

IV.3. ROBUSTESSE

IV.3.1. INTRODUCTION

La robustesse d'une procédure analytique est la mesure de sa capacité à rester non affectée par des petites variations délibérées des conditions opératoires de la procédure. Elle fournit une indication sur la fiabilité durant l'usage normal d'une méthode analytique [56, 59, 61, 62, 64, 65].

Le test de robustesse est important en vue d'identifier les facteurs opératoires qui ne sont pas nécessairement étudiés en phase de développement de la méthode, mais qui pourraient avoir une influence sur les résultats, et par conséquent d'anticiper les problèmes pouvant survenir au moment de l'application de la méthode, par exemple lors de l'analyse de routine ou lors d'une étude collaborative [59, 64, 65]. Si les mesures sont sensibles aux variations des conditions analytiques, il serait indispensable de maintenir constantes ces conditions ou d'introduire des précautions dans la description de la méthode.

Généralement lorsqu'un test de robustesse est effectué, ce sont les réponses qualitatives, par exemple les critères d'évaluation de la performance chromatographique, qui sont souvent prises en compte pour juger de la stabilité de la procédure analytique. Cependant, il est tout aussi important de considérer les réponses quantitatives, par exemple la détermination d'une substance dans un échantillon, étant donné qu'elles constituent le but d'une méthode analytique.

L'objectif poursuivi dans ce travail est de tester la robustesse de la méthode de chromatographie liquide à haute performance (CLHP) que nous avons développée et validée pour la détermination du R-timolol dans le maléate de S-timolol. Nous évaluerons la robustesse des conditions analytiques de la méthode de CLHP en nous basant sur les réponses qualitatives mais aussi et surtout sur les réponses quantitatives.

IV.3.2. PRÉPARATION DES SOLUTIONS

Rappelons que la dissolution des échantillons et la dilution des solutions sont effectuées dans un mélange de solvants composé de 2-propanol et de diéthylamine (99/1, v/v).

IV.3.2.1. SOLUTION UTILISEE POUR LE TEST D'ADEQUATION

Le test d'adéquation du système de CLHP, en anglais « System Suitability Test » (« SST ») est un test qui permet à l'analyste d'apporter un jugement sur le fonctionnement d'un équipement utilisé pour effectuer les mesures analytiques [63]. Dans le cas d'un fonctionnement incorrect, il y a lieu d'apporter une solution appropriée. Selon ICH [243], ce test fait partie intégrante des procédures analytiques. Dans le cadre d'un test de robustesse, le SST permet d'examiner l'adéquation d'une procédure analytique en fonction des variations des facteurs opératoires délibérément introduites dans cette procédure. Dans la suite de ce travail, nous utiliserons le terme SST pour désigner le test d'adéquation du système.

Des solutions mères (à 1 mg/mL) de dimère de timolol (composé N°1), de R-timolol (composé N°2), d'isotimolol (composé N°3), de S-timolol (composé N°4) et de dimorpholinothiadiazole (DMTDZ) (composé N°5) ont été préparées séparément.

Une solution de référence du mélange des cinq composés a été préparée par dilution de chacune des solutions mères en vue d'obtenir des concentrations de 10 µg/mL.

Cette solution a servi pour le SST qui a consisté en la détermination des résolutions aussi bien entre les pics consécutifs (Rs 1-2, Rs 2-3, Rs 3-4, Rs 4-5) qu'entre ceux des énantiomères du timolol (Rs 2-4). Le SST a été effectué au début de chacune des conditions expérimentales générées par le plan d'expériences avant de procéder à l'analyse des échantillons à examiner.

IV.3.2.2. SOLUTIONS UTILISÉES POUR LA DÉTERMINATION QUANTITATIVE

IV.3.2.2.1. Solution de référence

Une solution mère contenant 1,5 mg/mL de maléate de R-timolol substance chimique de référence (SCR) a été préparée. Cette solution a été ensuite diluée cent fois pour obtenir une solution de référence contenant 0,015 mg/mL de maléate de R-timolol correspondant à 1,0 %.

D'autre part, une solution mère contenant 1,5 mg/mL de maléate de S-timolol a été préparée, puis ensuite diluée 250 fois en vue d'obtenir une solution contenant 0,006 mg/mL de maléate de S-timolol correspondant à 0,4 %.

Les solutions de référence à 1,0 % et à 0,4 % ont été utilisées pour déterminer respectivement, le maléate de R-timolol et les autres impuretés dans les différents échantillons de maléate de S-timolol.

Les solutions mères ont été passées au bain à ultrasons pendant environ 15 min. en vue d'assurer une dissolution complète des substances.

IV.3.2.2.2. Solutions à analyser

Plusieurs solutions des échantillons à examiner de maléate de S-timolol ont été préparées dans des ballons jaugés volumétriques de 10 mL en dissolvant une quantité exactement pesée de 15 mg d'échantillon de maléate de S-timolol. Ces solutions ont été placées au bain à ultrasons pour assurer une dissolution complète des substances. Trois nouvelles solutions indépendantes ($n = 3$ répétitions) ont été préparées par échantillon et par expérience. Chaque solution d'échantillon a été analysée dans les conditions de répétabilité.

