (CV%)	Conclusion
Niveau 1	20	0,14	0,01	3,91	< 10	Validé
Niveau 2	20	0,29	0,01	3,67	< 10	Validé
Niveau 3	20	0,6	0,03	4,57	< 10	Validé
Niveau 4	20	1,25	0,04	3,02	< 10	Validé
Vitamine E						
Echantillon	Nombre (n)	Moyenne (m), mg/l	Ecart type (ET), mg/l	CV %	Limites acceptable (CV%)	Conclusion
Niveau 1	20	2,6	0,09	3,46	< 10	Validé
Niveau 2	20	4,98	0,2	3,98	< 10	Validé
Niveau 3	20	10,27	0,27	2,6	< 10	Validé
Niveau 4	20	20,68	0,21	1,0	< 10	Validé

Toutes les valeurs des CV sont inférieures à 5 %. La valeur admise dans notre protocole est de 10 %. L'étude statistique des données est fournie en annexe III.

✓ *Reproductibilité*

La reproductibilité a été évaluée à l'aide des CV calculés à partir des résultats de la gamme d'étalonnage. L'essai est réalisé sur 15 jours avec 15 déterminations et à 4 niveaux (Tableau 2).

Tableau 2. Dosage plasmatique des vitamines A et E : évaluation de la reproductibilité.

Vitamine A						
Echantillon	Nombre (n)	Moyenne (m) mg/l	Ecart type (ET) mg/l	CV %	Limites acceptable (CV%)	Conclusion
Niveau 1	15	0,14	0,01	4,63	< 10	Validé
Niveau 2	15	0,29	0,01	4,14	< 10	Validé
Niveau 3	15	0,60	0,01	1,75	< 10	Validé
Niveau 4	15	1,22	0,02	1,53	< 10	Validé
Vitamine E						
Echantillon	Nombre (n)	Moyenne (m) mg/l	Ecart type (ET) mg/l	CV %	Limites acceptable (CV%)	Conclusion
Niveau 1	15	2,57	0,12	4,70	< 10	Validé
Niveau 2	15	5,25	0,22	4,22	< 10	Validé
Niveau 3	15	10,65	0,33	3,10	< 10	Validé
Niveau 4	15	21,40	0,51	2,41	< 10	Validé

Toutes les valeurs des coefficients de variation sont inférieures à 5 %. La valeur admise dans notre protocole est de 10 %. L'étude statistique des données est fournie en annexe IV.

3. Evaluation de l'inexactitude

Notre laboratoire participe au contrôle de qualité externe SFVB. Pour établir l'inexactitude de la méthode utilisant la colonne Kinetex, nous avons comparé les valeurs obtenues sur des échantillons d'EEQ aux valeurs cibles. La valeur cible retenue est la moyenne des résultats obtenus avec la même méthode (groupe de pairs) (Tableau 3).

Tableau 3. Dosage plasmatique des vitamines A et E : évaluation de l'inexactitude

Vitamine A								
Echantillon	N° SFVB	Valeurs observées (colonne Kinetex)		Valeur cible, $\mu\text{mol/l}$	Biais, $\mu\text{mol/l}$	Biais, (%)	Limites acceptable (Biais), %	Conclusion
		mg/l	$\mu\text{mol/l}$					
1	121	0,53	1,85	1,94	-0,09	-4,64	<10	Validé
2	122	1,027	3,58	3,9	-0,32	-8,21	<10	Validé
3	123	0,363	1,28	1,38	-0,1	-7,25	<10	Validé
4	126	0,39	1,36	1,47	-0,11	-7,48	<10	Validé
5	127	0,75	2,76	2,69	0,07	2,60	<10	Validé

Vitamine E								
Echantillon	N° SFVB	Valeurs observées (colonne Kinetex)		Valeur cible, $\mu\text{mol/l}$	Biais, $\mu\text{mol/l}$	Biais, (%)	Limites acceptable (Biais), %	Conclusion
		mg/l	$\mu\text{mol/l}$					
1	121	11,38	27,31	26,6	0,71	2,67	<10	Validé
2	122	20,949	50,28	47,5	2,78	5,85	<10	Validé
3	123	7,797	18,71	18	0,71	3,94	<10	Validé
4	126	8,03	19,27	18,4	0,87	4,73	<10	Validé
5	127	14,71	35,3	35,8	-0,5	-1,40	<10	Validé

Lors de notre analyse, les biais obtenus sont inférieurs à 10 %.

4. Evaluation du domaine de linéarité

✓ Limite de détection

Pour estimer la limite de détection, nous avons effectués 10 mesures répétées des blancs (diluant) dans une même série, et nous avons calculé la moyenne obtenue (m_b) et l'écart-type (ET) exprimé en concentration de ces 10 mesures (cf. annexe VI).

La limite de détection est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Limite de détection} = 3 \times \text{ET}$$

Tableau 4. Dosage des vitamines A et E : Limite de détection

Vitamine A (mg/l)	LD = 0,002
Vitamine E (mg/l)	LD = 0,137

Pour la vitamine A la limite de détection est de 0,002 mg/l et pour la vitamine E est de 0,137 mg/l.

✓ *Limites de linéarité*

La limite de linéarité a été évaluée à l'aide de dilutions d'un étalon de concentration très élevée. Les dilutions au nombre de 11 (cf. annexe VII) sont réparties sur l'ensemble du domaine de mesure à explorer. Chaque dilution a été analysé 10 fois (Figure 7).

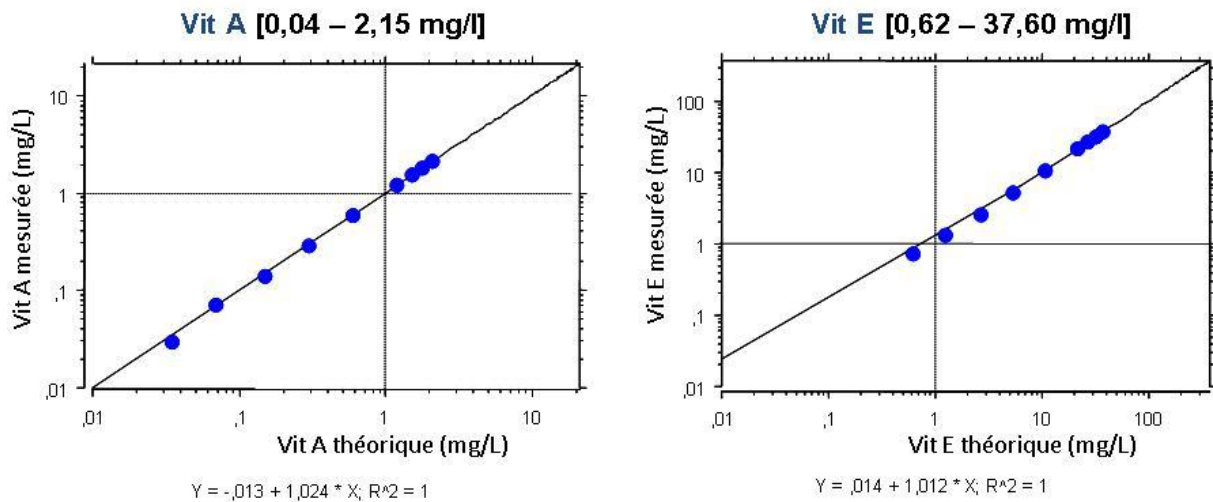


Figure 7. Dosage plasmatique des vitamines A et E : Domaine de linéarité

Une réponse linéaire a été observée entre 0,04 et 2,15 mg/l pour le dosage de la vitamine A et entre 0,62 et 37,60 mg/l pour le dosage de la vitamine E.

