

V.3. ROBUSTESSE

V.3.1. INTRODUCTION

Suivant le cycle de vie d'une méthode [56], la robustesse fait partie de la validation. Cependant, d'un point de vue pratique, il devient plus courant chez les analystes de la traiter dans une étude séparée. Par rapport à la validation qui ne considère que les résultats quantitatifs, la robustesse considère généralement les deux réponses, quantitatives et qualitatives. En se basant sur la définition de la robustesse [56], ce test a pour objectif de vérifier si les résultats qualitatifs et/ou quantitatifs, obtenus en appliquant une méthode optimisée (et souvent non encore validée) ne sont pas affectés par de faibles modifications délibérées et judicieuses des paramètres analytiques.

Avec sa grande efficacité, sa simplicité, sa sélectivité et sa souplesse [110], l'électrophorèse capillaire (EC) a notamment été trouvée appropriée comme technique de séparation orthogonale par rapport à la chromatographie liquide, avec des applications particulièrement intéressantes dans le domaine de la séparation énantiomérique.

L'objectif de ce travail est de tester la robustesse de la méthode d'EC en milieu non aqueux développée et validée pour la détermination de l'impureté R-timolol dans le maléate de S-timolol. Comme nous l'avons fait pour le test de robustesse de la méthode de CLHP dans la partie IV.3, nous allons considérer des réponses qualitatives, à savoir les critères de performances électrophorétiques, et des réponses quantitatives, notamment la détermination de la teneur en R-timolol dans les échantillons de maléate de S-timolol.

V.3.2. PRÉPARATION DES SOLUTIONS

V.3.2.1. SOLUTION D'ÉTALON INTERNE

La solution d'étalon interne a été préparée par dissolution d'environ 12,5 mg de chlorhydrate de pyridoxine dans 25,0 mL de méthanol suivie d'une dilution au cinquantième avec le même solvant.

IV.3.2.2. SOLUTION UTILISEE POUR LE TEST DE PERFORMANCE

Deux solutions mères contenant respectivement 1 mg/mL de S-timolol et 1 mg/mL de R-timolol ont été préparées dans du méthanol. Ensuite, une solution de mélange a été préparée en diluant ces solutions mères et celle de la pyridoxine pour obtenir respectivement une solution de travail contenant 5 µg/mL de pyridoxine, 10 µg/mL de S-timolol et 2 µg/mL de R-timolol

Cette solution a servi pour le test de conformité (SST) en vue d'examiner les performances électrophorétiques de chaque condition expérimentale. Le SST consiste en la détermination des valeurs de résolution entre les pics consécutifs y compris ceux des énantiomères du timolol. Il a été effectué au début de chaque condition expérimentale.

V.3.2.3. SOLUTIONS UTILISÉES POUR LA DÉTERMINATION QUANTITATIVE

V.3.2.3.1. Solution de référence

Une solution mère méthanolique de R-timolol a été préparée dans un ballon jaugé volumétrique de 10,0 mL en dissolvant une quantité exactement pesée d'environ 20,0 mg de maléate de R-timolol. Cette solution a ensuite été diluée cent fois en vue d'obtenir une solution de référence représentant 1,0 % (soit 20 µg/mL) de niveau d'impureté et contenant 5 µg/mL d'étalon interne (pyridoxine).

V.3.2.3.2. Solutions à analyser

Différentes solutions méthanoliques des échantillons à examiner ont été préparées dans des ballons jaugés de 10,0 mL en dissolvant une quantité exactement pesée approximative de 20,0 mg d'échantillon de maléate de S-timolol. Un bain à ultrasons a été utilisé pour faciliter la dissolution des échantillons. Ces solutions contenaient l'étalon interne à la concentration de 5 µg/mL. Deux solutions indépendantes (2 répétitions) de chaque échantillon ont été préparées pour chaque échantillon examiné et par série.

V.3.3. RESULTATS ET DISCUSSION

Comme pour le test de robustesse de la méthode CLHP, le test de robustesse a été effectué en tenant compte des huit étapes décrites dans la littérature [58].

V.3.3.1. IDENTIFICATION ET SELECTION DES FACTEURS

Nous avons sélectionné un seul facteur qualitatif et six facteurs quantitatifs [64] (Tableau V.8.) afin de permettre de simuler les variations susceptibles de survenir entre différents laboratoires lors d'un usage à large échelle comme par exemple lors d'une étude inter-laboratoires que nous envisageons de mener avec cette méthode analytique.

Tableau V.8. – Domaine expérimental

	Unités	Limites	Niveau (-1)	Niveau (+1)	Nominal
<u>Facteur qualitatif</u>					
A. - Type d'équipement d'EC			A	B	A
<u>Facteurs quantitatifs</u>					
B. – Température du capillaire	°C	15 ; 17	15	17	15
C. - Longueur d'onde	nm	± 5	290	300	295
D. - Voltage	kV	± 2	23	27	25
E. – Volume d'injection (correspondance en nL)	sec	± 1	7 (20,5 nL)	9 (26,3 nL)	8 (23,4 nL)
F. - HDMS-β-CD	mM	± 2,5	27,5	32,5	30
G. – CamphoSO ₃ ⁻	mM	± 2,5	27,5	32,5	30

Le facteur qualitatif était l'équipement d'électrophorèse capillaire provenant du même fabricant, Agilent. En fait, à travers ce facteur, nous n'avons pas seulement considéré le type d'équipement, mais aussi le logiciel d'exploitation du système d'EC.

Les facteurs quantitatifs étaient la température de thermostatisation du capillaire, la longueur d'onde du détecteur, le voltage appliqué pour la séparation électrophorétique, les concentrations de HDMS- β -CD et de camphosulfonate.

V.3.3.2. DEFINITION DES NIVEAUX DES FACTEURS

Les niveaux des facteurs à tester sont indiqués dans le tableau V.8. Leur sélection a été faite de façon à refléter les variations potentielles qui pourraient survenir. Généralement, les domaines expérimentaux des facteurs quantitatifs sont conçus de telle manière que les niveaux extrêmes sont symétriquement situés autour du niveau nominal comme cela est le cas avec la longueur d'onde du détecteur, le voltage appliqué pour la séparation électrophorétique ainsi que les concentrations de HDMS- β -CD et de camphosulfonate. Cependant, pour la température de thermostatisation du capillaire, puisque l'équipement n'est pas en mesure de refroidir le capillaire en dessous la valeur nominale (15°C), nous nous sommes contenté de fixer les niveaux extrêmes asymétriquement autour du niveau nominal (Tableau V.8).

V.3.3.3. SELECTION DU PLAN EXPERIMENTAL

Face aux multiples plans expérimentaux décrits pour le test de robustesse des procédures analytiques, nous avons sélectionné le plan de Plackett-Burman à deux niveaux [58, 86]. Huit conditions expérimentales ont ainsi été générées telles que présentées dans le tableau V.9. pour les sept facteurs sélectionnés.

