

VI.4. ETUDE COLLABORATIVE

V.4.1. INTRODUCTION

Le récent développement des méthodes électrophorétiques capillaires en milieu non aqueux acidifié et utilisant l'heptakis(2,3-di-*O*-méthyl-6-*O*-sulfo)- β -cyclodextrine (HDMS- β -CD) comme sélecteur chiral s'est révélé très prometteur pour la séparation énantiomérique des médicaments basiques, comme le timolol [255]. La validation des méthodes analytiques est une étape essentielle pour garantir la qualité adéquate des résultats générés au sein du laboratoire qui a développé cette méthode. Toutefois, lorsqu'un usage à plus large échelle de la méthode analytique est envisagé, comme par exemple sa normalisation ou son transfert simultané vers plusieurs laboratoires, une étude collaborative devient indispensable.

A notre connaissance, très peu de méthodes d'électrophorèse capillaire (EC) ont fait l'objet d'étude inter-laboratoires [86-88, 102, 264, 265]. Cependant, l'examen de la fidélité au cours d'une étude inter-laboratoires permet d'augmenter la confiance des utilisateurs finals vis-à-vis de la procédure analytique, mais aussi de déceler d'éventuels problèmes relatifs au transfert de cette procédure vers un usage à large échelle.

L'objectif de cette étude est d'évaluer, au moyen d'une étude inter-laboratoires, la capacité de transfert de la méthode d'EC en milieu non aqueux qui a été développée et validée pour la détermination de la pureté énantiomérique du S-timolol. A cet effet, en se basant sur le guide ISO 5725-2 [52], plusieurs réponses qualitatives et quantitatives ont été examinées en vue d'évaluer la performance de la méthode d'EC en milieu non aqueux au sein des laboratoires.

V.4.2. MATERIELS ET METHODE

V.4.2.1. APPAREILLAGE

Dans le cadre de cette étude collaborative, les différents équipements d'électrophorèse capillaire devaient satisfaire aux exigences de la méthode d'EC en milieu non aqueux. En effet, un refroidissement suffisant était indispensable pour permettre le maintien du capillaire

à la température de 15°C. De plus, les équipements d'EC devaient permettre l'utilisation de capillaire dont la longueur totale est de 48,5 cm, celle entre le point d'injection et de détection de 40 cm et le diamètre interne de 50 µm. Pour les équipements Agilent, ces exigences en rapport avec les dimensions du capillaire ne posent pas de problème. Par contre, pour les équipements Beckman, compte tenu de la conception des cassettes pour le montage des capillaires, la longueur totale de ces derniers était adaptée pour faire 50,2 cm. La longueur totale du capillaire a été adaptée à cette spécification

Trois laboratoires ont utilisé des systèmes P/ACE MDQ de chez Beckman (Fullerton, USA) et huit ont utilisé des systèmes HP^{3D}CE de chez Agilent (Waldbronn, Germany). Pour ces derniers, les versions des logiciels d'exploitation étaient différentes (Tableau V.15).

Les capillaires étaient en silice fondue non modifiée provenant de différents fournisseurs à savoir BGB Analytik, Polymicro technologies, Beckman Coulter et Composite Metal Services.

Les calculs statistiques ont été réalisés avec le logiciel JMP® version 5.1 pour Windows.

Tableau V.15. – Caractéristiques des équipements d’EC et des capillaires utilisés lors de l’étude

Types d’équipement d’EC des laboratoires	Logiciels d’exploitation	Données du capillaire
1) HP^{3D} (Agilent)	ChemStation Rev. A.08.03	Polymicro BGB Analytik
2) G1600A (Agilent)	3D-CE ChemStation Rev. A.09.01	Polymicro Technologies
3) G1600AX (Agilent)	MSD ChemStation Rev. A.10.02 [1757]	BGB Analytik AG 375 µm O.D.
4) HP^{3D} (Agilent)	3D-CE ChemStation Rev. A.05.03	TSP, 375 µm O.D.
5) HP^{3D}, 1600 A (Agilent)	3D-CE ChemStation Rev. A.08.03	TSP, 375 µm OD
6) HP^{3D} (Agilent)	Integration software Ver. A.09	Composite Metal Service
7) G1600AX (Agilent)	ChemStation Rev. A.09.03	BGB Analytik
8) HP^{3D}, 1600 (Agilent)	HPCE rev. 2.3, DAD rev. 1.3	Polymicro P/N 200017, 363 µm O.D.
9) P/ACE MDQ (Beckman)	32 Karat version 4.01	TSP 050375 Metal Composite Service
10) P/ACE MDQ (Beckman)	32 Karat version 5.0	TSP 050375 Metal Composite Service
11) P/ACE MDQ (Beckman)	32 Karat version 4.01	Metal Composite Service

V.4.2.2. PRODUITS CHIMIQUES ET RÉACTIFS

Pour la quantification du R-timolol, quatre échantillons homogènes de maléate de S-timolol ont été examinés (lots N°107200204, N° 11484, N°11483 et N°11351). Tous ces échantillons ainsi que la substance chimique de référence du R-timolol et la pyridoxine ont été distribués aux laboratoires participants par nos soins.

De manière générale, les laboratoires s'étaient approvisionnés en réactifs auprès des fournisseurs suivants :

- Sigma-Aldrich, Fluka pour l'acide (1R) ou (1S)-(-)-10-camphosulfonique et pour le formate de potassium,
- Regis Technologies, Antek-PAC pour l'heptakis(2,3-di-O-méthyl-6-O-sulfo)- β -cyclodextrine (HDMS- β -CD),
- VWR International, Acros, Panreac, Merck, Fluka, Riedel-de Haen pour l'acide formique, et
- Merck, Prolabo, Panreac, Carlo Erba Reagenti, Biosolve, American Chemicals pour le méthanol.

Ces réactifs devaient satisfaire aux exigences de l'EC en milieu non aqueux : la qualité du méthanol devait être pour « chromatographie liquide » alors que celle de l'acide formique (98-100%) devait être « pour analyse ».

V.4.2.3. CONDITIONS ELECTROPHORETIQUES

Les conditions d'EC développées dans la partie V.I ont été appliquées par les différents laboratoires participants et consistaient en l'utilisation d'un capillaire en silice fondue non modifiée dont la longueur totale est de 48,5 cm, celle entre le point d'injection et de détection de 40 cm et le diamètre interne de 50 μ m. Les séparations électrophorétiques ont été effectuées en utilisant 30 mM de HDMS- β -CD en combinaison avec 30 mM de camphosulfonate de potassium dans du méthanol acidifié avec 0,75 M d'acide formique. L'injection hydrodynamique est faite en appliquant une pression de 50 mbar pendant une période de 8 sec et la détection UV était réalisée à 295 nm. Le capillaire est thermostaté à 15°C. Dans ces conditions, en appliquant un voltage de 25 kV, le dernier pic migrant est détecté au niveau de la cathode après 14 min.

Un nouveau capillaire est conditionné à 15°C avec du méthanol pendant 15 min. Avant d'effectuer les expériences, le capillaire est conditionné successivement avec le tampon d'électrolyte (BGE) et le tampon d'électrolyte contenant l'HDMS- β -CD (BGE-CD). Entre les injections, le capillaire est rincé à 15°C avec du méthanol pendant 2 min puis conditionné à 15°C avec la solution de BGE-CD pendant 4 min. Le BGE et le BGE-CD sont renouvelés après environ 70 min d'analyse pour éviter le phénomène d'épuisement du tampon qui peut causer une perte d'efficacité de séparation. A la fin de chaque journée de travail, le capillaire est rincé à 25°C avec du méthanol pendant 30 min, puis avec une solution méthanolique à 20 mM de formate d'ammonium et finalement avec du méthanol pendant 30 min. Les cycles de rinçage et de conditionnement du capillaire sont effectués à une pression d'environ 1 bar.

