

## **IV.2. VALIDATION**

### **IV.2.1. INTRODUCTION**

Dans la pratique courante, après l'étape d'optimisation, il devient de plus en plus évident et essentiel de démontrer au moyen de la validation qu'une méthode optimisée correspond à l'usage attendu tout en fournissant, par ailleurs, des résultats fiables. Pour valider la méthode de CLHP optimisée dans ce travail, nous avons appliqué la stratégie basée sur le profil d'exactitude récemment introduite et décrite dans la littérature [50, 51]. D'un point de vue statistique, cette stratégie de validation répond aux besoins des analystes quant à la prise de décision en rapport avec les résultats fournis et en considérant des limites d'acceptation prédéfinies ainsi que le risque relatif à l'usage futur de la méthode. De ce fait, l'utilisation du profil d'exactitude se trouve être en accord avec l'objectif d'une méthode qui peut être résumé en sa capacité à quantifier le plus exactement possible chacune des quantités inconnues devant être déterminées par le laboratoire.

En réalité, ce qui est attendu d'une procédure analytique lorsqu'un analyste l'applique est que la différence observée entre le résultat d'une mesure ( $x_i$ ) et la « vraie valeur » ( $\mu_T$ ) de l'échantillon (qui demeure toujours inconnue) soit inférieure à la limite d'acceptation prédéfinie. De plus, l'analyste devra fournir la garantie quant à l'usage futur de la méthode. Au moyen du critère de l'erreur totale sur laquelle se base cette stratégie de validation, l'analyste peut envisager de contrôler le risque du consommateur indispensable d'un point de vue garantie et confiance. En effet, des critères idéaux d'acceptation devraient assurer qu'une proportion élevée des résultats futurs sera comprise dans des limites acceptables avec un degré de confiance élevé [233]. Le risque du consommateur (faux négatif) est défini comme étant le risque d'accepter des résultats mauvais et par contre le risque du producteur (faux positif) est celui de rejeter des résultats corrects.

L'objectif de cette étude est d'effectuer une validation complète de la méthode de CHLP pour la détermination de l'impureté R-timolol dans le S-timolol. Notre souhait était d'effectuer une validation complète de la même méthode de CLHP pour les autres impuretés séparées par cette méthode. Malheureusement, nous étions limités en pratique par la quantité disponible de ces impuretés.

## IV.2.2. PRÉPARATION DES SOLUTIONS

### IV.2.2.1. SOLUTIONS POUR LA VALIDATION DE LA MÉTHODE DE CLHP

#### IV.2.2.1.1. Standards de calibration

Une solution mère de R-timolol a été préparée par dissolution dans 25 mL de mélange de solvants (2-propanol contenant 1% de diéthylamine) d'une quantité exactement pesée approximative de 11,25 mg de substance chimique de référence (SCR) de maléate de R-timolol. Pour permettre une dissolution complète, la solution mère était placée au bain à ultrasons pendant au moins 15 min.

Ensuite, des dilutions successives ont été réalisées en vue d'obtenir plusieurs solutions filles aux niveaux de concentration tels que mentionnés dans le tableau IV.6. Ces solutions ont été utilisées comme standards de calibration (SC). Chaque solution a été analysée trois fois. Selon le protocole décrit dans la littérature [50], le nombre des niveaux de concentration est suffisant pour générer différents modèles de régression.

*Tableau IV.6. - Solutions relatives au R-timolol*

Niveaux de concentration (% relatif à 1,5 mg/mL de maléate de S-timolol)	Concentration en R-timolol (µg/mL)	
	Standards de calibration	Standards de validation
0,1 %	1,5	1,5
0,2 %	3,0	3,0
0,4 %	-	6,0
0,8 %	12,0	12,0
1,6 %	24,0	24,0
Total	12 échantillons / jour	15 échantillons / jour

#### IV.2.2.1.2. Standards de validation

Des solutions mères indépendantes ont été préparées de la même façon que pour celles des standards de calibration. Elles ont été successivement diluées en vue d'obtenir des solutions intermédiaires. Les solutions filles dont les concentrations sont indiquées dans le tableau IV.6 ont été obtenues par dilution de ces solutions intermédiaires dans des ballons jaugés volumétriques contenant préalablement environ 15 mg exactement pesés de maléate de S-timolol. Trois répétitions ( $n = 3$ ) ont été préparées pour chaque niveau de concentration ( $m = 5$ ). L'ensemble de l'étape de préparation a été répétée pendant trois jours ( $p = 3$ ). Ces standards de validation (SV) ont été préparés de manière indépendante dans la matrice en vue de simuler le plus possible la procédure analytique pour la détermination de l'impureté R-timolol dans des échantillons de maléate de S-timolol. Pour cela, le lot d'échantillon N°8060 a été utilisé comme matrice puisque c'était l'un des lots les plus purs et qu'il était disponible en quantité suffisante pour la réalisation des expériences.

L'évaluation de la sélectivité de la méthode a été faite avec une solution à blanc du mélange des solvants et un mélange de S-timolol, de R-timolol, d'isotimolol, de dimère de timolol et du dimorpholinothiadiazole aux concentrations d'environ 10 µg/mL.

#### **IV.2.2.2. SOLUTIONS UTILISÉES POUR LA DÉTERMINATION QUANTITATIVE**

Plusieurs solutions d'échantillons à examiner de maléate de S-timolol ont été préparées à des concentrations de 1,5 mg/mL. Chaque échantillon a été analysé en trois répétitions.

Une solution mère contenant 1,5 mg/mL de maléate de R-timolol *SCR* a été préparée puis 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 diluée 250 fois en vue d'obtenir une deuxième solution de référence contenant 0,006 mg/mL de maléate de S-timolol correspondant à 0,4 %.

Ces deux solutions de référence ont été utilisées pour déterminer respectivement le maléate de R-timolol et les substances apparentées dans les différents lots d'échantillons de maléate de S-timolol.

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

### IV.2.3. RESULTATS ET DISCUSSION

#### IV.2.3.1. STRATÉGIE DU PROFIL D'EXACTITUDE

La validation a pour but de démontrer que la procédure analytique correspond à l'usage pour lequel elle est prévue [234, 235].

La stratégie couramment utilisée pour la validation d'une procédure analytique est basée sur les critères d'acceptation qui considèrent de manière dissociée le biais et la variance [50, 123]. Cependant, dans l'étude présente, nous avons appliqué une nouvelle stratégie basée sur l'intervalle de tolérance d'espérance  $\beta$  de l'erreur totale d'une mesure (en anglais «  $\beta$ -expectation tolerance intervals for the total error measurement »), erreur qui prend en compte la justesse (biais) et la fidélité intermédiaire (écart-type). Comme précédemment mentionné dans la partie introductive, cette stratégie présente la possibilité de contrôler le risque d'acceptation d'une méthode non adéquate et ce, au moyen des profils d'exactitude. Un autre avantage présenté par cette stratégie est de fournir la garantie que les résultats des mesures qui seront obtenus lors de l'application future de la méthode validée seront inclus dans les limites d'acceptation fixées à priori selon les exigences définies.

En conséquence, le profil d'exactitude peut être considéré comme un outil de décision très utile pour accepter ou rejeter une méthode selon son usage prévu. De plus, le profil d'exactitude peut être utilisé pour sélectionner le modèle de régression le plus approprié pour la calibration, pour déterminer les limites de quantification supérieure et inférieure, et subséquemment pour sélectionner l'intervalle de concentration pour le dosage.