IV.3.3. RESULTATS ET DISCUSSION

La littérature définit huit étapes pour la réalisation du test de robustesse [58]. Celles-ci sont reprises ci après:

1. identification des facteurs opératoires à tester,
2. définition des différents niveaux pour ces facteurs,
3. sélection du plan expérimental,
4. définition du protocole expérimental,
5. définition des réponses à déterminer ou à étudier selon le cas,
6. exécution des expériences auxquelles sont associées la détermination ou l'étude des réponses sélectionnées,
7. analyse statistique et/ou graphique des effets des facteurs,
8. conclusions pertinentes sur la base des résultats des analyses statistiques et éventuellement amélioration de la procédure analytique si nécessaire.

IV.3.3.1. IDENTIFICATION ET SELECTION DES FACTEURS

Lors d'une étude de robustesse, le choix des facteurs opératoires doit être judicieusement effectué, d'autant plus qu'il dépend de l'objectif poursuivi par l'analyste. Etant donné que dans ce travail nous envisageons de mener une étude collaborative dans laquelle la méthode de CLHP développée et validée sera appliquée, nous avons estimé pertinent d'examiner si le test de robustesse permet effectivement de simuler les variations susceptibles de survenir lors de cette étude collaborative, car en théorie cela est envisageable. De ce fait, il nous a semblé important que la sélection des facteurs à étudier puisse refléter les changements potentiels ou probables observés lors d'une étude collaborative. Ainsi par exemple, différents équipements de CLHP ou des colonnes de différents âges peuvent être utilisés dans une étude collaborative tout comme différents volumes de solvants peuvent être prélevés pour la préparation de la phase mobile. De plus, la longueur d'onde d'un détecteur, même bien fixée, pourrait fournir des valeurs différentes d'un laboratoire à un autre.

Deux facteurs qualitatifs [64] ont été sélectionnés (Tableau IV.12) : le type d'équipement de CLHP et l'âge de la colonne chirale Chiralcel OD-H. Deux systèmes de CLHP provenant de différents fabricants, Shimadzu (A) et Agilent (B), ont été utilisés. Les codes -1 et +1 (voir plus loin) leur ont été arbitrairement attribués. La même codification a été attribuée au facteur âge de la colonne. Ainsi, une colonne nouvelle est codée -1 et une ancienne +1. Avant de progresser plus loin dans ce travail, il nous a semblé important d'expliquer le choix du critère de classification de ce facteur basé sur l'âge ou mieux sur la perte d'efficacité de séparation chromatographique souvent liée à la durée d'utilisation. Nous avons défini une nouvelle colonne comme étant celle pour laquelle la résolution de la paire critique R_{s2-3} observée dans les conditions nominales de CLHP est supérieure à 1,25, alors que pour une colonne ancienne, la résolution R_{s2-3} est inférieure à cette valeur. Rappelons que la paire critique définie en phase d'optimisation est constituée des pics correspondant au R-timolol et à l'isotimolol. Avant de commencer les expériences, les deux colonnes utilisées ont d'abord été testées pour confirmer cette classification. Celle dont le numéro de lot est ODH0CE-BC081 a été trouvée nouvelle ($R_{s2-3} = 1,7$) alors que celle dont le numéro de lot est ODH0CE-IB031 a été considérée comme ancienne (R_{s2-3} observée = 1,1). A côté du facteur âge de la colonne, la variabilité de lot à lot est aussi prise en compte par ce facteur.

Parmi les facteurs quantitatifs, cinq [64] ont été considérés (Tableau IV.12) à savoir les proportions du 2-propanol et de la diéthylamine (DEA) dans la phase mobile, le débit de la phase mobile, la détection de la longueur d'onde et la température de la colonne.

Tableau IV.12. – Domaine expérimental

	Unités	Limites	Niveau (-1)	Niveau (+1)	Nominal
<u>Facteurs qualitatifs</u>					
A. - Type d'équipement de CLHP			Shimadzu	Agilent	Shimadzu
B. - Age de la colonne			Ancienne	Nouvelle	Nouvelle
<u>Facteurs quantitatifs</u>					
C. - Pourcentage du 2-propanol dans la phase mobile	%	± 0,5	3,0	4,0	3,5
D. - Pourcentage de la DEA dans la phase mobile	%	± 0,05	0,05	0,15	0,10
E. – Débit de la phase mobile	mL/min	± 0,1	0,9	1,1	1,0
F. - Longueur d'onde	nm	± 5	292	302	297
G. - Température de la colonne	°C	-3 ; +7	20	30	23

IV.3.3.2. DEFINITION DES NIVEAUX DES FACTEURS

Les niveaux des facteurs sont indiqués dans le tableau IV.12. En général pour les facteurs quantitatifs (pourcentages de 2-propanol et de DEA dans la phase mobile, longueur d'onde du détecteur et débit de la phase mobile), les niveaux extrêmes sont situés symétriquement autour du niveau nominal. Par contre, pour la température de la colonne, les extrêmes ont été situés asymétriquement autour du niveau nominal étant donné qu'ils représentent mieux la réalité.

IV.3.3.3. SELECTION DU PLAN EXPERIMENTAL

Bien que plusieurs plans expérimentaux soient décrits pour le test de robustesse des procédures analytiques, les plans de Plackett-Burman sont fréquemment utilisés. Un plan expérimental de Plackett-Burman à deux niveaux [59, 71] a été élaboré pour sept facteurs. Huit conditions expérimentales ont été ainsi générées, telles que présentées dans le tableau IV.13.