5. Comparaison avec méthode déjà utilisé au laboratoire

La comparaison a été effectuée à partir de 82 échantillons de patients couvrant de façon homogène l'étendue du domaine physiopathologique rencontré (cf. annexe VIII).

Pour la vitamine A les valeurs usuelles sont de 0,42 à 0,68 mg/l. Nous avons observé une excellente corrélation entre deux méthodes (régression de Passing &

Bablok), une bonne cohérence entre les deux dosages avec une pente à 1,000 et une interception à l'origine à 0,000 (Figure 8). Le diagramme des différences montre une différence moyenne de 0,00134. Il met en évidence 6 couples de résultats « déviants » pour lesquels le pourcentage d'écart est supérieur à 10 %.

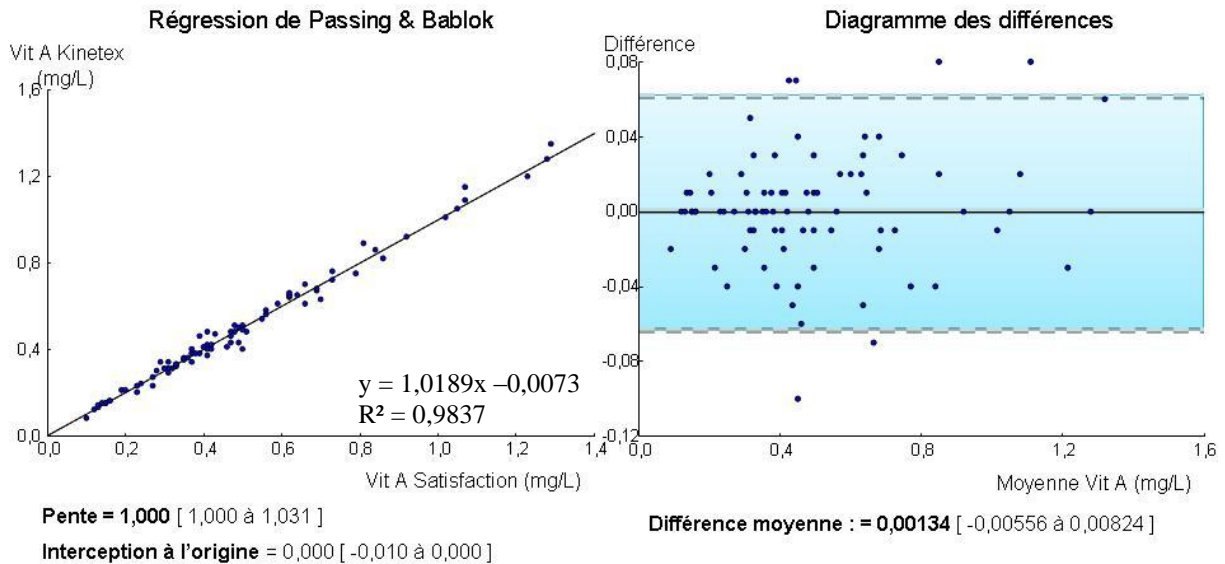


Figure 8. Dosage de vitamine A : Comparaison de deux techniques (Kinetex versus Satisfaction).

Pour la vitamine E les valeurs usuelles sont de 6,6 à 12,9 mg/l. Nous avons observé une bonne cohérence entre les deux dosages avec une pente à 0,993 et une interception à l'origine à 0,0686 (Figure 9). Au niveau de diagramme de différence nous avons observé 4 couples de résultats déviants avec le pourcentage d'écart supérieur à 10 %.

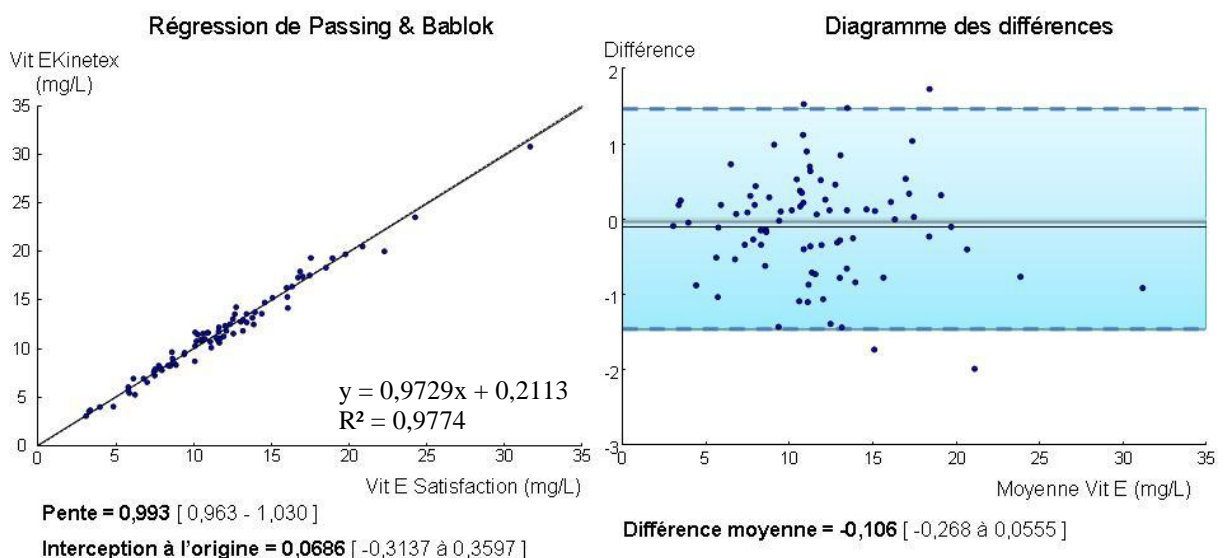


Figure 9. Dosage de vitamine E : Comparaison de deux techniques (Kinetex versus Satisfaction).

DISCUSSION

Nos résultats montrent que la méthode de dosage plasmatique des vitamines A et E par CLHP couplée à la détection Ultra-Violet utilisant la nouvelle colonne Kinetex est parfaitement adaptée aux objectifs fixés.

Avec le choix de la composition de la phase mobile méthanol/eau 97/3 (v/v), délivrée à un débit de 2 ml/min, le temps de rétention de la vitamine A est de 0,7 min, celle de la vitamine E est de 1,91 min. L'efficacité de la séparation a montré un nombre de plateaux théoriques de 1761 pour la vitamine A et de 6511 pour la vitamine E. Le délai d'analyse est passé de 12 min à 3,5 min tout en préservant une bonne résolution. Le gain de temps considérable rend maintenant l'étape analytiques réalisable sur une journée au lieu de deux précédemment. La bonne résolution nous a également permis de réduire la prise d'essai de 20 µl à 10 µl.

Après l'optimisation des conditions opératoires, les critères analytiques ont été déterminés.

✓ *Fidélité de la méthode*

Les CV de la répétabilité et de la reproductibilité sont inférieurs à 5%, signe de robustesse de la méthode. Pour minimiser la durée et le coût des tests de reproductibilité, nous avons utilisé la gamme d'étalonnage avec 15 déterminations et à 4 niveaux de concentration. Cependant, il paraît judicieux de réaliser une reproductibilité sur des CIQ journaliers après mise en place en routine de cette méthode de dosage. Selon le guide technique SH GTA 04, la fidélité intermédiaire peut être établie sur au moins 15 jours avec 30 déterminations et à deux niveaux de CIQ minimum.