V.4.2.4. PRÉPARATION DES SOLUTIONS

Afin d'assurer une dissolution complète des substances et l'homogénéité des solutions, l'utilisation du vortex et le passage en bain à ultrasons ont été exigés. Avant leur utilisation dans le système d'EC, les solutions ont été filtrées directement dans des vials appropriés à travers des filtres membranes Polypure en polypropylène (0,2 μ m) (Alltech, Laarne, Belgique) résistants aux solvants organiques.

V.4.2.4.1. Solutions de référence

En vue d'examiner la performance des systèmes d'EC, trois solutions de référence ont été sélectionnées et préparées comme suit :

- i)* la solution de référence (a) contenant la pyridoxine (5 μ g/mL), le S-timolol (10 μ g/mL) et le R-timolol (2 μ g/mL) et préparée par dilution à partir des solutions mères correspondantes (1 mg/mL),
- ii)* la solution de référence (b) contenant 20 μ g/mL de maléate de R-timolol (correspondant à 1,0 %) et 5 μ g/mL de pyridoxine, et
- iii)* la solution de référence (c) qui correspond à une solution à 0,1 % (en référence au maléate de R-timolol) préparée en diluant 10 fois la solution de référence (b).

La solution de référence (a) a été utilisée dans un premier test de performance pour identifier les différents pics observés dans les électrophérogrammes obtenus et pour calculer les résolutions entre les énantiomères du timolol et entre le S-timolol et la pyridoxine. En effet, les concentrations des trois analytes ont été sélectionnées de manière à permettre l'identification des pics selon leur hauteur. Dans les conditions d'EC prescrites, l'énantiorésolution ne peut pas être inférieure à 5,5. La résolution entre l'étalon interne et le S-timolol doit aussi être rapportée. Sa valeur doit être au moins de 9. En cas de non conformité à ce test, par exemple une énantiorésolution inférieure à 5,5, le protocole préconise l'ajustement du voltage. En effet, lors du test de robustesse de la méthode d'EC en milieu non aqueux, nous avons constaté qu'une diminution du voltage appliqué améliorerait la séparation énantiomérique. Dans tous les cas, quels que soient les résultats du test, les temps de migration des analytes et la sélectivité (rapport entre les temps de migration) entre les pics consécutifs devaient être rapportés. Les résolutions sont calculées selon la Pharmacopée Européenne [209] :

$$Rs_{12} = 1.18 \times \left[\frac{(t_{M_2} - t_{M_1})}{(w_{2(0.5)} + w_{1(0.5)})} \right] \quad (\text{V.6})$$

avec t_{M_1} et t_{M_2} , les temps de migration des pics correspondant respectivement au premier et au second pic d'analyte, $w_{1(0.5)}$ et $w_{2(0.5)}$, les largeurs à mi-hauteur de leurs pics respectifs.

Dans un second test de performance, la solution de référence (c) est utilisée pour tester la sensibilité en déterminant le rapport signal/bruit (S/B). Ce rapport a été calculé selon la Pharmacopée Européenne [209] (Equation IV.9) en considérant le pic du R-timolol. Si une valeur d'au moins 10 est obtenue pour ce rapport, signifiant que la solution analysée donne un signal qui vaut dix fois celui du bruit de fond, alors la concentration correspondant à 0,1 % est considérée comme limite de quantification. Il était dès lors possible de quantifier le R-timolol à des concentrations en solution au dessus de ce seuil. Dans le cas contraire (rapport S/B inférieur à 10), le détecteur devait être vérifié et si nécessaire être remplacé. Comme la solution de référence (c) contient aussi la pyridoxine (étalon interne), la valeur du rapport S/B de son pic doit aussi être rapportée.

Enfin, dans un troisième test de performance, la répétabilité du système d'injection a été examinée en injectant six fois la solution de référence (b). La répétabilité des temps de

migration de chaque analyte a ensuite été évaluée ainsi que le temps de migration relatif qui est le rapport entre le temps de migration du R-timolol et celui de l'étalon interne.

V.4.2.4.2. Solutions pour la détermination quantitative

V.4.2.4.2.1. Solution de l'étalon interne

La solution mère de l'étalon interne a été préparée en dissolvant environ 12,5 mg de chlorhydrate de pyridoxine dans 25,0 mL de méthanol. Ensuite, la solution a ensuite été diluée cinquante fois avec le même solvant en vue d'obtenir une solution intermédiaire à la concentration de 10 µg/mL.

V.4.2.4.2.2. Solution de référence

Une solution mère de R-timolol a été préparée en dissolvant dans 10,0 mL de méthanol une quantité exactement pesée d'environ 20 mg de maléate de R-timolol. Cette solution mère a ensuite été diluée cent fois pour obtenir une solution de référence représentant 1,0 % (20 µg/mL) en impureté et contenant l'étalon interne à la concentration de 5 µg/mL. Cette solution de référence a été utilisée pour la détermination de la teneur en R-timolol dans différents échantillons de maléate de S-timolol.

V.4.2.4.2.2. Solution à examiner

Quatre lots d'échantillons (A, B, C et D) de maléate de S-timolol ont été fournis aux laboratoires participants sous forme de poudre homogène. Deux solutions indépendantes ont été préparées par échantillon en vue de contenir respectivement 2,0 mg/mL de S-timolol et 5 µg/mL d'étalon interne. La solution échantillon à examiner a quant à elle été préparée en dissolvant une quantité exactement pesée d'environ 20,0 mg d'échantillon à analyser dans 10,0 mL de méthanol et en y additionnant le volume de solution intermédiaire de l'étalon

interne pour obtenir une concentration finale de 5 µg/mL. Chaque solution a été analysée dans les conditions de répétabilité.

V.4.2.4.3. Protocole d'exécution de l'étude

L'étude comprenait au départ onze laboratoires appartenant à des institutions gouvernementales, universitaires ainsi qu'à des compagnies pharmaceutiques, localisées en Europe et en Amérique. Ce nombre est en accord avec le nombre minimum de laboratoire exigé par le guide ISO 5725-2 ($n = 8$) [52].

Nous avons donc suivi ce guide pour réaliser l'étude collaborative. L'organisation de l'étude est illustrée à la figure V.17.

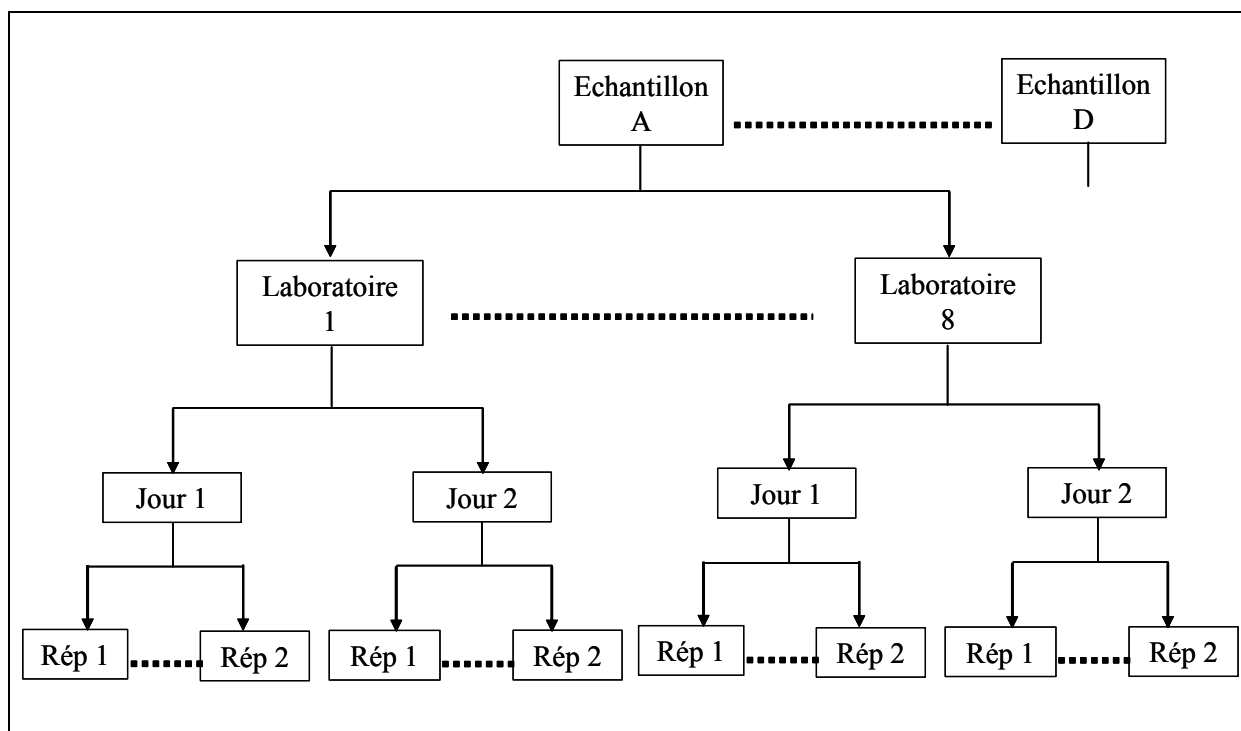


Figure V.17. – Protocole d'exécution de l'étude collaborative pour chaque échantillon analysé ($r = 8$ laboratoires, $c = 2$ jours et $g = 2$ répétitions).

