

## **VII.1. INTRODUCTION**

Comme nous l'avons précisé dans le chapitre VI, le concept d'incertitude relative aux mesures des résultats devient de nos jours un paramètre de plus en plus important pour juger de la performance d'une procédure analytique à côté des critères de validation [93]. En réalité, lorsqu'un jeu de données de mesures est obtenu pour le même mesurande en ayant appliqué une méthode analytique, comme à l'issue de la validation, d'un test de robustesse ou encore d'une évaluation inter-laboratoires, les résultats ne sont jamais tous parfaitement identiques. Il existe une variabilité des résultats des mesures pouvant raisonnablement être attribuée au mesurande et qui est considéré comme incertitude [94].

Par ailleurs, aucune publication n'existe à notre connaissance traitant de l'évaluation de l'incertitude des résultats émanant de techniques d'électrophorèse capillaire. En effet, même si la littérature signale quelques études collaboratives [86-88, 102, 264, 265] aucune d'entre-elles n'émet des conclusions pertinentes quant à l'évaluation de l'incertitude de mesure. Il nous est dès lors paru très intéressant de soumettre cette technique à ce type d'évaluation. A cette fin, nous comptons reprendre l'EC en milieu non aqueux développée pour la détermination du R-timolol dans les échantillons de maléate de S-timolol (cf. partie V.1.).

Comme pour la technique de CLHP, nous évaluerons l'incertitude à partir de trois mêmes approches, à savoir la validation, la robustesse et l'étude inter-laboratoires. Dans un deuxième point, notre souci sera de comparer les incertitudes obtenues et d'en tirer des recommandations.

## VII.2. ESTIMATION DE L'INCERTITUDE EN VALIDATION

### VII.2.1. METHODOLOGIE

Pour déterminer l'incertitude des mesures obtenues en phase de validation, nous avons appliqué l'approche décrite par Feinberg et coll., [1] qui est explicitée dans la partie traitant sur l'incertitude en CLHP (cf. partie VI.2.).

### VII.2.2. RESULTATS ET DISCUSSION

Sur la base des équations VI.10, les résultats de l'incertitude ont été générés et sont présentés dans le tableau VII.1. Ces résultats ont été obtenus à partir du 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 concentration (24 µg/mL) pour la calibration (cf. partie V.2.3.3.2.).

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

Niveaux de concentration	Incrtitude du biais (10 <sup>-2</sup> , µg/mL)	Incrtitude (10 <sup>-2</sup> , µg/mL)	Incrtitude élargie (10 <sup>-2</sup> , µg/mL)	Incrtitude élargie relative (%)
2,0 µg/mL	1,74	5,50	11,00	3,679
5,0 µg/mL	6,96	15,47	30,93	5,105
12,0 µg/mL	15,39	35,54	71,08	5,375
24,0 µg/mL	9,30	23,27	46,55	1,825

Comme montré dans le tableau VII.1, les valeurs d'incertitude sont comprises entre  $0,0174 \mu\text{g/mL} - 0,154 \mu\text{g/mL}$  pour l'incertitude du biais et entre  $0,055 \mu\text{g/mL} - 0,355 \mu\text{g/mL}$  pour celle de la mesure. Remarquons que l'incertitude semble augmenter avec la teneur en impureté comme nous l'avions également observé en CLHP. L'incertitude élargie ( $U_x$ ), qui est égale à l'incertitude type multipliée par un facteur d'élargissement  $k = 2$  [91, 99, 117], est comprise entre  $0,110 \mu\text{g/mL} - 0,466 \mu\text{g/mL}$ . Nos attentes sont satisfaites puisque tous les résultats observés pour chaque niveau de concentration sont compris dans les limites d'acceptation de 10 %. De plus, les incertitudes élargies relatives (en %) n'excèdent pas 5,4 %. Par ailleurs, les valeurs d'incertitude obtenues ne semblent pas être différentes de celles obtenues en phase de validation avec la CLHP renforçant ainsi la démonstration de l'équivalence de performance des deux techniques, EC et CLHP.