D'un point de vue pratique, cette stratégie de validation peut se résumer en six étapes reprises ci-après :

- a. sélection des limites d'acceptation considérant l'usage attendu de la méthode,
- b. ajustement d'un modèle de régression à partir des standards de calibration,
- c. calcul des concentrations des standards de validation à partir du modèle sélectionné,

- d. détermination du biais moyen à chaque niveau de concentration,
- e. calcul des limites de tolérance bilatérales pour les résultats attendus au niveau  $\beta$  à chaque niveau de concentration en considérant le biais et l'écart-type de fidélité intermédiaire, et
- f. établissement du profil d'exactitude, représentant comme fonction de la concentration, le biais moyen, l'intervalle de tolérance des valeurs attendues au niveau  $\beta$  et les limites d'acceptation.

#### **IV.2.3.2. CRITÈRES DE VALIDATION**

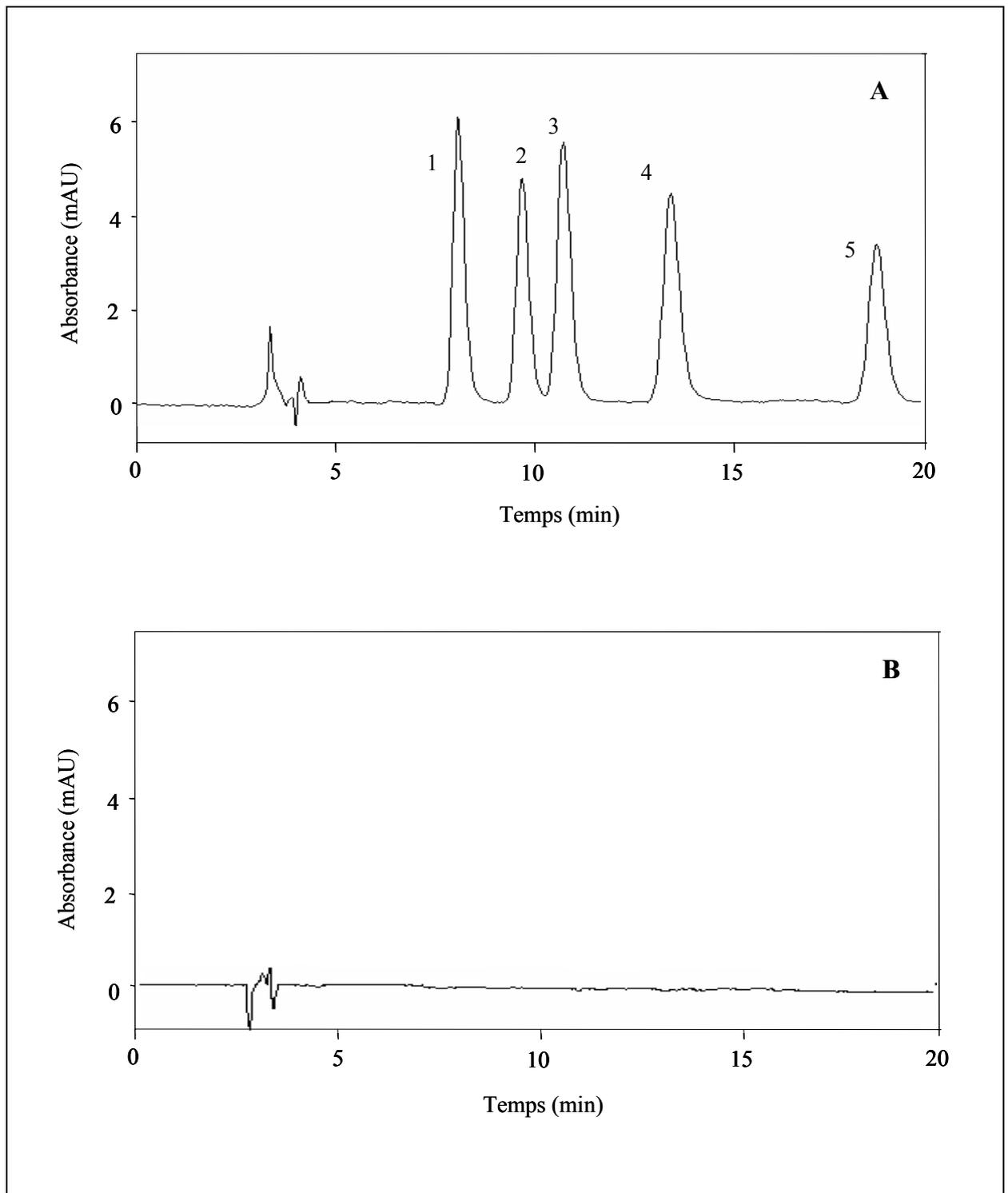
Les critères de validation sont ceux couramment utilisés dans les procédures analytiques de séparation et repris dans le document Q2A de la Conférence Internationale sur l'Harmonisation [40]. Il s'agit de la sélectivité, de la justesse, de la précision (répétabilité et fidélité intermédiaire), de l'exactitude, de la linéarité, des limites de détection et de quantification.