Tableau V.9. – Plan expérimental

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

V.3.3.4. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Pour l'exécution des expériences du test de robustesse, nous avons tout d'abord élaboré un protocole expérimental (Figure V.12.A) calqué sur celui couramment appliqué dans des études collaboratives dans le but d'établir un parallélisme entre les deux études (inter-laboratoires et robustesse), les laboratoires étant remplacés ici par les expériences et les jours par les séries. Puisqu'en pratique les expériences n'ont pas été réalisées selon ce protocole initial, il était logique de faire concorder ce protocole à l'exécution telle que faite en pratique. Comme schématisé dans la figure V.12.B, pour chaque série, deux préparations indépendantes ($n = 2$ répétitions) de chaque échantillon de maléate de S-timolol ont été analysées et ce, en appliquant les huit conditions expérimentales. L'ensemble de l'analyse a été répété deux fois constituant ainsi deux séries. En réalité, dans les deux séries, différents lots de HDMS- β -CD ont été utilisés. Le plan expérimental a été exécuté de manière aléatoire ainsi qu'en parallèle sur les deux équipements d'EC.

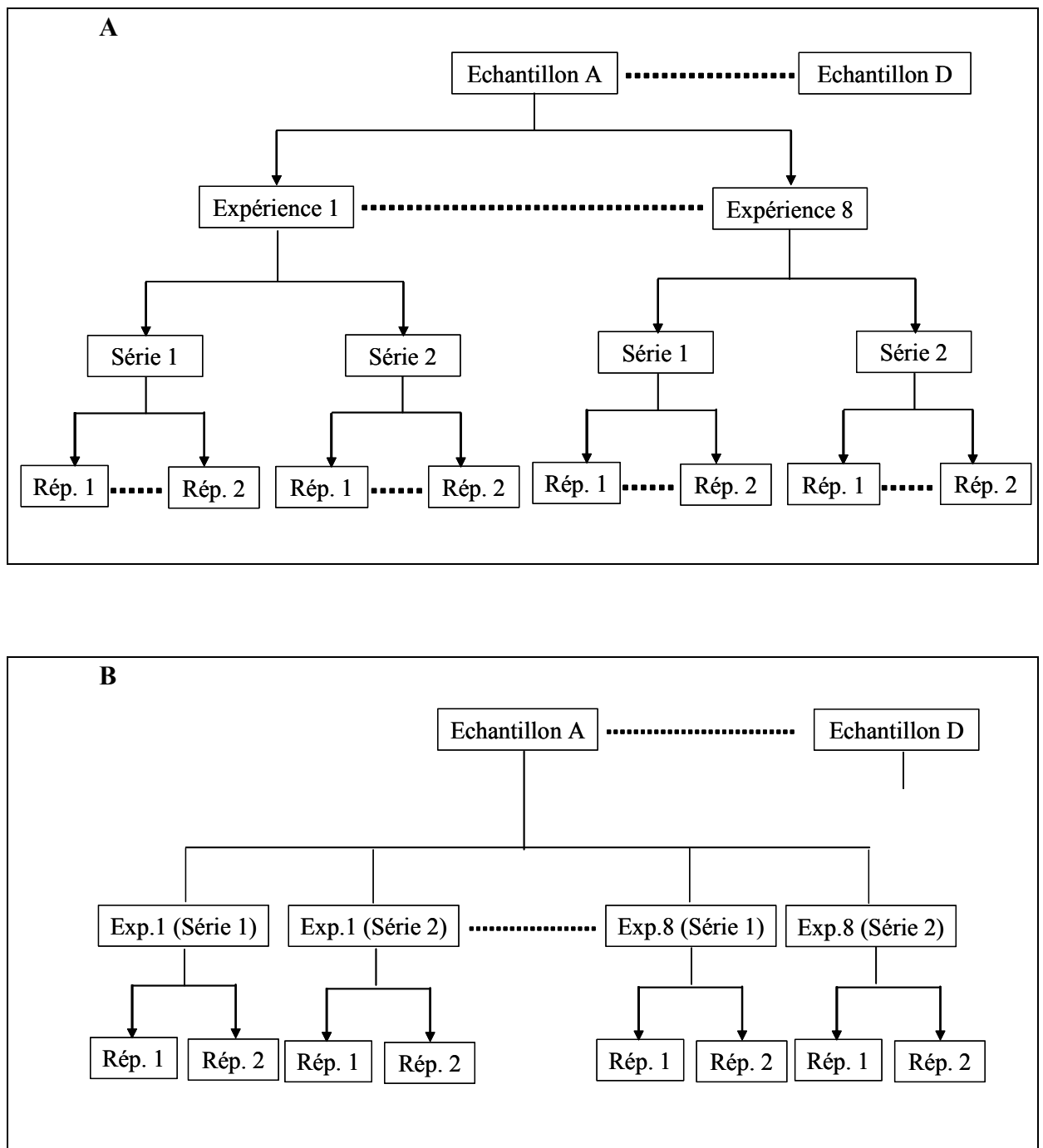


Figure V.12. – Protocole expérimental du test de robustesse en comparaison avec ceux communément appliqués lors des études inter-laboratoires (A). Protocole expérimental appliqué dans le cas de l'étude présente (B).

(c = 2 répétitions, g = 2 séries et r = 8 expériences)

Légende : Exp. = Expérience, Rép. = répétitions.

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

Durant les phases de rinçage et de conditionnement du capillaire, la température correspondante aux conditions expérimentales a été utilisée. Avant, pendant et après la séquence d'exécution des différentes conditions expérimentales (Tableau V.9.), les traitements suivants ont été appliqués au niveau du capillaire :

avant les expériences :

- rinçage du capillaire avec du méthanol pendant 5 min,
- conditionnement avec le BGE pendant 5 min
- conditionnement avec le BGE-CD pendant 5 min

entre les injections :

- rinçage du capillaire avec du méthanol pendant 2 min,
- conditionnement avec le BGE-CD pendant 4 min

à la fin de l'analyse (ou en fin de journée) :

- rinçage du capillaire avec du méthanol à 25°C pendant 30 min,
- rinçage du capillaire avec 20 mM de solution méthanolique de formiate d'ammonium pendant 20 min,
- rinçage du capillaire de nouveau avec du méthanol pendant 30 min.

La pression appliquée lors du cycle de rinçage est approximativement d'1 bar.

Comme l'indique la figure V.13, l'exécution des expériences a toujours commencé par le test d'adéquation du système d'EC en analysant la solution du mélange prévue à cet effet, suivie de l'analyse de la solution de référence pour la quantification et celle des échantillons à examiner ($g = 2$ répétitions).