Tableau IV.13. – Plan expérimental

Expériences	Facteurs						
	A	B	C	D	E	F	G
1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
2	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1
3	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1
4	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
5	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1	+1
7	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

IV.3.3.4. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Un protocole expérimental a été défini pour l'exécution des expériences du test de robustesse. Le protocole expérimental schématisé dans la figure IV.13.A a été calqué sur celui couramment appliqué dans des études collaboratives, les laboratoires étant remplacés ici par les expériences et les jours par les séries. Cependant, en pratique, nous avons réalisé les

expériences en suivant le protocole expérimental présenté dans la figure IV.13.B, c'est-à-dire pour chaque série, trois préparations indépendantes ($n = 3$ répétitions) de chaque échantillon de maléate de S-timolol ont été analysées et ce, en appliquant les huit conditions expérimentales.

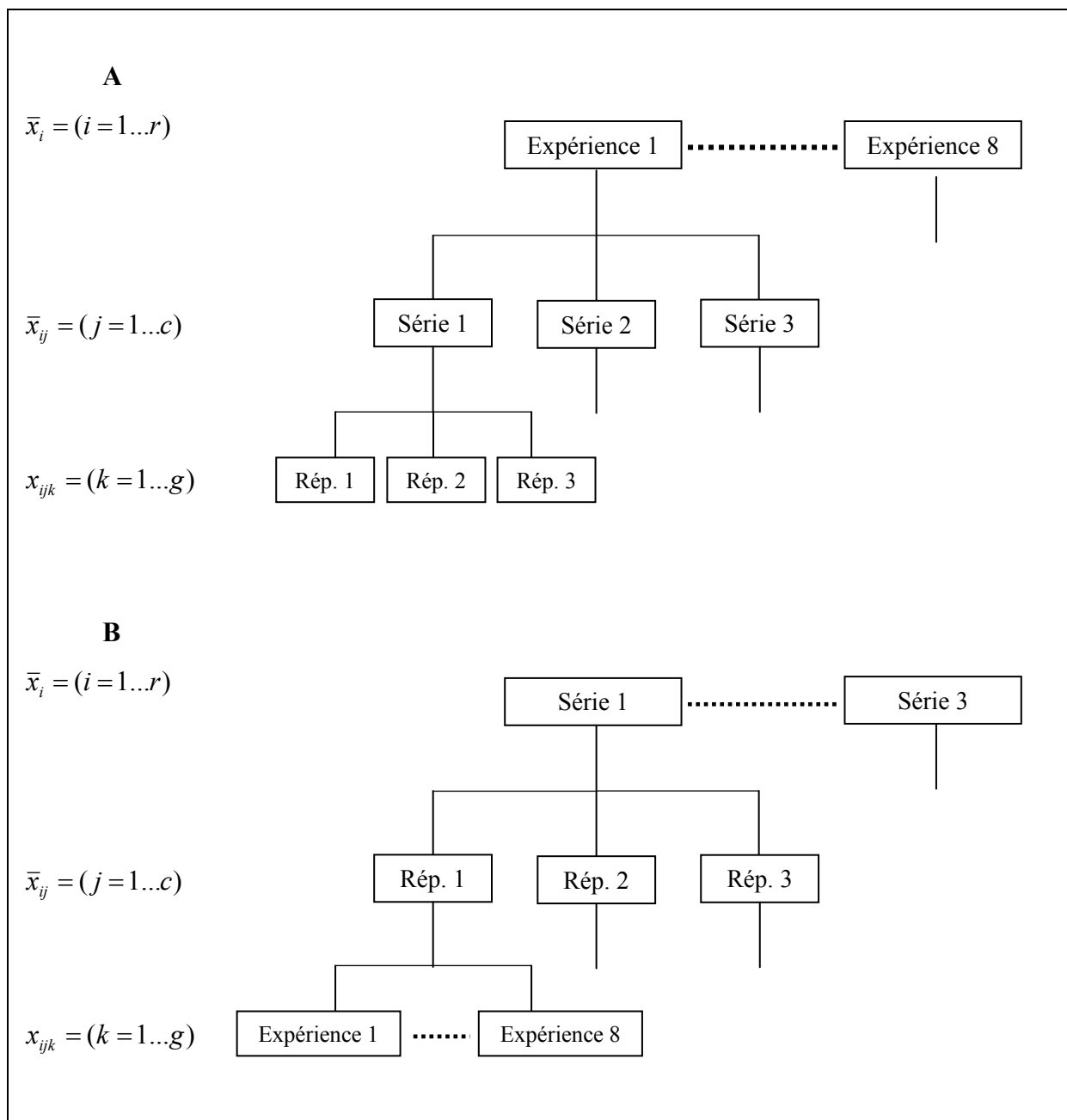


Figure IV.13. – Protocole expérimental du test de robustesse en comparaison avec ceux communément appliqués lors des études inter-laboratoires ($c = 3$ séries, $g = 3$ répétitions et $r = 8$ expériences) (A). Protocole expérimental appliqué dans le cas de l'étude présente ($r = 3$ séries, $c = 3$ répétitions et $g = 8$ expériences) (B).

Avant l'exécution de chaque expérience, le système de CLHP a été équilibré avec la phase mobile correspondante pendant 3 heures minimum. Suite à la durée de l'exécution des expériences, il nous a fallu deux jours pour réaliser une série.

Comme l'indique la figure IV.14., l'exécution des expériences commence toujours par le test d'adéquation du système de CLHP en analysant la solution du mélange prévue à cet effet, suivie de l'analyse des solutions de référence pour la quantification et celles des échantillons à examiner ($n = 3$ répétitions).