$$\bar{x}_i = (i = 1 \dots r), \bar{x}_{ij} = (j = 1 \dots c) \text{ et } x_{ijk} = (k = 1 \dots g)$$

Elle indique que dans chaque laboratoire, les quatre lots d'échantillons de maléate de S-timolol ont été analysés sur deux jours (ou séries) ($c = 2$). Chaque jour, deux solutions indépendantes de chaque échantillon ont été préparées et analysées ($g = 2$ répétitions).

La teneur en R-timolol a été déterminée dans ces échantillons en se référant à la solution de référence à 0,1 %. Comme cela a été le cas pour l'étude collaborative que nous avons menée avec la méthode de CLHP, nous avons appliqué un protocole beaucoup plus élaboré que ceux couramment appliqués dans la plupart des études inter-laboratoires [79, 245], car il a notamment permis d'évaluer la fidélité intermédiaire pour chaque laboratoire.

V.4.2.5. ANALYSE STATISTIQUE DES RÉSULTATS QUANTITATIFS

Avant leur utilisation, les résultats quantitatifs ont été statistiquement examinés en vue d'évaluer une éventuelle présence de valeurs aberrantes ou de valeurs limites. Deux approches définies par les lignes directrices ISO 5725-2 [52] ont été appliquées à savoir l'évaluation graphique et les tests numériques.

La variabilité intra-laboratoire a été évaluée graphiquement au moyen du test statistique k de Mandel. Le test de Cochran [52] a été utilisé pour évaluer l'homogénéité de la variance de tous les laboratoires.

Quant à la variabilité inter-laboratoires, elle a été évaluée graphiquement au moyen du test statistique h de Mandel. Différents tests de Grubb [52, 246] et un test décrit par Kelly [247] ont été utilisés pour l'évaluation numérique.

Les formules pour le calcul de ces différents tests sont reprises dans la partie IV.4.2.5.

V.4.3. RESULTATS ET DISCUSSION

Avant de procéder aux tests de l'étude, il a été demandé à tous les laboratoires de s'assurer de la maintenance de leurs équipements d'EC en se référant aux manuels d'usage de chaque équipement. En effet, il est bien connu qu'un manque de maintenance ou une maintenance inadéquate de certaines parties de l'équipement d'EC, telles que les perforieuses de bouchons (en anglais « prepunchers ») ou les électrodes, est à la base d'effets néfastes sur

l'efficacité de la séparation. La procédure de maintenance a été quotidiennement effectuée avant le début de chaque jour d'analyse.

Un protocole détaillé a ensuite été élaboré pour l'exécution de l'étude. Toutefois, un test préliminaire (ou test d'aptitude) a été organisé en vue de permettre aux laboratoires participants de se familiariser avec la méthode et de vérifier l'adéquation du protocole. Ce test consiste en l'évaluation des aspects qualitatifs (résolution, sélectivité des différents pics d'analyte, leur temps de migration et le rapport signal/bruit) et des aspects quantitatifs (teneur en R-timolol dans un échantillon de maléate de S-timolol). Ce n'était qu'après ce test préliminaire et sur base des résultats rapportés que les laboratoires pouvaient commencer l'étude inter-laboratoires proprement dite.

V.4.3.1. TEST D'APTITUDE (TRAINING)

Le test d'aptitude a révélé plusieurs problèmes auprès des laboratoires utilisant les équipements de chez Beckman. Certains de ces laboratoires n'ont observé aucun pic électrophorétique avec la solution de référence (a) endéans le temps d'analyse fixé par le protocole (14 min). D'autres ont observés de trop faibles intensités de courant voire l'absence totale de courant et empêchant toute migration.

Une analyse plus approfondie de la situation a indiqué que le problème serait lié au système de refroidissement du capillaire. En effet, les équipements Agilent sont munis d'un système de refroidissement par aération d'air froid alors que dans les équipements Beckman c'est plutôt un liquide qui assure le refroidissement du capillaire, et ces derniers semblent être plus efficaces [102, 266]. Dans la méthode d'EC en milieu non aqueux qui a été développée, les conditions analytiques stipulent d'utiliser la valeur de 15°C comme température du capillaire. Avec les équipements Beckman, un refroidissement plus important semble survenir au sein du capillaire provoquant ainsi une diminution d'intensité sachant que le courant est proportionnel à la température. Par conséquent, un retard de migration des pics (temps de migration élevés) a été observé par rapport aux analyses effectuées avec les équipements Agilent [102].

Une autre situation plus gênante toujours en rapport avec le système de refroidissement a été le fait que la valeur de 15°C (pour la température) a provoqué la cristallisation et la précipitation du BGE-CD au sein du capillaire ou aux niveaux de ses

extrémités conduisant à une absence de courant. Cette situation a fréquemment été rapportée par les laboratoires utilisant les équipements de chez Beckman.

Même si deux laboratoires ont pu rapporter des résultats relatifs uniquement à l'analyse de la solution de référence (c), suite aux problèmes évoqués ci-dessus, ils n'en étaient pas moins incapables de fournir suffisamment de résultats pouvant leur permettre de poursuivre l'étude inter-laboratoires. Par conséquent, seuls les laboratoires utilisant les équipements Agilent ont pu réaliser le test préliminaire sans rencontrer les problèmes énumérés ci-dessus. Puisque leur nombre ($r = 8$) était toujours en accord avec les prescriptions de normes ISO 5725-2, l'étude a pu continuer.

V.4.3.2. ETUDE INTER-LABORATOIRES

V.4.3.2.1. Vérification du système d'EC et réponses électrophorétiques

La performance du système d'EC devait être d'abord vérifiée en analysant les solutions de référence (a) et (c). Si les exigences prescrites pour ces deux tests étaient satisfaites, le troisième test de performance, le test de répétabilité, pouvait être effectué et ensuite, la teneur du R-timolol était déterminée dans les différents échantillons de maléate de S-timolol en suivant la procédure décrite dans la Figure V.18.

