

## **VI.1. INTRODUCTION**

L'incertitude est un paramètre associé au résultat d'une mesure ( $x$ ) qui caractérise la dispersion des valeurs pouvant être raisonnablement attribuées au mesurande [91].

L'estimation de ce paramètre est donc fondamentale pour l'interprétation des résultats et est, par conséquent, devenu très logiquement une obligation incontournable pour les prestataires d'essai dans les différents secteurs où les procédures analytiques quantitatives sont appliquées pour fournir ces résultats. En effet, depuis 2001, la norme ISO 17025 impose aux laboratoires d'essai et notamment à tous les prestataires des services dans le domaine de la santé d'appliquer des procédures pour l'estimation de l'incertitude des résultats d'essais, et le cas échéant, de rapporter cette incertitude [90, 101]. Cette obligation prend notamment tout son sens lors de la comparaison des résultats entre eux, et surtout de ceux-ci par rapport à des seuils de toxicité ou de pathologie, ou encore par rapport à des limites réglementaires de conformité.

Face à cette obligation normative, les laboratoires se sont trouvés confrontés à une problématique nouvelle pour eux et dont l'implémentation était malaisée dans un contexte hautement concurrentiel. En effet, la plupart des approches préconisées (ex : GUM, Eurachem, ...), dérivées de la métrologie, sont complexes, coûteuses et fastidieuses dans le cadre d'analyses impliquant de nombreuses sources d'erreurs. Elles sont donc non seulement économiquement intenables pour ces prestataires de services mais, de plus, dans certains cas, la nature même de la méthode d'essai empêche le calcul rigoureux et statistiquement fiable de l'incertitude. Tant et si bien que de nos jours la plupart de ces prestataires de services sont encore incapables de répondre valablement à cette exigence de la norme ISO 17025.

C'est pourquoi dans cette partie de notre travail, nous nous attacherons à l'évaluation de ce paramètre qui traduit la performance d'une méthode de mesure associée au résultat rendu. A cette fin, les données issues de trois étapes importantes du cycle de vie d'une méthode analytique seront utilisées, à savoir la phase de validation, l'étude de la robustesse et l'étude inter-laboratoires et ce, en appliquant pour chacune d'entre-elles les stratégies appropriées. Dans le cadre de cette première évaluation de l'incertitude, la méthode de CLHP développée pour la détermination du R-timolol dans le maléate de S-timolol sera retenue. Ensuite, nous comparerons les incertitudes obtenues par ces différentes approches en vue d'en dégager les premières tendances. Dans un deuxième chapitre, nous tenterons de faire les

mêmes exercices pour la méthode d'EC, c'est-à-dire estimer et comparer les incertitudes de résultats issus des trois mêmes études afin d'en tirer des conclusions et recommandations plus généralisables.

Enfin, dans ce contexte, rappelons les trois grandes approches pour l'estimation de l'incertitude:

- (i) l'approche Intra-laboratoire qui comprend les stratégies décrites par ISO [91], celle utilisant les données de validation et celle utilisant les résultats quantitatifs issus d'un test de robustesse,
- (ii) l'approche Inter-laboratoires décrite par le Comité des Méthodes Analytiques [121] dont les estimés de précision sont obtenus à l'issue d'une étude de performance inter-laboratoires (ISO 5725-2), et
- (iii) les approches Mixtes qui combinent les données obtenues à partir d'un exercice intra-laboratoire et d'un autre inter-laboratoire(s), parmi lesquelles figurent les stratégies proposées par Barwick et Ellison [92] et par le comité d'ISO/TS 69 [122].

## **VI.2. ESTIMATION DE L'INCERTITUDE EN VALIDATION**

### **VI.2.1. METHODOLOGIE**

L'estimation de l'incertitude à partir des données de validation s'appuie sur la variabilité totale disponible, obtenue par exemple avec des types de validation analysés plusieurs fois sur une période de temps, avec des opérateurs et instruments différents, ou sur l'écart-type obtenu à partir des répétitions sur différents échantillons.

Partant des démonstrations faites par Mee [55], Feinberg et coll. [1] ont démontré que grâce à la nouvelle stratégie de validation qui tient compte de l'erreur totale (biais + écart-type) d'une mesure, l'intervalle de tolérance  $\beta$  qui dépend de l'écart-type de la fidélité intermédiaire ( $\hat{\sigma}_M$ ) mais aussi de la variabilité du biais ( $\hat{\delta}_M$ ) auquel est associé un facteur d'élargissement ( $k_s$ ) et le quantile  $\beta$  ( $Q_t$ ) de la distribution  $t$  de Student avec  $\nu$  degrés de liberté ( $\nu$  est calculé selon la méthode de correction proposée par Satterthwaite [267]) peut être un estimateur de l'incertitude d'une mesure associée à une méthode analytique. Cet intervalle peut être représenté comme suit :

$$\left[ \hat{\delta}_M \pm Q_t k_s \hat{\sigma}_M \right] \quad (\text{VI.1})$$

Dans cette équation, nous remarquons que la composante de la variance représentée par la variance de la fidélité intermédiaire ( $\hat{\sigma}_M^2$ ) comprend les variances inter-séries ( $\hat{\sigma}_B^2$ ) et intra-série ( $\hat{\sigma}_W^2$ ). Elle est calculée comme suit :

$$\hat{\sigma}_M^2 = \hat{\sigma}_W^2 + \hat{\sigma}_B^2 \quad (\text{VI.2})$$

Le facteur d'élargissement,  $k_s$ , qui prend en compte la variabilité du biais moyen tel qu'estimé à partir du plan expérimental est obtenu au moyen de l'équation suivante :

$$k_s = \sqrt{1 + \frac{1}{pnB^2}} \quad (\text{VI.3})$$

Le terme  $B$  est décrit dans la partie introductive (I.2.6.1.3).

Par ailleurs, suivant les recommandations du guide ISO/TS 21748 [122], l'estimation de l'incertitude d'une mesure  $Y$  associée à des observations peut être calculée selon l'équation I.26 (cf. partie introductive) [1, 122]. Dans cette équation, le terme  $\sum c_i^2 u(x_i)^2$  est la somme de tous les effets autres que ceux inclus dans  $s_R$  et  $\hat{\delta}$ , par exemple les effets d'échantillonnage, de la préparation des échantillons à analyser, de la variation de leur composition ainsi que de leur homogénéité et leur stabilité. Dans le cadre d'une étude collaborative par exemple, ce terme peut être simplifié car il est soumis à des écarts autres que ceux donnant lieu au biais de la méthode, au biais du laboratoire ou à l'erreur résiduelle. Dans ces conditions, l'équation I.26. peut être simplifiée et devient ainsi :

$$u^2(Y) = s_R^2 + u^2(\hat{\delta}) \quad (\text{VI.4})$$

où  $s_R$  est l'écart-type de la reproductibilité et  $u(\hat{\delta})$  l'incertitude associée au biais  $\delta$  de la méthode pouvant être estimée comme suit :

$$u(\hat{\delta}) = \sqrt{\frac{s_R^2 \left(1 - \gamma + \frac{\gamma}{n}\right)}{p}} \quad (\text{VI.5})$$

où  $n$  est le nombre de répétitions au sein d'une condition expérimentale,  $p$  le nombre de conditions expérimentales et  $\gamma = \frac{s_r^2}{s_R^2}$ . Dans ce rapport des variances,  $s_r^2$  est l'estimé de la variance de la répétabilité au sein d'une condition expérimentale et  $s_R^2$  l'estimé de la variance de la reproductibilité qui est la somme des composantes de la variance de la répétabilité et de la variance entre les conditions expérimentales ( $\hat{\sigma}_B^2$ ).

