



**PROGRAMME MIXTE FAO/OMS SUR LES NORMES ALIMENTAIRES  
COMITÉ DU CODEX SUR LES MÉTHODES D'ANALYSE ET D'ÉCHANTILLONNAGE**

**Trente-sixième session**

**Budapest (Hongrie), 23-27 février 2015**

**DOCUMENT DE TRAVAIL SUR LA DÉMARCHE-CRITÈRES POUR LES MÉTHODES QUI UTILISENT  
UNE «SOMME DE COMPOSANTS»**

**(Élaboré par le Royaume-Uni<sup>1</sup>)**

## **GÉNÉRALITÉS**

1. À la trente-cinquième session du Comité du Codex sur les méthodes d'analyse et d'échantillonnage (CCMAS), la délégation des États-Unis d'Amérique a présenté le rapport du groupe de travail électronique dont il est fait état dans le document CX/MAS 14/35/5, notant que l'idée d'établir des critères pour les méthodes de type I et/ou les méthodes multianalytes suscitait un intérêt général, mais sans aller plus loin et sans tentative de consensus sur ce point. La délégation a souligné les recommandations formulées et fait valoir que le Comité devrait tenir compte de divers facteurs dans l'élaboration de critères pour les méthodes de type I ou les méthodes multianalytes, notamment: i) s'agissant de critères pour les méthodes de type I, il serait envisageable de mettre en place des procédures d'évaluation de l'équivalence entre les méthodes au lieu d'établir des critères; cependant, comme les méthodes de type I ne sont pas toutes similaires, évaluer l'équivalence serait parfois impossible; ii) s'agissant des méthodes multianalytes, il faut déterminer le rôle des facteurs d'équivalence toxique (TEF), en examinant l'opportunité de ne pas les inclure dans la norme comme l'a fait le Comité du Codex sur le poisson et les produits de la pêche; et, iii) étudier si l'approche globale est adaptée ou si différentes approches s'imposent pour les méthodes multianalytes, car il pourrait y avoir des divergences d'une toxine à l'autre.

2. Le Comité s'est penché sur chacune de ces recommandations.

**Recommandation 1 – Les critères adaptés aux différentes circonstances (méthodes de type I et multianalytes) doivent être établis séparément lors de leur phase d'élaboration et dans le Manuel de procédure**

3. Globalement, les intervenants se sont accordés sur cette recommandation.

**Recommandation 2 – Opportunité d'élaborer des critères pour les méthodes de type I, d'élaborer une procédure établissant quand différentes méthodes donnent des résultats comparables, ou de ne pas modifier le système actuel**

4. Il a été convenu de façon générale qu'il ne faut pas élaborer de critères numériques pour les méthodes de type I, mais qu'il est nécessaire d'examiner des procédures visant à déterminer l'équivalence de ces méthodes.

**Recommandations 3 et 4 – Établissement d'une démarche-critères pour les méthodes multianalytes**

5. De l'avis général, les travaux en ce sens doivent se poursuivre, et les TEF ne doivent plus être intégrés à une méthode d'analyse spécifique; ils pourraient être indiqués dans la norme ou dans un autre document leur permettant d'être mis à jour et évalués régulièrement à l'aide de procédures reconnues internationalement.

6. Étant donné le débat général suscité par ces recommandations, le Comité a donné son accord à la poursuite des travaux avec la création de deux groupes de travail électroniques, travaillant en anglais uniquement, ouverts à l'ensemble des membres et des observateurs, avec les attributions suivantes:

---

<sup>1</sup> M. Andrew Damant, directeur du groupe de travail électronique.

- a. Élaboration de procédures/directives visant à déterminer l'équivalence entre les méthodes de type I, groupe dirigé par les États-Unis d'Amérique afin de préparer un document de travail examinant diverses approches pour les différentes classes de méthodes de type I; et
  - b. Élaboration d'une démarche-critères pour les méthodes qui utilisent une «somme de composants», groupe dirigé par le Royaume-Uni. Le groupe de travail devra rédiger un document de travail qui évalue et commente les options actuelles. Il s'interroge sur les directives générales et évalue les critères à appliquer au cas par cas.
7. À sa trente-cinquième session, le Comité sur les méthodes d'analyse et d'échantillonnage a également discuté des critères de performance pour les méthodes de détermination de biotoxines marines dans la *Norme pour les mollusques bivalves vivants et crus*.
8. Le CCMAS a approuvé les critères proposés par le Comité sur le poisson et les produits de la pêche. Le CCMAS a par ailleurs noté que la méthode officielle 2005.06 de l'AOAC n'analyse pas toutes les substances du tableau mais porte sur les principaux composants toxiques. En outre, il a été noté qu'il était utile de fournir aux analystes les renseignements contenus dans les *Méthodes d'analyse et d'échantillonnage recommandées* (CODEX STAN 234-1999) indiquant quelles méthodes d'analyse répondent aux critères.
9. Le Comité a approuvé les méthodes 959.08 et 2011.27 de l'AOAC (essai de liaison aux récepteurs) en type IV. Le Comité a été informé que la méthode 959.08 de l'AOAC n'était pas applicable dans certains pays dans lesquels les matériaux de référence saxitoxines (STX) ne sont pas disponibles, soulignant que leur commerce est limité par la Convention sur les armes chimiques.
10. À sa trente-septième session, la Commission du Codex Alimentarius a prolongé la discussion des critères de performance pour les méthodes de détermination de biotoxines marines (section I-8.6) de la *Norme pour les mollusques bivalves vivants et crus*. La Commission a examiné le projet de section I-8.6 tel qu'approuvé et amendé par le Comité sur les méthodes d'analyse et d'échantillonnage.
11. Des intervenants se sont toutefois inquiétés du fait que les essais biologiques sur la souris soient classés en type IV, ce qui signifierait que cette méthode ne pourrait pas être utilisée à des fins de contrôle, d'inspection et de réglementation dans certains pays. Cela aurait des incidences négatives sur le commerce étant donné que cette méthode, efficace, est très utilisée et permet de protéger efficacement la santé humaine.
12. Il a par ailleurs été noté que les critères énoncés dans le Manuel de procédure ne s'appliquaient pas aux méthodes biologiques mais plutôt aux méthodes chimiques, et qu'il faudrait envisager d'exempter les méthodes biologiques, comme c'est actuellement le cas pour les méthodes PCR et ELISA.
13. Des délégations ont de nouveau indiqué que le Comité sur les méthodes d'analyse et d'échantillonnage devrait, selon elles, envisager de définir des critères pour les méthodes biologiques étant donné que les critères actuellement suivis pour le choix des méthodes s'appliquent aux méthodes chimiques, et ont conduit au classement en type IV.
14. La délégation sud-africaine a dit préférer que l'on adopte les deux méthodes, biologique et chimique, plutôt que de ne renvoyer que la méthode biologique au Comité sur les méthodes d'analyse et d'échantillonnage.
15. L'utilité de maintenir les méthodes biologique et chimique au même statut a été notée.
16. D'autres délégations ont estimé que la section I-8.6 permettait l'utilisation à la fois des essais biologiques sur la souris et des méthodes chimiques, et que le Comité sur les méthodes d'analyse et d'échantillonnage avait suivi les Principes pour l'élaboration des méthodes d'analyse du Codex. Elles ont par ailleurs fait remarquer que le Comité sur les méthodes d'analyse et d'échantillonnage travaillait actuellement à la définition de critères pour les méthodes biologiques.
17. La Commission du Codex Alimentarius:
- i. a adopté la section I-8.6.1;
  - ii. a renvoyé la section I-8.6.2 au Comité sur les méthodes d'analyse et d'échantillonnage en lui demandant de réexaminer les types attribués aux méthodes en question et a encouragé les membres à soumettre des informations afin que le Comité sur les méthodes d'analyse et d'échantillonnage puisse prendre une décision sur cette question;