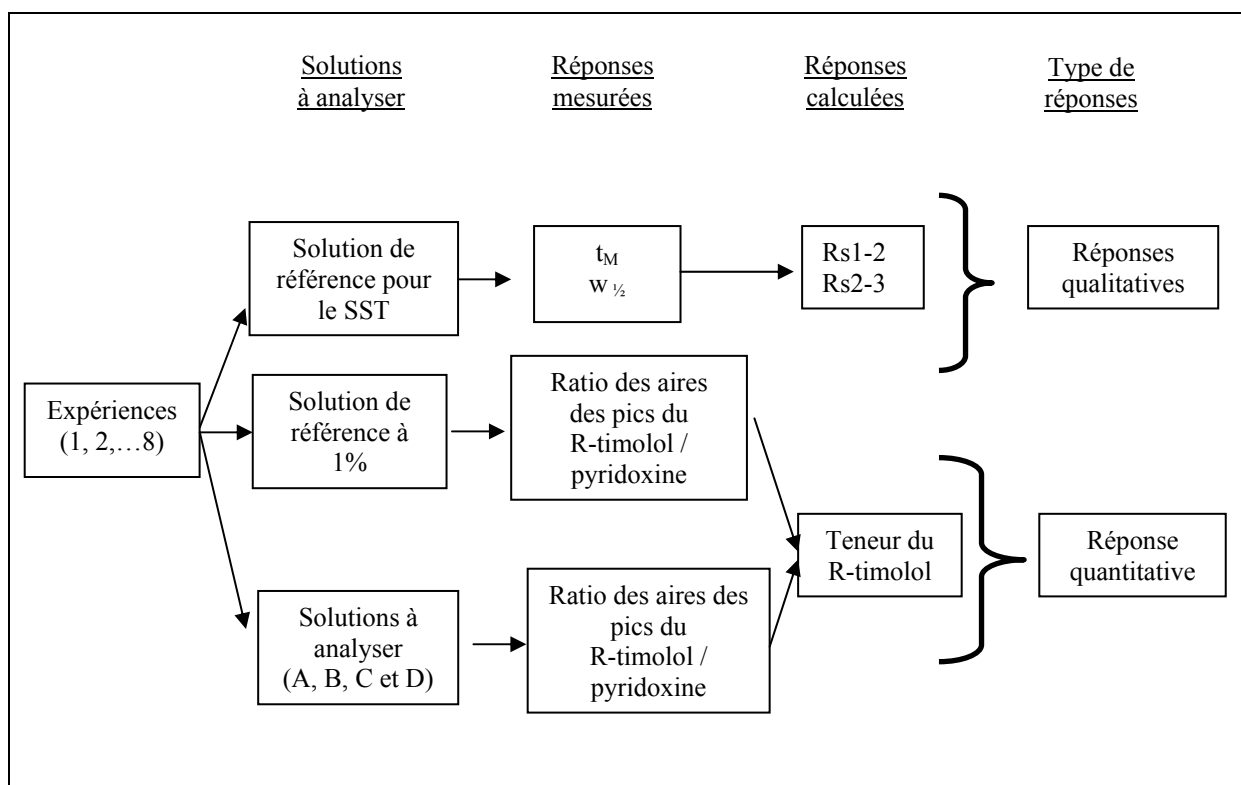


Figure V.13. – Représentation schématique de l'exécution du test de robustesse

V.3.3.5. IDENTIFICATION ET SELECTION DES REPONSES

En général, lors d'un test de robustesse, ce sont les réponses qualitatives qui sont prises en compte pour évaluer la robustesse des conditions opératoires d'une procédure analytique. Comme pour la CLHP, nous avons considéré aussi bien les réponses quantitatives que les qualitatives. Les premières se rapportent aux teneurs des impuretés dans les échantillons de maléate de S-timolol et les deuxièmes à la qualité de la séparation électrophorétique évaluée en calculant les résolutions entre les pics consécutifs y compris entre ceux des énantiomères du timolol.

V.3.3.6. RESULTATS D'EXECUTION DES EXPERIENCES

V.3.3.6.1. Adéquation du système d'EC et réponses qualitatives

Dans les conditions nominales de la méthode d'EC en milieu non aqueux, les pics correspondant aux trois composés sont bien séparés avec respectivement des temps de migration de 9,8 minutes pour la pyridoxine, 11,2 minutes pour le S-timolol et de 12,2 minutes pour le R-timolol (figure V.14).

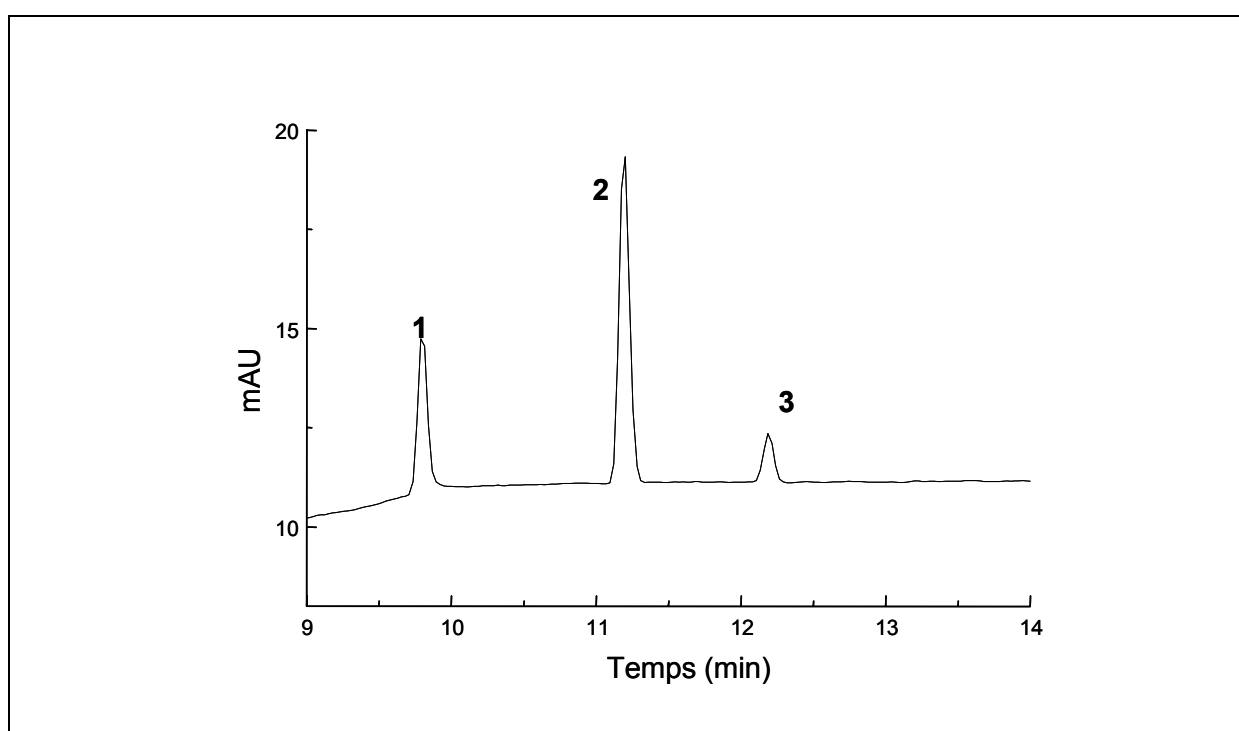


Figure V.14. – Electrophérogramme d'une solution contenant la pyridoxine (1), le S-timolol (2) et le R-timolol (3), dans les conditions nominales

Les valeurs des résolutions moyennes des trois analyses sont de 9,0 entre la pyridoxine et le S-timolol (R_{s1-2}) et de 5,5 pour la paire des pics des énantiomères (R_{s2-3}). Par conséquent, ces valeurs ont été considérées comme points de départ pour examiner l'adéquation du système d'EC dans les différentes conditions expérimentales indiquées dans le tableau V.13. L'identification des composés et leur ordre de migration électrophorétique ont été établis grâce à la différence de hauteur des pics.