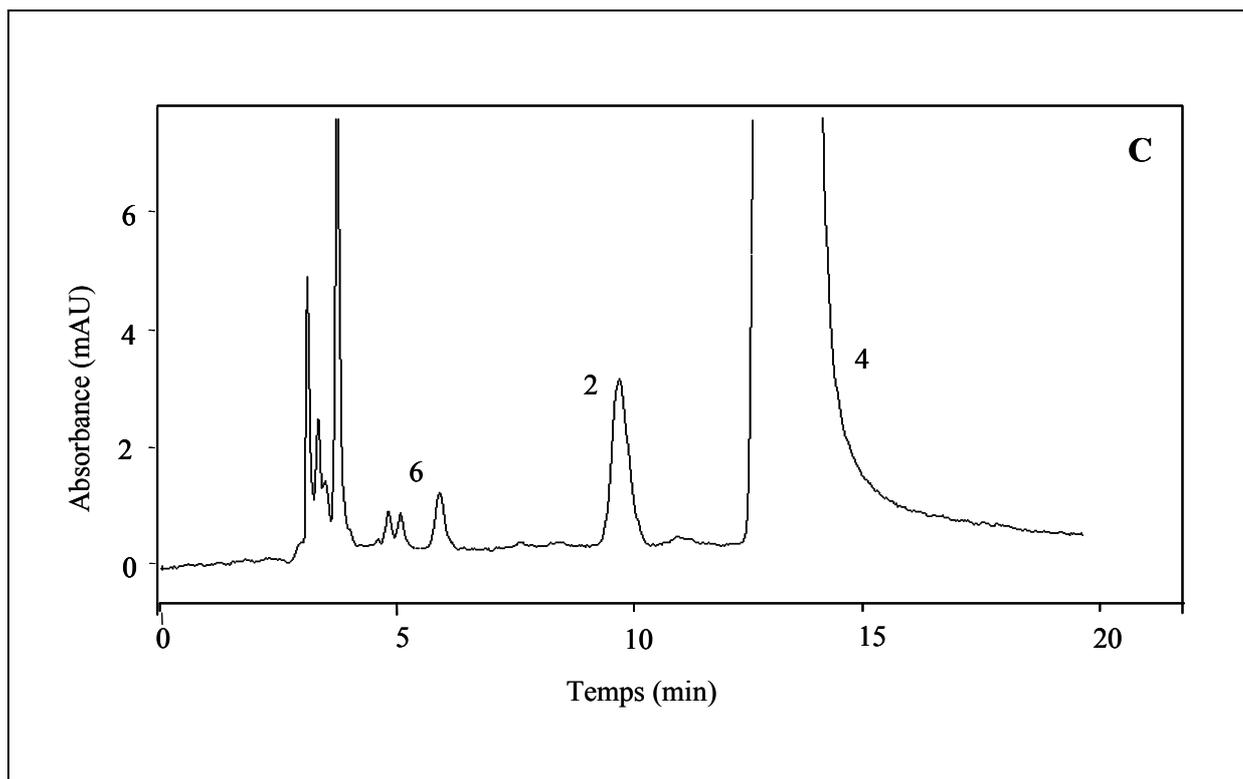
#### **IV.2.3.3. VALIDATION DE LA MÉTHODE DE DOSAGE DU R-TIMOLOL**

##### **IV.2.3.3.1. Sélectivité**

Il nous a tout d'abord semblé indispensable de vérifier l'absence de toute interférence au niveau du temps de rétention du R-timolol ainsi qu'au niveau de ceux des autres impuretés séparées par la méthode de CLHP développée dans ce travail. Pour cela, la sélectivité de la méthode a été vérifiée en comparant des chromatogrammes typiques obtenus en analysant d'une part, une solution d'un blanc de 2-propanol contenant 1 % de diéthylamine, et d'autre part, une solution diluée d'un mélange de S-timolol, de R-timolol, d'isotimolol, de dimère de timolol et du dimorpholinothiadiazole.

Comme illustré dans la figure IV.9, aucun pic ni interférence n'a été observé aux temps de rétention correspondant à ces cinq composés. De plus, le pic correspondant au R-timolol au niveau de concentration de 0,2 % peut être facilement intégré et par conséquent être quantifié en présence du pic correspondant au S-timolol à 1,5 mg/mL.





**Figure IV.9.** – Chromatogrammes d'une solution contenant le dimère de timolol, le R-timolol, l'isotimolol, le S-timolol et le DMTDZ (A), du mélange des solvants de dissolution (B) et d'un standard de validation à 0,2 % (C).

**Pics:** 1.- Dimère de timolol; 2.- R-timolol; 3.- isotimolol; 4.- S-timolol; 5.- DMTDZ; 6.- Front de solvant.

**Concentrations des analytes :** Entre 5 et 10  $\mu\text{g/mL}$  en (A) et environ 3  $\mu\text{g/mL}$  de R-timolol calculé par rapport au maléate de S-timolol dans (C).

Un autre aspect de la sélectivité a consisté en l'évaluation d'une quelconque interférence au temps de rétention du R-timolol avec la solution échantillon de maléate de S-timolol utilisée comme matrice. Nous avons observé un faible pic identifié comme étant le R-timolol et dont le signal était inférieur à la limite de quantification cible (0,1%). Par conséquent, nous avons évalué son influence sur les résultats en appliquant la stratégie conventionnelle du test  $t$  de Student en vue de comparer les pentes ainsi que les ordonnées à l'origine des droites de régression déterminées entre la concentration en R-timolol et la réponse analytique (aire du pic du R-timolol) obtenues d'une part, en présence de la matrice et d'autre part, en absence de celle-ci [236]. Généralement, une différence significative observée

entre les pentes indique une erreur systématique proportionnelle alors qu'une différence significative des ordonnées à l'origine correspond à une erreur systématique constante. Si les pentes et les ordonnées à l'origine sont significativement différentes, les erreurs proportionnelles et systématiques ont une influence sur les résultats obtenus avec la matrice. Dans le cas qui nous concerne, aucune erreur systématique n'a été notée puisque aucune différence significative n'a été observée entre les ordonnées à l'origine (différence = -218,98,  $p$ -value = 0,311) ni entre les pentes (différence = 29,377,  $p$ -value = 0,075).

#### IV.2.3.3.2. Analyse de la fonction de réponse et sélection du modèle de régression approprié

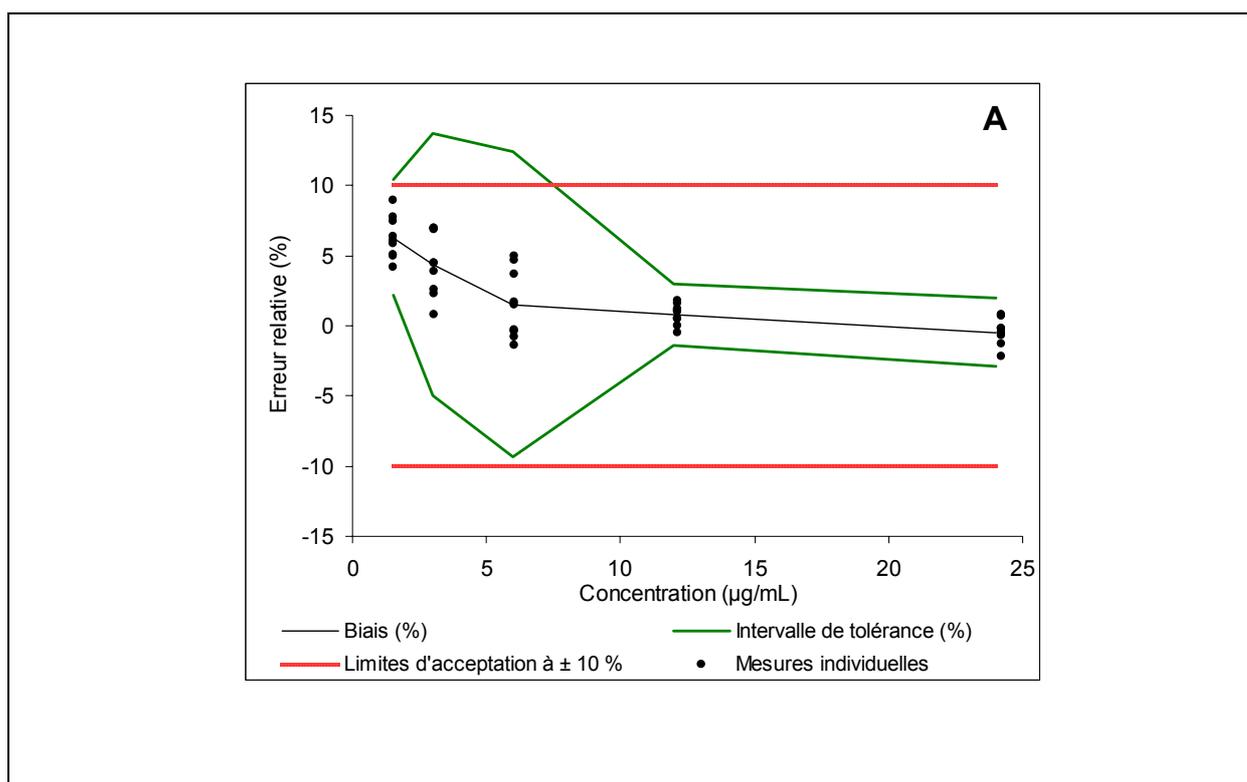
Cette étape constitue l'une des plus importantes du fait que la fiabilité des résultats de validation qui seront obtenus dépend du modèle de régression sélectionné. La fonction de réponse a été évaluée au moyen de trois courbes de calibration construites à partir des standards de calibration et utilisant quatre niveaux de concentration (voir tableau IV.6). Ensuite, plusieurs modèles de régression ont été ajustés au moyen du logiciel utilisé en vue d'analyser la relation entre la concentration en R-timolol ( $\mu\text{g/mL}$ ) et la réponse analytique (surface de pic du R-timolol) et de décider lequel est le plus approprié.