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

#### **VII.3.1. METHODOLOGIE**

Tout comme nous l'avons fait en CLHP, nous avons considéré le test de robustesse en EC en milieu non aqueux comme une simulation d'une situation pouvant survenir lors d'une étude inter-laboratoires. En pratique, les expériences ont été réalisées en suivant le schéma présenté dans la figure V.12.B, c'est-à-dire pour chaque série ( $r = 2$ ), deux répétitions indépendantes ( $c = 2$ ) de chaque échantillon de maléate de S-timolol ont été analysées et ce, en appliquant les huit conditions expérimentales ( $g = 8$ ) élaborées par le plan de Plackett-Burman, faisant un nombre total de 32 observations par échantillon. Le nombre d'expérience est donc à nouveau en parfait agrément quant au nombre minimum de huit laboratoires exigé par le guide ISO 5725-2 pour une étude inter-laboratoires. Signalons que dans cette étude, trois niveaux correspondant aux sources de variabilité ont été pris en compte à savoir le niveau « expérience », le niveau « série » et le niveau « répétition ». Habituellement, seulement deux niveaux (laboratoires et répétitions) sont examinés. Faisons également remarquer que d'une série à l'autre, nous avons utilisé des lots différents de HDMS- $\beta$ -CD, ce qui ne semble pas être en désaccord avec la réalité de la pratique analytique. En effet, dans le temps, il est tout à fait concevable qu'un analyste puisse utiliser des lots différents de HDMS- $\beta$ -CD. Ainsi, la variabilité du niveau « série » ne concerne pas uniquement la source de variabilité « jour » mais aussi la variabilité entre les lots de la cyclodextrine.

Les résultats quantitatifs obtenus lors du test de robustesse sont présentés dans les tableaux V.12 et V.13. Ce sont les teneurs en R-timolol obtenues en analysant quatre échantillons de maléate de S-timolol suivant le protocole expérimental et le plan de Plackett-Burman que nous avons établi. Avant leur utilisation, nous nous sommes assurés de leur qualité au moyen des tests statistiques appropriés. Ensuite, en se basant sur le guide ISO 5725-2 [52], les différentes composantes de la variance ont été calculées, à savoir la variance de répétabilité,  $s^2_r$ , celle entre les expériences,  $s^2_E$ , et celle de reproductibilité,  $s^2_R$ , résultant d'ailleurs de la combinaison de  $s^2_r$  et  $s^2_E$  [52].

## VII.3.2. RESULTATS ET DISCUSSIONS

### VII.3.2.1. EXAMEN CRITIQUE DES RESULTATS

Puisque nous comptons appliquer la stratégie développée dans le guide ISO 5725-2 en vue d'estimer l'incertitude, nous avons donc vérifié la qualité des résultats. Toutefois, seuls ont été appliqués les tests numériques de Cochran (équation IV.11) pour l'évaluation de l'homogénéité des variances entre les différentes expériences et les 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 quatre échantillons (A, B, C et D) sont respectivement, 0,41, 0,21, 0,25 et 0,34. Ces valeurs étant en dessous des seuils critiques de 5 % (0,52) et de 1 % (0,62), démontrent ainsi une homogénéité des variances entre les résultats obtenus dans les différentes conditions expérimentales générées par le plan de Plackett-Burman.

D'autre part, nous avons utilisé les différents tests  $G$  pour examiner, respectivement une valeur suspectée aberrante ( $G_l$  pour la plus petite ou  $G_p$  la plus grande), deux premières ou deux dernières valeurs suspectes au moyen des tests respectifs de  $G_{l,2}$  et de  $G_{r-1,r}$ , et deux valeurs extrêmes suspectées aberrantes ( $G_{l,p}$ ). Les résultats présentés dans le tableau VII.2 montrent que les tests ne sont pas significatifs.

En conclusion, puisque d'une part nous n'avons pas pu détecter une hétérogénéité des variances entre les expériences, et que d'autre part il n'y a aucune valeurs aberrantes ni valeurs suspectes détectées, par conséquent toutes les données peuvent être utilisées pour la suite des analyses, notamment l'estimation des variances.

Tableau VII.2. – Résultats des tests de Grubb

Tests de Grubb	Tests statistiques				Seuils critique	
					$p = 8$	
	Echantillon A	Echantillon B	Echantillon C	Echantillon D	5 %	1 %
$G_I$	0,55	0,86	0,56	0,94	2,13	2,27
$G_r$	1,07	0,70	0,59	0,90	2,13	2,27
$G_{I,2}$	1,03	1,03	1,02	1,03	0,11	0,06
$G_{r,r-1}$	1,01	1,01	1,01	1,01	0,11	0,06
$G_{I,r}$	18,5	10,2	11,8	15,6	64,5	74,9
Expériences	-	-	-	-		

Légende : - = Pas de valeurs aberrantes ni limites.

### VII.3.2.2. CALCUL DES VARIANCES

Les estimés de variance ont été calculés à partir de la table d'Anova telle que présentée dans le tableau VII.3.

Tableau VII.3. – Analyse des composantes de la variance

Sources de variabilité	Carrés moyens (CM)	Variances estimées ( $s^2$ )
Expériences	$CM_{\text{Expériences}} = \frac{cg \sum (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{r-1}$	$S_{\text{Expériences}}^2 = \frac{CM_{\text{Expériences}} - CM_{\text{Séries}}}{c \cdot g}$
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 expériences ;  $r$  = nombre d'expériences.