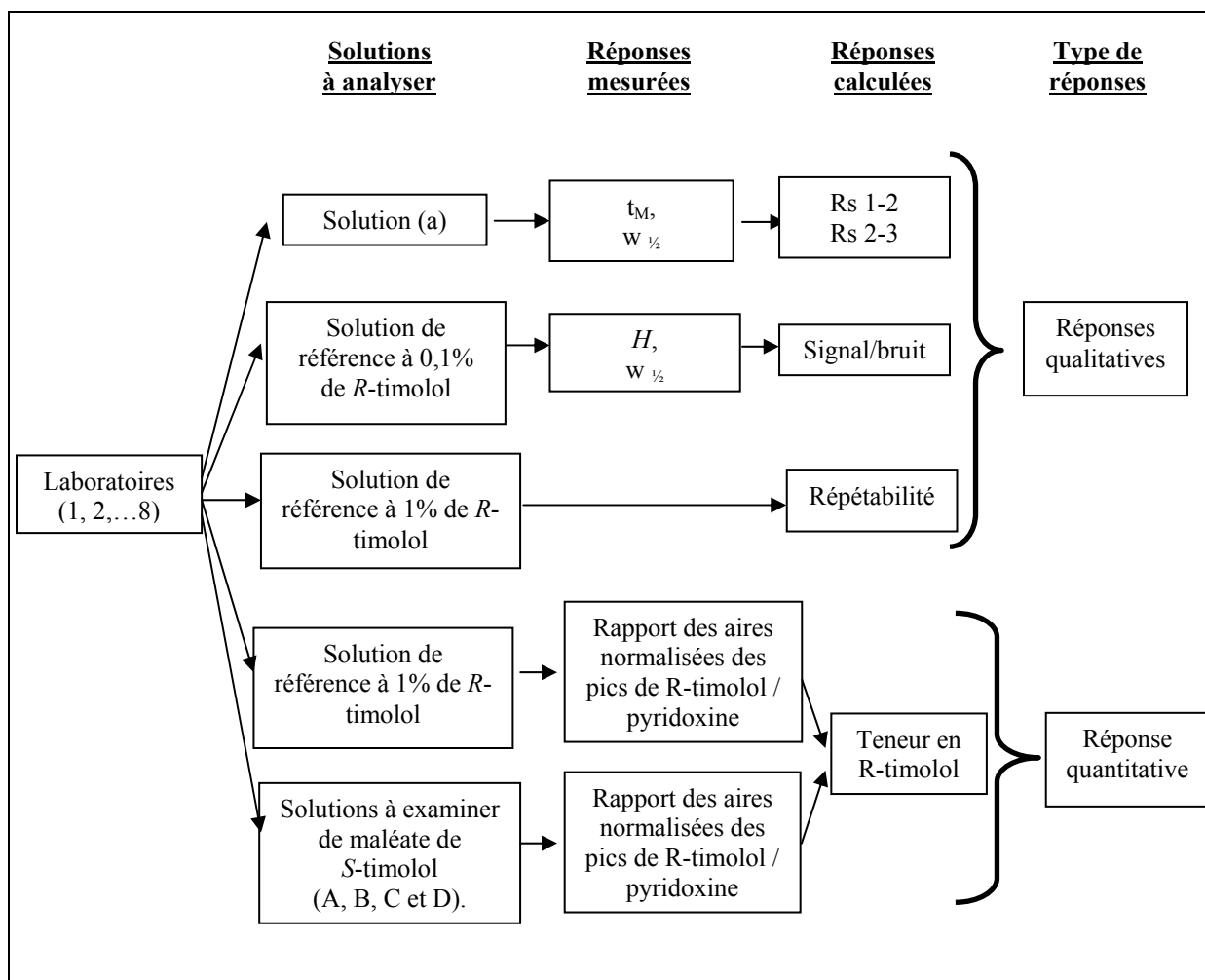


Figure V.18. – Représentation schématique pour l'exécution des tests et la détermination des réponses

Légende : t_M = temps de migration ; $w_{1/2}$ = largeur de pic à mi-hauteur ; H = hauteur de pic ; Rs = résolution, 1 = pyridoxine ; 2 = S-timolol ; 3 = R-timolol.

Un électrophérogramme typique d'une solution de référence (a) est présenté à la figure V.19. La séparation électrophorétique a été convenablement et efficacement atteinte par tous les laboratoires participants avec des valeurs d'intensité de courant allant de 14 à 20 μA . Il peut être noté que par la différence des hauteurs des pics, tous les laboratoires ont pu identifier les trois pics et leur ordre de migration.

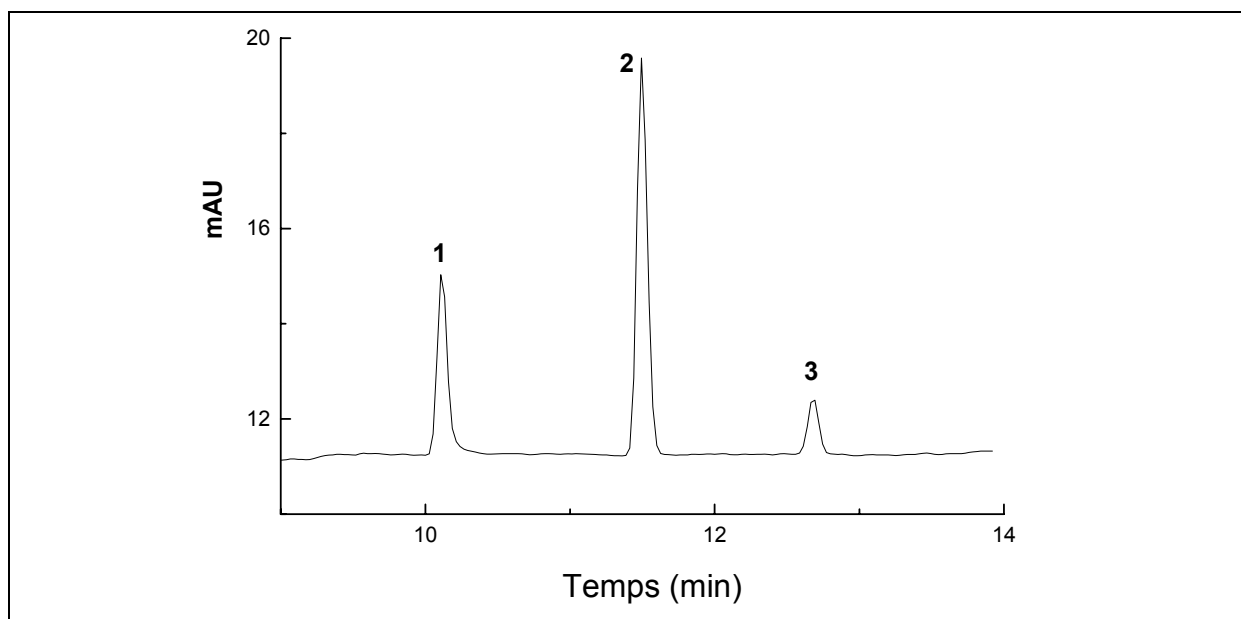


Figure V.19. – *Séparation électrophorétique obtenu en analysant la solution de référence (a)*
Pics et concentrations: 1.- Pyridoxine (5 µg/mL), 2.- S-timolol (10 µg/mL) et 3.- R-timolol (2 µg/mL).

Les résultats pour les tests d'adéquation du système d'EC résumés dans le tableau V.16 indiquent que tous les laboratoires ont satisfait aux exigences quant à l'énantiorésolution puisque les valeurs obtenues étaient supérieures à 5,5. La résolution attendue entre la pyridoxine et le S-timolol ($R_{S_{1-2}} = 9$) était aussi satisfaisante pour tous les laboratoires excepté le laboratoire 7 qui a obtenu une plus petite valeur ($R_{S_{1-2}} = 5.3$). De plus, ce laboratoire a obtenu des temps de migration faibles pour tous les pics par rapport aux autres laboratoires bien que l'intensité de courant rapportée était acceptable. Aucun problème particulier n'a été rapporté par ce laboratoire qui, par ailleurs, avait présenté des résultats satisfaisants lors du test préliminaire. Puisque les résultats étaient améliorés au deuxième jour de l'étude, nous avons suspecté qu'un conditionnement insuffisant du capillaire était à l'origine de ce problème [102, 110, 266].

Tableau V.16. – *Temps de migration et résolutions obtenus au jour 1 avec la solution de référence (a)*

Laboratoires	Temps de migration (min)			Résolutions (Rs)	
	Pic 1	Pic 2	Pic 3	Rs 1-2	Rs 2-3
1	10,2	11,2	12,5	8,6	10,6
2	9,2	10,2	11,1	10,0	10,0
3	10,0	11,0	12,0	9,3	9,3
4	10,7	12,5	13,5	11,9	5,7
5	10,9	11,5	12,5	9,2	6,5
6	10,0	11,5	12,4	12,9	6,8
7 (jour 1)	8,2	8,7	9,6	5,3	8,6
7 (jour 2)	9,3	10,2	11,0	8,9	7,9
8	10,4	11,6	12,9	10,7	10,0

Légende : 1 = pyridoxine ; 2 = S-timolol ; 3 = R-timolol.