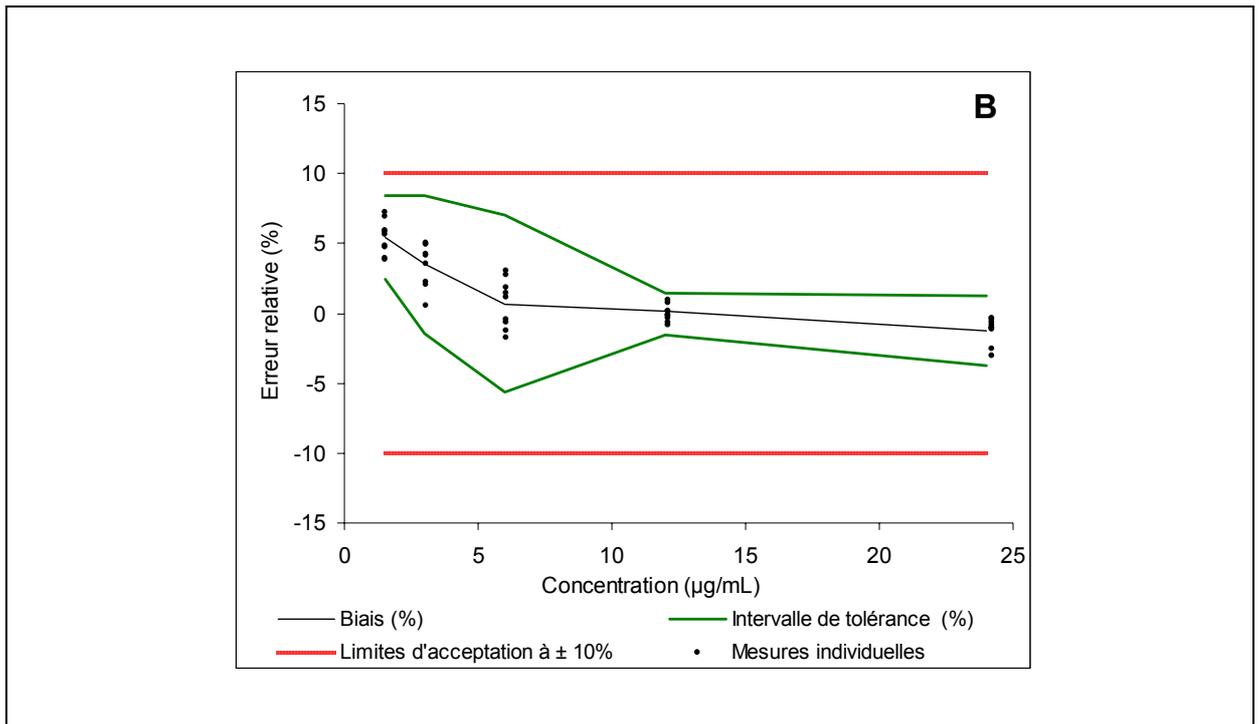
Les concentrations des standards de validation ont été calculées à partir de chaque courbe obtenue, ce qui a permis d'obtenir pour chaque niveau de concentration le biais relatif moyen, les limites de tolérance supérieures et inférieures des valeurs attendues au niveau  $\beta$  et ce, en considérant l'écart-type pour la fidélité intermédiaire. Ensuite, différents profils d'exactitude (figures IV.10 à IV.12) ont été construits à partir de ces données. Par souci de clarté dans notre texte, nous écrivons limites de tolérance (ou intervalles de tolérance) pour faire allusion aux limites de tolérance des résultats attendus au niveau  $\beta$  (ou intervalles de tolérance).

Comme il s'agit d'une détermination d'impuretés, les limites d'acceptation ont été fixées à 10 % [53]. Nous avons considéré la variabilité de 10 % communément admise par les organismes réglementaires pour la détermination d'impuretés.

Comme il est couramment pratiqué dans les monographies des pharmacopées, un seul niveau de concentration est utilisé pour la calibration en vue de déterminer des impuretés. Dans ce contexte, nous avons examiné les profils d'exactitude obtenus en considérant les concentrations de 24  $\mu\text{g/mL}$  et de 12  $\mu\text{g/mL}$  pour la calibration. Ainsi que l'illustre la figure IV.10.A, en considérant la concentration de 24  $\mu\text{g/mL}$  et un risque de 5 %, le profil

d'exactitude excède les limites d'acceptation, avec une erreur relative importante observée aux faibles niveaux de concentration, alors qu'avec la concentration de 12  $\mu\text{g/mL}$  (figure IV.10.B) et le même risque, le profil d'exactitude est à l'intérieur des limites d'acceptation. Même si une augmentation de l'erreur relative a été observée aux faibles niveaux de concentration, l'objectif de la méthode demeure atteint. Cet objectif se résume en la capacité de quantifier l'impureté R-timolol dans les échantillons de maléate de S-timolol à des faibles niveaux de concentration sachant que la teneur maximum de cette impureté chirale tolérée par la monographie est 1,0 % [209]. En conséquence, nous avons sélectionné ce modèle de régression qui d'une part, rencontre les objectifs de la méthode et d'autre part, correspond à l'utilisation en analyse de routine. Ce modèle a été ainsi utilisé pour évaluer les différents critères de validation. De plus, il garantit que 95 fois sur 100 les futures mesures seront incluses dans les limites d'acceptation.