Nous avons calculé tout d'abord, les différents carrés moyens, à savoir les carrés moyens entre expériences ( $CM_{\text{Expériences}}$ ), les carrés moyens entre séries ( $CM_{\text{Séries}}$ ) et les carrés moyens entre répétitions ( $CM_{\text{Répétitions}}$ ) et ce, pour la teneur du R-timolol dans les quatre échantillons de maléate de S-timolol investigués. Ensuite, les estimés de différentes variances ont été calculés à partir de ces carrés moyens en utilisant les formules indiquées dans le tableau VII.3. Les résultats sont présentés dans le tableau VII.4.

**Tableau VII.4. – Estimation des composantes des variances ( $\times 10^{-4}$ )**

	Sources de variabilité	Echantillon de maléate de S-timolol			
		A	B	C	D
Composantes de la variance	Séries ( $s^2_{\text{Séries}}$ )	11,20	13,8	10,05	0,23
	Répétitions ( $s^2_{\text{Répétitions}}$ )	0	0	0,35	1,14
	Expériences ( $s^2_{\text{Expériences}}$ )	15,05	6,39	5,83	3,28 <sup>4</sup>
Variance de la reproductibilité ( $s^2_{\text{R}}$ )		26,25	20,19	16,23	4,64
Ratio reproductibilité/répétabilité		2,3	1,5	1,7	3,4

Différents profils ont été observés avec les différents estimés des variances obtenus. Comme nous pouvions nous y attendre suite aux variations délibérément appliquées sur les huit conditions expérimentales de la méthode d'EC en milieu non aqueux la variance inter-expériences ( $s^2_{\text{Expériences}}$ ) est la plus importante dans les échantillons A et D du maléate de S-timolol (contribution estimée respectivement à 57 % et 70 %). Cependant, elle est de moindre importance dans les échantillons B et C (respectivement 32 % et 36 %) pour lesquels la plus grande contribution est plutôt celle de la variance inter-séries ( $s^2_{\text{Séries}}$ ), estimée respectivement à 68 % et 62 %. Dans l'échantillon A, la variance de cette composante n'est toutefois pas négligeable (43 %), indiquant vraisemblablement que la différence de lots de HDMS- $\beta$ -CD pourrait affecter la variabilité entre les séries. Quant aux répétitions, les variances correspondantes ( $s^2_{\text{Répétitions}}$ ) sont très négligeables dans les échantillons A (0 %), B (0 %) et C (2 %), démontrant ainsi l'excellente fidélité de la procédure analytique dans ces conditions. Néanmoins, pour l'échantillon D, cette variance est la seconde en importance. Elle représente

en effet le quart de la variabilité totale (25 %). Ceci peut s'expliquer par le fait qu'à de faibles concentrations en analytes, comme par exemple dans le cas où la teneur en R-timolol est de l'ordre de 0,1 %, l'effet inter-série devient négligeable [51] par rapport à l'effet répétitions et par conséquent non estimable avec la taille d'échantillon choisi ( $n = 2$ ) [268]. Des valeurs de zéro ont été obtenues pour la variance de répétitions avec les échantillons A et B.

### VII.3.2.2. ESTIMATION DES DIFFERENTES COMPOSANTES D'INCERTITUDE

Les variances de la répétabilité ( $s_r^2$ ) et de la reproductibilité ( $s_R^2$ ) ont ensuite été calculées en utilisant les équations VI.11 et VI.12 décrites dans la partie de la CLHP (cf. VI.3.).

Les valeurs du  $s_r^2$  obtenues sont de  $11,20 \cdot 10^{-4}$ , de  $13,80 \cdot 10^{-4}$ , de  $10,40 \cdot 10^{-4}$  et de  $1,37 \cdot 10^{-4}$  pour la teneur du R-timolol, respectivement dans les échantillons A, B, C et D.

Le rapport entre la reproductibilité et la répétabilité a aussi été calculé. Les valeurs sont comprises entre 2 et 4 [270] pour les échantillons A et D (Tableau VII.4), ce qui indique que la grandeur des sommes des composantes de la variance est plus importante que la grandeur de la répétabilité. Par contre pour les échantillons B et C, ces mêmes rapports sont inférieurs à 2 [270].

La reproductibilité, représentée par  $s_R^2$  et correspondant à la somme des différentes composantes de variance, a permis de calculer l'incertitude type,  $u_x$ , en utilisant l'équation VI.13. Elle vaut  $u_x = s_R = 0,0512 \%$ ,  $0,0449 \%$ ,  $0,0403 \%$  et  $0,0215 \%$  pour la teneur en R-timolol, respectivement dans les échantillons A, B, C et D. Quant à l'incertitude élargie calculée avec un facteur d'élargissement de  $k = 2$  [91, 99, 117], elle devient pour les mêmes échantillons  $U_x = 2u_x = 0,1024 \%$ ,  $0,0898 \%$ ,  $0,0806 \%$  et  $0,0430 \%$  pour la teneur en R-timolol (A, B, C et D). Les concentrations de cette impureté obtenues lors de l'analyse de ces échantillons dans les conditions nominales de la méthode analytique sont respectivement de  $0,66 \%$ ,  $0,35 \%$ ,  $0,29 \%$  et  $0,10 \%$ . Les incertitudes semblent être dépendantes de la concentration.