- iii. a encouragé le Comité sur les méthodes d'analyse et d'échantillonnage à poursuivre rapidement ses débats sur la façon de traiter des méthodes biologiques au moyen d'une approche fondée sur des critères;
- iv. a pris note des réserves de l'Afrique du Sud quant à la décision indiquée à l'alinéa ii. ci-dessus.

18. À la suite des débats ayant eu lieu à la trente-septième session de la Commission du Codex Alimentarius, le groupe de travail du CCMAS chargé d'élaborer une démarche-critères pour les méthodes qui utilisent une «somme de composants» a également été chargé d'étudier l'établissement de critères pour les méthodes biologiques.

19. Le présent document de travail s'appuie sur les travaux déjà coordonnés par les États-Unis d'Amérique et ayant fait l'objet d'un rapport<sup>2</sup>.

20. Le groupe de travail électronique compte plus de 60 participants. Néanmoins, en raison d'un retard dans la préparation du présent document de discussion, le groupe de travail électronique n'a pas encore été consulté. Il faut donc considérer que ce document est présenté par la direction de la délégation britannique plutôt que par le groupe de travail électronique à proprement parler.

## INTRODUCTION

21. Le Manuel de procédure établit des *Critères généraux régissant le choix des méthodes d'analyse* (22<sup>e</sup> édition 2014, version française, p. 75). Les méthodes sont évaluées en se fondant sur les paramètres suivants: spécificité, exactitude, précision, limite de détection, sensibilité, utilité pratique et applicabilité. Par ailleurs, le Manuel de procédure permet d'établir d'autres critères, le cas échéant, et formule des orientations quant au choix d'une méthode dans l'éventail proposé. Ce document propose également de mettre en œuvre une «démarche-critères» au lieu d'approuver une méthode spécifique (*ibid.*). La démarche-critères permet de définir un ensemble de critères (valeurs numériques) qu'une méthode doit satisfaire pour être applicable (c'est-à-dire «adaptée au but») à une norme donnée. La démarche-critères est applicable aux méthodes de type II et III entièrement validées, à l'exception de méthodes comme PCR et ELISA, mais n'est pas applicable aux méthodes de type I. La mise en œuvre de la démarche-critères nécessite des données sur l'applicabilité, la fourchette minimale applicable, les limites de détection et de quantification, la précision (notamment des critères reposant sur l'écart-type de reproductibilité relatif), la récupération et la justesse (Manuel de procédure, 22<sup>e</sup> édition 2014, version française, p. 77-78). Le Manuel de procédure décrit deux démarches pour élaborer des critères. La première s'appuie sur la limite spécifiée (limite maximale ou minimale) pour établir des critères numériques visant les paramètres susmentionnés, présentés dans le tableau 1. La seconde repose sur la conversion d'une méthode donnée pour dégager des critères numériques pour les paramètres récapitulés dans le tableau 1. Certes, il faut que la méthode soit validée et convienne pour l'analyte et le produit considérés, mais elle n'a pas à être spécifiquement approuvée avant d'être «convertie» en critères. Bien que le Manuel de procédure ne le précise pas explicitement, les *Recommandations relatives à l'établissement de valeurs numériques pour les critères méthodologiques* ont été élaborées en ne tenant compte que de déterminations à un seul analyte, c'est-à-dire uniquement des méthodes mesurant la concentration d'un analyte donné et dans lesquelles la détermination repose sur une comparaison avec une spécification.

### Tableau 1: Recommandations relatives à l'établissement de valeurs numériques pour les critères méthodologiques

#### Applicabilité:

La méthode doit être applicable pour la disposition concernée, le produit considéré et la ou les limites spécifiées (maximale et/ou minimale) (LM). La fourchette minimale applicable de la méthode dépend de la limite spécifiée (LM) à évaluer, et peut être exprimée par l'écart-type de reproductibilité ( $s_R$ ) ou par les limites de détection (LD) et de quantification (LQ).

---

<sup>2</sup> [CX/MAS 14/35/5](#) Document de discussion sur l'examen de procédures pour établir des critères.