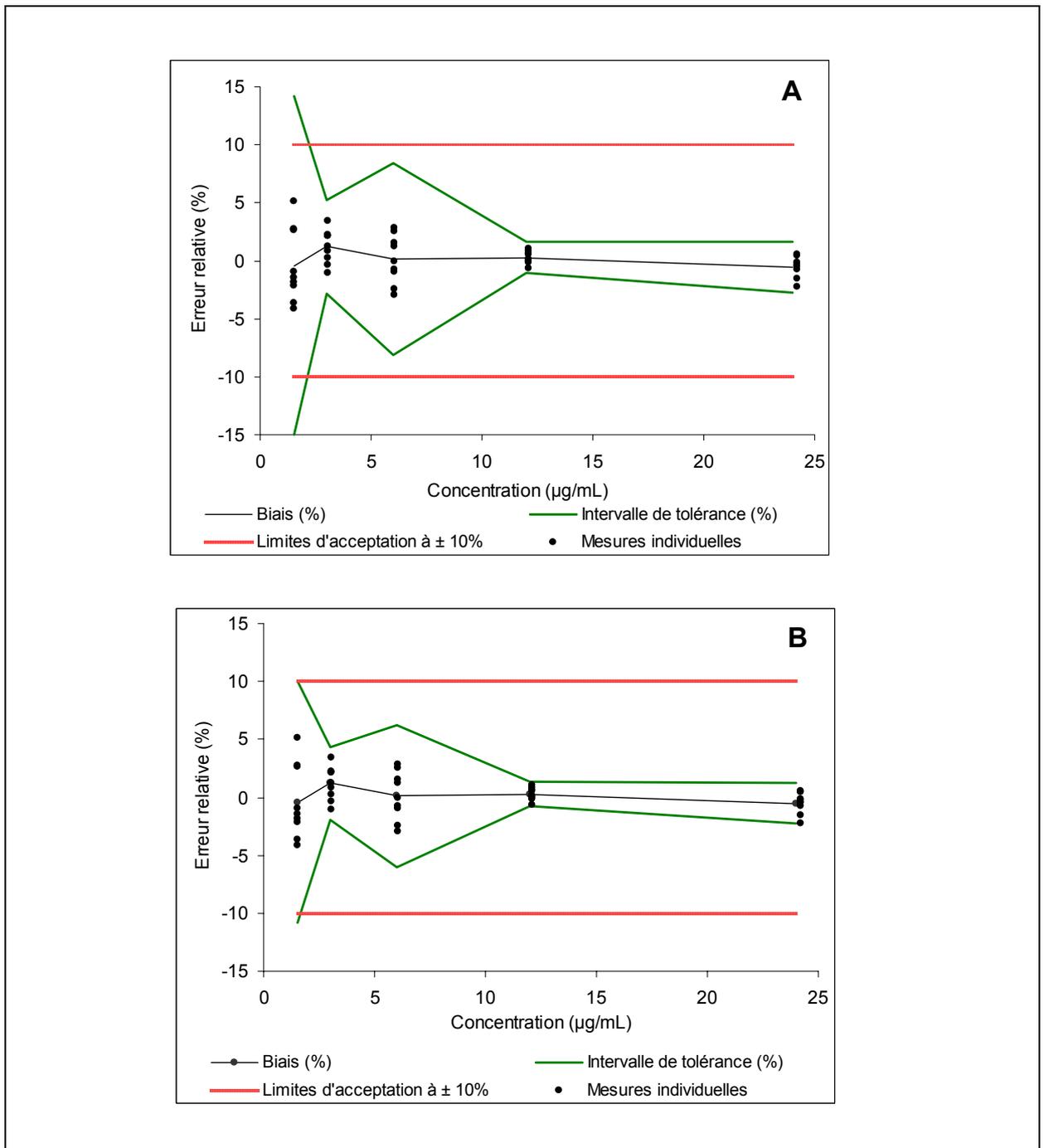




**Figure IV.10.** – Profils d'exactitude obtenus avec un risque de 5 % et en considérant le modèle de régression linéaire passant par 0 et ajusté avec 24,0 µg/mL (A) et 12,0 µg/mL (B).

Nous avons aussi examiné d'autres modèles notamment les linéaires simples (pondérés ou non), le quadratique et ceux obtenus après une transformation logarithmique ou racine carrée.

En considérant le modèle de régression linéaire et prenant un risque de 5 % (Figure IV.11.A), nous avons constaté que les intervalles de tolérance se trouvent en dehors des limites d'acceptation pour le niveau de concentration le plus faible. Même en prenant un risque de 10 % (Figure IV.11.B), la limite de tolérance inférieure se retrouve toujours en dehors des limites d'acceptation alors qu'une amélioration est observée pour la limite de tolérance supérieure au plus faibles niveaux de concentration.

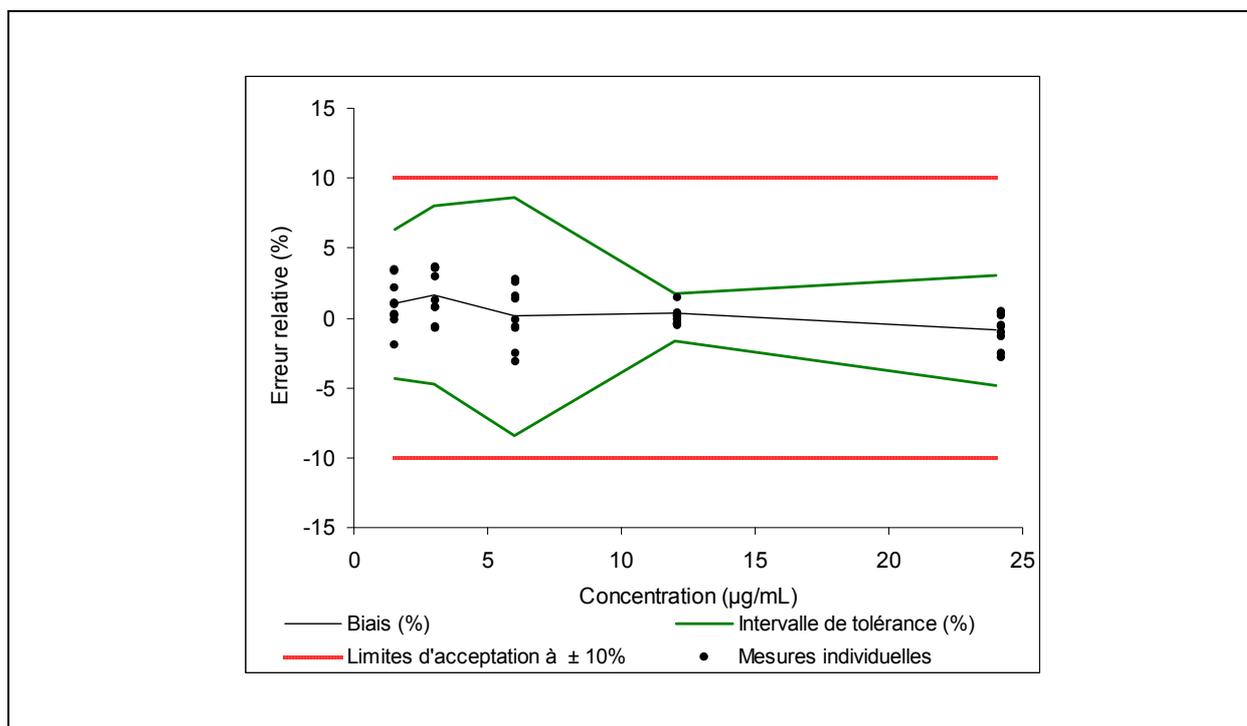


**Figure IV.11.** – *Profils d'exactitude obtenus en considérant le modèle de régression linéaire avec un risque de 5 % (A) et un risque de 10 % (B).*

Le modèle de régression linéaire pondérée appliquant un facteur de pondération de  $1/X^2$  ( $X$  étant la concentration en R-timolol) et associé à un risque de 5 % a été trouvé approprié comme l'illustre la figure IV.12. En effet, les intervalles de tolérance sont compris

dans les limites d'acceptation et ce, dans tout l'intervalle de concentration utilisé pour la validation.

Même si ce modèle de régression semble être le plus approprié pour décrire adéquatement la relation entre la concentration et la réponse analytique, son application en routine peut être longue parce qu'elle nécessite la préparation et l'analyse de plusieurs solutions de référence en vue d'établir des courbes de calibration pour le dosage des impuretés.



**Figure IV.12.** – Profil d'exactitude obtenu en considérant le modèle de régression linéaire pondéré ( $1/X^2$ ) et un risque de 5%

Les autres modèles de régression linéaire ou linéaire pondérée obtenus après transformation au moyen d'une fonction racine carrée ou logarithmique ne conviennent pas puisque les profils d'exactitude correspondants sont en dehors des limites d'acceptation quel que soit le risque considéré.

IV.2.3.3.3. Justesse

La justesse fournit une indication sur les erreurs systématiques de la procédure analytique [123]. Elle est exprimée en termes de biais (en  $\mu\text{g/mL}$ ) ou de biais relatif (%) et a été estimée au moyen des standards de validation dans la matrice à cinq niveaux de concentration (de 1,5 à 24  $\mu\text{g/mL}$ ).

Comme le montre le tableau IV.7, les biais relatifs de la méthode développée ont été trouvés acceptables puisqu'ils sont relativement proches de zéro et que les récupérations sont comprises entre 98,5 et 105,5 %. Cependant, pour les niveaux de concentration les plus faibles, nous avons noté des biais relatifs aux alentours de 4 ou 5 %.