Finalement, en analysant un échantillon de maléate de S-timolol contenant l'impureté R-timolol à des teneurs similaires à celles de l'échantillon A (environ  $0,66 \%$ ), le résultat  $x$  obtenu avec la méthode d'EC en milieu non aqueux pourrait être exprimé comme suit :  $x \pm 0,102 \%$ . Pour l'échantillon B (environ  $0,37 \%$ ), l'échantillon C (environ  $0,29 \%$ ) et



l'échantillon D (environ 0,11 %), les résultats attendus seraient respectivement  $x \pm 0,09$  %,  $x \pm 0,08$  % et  $x \pm 0,04$  %.

Au vu des résultats présentés dans les tableaux V.12 et V.13, nous pouvons dire que les mesures obtenues sont satisfaisantes puisque 1 mesure sur les 32 observées pour l'échantillon A (Tableau V.12) et l'échantillon C (Tableau V.13) est en dehors des intervalles attendus et que pour l'échantillon B (Tableau V.12), toutes les mesures sont comprises dans l'intervalle attendu, ce qui représente plus de 95 % d'espérance. Cependant pour l'échantillon D dont la teneur en R-timolol est proche de la limite de quantification (0,1 %) (Tableau V.13), 4 mesures sur 32 sont en-dehors de l'intervalle correspondant.

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

### **VII.4.1. METHODOLOGIE**

Nous avons également mené une étude inter-laboratoires pour évaluer la reproductibilité des résultats obtenus avec la méthode d'EC en milieu non aqueux. La méthodologie décrite dans le guide ISO 5725-2 [52] a à nouveau été suivie. Un protocole détaillé a été élaboré pour l'exécution de l'étude. En se servant de ce guide et en utilisant les données quantitatives obtenues, nous pourrions déterminer la répétabilité et la reproductibilité et par conséquent, estimer l'incertitude dans des conditions de reproductibilité.

### **VII.4.2. RESULTATS ET DISCUSSION**

#### **VII.4.2.1. CALCUL DES VARIANCES**

A partir des équations de l'analyse de variance présentées dans le tableau VI.4 de l'étude inter-laboratoires réalisée avec la méthode CLHP (partie IV.4), les carrés moyens ont été calculés pour les laboratoires ( $CM_{\text{Laboratoires}}$ ), pour les jours ( $CM_{\text{Jours}}$ ) et pour les répétitions ( $CM_{\text{Répétitions}}$ ) y compris les variances correspondantes ( $s^2_{\text{Laboratoires}}$ ,  $s^2_{\text{Jours}}$  et  $s^2_{\text{Répétitions}}$ ). Suivant le guide ISO 5725-2 [34], les estimés de la reproductibilité et de la répétabilité sont calculés à partir des équations suivantes :

$$s^2_{\text{r}} = s^2_{\text{Répétitions}} \quad (\text{VII.1})$$

$$s^2_{\text{R}} = s^2_{\text{Répétitions}} + s^2_{\text{Laboratoires}} \quad (\text{VII.2})$$

Dans le cas de la présente étude collaborative qui a été menée en suivant le protocole présenté dans la Figure V.17, l'ensemble des analyses a été réalisé en deux jours permettant ainsi de calculer la variance de la répétabilité (Equation VII.1), celle de la fidélité intermédiaire

dépendant de l'effet « jour » (Equation VII.3) ainsi que celle de la reproductibilité (Equation VII.4) :

$$s^2_T = s^2_{\text{Jours}} + s^2_{\text{Répétitions}} \quad (\text{VII.3})$$

$$s^2_R = s^2_T + s^2_{\text{Laboratoires}} = s^2_{\text{Répétitions}} + s^2_{\text{Jours}} + s^2_{\text{Laboratoires}} \quad (\text{VII.4})$$

Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau VII.5.

**Tableau VII.5. – Estimation des composantes de la variance ( $\times 10^{-4}$ )**

	Sources de variabilité	Echantillons de maléate de S-timolol			
		A	B	C	D
Composantes de la variance	Laboratoires ( $s^2_{\text{Laboratoires}}$ )	36,11	8,76	13,27	12,09
	Jours ( $s^2_{\text{Jours}}$ )	7,64	2,81	0,47	0,81
	Répétitions ( $s^2_{\text{Répétitions}}$ )	20,04	5,01	4,09	3,94
Variance répétabilité ( $s^2_r$ )		20,04	5,01	4,09	3,94
Variance de la reproductibilité ( $s^2_R$ )		63,78	16,57	17,83	16,83
Ratio reproductibilité/répetabilité		3,2	3,3	4,4	4,3

Notons que la variabilité la plus importante est observée pour la composante « laboratoire », et ce, pour tous les échantillons. Elle est estimée à 57 %, 53 %, 74 % et 72 % de la variabilité totale, respectivement pour les échantillons A, B, C et D. Cependant, la variabilité la plus faible est celle de la composante « jour » estimée à 12 %, 17 %, 3 % et 5 % pour les mêmes échantillons alors que la composante « répétition » est quant à elle d'importance intermédiaire par rapport à la variabilité totale.