<b>Fourchette minimale applicable:</b>	Pour $LM \geq 0,1$ mg/kg, $[LM - 3 s_R, LM + 3 s_R]$ Pour $LM < 0,1$ mg/kg, $[LM - 2 s_R, LM + 2 s_R]$
<b>Limite de détection (LD):</b>	$s_R^3$ = écart-type de reproductibilité Pour $LM \geq 0,1$ mg/kg, $LD \leq LM \cdot 1/10$ Pour $LM < 0,1$ mg/kg, $LD \leq LM \cdot 1/5$
<b>Limite de quantification (LQ):</b>	Pour $LM \geq 0,1$ mg/kg, $LQ \leq LM \cdot 1/5$ Pour $LM < 0,1$ mg/kg, $LQ \leq LM \cdot 2/5$

**Précision:** Pour  $LM \geq 0,1$  mg/kg,  $HorRat \leq 2$   
Pour  $LM < 0,1$  mg/kg,  $RSD_R < 22$  % [44 %?].  
 $RSD_R^4$  = écart-type de reproductibilité relatif.  
 $RSD_R \leq 2 \cdot PRSD_R$

<b>Récupération (R):</b>	<b>Concentration</b>	<b>Rapport</b>	<b>Unité</b>	<b>Récupération (%)</b>
	100	1	100 % (100 g/100 g)	98 – 102
	$\geq 10$	$10^{-1}$	$\geq 10$ % (10 g/100 g)	98 – 102
	$\geq 1$	$10^{-2}$	$\geq 1$ % (1 g/100 g)	97 – 103
	$\geq 0,1$	$10^{-3}$	$\geq 0,1$ % (1 mg/g)	95 – 103
	0,01	$10^{-4}$	100 mg/kg	90 – 107
	0,001	$10^{-5}$	10 mg/kg	80 – 110
	0,0001	$10^{-6}$	1 mg/kg	80 – 110
	0,00001	$10^{-7}$	100 µg/kg	80 – 110
	0,000001	$10^{-8}$	10 µg/kg	60 – 115
	0,0000001	$10^{-9}$	1 µg/kg	40 – 120

**Justesse:** D'autres directives sont disponibles pour les fourchettes de récupération attendues dans des domaines d'analyse spécifiques.  
Dans les cas où il a été démontré que les récupérations sont une fonction de la matrice, d'autres spécifications peuvent être appliquées.  
Pour l'évaluation de la justesse, il est préférable d'utiliser du matériau de référence certifié.

22. Les critères du tableau 1 doivent être approuvés pour la détermination en question.

### SPÉCIFICATIONS EXIGEANT UNE COMBINAISON DE COMPOSANTS

23. Bien que le Manuel de procédure ne le précise pas spécifiquement, les *Recommandations relatives à l'établissement de valeurs numériques pour les critères méthodologiques* ont été élaborées en ne tenant compte que de déterminations à un seul analyte. Le document CX/MAS 14/35/5 du Comité sur les méthodes d'analyse et d'échantillonnage indique que les démarches détaillées relatives aux analytes isolés formulées dans le Manuel de procédure ne conviennent pas pour établir des critères pour les spécifications exigeant la détermination d'une combinaison de composants. Citons par exemple les aflatoxines dans les fruits à coque encadrées par la *Norme générale pour les contaminants et les toxines présents dans les produits destinés à la consommation humaine et animale* (CODEX STAN 193-1995): la spécification porte sur la concentration en aflatoxines totales, obtenue en ajoutant B1, B2, G1 et G2. Le document CX/MAS 14/35/5 décrit différentes d'options en détail, avec les avantages et les inconvénients de chacune aux fins d'établir des critères dans ce type de situation. Voici ces options:

- Option 2-1: considérer la spécification (somme de composants) comme la limite spécifiée (limite maximale/minimale) et élaborer des critères numériques à partir de cette limite et des paramètres énumérés dans le tableau 1.
- Option 2-2: choisir une méthode adaptée et convertir cette méthode en critères à l'aide des recommandations existantes du Manuel de procédure.
  - Option 2-2A: établir des critères numériques en se fondant sur la méthode approuvée pour chacun des composants respectivement.

<sup>3</sup> Le  $s_R$  doit être calculé à l'aide de l'équation de Horwitz/Thompson. Lorsque cette équation ne peut être appliquée (à des fins d'analyse ou conformément à la réglementation) ou lorsque l'on «convertit» des méthodes en critères, il doit reposer sur le  $s_R$  obtenu dans une étude de la performance des méthodes appropriée.

<sup>4</sup> Le  $RSD_R$  doit être calculé à l'aide de l'équation de Horwitz/Thompson. Lorsque cette équation ne peut être appliquée (à des fins d'analyse ou conformément à la réglementation) ou lorsque l'on «convertit» des méthodes en critères, il doit reposer sur le  $RSD_R$  obtenu dans une étude de la performance des méthodes appropriée.

- Option 2-2B: établir des critères numériques en se fondant sur la spécification et sur la performance de la méthode pour chacun des composants respectivement.

- Option 2-3: établir des critères numériques en se fondant sur la LM et sur le nombre de composants.

24. Le grand problème commun à toutes les options présentées dans le document CX/MAS 14/35/5 est la détermination du critère lié à l'écart-type de reproductibilité prévu ( $PRSD_R$ ). L'équation de Horwitz/Thompson découle initialement de données associées aux analytes pris isolément, c'est pourquoi elle ne peut être appliquée directement pour obtenir le  $PRSD_R$  d'une «somme de composants». Par conséquent, ni l'équation de Horwitz/Thompson, ni le HorRat ne peuvent servir à fixer une valeur numérique de la précision. Si l'on essayait d'appliquer l'équation de Horwitz/Thompson à une «somme de composants», la précision d'un ou plusieurs de ces composants pourrait avoir à dépasser 100 pour cent. Les intervenants débattant du document CX/MAS 14/35/5 se sont largement accordés sur le fait qu'il ne convient pas de calculer le  $PRSD_R$  pour des spécifications de somme de composants à partir de la LM elle-même, car lorsqu'il faut analyser plusieurs composants, les mesures relatives à chaque analyte sont corrélées et ne sont donc pas indépendantes. Si l'équation de Horwitz/Thompson est appliquée, il faut limiter son utilisation aux mesures d'analytes pris isolément.

25. En réalité, la majorité des mesures effectuées pour des spécifications de sommes de composants satisfont la condition de Thompson ( $PRSD_R = 22\%$ ) pour les concentrations concernées, si bien que chaque méthode présentant un  $PRSD_R$  de 22 pour cent pour chaque analyte devrait avoir une précision acceptable. Pour des concentrations supérieures, la valeur de Horwitz constituera probablement le critère adapté.