Le laboratoire 8 a effectué les analyses en appliquant un voltage en dessous de 25 kV. En effet, lors du training, la résolution de la paire des pics des énantiomères était satisfaisante mais celle de la paire pyridoxine / S-timolol ne l'était pas ($R_{S1-2} = 7,5$). Une traînée du pic parent (S-timolol) était aussi observée (Figure V.20). C'est pourquoi un voltage de 23,5 kV a été appliqué permettant ainsi d'améliorer cette résolution ($R_{S1-2} = 10,7$) et la symétrie du pic parent. Remarquons que cette pratique est en accord avec l'évaluation graphique obtenu lors de l'étude de robustesse de la méthode d'EC en milieu non aqueux qui montrait que le voltage avait un effet significatif de moindre mesure sur cette résolution. Cette amélioration de la symétrie du pic parent a permis la détection, l'intégration et la quantification du pic de R-timolol dans les échantillons de maléate de S-timolol. Ce phénomène pourrait provenir de la différence des lots de capillaires utilisés [110] susceptible d'affecter la reproductibilité de la séparation électrophorétique.

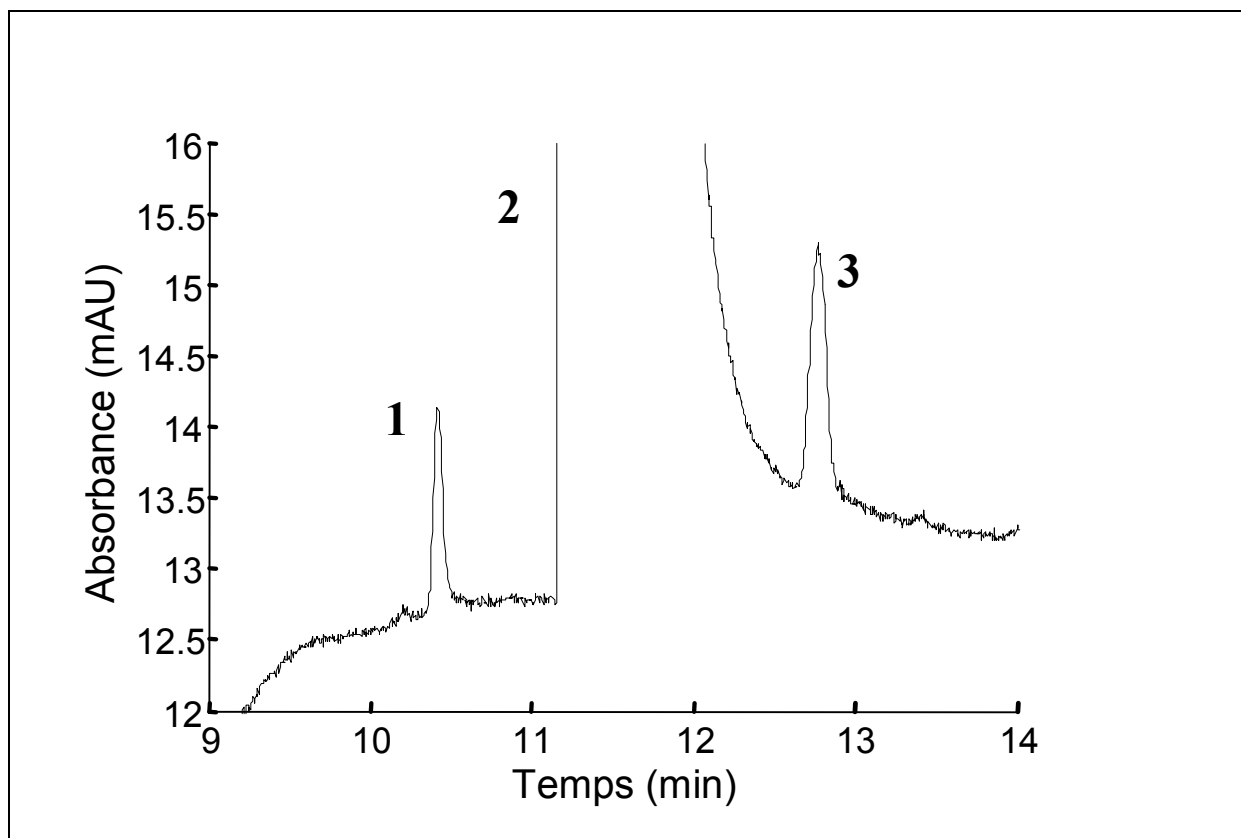


Figure V.20. – Séparation électrophorétique obtenu par le laboratoire 8 en analysant la solution échantillon A

Pics et concentrations: 1.- Pyridoxine (5 $\mu\text{g/mL}$), 2.- S-timolol (2 mg/mL) et 3.- R-timolol (12,4 $\mu\text{g/mL}$).

La détectabilité du système d'EC a été vérifiée en évaluant les valeurs des rapports signal/bruit (S/B) pour le R-timolol et la pyridoxine. Tous les laboratoires ont satisfait à ces exigences pour le R-timolol (Tableau V.17). Néanmoins, pour la pyridoxine, les valeurs de S/N n'ont jamais dépassé 10. En particulier, le laboratoire 5 a présenté une valeur extrêmement basse (S/B = 2). Notons encore que le rapport entre le S/B du R-timolol et le S/B de la pyridoxine était de 7,5 pour ce même laboratoire alors qu'en général, des rapports compris entre 1,8 et 3,0 étaient obtenus. Ceci indique clairement une croissance de l'incertitude pour le laboratoire 5 lors de la quantification du R-timolol à des concentrations proches de la limite de quantification (0,1%).

En ce qui concerne la sélectivité, les valeurs obtenues étaient quant à elle en majorité de 1,1.

Tableau V.17. – *Sélectivités et rapports signal/bruit obtenus au jour 1 avec la solution (a)*

Laboratoire	Sélectivités (α)		Signal/bruit (S/B)	
	α 1-2	α 2-3	S/N pic 1	S/N pic 3
1	1,12	1,10	5	10
2	1,10	1,10	6	11
3	1,10	1,09	4	11
4	1,17	1,08	8	22
5	1,13	1,09	2	15
6	1,07	1,15	7	16
7 (jour 1)	1,07	1,11	5	11
7 (jour 2)	1,10	1,08	5	10
8	1,11	1,11	5	15

Légende : 1 = pyridoxine ; 2 = S-timolol ; 3 = R-timolol.

Dans un troisième test de performance, la précision des systèmes d'EC a été examinée en termes de variation des temps de migration ainsi que de variation des aires des pics de la pyridoxine et du R-timolol. Les résultats présentés dans le tableau V.18 pour les temps de migration indiquent que leurs valeurs des coefficients de variation (CV) ne sont pas supérieures à 1 % pour tous les laboratoires excepté pour les laboratoires 3 et 7 (pyridoxine et R-timolol). Au deuxième jour de l'étude, une amélioration a été observée. Comme pour le test de robustesse, nous avons examiné la précision des différents systèmes d'EC en terme de temps de migration (t_M) relatif entre le R-timolol et la pyridoxine ($t_{M \text{ R-timolol}} / t_{M \text{ pyridoxine}}$). Les CV étaient inférieurs à 1 % pour tous les laboratoires et même en majorité inférieurs à 0,4 %. Pour les deux jours d'analyse, les valeurs de CV pour les temps de migration relatifs étaient inférieures à 1,2 %, excepté pour le laboratoire 5 (CV = 2 %). Pour l'ensemble de l'étude inter-laboratoires, la valeur du CV était 2,2 % ($N = 96$ analyses), démontrant ainsi une très bonne stabilité des temps de migration relatifs pour la méthode EC en milieu non aqueux et ce, dans les conditions de répétabilité, de fidélité intermédiaire et de reproductibilité. Ceci indique aussi d'une part, une bonne constance des vitesses de migration des pics de la

pyridoxine et du R-timolol dans tous les laboratoires, et d'autre part l'adéquation de l'effet de standardisation de la pyridoxine. L'application du TMR a été trouvée aussi intéressante pour les laboratoires 3 et 7 (CV en dessous de 0,8 %) où les CV des temps de migration correspondant étaient particulièrement très élevés.