Le rapport reproductibilité/répetabilité a aussi été évalué selon Horwitz [269]. Par rapport aux valeurs attendues qui doivent être comprises entre 2 et 4, les rapports sont respectivement de 3,2, de 3,3, de 4,4 et de 4,3 pour les échantillons A, B, C et D. De telles valeurs, légèrement supérieures à celles attendues, sont souvent observées lorsqu'il s'agit d'impuretés à de faibles

niveaux de concentration [245]. Suivant les normes ISO, la relation entre le coefficient de variation et la concentration doit être vérifiée. Dans cette étude, cet exercice a été fait mais en vérifiant plutôt la relation entre l'incertitude et la concentration.

La variance de la reproductibilité a permis de calculer l'incertitude type  $\bar{u}_x$  en utilisant l'équation :

$$\bar{u}_x = \sqrt{s_R^2} \quad (\text{VII.5})$$

L'incertitude type calculée vaut  $u_x = s_R = 0,0799 \%$ ,  $0,0407 \%$ ,  $0,0422 \%$  et  $0,0410 \%$  pour la teneur en R-timolol dans les échantillons A, B, C et D, et l'incertitude élargie  $U_x$  correspondante, en utilisant  $k = 2$  [91, 99, 117] est  $0,1597 \%$ ,  $0,08142 \%$ ,  $0,08446 \%$  et  $0,08206 \%$ . Puisque les teneurs moyennes obtenues dans ces échantillons sont respectivement de  $0,62 \%$ , de  $0,34 \%$ , de  $0,26 \%$  et de  $0,11 \%$  (Tableaux V.20 et V.21), nous pouvons dire que l'incertitude est relativement constante pour les échantillons B, C et D, alors qu'elle est élevée pour l'échantillon A. En effet, ceci indique que l'incertitude semble ne pas être affectée seulement par la teneur en R-timolol, mais aussi jusqu'à un certain niveau par d'autres sources de contribution à l'incertitude. Rappelons que lors de l'étude de validation, nous avons constaté que l'incertitude semblait dépendre de la concentration.

Ainsi, en analysant un échantillon de maléate de S-timolol contenant l'impureté R-timolol à des teneurs similaires à celle de l'échantillon A (environ  $0,66 \%$ ) (Tableau V.7), le résultat  $x$  obtenu avec la méthode d'EC en milieu non aqueux testée serait exprimé comme suit :  $x \pm 0,16 \%$ , alors que pour un échantillon contenant la moitié de cette teneur (par exemple  $0,34 \%$  dans l'échantillon B) (Tableau V.7), l'incertitude associée au résultat serait environ la moitié ( $x \pm 0,081 \%$ ). Ceci peut être illustré par la probabilité d'obtenir  $95 \%$  des valeurs rapportées comprises respectivement dans les intervalles  $0,500 \% - 0,819 \%$  et  $0,265 \% - 0,428 \%$ . Le résultat de la teneur en R-timolol dans les échantillons avec des concentrations inférieures à  $0,35 \%$ , par exemple similaires aux échantillons C et D (teneurs de  $0,26 \%$  et de  $0,11 \%$ ) (Tableau V.7), le résultat serait  $x \pm 0,08 \%$  pour les deux échantillons, illustrant que  $95 \%$  des valeurs rapportées seront comprises respectivement dans les intervalles  $0,206 - 0,375 \%$  et  $0,018 - 0,182 \%$ . Effectivement, les résultats présentés dans les tableaux V.20 et V.21 indiquent que les mesures obtenues sont satisfaisantes puisque 1 mesure sur les 32 observations pour les échantillons A et B, (Tableau V.20) et 2 mesures sur 32 pour l'échantillon C (Tableau V.21) sont en dehors des intervalles attendus. Cependant

pour l'échantillon D où, rappelons-le, la teneur en R-timolol est proche de la limite de quantification (0,1 %) (Tableau IV.21), 4 observations sur 32 sont en dehors de l'intervalle correspondant. Cette situation avait déjà été observée lors de l'étude de robustesse.