✓ *L'inexactitude*

A défaut de CIQ externalisés nous avons déterminé l'approche de la justesse par le calcul de l'inexactitude en utilisant les valeurs obtenues sur des échantillons d'EEQ. La méthode de dosage des vitamines A et E utilisant la colonne Kinetex présente une exactitude satisfaisante, les biais obtenus sont inférieurs à 10 %. Compte tenu du coût d'externalisation des CIQ, nous allons continuer évaluer l'exactitude, après mise en place en routine de cette méthode, en comparant les

résultats réels à des valeurs cibles et à des limites acceptables définies par les organisateurs de programme d'EEQ, SFVB.

✓ *Domaine de mesure*

L'évaluation du domaine de mesure a été effectuée selon les recommandations présentées dans le guide technique SH GTA 04. L'étude graphique nous a permis de définir l'intervalle du domaine de mesure où la linéarité est respectée. Une réponse linéaire a été observée entre 0,04 et 2,15 mg/l pour le dosage de la vitamine A et entre 0,62 et 37,60 mg/l pour le dosage de la vitamine E. Cette étude nous a permis également de vérifier la linéarité entre les dilutions effectuées et les concentrations calculées, s'assurer de l'adéquation des pipettes utilisées.

✓ *Comparaison de deux méthodes*

La comparaison des deux méthodes par la représentation graphique de Bland & Altman nous a permis d'estimer les relatives différences entre les deux méthodes en fonction des moyennes des concentrations mesurées par chaque méthode. Cela nous a permis de définir le biais entre les deux techniques, son écart type et son intervalle de confiance 95 %. Nous avons observé une bonne corrélation entre les deux méthodes. Ces résultats permettent de confirmer les performances de la nouvelle colonne Kinetex.

L'ensemble des actions prévues lors de la planification du protocole expérimental de validation de la méthode a été mené à terme avec la participation de l'ensemble du personnel du secteur «CLHP – dosage des vitamines A, E et C». Les résultats ont été présentés par le responsable du secteur, le Docteur Thao Nguyen Khoa lors d'une réunion de laboratoire. La méthode est actuellement mise en place pour le dosage plasmatique des vitamines A et E.

CONCLUSION

La méthode de dosage des vitamines A et E par CLHP utilisant la colonne Kinetex présente :

- une bonne répétabilité (CV < 5 %) ;
- une bonne reproductibilité (CV < 5 %) ;
- une exactitude satisfaisante (Biais < 10 %) ;
- une limite de détection de 0,002 mg/l pour la vitamine A et de 0,137 mg/l pour la vitamine E ;
- une linéarité satisfaisante entre 0,04 et 2,15 mg/l pour le dosage de la vitamine A et entre 0,62 et 37,60 mg/l pour le dosage de la vitamine E.

Ces caractéristiques ont démontré la performance de la méthode et ainsi constituent la structure d'un dossier de validation de la méthode dans le cadre de la mise en œuvre de la démarche qualité dans le laboratoire selon la norme NF EN ISO 15189.

De plus, le remplacement de la colonne Satisfaction par la colonne Kinetex va apporter de nombreux avantages :

- i) la réduction de la prise d'essai de 20 µl à 10 µl tout en conservant les qualités analytiques;
- ii) une réduction du temps d'analyse de 12 min à 3,5 min par échantillon rendant réalisable l'étape analytique sur une journée au lieu de deux précédemment;
- iii) une réduction de la consommation de solvant organique dont l'élimination est coûteuse apportant un intérêt financier pour le laboratoire.

Sur le plan personnel, le diplôme universitaire « Assurance qualité au laboratoire de biologie médicale » a été riche tant sur le point des connaissances que sur l'aspect humain. Cette formation m'a permis d'acquérir les principes de l'Assurance Qualité et de s'approprier les méthodologies. Elle m'a permis également de me rendre compte de l'importance de la communication au sein du laboratoire pour que l'ensemble du personnel se sente impliqué dans la démarche qualité. Cette

formation m'a permis également d'acquérir une vision transversale du Pôle Biologie et Produits de Santé et laboratoire de Biochimie Générale en particulier.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. <http://hopital-necker.aphp.fr/>, L'hôpital universitaire Necker - Enfants Malades, 06/07/2012.
2. Ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale. Journal Officiel de la République Française(JORF), [s.l.], 15 janvier 2010, NOR SASX0927179R.
3. NF EN ISO 15189. Laboratoires de biologie médicale : exigences concernant la qualité et la compétence. AFNOR, [s.l.], août 2007.
4. SH REF 08-REV.01.Expression et évaluation des portées d'accréditation. COFRAC Section santé humaine, [s.l.], avril 2012.
5. SH GTA 04-REV.00.Guide technique d'accréditation de vérification (portée A)/validation (portée B) des méthodes en biologie médicale. COFRAC Section santé humaine, [s.l.], avril 2011.
6. Le Moel G, Dauvergne A, Guiland J-C, « Vitamine A », Cahier de formation de Biologie médicale, 2007, 38, Bioforma, 14-28.
7. Léger C-I, Carbonneau M-A, Fouret G, « Vitamine E », Cahier de formation de Biologie médicale, 2007, 38, Bioforma, 49-63.
8. <http://www.chemeuropa.com>, Les colonnes Kinetex® proposent les bénéfices de l'UHPLC sur n'importe quel système LC, Phenomenex Ltd., [s.d].
9. Vassault A, Hulin A, Chapuzet E, Arnaud J, Giroud C, et les membres du sous-groupes 2 analytique de la SFBC « Vérification / validation des performances d'une méthode d'analyse », Annales de Biologie Clinique, Décembre 2010, Volume 68, Hors série n°1, John Libbey Eurotext, 247-294.
10. Vassault A, Grafmeyer D, De Graeve J, Cohen R, Beaudonnet A, Bienvenu J. « Analyses de biologie médicale : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation de techniques ». Annales de Biologie Clinique, 1999, 57, John Libbey Eurotext, 685-695.

11.Vassault A. Procédure de validation d'une technique *SPECTRA BIOLOGIE*,
vol.16, n°90, Novembre 1997, [s.l.], 43-50.

LISTE DES ANNEXES

Annexe I Fiche technique.....	34
Annexe II Influence de la composition de la phase mobile Méthanol/eau sur le temps de rétention des analytes.....	40
Annexe III Evaluation de la répétabilité.....	41
Annexe IV Evaluation de la reproductibilité.....	42
Annexe V Evaluation de l'inexactitude.....	43
Annexe VI Evaluation de limite de détection.....	44
Annexe VII Evaluation des limites de linéarité	45
Annexe VIII Etude de la corrélation	46

Annexe I

Fiche technique

Laboratoire de Biochimie A

juin 2011

VITAMINES A et E

I. INTERÊT PHYSIOPATHOLOGIQUE

La vitamine A (rétinol) et la vitamine E (α -tocophérol) sont deux vitamines liposolubles.