Tableau V.18. – *Répétabilité (n = 6 injections) des temps de migration et des temps de migration relatifs*

Labo.	Pyridoxine				R-timolol				TMR
	TM		Aire		TM		Aire		
	Moy.	CV (%)	Moy.	CV (%)	Moy.	CV (%)	Moy.	CV (%)	CV (%)
1	10,3	0,3	10,85	1,1	12,6	0,4	25,71	1,9	0,1
2	9,3	0,9	8,06	4,8	11,1	1,0	23,12	0,5	0,2
3	9,9	1,9	8,64	12,1	11,7	1,8	28,80	5,3	0,7
4	10,6	0,8	8,52	6,5	13,1	0,9	25,52	3,1	0,3
5	10,3	0,2	8,03	3,9	12,5	0,2	28,17	4,0	0,3
6	9,8	0,3	7,28	1,6	12,2	0,3	24,98	1,8	0,1
7	8,3	2,1	11,13	1,2	9,8	2,2	26,41	0,9	0,2
8	10,4	0,6	5,69	3,4	12,8	0,5	20,63	2,8	0,2

Légende : Labo. = laboratoire ; Moy. = Moyenne ; CV = coefficient de variation ; TM = temps de migration ; TMR = temps de migration relatif.

Quant aux aires des pics, les résultats présentés dans le tableau V.18 montrent que les laboratoires 1, 6, 7 et dans une moindre mesure le laboratoire 8 ont des variabilités tout à fait acceptables (CV inférieurs à 3 %) pour les deux composés. Cependant, de très grandes variabilités ont été observées aussi bien pour le R-timolol (laboratoires 3 et 5) que pour l'étalon interne (laboratoires 2, 3, 4 et 5) avec des valeurs importantes de CV (exemple 12,1 % pour le laboratoire 3). Malgré la normalisation des aires de pic en les divisant par les temps migration correspondants, cette variabilité n'a pas été significativement améliorée (Tableau V.19). Par contre, pour le rapport des aires normalisées des pics du R-timolol sur celles de la pyridoxine, des valeurs acceptables (CV inférieur à 3 %) ont pu être atteintes par la moitié des

participants (laboratoires 1, 6, 7 et 8). A la lumière de ces observations et de celles rapportées par les données du rapport signal/bruit, les variations observées pour les aires des pics semblent être affectées par d'autres sources que les temps de migration, par exemple la source d'énergie de la lampe du détecteur et la vitesse d'acquisition des signaux en provenance du détecteur. Pour les laboratoires 2, 3, 4 et 5, les valeurs de CV sont plus grandes avec l'étalon interne qu'en absence de standardisation. Des valeurs de CV plus grandes ont été rapportées pour le pic de la pyridoxine ainsi que pour celui du R-timolol. Ceci pourrait avoir une influence sur les résultats quantitatifs.

Tableau V.19. - Répétabilité ($n = 6$ injections) des aires normalisées et de leur ratio

Laboratoires	Pyridoxine		R-timolol		Ratio des aires corrigées (R-timolol/Pyridoxine)	
	Aires normalisées				Moyenne	CV (%) (jour1 // jour 2)
	Moyenne	CV (%)	Moyenne	CV (%)		
1	1,05	1,3	2,04	2,1	1,935	1,1 // 1,9
2	0,87	4,9	2,08	1,2	2,400	4,4 // 6,2
3	0,87	12,7	2,47	6,4	2,842	8,2 // 6,2
4	0,80	7,2	1,95	3,8	2,425	5,2 // 2,7
5	0,78	3,9	2,26	4,1	2,894	6,3 // 3,5
6	0,74	1,6	2,05	1,9	2,773	1,8 // 1,6
7	1,34	1,6	2,70	2,6	2,008	2,1 // 2,7
8	0,55	3,3	1,61	2,4	2,9539	2,1 // 2,6

Légende : CV = coefficient de variation.

V.4.3.2.2. Réponses quantitatives

V.4.3.2.2.1. Teneur en R-timolol

Comme il a été précédemment remarqué lors de l'analyse des échantillons de maléate de S-timolol en phase de robustesse (Figure V.15), tous les laboratoires n'observaient qu'un seul pic d'impureté correspondant au R-timolol dans les électrophérogrammes obtenus avec

les solutions d'échantillons A, B, C et D. La teneur de cette impureté a été déterminée dans ces échantillons en comparant le rapport normalisé du R-timolol obtenu en analysant les solutions des différents échantillons à examiner (ANE) et le rapport normalisé du R-timolol obtenu en analysant la solution de référence à 1 % (ANR). Pour cela, l'équation suivante a été utilisée :

$$\text{Teneur en R-timolol (\%)} = \frac{ANE}{ANR} \times 1\% \quad (\text{V.7})$$

Le rapport du R-timolol dans les solutions d'échantillon ou de référence a été normalisé comme suit :

$$\text{Rapport normalisé} = \frac{\text{Rapport Référence ou Rapport Essai} \times 20}{\text{prise d'essai (mg)}} \quad (\text{V.8})$$

avec le rapport Référence ou le rapport Essai obtenus au moyen de l'équation suivante :

$$\text{Rapport} = \frac{\text{Aire corrigée du R-timolol (dans Essai ou Référence)}}{\text{Aire corrigée de la pyridoxine (dans Essai ou Référence)}} \quad (\text{V.9})$$

Dans ces équations, le terme « Référence » se rapporte à la solution de référence à 1 % et le terme « Essai » se rapporte aux solutions d'essai des échantillons à examiner.

L'aire corrigée est obtenue en divisant l'aire du pic par son temps de migration.

Les résultats présentés dans les tableaux V.20 et V.21 montrent clairement que tous les laboratoires ont été capables de quantifier l'impureté R-timolol dans tous les échantillons, même dans l'échantillon D contenant du R-timolol à des teneurs proches de la limite de quantification (0,1 %). Les teneurs rapportées fluctuaient entre 0,49 % – 0,78 %, 0,26 % – 0,41 %, 0,19 % – 0,34 % et 0,06 % – 0,20 %, respectivement pour les échantillons A, B, C et D.

Tableau V.20. – Teneurs (%) en R-timolol dans les échantillons A et B

Laboratoires	R-timolol dans l'échantillon A		R-timolol dans l'échantillon B	
	<i>Jour 1</i>	<i>Jour 2</i>	<i>Jour 1</i>	<i>Jour 2</i>
1	0,63	0,64	0,40	0,39
	0,63	0,64	0,40	0,40
2	0,64	0,78	0,35	0,37
	0,69	0,66	0,30	0,41
3	0,71	0,76	0,33	0,33
	0,61	0,65	0,36	0,32
4	0,69	0,60	0,34	0,31
	0,70	0,60	0,34	0,33
5	0,51	0,61	0,30	0,37
	0,65	0,67	0,35	0,35
6	0,57	0,50	0,31	0,29
	0,61	0,49	0,30	0,26
7	0,66	0,69	0,37	0,36
	0,64	0,71	0,35	0,32
8	0,51	0,50	0,30	0,35
	0,51	0,51	0,28	0,28
Moyenne (%)	0,62		0,34	

Tableau V.21. – *Teneurs (%) en R-timolol dans les échantillons C et D*

Laboratoires	R-timolol dans l'échantillon C		R-timolol dans l'échantillon D	
	Jour 1	Jour 2	Jour 1	Jour 2
1	0,34	0,33	0,19*	0,20*
	0,34	0,33	0,19*	0,20*
2	0,24	0,31	0,09	0,18
	0,26	0,23	0,07	0,11
3	0,25	0,27	0,15	0,14
	0,24	0,26	0,11	0,12
4	0,24	0,24	0,09	0,10
	0,26	0,26	0,14	0,11
5	0,27	0,28	0,10	0,10
	0,27	0,30	0,10	0,10
6	0,23	0,22	0,10	0,08
	0,24	0,22	0,06	0,07
7	0,29	0,33	0,09	0,09
	0,28	0,27	0,09	0,08
8	0,23	0,20	0,10	0,10
	0,24	0,19	0,09	0,08
Moyenne (%)	0,26		0,11	

Légende: * = valeurs suspectées d'être aberrantes.