Lorsqu'un laboratoire veut évaluer son incertitude en déterminant la teneur en R-timolol dans des échantillons de maléate de S-timolol similaires à l'échantillon A (0,62 %), et en effectuant l'analyse avec trois répétitions et en appliquant la méthode d'EC en milieu non aqueux, l'incertitude type du résultat moyen sera :

$$u_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{S_{\text{répétitions}}^2}{3} + s_T^2 + s_{\text{laboratoires}}^2} = 0,0710 \quad (\text{VII.6})$$

L'incertitude élargie sera donc égale à  $U_x = 0,142$  et le résultat moyen sera écrit comme suit :  $x \pm 0,14$  %.

D'autre part, si le même laboratoire effectue ces analyses en trois répétitions et durant trois jours, l'incertitude type du résultat moyen deviendra :

$$u_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{S_{\text{répétitions}}^2}{3 \times 3} + \frac{s_T^2}{3} + s_{\text{laboratoires}}^2} = 0,0639 \quad (\text{VII.7})$$

avec une incertitude élargie de  $U_x = 0,128$  et un résultat moyen exprimé comme suit :  $x \pm 0,13$  %.

Par contre, lorsque deux laboratoires effectuent les analyses chacun en trois répétitions l'incertitude type du résultat moyen sera :

$$u_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{S_{\text{répétitions}}^2}{3 \times 2} + s_T^2 + \frac{s_{\text{laboratoires}}^2}{2}} = 0,0539 \quad (\text{VII.8})$$

L'incertitude élargie et le résultats moyen seront rapportés comme suit :  $U_x = 0,108$ ,  $x \pm 0,11$  %.

Remarquons que dans les trois cas, les incertitudes observées ne sont pas considérablement améliorées.

De la même manière, les incertitudes types et élargie peuvent être calculées pour la teneur en R-timolol similaires à celles comprises dans les échantillons B, C et D.

## **VII.5. COMPARAISON DES INCERTITUDES OBTENUES PAR LES DIFFERENTES APPROCHES**

Ces trois approches (validation, robustesse et inter-laboratoires) pour l'estimation peuvent à nouveau être comparées puisque les mêmes échantillons de S-timolol contenant du R-timolol à ont été analysés avec la même procédure. A cette fin, nous appliquerons la même stratégie que celle utilisées pour la comparaison des incertitudes de la méthode de CLHP. Dans un premier temps, nous comparerons les estimés d'incertitude obtenus lors des études de robustesse et inter-laboratoires que nous nous attendons à trouver équivalents. Ensuite, nous envisagerons la comparaison des estimés obtenus avec les trois approches.

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

Puisque dans les deux études les mêmes échantillons ont été analysés pour déterminer le R-timolol, il est aisé de comparer les estimés d'incertitude élargie en appliquant le test  $F$ . Les valeurs calculées de  $F$  valent respectivement 1,56, 0,91, 1,05 et 1,91 pour les échantillons A, B, C et D. Ces valeurs étant inférieures à celle du seuil critique ( $F = 3,44$  pour  $\alpha = 0,05$ ), nous pouvons conclure que les estimés d'incertitude obtenus en robustesse ne semblent pas être différents de ceux obtenus en inter-laboratoires. Par conséquent, les estimés obtenus avec les échantillons A, B, C et D sont appropriés pour estimer l'incertitude de reproductibilité. De ce fait, nous pouvons dire que l'étude de robustesse en EC en milieu non aqueux peut donc être raisonnablement proposée comme une alternative à l'étude inter-laboratoires pour l'estimation l'incertitude de mesure pour autant que les concentrations ne soient pas supérieures ou égales à 0,29%. En effet, il s'agit du dernier niveau de concentration où les estimés des incertitudes entre les études ont été testés et n'ont pas semblé être différentes.