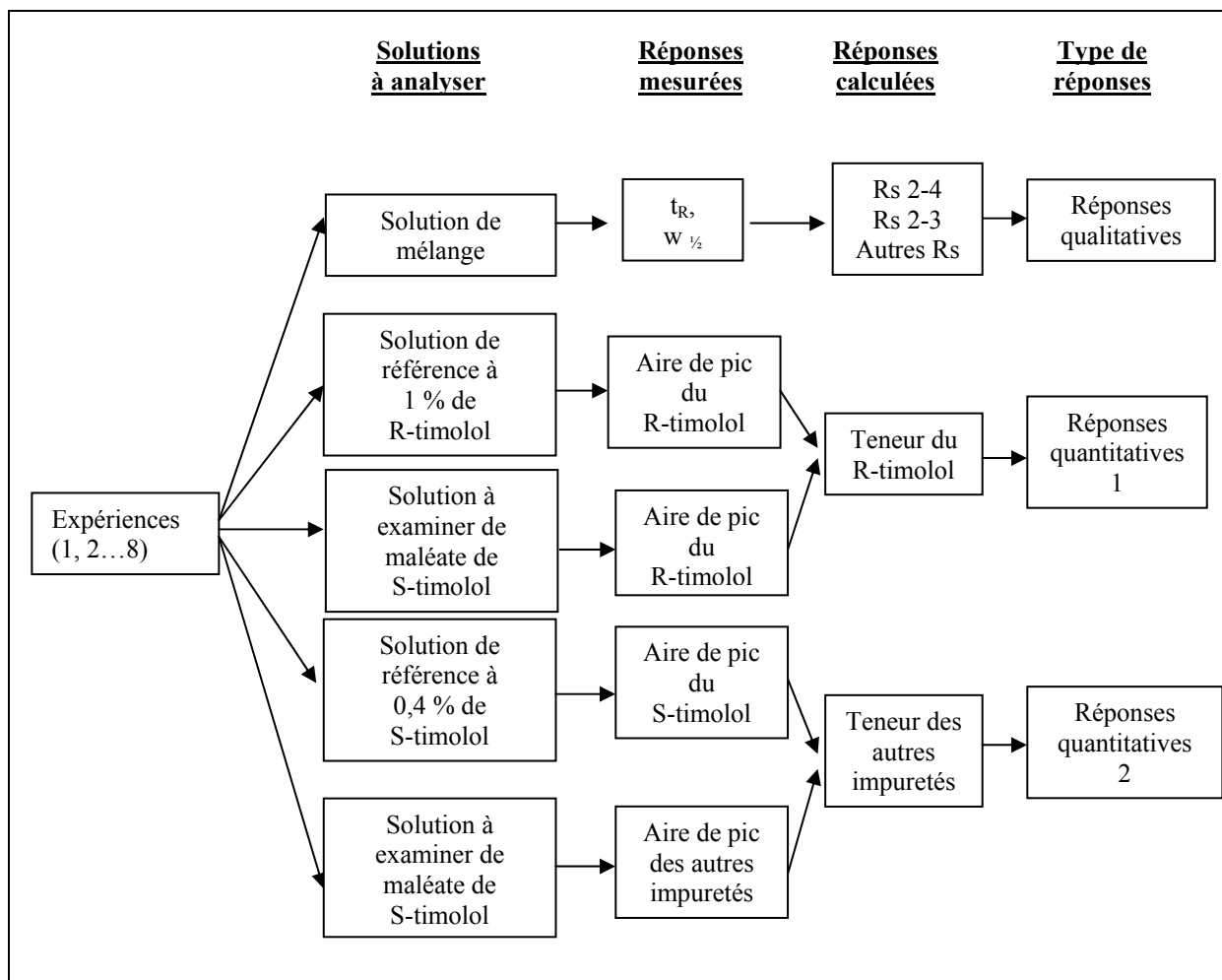


Figure IV.14. – *Représentation schématique de l'exécution du test de robustesse*

Légende : t_R = temps de rétention des pics ; $w_{1/2}$ = largeur du pic à mi-hauteur ; Rs = résolution ; Rs2-4 = résolution de la paire énantiomérique ; Rs2-3 = résolution de la paire critique.

L'ensemble des analyses a été répété trois fois, constituant ainsi trois séries. Le plan expérimental a été exécuté de façon aléatoire et en parallèle sur les deux équipements et les deux colonnes.

IV.3.3.5. IDENTIFICATION ET SELECTION DES REPOSES

Généralement, ce sont les réponses qualitatives qui sont prises en compte pour juger de la robustesse des conditions opératoires d'une procédure analytique. Dans cette étude, nous avons considéré aussi bien les réponses quantitatives que les qualitatives. Les premières se rapportent aux teneurs des impuretés dans les échantillons de maléate de S-timolol et les deuxièmes à la qualité de la séparation chromatographique évaluée en calculant les résolutions entre les pics consécutifs et entre ceux des énantiomères du timolol.

IV.3.3.6. RESULTATS D'EXECUTION DES EXPERIENCES

IV.3.3.6.1. Adéquation du système de CLHP et réponses qualitatives

La figure IV.15 montre un chromatogramme typique d'une solution de référence pour le SST obtenu dans les conditions expérimentales nominales. Les valeurs de la résolution sont de 1,7 pour la paire critique et de 5,6 pour la paire énantiomérique. Par rapport aux exigences de la séparation énantiomérique [209], nous pouvons confirmer que le système analytique est satisfaisant pour le test qualitatif en rapport avec la performance étant donné que la résolution de la paire énantiomérique est supérieure à 4,0.