26. Par ailleurs, le document CX/MAS 14/35/5 soulevait la question suivante: dans le cadre du Codex, est-il «permis» d'établir des critères pour des analytes pour lesquels il n'y a pas de spécifications? Bien qu'il s'agisse d'une question pertinente, le présent document de travail estime que s'il existe des spécifications individuelles pour les analytes (comme c'est le cas pour les aflatoxines dans la norme CODEX STAN 193-1995), ces derniers sont associés par défaut à la spécification totale et l'on peut donc définir des critères.

27. Le document CX/MAS 14/35/5 indique, sans toutefois le formuler explicitement, que l'option 2-3 est la plus pragmatique. Selon cette option, les critères numériques sont établis en se fondant sur la LM et sur le nombre de composants.

28. Voici les recommandations du Manuel de procédure pour déterminer les valeurs numériques de la limite de quantification:

**Limite de quantification (LQ):** Pour  $LM \geq 0,1$  mg/kg,  $LQ \leq LM \cdot 1/5$   
 Pour  $LM < 0,1$  mg/kg,  $LQ \leq LM \cdot 2/5$

29. Cela vaut pour l'analyse d'un seul composant. Quand la LM vise une somme de composants, la LQ de chacun d'entre eux doit théoriquement rester sous des seuils correspondants. S'agissant de la somme de deux composants, la LQ de chacun d'eux doit représenter la moitié de la LQ cumulée, et pour la somme de trois composants, la LQ de chacun d'eux doit représenter un tiers de la LQ cumulée.

30. D'après ce principe, voici les critères suggérés concernant la limite de quantification:

**Limite de quantification (LQ):** Pour  $LM \geq 0,1$  mg/kg,  $LQ \leq LM \cdot 1/5 \cdot 1/n$   
 Pour  $LM < 0,1$  mg/kg,  $LQ \leq LM \cdot 2/5 \cdot 1/n$   
 Où  $n$  = nombre de composants

31. Pour les analyses de plusieurs composants ayant la même pondération,  $n$  est le nombre de composants/analytes. On en déduit ainsi les critères pour les méthodes multianalytes (et un seul analyte, soit  $n = 1$ ) indiqués dans le tableau 2.

## Tableau 2: Recommandations relatives à l'établissement de valeurs numériques pour les critères méthodologiques

**Applicabilité:** La méthode doit être applicable pour la disposition concernée, le produit considéré et la ou les limites spécifiées (maximale et/ou minimale) (LM). La fourchette minimale applicable de la méthode dépend de la limite spécifiée (LM) à évaluer, et peut être exprimée par l'écart-type de reproductibilité ( $s_R$ ) ou par les limites de détection (LD) et de quantification (LQ).

**Fourchette minimale applicable pour les composants individuels<sup>5</sup>:**Pour  $LM/n \geq 0,1$  mg/kg,  $[LM/n - 3 s_R, LM + 3 s_R]$ Pour  $LM/n < 0,1$  mg/kg,  $[LM/n - 2 s_R, LM + 2 s_R]$ 

Remarque: la concentration supérieure des composants individuels dépasse la LM.

**Limite de détection (LD) pour les composants individuels:**Pour  $LM/n \geq 0,1$  mg/kg,  $LD \leq LM/n \cdot 1/10$ Pour  $LM/n < 0,1$  mg/kg,  $LD \leq LM/n \cdot 1/5$ **Limite de quantification (LQ) pour les composants individuels:**Pour  $LM/n \geq 0,1$  mg/kg,  $LQ \leq LM/n \cdot 1/5$ Pour  $LM/n < 0,1$  mg/kg,  $LQ \leq LM/n \cdot 2/5$ **Précision pour les composants individuels:**Pour  $LM/n \geq 0,1$  mg/kg,  $HorRat \leq 2$ Pour  $LM/n < 0,1$  mg/kg,  $RSD_R < 44$  % $RSD_R$  = écart-type de reproductibilité relatif

Récupération (R):	Concentration	Rapport	Unité	Récupération (%)
	100	1	100 % (100 g/100 g)	98 – 102
	$\geq 10$	$10^{-1}$	$\geq 10$ % (10 g/100 g)	98 – 102
	$\geq 1$	$10^{-2}$	$\geq 1$ % (1 g/100 g)	97 – 103
	$\geq 0,1$	$10^{-3}$	$\geq 0,1$ % (1 mg/g)	95 – 103
	0,01	$10^{-4}$	100 mg/kg	90 – 107
	0,001	$10^{-5}$	10 mg/kg	80 – 110
	0,0001	$10^{-6}$	1 mg/kg	80 – 110
	0,00001	$10^{-7}$	100 $\mu$ g/kg	80 – 110
	0,000001	$10^{-8}$	10 $\mu$ g/kg	60 – 115
	0,0000001	$10^{-9}$	1 $\mu$ g/kg	40 – 120

**Justesse:**

D'autres directives sont disponibles pour les fourchettes de récupération attendues dans des domaines d'analyse spécifiques. Dans les cas où il a été démontré que les récupérations sont une fonction de la matrice, d'autres spécifications peuvent être appliquées. Pour l'évaluation de la justesse, il est préférable d'utiliser sur matériau de référence certifié.

**Exemple A:**

Aflatoxines dans les arachides, comportant 4 analytes: B1, B2, G1 et G2.

$LM = 15 \mu\text{g/kg}$

Sachant qu'il y a quatre analytes,  $n = 4$ ,

$LM/n = 15/4 \mu\text{g/kg} = 3,75 \mu\text{g/kg}$

Grâce à la feuille de calcul Excel disponible sur [www.nmkl.org](http://www.nmkl.org) en cliquant sur «How to get method criteria based on ML» (comment obtenir des critères pour une méthode à partir de la LM), on obtient les valeurs suivantes:

<sup>5</sup> Pour les analyses de plusieurs composants ayant la même pondération,  $n$  est le nombre de composants/analytes.