Ainsi, partant d'abord de l'équation VI.1, la variance de l'intervalle de tolérance peut être écrite comme suit :

$$\hat{\sigma}_{Tot}^2 = k_s^2 \hat{\sigma}_M^2 \quad (\text{VI.6})$$

Ensuite, à partir des équations VI.2, VI.3 et VI.6, une série d'équations peut être développée de la manière suivante :

$$\hat{\sigma}_{Tot}^2 = \left[ \sqrt{1 + \frac{1}{pnB^2}} \hat{\sigma}_M \right]^2 = \hat{\sigma}_M^2 + \left( \frac{1}{pnB^2} \right) \hat{\sigma}_M^2 \quad (VI.7)$$

$$\hat{\sigma}_{Tot}^2 = \hat{\sigma}_M^2 + \frac{\left( 1 + \frac{ns_B^2}{s_W^2} \right) (s_B^2 + s_W^2)}{np \left( 1 + \frac{ns_B^2}{s_W^2} \right)} \quad (VI.8)$$

$$\hat{\sigma}_{Tot}^2 = \hat{\sigma}_M^2 + \frac{ns_B^2 + s_W^2}{np} \quad (VI.9)$$

Lorsqu'un plan hiérarchisé est envisagé comme en validation avec  $p$  séries de conditions expérimentales et  $n$  répétitions au sein d'une condition, en appliquant la théorie classique des modèles d'Anova pour des effets aléatoires, le terme «  $\frac{ns_B^2 + s_W^2}{np}$  » est un estimateur de l'incertitude (variance) de la moyenne générale (ou biais)  $\hat{\delta}$ . Par conséquent, l'équation VI.9 peut être simplifiée comme suit :

$$\hat{\sigma}_{Tot}^2 = \hat{\sigma}_M^2 + \hat{\sigma}_{\hat{\delta}_M}^2 \quad (VI.10)$$

avec  $\hat{\sigma}_{\hat{\delta}_M}^2$  l'incertitude (variance) estimée du biais estimé,  $\hat{\delta}_M$ , et  $\hat{\sigma}_M^2$  la variance de la fidélité intermédiaire.

Dès lors, en considérant l'équation VI.10,  $\hat{\sigma}_{Tot}^2$  correspond à l'incertitude de mesure dérivée de la variance utilisée pour construire les limites de tolérance  $\beta$ . Graphiquement, l'incertitude élargie représente la largeur de l'intervalle de tolérance  $\beta$  obtenue avec les données de validation et utilisant la stratégie de l'erreur totale d'une mesure. Remarquons que l'équation VI.10 de la validation est similaire à l'équation VI.4 d'ISO.

## VI.2.2. RESULTATS ET DISCUSSION

En considérant l'équation VI.10, les incertitudes calculées par niveaux de concentration sont présentées dans le tableau VI.1. Ces résultats ont été obtenus en utilisant le modèle de régression qui a été sélectionné en phase de validation, à savoir le modèle de régression linéaire passant par zéro et utilisant un seul niveau de calibration (12 µg/mL) (cf. partie IV.2.3.3.2).

**Tableau VI.1.** – *Estimés des différentes incertitudes relatives à la teneur en R-timolol à chaque niveau de concentration du profil d'exactitude utilisant le modèle de régression sélectionné*

| Niveau de concentration (µg/mL) | Incertitude du biais ( $10^{-2}$ , µg/mL) | Incertitude ( $10^{-2}$ , µg/mL) | Incertitude élargie ( $10^{-2}$ , µg/mL) | Incertitude élargie relative (%) |
|---------------------------------|---|----------------------------------|--|----------------------------------|
| 1,5                             | 0,61                                      | 1,93                             | 3,86                                     | 2,55                             |
| 3,0                             | 2,34                                      | 5,55                             | 11,11                                    | 3,67                             |
| 6,0                             | 5,78                                      | 12,97                            | 25,94                                    | 4,28                             |
| 12,0                            | 2,66                                      | 7,75                             | 15,50                                    | 1,28                             |
| 24,0                            | 9,32                                      | 25,25                            | 50,51                                    | 2,09                             |

Le tableau VI.1 montre que les valeurs d'incertitude sont comprises entre 0,006 µg/mL – 0,094 µg/mL pour l'incertitude du biais et entre 0,019 µg/mL – 0,253 µg/mL, pour celle de la mesure. Remarquons que l'incertitude semble augmenter exponentiellement avec la teneur en impureté. L'incertitude élargie ( $U_x$ ), qui est égale à l'incertitude type multipliée par un facteur d'élargissement  $k$  [91, 99, 117], définit un intervalle autour de la valeur moyenne dans lequel la « vraie valeur » inconnue est retrouvée avec une probabilité définie. Le choix de ce facteur est basé sur le niveau de confiance désiré. C'est ainsi qu'en considérant une valeur de 2 pour  $k$  [91, 99, 117], la probabilité de trouver la vraie valeur est

approximativement de 95 %. Les valeurs  $U_x$  ont été calculées et sont comprises entre 0,039  $\mu\text{g/mL}$  – 0,506  $\mu\text{g/mL}$ . Notons que tous les résultats observés pour chaque niveau de concentration en validation sont compris dans les limites d'acceptation de 10 %. Il en va de même en ce qui concerne les incertitudes élargies relatives, exprimées en % et obtenues en divisant les incertitudes élargies avec les concentrations introduites correspondantes. En effet, aucune des incertitudes élargies relatives n'excèdent 5 %.

### **VI.3. ESTIMATION DE L'INCERTITUDE EN ROBUSTESSE**

#### **VI.3.1. METHODOLOGIE**

Ainsi que nous l'avons évoqué dans la partie introductive de notre travail, le test de robustesse peut être considéré comme une simulation d'une situation pouvant survenir lors d'une étude inter-laboratoires [115], il est dès lors possible de calculer l'incertitude à partir d'un test de robustesse. Celui-ci peut ainsi raisonnablement fournir un estimé de l'incertitude de la reproductibilité. Dans ce cas, une étude inter-laboratoires n'est donc plus nécessaire pour obtenir l'incertitude associée à une mesure.

Par analogie aux conditions expérimentales couramment appliquées dans des études inter-laboratoires, les conditions de robustesse présentées dans la figure IV.13.A montre que les « Expériences » élaborées par le plan de Plackett-Burman peuvent être assimilées à des laboratoires d'une étude inter-laboratoires. Leur nombre est en parfait agrément avec le nombre minimum de huit laboratoires recommandé par le guide ISO 5725-2 pour une étude inter-laboratoires. Cependant, en pratique, les expériences sont réalisées en suivant les conditions expérimentales présentées dans la figure IV.13.B. Pour chaque série ( $r = 3$ ), trois répétitions indépendantes ( $c = 3$ ) des deux échantillons de maléate de S-timolol ont été analysées et ce, en appliquant les huit conditions expérimentales ( $g = 8$ ) amenant le nombre total d'observations à 72 par échantillon. Il est toutefois important de signaler que trois niveaux ont été pris en considération dans cette étude à savoir, le niveau « Expérience », le niveau « Série » pouvant être assimilé à celui de « Jour » dans une étude inter-laboratoires et le niveau « Répétition ». Habituellement, deux niveaux (laboratoire et répétition) sont seulement examinés dans le cadre d'une étude inter-laboratoires, ce qui ne permet pas d'évaluer l'effet jour comme nous comptons le faire dans le cas présent.

Les résultats quantitatifs, à savoir la teneur en R-timolol obtenus en analysant les deux échantillons de maléate de S-timolol, ont été générés à partir de ce protocole expérimental et sont présentés dans les tableaux IV.14.A et IV.14.B. Avant leur utilisation, nous nous sommes préalablement assuré de leur qualité au moyen de tests statistiques. Ensuite, au moyen du guide ISO 5725-2 [52], nous avons calculé les différentes sources de variances, à savoir la variance de la répétabilité,  $s^2_r$ , celle entre les expériences,  $s^2_E$ , et enfin celle de la reproductibilité,  $s^2_R$ , résultant de la combinaison de  $s^2_r$  et  $s^2_E$  [52].