Les tocophérols suivent les mêmes étapes de digestion et d'absorption que les triglycérides alimentaires et sont transportés jusqu'au foie en suivant le métabolisme des chylomicrons. Ils sont sécrétés par les hépatocytes, incorporés aux VLDL, et suivent le métabolisme de ces lipoprotéines dans le compartiment vasculaire. Le transfert tissulaire des tocophérols pourrait faire intervenir le catabolisme des lipoprotéines par la Lipoprotéine Lipase (transfert en même temps que les acides gras), mais également l'internalisation ou le transfert direct à partir des LDL et HDL.

Les tocophérols interviennent au niveau des membranes cellulaires et des LDL par leurs effets anti-oxydants lipophiles permettant de piéger les radicaux libres mais aussi l'oxygène moléculaire singulet. Ceci explique le rôle protecteur joué par la vitamine E dans tous les phénomènes pathologiques impliquant les radicaux libres (athérosclérose, cancérogénèse...).

La vitamine A, d'origine alimentaire, est stockée au niveau hépatique. Elle est transportée dans le plasma sous la forme d'un complexe trimoléculaire avec sa protéine vectrice, la RBP (retinol binding protein) et la transthyréline. Cette molécule possède des propriétés anti-oxydantes, beaucoup moins puissantes toutefois que celles de la vitamine E. En revanche, elle joue un rôle fondamental dans les processus de la vision et de la prolifération cellulaire. Sa carence se traduit par des anomalies de la vision crépusculaire (héméralopie).

Les hypovitaminoses A et E peuvent résulter d'une carence d'apport (nutrition artificielle, malnutrition, carence d'absorption) ou d'un déséquilibre entre apports et besoins.

II. PRELEVEMENT

Plasma : - Bouchon vert (Héparinate de Na, Li ou NH₄)
- Tube : 5 ml, 2 ml ou micro.

Sérum : - Bouchon jaune d'or ou rouge (tube sec)
- Tube : 5 ml, 2 ml ou micro.

La vitamine A étant dégradée par la lumière, les prélèvements doivent parvenir au laboratoire protégés par du papier d'aluminium.

Etiquetage : identification standard

Conditions de stabilité des analytes : 8 h à température ambiante, 1 mois à - 20°C

Volume minimum de plasma ou sérum : 200 µl

III. VALEURS USUELLES & PATHOLOGIQUES

Vitamine A (Rétinol) : Malvy *et al*, 1993

Chez l'individu sain, la rétinolémie augmente de la naissance à l'âge adulte ; il en est de même pour la concentration hépatique du rétinol et de ses esters.

Chez le sujet âgé sans pathologie associée et sans dénutrition, les valeurs usuelles sont identiques à celles de l'adulte.

Les rétinolémies plus basses chez le prématuré par rapport au nouveau-né à terme, pourraient s'expliquer par un défaut de maturation hépatique pour la synthèse de la RBP.

Facteur de conversion

x 3

Age	Vit A mg/L	Vit A µmol/L
Nouveau-né à terme	0,15 – 0,79	0,45 – 2,36
Prématuré de 24 à 36 semaines	0,02 – 0,35	0,06 – 1,04
Enfants		
3-5 ans	0,20 – 0,43	0,61 – 1,29
6-8 ans	0,23 – 0,64	0,70 – 1,93
9-11 ans	0,30 – 0,67	0,90 – 2,00
12-13 ans	0,28 – 0,77	0,83 – 2,32
14-16 ans	0,33 – 0,97	0,99 – 2,90
Adultes	0,35 – 1,09	1,06 – 3,26

La RBP joue un rôle critique dans l'exploration du statut vitaminique A :

- toute diminution de sa synthèse entraîne celle du rétinol plasmatique ;
- inversement, le rétinol régule la libération de RBP par le foie et toute carence en vitamine A sera accompagnée d'une diminution de la RBP circulante alors que le taux de synthèse par l'hépatocyte reste normal.

Par ailleurs, une diminution de la RBP circulante est observée en cas de malnutrition et dans les états inflammatoires. Son augmentation est observée dans l'insuffisance rénale chronique et les stéatoses hépatiques.

Vit A mg/L	Vit A µmol/L	Statut nutritionnel
0,23 à 0,58	0,70 à 1,75	satisfaisant
< 0,12	< 0,35	carencé
0,12 – 0,23	0,35 – 0,70	marginal
0,58 – 1,17	1,75 – 3,50	excessif
> 1,50	> 4,50	toxique

Vitamine E (Alpha-Tocophérol) : Machlin LJ, Handbook of Vitamins

Facteur de conversion

x 2,4

Etat	Vit E mg/L	Vit E µmol/L	
Sujet sain	Nouveau-né à terme	4,0	9,6
	Nouveau-né prématuré	2,6	6,2
	Adulte	9,5	22,8
Malnutrition protéino-énergétique	3,0	7,2	
Entéropathies			
Anomalies congénitales des voies biliaires	< 1,0	< 2,4	
Abétalipoprotéïnémie	< 1,0	< 2,4	
Maladie coeliaque	3,2	7,7	
Pancréatite chronique	4,0	9,6	
Colite ulcéreuse	2,4	5,8	
Mucoviscidose	2,3	5,5	
Pathologies hémolytiques			
Bêta-thalassémie majeure	4,2	10,1	
Drépanocytose	6,2	14,9	
Ictère hémolytique (sphérocytose héréditaire)	5,2	12,5	

IV. PRINCIPE DE DOSAGE

Après extraction en phase organique en présence d'un étalon interne, les vitamines sont séparées par chromatographie liquide haute pression (CLHP) en phase inverse. La détection est réalisée par mesure de l'absorbance à 325 nm pour la vitamine A et à 292 nm pour la vitamine E.

V. MATERIEL

1. Appareils

Injecteur automatique Waters 717 Plus Autosampler¹

Pompe P680 Dionex²

Détecteur UV 170U Dionex

Intégrateur Chroméléon Dionex

Séparation sur colonne Satisfaction RP18AB 5 µm, 4,6 mm x 250 mm (CIL Cluzeau³ réf. SA5C18AB250).

Evaporateur Hetovac (distribué par ATGC⁴)

¹ Waters SAS 78280 Guyancourt - Tel. 0 820 885 885

² Dionex SA – 164-166, av Joseph Kessel, 78960 Voisins Le Bretonneux – Tel. 0139300110 – Fax. 0139300116

³ CIL Cluzeau - 91 rue de la République, 92800 Puteaux-La Défense – Tel. 0147629360

⁴ ATGC - ZI des Richardets - 24 rue du Ballon, 93160 Noisy Le Grand - Tél. 0143042100 - Fax. 0143042904

⁴ VWR International SAS, 201 rue Carnot, 94126 Fontenay-sous-Bois Cedex – Tél. 0825 02 30 30 – Fax 0825 02 30 35

2. Réactifs

Méthanol LiChrosolv Prolabo VWR⁵ (réf. 20 834 291)

Hexane LiChrosolv Prolabo VWR (réf. 24 605 321)

Ethanol Prolabo VWR (réf. 20 821 310)

3. Etalons

Vitamin-A-alcohol (250 mg) Sigma Aldrich⁶ (réf. : 95144-250)

D α -Tocophérol (100 mg) Acros Organics Interchim⁶ (réf. 421031000)

Les solutions étalons sont conservées à -80°C.

Etalon interne : Acétate de tocophérol Sigma (réf T 3001), conservé à 4°C.

4. Echantillon de contrôle

Vitamin A/E ChromSystems⁷ lyophilisé,

niveaux 1 et 2 (réf. 0032)

niveau 1 (réf. 0036)

niveau 2 (réf. 0037)

Conservation à -20°C.