*Tableau IV.7. - Justesse de la méthode*

<b>Niveaux de concentration (<math>n = 3, p = 3</math>)</b>	<b>Biais absolu : <math>\mu\text{g/mL}</math> (biais relatif : %)</b>	<b>Récupération</b>
1,5 $\mu\text{g/mL}$	0,082 (5,4)	105,4 %
3,0 $\mu\text{g/mL}$	0,106 (3,5)	103,5 %
6,0 $\mu\text{g/mL}$	0,042 (0,7)	100,7 %
12,0 $\mu\text{g/mL}$	-0,002 (0,0)	100,0 %
24,0 $\mu\text{g/mL}$	-0,303 (-1,3)	98,7 %

IV.2.3.3.4. Fidélité

La fidélité fournit une indication sur les erreurs dues au hasard [123]. Elle a été estimée en calculant la répétabilité et la fidélité intermédiaire à chaque niveau de concentration utilisé en validation.

Comme montré dans le tableau IV.8., les coefficients de variation de répétabilité qui reflètent la fidélité intra-jour pour chaque niveau de concentration ne dépassent pas 1,3 %. Pour la fidélité intermédiaire qui reflète la fidélité inter-jour, les coefficients de variation ne dépassent pas 2,0 %, ce qui démontre l'excellence de la fidélité de la méthode de CLHP développée.

**Tableau IV.8. - Fidélité de la méthode**

<b>Niveaux de concentration (n = 3, p = 3)</b>	<b>Répétabilité (coefficients de variation %)</b>	<b>Fidélité intermédiaire (coefficients de variation %)</b>
1,5 µg/mL	1,2	1,2
3,0 µg/mL	1,2	1,7
6,0 µg/mL	1,2	1,9
12,0 µg/mL	0,6	0,6
24,0 µg/mL	0,9	1,0

#### IV.2.3.3.5. Exactitude

L'exactitude se réfère à l'étroitesse d'agrément entre le résultat obtenu et la valeur de référence acceptée notamment par convention ou « la vraie valeur » [123]. L'exactitude tient compte de l'erreur totale liée au résultat, c'est-à-dire des erreurs systématique et aléatoire.

L'exactitude de la méthode est représentée à partir du profil d'exactitude tel qu'illustré à la figure IV.10.B. Au vu des résultats présentés dans le tableau IV.9, la méthode CLHP proposée est exacte étant donné qu'à chaque niveau de concentration, les différentes limites de tolérance des résultats restent incluses dans les limites d'acceptation de  $\pm 10\%$ .

Selon le test de pureté énantiomérique décrit dans la monographie du maléate de S-timolol dans la Pharmacopée Européenne [209], la teneur maximum tolérée pour le R-timolol (1 % correspondant à 15 µg/mL) est la valeur cible pour la prise de décision sur l'acceptation ou le rejet d'un lot d'échantillon de maléate de S-timolol. Remarquons qu'aux alentours de cette valeur cible, l'exactitude de la méthode CLHP est particulièrement bonne.

**Tableau IV.9. - Exactitude de la méthode**

<b>Niveaux de concentration (<math>n = 3, p = 3</math>)</b>	<b>Limites de tolérance (en <math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Limites de tolérance (en %)</b>
1,5 $\mu\text{g/mL}$	1,55 à 1,64	2,5 à 8,4
3,0 $\mu\text{g/mL}$	2,98 à 3,28	-1,4 à 8,5
6,0 $\mu\text{g/mL}$	5,71 à 6,48	-5,6 à 7,0
12,0 $\mu\text{g/mL}$	11,9 à 12,3	-1,5 à 1,5
24,0 $\mu\text{g/mL}$	23,3 à 24,5	-3,8 à 1,3

IV.2.3.3.6. Linéarité

La linéarité d'une procédure analytique est sa capacité à obtenir, à l'intérieure d'un certain intervalle de dosage, des résultats (et non des signaux) directement proportionnels à la concentration (quantité) de la substance à examiner dans l'échantillon [237].

Pour toutes les séries (jours) de validation, une droite de régression a été ajustée sur les concentrations calculées par rapport aux concentrations introduites en appliquant le modèle de régression linéaire pour lequel le coefficient de détermination ( $r^2$ ), la pente et l'ordonnée à l'origine sont présentés dans le tableau IV.10.

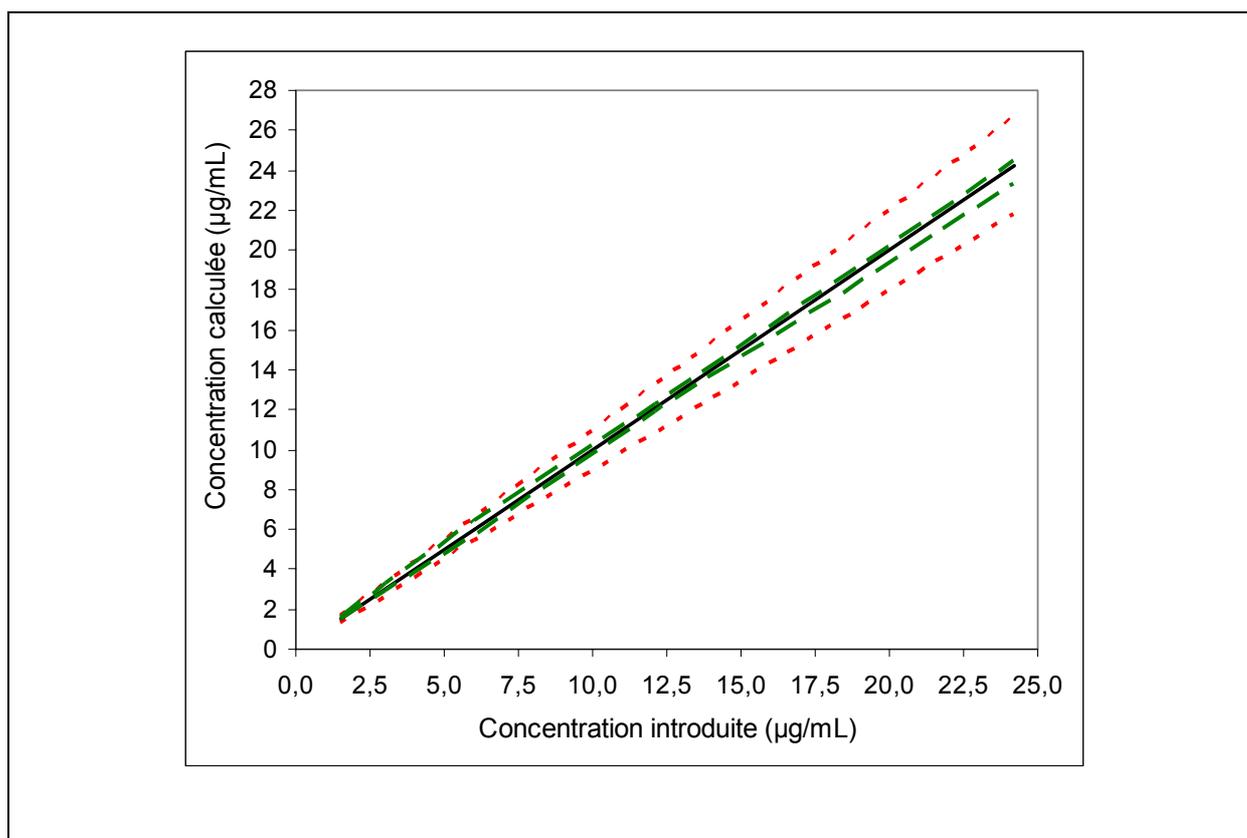
**Tableau IV.10. - Linéarité de la méthode**