## VI.3.2. RESULTATS ET DISCUSSION

### VI.3.2.1. EXAMINATION CRITIQUE DES RESULTATS

Généralement lors du test de robustesse, les résultats sont simplement rapportés sans pour autant procéder à un examen de leur qualité. Toutefois, comptant appliquer la stratégie d'ISO 5725-2 en vue de l'estimation de l'incertitude, cette vérification nous est apparue nécessaire. Dans le cadre de notre étude, nous ne nous sommes limités qu'aux tests numériques de Cochran (équation IV.11) pour l'évaluation de l'homogénéité des variances entre les différentes expériences et aux tests de Grubb (équations IV.13 à IV.17) pour l'évaluation des valeurs aberrantes ou des valeurs suspectes.

Les valeurs de  $C$  calculées pour les échantillons A5800 ( $C = 0,51$ ) et A5799 ( $C = 0,23$ ) sont en dessous des seuils critiques de 5 % (0,52) et 1 % (0,62), démontrant ainsi une homogénéité des variances entre les résultats obtenus dans les différentes conditions expérimentales générées par le plan de Plackett-Burmann.

D'autre part, les valeurs de  $G$  calculées pour une valeur suspectée aberrante (la plus petite ou la plus grande) dans les échantillons A5800 ( $G_1 = 0,50$  et  $G_p = 0,27$ ) et A5799 ( $G_1 = 0,65$  et  $G_p = 0,46$ ) sont largement inférieures aux seuils critiques de 5 % (2,13) et de 1 % (2,27).

Enfin, étant donné que ces tests  $G_1$  et  $G_p$  ne sont pas significatifs, les lignes directrices d'ISO recommandent d'effectuer l'examen des deux premières ou deux dernières valeurs « suspectes » au moyen des tests respectifs de  $G_{1,2}$  et de  $G_{p-1,p}$ . Les valeurs de ces tests obtenus pour les échantillons A5800 (respectivement 0,87 et 0,66) et A5799 (respectivement 0,93 et 0,83) sont plus grandes que celles des seuils critiques à 5 % (0,11) et à 1 % (0,06). Par conséquent, ils peuvent être considérés comme non significatifs.

En conclusion, puisque d'une part les variances entre les expériences sont similaires, et que d'autre part il n'y a aucune valeur aberrante ni valeur suspecte, nous pouvons dès lors employer toutes les données issues de l'étude de robustesse pour la suite des analyses et notamment l'estimation des variances.

### VI.3.2.2. CALCUL DES VARIANCES

Les estimés de variance ont été calculés à partir des formules présentées dans le tableau VI.2.

*Tableau VI.2. – Analyse des composantes de la variance*

| Sources de variabilité | Carrés moyens (CM)  | Variances estimées (s <sup>2</sup> )  |
|------------------------|---|---|
| Séries                 | $CM_{\text{Séries}} = \frac{cg \sum (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{r-1}$                    | $S_{\text{Séries}}^2 = \frac{CM_{\text{Séries}} - CM_{\text{Répétitions}}}{c \cdot g}$    |
| Répétitions            | $CM_{\text{Répétitions}} = \frac{g \sum \sum (\bar{x}_{ij} - \bar{x}_i)^2}{r(c-1)}$   | $S_{\text{Répétitions}}^2 = \frac{CM_{\text{Répétitions}} - S_{\text{Expériences}}^2}{g}$ |
| Expériences            | $CM_{\text{Expériences}} = \frac{\sum \sum \sum (x_{ijk} - \bar{x}_{ij})^2}{rc(g-1)}$ | $S_{\text{Expériences}}^2 = CM_{\text{Expériences}}$                                      |

*Légende : r = 3 séries ; c = 3 répétitions ; g = 8 expériences*

Les différents carrés moyens ont tout d'abord été calculés, à savoir les carrés moyens entre les expériences (CM<sub>Expériences</sub>), les carrés moyens entre les séries (CM<sub>Séries</sub>) et les carrés moyens entre les répétitions (CM<sub>Répétitions</sub>) et ce, pour la teneur du R-timolol dans les deux échantillons de maléate de S-timolol analysés. Ensuite, les estimés des différentes variances ont pu être calculés à partir de ces mêmes carrés moyens en utilisant les formules indiquées dans le tableau VI.2.

Les résultats présentés dans le tableau VI.3 montrent que la variance la plus élevée est observée entre les expériences (s<sup>2</sup><sub>Expériences</sub>) et ce, pour les deux échantillons de maléate de S-timolol. Par conséquent, l'ensemble de la variabilité de la teneur en R-timolol peut être essentiellement attribué aux expériences pour lesquelles une contribution a été estimée à 67 % et 65 %, respectivement pour les échantillons N°A5800 et N°A5799. La variance entre les répétitions (s<sup>2</sup><sub>Répétitions</sub>) est la plus petite et ce, notamment pour l'échantillon N°A5800 démontrant ainsi la précision de la procédure analytique. Cependant, ce profil n'est pas confirmé par l'échantillon N°A5799. En effet, la plus faible variance est, dans ce cas, celle

entre les séries ( $s^2_{\text{séries}}$ ). Cette situation paradoxale peut vraisemblablement s'expliquer par le fait qu'aux faibles concentrations, l'effet inter-séries est négligeable [51] comparativement à celui de l'inter-répétitions et est donc non estimable compte tenu de la faible taille de l'échantillon ( $n = 3$ ) [268].

**Tableau VI.3. – Estimation des composantes des variances**

| Sources de variabilité | Variance de la résolution (Rs) |                   | Variances ( $10^{-4}$ ) de la teneur du R-timolol |                     |
|------------------------|--------------------------------|-------------------|---|---------------------|
|                        | Rs <sub>2-3</sub>              | Rs <sub>2-4</sub> | Echantillon N°A5800                               | Echantillon N°A5799 |
| Expériences            | 0,0849                         | 0,5657            | 3,41  | 1,35                |
| Séries                 | 0                              | 0                 | 1,68  | 0                   |
| Répétitions            | -                              | -                 | 0   | 0,72                |
| Total                  | 0,0849                         | 0,5657            | 5,09  | 2,07                |

Concernant les réponses qualitatives, nous avons de la même manière calculé les différents carrés moyens et les estimés des variances. L'ensemble de la variabilité de ces facteurs qualitatifs était principalement dû dans ce cas aux expériences pour lesquelles la contribution était estimée à plus de 99 % aussi bien pour les résolutions de la paire de pics des énantiomères (Rs2-4) que de la paire critique (Rs2-3) (Tableau VI.3). Ces réponses qualitatives sont systématiquement affectées par les modifications délibérées des facteurs opératoires examinés, conduisant ainsi à une très grande contribution de l'effet inter-expériences. Nous pouvons ainsi constater que les variances estimées pour les réponses qualitatives suivent la tendance observée pour les réponses quantitatives. Puisque la variance inter-expériences est nettement plus grande que la variance inter-séries, cette dernière n'est donc pas estimable avec trois mesures ( $n = 3$ ). C'est ainsi que des valeurs de zéro ont été observées pour cette variance pour les deux réponses qualitatives. Par conséquent, aucune contribution de l'effet des répétitions n'a été rapportée.

**VI.3.2.3. ESTIMATION DES DIFFERENTES COMPOSANTES D'INCERTITUDE**

Pour estimer l'incertitude, nous avons considéré les variances de la répétabilité ( $s^2_r$ ) et de la reproductibilité ( $s^2_R$ ) calculées au moyen des équations suivantes :

$$s^2_r = s^2_{\text{Répétitions}} + s^2_{\text{Séries}} \quad (\text{VI.11})$$

$$s^2_R = s^2_r + s^2_{\text{Expériences}} = s^2_{\text{Répétitions}} + s^2_{\text{Séries}} + s^2_{\text{Expériences}} \quad (\text{VI.12})$$

Les valeurs du  $s^2_r$  obtenues étaient respectivement de  $1,68 \cdot 10^{-4}$  et de  $0,72 \cdot 10^{-4}$  pour la teneur du R-timolol dans les échantillons N° A5800 et N° A5799. Comme présenté dans le tableau VI.3, l'ensemble de la variabilité est surtout dû à la variance de la reproductibilité.