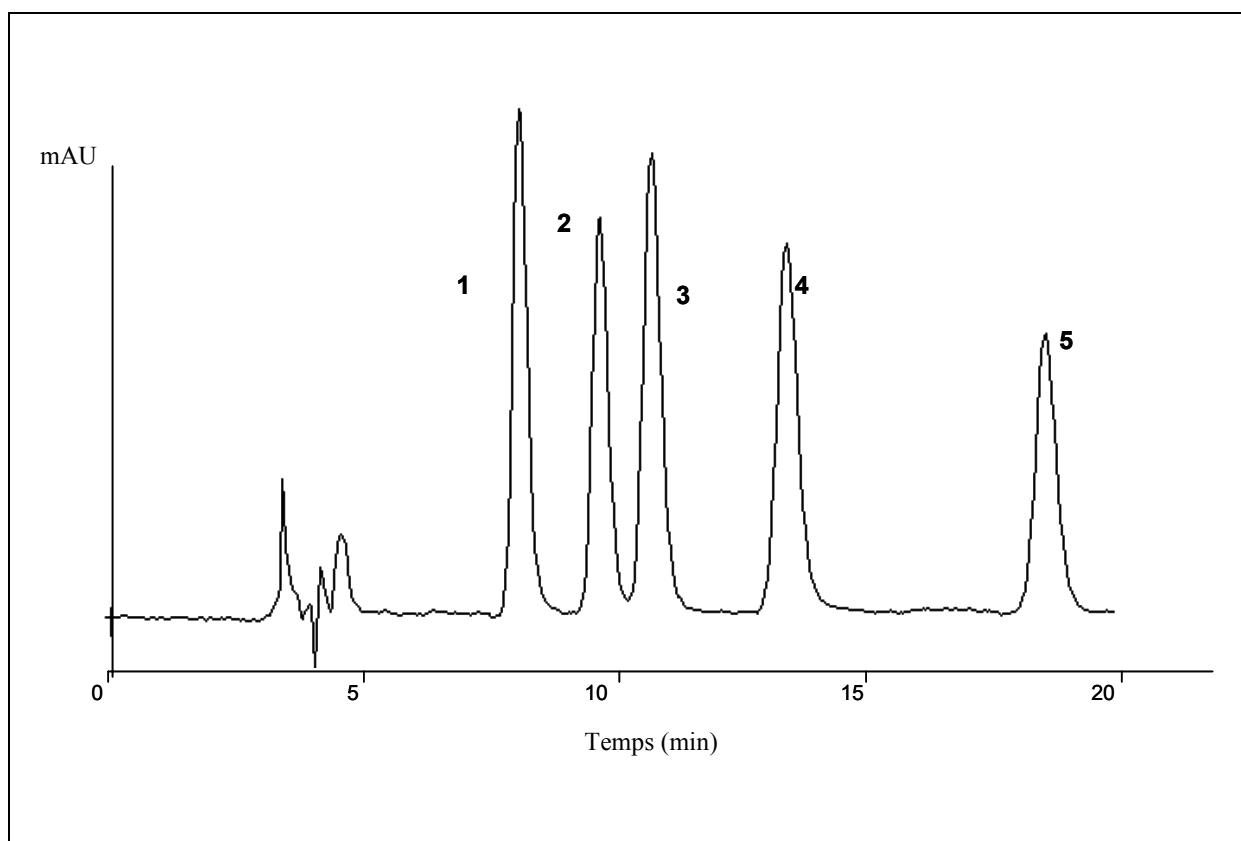


Figure IV.15. – *Chromatogramme typique d'une solution de mélange des cinq composés dans les conditions nominales*

Légende: Dimère de timolol (1), R-timolol (2), isotimolol (3), S-timolol (4), dimorpholinothiadiazole (5).

Après l'exécution des différentes conditions expérimentales, nous avons constaté que les valeurs de résolution pour toutes les expériences étaient au dessus de 1,25 excepté celle de la résolution entre le R-timolol (pic 2) et l'isotimolol (pic 3). En effet, seulement deux conditions expérimentales étaient satisfaisantes pour cette paire (expériences 1 et 6) (Tableau IV.14). Pour la paire énantiomérique, seule une valeur était considérablement en dessous de 4,0 (expérience 7). Par conséquent, quelles que soient les variations introduites au niveau des facteurs opératoires et en considérant le domaine expérimental examiné, la résolution énantiomérique (R_{s2-4}) demeure dans la majorité des cas, un excellent indicateur de l'adéquation du système de CLHP envers la séparation énantiomérique du timolol. Ainsi, en se basant sur cette résolution, les différentes conditions expérimentales ont permis d'obtenir une énantiomérisation suffisante des pics du timolol et conviennent donc pour le test de pureté

énantiomérique. En revanche, sur la base de la résolution de la paire critique (Rs2-3), la quantification de R-timolol pourrait être affectée dans un échantillon de maléate de S-timolol contenant une importante teneur en isotimolol. En vérifiant la pureté les lots d'échantillons concernés dans ce travail (N° A5800 et A5799) cette situation ne s'est pas présentée (figure IV.16).