VI. PROTOCOLE OPERATOIRE

1. Préparation des spécimens

Dans un tube en verre ou un godet Eppendorf, distribuer successivement :

Sérum ou plasma	200 μ l
EI (2,5 g/L)	30 μ l
Ethanol	170 μ l

Agiter au vortex puis ajouter 500 μ l d'hexane.

Après agitation au vortex **pendant 1min**, centrifuger 5 min pour obtenir une bonne séparation des deux phases.

Reprendre 450 μ l d'extrait (phase supérieure) et évaporer à sec 1h environ (Hetovac, Laboratoire de Biochimie A, Lavoisier 5^{ème} étage, porte 015-01-R05-276_196).

Reprendre le résidu d'évaporation par 100 μ l d'éthanol et agiter au vortex pour obtenir une bonne dissolution.

Conserver les extraits à l'obscurité jusqu'au moment de l'injection.

2. Préparation des étalons

Préparation des solutions étalons

- Rétinol (Vitamine A) : Solution mère à 250 mg dans 100 ml d'éthanol absolu ; à diluer au 1/200 dans l'éthanol absolu avant emploi (12,5 mg/L).
- Tocophérol (Vitamine E) : Solution mère à 100 mg dans 100 ml d'éthanol absolu ; à diluer au 1/5 dans l'éthanol absolu avant emploi (200 mg/L)
- Acétate de Tocophérol (Etalon Interne) : Solution mère à 1 g/100 ml dans l'éthanol absolu. A diluer au 1/4 dans l'éthanol absolu avant emploi (250 mg/100 ml).

Conservation au congélateur, à l'abri de la lumière.

⁶ Sigma – Aldrich- L'Isle d'Abeau Chesnes, BP 701, 38297 Saint-Quentin Fallavier - Tél. 080021108 - Fax. 0800031052

⁷ ChromSystems GmbH, Heimbürgstrasse 3 – 81243 München Germany – Tél. +49 89 189 300 – Fax. +49 89 189 309

Préparation de la gamme d'étalonnage

	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>
Rétinol (~ 12,5 mg/L)	25 µl	50 µl	100 µl	200 µl
Tocopherol (~ 200 mg/L)	25 µl	50 µl	100 µl	200 µl
Etalon Interne (2,5 g/L)	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl
Ethanol	650 µl	600 µl	500 µl	300 µl

3. Conditions opératoires

Injecteur automatique thermostaté à 10°C : volume d'injection de 20 µl.

Phase mobile : Méthanol

Pompe : débit 2 ml/min

Détecteur : acquisition :

- de 0 à 5 min, à la longueur d'onde de 325 nm (rétinol) ;
- et de 5,5 à 12 min, à la longueur d'onde de 292 nm (α -tocophérol et acétate de tocophérol).

VII. CONTROLE

Préparer une nouvelle gamme d'étalonnage et recalibrer au cas où la valeur du contrôle s'écarte des valeurs acceptables (moyenne $\pm 10\%$).

VIII. PERFORMANCES DE LA TECHNIQUE

Limites de linéarité

Vitamine A	0,05 à 2,5 mg/L
Vitamine E	3 à 60 mg/L

CV%

<u>Niveau bas</u>	Vitamine A	0,49 \pm 0,05 mg/L	CV = 9,5%
	Vitamine E	7,30 \pm 0,29 mg/L	CV = 4,0%
<u>Niveau haut</u>	Vitamine A	0,87 \pm 0,04 mg/L	CV = 4,8 %
	Vitamine E	18,60 \pm 1,99 mg/L	CV = 10,7 %

IX. ARCHIVAGE

Résultats des patients et des contrôles :

Ils sont consignés dans le dossier « Vitamines » à la pailasse.

X. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

12. Les vitamines. Cahier de Formation *Bioforma* 2007; 38.

13. Gey KF. Vitamin E plus vitamin C and interacting nutrients required for optimal health. A critical and constructive review of epidemiology and supplementation data regarding cardiovascular disease and cancer. *Biofactors* 1998; 7:113-74.

14. Machlin LJ. *Handbook of Vitamins* : Nutritional, Biochemical, and Clinical Aspects. Marcel Dekker, New York 1984, 614 p.
15. Malvy D, Burtschy B, Dostalova L, Amedee-Manesme O. Serum retinol, β -carotene, α -tocopherol and cholesterol in healthy french children. *Int J Epidemiol* 1993 ; 22 : 237-46.
16. Milne DB, Botnen J. Retinol, α -tocopherol and α - and β -carotene simultaneously determined in plasma by isocratic liquid chromatography. *Clin Chem* 1986 ; 32: 874-876.
17. Ross C. Overview of retinoid metabolism. *J Nutr* 1993; 123:346-50.
18. Semba R. Vitamin A, immunity and infection. *Clin Inf Dis* 1994 ; 19 : 489-99.

XI. LOGISTIQUE

Délai de réponse : 1 semaine

Cotation : Vitamine A : BHN 100
Vitamine E : BHN 100

Pièce : **Laboratoire de Biochimie B, Lavoisier 4^{ème} étage**
porte 015-01-R04-291_206

<i>Date de rédaction</i>	24.07.95
<i>Préparée par</i>	J.P. DE BANDT M. THEVENIN
<i>Approuvée par</i>	B. LACOUR
<i>Date de révision 1</i>	02.12.97
<i>Date de révision 2</i>	07/06/2011 T. NGUYEN KHOA
<i>Date de révision 3</i>	12/06/2012 T. NGUYEN KHOA

Annexe II

Influence de la composition de la phase mobile Méthanol/eau sur le temps de rétention des analytes

Validation de méthode CLHP / colonne Kinetex					
Feuille de saisie des résultats					
Dosage Vitamines A et E					
Opérateur : AP					
Responsable : TNK					
Pression	Méthanol	Eau	Temps de rétention, min		
	%	%	Vit A	Vit E	EI
158	100	0	0,62	1,22	1,49
160	100	0	0,61	1,17	1,43
158	100	0	0,61	1,16	1,41
158	100	0	0,61	1,15	1,40
Moyenne			0,61	1,18	1,43
écart type			0,01	0,03	0,04
CV %			0,82	2,65	2,81
173	97	3	0,70	1,89	2,48
173	97	3	0,70	1,88	2,47
173	97	3	0,70	1,89	2,47
173	97	3	0,70	1,88	2,47
Moyenne			0,70	1,88	2,47
écart type			0,00	0,00	0,00
CV %			0,21	0,16	0,13
210	95	5	0,83	3,13	4,39
206	95	5	0,83	3,12	4,37
206	95	5	0,83	3,12	4,37
205	95	5	0,83	3,12	4,36
Moyenne			0,83	3,12	4,37
écart type			0,00	0,00	0,01
CV %			0,00	0,16	0,29
216	93	7	0,94	4,38	6,37
215	93	7	0,94	4,36	6,35
216	93	7	0,93	4,35	6,32
215	93	7	0,93	4,34	6,31
Moyenne			0,94	4,36	6,34
écart type			0,01	0,02	0,03
CV %			0,62	0,39	0,43
238	90	10	1,39	11,79	18,74
240	90	10	1,39	11,76	18,76
240	90	10	1,39	11,78	18,74
240	90	10	1,39	11,76	18,76
Moyenne			1,39	11,77	18,75
écart type			0,00	0,01	0,01
CV %			0,00	0,13	0,06