Lors d'une étude inter-laboratoires, le rapport entre la variance de reproductibilité et celle de la répétabilité est habituellement calculé. Il fournit une indication de l'ordre de grandeur de ces deux variances. En effet, selon Horwitz [269], un rapport entre 2 et 4 est attendu, signifiant que la variance de la reproductibilité a une grandeur similaire ou plus importante que la variance de la répétabilité. Dans cette étude, un rapport d'environ 3 a été obtenu pour les deux échantillons analysés, ce qui est tout à fait cohérent par rapport à la théorie.

La reproductibilité, représentée par  $s^2_R$  et correspondant à la somme des différentes composantes de la variance, a permis de calculer l'incertitude type,  $u_x$ , en utilisant l'équation suivante :

$$u_x = s_R = \sqrt{s^2_{\text{Répétitions}} + s^2_{\text{Séries}} + s^2_{\text{Expériences}}} \quad (\text{VI.13})$$

L'incertitude calculée pour la teneur en R-timolol dans les échantillons N°A5800 et N°5799 est respectivement  $u_x = s_R = 0,0226$  et  $0,0144$ , et l'incertitude élargie, calculée en utilisant un facteur d'élargissement de  $k = 2$ , devient  $U_x = 2u_x = 0,0451$  et  $0,0288$ . Par ailleurs, les concentrations en R-timolol dans les échantillons obtenues dans les conditions nominales sont respectivement de  $0,53 \%$  et de  $0,27 \%$ . Nous pouvons dès lors dire que les incertitudes mesurées semblent être dépendantes de la concentration.

Par ailleurs, lors de l'analyse d'un échantillon inconnu de maléate de S-timolol contenant du R-timolol à des teneurs similaires à celle de l'échantillon N°A5800 (environ 0,53 %) ou de l'échantillon N°5799 (environ 0,27 %), nous pourrions dire que la teneur en R-timolol,  $x$  fourni par la méthode de CLHP pourrait être de :  $x \pm 0,045$  % ou  $x \pm 0,029$  %, ceci signifiant que 95 % des résultats des mesures devraient être compris entre 0,48 % et 0,58 % pour le premier intervalle de concentration et entre 0,24 % à 0,30 % pour le second.

Enfin, les mesures effectuées montrent que les résultats satisfont aux espérances attendues puisque trois mesures sur 72 (4,2 %) observées dans le tableau IV.12 et que seulement deux mesures sur 72 (2,8 %) dans le tableau IV.13 sont en dehors des intervalles attendus.

## **VI.4. ESTIMATION DE L'INCERTITUDE EN INTER-LABORATOIRES**

### **VI.4.1. METHODOLOGIE**

L'étude inter-laboratoires étant le seul moyen pour l'évaluation de la reproductibilité des résultats, nous avons dès lors également mené une étude collaborative en suivant le guide ISO 5725-2 [52] afin d'évaluer l'incertitude associée à la détermination du R-timolol et des autres impuretés du S-timolol par CLHP. Un protocole détaillé et minutieusement élaboré nous a permis d'estimer la répétabilité et la reproductibilité des données quantitatives.

### **VI.4.2. RESULTATS ET DISCUSSION**

#### **VI.4.2.1. CALCUL DES VARIANCES**

Comme pour la robustesse, les estimés de variance ont été calculés à partir de la table d'Anova telle que présentée dans le tableau VI.4. A partir des équations de l'analyse de la variance (Tableau VI.4), les carrés moyens ont été calculés pour les laboratoires, ( $CM_{\text{Laboratoires}}$ ), pour les séries ( $CM_{\text{Séries}}$ ) et pour les répétitions ( $CM_{\text{Répétitions}}$ ). De même, les variances ont été déterminées pour les laboratoires ( $s^2_{\text{Laboratoires}}$ ), pour les séries ( $s^2_{\text{Séries}}$ ) et pour les répétitions ( $s^2_{\text{Répétitions}}$ ). En considérant le guide ISO 5725-2 [52], les estimés de la variance de la répétabilité ( $s^2_r$ ) et de la variance de la reproductibilité ( $s^2_R$ ) ont été calculés en utilisant les équations suivantes :

$$s^2_r = s^2_{\text{Répétitions}} \quad (\text{VI.14})$$

$$s^2_R = s^2_{\text{Répétitions}} + s^2_{\text{Laboratoires}} \quad (\text{VI.15})$$

**Tableau VI.4. – Analyse des composantes de la variance**

| Sources de variabilité | Carrés moyens (CM)  | Variances estimées (s <sup>2</sup> )  |
|------------------------|---|---|
| Laboratoires           | $CM_{\text{Laboratoires}} = \frac{cg \sum (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{r-1}$              | $S_{\text{Laboratoires}}^2 = \frac{CM_{\text{Laboratoires}} - CM_{\text{Séries}}}{c \cdot g}$ |
| Séries                 | $CM_{\text{Séries}} = \frac{g \sum \sum (\bar{x}_{ij} - \bar{x}_i)^2}{r(c-1)}$        | $S_{\text{Séries}}^2 = \frac{CM_{\text{Séries}} - S_{\text{Répétitions}}^2}{g}$               |
| Répétitions            | $CM_{\text{Répétitions}} = \frac{\sum \sum \sum (x_{ijk} - \bar{x}_{ij})^2}{rc(g-1)}$ | $S_{\text{Répétitions}}^2 = CM_{\text{Répétitions}}$  |

Légende : g = nombre de répétitions par série ; c = nombre de séries par laboratoire ; r = nombre de laboratoires.

**Tableau VI.5. – Estimation des composantes de la variance du R-timolol sans les valeurs aberrantes**

|  | Sources de variabilité                                | R-timolol dans l'échantillon N°A5800 | R-timolol dans l'échantillon N°A5799 |
|--|---|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Variances (x 10 <sup>-4</sup> )  | Laboratoire (s <sup>2</sup> <sub>Laboratoires</sub> ) | 2,89                                 | 2,27                                 |
|  | Série (s <sup>2</sup> <sub>Séries</sub> )             | 3,29                                 | 0,68                                 |
|  | Répétition (s <sup>2</sup> <sub>Répétitions</sub> )   | 5,72                                 | 1,22                                 |
| Variance de la répétabilité (s <sup>2</sup> <sub>r</sub> ) (x 10 <sup>-4</sup> )     |   | 5,72                                 | 1,22                                 |
| Variance de la reproductibilité (s <sup>2</sup> <sub>R</sub> ) (x 10 <sup>-4</sup> ) |   | 11,9                                 | 4,17                                 |
| Ratio Reproductibilité/ Répétabilité Teneur moyenne                                  |   | 2,1<br>0,50 %                        | 3,4<br>0,26 %                        |

Dans le cas de la présente étude collaborative qui a été menée en suivant le protocole d'exécution repris dans la figure IV.17, l'ensemble des analyses a été réalisé en deux séries (ici deux jours). Par conséquent, la variance de la reproductibilité ( $s^2_R$ ) devient :

$$s^2_R = s^2_{\text{Répétitions}} + s^2_{\text{Séries}} + s^2_{\text{Laboratoires}} \quad (\text{VI.16})$$

Les résultats de ces calculs sont présentés dans le tableau VI.5.