V.4.3.2.2.2. Examen critique des données

Au terme de cette étude collaborative, il était indispensable d'examiner la qualité des données quantitatives obtenues au moyen des tests statistiques appropriés. Parmi eux figurent les tests numériques de Cochran en vue d'examiner l'homogénéité des variances et les différents tests de Grubb pour la détection des valeurs aberrantes [248]. Les tests graphiques utilisés sont respectivement ceux de Mandel k et de Mandel h [52]. A ce stade de l'étude, ces tests permettent d'évaluer l'existence d'éventuel problème au sein d'un laboratoire ou avec un échantillon examiné.

V.4.3.2.2.1. Evaluation intra-laboratoire

Les graphiques présentés dans les figures V.21 et V.22 ont été construits par laboratoire et par échantillon et ce, en appliquant la formule pour le test k de Mandel (équation IV.10) afin d'évaluer l'existence d'éventuel problème au sein des laboratoires ou au sein des échantillons.

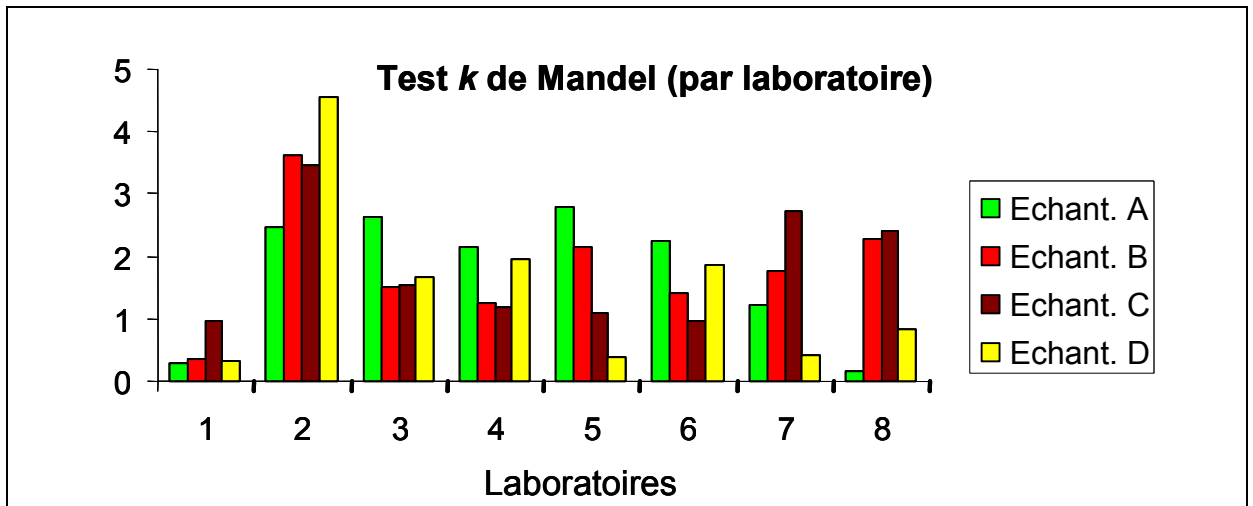


Figure V.21. – Test de Mandel k groupé par laboratoire pour l'évaluation de la variabilité intra-laboratoire.

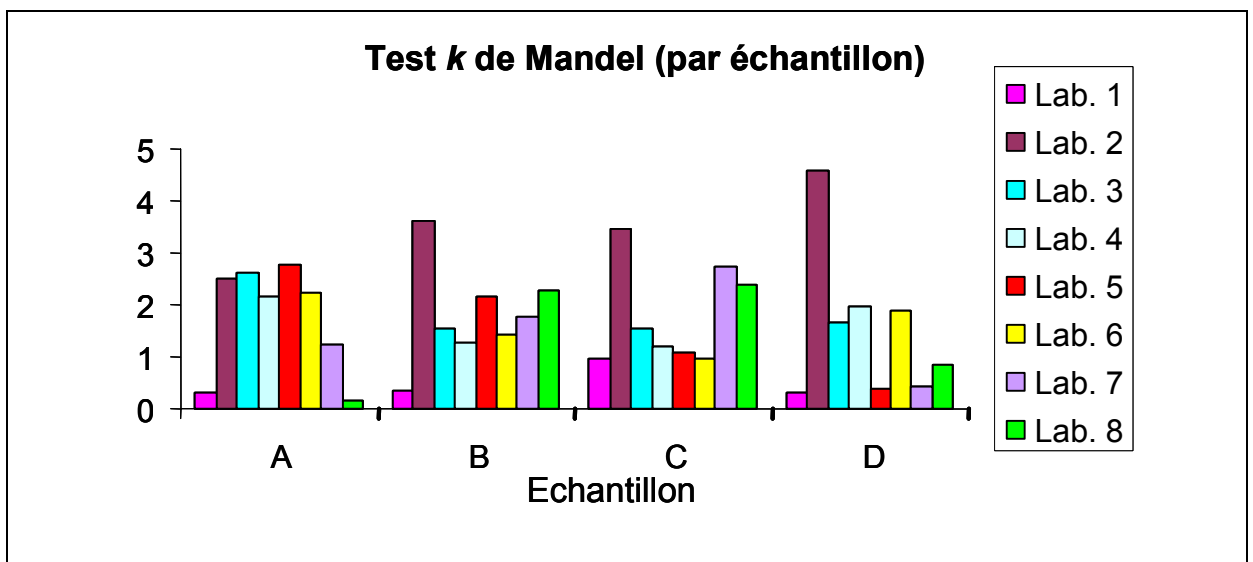


Figure V.22. – Test de Mandel k groupé par échantillon pour l'évaluation de la variabilité intra-laboratoire.

Comme illustré dans la figure V.21, le laboratoire 2 a présenté des grandes valeurs de k , suggérant une importante variabilité intra-laboratoire comparée aux autres laboratoires. Pour ce laboratoire, la plus grande variabilité était attribuée à l'échantillon D. En revanche, le laboratoire 1 a quant à lui présenté de petites valeurs de k suggérant une faible variabilité. Sur la base de l'analyse visuelle de la Figure V.22, nous pouvons en déduire que le problème de variabilité intra-laboratoire n'était pas du à l'échantillon de maléate de S-timolol analysé.

Le test de Cochran (équation IV.11) a ensuite été utilisé pour évaluer si la variabilité observée était numériquement inconsistante, et ce plus particulièrement par le laboratoire 2 et pour l'échantillon D. La valeur calculée ($C = 0,65$) était juste en dessous du seuil critique à 5 % ($C = 0,68$). Ceci indique qu'aucune valeur aberrante ni à la limite n'a été trouvée dans ces données quantitatives. Aucun problème analytique non plus n'a été rapporté par ce laboratoire durant l'exécution de l'étude. Les valeurs du test de Cochran calculées pour les autres échantillons étaient inférieures au seuil critique de 5 % ($C = 0,24, 0,41$ et $0,37$, respectivement pour les échantillons A, B et C). Par conséquent, la variabilité intra-laboratoire observée pour les quatre échantillons est similaire pour tous les laboratoires.

V.4.3.2.2.2.2. Evaluation inter-laboratoires

Comme pour la variabilité intra-laboratoire, la variabilité inter-laboratoires a été examinée par laboratoire (Figure V.23) et par échantillon (Figure V.24) et ce, par une évaluation graphique au moyen du test h de Mandel (équation IV.12).