Les résultats des réponses qualitatives présentés dans le tableau V.10 montrent que dans la série 1, la valeur de l'énantiorésolution (Rs_{2-3}) est supérieure aux valeurs obtenues dans les conditions nominales et ce, uniquement pour une seule expérience (No.6), alors que les valeurs obtenues avec les expériences 4 et 8 sont proches de ces valeurs sous les conditions nominales. D'autre part, toutes les valeurs de Rs_{1-2} étaient au dessus de celles des conditions nominales. Dans la série 2, la moitié des résultats (expériences N°1, 2, 4 et 6) pour la résolution Rs_{2-3} sont au dessus de la valeur nominale alors que dans les expériences 5 et 7 ils sont en dessous. Pour la Rs_{1-2} , seules les valeurs obtenues pour les deux expériences (2 et 4) sont en dessous de la valeur nominale. Rappelons que dans la série 1, un ancien lot d'échantillon de HDMS- β -CD a été utilisé alors que dans la série 2 c'était un nouveau lot.

Les temps de migration de la plupart des pics à l'exception de ceux de l'expérience 2 sont un peu plus élevés dans la série 1 que dans la série 2 (Tableau V.10). Une explication possible pourrait être la différence de la pureté entre les deux lots de HDMS- β -CD. Toutefois, aucun certificat d'analyse n'était disponible pour vérifier cette hypothèse et donc la pureté de cet ancien lot de HDMS- β -CD conservé à la température ambiante pendant une longue période. L'ordre de migration des pics observé dans les deux séries est le même que celui présenté dans l'électrophérogramme de la figure V.14. En termes de résolution et de temps de migration, nous pouvons dire que la robustesse de la méthode est affectée par la différence de lot de HDMS- β -CD.

Tableau V.10. – *Performances électrophorétiques évaluées en considérant les temps de migration des pics et les résolution (Rs) entre les pics consécutifs.*

Expérience No	Série 1 (HDMS-β-CD lot N°1)					Série 2 (HDMS-β-CD lot N° 2)				
	Temps de migration (min)			Rs1-2	Rs2-3	Temps de migration (min)			Rs1-2	Rs2-3
	1	2	3			1	2	3		
1	11,5	13,8	14,7	13,8	4,9	10,3	11,9	12,9	9,9	5,8
2	8,4	9,3	10,1	16,1	3,5	8,9	9,9	10,8	8,2	6,1
3	9,1	10,9	11,6	12,8	4,2	8,3	9,7	10,2	10,0	4,2
4	9,8	11,4	12,2	10,2	5,1	9,1	10,1	11,1	7,3	5,6
5	11,9	14,4	15,3	14,0	4,7	10,4	12,0	12,9	9,1	5,2
6	11,6	13,7	14,7	12,4	5,8	10,7	12,5	13,5	10,7	5,5
7	8,9	10,7	11,2	12,7	3,8	8,3	9,6	10,3	10,1	4,9
8	11,0	13,0	13,9	12,4	5,2	10,5	12,4	13,1	11,9	4,6

Légende: 1 = Pyridoxine, 2 = S-timolol, 3 = R-timolol

Un autre test d'adéquation du système d'EC que nous avons réalisé est l'évaluation de la répétabilité des temps de migration. Ce test a été effectué respectivement pour les pics de la pyridoxine et du R-timolol obtenus à partir des électrophérogrammes issus de l'analyse des solutions échantillons à examiner dans les huit conditions expérimentales. Les résultats présentés par série (Tableau V.11) indiquent une dispersion très constante des temps de migration de la série 1 (la plupart des CV étant inférieurs à 1,0 %) comparativement à ceux de la série 2 (la plupart des CV étant supérieurs à 1,0 %). Dans la série 1, seule une expérience (No. 3) a conduit à une grande variabilité mais néanmoins inférieure à 1,6 %. Ce CV reste néanmoins en accord avec la variabilité inhérente à la technique envisagée. Dans la série 2, différents profils de variabilité sont observés. Des temps de migration assez constants sont seulement observés avec l'expérience 8 (CV en dessous de 0,8 %). Les temps de migration des expériences 1, 2, 4 et 6 présentent une plus grande variabilité mais toujours en dessous d'un CV de 1,6 %. Cependant, pour les expériences 3, 5 et 7, d'importantes variabilités ont été notées avec des coefficients de variation supérieurs à 2,0 %.

La précision du système d'EC considérant les huit conditions expérimentales a aussi été examinée en termes de temps de migration (t_M) relatifs entre le R-timolol et la pyridoxine ($t_{M \text{ R-timolol}}/t_{M \text{ pyridoxine}}$). Dans le procédé de standardisation, le temps de migration relatif peut être considéré comme un indicateur convenable pour l'expression de la vitesse de migration, du pic d'intérêt (R-timolol) par rapport à celui de l'étalon interne (pyridoxine). Il est en effet bien connu que la différence de vitesse affecte l'aire de pic et par conséquent, la quantification d'un analyte [209]. Les résultats présentés dans le tableau V.11 montrent que les CV des temps de migration relatifs sont en dessous de 1,0 % indiquant une bonne constance des vitesses de migration des pics considérés et ce, dans chaque expérience et pour chaque série.