Ainsi que nous l'avons déjà signalé, on s'attend, selon Horwitz [269], à obtenir une variance de la reproductibilité 2 à 4 fois plus grand que la variance de la répétabilité, ce qui veut dire que la variance de la reproductibilité est similaire ou plus grande que celle de la répétabilité. Comme l'indique le tableau IV.5, les rapports pour la teneur en R-timolol dans les deux échantillons analysés étaient compris entre 2 et 4. Signalons néanmoins qu'une situation tout à fait inhabituelle a été enregistrée au niveau des variances obtenues avec le R-timolol dans l'échantillon N° A5800 par rapport à celles obtenues avec l'échantillon N°A5799. En effet, nous avons trouvé d'une part une variance inter-laboratoires plus faible (contribution sur la variance totale estimée à 24 %) et d'autre part, une variance inter-répétitions plus élevée (contribution sur la variance totale estimée à 48 %). Etant donné qu'aucune raison analytique n'avait été clairement identifiée, les valeurs aberrantes ont été conservées. En effet, la probabilité qu'elles soient obtenues n'est pas nulle. Les nouveaux résultats présentés dans le tableau VI.6 montrent que la contribution totale de la variabilité observée pour la teneur de R-timolol est surtout due aux laboratoires. Les rapports des variances de la reproductibilité et de la répétabilité pour la teneur en R-timolol dans les deux échantillons sont toujours compris entre 2 et 4.



**Tableau VI.6. – Estimation des composantes de la variance du R-timolol  
avec toutes les données**

|  | Sources de variabilité                                | R-timolol dans<br>l'échantillon N°5800 | R-timolol dans<br>l'échantillon N°5799 |
|--|---|--|--|
| Variances<br>(x 10 <sup>-4</sup> )   | Laboratoire (s <sup>2</sup> <sub>Laboratoires</sub> ) | 15,44                                  | 5,29                                   |
|  | Série (s <sup>2</sup> <sub>Séries</sub> )             | 4,81                                   | 0                                      |
|  | Répétition (s <sup>2</sup> <sub>Répétitions</sub> )   | 11,48                                  | 2,68                                   |
| Variance de la répétabilité (s <sup>2</sup> <sub>r</sub> ) (x 10 <sup>-4</sup> )     |   | 11,48                                  | 2,68                                   |
| Variance de la reproductibilité (s <sup>2</sup> <sub>R</sub> ) (x 10 <sup>-4</sup> ) |   | 31,7                                   | 7,97                                   |
| Ratio Reproductibilité/ Répétabilité   |   | 2,8                                    | 3,0                                    |

Pour les impuretés obtenues à l'issue de la dégradation de l'échantillon N°11483 de maléate de S-timolol, nous avons procédé de la même manière que pour le R-timolol en vue de déterminer les carrés moyens ainsi que les variances des principales sources de variabilité.

**Tableau VI.7. – Estimation des composantes de la variance (x 10<sup>-3</sup>) pour les autres impuretés  
du timolol, sans et avec les valeurs aberrantes**

| Sources de variabilité   | Impureté 1 (*) | Impureté 2 (*) | Impureté 3 (*) |
|--|----------------|----------------|----------------|
| Laboratoire (s <sup>2</sup> <sub>Laboratoires</sub> )          | 11,5 (15,2)    | 404 (661)      | 435 (921)      |
| Série (s <sup>2</sup> <sub>Séries</sub> )                      | 0,74 (1,66)    | 0 (0)          | 0 (312)        |
| Répétition (s <sup>2</sup> <sub>Répétitions</sub> )            | 0,12 (0,187)   | 2,73 (9,17)    | 2,12 (128)     |
| Variance de la répétabilité (s <sup>2</sup> <sub>r</sub> )     | 0,12 (0,187)   | 2,73 (9,17)    | 2,12 (128)     |
| Variance de la reproductibilité (s <sup>2</sup> <sub>R</sub> ) | 12,3 (17)      | 406 (670)      | 437 (965)      |
| Rapport Reproductibilité/ Répétabilité                         | 106 (91)       | 149 (73)       | 206 (76)       |
| Teneur moyenne   | 0,22 %         | 0,79 %         | 0,91 %         |

\* Les valeurs entre parenthèse sont calculées à partir de toutes les données y compris celles aberrantes.

Les résultats obtenus en excluant ou en maintenant les valeurs aberrantes (Tableau VI.7) montrent que la contribution à la variance totale est surtout due aux laboratoires. De plus, les rapports de variances de productibilité et de répétabilité étaient nettement supérieurs aux espérances attendues quelques soient les situations présentées.

#### **VI.4.2.2. ESTIMATION DE L'INCERTITUDE**

A partir de la variance de la reproductibilité, nous avons calculé l'incertitude type en utilisant l'équation suivante :

$$u_{\bar{x}} = \sqrt{S_R^2} \quad (\text{VI.17})$$

Les incertitudes types pour la teneur en R-timolol dans les échantillons N°5800 et N°5799 sont respectivement  $u_x = s_R = 0,0563$  et  $0,0282$ , et les incertitudes élargies en utilisant un facteur d'élargissement  $k = 2$  [91, 99, 117] sont respectivement de  $0,1127$  et de  $0,00564$ . Les teneurs du R-timolol obtenues dans les conditions nominales étant quant à elle de  $0,53\%$  et  $0,27\%$ , nous pouvons donc à nouveau dire que les incertitudes semblent dépendre de la concentration.

Finalement, comme pour la robustesse, en analysant un échantillon de maléate de S-timolol contenant l'impureté R-timolol à des teneurs similaires à celle de l'échantillon N°A5800 (environ  $0,53\%$ ), le résultat  $x$  obtenu avec la méthode de CLHP étudiée sera exprimé comme suit :  $x \pm 0,113\%$ . Pour des teneurs en R-timolol similaires à celle de l'échantillon N°A5799 (environ  $0,27\%$ ), le résultat sera  $x \pm 0,056\%$ . Ceci signifie que  $95\%$  des résultats des mesures devraient être respectivement compris dans les intervalles de  $0,42\%$  à  $0,64\%$  et de  $0,19\%$  à  $0,32\%$ . Les résultats présentés dans les tableaux IV.19 et IV.20 pour les mesures effectuées montrent que les espérances ne sont pas tout à fait satisfaisantes puisque pour chaque échantillon, seulement 2 mesures sur 32 ( $6,3\%$ ) sont en dehors des intervalles attendus mais n'en restent pas moins acceptables.

Quant aux différentes impuretés obtenues à l'issue de la dégradation de l'échantillon N°11483, nous avons effectué les calculs uniquement pour les impuretés inconnues car la dégradation n'a produit que de faibles concentrations des impuretés connues. Ayant procédé

de la même façon que pour le R-timolol, nous avons respectivement obtenu des valeurs d'incertitude type,  $u_x$ , de l'ordre de 0,13 %, de 0,82 % et de 0,98 %, et valeurs d'incertitude élargie,  $U_x$  de l'ordre de 0,26 %, de 1,63 % et de 1,97 %. Remarquons que ces valeurs d'incertitude sont plus grandes que les concentrations des impuretés.

Si un laboratoire voulait évaluer son incertitude en déterminant le R-timolol à des teneurs similaires à celles retrouvées dans l'échantillon N°A5800 (par exemple 0,53%), et en effectuant l'analyse avec trois répétitions, l'incertitude type du résultat moyen serait :

$$u_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{S_{\text{Répétitions}}^2}{3} + S_{\text{Séries}}^2 + S_{\text{Laboratoires}}^2} = 0,0491 \quad (\text{VI.18})$$

avec une incertitude élargie de  $U_{\bar{x}} = 0,0981$  et le résultat final reporté serait de  $x \pm 0,098\%$ .