<b>Fourchette minimale applicable pour les <u>composants individuels</u>:</b>	0,002* – 0,022** mg/kg = 2 – 22 µg/kg *correspondant à LM = 3,75 µg/kg **correspondant à LM = 15 µg/kg
<b>Limite de détection (LD) pour les <u>composants individuels</u>:</b>	0,75 µg/kg
<b>Limite de quantification (LQ) pour les <u>composants individuels</u>:</b>	1,5 µg/kg
<b>Précision pour les <u>composants individuels</u>:</b>	RSD <sub>R</sub> ≤ 44 %
<b>Récupération (R):</b>	40 – 120 %

Exemples de méthodes répondant aux critères:

Méthode 999.07 de l'AOAC (chromatographie d'immunoaffinité en phase liquide avec dérivation post-colonne)

Méthode 2005.08 de l'AOAC (chromatographie en phase liquide avec dérivation photochimique post-colonne)

Exemples de méthodes ne répondant pas aux critères:

Méthode 975.36 de l'AOAC (méthode avec minicolonne de Romer) applicable pour les concentrations ≥ 10 µg/kg

Méthode 990.34 de l'AOAC (dosage d'immunoabsorption par enzyme liée avec ImmunoDot) pour les concentrations ≥ 20 µg/kg

Méthodes 970.45 et 998.03 de l'AOCS–AOAC, méthode 993.17 de l'AOAC (chromatographie sur couche mince)

Exemple B:

*Biotoxines du groupe des acides okadaïques (OA), en postulant une pondération égale de tous les composants (TEF non appliqués).*

$$LM = 0,16 \text{ mg/kg}^6$$

Sachant qu'il y a trois analytes,  $n = 3$ ,

$$LM/n = 0,16/3 \text{ mg/kg} = 0,05 \text{ mg/kg}$$

Grâce à la feuille de calcul Excel disponible sur [www.nmkl.org](http://www.nmkl.org) en cliquant sur «How to get method criteria based on ML» (comment obtenir des critères pour une méthode à partir de la LM), on obtient les valeurs suivantes:

<b>Fourchette minimale applicable pour les <u>composants individuels</u>:</b>	0,03* – 0,26** mg/kg *correspondant à LM = 0,05 mg/kg **correspondant à LM = 0,16 mg/kg
<b>Limite de détection (LD) pour les <u>composants individuels</u>:</b>	0,01 mg/kg
<b>Limite de quantification (LQ) pour les <u>composants individuels</u>:</b>	0,02 mg/kg
<b>Précision pour les <u>composants individuels</u>:</b>	RSD <sub>R</sub> ≤ 44 %
<b>Récupération (R):</b>	60 – 115 %

Exemples de méthodes répondant aux critères:

Aucune

<sup>6</sup> Officiellement, la LM de 0,16 mg/kg vaut pour les équivalents acide okadaïque, mais pour cet exemple nous n'avons pas tenu compte des TEF.



Exemples de méthodes ne répondant pas aux critères:

Laboratoire de référence de l'Union européenne pour les biotoxines marines, procédure opérationnelle standard pour OA et AZA, 2011. Dans cette méthode, la limite de quantification est estimée à 0,04 mg/kg à la fois pour OA et AZA.

Exemple C:

Biotoxines du groupe des saxitoxines (STX), en postulant une pondération égale de tous les composants (TEF non appliqués).

$$LM = 0,8 \text{ mg/kg}^7$$

Sachant qu'il y a quinze analytes,  $n = 15$ ,

$$LM/n = 0,8/15 \text{ mg/kg} = 0,05 \text{ mg/kg}$$

Grâce à la feuille de calcul Excel disponible sur [www.nmkl.org](http://www.nmkl.org) en cliquant sur «How to get method criteria based on ML» (comment obtenir des critères pour une méthode à partir de la LM), on obtient les valeurs suivantes:

<b>Fourchette minimale applicable pour les composants individuels:</b>	0,03* – 1,2** mg/kg
	*correspondant à LM = 0,05 mg/kg
	**correspondant à LM = 0,8 mg/kg
<b>Limite de détection (LD) pour les composants individuels:</b>	0,01 mg/kg
<b>Limite de quantification (LQ) pour les composants individuels:</b>	0,02 mg/kg
<b>Précision pour les composants individuels:</b>	RSD <sub>R</sub> ≤ 44 %
<b>Récupération (R):</b>	60 – 115 %

Exemples de méthodes répondant aux critères:

Méthode 2005.06 de l'AOAC (toxines IPM chez les mollusques). La limite de quantification estimée de cette méthode vaut 0,02 mg/kg pour STX et 0,008 mg/kg pour dcSTX.

Exemples de méthodes ne répondant pas aux critères:

Méthode 2005.06 de l'AOAC (toxines IPM chez les mollusques). La limite de quantification estimée de cette méthode vaut 0,125 mg/kg pour GTX 2 et 3 (ensemble), et 0,03 mg/kg pour B-1.

23. Si les méthodes données dans les exemples B et C présentent chacune une précision acceptable, elles ne satisfont cependant pas les critères associés à la limite de quantification pour chaque analyte. Ce constat met en lumière un problème théorique saillant lorsque les limites de quantification et de détection sont estimées au prorata du nombre d'analytes ( $n$ ). Plus le nombre d'analytes est important, plus la LQ requise est faible, si la spécification vise une somme de composants.

24. L'option 2-2A du document CX/MAS 14/35/5 décrit comment on pourrait établir des critères numériques à partir de la méthode approuvée respectivement pour les divers composants. L'annexe 2 du document CX/MAS 14/35/5 indique que le RSD<sub>total</sub> diminue lorsque le nombre de composants augmente. Cela étant, la réflexion présentée dans cette annexe ne tient pas compte des effets de corrélation et de covariance, problèmes dont l'exemple D<sup>8</sup> suivant illustre l'importance.

Exemple D

Le tableau 3 présente des résultats d'analyse des aflatoxines B1, B2, G1 et G2 dans les denrées alimentaires, plusieurs laboratoires ayant communiqué des résultats séparés pour ces quatre aflatoxines dans une denrée donnée. Sont également fournis les variances et écarts-types correspondants. Peut-on directement estimer l'écart-type pour les aflatoxines totales à partir de ces quatre écarts-types?

<sup>7</sup> Officiellement, la LM de 0,8 mg/kg vaut pour les équivalents acide okadaïque, mais pour cet exemple nous n'avons pas tenu compte des TEF.

<sup>8</sup> RSC, Document technique AMC n° 30, 2008. *The standard deviation of the sum of several variables* (écart-type pour la somme de plusieurs variables) (<http://www.rsc.org/Membership/Networking/InterestGroups/Analytical/AMC/TechnicalBriefs.asp>).