Tableau V.11. – *Evaluation de la répétabilité des temps de migration (min)*

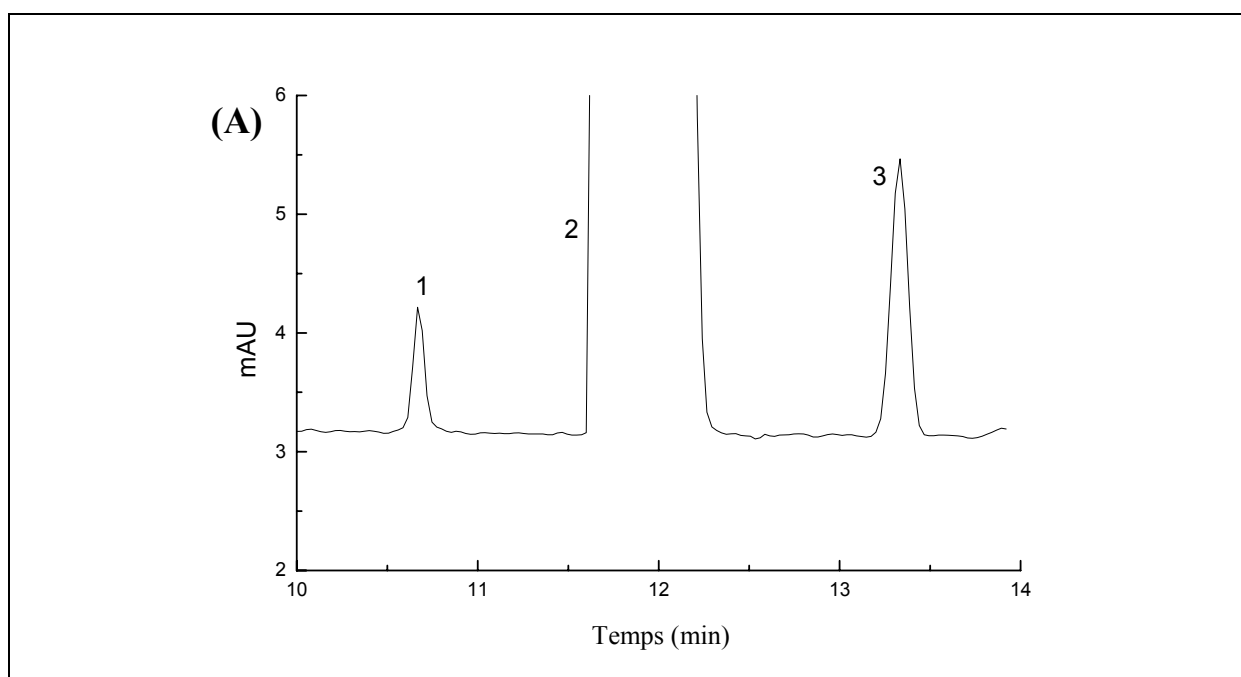
		Expériences							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Série 1									
E.I.	Moyenne	11,1	9,71	8,98	9,73	11,51	11,60	8,92	10,98
	CV	0,87%	0,16%	1,28%	0,28%	0,66%	0,06%	0,17%	0,59%
R-timolol	Moyenne	14,11	12,11	11,42	12,06	14,79	14,73	11,33	13,93
	CV	0,79%	0,13%	1,53%	0,15%	0,58%	0,14%	0,23%	0,49%
TMR*	Moyenne	1,27	1,25	1,27	1,24	1,28	1,27	1,27	1,27
	CV	0,12%	0,09%	0,33%	0,13%	0,12%	0,17%	0,22%	0,16%
Série 2									
E.I.	Moyenne	10,38	9,14	8,75	9,30	11,11	11,35	8,56	10,74
	CV	1,09%	1,13%	2,05%	1,14%	2,18%	1,30%	2,66%	0,50%
R-timolol	Moyenne	12,98	11,23	11,06	11,38	14,03	14,46	10,81	13,43
	CV	1,17%	1,44%	2,72%	1,37%	2,55%	1,49%	2,85%	0,69%
TMR*	Moyenne	1,25	1,23	1,26	1,22	1,26	1,27	1,26	1,25
	CV	0,13%	0,31%	0,53%	0,24%	0,39%	0,20%	0,53%	0,21%

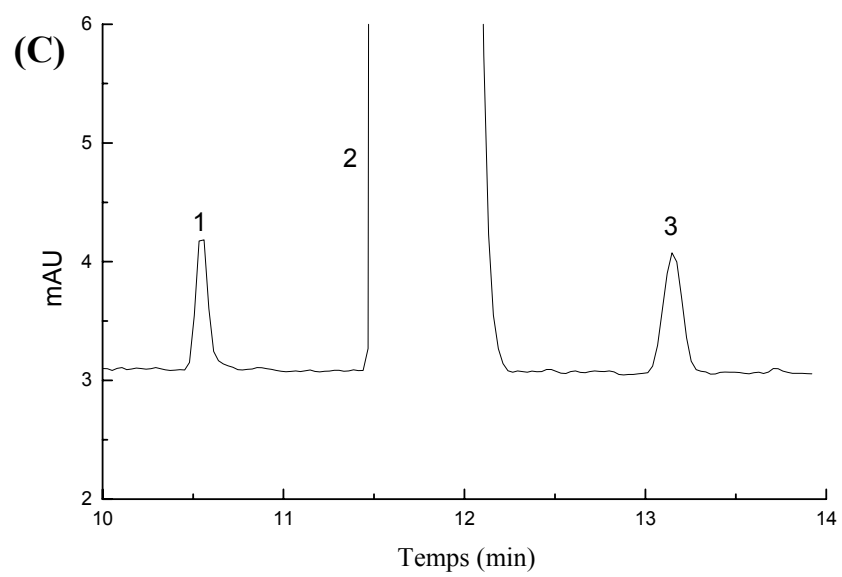
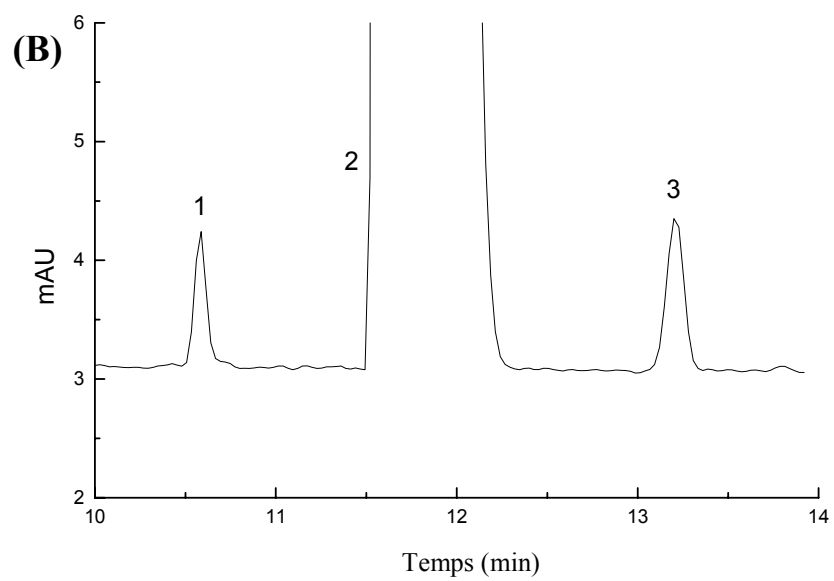
Légende : *TMR = Temps de migration relatif ; CV = coefficient de variation, E.I. = étalon interne

Ces bons résultats démontrent aussi l'adéquation de la standardisation par la pyridoxine et ce, dans les différentes conditions expérimentales testées. De plus, la composition du BGE et du BGE-CE utilisée dans chacune des conditions expérimentales ainsi que les étapes de rinçage entre les injections se sont également révélées adéquates [53]. L'utilité de l'application du temps de migration relatif est particulièrement intéressante pour la série 2 où les CV sont maintenant en dessous de 0,6 % alors qu'ils étaient majoritairement élevés.