Annexe III

Evaluation de la répétabilité

Validation de méthode CLHP / colonne Kinetex								
Feuille de saisie des résultats : Répétabilité								
Dosage Vitamines A et E								
Unité : mg/l								
Opérateur : AP / CPV								
Responsable : TNK								
	Vitamine A				Vitamine E			
N°	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3	Niveau 4	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3	Niveau 4
1	0,13	0,28	0,63	1,30	2,45	5,05	10,53	21,24
2	0,13	0,28	0,62	1,24	2,59	5,05	10,57	20,24
3	0,13	0,28	0,63	1,28	2,60	5,09	10,35	20,79
4	0,13	0,28	0,62	1,19	2,43	4,99	10,39	20,31
5	0,13	0,28	0,62	1,25	2,61	5,05	10,43	20,58
6	0,14	0,30	0,62	1,25	2,60	5,03	10,41	20,60
7	0,14	0,29	0,62	1,21	2,63	5,01	10,35	20,61
8	0,14	0,28	0,62	1,17	2,57	5,07	10,39	20,71
9	0,13	0,29	0,62	1,23	2,44	4,97	10,12	20,61
10	0,13	0,31	0,61	1,18	2,52	5,57	10,01	20,70
11	0,14	0,32	0,60	1,27	2,69	4,88	10,79	20,64
12	0,14	0,30	0,57	1,29	2,69	5,01	10,49	21,00
13	0,14	0,30	0,56	1,24	2,60	4,90	9,97	20,70
14	0,14	0,30	0,59	1,20	2,77	4,71	9,93	20,67
15	0,14	0,30	0,54	1,22	2,69	4,73	9,99	20,59
16	0,14	0,30	0,56	1,28	2,71	5,01	9,88	20,61
17	0,14	0,29	0,56	1,26	2,64	4,97	10,20	20,74
18	0,14	0,29	0,62	1,27	2,61	4,54	10,04	20,62
19	0,14	0,30	0,60	1,28	2,60	5,01	10,01	20,72
20	0,14	0,30	0,58	1,28	2,62	4,91	10,65	20,91
Moyenne	0,14	0,29	0,60	1,25	2,60	10,27	20,68	20,68
écart type	0,01	0,01	0,03	0,04	0,09	0,27	0,21	0,21
CV %	3,91	3,67	4,57	3,02	3,46	2,60	1,03	1,03
CV limite	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%
Conclusions	Validé	Validé	Validé	Validé	Validé	Validé	Validé	Validé

Annexe IV

Evaluation de la reproductibilité

Validation de méthode CLHP / colonne Kinetex									
Feuille de saisie des résultats : Reproductibilité									
Dosage Vitamines A et E									
Unité : mg/l									
Opérateur : AP / CPV									
Responsable : TNK									
Date du test	N°	Vitamine A				Vitamine E			
		Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3	Niveau 4	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3	Niveau 4
06/06/2012	1	0,13	0,281	0,615	1,214	2,59	5,088	10,773	20,737
07/06/2012	2	0,134	0,281	0,59	1,224	2,383	4,824	10,802	20,844
12/06/2012	3	0,137	0,307	0,6214	1,243	2,613	5,546	10,3121	21,113
13/06/2012	4	0,132	0,278	0,599	1,237	2,56	5,388	11,15	21,597
20/06/2012	5	0,135	0,275	0,591	1,224	2,637	5,051	10,57	21,525
21/06/2012	6	0,126	0,281	0,599	1,209	2,268	5,252	10,006	21,353
26/06/2012	7	0,14	0,28	0,588	1,214	2,499	5,08	10,413	21,483
17/07/2012	8	0,15	0,301	0,601	1,211	2,661	5,318	10,633	21,308
25/07/2012	9	0,141	0,292	0,594	1,21	2,584	5,084	10,611	21,371
04/09/2012	10	0,141	0,291	0,593	1,241	2,671	5,598	11,207	22,902
10/09/2012	11	0,142	0,31	0,588	1,231	2,682	5,601	11,102	21,89
12/09/2012	12	0,145	0,277	0,581	1,171	2,512	5,122	10,317	20,857
13/09/2012	13	0,144	0,292	0,596	1,208	2,632	5,285	10,658	21,284
18/09/2012	14	0,144	0,282	0,589	1,197	2,737	5,169	10,706	21,343
19/09/2012	15	0,142	0,306	0,599	1,204	2,562	5,319	10,531	21,373
Moyenne		0,14	0,29	0,60	1,22	2,57	5,25	10,65	21,40
écart type		0,01	0,01	0,01	0,02	0,12	0,22	0,33	0,51
CV %		4,63	4,14	1,75	1,53	4,70	4,22	3,10	2,41
CV limite		10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%
Conclusions		Validé	Validé	Validé	Validé	Validé	Validé	Validé	Validé

Annexe V

Evaluation de l'inexactitude

Validation de méthode CLHP / colonne Kinetex								
Feuille de saisie des résultats : Inexactitude								
Dosage Vitamines A et E								
Unité : mg/l ; µmol/l								
Opérateur : AP / CPV								
Responsable : TNK								
Vitamine A								
Echantillon	N° SFVB	Valeurs observées (colonne Kinetex)		Valeur cible, µmol/l	Biais, µmol/l	Biais, (%)	Limites acceptable (Biais), %	Conclusion
		mg/l	µmol/l					
1	121	0,53	1,85	1,94	-0,09	-4,64	<10	Validé
2	122	1,027	3,58	3,9	-0,32	-8,21	<10	Validé
3	123	0,363	1,28	1,38	-0,1	-7,25	<10	Validé
4	126	0,39	1,36	1,47	-0,11	-7,48	<10	Validé
5	127	0,75	2,76	2,69	0,07	2,60	<10	Validé
Vitamine E								
Echantillon	N° SFVB	Valeurs observées		Valeur cible,	Biais, µmol/l	Biais, (%)	Limites acceptable	Conclusion
		mg/l	µmol/l					
1	121	11,38	27,31	26,6	0,71	2,67	<10	Validé
2	122	20,949	50,28	47,5	2,78	5,85	<10	Validé
3	123	7,797	18,71	18	0,71	3,94	<10	Validé
4	126	8,03	19,27	18,4	0,87	4,73	<10	Validé
5	127	14,71	35,3	35,8	-0,5	-1,40	<10	Validé

Annexe VI

Evaluation de limite de la détection

Validation de méthode CLHP / colonne Kinetex				
Feuille de saisie des résultats : Limite de détection				
Dosage Vitamines A et E				
Unité : mg/l				
Opérateur : CPV				
Responsable : TNK				
Blanc				
	Vitamine A		Vitamine E	
N°	signal	x	signal	y
1	0,020	-0,19508	0,040	-3,82628
2	0,000	-0,19600	0,010	-3,86432
3	0,000	-0,19600	0,100	-3,75020
4	0,010	-0,19554	0,050	-3,81360
5	0,010	-0,19554	0,040	-3,82628
6	0,010	-0,19554	0,090	-3,76288
7	0,020	-0,19508	0,010	-3,86432
8	0,020	-0,19508	0,040	-3,82628
9	0,050	-0,19370	0,090	-3,76288
10	0,040	-0,19416	0,000	-3,87700
Moyenne	0,018	-0,19517	0,047	-3,81740
écart type (ET)	0,016	0,000745	0,036	0,045542
3*ET		0,00223467		0,13662663
Gamme d'étalonnage				
	Vitamine A		Vitamine E	
	signal	conc, mg/l	signal	conc, mg/l
	6,05	0,143	4,52	2,887
	11,22	0,292	7,61	5,353
	19,25	0,594	12,27	10,224
	29,37	1,21	19,3	21,46
				$x=(0,046*Sb)-0,196$
				$y=(1,268*Sb)-3,877$
				Sb : signal correspondant à la ligne de base