Tableau 3: Résultats d'essais répliqués pour la détermination des aflatoxines (fraction massique exprimée en ppb)

Laboratoire	B1	B2	G1	G2	Total
1	8,5	4,3	3,5	1,6	17,9
2	4	2,5	1,7	2,1	10,3
3	6,6	3,6	2,1	2	14,3
4	5,9	3,4	2,3	2,2	13,8
6	4,2	2,2	1,8	1,6	9,8
7	6,2	3,5	2,6	2,7	15,0
8	7,1	3,8	2,6	2,5	16,0
8	5,2	3,4	2,1	2,2	12,9
9	4,9	2,45	2,15	1,8	11,3
10	6,3	3,3	2,3	1,9	13,8
Variance	1,881	0,438	0,259	0,129	6,40
Écart-type	1,371	0,662	0,509	0,359	2,53

Si l'on suppose que les résultats obtenus pour les quatre aflatoxines ne sont pas corrélés, l'écart-type de la somme de ces composants est la racine carrée de la somme des variances respectives, soit:

$$\sqrt{1.881 + 0.438 + 0.259 + 0.129} = 1.65$$

Mais si l'on calcule les aflatoxines totales obtenues respectivement par les différents laboratoires, on dégage les valeurs indiquées dans la dernière colonne du tableau 3. Ces valeurs affichent un écart-type de 2,53, bien supérieur à l'estimation ci-dessus. Pourquoi une telle différence?

Les résultats divergent parce que les observations ne sont pas indépendantes. Leur corrélation est nette. On peut le constater en calculant leurs covariances  $cov(x,y)$  (tableau 4) ainsi que les coefficients de corrélation associés  $r(x,y)$  (tableau 5) à l'aide des formules suivantes:

$$cov(x, y) = \sum_i \frac{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{n - 1}$$

$$\equiv r(x, y)s_x s_y$$

Où  $x_i, y_i$  sont les  $i$ -èmes paires de variables  $x, y$ ,  $s_x$  et  $s_y$  étant les écarts-types respectifs.

Tableau 4: Matrice de covariance

	B1	B2	G1	G2
B1	<b>1,881</b>	0,848	0,635	0,032
B2	0,848	<b>0,438</b>	0,277	0,066
G1	0,635	0,277	<b>0,259</b>	0,000
G2	0,032	0,066	0,000	<b>0,129</b>

Tableau 5: Coefficients de corrélation

	B1	B2	G1	G2
B1	1	0,934	0,909	0,064
B2	0,934	1	0,823	0,276
G1	0,909	0,823	1	0,000
G2	0,064	0,276	0,000	1

Plusieurs coefficients de corrélation dépassent largement 0,5, indiquant qu'en pratique, ils modifient l'écart-type cumulé.

Étant donné qu'il existe une corrélation entre les variables, comme le montrent les données fournies en exemple, l'écart-type correct de la somme des composants est égal à la racine carrée de la somme des variances et des covariances, soit:

$$\sqrt{(1.881 + 0.438 + 0.259 + 0.129 + 2(0.848 + 0.635 + 0.032 + 0.277 + 0.066 + 000))} = 2.53$$

Comme nous l'avons vu précédemment, ce résultat peut être obtenu directement en calculant l'écart-type simple des concentrations en aflatoxines totales mesurées. (Remarquez que les covariances  $cov(x,y)$  et  $cov(y,x)$  sont toutes deux incluses dans la somme, d'où le facteur 2 pour les variables de covariance.)

On appliquera exactement les mêmes principes pour estimer l'incertitude-type d'une somme de variables. L'écart-type ci-dessus fournit l'incertitude-type associée aux effets aléatoires pour la teneur en aflatoxines totales communiquée par un laboratoire donné. Pour une moyenne de  $n$  résultats (issus par exemple d'une série d'observations réalisées dans un essai mené par un seul laboratoire), il faut diviser l'écart-type calculé par  $\sqrt{n}$ .

S'il existe une quelconque corrélation entre les variables à additionner (ou combinées de quelque manière que ce soit), il importe de l'intégrer correctement dans le calcul de l'écart-type des résultats. Quand les données brutes sont disponibles, deux approches sont possibles: soit calculer les résultats séparés puis déterminer leur écart-type, soit calculer les covariances nécessaires puis les additionner. Quand seuls les écarts-types et les coefficients de corrélation (ou les covariances) sont disponibles, l'unique solution consiste à déterminer l'écart-type cumulé à partir des covariances.

25. L'exemple D présente une manière de déterminer l'incertitude (type) de mesure de résultats d'analyse portant sur des sommes de composants, mais d'autres démarches sont accessibles dans la littérature<sup>9,10</sup>.

26. La section II (page 93) du *Manuel de procédure* indique: «Une marge de tolérance doit être fixée pour l'incertitude de mesure lorsqu'on décide si un résultat analytique répond ou non à la spécification. Cette exigence peut ne pas s'appliquer dans des situations où il existe un danger direct pour la santé, par exemple dans le cas de pathogènes d'origine alimentaire.» Les *Directives sur l'incertitude de mesure* (CAC/GL 54-2004) offrent des orientations générales sur l'incertitude de mesure, mais n'abordent pas la question de l'incertitude de mesure associée aux valeurs analytiques elles-mêmes obtenues en additionnant des composants. Les *Directives pour l'estimation de l'incertitude des résultats* (CAC/GL 59-2006) formulent des recommandations quant à l'estimation de l'incertitude des résultats d'analyse des pesticides: «L'estimation de l'incertitude des résultats pour les résidus composites provenant de l'association de plusieurs techniques, comme les isomères structuraux et optiques, les métabolites et autres produits de fractionnement, peut exiger une approche différente en particulier lorsque la LMR a été établie pour la somme de tous ou de

<sup>9</sup> Gauthier Epe, Gianfranco Diletti, Alwyn Fernandes, Johannes Haedrich, Jerry Hart, Helge Hove, Anna Laura Iamiceli, Alexander Kotz, Rainer Malisch, Philippe Marchand, Wolfgang Moche, Georges Scholl, Giampiero Scortichini, Thorsten Bernsmann, Yves Tondeur et Wim Traag. Measurement Uncertainty for Persistent Organic Pollutants by Isotope-Dilution Mass Spectrometry (Incertitude de mesure des polluants organiques persistants par spectrométrie de masse avec dilution isotopique). Publication présentée à Dioxins 2014 (sous presse?).