V.3.3.6.2. Réponses quantitatives

En tenant compte du rapport présenté dans la partie V.2.3.5 et comme le montrent les électrophérogrammes présentés dans la figure V.15, un seul pic d'impureté correspondant au R-timolol a été retrouvé dans les quatre lots d'échantillons examinés.





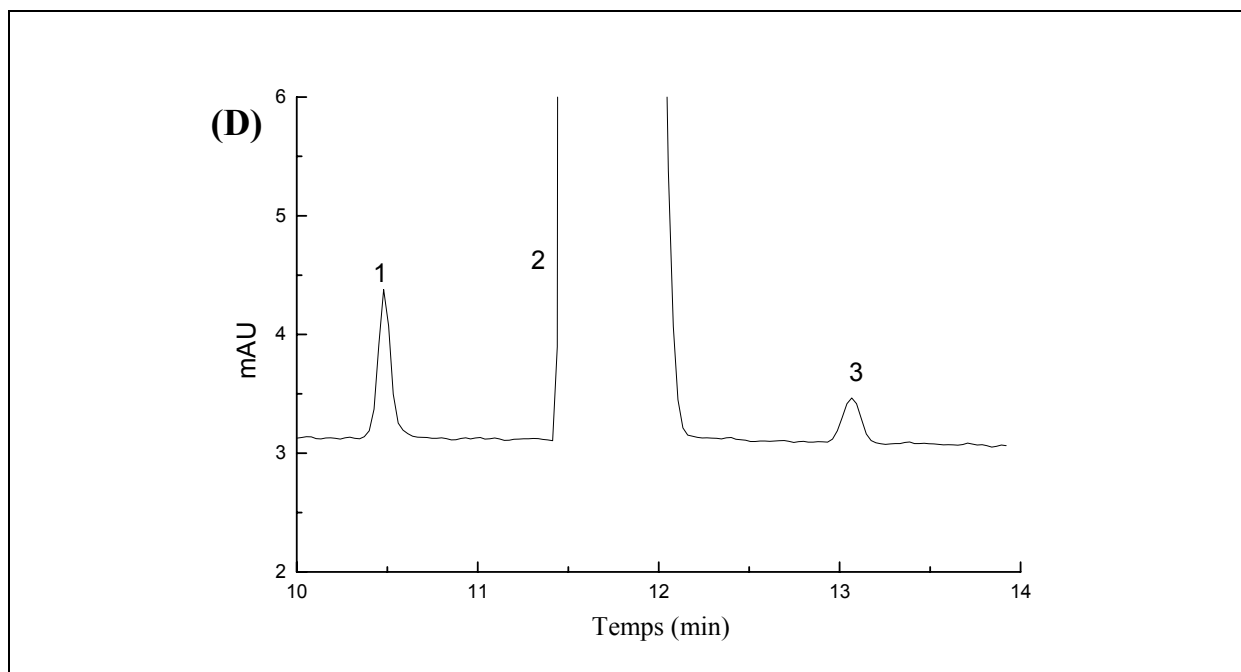


Figure V.15. – Electrophérogrammes typiques des solutions de maléate de S-timolol échantillon A (A), échantillon (B), échantillon C (C) et échantillon (D) obtenus dans les conditions nominales

Pics et concentrations: 1.- Pyridoxine (5 µg/mL), 2.- S-timolol (environ 2,0 mg/mL) et 3.- R-timolol (A = 12,4 µg/mL, B = 6,8 µg/mL, C = 5,2 µg/mL et D = 2,2 µg/mL).

Ainsi, la teneur de l'impureté R-timolol a été déterminée dans les échantillons examinés en comparant le rapport normalisé obtenu en analysant les solutions de ces échantillons (ANE) et le rapport normalisé du R-timolol obtenu en analysant la solution de référence à 1 % (ANR) en utilisant l'équation suivante :

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

Les rapports du R-timolol dans les solutions des essais ou de référence ont été normalisés comme suit :

$$\text{Rapport normalisé} = \frac{\text{Rapport Référence ou Rapport Essai} \times 20}{\text{prise d'essai (en mg)}} \quad (\text{V.2})$$

avec le Rapport Référence (solution de référence) ou le Rapport Essai (solutions d'échantillons à examiner) obtenus au moyen des calculs suivants :

$$\text{Rapport} = \frac{\text{Aire corrigée de R-timolol dans Essai ou Référence}}{\text{Aire corrigée de la pyridoxine dans Essai ou Référence}} \quad (\text{V.3})$$

Essai étant les solutions d'échantillon à examiner et Référence la solution d'échantillon de référence.

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

Les résultats présentés dans les tableaux V.12 et V.13 montrent qu'en appliquant toutes les conditions expérimentales du plan de Plackett-Burman, la quantification du R-timolol a été effectuée pour tous les échantillons, y compris l'échantillon D qui contient du R-timolol à des teneurs proches de la limite de quantification (0,1%). Les teneurs rapportées fluctuent entre 0,54 – 0,72 %, 0,26 – 0,39 %, 0,18 – 0,32 % et 0,04 – 0,15 %, respectivement pour les échantillons A, B, C et D. Ces valeurs sont distribuées autour de la valeur moyenne obtenue dans les conditions nominales (0,67 %, 0,37 %, 0,33 % et 0,12 %, respectivement pour les échantillons A, B, C et D) et sont toujours inférieures à la teneur maximale de cette impureté chirale telle que spécifiée dans la monographie du maléate de timolol [209]. Cependant, nous avons constaté des écarts importants entre les teneurs du R-timolol, en particulier pour celles obtenues avec l'échantillon D. En considérant par exemple le rapport entre la teneur la plus élevée et celle la plus petite, nous trouvons une valeur importante (environ 3,8) pour cet échantillon. Pour les autres échantillons (A, B et C), ces mêmes rapports sont respectivement de 1,3, 1,5 et 1,7. Par conséquent nous nous sommes intéressés à évaluer la précision des résultats entre expériences et entre série et ce, pour chaque échantillon.

En considérant la précision entre expériences (Tableaux 12 et 13), nous pouvons clairement voir que les CV augmentent lorsque la teneur en R-timolol diminue, excepté avec les expériences 3, 6 et 8 où la variabilité n'évolue guère entre les échantillons A et C (expériences N° 3 et 8). D'autre part, nous avons trouvé illogique que les résultats de l'échantillon A obtenus avec l'expérience 6 puissent présenter un CV élevé comparé à l'échantillon B, alors que sa teneur moyenne est deux fois plus grande. De plus, c'est le seul CV pour l'échantillon A qui est en dehors des limites d'acceptation de 10 % [53]. En tenant compte de cette limite d'acceptation, seules trois expériences (N°2, 5 et 8) ont présenté des résultats acceptables avec l'échantillon B et quatre (N°2, 3, 5 et 8) avec l'échantillon C. Dans

l'échantillon D, quelles que soient les conditions expérimentales utilisées, les variabilités observées sont toujours très importantes avec des CV largement en dehors des limites d'acceptation de 10 % et donc inacceptables (CV de 36,15 % et de 28,22%, respectivement pour les expériences 1 et 4).