$n = 3$ répétitions	<u>Intervalle de dosage</u>	1,5 – 24
$m = 5$ niveaux de concentration	<u>Pente</u>	0,9825
$p = 3$ séries (ou jours)	<u>Ordonnée à l'origine</u>	0,1492
$N = 45$ observations totales	<u><math>r^2</math></u>	0,9998

Dans la pratique courante, très souvent le coefficient de détermination ( $r^2$ ) est utilisé erronément pour évaluer la qualité de la linéarité d'une procédure analytique. En effet, Van Loco et coll. [238] ainsi que Hibbert [239] ont mis en lumière cet aspect en démontrant que la valeur du coefficient de détermination approchant l'unité ne peut que donner une certaine approximation de la qualité de la linéarité étant donné qu'une relation curviligne pourrait aussi présenter un  $r^2$  proche de l'unité. Dans ce cas, un des moyens est d'appliquer une analyse de variance (ANOVA) [240] ou l'approche considérant la région de confiance de joint elliptique (en anglais Elliptic Joint Confidence region) de Mandel et Linnig [241].

L'approche statistique pour l'ajustement de la droite de la linéarité en utilisant une ANOVA compare l'erreur d'ajustement (en anglais « Lack-of-Fit » ou « LOF ») à l'erreur pure (aléatoire). L'hypothèse d'un ajustement adéquat est rejetée si le rapport  $F_{\text{observé}}$  qui équivaut à « LOF/Erreur pure » est supérieur à la valeur  $F$  de la statistique pour un nombre défini de degrés de liberté et un niveau de signification approprié. Toutefois, le problème de cette approche est que plus la variance est grande, plus ce rapport  $F_{\text{observé}}$  est petit, et par conséquent plus il y a de chance de considérer d'une manière erronée l'ajustement comme adéquat et in fine d'accepter la linéarité de la méthode analytique. Ainsi, cette approche ne convient pas pour évaluer la linéarité de la méthode dans le cas présent. De même, l'approche considérant la région de confiance de joint elliptique ne convient pas pour les raisons évoquées avec l'ANOVA.

C'est pourquoi nous avons appliqué l'approche basée sur les limites de tolérance absolues. Pour qu'une droite de régression soit démontrée linéaire, il faudrait que les limites de tolérance absolues soient comprises dans les limites d'acceptation prédéfinies. Puisque les limites de tolérance absolues telles qu'illustrées dans la figure IV.12 sont comprises dans les limites d'acceptation de  $\pm 10\%$ , la linéarité de la méthode de CLHP développée est ainsi démontrée.



**Figure IV.12.** – Graphe de la linéarité se rapportant à la méthode de CLHP pour la détermination du R-timolol

**Légendes** : La ligne continue est la droite d'identité ( $y = x$ ) sur laquelle les points devraient se retrouver dans le cas d'une méthode validée; Les lignes en traits (vert) correspondent au profil d'exactitude, par exemple, les limites de tolérance exprimées en valeur absolue, et les lignes pointillées (rouge) représentent les limites d'acceptation à  $\pm 10\%$ .

#### IV.2.3.3.7. Limites de détection et de quantification

La limite de détection (LD) est la plus petite quantité de la substance ciblée qui peut être détectée, mais pas exactement quantifiée dans un échantillon [50, 46].

La LD a été estimée en utilisant l'ordonnée à l'origine moyenne du modèle de calibration et l'écart-type résiduel de la régression. En appliquant cette méthode de calcul, la

LD de la méthode CLHP vaut 0,27 µg/mL (ou 0,02 % par rapport à la concentration de 1,5 mg/mL).

La limite de quantification inférieure (LQ) est la plus petite quantité de la substance ciblée dans un échantillon qui peut être déterminée dans des conditions expérimentales prescrites avec une exactitude bien définie [50, 46].

La LQ a été obtenue en calculant la plus petite concentration en dessous de laquelle les limites d'exactitude ou les limites de tolérance sont en dehors des limites d'acceptation. Etant donné que le profil d'exactitude obtenu en considérant le modèle de régression sélectionné est inclus dans les limites d'acceptation, le premier niveau de concentration (1,51 µg/mL ou 0,1 % par rapport à la concentration de 1,5 mg/mL) qui est le niveau le plus bas investigué correspond à la limite de quantification.

Selon ICH [40], il est recommandé de vérifier si la LD obtenue avec d'autres stratégies comme par exemple celle du profil d'exactitude équivaut à celle déterminée suivant l'approche classique basée sur l'évaluation du rapport signal/bruit. Un rapport compris entre 3 :1 ou 2 :1 est généralement considéré comme acceptable pour l'estimation de la LD [40]. Pour cela, nous avons effectué quelques expériences supplémentaires en vue d'analyser six solutions de maléate de S-timolol contenant du R-timolol à des concentrations proches de la LD estimées au moyen du profil d'exactitude. En appliquant cette approche, la LD vaut 0,173 µg/mL ce qui correspond à 0,012 % par rapport à 1,5 mg/mL. Cette valeur étant très proche de celle obtenue avec la stratégie du profil d'exactitude, nous pouvons admettre que la concentration de 0,27 µg/mL correspond à la LD.

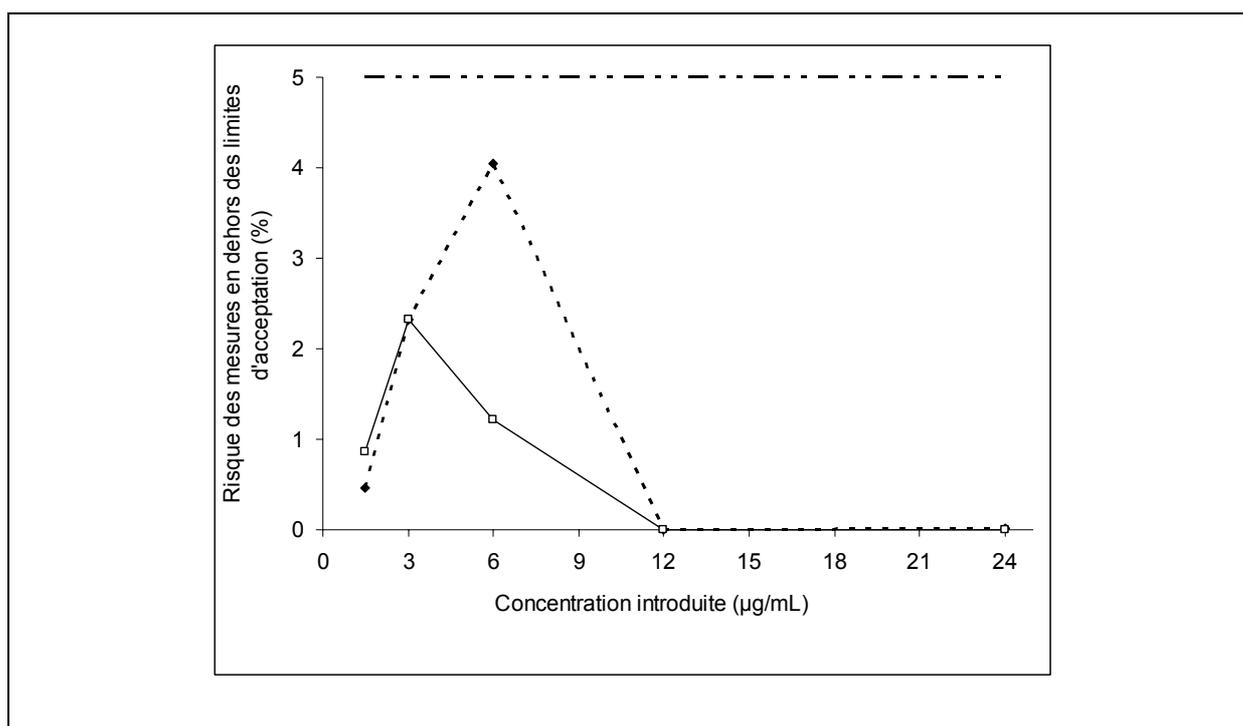
#### **IV.2.3.4. PROFIL DE RISQUE**

Le profil de risque exprime par niveau de concentration investigué, la probabilité pour que le résultat d'une mesure effectuée en analyse de routine puisse tomber en dehors des limites d'acceptation, en considérant le biais estimé ainsi que les paramètres de précision obtenus en phase de validation.