Selon le même principe, si ce même laboratoire effectuait les analyses avec trois répétitions et pendant trois jours, l'incertitude type du résultat moyen serait :

$$u_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{S_{\text{Répétitions}}^2}{9} + \frac{S_{\text{Séries}}^2}{3} + S_{\text{Laboratoires}}^2} = 0,0428 \quad (\text{VI.19})$$

avec une incertitude élargie de  $U_{\bar{x}} = 0,0856$ . Le résultat final reporté serait donc de  $x \pm 0,086\%$ . Dans les deux situations, une faible amélioration de l'incertitude est observée.

Notons encore que si deux laboratoires voulaient effectuer les analyses avec la même méthode de CLHP dans les conditions de répétabilité, l'incertitude type du résultat moyen serait :

$$u_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{S_{\text{Répétitions}}^2}{6} + S_{\text{Séries}}^2 + \frac{S_{\text{Laboratoires}}^2}{2}} = 0,0380 \quad (\text{VI.20})$$

avec une incertitude élargie correspondante de  $U_{\bar{x}} = 0,076$  et un résultat final reporté de  $x \pm 0,076\%$ . Une amélioration de l'incertitude serait observée.

De la même manière, les calculs peuvent être effectués pour le niveau de concentration similaire à la teneur en R-timolol dans l'échantillon N°A5799.

## **VI.5. COMPARAISON DES DIFFERENTES ETUDES POUR L'EVALUATION DE L'INCERTITUDE**

Les estimés d'incertitude ayant été obtenus avec les trois approches (validation, robustesse et inter-laboratoires), nous allons maintenant nous intéresser à la comparaison de ces estimés. Pour cela, nous comptons d'abord comparer les estimés d'incertitude obtenus en robustesse et en inter-laboratoires pour lesquels nous espérons qu'ils soient équivalents. Ensuite, nous envisageons d'adjoindre à cette première comparaison les estimés d'incertitude obtenus en validation sur la base du profil d'exactitude.

### **VI.5.1. ROBUSTESSE ET INTER-LABORATOIRES**

Pour confirmer l'adéquation des estimés d'incertitude obtenus en robustesse, nous les avons comparés avec ceux obtenus à partir de l'étude inter-laboratoires. Il est à noter que dans les deux études les mêmes échantillons ont été analysés et la même procédure analytique a été appliquée. Les estimés obtenus à partir de toutes les données y compris les aberrantes, ont tout d'abord été comparés au moyen d'un test  $F$ . Les valeurs calculées de  $F$  sont respectivement de 1,78 pour la teneur en R-timolol dans l'échantillon N° A5800 et de 1,56 pour le deuxième échantillon (N° A5799). Etant donné que les valeurs de  $F$  sont inférieures à la valeur critique de la table ( $F = 3,44$ ) au seuil  $\alpha = 0,05$ , aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les deux estimés obtenus avec les deux études et ce, pour les deux niveaux de concentrations de R-timolol considérés. Par conséquent, l'étude de robustesse peut donc dans ce cas être proposée comme une alternative à l'étude inter-laboratoires pour estimer l'incertitude de mesure.

### **VI.5.2. VALIDATION, ROBUSTESSE ET INTER-LABORATOIRES**

A nouveau, ces trois approches peuvent être comparées puisque les mêmes échantillons de S-timolol contenant du R-timolol à des teneurs similaires ont été analysés avec la méthode procédure analytique. A cette fin, les données quantitatives (teneur de R-

timolol exprimées en %) doivent préalablement être transformées en  $\mu\text{g/mL}$  comme ce fut le cas dans la phase de validation. Dans les trois études, les principales composantes de la variance ont été estimées, notamment la fidélité intermédiaire obtenue en validation ( $FI_{\text{Validation}}$ ), en robustesse ( $FI_{\text{Robustesse}}$ ) et en inter-laboratoires ( $FI_{\text{Inter-laboratoires}}$ ) ainsi que la variance de la reproductibilité en inter-laboratoires ( $Repro_{\text{Inter-laboratoires}}$ ). Les composantes de variance ont ensuite été modélisées comme fonction aussi bien fonction de la concentration que de l'étude selon l'équation suivante :

$$\text{Variance} = f(\text{Concentration} + \text{Etude}) + \varepsilon \quad (\text{VI.21})$$

Dans cette partie le terme « étude » se rapporte aux différentes approches (validation, robustesse et inter-laboratoires) au moyen desquelles l'incertitude a été calculée.

Ayant observé que la variance augmente exponentiellement avec la concentration, le logarithme népérien ( $\ln$ ) a été utilisé pour linéariser la relation entre la variance et la concentration. Le modèle ajusté est le suivant :

$$\ln \text{Variance} = \alpha + \lambda \ln \text{Concentration} + \gamma \text{Etude} + \varepsilon \quad (\text{VI.22})$$

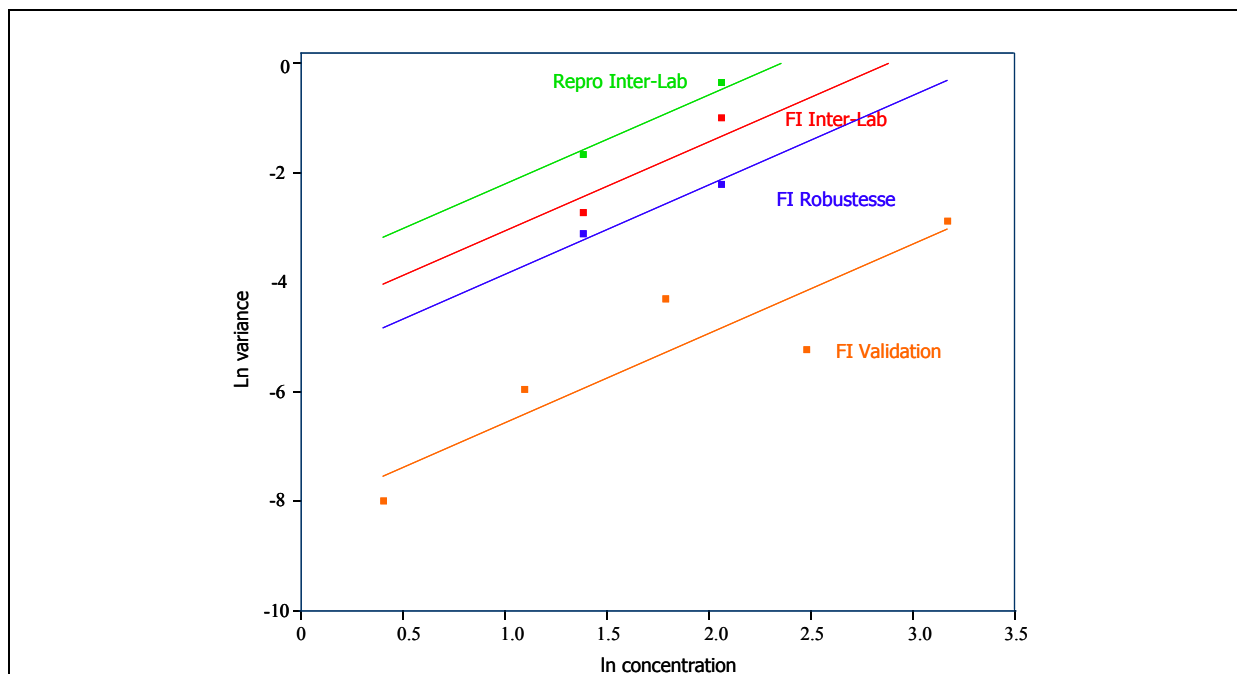
avec  $\lambda$  l'estimé de la pente et  $\gamma$  le vecteur des estimés du type d'étude,  $\alpha$  et  $\varepsilon$  respectivement l'ordonnée à l'origine et l'erreur résiduelle du modèle de régression. Un coefficient de détermination ( $r^2$ ) de 0,9465 montre que les variances sont modélisées de manière appropriées et présente une ordonnée à l'origine de  $-5,547$  et une pente de 1,624. Cette dernière nous laisse par ailleurs penser que, pour cette méthode, les variances des mesures augmentent à peu près comme fonction du carré de la concentration.