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

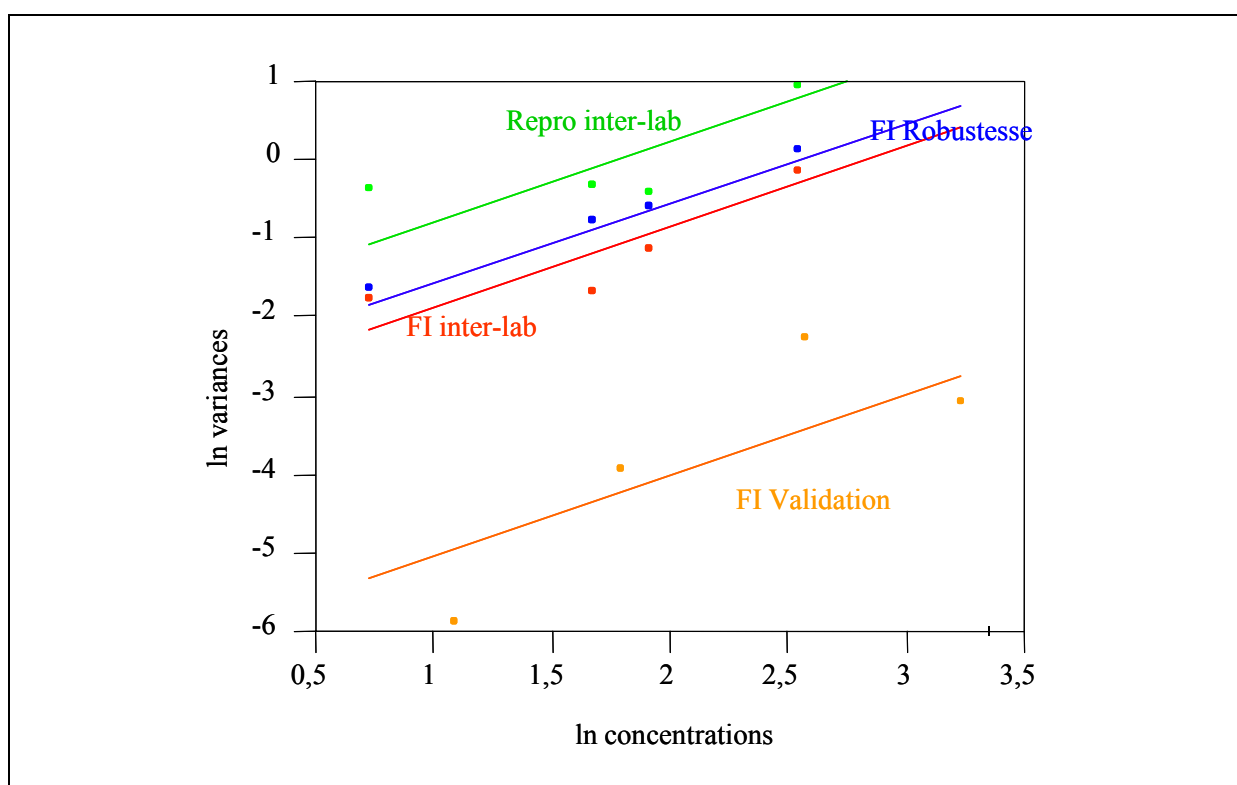
A cette fin, nous avons suivi le même raisonnement que celui appliqué pour la comparaison des incertitudes obtenues avec méthode de CLHP (cf. Chapitre VI) Nous avons commencé par uniformiser la présentation des teneurs en R-timolol obtenues lors des études de robustesse et inter-laboratoires en transformant de % en  $\mu\text{g/mL}$  comme en phase de validation. Ensuite, nous avons modélisé les composantes de la variance comme une fonction aussi bien de la concentration que de l'étude. L'équation VI.21 nous a servi pour cette modélisation. A l'issue des trois études, les principales composantes de la variance suivante ont été estimées : la fidélité intermédiaire obtenue en validation ( $FI_{\text{Validation}}$ ), celle obtenue en robustesse ( $FI_{\text{Robustesse}}$ ) et celle obtenue en inter-laboratoires ( $FI_{\text{Inter-laboratoires}}$ ). La variance de la reproductibilité en inter-laboratoires ( $Repro_{\text{Inter-laboratoires}}$ ) a aussi été estimée. Sachant que la variance augmente exponentiellement avec la concentration, le logarithme népérien ( $\ln$ ) a à nouveau été utilisé pour linéariser la relation entre la variance et la concentration. L'équation VI.22 a été appliquée pour ajuster le modèle. Les résultats des calculs effectués, présentent un coefficient de régression ( $r^2$ ) de 0,9085, ce qui suggère que les variances sont adéquatement modélisées avec des valeurs correspondantes de  $-3,313$  pour l'ordonnée à l'origine et de  $1,017$  pour la pente. Cette dernière suggère que pour cette méthode, contrairement à la méthode de CLHP, les variances des mesures augmentent à peu près de manière strictement proportionnelle avec la concentration. D'autre part, ce modèle permet de comparer statistiquement les différentes composantes de variance obtenues avec les différents jeux de données générées lors des différentes études.

En fin de compte, en considérant l'erreur résiduelle du modèle, nous avons testé diverses hypothèses statistiques au moyen du test  $t$  de Student. Les résultats des contrastes calculés et présentés dans le tableau VII.6 montrent que les estimés des composantes des variances  $FI_{\text{Robustesse}}$ ,  $FI_{\text{Inter-laboratoires}}$  et  $Repro_{\text{Inter-laboratoires}}$  sont significativement différents (plus grand) que les estimés de la composante  $FI_{\text{Validation}}$ . Ce résultat, graphiquement évident (Figure VII.1), était attendu puisque qu'il va dans le même sens que celui observé avec la méthode de CLHP. Rappelons aussi que par opposition aux études de robustesses et inter-laboratoires, les études de validation sont généralement réalisées dans des conditions de fidélité strictes et bien contrôlées [44]. Ce résultat est donc tout à fait cohérent.