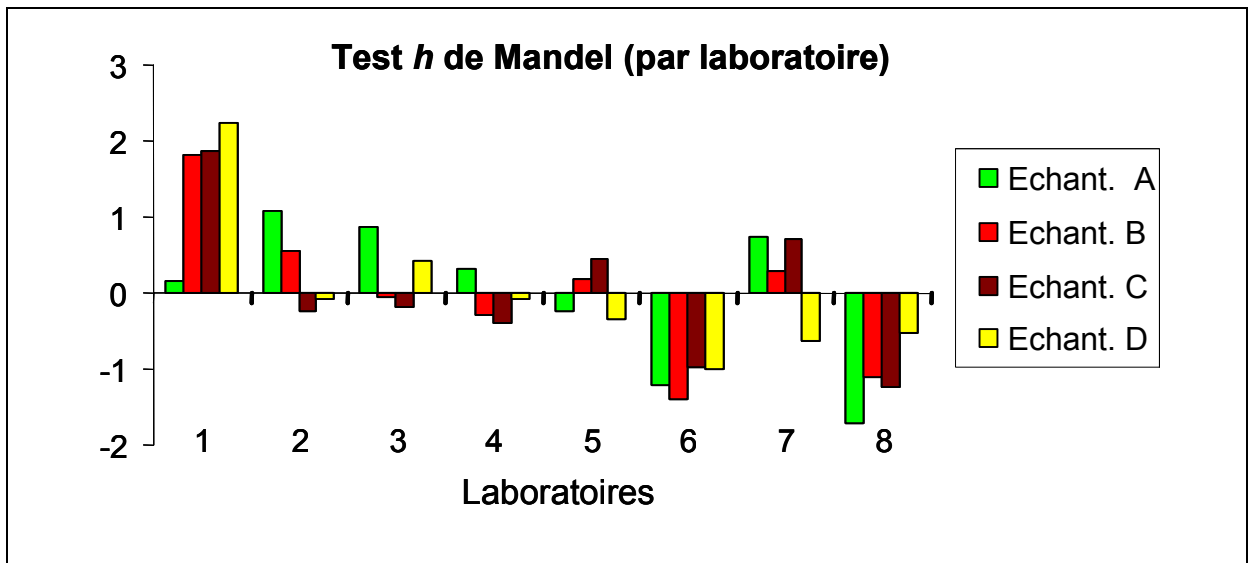


Figure V.23. – Test de Mandel h groupé par laboratoire pour l'évaluation de la variabilité inter-laboratoires.

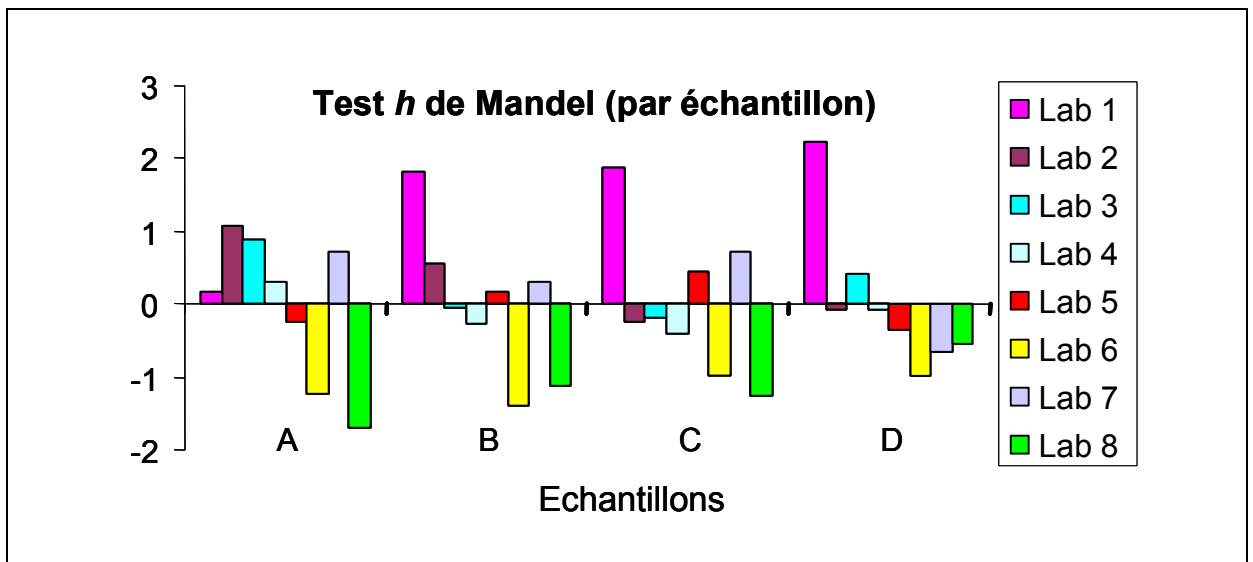


Figure V.24. – Test de Mandel h groupé par échantillon pour l'évaluation de la variabilité inter-laboratoires.

La figure V.22 montre que les laboratoires 2, 3, 4, 5 et 7 ont une distribution aléatoire des valeurs de h autour de zéro, alors que pour le laboratoire 1 des valeurs de h exclusivement positives sont observées contrairement aux laboratoires 6 et 8 qui ont des valeurs négatives. De nouveau, la variabilité observée n'était pas associée aux échantillons (Figure V.23). Cela suggère l'occurrence d'une erreur systématique dans ces laboratoires. Une des explications en rapport avec ces observations viendrait de la différence dans la vitesse d'acquisition des signaux provenant du détecteur, facteur qui n'a pas été pris en compte lors du développement de la méthode, qui pourrait cependant affecter la détermination de la teneur en R-timolol même en présence de l'étalon interne [263].

Les tests numériques de Grubb ont ensuite été appliqués pour détecter des valeurs aberrantes. Les équations IV.13, IV.14, IV.15, IV.16 et IV.17 ont été utilisées pour les calculs de ces tests. Les résultats présentés dans le tableau V.22 indiquent la présence de valeurs à la limite de l'aberrance dans le laboratoire 1 pour l'échantillon D. Ceux-ci ont été marqués avec un seul astérisque dans le tableau V.21 mais néanmoins maintenu pour l'étude de la précision.

Tableau V.22. – *Résultats des tests de Grubb*

Tests de Grubb	Tests statistiques				Seuils critiques	
					$p = 8$	
	Echantillon A	Echantillon B	Echantillon C	Echantillon D	5 %	1 %
G_l	1,78	1,85	1,88	1,31	2,13	2,27
G_r	2,08	1,90	1,98	2,16*	2,13	2,27
$G_{l,2}$	0,81	0,80	0,81	0,89	0,11	0,06
$G_{r,r-1}$	0,75	0,78	0,73	0,68	0,11	0,06
$G_{l,r}$	9,93	9,04	9,84	8,19	64,5	74,9
Laboratoire	-	-	-	1		

Légende : * = indication de valeurs limites; - = pas de valeurs aberrantes.

V.2.4. CONCLUSION

Nous avons donc démontré, à travers une étude collaborative menée avec succès, que la méthode d'EC en milieu non aqueux a permis de déterminer la pureté énantiomérique du S-timolol.

Auparavant, un test préliminaire a été effectué en vue de s'assurer de la bonne mise en œuvre de la méthode et de l'adéquation du protocole de l'étude. Les problèmes survenus lors de ce test ont montré que la méthode est transférable vers les équipements provenant d'un même fabricant et plus difficilement vers d'autres.

Les performances qualitatives des systèmes d'EC ont été jugées acceptables lorsque l'analyse était effectuée en considérant les temps de migration relatifs et les aires de pics normalisées.

Dans l'étude inter-laboratoires, huit laboratoires ont pu rapporter les résultats de la teneur du R-timolol déterminées dans quatre échantillons de maléate de S-timolol. L'évaluation de la qualité des résultats au moyen des tests statistiques n'a montré que quelques valeurs suspectées d'être aberrantes pour les données quantitatives.

L'étude inter-laboratoires étant parfaitement menée à terme, il est tout à fait envisageable d'utiliser la méthode d'EC en milieu non aqueux pour évaluer n'importe quel laboratoire dans le cadre des tests de compétence.