Tableau IV.13. – Performances chromatographiques : résolution (Rs) entre les pics consécutifs et entre la paire des pics énantiomériques (n = 3)

Expériences	Paramètres de performance chromatographique				
	Rs 1-2	Rs 2-3	Rs 3-4	Rs 4-5	Rs 2-4
1	2,71	1,28	4,55	3,45	5,82
2	1,64	0,83	3,54	5,00	4,31
3	2,09	0,89	3,10	4,48	3,98
4	3,02	0,40	3,30	1,40	3,92
5	2,38	0,87	3,92	2,57	4,94
6	1,49	1,25	3,51	6,20	4,93
7	1,85	0,59	2,76	3,74	3,45
8	3,18	0,78	3,72	1,89	4,46

IV.3.3.6.2. Réponses quantitatives

Le rapport présenté dans la partie IV.3.2 indique que seul le R-timolol était retrouvé comme impureté dans les deux lots d'échantillons examinés, ce qui, par ailleurs, est confirmé par les chromatogrammes présentés dans la figure IV.16.

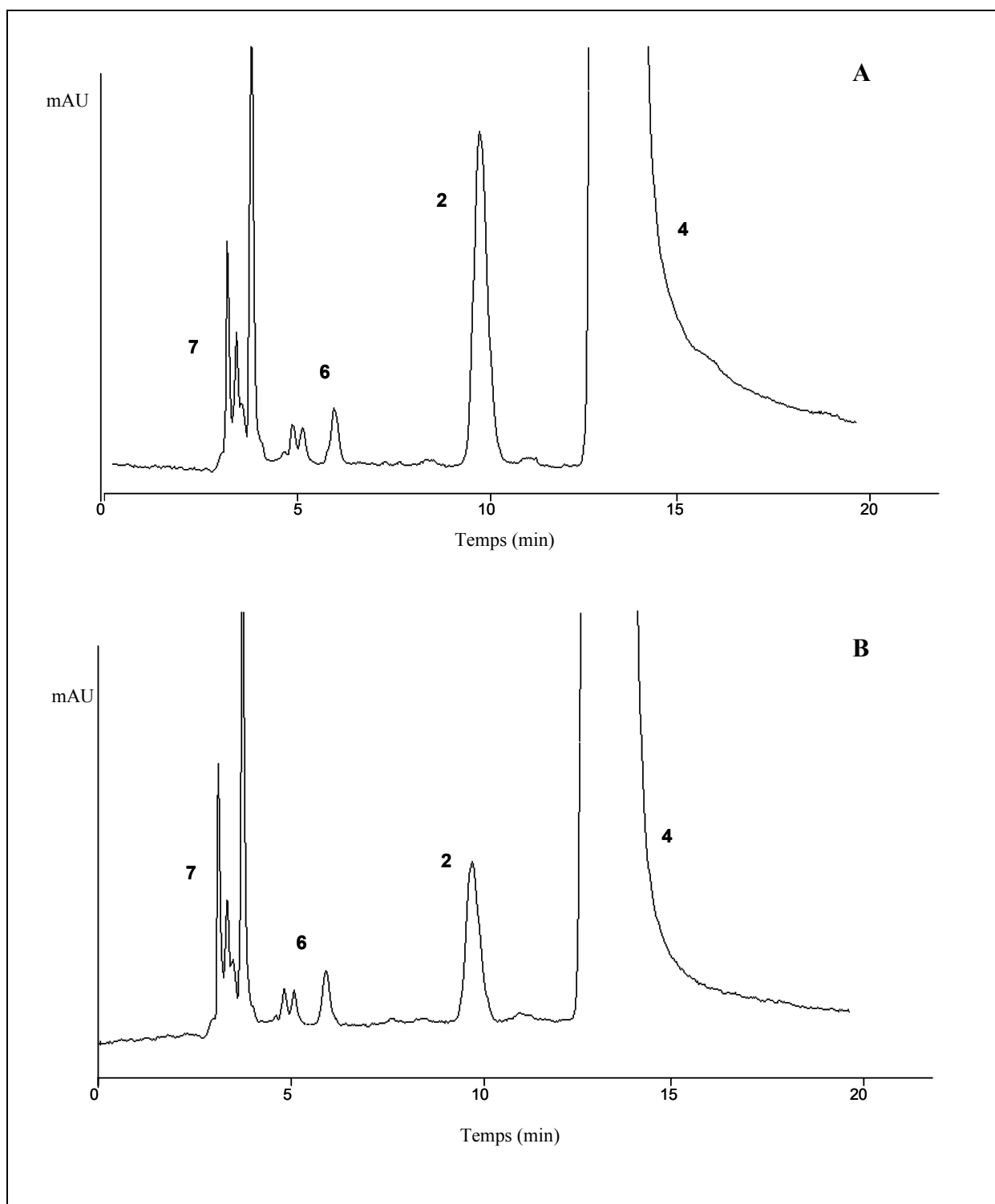


Figure IV.16. – *Chromatogrammes typiques des solutions de maléate de S-timolol lots N° A5800 (A) et N° A5799 (B) obtenus dans les conditions nominales*
Légende: Dimère de timolol (1), R-timolol (2), isotimolol (3), S-timolol (4), dimorpholinothiadiazole (5), impuretés non identifiées (6) et front de solvant (7).