Cette transformation va donc nous permettre de comparer statistiquement les différentes composantes de la variance obtenues avec les différentes approches. En considérant l'erreur résiduelle du modèle, diverses hypothèses statistiques peuvent être testées au moyen du test  $t$  de Student. Les résultats des contrastes obtenus (Tableau VI.8) montrent que les estimés des composantes de la variance de  $FI_{\text{Robustesse}}$ , de  $FI_{\text{Inter-laboratoires}}$  et de  $Repro_{\text{Inter-laboratoires}}$  sont significativement différents (grand) que ceux de la variance de  $FI_{\text{Validation}}$ .

**Tableau VI.8.** – Comparaison des estimés des composantes de la variance obtenues avec les trois études impliquant la méthode de CLHP pour la détermination du R-timolol et en ayant inclus toutes les données de l'étude inter-laboratoires

|                                      | Contraste par le test $t$ |               |               |        |        |
|--------------------------------------|---------------------------|---------------|---------------|--------|--------|
| FI <sub>Validation</sub>             |                           |               |               |        |        |
| FI <sub>Robustesse</sub>             |                           |               |               |        |        |
| FI <sub>Inter-laboratoires</sub>     |                           |               |               |        |        |
| Repro <sub>Inter-laboratoires</sub>  |                           |               |               |        |        |
| Différence estimée entre les droites | 2,7152                    | 4,3633        | 3,5043        | 1,648  | 0,7891 |
| Erreur type                          | 0,5697                    | 0,5697        | 0,5697        | 0,6806 | 0,6806 |
| $t$ Ratio                            | 4,7659                    | 7,6585        | 6,151         | 2,4214 | 1,1594 |
| $p$ -value* (test de Student)        | <b>0,0031</b>             | <b>0,0003</b> | <b>0,0008</b> | 0,0518 | 0,2903 |

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



**Figure VI.1.** - Courbe de régression des composantes de la variance comme fonction de la concentration (avec tous les laboratoires)

Le résultat illustré dans le graphique de la figure VI.1. était raisonnablement attendu. En effet, les études de validation sont habituellement réalisées dans des conditions strictes et bien contrôlées ce qui n'est pas le cas dans les études inter-laboratoires, et par définition, encore moins avec les études de robustesse puisque dans ces dernières, les conditions analytiques sont délibérément modifiées [44].

Une autre question intéressante que nous pouvions nous poser était de savoir si la  $FI_{\text{Robustesse}}$  était bel et bien prédictive des niveaux de variance qui pouvaient être rencontrés lors des études inter-laboratoires. Les contrastes effectués en comparant les deux termes  $FI_{\text{Inter-laboratoires}}$  et  $\text{Repro}_{\text{Inter-laboratoires}}$  à la  $FI_{\text{Robustesse}}$  présentés dans le tableau VI.8 montrent que la  $FI_{\text{Robustesse}}$  n'est pas significativement différente de la  $FI_{\text{Inter-laboratoires}}$  mais plus petite que la  $\text{Repro}_{\text{Inter-laboratoires}}$ .

Notons néanmoins que les niveaux de variance de la fidélité intermédiaire ( $s^2_{\text{FI}}$ ), par exemple les variances intra- et inter-jours, sont comparables lorsqu'ils sont estimés à partir des études de robustesse et inter-laboratoires (voir équation VI.23). Ces résultats sont en accord avec les attentes.

$$s^2_{\text{FI}} = s^2_{\text{Inter-jour}} + s^2_{\text{Intra-jour}} \quad (\text{VI.23})$$

Par ailleurs, en considérant les valeurs aberrantes obtenues par le laboratoire 7 lors de l'étude inter-laboratoires, nous nous rendons compte que la variance inter-laboratoires ( $s^2_{\text{Inter-laboratoires}}$ ) est grande et tout comme la variance de la reproductibilité inter-laboratoires ( $s^2_{\text{Laboratoire}}$ ) du fait que celle-ci correspond à :

$$s^2_{\text{Reproductibilité}} = s^2_{\text{FI}} + s^2_{\text{Inter-laboratoires}} \quad (\text{VI.24})$$

$$s^2_{\text{Reproductibilité}} = s^2_{\text{Inter-Répétitions}} + s^2_{\text{Inter-Jours}} + s^2_{\text{Inter-laboratoires}} \quad (\text{VI.25})$$

Enfin, l'exclusion du laboratoire 7 a également été envisagé dans le cas de cette étude afin d'examiner quelles étaient les meilleures conditions pour déterminer la variabilité et par conséquent l'incertitude des résultats analytiques. Cette pratique d'exclusion n'est certainement pas recommandable dans le cas spécifique d'une étude inter-laboratoires. Toutefois, les résultats obtenus par le laboratoire 7 laissaient penser que les recommandations quant à l'application de la méthode de CLHP n'avaient pas été correctement suivies. En

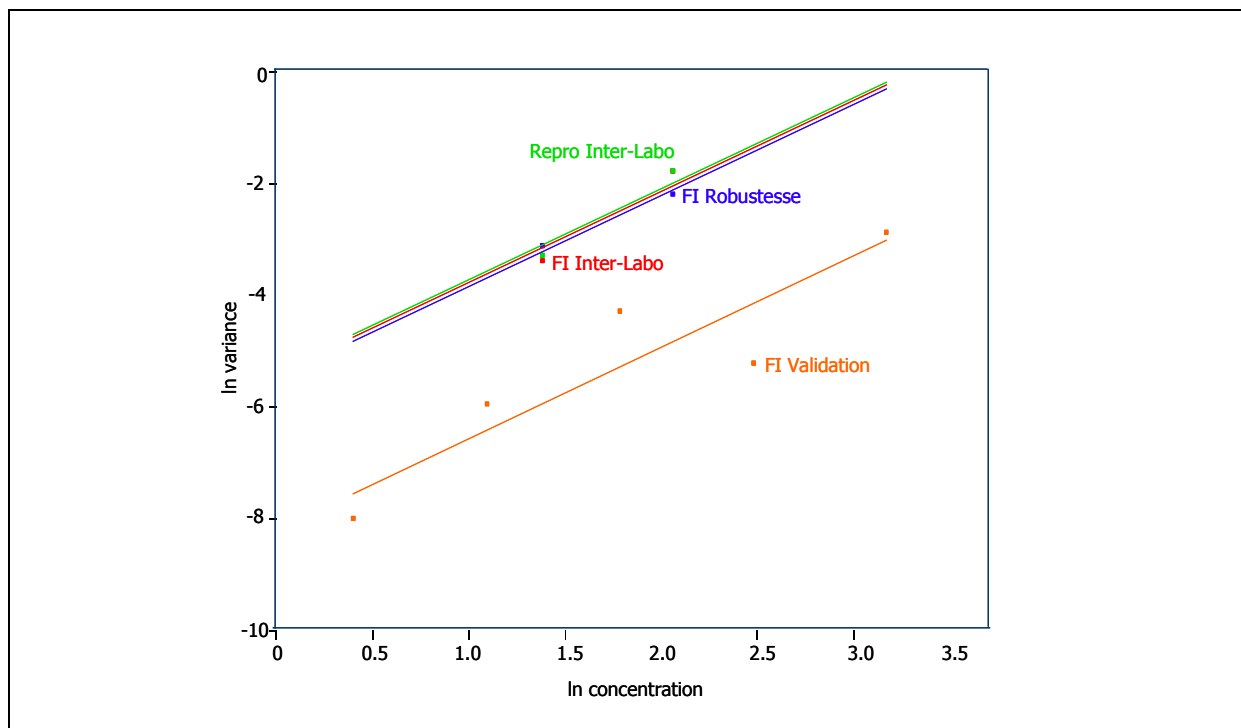
supprimant ce laboratoire, il était dès lors envisageable d'affiner l'analyse des sources de variations en dissociant plus aisément celles qui étaient issues de la mise en pratique de la méthode de celles résultant de la performance du laboratoire et ceci, rappelons-le, uniquement dans le cadre de la comparaison des différents types d'approches. A nouveau, l'obtention d'un  $r^2$  de 0,9245, nous permet de constater que la variance est adéquatement modélisée en utilisant une transformation de type logarithmique (ln) (Equation VI.22). De plus, les résultats présentés dans le tableau VI.9 indiquent que la  $FI_{\text{Inter-laboratoires}}$ , la  $Repro_{\text{Inter-laboratoires}}$  et la  $FI_{\text{Robustesse}}$  sont significativement plus grandes que la  $FI_{\text{Validation}}$ , ce qui transparait très clairement à l'examen de la figure VI.2. Nous pouvons également observer sur cette même figure que dans ces conditions la fidélité intermédiaire obtenue en robustesse ( $FI_{\text{Robustesse}}$ ) prédit très bien l'incertitude obtenue en inter-laboratoires. En effet,  $FI_{\text{Inter-laboratoires}}$  et  $Repro_{\text{Inter-laboratoires}}$  ne sont pas significativement différents de  $FI_{\text{Robustesse}}$ .