Annexe VII

Evaluation des limites de linéarité

Validation de méthode CLHP / colonne Kinetex												
Feuille de saisie des résultats : Limites de linéarité												
Dosage Vitamines A et E												
Unité : mg/l												
Opérateur : CPV												
Responsable : TNK												
V théoriques	G0	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11
Vit A	0	0,01	0,02	0,04	0,07	0,15	0,30	0,60	1,20	1,51	1,81	2,12
Vit E	0	0,16	0,31	0,62	1,25	2,66	5,32	10,64	21,29	26,85	32,22	37,59
Vitamine A												
V mesurés	G0	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11
1	0,00	0,00	0,01	0,03	0,06	0,14	0,28	0,59	1,20	1,50	1,86	2,16
2	0,00	0,01	0,02	0,04	0,07	0,15	0,30	0,59	1,22	1,49	1,80	2,12
3	0,00	0,01	0,01	0,04	0,06	0,15	0,29	0,58	1,22	1,46	1,80	2,12
4	0,00	0,01	0,01	0,03	0,06	0,14	0,30	0,58	1,21	1,48	1,79	2,10
5	0,00	0,01	0,02	0,04	0,07	0,14	0,31	0,59	1,23	1,64	1,88	2,26
6	0,00	0,01	0,02	0,03	0,08	0,15	0,28	0,58	1,17	1,49	1,89	2,15
7	0,00	0,01	0,02	0,03	0,07	0,14	0,29	0,59	1,24	1,63	1,88	2,26
8	0,00	0,01	0,02	0,04	0,07	0,12	0,28	0,60	1,19	1,46	1,86	2,13
9	0,00	0,01	0,02	0,04	0,07	0,12	0,28	0,06	1,19	1,46	1,86	2,13
10	0,00	0,01	0,02	0,04	0,07	0,13	0,28	0,59	1,18	1,50	2,13	1,89
Moyenne	0,00	0,01	0,02	0,04	0,07	0,14	0,29	0,54	1,20	1,51	1,87	2,13
écart type	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,17	0,02	0,07	0,10	0,10
Vitamine E												
V mesurés	G0	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11
1	0,03	0,32	0,40	0,70	1,26	2,60	5,23	10,34	21,43	25,88	31,13	36,27
2	0,04	0,02	0,48	0,48	1,45	2,74	5,17	10,71	21,34	25,92	31,33	36,98
3	0,00	0,25	0,39	0,70	1,30	2,60	5,27	10,73	21,88	26,35	31,70	37,15
4	0,03	0,31	0,42	0,73	1,33	2,57	5,31	10,68	21,75	25,87	31,89	36,98
5	0,02	0,25	0,04	0,81	1,37	2,68	5,60	11,10	21,89	29,42	35,43	41,20
6	0,05	0,02	0,33	0,86	1,45	2,51	5,12	10,32	20,86	26,05	32,56	36,51
7	0,01	0,32	0,38	0,79	1,35	2,67	5,60	11,21	22,90	29,42	35,31	41,20
8	0,02	0,46	0,56	0,89	1,65	2,19	4,82	10,39	20,93	25,99	31,56	36,82
9	0,05	0,46	0,56	0,89	1,65	2,19	4,82	10,39	20,93	25,99	31,56	36,82
10	0,00	0,17	0,52	0,76	1,54	2,20	4,90	10,34	20,91	26,33	36,82	32,32
Moyenne	0,02	0,26	0,41	0,76	1,44	2,50	5,18	10,62	21,48	26,72	32,93	37,22
écart type	0,02	0,15	0,15	0,12	0,14	0,22	0,28	0,32	0,65	1,43	2,09	2,53
Résumé des données												
	Vit A (th)	Vit A (m)	Vit E (th)	Vit E (m)								
G0	0,00	0,00	0,00	0,02								
G1	0,01	0,01	0,16	0,26								
G2	0,02	0,02	0,31	0,41								
G3	0,04	0,04	0,62	0,76								
G4	0,07	0,07	1,25	1,44								
G5	0,15	0,14	2,66	2,50								
G6	0,30	0,29	5,32	5,18								
G7	0,60	0,54	10,64	10,62								
G8	1,20	1,20	21,29	21,48								
G9	1,51	1,51	26,85	26,72								
G10	1,81	1,87	32,22	32,93								
G11	2,12	2,13	37,59	37,22								
th : valeurs théoriques												
m : valeurs mesurés												

Annexe VIII

Etude de la corrélation

Validation de méthode CLHP / colonne Kinetex		
Feuille de saisie des résultats : Corrélation (Kinetex versus Satisfaction)		
Dosage Vitamines A et E		
Unité : mg/l		
Opérateur : AP / CPV		
Responsable : TNK		

Valeurs	Vit A	Vit E
basses	< 0,3	<4,4
moyennes	0,3 - 0,68	4,4-12,9
hautes	> 0,68	>12,9

Page 1/2

N°	Vitamine A				Vitamine A			
	A	B	Biais (A-B)	Biais (%)	A	B	Biais (A-B)	Biais (%)
	Kinetex (testée)	Satisfaction (utilisée)	Différence (A-B)	(Biais/B) *100	Kinetex (testée)	Satisfaction (utilisée)	Différence (A-B)	(Biais/B) *100
1	0,08	0,10	-0,02	-17,00	3,00	3,10	-0,10	-3,19
2	0,12	0,12	0,00	-1,67	3,48	3,30	0,18	5,39
3	0,13	0,13	0,00	-1,54	3,62	3,38	0,24	6,95
4	0,14	0,13	0,01	8,46	3,935	3,99	-0,06	-1,38
5	0,15	0,14	0,00	3,57	3,981	4,87	-0,89	-18,25
6	0,15	0,15	0,00	0,67	5,206	6,25	-1,04	-16,70
7	0,15	0,15	0,00	1,33	5,37	5,89	-0,52	-8,91
8	0,16	0,16	-0,01	-3,13	5,70	5,82	-0,12	-2,11
9	0,16	0,16	0,00	-2,50	6,00	5,82	0,18	3,06
10	0,20	0,23	-0,03	-12,17	6,487	7,03	-0,54	-7,72
11	0,21	0,19	0,02	8,42	6,86	6,80	0,06	0,90
12	0,21	0,2	0,01	3,50	6,87	6,15	0,72	11,64
13	0,23	0,23	0,00	-0,43	7,17	7,52	-0,35	-4,71
14	0,23	0,27	-0,04	-13,33	7,54	7,46	0,08	1,11
15	0,24	0,24	-0,01	-2,08	7,71	7,99	-0,28	-3,49
16	0,27	0,27	0,00	0,37	7,83	7,53	0,30	3,93
17	0,29	0,31	-0,02	-6,45	8,03	7,85	0,18	2,29
18	0,30	0,28	0,02	8,21	8,15	8,50	-0,36	-4,18
19	0,31	0,31	0,00	-0,32	8,21	7,78	0,43	5,49
20	0,31	0,32	-0,01	-3,44	8,221	8,38	-0,16	-1,90
21	0,31	0,30	0,01	4,33	8,26	8,89	-0,63	-7,04
22	0,32	0,33	-0,01	-2,42	8,53	8,68	-0,15	-1,69
23	0,33	0,33	0,00	0,00	8,548	8,73	-0,18	-2,08
24	0,33	0,33	0,00	0,61	8,65	10,09	-1,44	-14,23
25	0,34	0,31	0,03	8,71	8,95	8,67	0,28	3,25
26	0,34	0,37	-0,03	-8,38	9,39	9,42	-0,03	-0,29
27	0,34	0,29	0,05	17,59	9,542	9,45	0,09	0,97
28	0,35	0,35	0,00	0,86	9,60	8,62	0,98	11,40
29	0,36	0,35	0,01	1,71	10,061	11,16	-1,10	-9,85
30	0,36	0,36	0,00	0,00	10,22	10,11	0,11	1,07
31	0,37	0,41	-0,04	-10,24	10,57	11,68	-1,11	-9,52
32	0,38	0,37	0,01	1,35	10,68	11,09	-0,41	-3,69
33	0,38	0,39	-0,01	-3,33	10,72	10,20	0,52	5,14
34	0,38	0,38	0,00	-0,53	10,73	11,61	-0,88	-7,58
35	0,40	0,50	-0,11	-21,00	10,75	10,59	0,16	1,48
36	0,40	0,42	-0,02	-5,48	10,84	10,47	0,37	3,55
37	0,40	0,41	-0,01	-3,17	10,94	10,60	0,34	3,18
38	0,40	0,37	0,03	7,57	10,96	10,75	0,21	1,93
39	0,41	0,40	0,01	3,50	11,01	11,73	-0,72	-6,16
40	0,41	0,46	-0,05	-10,00	11,09	11,46	-0,37	-3,25