<sup>10</sup> Medina-Pastor, P., Valverde, A., Pihlstrom, T., Masselte, S., Gamon, M., Mezcuca, M., Rodriguez-Torreblanca, C. et Fernandez-Alba, A. R. Comparative study of the main top-down approaches for the estimation of measurement uncertainty in multiresidue analysis of pesticides in fruits and vegetables (Étude comparative des principales approches descendantes de l'estimation de l'incertitude de mesure dans les analyses multirésidus de pesticides dans les fruits et légumes). *J. Agric. Food Chem.* **59**, 7609-19, 2011.

certaines des composants. L'estimation des erreurs aléatoires et systématiques des résultats fondée sur la mesure de pics multiples est expliquée en détail dans une publication récente<sup>11</sup>.»

27. Si elles ne justifient pas explicitement l'élaboration du présent document, les questions soulevées dans les exemples B, C et D, ainsi que dans les paragraphes qui précèdent, mettent en lumière la nécessité de formuler des indications pour expliquer les démarches pouvant être adoptées pour déterminer l'incertitude de mesure associée à des résultats d'analyse obtenus en additionnant des composants.

28. Bien que le document CX/MAS 14/35/5 exprime des réserves sur l'approche correspondant à l'option 2-2A, cette dernière a été adoptée pour la *Norme pour les mollusques bivalves vivants et crus* (CODEX STAN 292-2008), dans la version révisée de 2014. Dans cette norme, des critères numériques (d'après des conseils du CCMAS) ont été établis à partir des méthodes approuvées pour chacun des composants de chaque groupe de toxines. Ce choix fixe donc une orientation. Le Codex encadre un nombre limité de domaines analytiques exigeant la mise en œuvre d'une démarche pour les méthodes qui utilisent des sommes de composants. Par voie de conséquence, et en raison des difficultés exprimées dans les paragraphes précédents, il est recommandé que là où il faut établir des critères numériques pour ce type de méthode, ces critères seront définis à partir des méthodes approuvées pour chacun des composants, et non de façon théorique en se fondant sur la LM.

### FACTEURS D'ÉQUIVALENCE TOXIQUE

29. Pour certains produits ou analytes, la spécification repose sur la détermination des concentrations respectives des multiples analytes à l'aide d'une seule méthode, puis la conversion de ces concentrations en «équivalents toxiques» grâce à un facteur d'équivalence toxique (TEF). La spécification est alors une limite fondée sur la somme des équivalents. Cette approche est illustrée par la détermination des toxines du groupe saxitoxines dans la *Norme pour les mollusques bivalves vivants et crus* (CODEX STAN 292-2008). La spécification vaut pour la concentration d'équivalents saxitoxines déterminée à partir des valeurs obtenues pour 12 congénères de la saxitoxine<sup>12</sup> multipliées par un TEF et additionnées. Les TEF sont également utilisés pour d'autres déterminations, comme dans le cas des dioxines, des PCB de type dioxine et des HAP. La démarche-critères actuellement indiquée dans le Manuel de procédure a été élaborée sans tenir compte des spécifications qui ont recours aux TEF ou à une somme d'équivalents toxiques.

30. Faire appel aux TEF pour déterminer un «équivalent toxique» nécessite un calcul, et si ce calcul fait partie de la méthode, alors conformément à ses pratiques antérieures le CCMAS la classe en type I. Même si la procédure d'analyse visant à déterminer la valeur avant conversion est rationnelle (type II/III), la détermination finale est de type I car le calcul est empirique. Une autre option à l'intégration des TEF dans la méthode consisterait à les inclure dans la norme.

31. Lorsque des TEF sont fixés, ils se rapportent normalement à la substance la plus toxique de la gamme de substances analysées. Une démarche pragmatique consisterait à s'assurer que les critères de performance spécifiés pour une méthode propre à un analyte fassent référence au composant le plus toxique (par exemple STX parmi les toxines IPM chez les mollusques (Oshima)), car cela correspondra à la fraction massique la plus faible et donc à la précision attendue la plus basse. Si le modèle de Horwitz s'applique idéalement, tous les autres composants seront plus précis s'ils représentent la principale substance d'un échantillon d'analyse à la limite, leur fraction massique étant supérieure. Ainsi, si une méthode est valide lorsque le composant le plus toxique est à la limite d'équivalents toxiques, elle fonctionnera mieux pour cette somme de composants pondérée différemment à la limite.

32. Lors des discussions du document CX/MAS 14/35/5, à la trente-cinquième session du CCMAS, les intervenants sont largement convenus que les TEF ne doivent pas être intégrés dans une méthode d'analyse spécifique, mais qu'il faut les inclure dans la norme. C'est l'approche adoptée pour modifier la *Norme pour les mollusques bivalves vivants et crus* (CODEX STAN 292-2008), dans laquelle des critères de performance numériques non pondérés (TEF non appliqués) ont été établis à partir des différentes méthodes approuvées.

### CRITÈRES DE PERFORMANCE NUMÉRIQUES POUR LES MÉTHODES BIOLOGIQUES

33. Jusqu'à présent, le Comité sur les méthodes d'analyse et d'échantillonnage a estimé qu'une méthode biologique comme les essais biologiques sur la souris devait être classée en type I (méthode-critère) lorsqu'elle détermine une valeur à laquelle elle seule permet d'aboutir, et constitue donc par définition la seule méthode applicable pour établir la valeur approuvée du paramètre mesuré.

<sup>11</sup> Soboleva E., Ambrus A. et Jarju O. Estimation of uncertainty of analytical results based on multiple peaks (Estimation de l'incertitude des résultats analytiques fondée sur des pics multiples), *J. Chromatogr. A.* **1029**, 161-166, 2004.

<sup>12</sup> On connaît plus de douze congénères de la saxitoxine, toutefois la méthode aujourd'hui approuvée (méthode 2005.05 de l'AOAC) n'en énumère que douze.