Par conséquent, la teneur de cette impureté a été déterminée par comparaison de l'aire de pic normalisée correspondant au R-timolol obtenue avec la solution à examiner de S-timolol (ANE) par rapport à celle obtenue avec la solution de référence (ANR) en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Teneur en R - timolol (\%)} = \frac{A \cdot N \cdot E}{A \cdot N \cdot R} \times 1\% \quad (\text{IV.5})$$

L'aire du pic a été normalisée (AN) comme suit :

$$\text{AN} = \text{Aire de pic mesurée} \times 15,0 / \text{masse pesée (en mg)} \quad (\text{IV.6})$$

Comme le montre le tableau IV.14, les teneurs individuelles sont comprises entre 0,45 % et 0,65 % pour le lot N°A5800 (tableau IV.14.A) avec une moyenne générale de 0,53 % (CV = 3,9 %) et entre 0,25 % et 0,33 % pour le lot N°A5799 (tableau IV.14.B) avec une moyenne générale de 0,28 % (CV = 4,9 %). Remarquons que ces valeurs sont toujours inférieures à 1,0 % qui est la teneur maximum de l'impureté chirale mentionnée dans la monographie du maléate de S-timolol [209]. Ces valeurs sont distribuées autour des valeurs moyennes obtenues dans les conditions nominales qui sont respectivement de 0,53 % et de 0,27% pour les lots N°A5800 et N°A5799.

**Tableau IV.14.A. – Teneur du R-timolol (%) dans l'échantillon de maléate de
S-timolol, lot N°A5800**

Expériences	Série 1		Série 2		Série 3		Moyenne (par expérience (CV))
	Rép.	Moyenne (CV)	Rép.	Moyenne (CV)	Rép.	Moyenne (CV)	
1	0,62* 0,55 0,59*	0,58 (6,1 %)	0,51 0,52 0,50	0,51 (1,3 %)	0,48* 0,53 0,52	0,51 (4,9 %)	0,53 (8,1 %)
2	0,55 0,53 0,55	0,54 (1,7 %)	0,52 0,53 0,53	0,53 (0,9 %)	0,51 0,53 0,53	0,52 (1,5 %)	0,53 (1,9 %)
3	0,56 0,56 0,57	0,56 (0,5 %)	0,52 0,54 0,54	0,53 (2,4 %)	0,53 0,51 0,52	0,52 (1,9 %)	0,54 (3,8 %)
4	0,54 0,53 0,54	0,54 (1,5 %)	0,53 0,54 0,53	0,53 (1,0 %)	0,54 0,55 0,53	0,54 (1,9 %)	0,54 (1,4 %)
5	0,55 0,54 0,56	0,55 (2,0 %)	0,53 0,54 0,49*	0,52 (4,5 %)	0,54 0,55 0,51	0,53 (3,0 %)	0,53 (4,0 %)
6	0,53 0,54 0,53	0,53 (0,4 %)	0,52 0,52 0,52	0,52 (0,3 %)	0,51 0,54 0,52	0,52 (1,4 %)	0,52 (1,6 %)
7	0,54 0,55 0,55	0,55 (1,0 %)	0,53 0,53 0,59*	0,55 (6,6 %)	0,53 0,52 0,52	0,52 (1,1 %)	0,54 (4,4 %)
8	0,55 0,54 0,53	0,54 (1,2 %)	0,54 0,54 0,55	0,54 (0,9 %)	0,53 0,52 0,52	0,53 (1,2 %)	0,54 (1,7 %)
Moyenne par série (CV)	0,55 (3,6 %)		0,53 (3,5 %)		0,52 (2,6 %)		

*Légende : * Valeurs suspectées d'être aberrantes; CV = coefficient de variation; Rép. = Répétitions indépendantes*

Tableau IV.14.B. – Teneur du R-timolol (%) dans l'échantillon de maléate de S-timolol, lot N°A5799

<u>Expériences</u>	<u>Série 1</u>		<u>Série 2</u>		<u>Série 3</u>		<u>Moyenne (par expérience (CV))</u>
	Rép.	Moyenne (CV)	Rép.	Moyenne (CV)	Rép.	Moyenne (CV)	
1	0,31* 0,26 0,26	0,28 (9,2 %)	0,28 0,27 0,26	0,27 (3,8 %)	0,26 0,27 0,27	0,27 (2,0 %)	0,27 (5,4 %)
2	0,30 0,28 0,28	0,29 (4,2 %)	0,27 0,25* 0,26	0,26 (4,2 %)	0,26 0,29 0,28	0,28 (5,9 %)	0,28 (5,8 %)
3	0,32* 0,28 0,26	0,29 (11,1 %)	0,30 0,27 0,29	0,29 (3,9 %)	0,30 0,28 0,28	0,29 (4,0 %)	0,29 (6,2 %)
4	0,29 0,28 0,29	0,28 (5,9 %)	0,28 0,27 0,29	0,28 (1,8 %)	0,29 0,30 0,30	0,29 (1,8 %)	0,28 (4,5 %)
5	0,30 0,28 0,26	0,28 (6,5 %)	0,28 0,27 0,29	0,28 (2,5 %)	0,30 0,29 0,29	0,29 (2,4 %)	0,28 (4,4 %)
6	0,28 0,28 0,25*	0,27 (5,6 %)	0,27 0,27 0,27	0,27 (0,7 %)	0,28 0,28 0,27	0,28 (1,6 %)	0,27 (3,4 %)
7	0,29 0,30 0,27	0,29 (5,3 %)	0,27 0,29 0,29	0,29 (3,1 %)	0,28 0,28 0,29	0,28 (2,3 %)	0,29 (3,4 %)
8	0,29 0,28 0,27	0,28 (3,6 %)	0,29 0,28 0,29	0,29 (1,1 %)	0,27 0,27 0,30	0,28 (6,4 %)	0,28 (4,0 %)
Moyenne par série (CV)	0,28 (6,1 %)		0,28 (4,1 %)		0,28 (4,3 %)		

*Légende : * Valeurs suspectées d'être aberrantes; CV = coefficient de variation ; Rép. = Répétitions indépendantes*

IV.3.3.7. EVALUATION STATISTIQUE DES EFFETS DES FACTEURS

L'effet de chaque facteur X a été calculé en utilisant l'équation suivante :

$$E_x = \frac{\sum Y(i)}{n_i} - \frac{\sum Y(j)}{n_j} \quad (\text{IV.7})$$

avec $\sum Y(i)$ et $\sum Y(j)$ les sommes des réponses lorsque le facteur X est respectivement aux niveaux + 1 et - 1, n_i et n_j le nombre d'expériences du plan ayant le facteur X respectivement aux niveaux + 1 et - 1.