La précision de la quantification a aussi été évaluée en considérant la différence des séries (ou la différence de lot de HDMS- β -CD). En observant les CV obtenus (Tableaux 12 et 13), il apparaît clairement que l'utilisation de différents lots de HDMS- β -CD affecte la fidélité de la teneur du R-timolol. Dans la série 1, dont les expériences ont été conduites avec l'ancien lot de HDMS- β -CD, les teneurs en R-timolol sont plus constantes avec des valeurs de CV très similaires de l'ordre de 4,5 %. Ces valeurs sont toutes acceptables quelle que soit la teneur en R-timolol (CV < 10 %) [53]. En revanche, dans la série 2 où le nouveau lot de HDMS- β -CD a été utilisé, les teneurs en R-timolol sont beaucoup plus variables. Seules celles obtenues avec l'échantillon A présentent un CV compris dans les limites d'acceptation de 10 %. Il est donc clair que la robustesse de la méthode d'EC en milieu non aqueux est à nouveau affectée par la différence de lot de HDMS- β -CD.

Tableau V.12. – Teneurs (%) en R-timolol dans les échantillons A et B

Expériences N°	R-timolol dans l'échantillon A			R-timolol dans l'échantillon B		
	<i>Jour 1</i>	<i>Jour 2</i>	<i>CV par expériences</i>	<i>Jour 1</i>	<i>Jour 2</i>	<i>CV par expériences</i>
1	0,62	0,59	4,27 %	0,36	0,27	15,18 %
	0,66	0,62		0,34	0,27	
2	0,63	0,65	1,86 %	0,35	0,33	5,08 %
	0,64	0,63		0,37	0,36	
3	0,72	0,60	7,88 %	0,39	0,32	10,71 %
	0,71	0,65		0,39	0,33	
4	0,63	0,61	7,22 %	0,38	0,30	16,97 %
	0,65	0,55		0,38	0,26	
5	0,72	0,70	3,48 %	0,37	0,35	4,88 %
	0,70	0,66		0,39	0,37	
6	0,66	0,55	11,90 %	0,34	0,29	10,30 %
	0,68	0,54		0,36	0,30	
7	0,64	0,63	3,94 %	0,37	0,30	10,27 %
	0,67	0,61		0,38	0,34	
8	0,65	0,66	4,54 %	0,38	0,35	6,43 %
	0,69	0,62		0,37	0,33	
CV par jour (série)	4,86 %	7,15 %		4,10 %	10,25 %	
Moyenne (%)	0,64 (7,10 %)			0,34 (10,72 %)		

Tableau V.13. – *Teneurs (%) en R-timolol dans les échantillons C et D*

Expériences N°	R-timolol dans l'échantillon C			R-timolol dans l'échantillon D		
	<i>Jour 1</i>	<i>Jour 2</i>	<i>CV par expériences</i>	<i>Jour 1</i>	<i>Jour 2</i>	<i>CV par expériences</i>
1	0,27	0,27	18,93 %	0,11	0,10	36,15 %
	0,29	0,18		0,11	0,04	
2	0,29	0,26	6,33 %	0,11	0,10	10,91 %
	0,29	0,26		0,11	0,09	
3	0,32	0,27	8,51 %	0,11	0,11	13,22 %
	0,29	0,27		0,11	0,09	
4	0,26	0,23	17,50 %	0,10	0,10	28,22 %
	0,30	0,20		0,10	0,05	
5	0,28	0,29	5,29 %	0,12	0,12	13,96 %
	0,31	0,28		0,11	0,15	
6	0,28	0,22	16,09 %	0,12	0,10	18,19 %
	0,30	0,22		0,11	0,08	
7	0,29	0,22	16,73 %	0,11	0,11	11,94 %
	0,30	0,22		0,11	0,09	
8	0,29	0,28	5,03 %	0,11	0,14	15,87 %
	0,30	0,27		0,11	0,10	
CV par jour (série)	4,90 %	12,88 %		4,37 %	28,52 %	
Moyenne (%)	0,27 (12,51 %)			0,10 (20,01 %)		

V.3.3.7. EVALUATION DES EFFETS DES FACTEURS

Hormis l'évaluation statistique, les effets des facteurs peuvent aussi être interprétés graphiquement. La distribution des effets estimés peut aussi être utilisée pour décider lesquels

peuvent être considérés comme négligeables [64]. L'effet de chaque facteur sur la réponse considérée peut être calculé par la différence entre les valeurs moyennes des réponses obtenues aux deux niveaux du plan expérimental, (-1) et (+1) [60]. Une déviation par rapport à la ligne droite horizontale indique que la différence observée entre les deux moyennes est importante ; par conséquent, l'effet correspondant est considéré comme significatif. Dès lors, plusieurs graphes peuvent être dessinés pour une évaluation visuelle rapide. Dans notre cas, nous avons utilisé les profils de prédiction pour les réponses qualitatives tandis que les réponses quantitatives ont été évaluées au moyen de calculs statistiques (équations IV.7 et IV.8.)

V.3.3.8. CONCLUSIONS DES ANALYSES GRAPHIQUES

V.3.3.8.1. Réponses quantitatives

Le tableau V.14. indique que seul le facteur équipement présente un effet significatif sur la teneur en R-timolol observé sur tous les échantillons. Puisque différentes versions des logiciels d'exploitation ont été utilisées pour piloter ces équipements d'EC qui par ailleurs, proviennent du même fabricant, la signification des effets sur la réponse quantitative serait attribuée aux paramètres instrumentaux. Cependant, dans l'étude de robustesse que nous avons menée, notre attention a été plutôt focalisée sur les paramètres chimiques (concentrations en BGE et en BGE-CD) et physiques (température du capillaire, longueur d'onde, voltage et temps d'injection) qui, n'ont pas d'effet significatif sur la réponse quantitative. Ainsi, en considérant ces paramètres, la méthode d'EC en milieu non aqueux est robuste pour la détermination de la teneur en R-timolol.

Puisque nous avons constaté une influence de la différence de lot de HDMS- β -CD sur la teneur en R-timolol en terme de variabilité, nous nous sommes intéressé à l'évaluation statistique de l'effet de cette différence. Le tableau montre qu'excepté pour l'échantillon D, la teneur en R-timolol est significativement affectée dans tous les échantillons de maléate de S-timolol.

Tableau V.14. – *Effets des facteurs (*) étudiés*

Facteurs	Teneur en R-timolol dans les échantillons			
	A	B	C	D
A.- Type d'équipement CE	0,0002	0,0002	0,0005	0,0240
B.- Température du capillaire	0,2416	0,6660	1,0000	0,6335
C.- Longueur d'onde	0,1627	0,0392	0,7494	0,2216
D.- Voltage	0,5537	0,3460	0,6323	0,2216
E.- Temps d'injection	0,1627	0,6660	0,8730	0,5055
F.- HDMS- β -CD	0,4088	0,9311	0,6323	0,9239
G.- CamphoSO ₃ ⁻	0,0526	0,1101	0,3421	0,1140
Séries 1 - 2	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0793

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

V.3.3.8.2. Réponses qualitatives

Les graphes des effets ont été dessinés pour évaluer les effets des facteurs sélectionnés sur la résolution énantiomérique et la résolution entre la pyridoxine et le S-timolol (Figure V.16.).