34. Le tableau 6 récapitule les résultats d'une recherche effectuée dans les *Méthodes d'analyse et d'échantillonnage recommandées* (CODEX STAN 234-1999) avec le mot-clé «essai biologique», en indiquant dans quel type ont été classées les méthodes en question.

**Tableau 6: Méthodes de type «essai biologique» présentées dans la norme CODEX STAN 234-1999**

Produit	Disposition	Méthode	Principe	Type
Margarine	Vitamine D	AOAC 936.14	Essai biologique sur le rat	II
Minarine	Vitamine D	AOAC 936.14	Essai biologique sur le rat	II
Aliments spéciaux	Acide folique	AOAC 944.12	Essai microbiologique	II
Aliments spéciaux	Nicotinamide pour les produits lactés	AOAC 944.13	Essai microbiologique	II
Aliments spéciaux	Acide pantothénique/ aliments enrichis	AOAC 945.74	Essai microbiologique	II
Aliments spéciaux	Acide pantothénique/ aliments non enrichis	The Analyst 89 (1964):1, 3-6, ibid. 232 Département de l'Agriculture des États-Unis, Agr. Handbook 97 (1965).	Essai microbiologique	IV
Aliments spéciaux	Coefficient d'efficacité protéique (CEP)	AOAC 960.48	Essai biologique sur le rat	I
Aliments spéciaux	Vitamine B12	AOAC 952.20	Essai microbiologique	II
Aliments spéciaux	Vitamine B6	AOAC 961.15	Essai microbiologique	II
Aliments spéciaux	Vitamine D	AOAC 936.14	Essai biologique sur le rat	IV
Préparations pour nourrissons et préparations de suite	Acide pantothénique	AOAC 992.07 (Mesure l'acide D-pantothénique (ou D-pantothénate de calcium) en cumulant les pantothénates totaux, soit les formes libres, liées à CoA et liées à l'ACP de l'acide pantothénique)	Essai microbiologique	II
Préparations pour nourrisson	Acide folique	AOAC 992.05 (Mesure l'acide folique en cumulant l'acide folique libre ainsi que les folates naturels libres et non liés) EN 14131:2003 (Mesure l'acide folique en cumulant les folates totaux libres et liés)	Essai microbiologique	II
Préparations pour nourrisson	Niacine	AOAC 985.34 (niacine préformée et nicotinamide)	Essai microbiologique et turbidité	III
Préparations pour nourrisson	Vitamine B6	AOAC 985.32	Essai microbiologique	III
Préparations pour nourrisson	Vitamine B6	EN 14166:2008 (Mesure la pyridoxine en cumulant le pyridoxal, la pyridoxine et la pyridoxamine libres et liés)	Essai microbiologique	III

35. Bien que la méthode 936.14 de l'AOAC soit classée comme essai biologique dans la norme CODEX STAN 234, il s'agit en fait d'un essai biologique sur le rat. Les méthodes de type essai biologique sur le rat indiquées dans la norme CODEX STAN 234 sont classées en type I, type II (méthode de référence) ou type IV (méthode provisoire). À la trente-septième session du Comité sur les méthodes d'analyse et d'échantillonnage, les essais biologiques sur la souris (AOAC 959.08) et l'essai de liaison aux récepteurs (AOAC 2011.27) ont été classés en type IV, donnant lieu à d'importants débats, à la trente-septième session de la Commission du Codex Alimentarius.

36. Partant de ces renseignements, il est difficile de distinguer une approche cohérente dans le classement par type des méthodes biologiques comme les essais biologiques sur le rat ou la souris. À la trente-sixième session du CCMAS, il a été recommandé que le Comité étudie la formation d'un groupe de travail électronique pour examiner plus en détail le classement par type des essais biologiques sur le rat ou la souris, en vue de mettre en place une approche harmonisée et cohérente.

37. Si l'on considère que toutes les méthodes de type essai biologique sur le rat ou la souris sont de type I, la question des critères de performance numériques ne se pose plus car ces méthodes sont considérées comme des méthodes-critères et n'ont donc pas d'équivalents.

38. Si l'on estime que les méthodes de type essai biologique sur le rat ou la souris peuvent être classées en type II, il convient d'adopter la démarche présentée dans l'option 2-2A du document CX/MAS 14/35/5 (établir les critères numériques en se fondant sur la méthode approuvée) dans la lignée des choix effectués pour la norme du Codex 292-2008. Si les méthodes de type essai biologique sur le rat ou la souris peuvent être classées en type II, il faudra peut-être qu'un groupe de travail électronique se penche sur l'équivalence entre les méthodes biologiques et chimiques.

#### **RECOMMANDATIONS PROVISOIRES ET POINTS À EXAMINER**

- 1) S'il faut établir des critères de performance numériques pour les méthodes répondant aux dispositions qui visent la somme de composants analytiques, ces critères doivent être élaborés à partir des méthodes approuvées pour chacun des composants, et non à partir de la LM.
- 2) Si les critères de performance numériques sont établis pour des dispositions qui impliquent une somme de composants, il convient de les élaborer pour chacun des composants sans appliquer de pondération.
- 3) Si les recommandations 1 et 2 sont acceptées, alors la section intitulée *Critères généraux régissant le choix des méthodes d'analyse* du Manuel de procédure doit être amendée pour souligner que les protocoles fondés sur la LM ne conviennent que pour les analyses portant sur un seul analyte, et que s'il faut établir des critères pour les dispositions visant une somme de composants, alors on privilégiera un protocole fondé sur la méthode approuvée.
- 4) Si les dispositions nécessitent l'utilisation de facteurs d'équivalence toxique (TEF), ces derniers doivent figurer dans la spécification du Codex mais ne pas entrer en jeu dans l'établissement des critères de performance numériques.
- 5) Le cadre des attributions du groupe de travail sur les méthodes qui utilisent des sommes de composants doit être élargi pour intégrer l'élaboration d'un document de travail sur les démarches pouvant servir à établir l'incertitude de mesure des résultats obtenus en additionnant des composants.
- 6) Il faut que le Comité sur les méthodes d'analyse et d'échantillonnage envisage de créer un groupe de travail électronique pour examiner les problèmes actuellement liés au classement par type des méthodes reposant sur un essai biologique sur le rat ou la souris, et pour étudier leur équivalence vis-à-vis des analyses chimiques.