**Tableau VI.9.** – *Comparaison des estimés des composantes de la variance obtenues avec les trois études impliquant la méthode de CLHP pour la détermination du R-timolol et ayant exclu le laboratoire 7 de l'étude inter-laboratoires*

|                                      | Contraste par le test <i>t</i> |               |               |        |        |
|--------------------------------------|--------------------------------|---------------|---------------|--------|--------|
| $FI_{\text{Validation}}$             |                                |               |               |        |        |
| $FI_{\text{Robustesse}}$             |                                |               |               |        |        |
| $FI_{\text{Inter-laboratoires}}$     |                                |               |               |        |        |
| $Repro_{\text{Inter-laboratoires}}$  |                                |               |               |        |        |
| Différence estimée entre les droites | 2,7157                         | 2,8427        | 2,7968        | 0,1271 | 0,0811 |
| Erreur type                          | 0,5715                         | 0,5715        | 0,5715        | 0,6827 | 0,6827 |
| <i>t</i> Ratio                       | 4,7522                         | 4,9745        | 4,8942        | 0,1861 | 0,1189 |
| <i>p</i> -value* (test de Student)   | <b>0,0032</b>                  | <b>0,0025</b> | <b>0,0027</b> | 0,8585 | 0,9093 |

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





**Figure VI.2.** - Courbe de régression des composantes de la variance comme fonction de la concentration (laboratoire 7 exclu)

Ainsi que nous le pensions, nous avons pu vérifier que l'étude de robustesse faisant intervenir de faibles variations délibérées des conditions expérimentales prédisait bien les conditions inter-laboratoires. Signalons encore que ce type de variations pourrait très bien se produire lors du transfert de la méthode d'un laboratoire à un autre. Par conséquent, l'étude de robustesse constitue également un test intéressant préalable à tout transfert analytique.

Par ailleurs, la différence observée entre l'étude de validation et les études inter-laboratoires ou de robustesse démontre clairement que l'incertitude dépend grandement des conditions de son obtention, notamment du plan d'expériences utilisé. C'est ainsi que si peu de sources de variations sont introduites dans ce plan expérimental, les estimés de l'incertitude obtenus dans des conditions analytiques néanmoins très similaires pourraient vraisemblablement ne pas être assez puissant d'un point de vue statistique pour mimer les conditions d'analyse en routine, engendrant de la sorte l'obtention d'estimé d'incertitude relativement « pauvre » voir même non pertinent.

Ceci ne signifie pas que l'incertitude estimée à partir de la phase de validation n'est pas adéquate mais bien que celle-ci n'est valide que dans le cadre du laboratoire émetteur. En

d'autres termes, si la détermination du R-timolol dans des échantillons de maléate de S-timolol sera à l'avenir réalisée dans les mêmes conditions que celles qui ont été testées lors de la validation (cf. partie IV.2.), les estimés de l'incertitude n'en demeurent pas moins appropriés et représentatifs de l'incertitude des résultats fournis par le laboratoire. En revanche, si la méthode devra être transférée vers plusieurs laboratoires pour un usage à large échelle, alors les estimés obtenus à partir de l'étude de robustesse sont les plus adéquats pour prédire les estimés de ces conditions de reproductibilité.

## **VI.6. CONCLUSION**

Dans le cadre de cette étude, nous avons déterminé, pour la même procédure analytique, l'incertitude associée aux résultats et ce par trois approches différentes utilisant respectivement les données de validation, de l'étude de robustesse et de l'étude inter-laboratoires.

En ce qui concerne l'approche basée sur la validation, nous avons utilisé le modèle de régression qui a été sélectionné pour calculer les critères de validation, à savoir le modèle de régression linéaire passant par zéro et utilisant un seul niveau d'étalonnage à la concentration de 12 µg/mL. Sur la base du profil d'exactitude ainsi obtenu, nous avons suivi la stratégie proposée par Feinberg et coll. pour l'estimation des incertitudes aux différents niveaux de concentration. Nous avons ainsi pu déterminer les incertitudes du biais, de la mesure et de l'incertitude élargie. Nous avons également pu constater que ces incertitudes semblaient dépendre de la concentration.

Au moyen de la seconde approche reposant sur l'étude de la robustesse, nous avons déterminé l'incertitude associée à la teneur en R-timolol dans deux échantillons de maléate de S-timolol (N°A5800 et N°A5799) dont la teneur en cette impureté était différente. Puisque d'une part, le plan expérimental de l'étude avait été élaboré en se servant du guide ISO 5725-2 relatif aux études inter-laboratoires et que d'autre part, le nombre d'expériences générées par le plan de Plackett-Burman était en accord avec le nombre minimum exigé par ce guide ( $n = 8$ ), nous avons pu calculer les différentes variances des résultats quantitatifs. Les différentes variances ainsi obtenues, notamment celles des expériences, des séries et des répétitions, nous ont permis de calculer les variances de la répétabilité et de la reproductibilité et par conséquent d'estimer l'incertitude de mesure associée à ces deux niveaux de concentrations en impureté.

Enfin, grâce aux données de l'étude inter-laboratoires et en suivant les prescriptions du guide ISO 5725-2 élaboré à cet effet, nous avons estimé les variances correspondant aux effets laboratoires, séries et répétitions. Celles-ci nous ont ensuite permis de calculer les variances de répétabilité et de reproductibilité afin de pouvoir estimer l'incertitude associée aux deux mêmes niveaux de concentrations que ceux de l'étude de robustesse. Il a aussi été démontré comment un laboratoire pouvait évaluer sa propre incertitude dans des échantillons similaires à ceux examinés dans cette étude. Dans le cadre de cette étude, nous avons

également analysé les résultats d'un échantillon dégradé par la chaleur sèche. Les résultats obtenus n'ont toutefois pas été concluants en vue d'une analyse statistique pertinente.

Finalement, nous avons comparé au moyen d'un test de contraste (*t*-test) les trois approches pour l'estimation de l'incertitude. Il ressort que l'incertitude obtenue lors d'une étude de robustesse prédit très bien celle obtenue lors d'une étude inter-laboratoires (reproductibilité) et constitue de toute évidence une alternative intéressante à cette dernière. L'incertitude associée à la validation est quant à elle significativement différente de celle des autres approches mais n'en reste pas moins parfaitement valable pour autant que le protocole de validation soit en accord avec la routine et que la méthode ne quitte pas le laboratoire qui l'a validée. Rappelons que la norme ISO-17025 demande que le laboratoire soit en mesure de donner l'incertitude associée ses résultats et non pas ceux de l'ensemble des prestataires du même secteur d'activité utilisant la même méthode de dosage.