Très récemment, la Food and Drug Administration (FDA) a introduit à travers le Process Analytical Technology (PAT) [242] la notion de gestion du risque dans le domaine des procédés de fabrication. Dans ce même ordre d'idée, la notion de la gestion du risque au moyen d'un profil a été introduite dans le domaine de validation des procédures analytiques. Le profil de risque peut fournir un moyen utile et efficace pour l'acquisition des informations

en vue de faciliter la compréhension des procédés et d'atteindre des améliorations de la procédure analytique [242]. En effet, il permet de contrôler le risque consommateur à l'aide de critères adéquats obtenus en validation (erreur systématique et erreur aléatoire) [233]. Lorsque plusieurs déterminations sont envisagées en analyse de routine, le risque exprime la proportion des mesures qui sont susceptibles d'être en dehors des limites d'acceptation si toutes les conditions demeurent équivalentes, par exemple aucun changement n'apparaît dans la procédure analytique.

Dans ce travail, nous avons investigué le profil de risque à chaque niveau de concentration utilisé en validation et calculé selon Mee [55]. Puisqu'à l'étape de validation nous avons sélectionné le modèle de régression passant par zéro et utilisant  $12 \mu\text{g/mL}$  et que le modèle de régression linéaire pondérée était aussi trouvé adéquat, nous avons considéré ces deux modèles pour établir les profils de risque (figure IV.13).



**Figure IV.13.** – Graphique des profils de risque considérant le modèle de régression linéaire pondérée (ligne en pointillé) et le modèle de régression ajusté avec  $12 \mu\text{g/mL}$  comme niveau de concentration (ligne continue), avec un niveau de risque fixé à priori à 5 %.

Comme le montre la figure IV.12, le risque d'avoir des mesures futures en dehors des limites d'acceptation de 10 % est pratiquement nul aux niveaux de concentration supérieurs à 12 µg/mL alors que ce risque augmente et culmine à 6 µg/mL (risque valant 4,1 %) et 3 µg/mL (risque valant 2,3 %) en considérant respectivement le modèle de régression linéaire pondéré et celui ajusté avec 12 µg/mL comme niveau de concentration. Dans tous les cas, les risques ne dépassent pas 5 % et sont même plus faibles en considérant ce dernier modèle de régression, confortant ainsi la justification de sa sélection pour la calibration en vue du dosage de l'impureté R-timolol.

De ce fait, en analysant les échantillons de maléate de S-timolol aux concentrations équivalant à environ 3,0 µg/mL (0,2 %), 97,5 fois sur 100 les mesures futures obtenues avec la méthode de CLHP chirale validée seront incluses dans les limites d'acceptation de 10 %. Cette proportion croît pour des teneurs supérieures à 0,4 % en impureté chirale. Par ailleurs, les critères d'acceptation obtenus avec le modèle de régression passant par zéro sont adéquats étant donné qu'ils assurent le risque consommateur en garantissant qu'une proportion élevée ( $\beta = 97,5$  %) des résultats des mesures futures seront compris dans les limites d'acceptation fixées pour les impuretés ( $\lambda = 10$  %).

#### **IV.2.3.5. DÉTERMINATION QUANTITATIVE DES IMPURETÉS**

Après avoir validé la méthode de CLHP optimisée, nous l'avons appliquée pour l'usage requis qui est la détermination de la teneur du R-timolol ainsi que des autres impuretés dans le maléate de S-timolol. Puisque nous disposons de plusieurs lots d'échantillons de maléate de S-timolol, nous en avons testé la pureté.

La détermination a été faite en comparant la réponse chromatographique (aire de pic) du R-timolol obtenue avec la solution à examiner à la réponse chromatographique de la solution de référence de R-timolol à 1,0 %. Pour les autres impuretés, la comparaison de leurs réponses chromatographiques a été faite avec la solution de référence de S-timolol à 0,4 %. Le facteur de réponse n'a pas été considéré.

Les résultats présentés dans le tableau IV.11 montre que les échantillons N°8059, 8060, 11350 et A5798 sont les plus purs alors que les autres contiennent surtout le R-timolol. En aucun cas la teneur de cette impureté chirale n'était supérieure à 0,5 %. D'autre part, aucune des autres impuretés n'a été trouvée présente à des concentrations supérieures à 0,1 %.

**Table IV.11. – Contenu de dix lots d'échantillon de maléate de S-timolol ;  
moyenne (%) et coefficient de variation (%)**

Echantillons de maléate de S-timolol	Impuretés déterminées			
	R-timolol (%) (RSD en %)	Isotimolol	DMTDZ	Dimère de timolol
N° 8059	*	-	-	-
N° 8060	*	-	-	-
N° 11350	*	-	-	-
N° A5798	*	-	-	-
N° 11351	0,11 (2,1)	-	-	-
N° 11486	0,11 (4,7)	-	-	-
N° A5799	0,24 (3,7)	-	-	-
N° 11483	0,25 (0,6)	-	-	-
N° 11484	0,31 (3,4)	-	-	-
N° A5800	0,49 (1,2)	-	-	-

Légende : \* = inférieur à 0,1 % ; - = non détecté

#### IV.2.4. CONCLUSION

Nous venons de présenter les résultats de l'étude consacrée à la validation de la méthode de CLHP que nous avons précédemment optimisée. A cet effet, une nouvelle stratégie basée sur le profil d'exactitude a été appliquée avec succès pour démontrer la capacité de la méthode à quantifier le R-timolol dans le maléate de S-timolol.

En considérant les risques de 5 % et 10 % ainsi, plusieurs profils d'exactitude ont été construits. A partir de ces profils, le modèle de régression le plus adéquat a été sélectionné : le modèle de régression linéaire passant par zéro et utilisant un seul standard de calibration (12 µg/mL).

Les différents critères de validation examinés en appliquant ce modèle de régression sélectionné ont été trouvés acceptables. Cependant, d'autres modèles de régression ont été aussi testés. A l'exception du modèle de régression linéaire pondéré, ces modèles n'étaient pas adéquats.

Le profil de risque a été investigué comme nouvel outil de gestion de risque dans le domaine de la validation des procédures analytiques en vue d'évaluer la probabilité d'obtenir des mesures futures en dehors des limites d'acceptation.

La méthode a été appliquée avec succès pour déterminer l'impureté R-timolol ainsi que les autres impuretés dans dix lots d'échantillons de maléate de S-timolol. Aucun lot n'a présenté des impuretés à des teneurs supérieures aux valeurs tolérées par la monographie pour ces impuretés.