La signification des effets de chaque facteur a été statistiquement évaluée par comparaison avec le seuil critique (effet critique ou E_{critique}) dérivé à partir de la loi t de Student [5, 6, 18] :

$$E_{\text{critique}} = t_{\text{critique}} \cdot (ET)_{\text{est}} \quad (\text{IV.8})$$

avec $(ET)_{\text{est}}$ l'erreur type estimée sur un effet et t_{critique} la valeur du t de Student s'y rapportant. Un effet est considéré comme significatif si sa valeur absolue est plus grande que celle de l'effet critique (où la p -value correspondante est inférieure à 0,05). L'erreur type (ET) est estimée à partir des expériences additionnelles des répétitions dans les conditions nominales des facteurs [64, 65, 244].

Au vu des résultats des calculs statistiques (Tableau IV.15), nous constatons que les deux facteurs qualitatifs présentent des effets significatifs sur toutes les réponses qualitatives à l'exception de la résolution énantiomérique (Rs2-4) pour laquelle aucun effet significatif n'a été noté avec le facteur équipement de CLHP. En effet, lorsque le type d'équipement de CLHP est changé (Agilent au lieu de Shimadzu), une faible diminution de la résolution de la paire critique (Rs2-3) a été observée. Cependant, pour la Rs2-4, elle n'est pas significative.

Par contre, lorsque une nouvelle colonne a été utilisée, une augmentation est observée pour ces deux résolutions (Rs 2-3 et Rs 2-4), ce qui était logiquement espéré.

Tableau IV.15. – Effets des facteurs étudiés*

	<u>Réponses qualitatives</u>		<u>Réponses quantitatives</u>	
	Rs 2-3	Rs 2-4	Lot N° A5800	Lot N° A5799
<u>Facteurs qualitatifs</u>				
Type d'équipement de CLHP	0,0130	0,1208	0,2761	0,2988
Age de la colonne	< 0,0001	< 0,0001	0,5848	0,2262
<u>Facteurs quantitatifs</u>				
Fraction de 2-propanol	0,1317	< 0,0001	0,5848	0,8620
Fraction de DEA	0,6287	0,4909	0,6619	0,4875
Débit	0,7877	0,4353	0,5848	0,3860
Longueur d'onde	0,1446	0,2547	0,8268	0,2988
Température de la colonne	< 0,0001	< 0,0001	0,1921	0,0069

* Les valeurs significatives au seuil de 5% sont en gras.

Pour les facteurs quantitatifs, la température de la colonne a montré un effet significatif sur les deux résolutions alors que le 2-propanol a un effet significatif uniquement sur la résolution énantiomérique (Rs2-4) ce qui, d'un point de vue chromatographique n'est pas illogique.

Lorsque la température de la colonne augmente, les valeurs des deux résolutions diminuent. D'autre part, lorsque la proportion du 2-propanol augmente, seule la résolution énantiomérique (Rs2-4) diminue, alors que celle de la paire critique (Rs2-3) demeure plutôt constante. Des comportements similaires, notamment pour la Rs2-4, ont été déjà révélés en phase d'optimisation de la méthode de CLHP. En conséquence, il était important de s'assurer que quelles que soient les influences de ces deux facteurs opératoires, la quantification du R-timolol dans les échantillons analysés ne serait pas affectée.

Un examen des résultats des effets de ces facteurs sur les réponses quantitatives (Tableau IV.15) indique qu'aucun facteur n'affecte la détermination du R-timolol excepté le facteur température de la colonne pour lequel un effet significatif a été noté pour le lot A5799.

Cet effet n'a pas été observé pour le lot A5800 et peut être considéré comme un effet aléatoire. Il est probable que dans 5 % de cas cet effet puisse survenir.

Comme mentionné auparavant, la robustesse de la quantification du R-timolol est due aussi à l'absence de l'isotimolol dans les échantillons analysés.

IV.3.4. CONCLUSION

Nous avons démontré que la méthode de CLHP optimisée et validée pour la détermination du R-timolol et des autres impuretés du timolol dans les échantillons de maléate de S-timolol demeurent non affectée par les variations délibérées des facteurs qualitatifs et quantitatifs.

Bien que quelques effets significatifs des facteurs opératoires ont été observés sur les critères de performances chromatographiques, ces facteurs n'avaient aucune influence significative sur la quantification du R-timolol, ce qui a démontré la robustesse de la méthode de CLHP. Toutefois, il serait utile de prendre en compte les problèmes potentiels qui pourraient survenir lors de l'analyse d'un échantillon contenant de l'isotimolol.

En effet, quelques effets des facteurs ont été observés sur les réponses qualitatives mais ils n'ont pas affecté la quantification du R-timolol dans les deux échantillons analysés.