Validation de méthode CLHP / colonne Kinetex
Feuille de saisie des résultats : Corrélation (Kinetex versus Satisfaction)
Dosage Vitamines A et E
Unité : mg/l
Opérateur : AP / CPV
Responsable : TNK

Valeurs	Vit A	Vit E
basses	< 0,3	<4,4
moyennes	0,3 - 0,68	4,4-12,9
hautes	> 0,68	>12,9

Page 2/2

N°	Vitamine A				Vitamine A			
	A	B	Biais (A-B)	Biais (%)	A	B	Biais (A-B)	Biais (%)
	Kinetex (testée)	Satisfaction (utilisée)	Différence (A-B)	(Biais/B) *100	Kinetex (testée)	Satisfaction (utilisée)	Différence (A-B)	(Biais/B) *100
41	0,42	0,41	0,01	1,22	11,21	11,95	-0,74	-6,18
42	0,42	0,42	0,00	-0,95	11,40	10,29	1,11	10,74
43	0,43	0,49	-0,06	-11,84	11,51	10,62	0,89	8,35
44	0,43	0,47	-0,04	-7,87	11,51	12,58	-1,07	-8,53
45	0,46	0,47	-0,01	-1,91	11,59	10,96	0,63	5,74
46	0,46	0,39	0,07	18,46	11,59	10,90	0,69	6,34
47	0,47	0,43	0,04	8,37	11,64	10,12	1,52	15,03
48	0,48	0,47	0,01	1,49	11,68	11,63	0,05	0,46
49	0,48	0,48	0,00	-0,63	11,78	12,13	-0,35	-2,92
50	0,48	0,51	-0,03	-5,49	11,79	13,19	-1,40	-10,62
51	0,48	0,41	0,07	18,05	12,16	11,65	0,51	4,35
52	0,49	0,5	-0,01	-2,80	12,30	12,05	0,25	2,05
53	0,50	0,49	0,01	2,04	12,44	13,89	-1,45	-10,42
54	0,51	0,5	0,01	1,40	12,48	12,37	0,11	0,89
55	0,51	0,48	0,03	6,46	12,65	13,44	-0,79	-5,88
56	0,54	0,55	-0,01	-2,36	12,73	13,05	-0,32	-2,48
57	0,56	0,56	0,00	-0,18	12,91	13,20	-0,29	-2,23
58	0,58	0,56	0,02	3,75	13,00	12,55	0,45	3,62
59	0,61	0,59	0,02	2,71	13,13	13,80	-0,67	-4,83
60	0,61	0,66	-0,05	-7,12	13,51	12,67	0,84	6,64
61	0,63	0,7	-0,07	-10,00	13,53	13,42	0,11	0,81
62	0,64	0,62	0,02	2,58	13,55	14,40	-0,85	-5,90
63	0,65	0,62	0,03	4,03	13,71	13,97	-0,26	-1,88
64	0,65	0,64	0,01	2,03	14,14	16,08	-1,94	-12,04
65	0,66	0,62	0,04	6,77	14,23	12,76	1,47	11,50
66	0,67	0,69	-0,02	-3,04	14,71	14,59	0,12	0,82
67	0,68	0,69	-0,01	-1,59	15,20	15,10	0,10	0,69
68	0,70	0,66	0,04	6,67	15,27	16,06	-0,79	-4,89
69	0,72	0,73	-0,02	-2,05	16,22	16,00	0,22	1,40
70	0,75	0,79	-0,04	-5,57	16,34	16,35	-0,01	-0,07
71	0,76	0,73	0,03	3,42	17,26	16,73	0,53	3,14
72	0,82	0,86	-0,04	-4,42	17,37	17,04	0,33	1,92
73	0,86	0,84	0,02	2,50	17,50	17,48	0,02	0,09
74	0,89	0,81	0,08	10,37	17,90	16,87	1,03	6,09
75	0,92	0,92	0,00	0,11	18,29	18,53	-0,24	-1,32
76	1,01	1,02	-0,01	-1,08	19,27	18,96	0,31	1,66
77	1,05	1,05	0,00	0,29	19,29	17,57	1,72	9,81
78	1,09	1,07	0,02	2,15	19,67	19,78	-0,11	-0,58
79	1,15	1,07	0,08	7,10	19,97	22,29	-2,32	-10,39
80	1,20	1,23	-0,03	-2,44	20,48	20,89	-0,41	-1,97
81	1,21	1,05	0,16	15,62	23,49	24,27	-0,78	-3,20
82	1,28	1,28	0,00	-0,31	30,75	31,67	-0,92	-2,92

RESUME

Dans le laboratoire, le dosage plasmatique des vitamines A et E est réalisé après extraction en phase organique par Chromatographie Liquide Haute Pression (CLHP) couplée à la détection Ultra-Violet. Ce dosage est prescrit par les services de dermatologie, de gastro-entérologie, de pédiatrie générale et en particulier pour le suivi nutritionnel des enfants traités par nutrition entérale ou parentérale. L'activité de ce secteur a augmentée en moins d'une année de 10%.

Un injecteur automatique a récemment été mis en place sur le système CLHP, ce qui a modifié l'organisation du travail du technicien au laboratoire. Pour optimiser le temps technicien, un changement de colonne de séparation est proposé. Le délai d'analyse a été réduit de moitié tout en conservant les qualités analytiques du dosage. Ce mémoire présente le protocole expérimental et les méthodes statistiques utilisés pour valider la nouvelle technique selon la norme NF EN ISO 15189.