**Tableau VII.6.** – Comparaison des estimés des composantes de la variance obtenues pour les trois études impliquant la méthode d'EC pour la détermination du R-timolol

	Contraste par le test <i>t</i>				
FI <sub>Validation</sub>					
FI <sub>Robustesse</sub>					
FI <sub>Inter-Laboratoires</sub>					
Repro <sub>Inter-Laboratoires</sub>					
Différence estimée entre les droites	-3,4548	-4,2216	-3,1676	-0,7668	0,2873
Erreur type	0,4402	0,4402	0,4402	0,4288	0,4288
<i>t</i> Ratio	-7,8485	-9,5905	-7,1958	-1,7883	0,6701
<i>p</i> -value* (test de Student)	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	0,1013	0,5166

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



**Figure VII.1.** - Droites de régression des composantes de la variance en fonction de la concentration pour chaque étude



En comparant les courbes de régression des composantes de la variance obtenues en EC (Figure VII.1) avec celles obtenues avec la méthode CLHP, nous constatons que celles obtenues avec l'EC sont plus proches de l'axe  $\ln(\text{variances})=0$  que pour la CLHP (Figure VI.2). Ceci indique tout simplement que la variabilité des résultats est plus importante pour l'électrophorèse capillaire que pour la chromatographie liquide.

## VII.6. CONCLUSION

Les résultats obtenus lors des trois études en appliquant la même procédure analytique (EC en milieu non aqueux) nous ont permis de déterminer l'incertitude des mesures.

Pour estimer l'incertitude en phase de validation, nous nous sommes servi des données issues du modèle de régression qui a été sélectionné pour examiner les critères de validation (régression linéaire passant par zéro et utilisant 24 µg/mL pour la calibration). En suivant la stratégie proposée par Feinberg et coll., différentes incertitudes (du biais, de mesure et élargie) ont été déterminées à tous les niveaux de concentration étudiés. Nous avons pu à nouveau constater que les incertitudes semblaient augmenter avec la concentration en R-timolol dans l'échantillon.

En ce qui concerne l'étude de robustesse de la procédure d'EC en milieu non aqueux, un plan expérimental a été élaboré en adaptant le guide ISO 5725-2 relatif aux études inter-laboratoires. Les expériences exécutées ont été générées par un plan de type Plackett-Burman. Elles étaient en accord avec le nombre minimum exigé par ce guide quant à leur nombre ( $n = 8$ ). De ce fait, en nous servant de la table Anova, nous avons pu calculer les différents estimés des variances à partir des résultats quantitatifs. Ceux-ci ont été obtenus en déterminant les teneurs en R-timolol dans quatre lots d'échantillons de maléate de S-timolol au cours des différentes expériences du plan assimilées dans le cas présent aux laboratoires d'une étude inter-laboratoires. Les différentes variances obtenues (expériences, séries et répétitions) nous ont permis de calculer la variance de la répétabilité et celle de la reproductibilité, et par conséquent d'estimer l'incertitude de mesure. Nous avons constaté que dans une certaine mesure, l'incertitude semble aussi dépendre de la concentration.

Enfin, dans l'étude inter-laboratoires, nous avons suivi le guide ISO 5725-2. Les résultats quantitatifs ont été obtenus par analyse de quatre échantillons de maléate de S-timolol. Il s'agit des mêmes échantillons que ceux qui ont été analysés lors de l'étude de robustesse. Toujours au moyen du guide ISO et de la table Anova, nous avons calculé les différentes variances obtenues (laboratoires, séries et répétitions), ce qui nous a permis de calculer les variances de la répétabilité et de la reproductibilité et d'estimer l'incertitude de mesure. L'estimé de l'incertitude de la teneur en R-timolol semble dépendre de la concentration à des teneurs importantes en R-timolol, alors qu'aux faibles teneurs, cette dépendance n'a pas pu être confirmée.

Tout comme pour l'étude menée en CLHP, il a été montré comment un laboratoire peut évaluer sa propre incertitude si ce laboratoire compte utiliser la méthode d'EC en milieu non aqueux pour déterminer le R-timolol dans des échantillons similaires à ceux qui ont été examinés dans cette étude.

Enfin, nous avons comparé les incertitudes obtenues avec les trois approches évaluées. Au terme de cet exercice, nous sommes arrivés aux mêmes conclusions que lors de l'étude réalisée au moyen de la méthode de CLHP. Il ressort en effet de cette seconde étude réalisée sur une technique analytique différente que l'incertitude obtenue lors d'une étude de robustesse prédit très bien celle obtenue lors d'une étude inter-laboratoires (reproductibilité). Nous pouvons ainsi confirmer que l'étude de robustesse constitue bel et bien une alternative intéressante à cette dernière. Nous avons également confirmé que l'incertitude associée à la validation est significativement différente de celle des autres approches mais qu'elle n'en reste pas moins valable pour autant que le protocole de validation soit en accord avec la routine et que la méthode ne quitte pas le laboratoire émetteur qui l'a validée.