Les effets les plus importants sur la résolution énantiomérique ont surtout été observés avec le voltage (effet négatif), la concentration en HDMS- β -CD (effet positif) et l'équipement (effet positif). Dans une moindre mesure, des effets négatifs ont été notés avec la température et la concentration en camphosulfonate. La longueur d'onde et le temps d'injection ne semblent quant à eux pas affecter cette résolution.

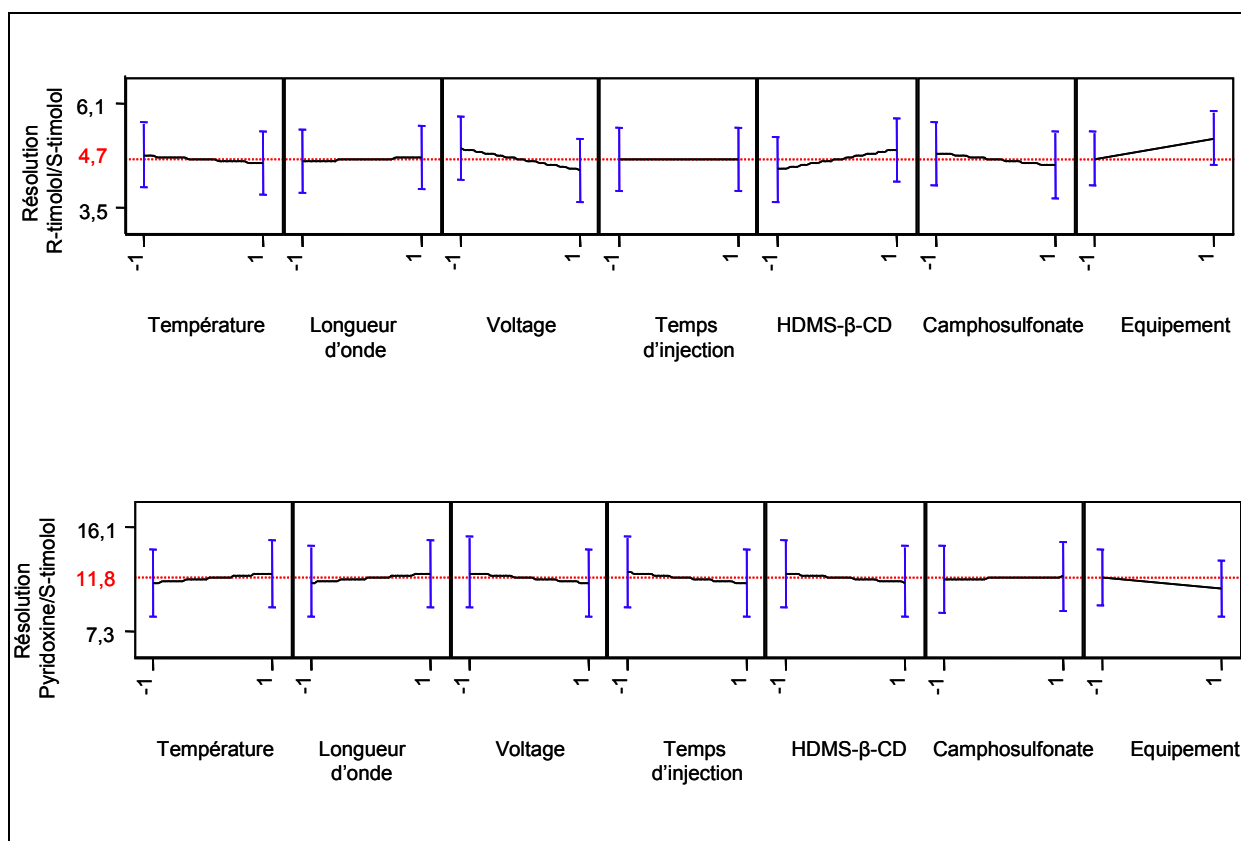


Figure V.16. – *Effets des différents facteurs sur les valeurs de résolution entre le R-timolol et le S-timolol et la pyridoxine et le S-timolol.*

Pour la résolution entre la pyridoxine et le S-timolol, la plupart des effets observés sont d'une moindre importance. Par ailleurs, à l'exception des effets positifs notés pour la température et la longueur d'onde, la plupart des effets sont négatifs. La concentration du camphosulfonate semble quant à elle ne pas affecter cette résolution.

En particulier, nous avons noté un effet opposé de la concentration en HDMS-β-CD sur les deux résolutions. Cet effet pourrait résulter de l'augmentation de la concentration en HDMS-β-CD qui induirait une amélioration de l'énantioséparation affectant dès lors négativement la résolution entre la pyridoxine et le S-timolol. L'effet opposé lié à l'équipement pourrait quant à lui être expliqué par la différence des versions du logiciel d'exploitation utilisé [263] non considérée dans cette étude.

V.2.4. CONCLUSION

Nous venons de réaliser une étude permettant d'évaluer la robustesse de la méthode d'EC en milieu non aqueux développée pour la détermination du R-timolol dans le maléate de S-timolol. Dans cette étude, des réponses qualitatives ainsi qu'une réponse quantitative ont été évaluées

En ce qui concerne les réponses qualitatives, notamment la résolution et le temps de migration, nous avons pu constater que la robustesse de la méthode dépend fortement du lot de HDMS- β -CD utilisé.

Nous avons également pu démontrer que l'utilisation d'un étalon interne induisait une nette amélioration des temps de migration et ce, quelles que soient les conditions expérimentales testées, démontrant ainsi l'adéquation de la pyridoxine comme étalon interne.

Malgré les effets des différents facteurs testés sur les réponses qualitatives, la résolution de la paire énantiomérique et de celle de la paire S-timolol/pyridoxine n'en restait pas moins suffisamment afin de toujours autoriser la quantification du R-timolol dans les quatre échantillons examinés.

Il est toutefois à noter que cette teneur était très variable selon les conditions expérimentales appliquées et surtout selon le lot de cyclodextrine utilisé. Ceci montre que la fiabilité de la quantification du R-timolol en utilisant la méthode d'EC en milieu non aqueux est une fois de plus significativement affectée par le lot de HDMS- β -CD utilisé.

La procédure analytique d'EC peut être considérée comme robuste puisqu'elle permet de quantifier le R-timolol en dépit des influences significatives des facteurs sélectionnés et pour autant qu'un seul lot de HDMS- β -CD soit utilisé. Dans ce contexte, une précaution doit être introduite dans la procédure analytique en vue d'attirer l'attention quant à la problématique liée à l'utilisation de différent lot de HDMS- β -CD.