

V.2. VALIDATION

V.2.1. INTRODUCTION

Ainsi que nous l'avons déjà signalé, la validation est une étape importante du cycle de vie d'une procédure analytique qui permet de démontrer la fiabilité des résultats. Pour valider la méthode d'électrophorèse capillaire (EC) en milieu non aqueux dont les conditions finales sont décrites dans le chapitre précédent, nous avons appliqué la stratégie basée sur le profil d'exactitude [50, 51]. Rappelons que l'objectif de la validation est de donner des garanties quant à l'aptitude de la procédure analytique à quantifier le plus exactement possible chacune des quantités inconnues que le laboratoire aura à quantifier à l'avenir.

L'objectif de cette partie de notre travail est donc d'effectuer une validation complète de la méthode d'EC en milieu non aqueux pour la détermination de l'impureté R-timolol dans le S-timolol et, sur la base des résultats obtenus, nous espérons être en mesure de fournir ses garanties.

V.2.2. PRÉPARATION DES SOLUTIONS

V.2.2.1. SOLUTIONS POUR LA VALIDATION DE LA MÉTHODE D'EC

V.2.2.1.1. Standards de calibration

Une solution mère de R-timolol a été préparée, en dissolvant dans un jaugé volumétrique de 10 mL une quantité exactement pesée d'approximativement 10,0 mg d'une substance chimique de référence de maléate de R-timolol. Ensuite, des dilutions successives ont été effectuées en vue d'obtenir plusieurs solutions filles dont les niveaux de concentration sont mentionnés dans le tableau V.2. et contenant chacune 5 µg/mL de pyridoxine utilisée comme étalon interne. Ces différentes solutions ont été utilisées comme standards de calibration (SC). Chaque solution a été injectée deux fois et la moyenne des mesures a été considérée comme un résultat. Le nombre des niveaux de concentration a été choisi afin de pouvoir générer différents modèles de régression [50, 260].

Tableau V.2. - Solutions relatives au R-timolol

Niveaux de concentration (% relatif à 2,0 mg/mL de maléate de S-timolol)	Concentration de R-timolol ($\mu\text{g/mL}$)	
	Standards de calibration	Standards de validation
0,10	2,0	2,0
0,25	-	5,0
0,60	12,0	12,0
1,20	24,0	24,0
Total	6 échantillons / jour	12 échantillons / jour

V.2.2.1.2. Standards de validation

Les solutions de validation ont été préparées à partir des solutions mères indépendantes de R-timolol de la même façon que pour les standards de validation. Des dilutions successives ont été effectuées en vue d'obtenir des solutions intermédiaires. Ensuite, des solutions filles dont les concentrations sont mentionnées dans le tableau V.2. ont été préparées dans des jaugés volumétriques de 10 mL contenant préalablement d'une part, environ 20 mg de maléate de S-timolol exactement pesés et d'autre part, la solution de pyridoxine pour obtenir une solution finale de 5 $\mu\text{g/mL}$. L'intervalle de dosage a été sélectionné de manière à couvrir la limite de quantification attendue (0,1 %) évaluée lors de l'étape d'optimisation et le niveau de concentration maximum toléré du R-timolol dans le maléate de S-timolol (1,0 %) [209]. Trois préparations indépendantes ($n = 3$) ont été effectuées par niveau de concentration ($m = 4$). L'ensemble de toutes ces préparations a été répété pendant trois jours ($p = 3$). Nous avons préparé les standards de validation (SV) en nous servant d'un des lots les plus purs d'échantillons de maléate de S-timolol (lot N° 8060)

comme matrice en vue de simuler au mieux l'analyse en routine [53]. Cet échantillon était disponible en quantité suffisante pour effectuer toutes les expériences.

V.2.2.2. SOLUTIONS UTILISÉES POUR LA DÉTERMINATION QUANTITATIVE

V.2.2.2.1. Solution de référence

Une solution mère 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 dans du méthanol. Cette solution a ensuite été diluée cent fois en vue d'obtenir une solution de référence à 1,0 % de R-timolol (20 µg/mL) contenant l'étalon interne (pyridoxine) à la concentration de 5 µg/mL.

V.2.2.2.2. Solution à examiner

Différentes solutions à examiner ont été préparées dans des ballons jaugés de 10,0 mL en dissolvant dans du méthanol une quantité exactement pesée d'environ 20,0 mg d'échantillon à analyser (maléate de S-timolol). Un bain à ultrasons a été utilisé pour permettre une complète dissolution des échantillons. Ces solutions contenaient l'étalon interne à la concentration de 5 µg/mL. Trois préparations indépendantes ont également été réalisées pour chaque échantillon à examiner.

V.2.3. RESULTATS ET DISCUSSION

V.2.3.1. BUTS DE LA VALIDATION

Comme nous l'avons précédemment mentionné, la validation a pour but de démontrer que la procédure analytique correspond à l'usage pour lequel elle est prévue [235]. Dans le cas présent, la méthode d'EC en milieu non aqueux a été développée pour la détermination de

l'impureté R-timolol dans le maléate de S-timolol. En guise de rappel, la nouvelle stratégie de validation que nous avons appliquée, utilisant les profils d'exactitude et prenant en compte l'erreur totale de mesure, peut être effectuée en six étapes importantes telles que mentionnées dans la partie sur la validation de la méthode de CLHP.

V.2.3.2. CRITÈRES DE VALIDATION

Nous avons considéré les critères de validation couramment utilisés dans les procédures analytiques de séparation et repris dans le document Q2A de la Conférence Internationale sur l'Harmonisation (ICH) [237]. Il s'agit de la sélectivité, de la justesse, de la fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire), de l'exactitude, de la linéarité, des limites de détection et de quantification.

V.2.3.3. VALIDATION DE LA MÉTHODE DE DOSAGE DU R-TIMOLOL

V.2.3.3.1. Sélectivité

Avant d'effectuer l'ensemble des expériences pour la validation de la méthode, nous nous sommes intéressés à vérifier l'absence de toute interférence au niveau des temps de migration des pics relatifs aux énantiomères du timolol ainsi qu'à celui de la pyridoxine. Pour cela, la sélectivité de la méthode a été examinée dans un premier temps en comparant des électrophérogrammes obtenus en analysant d'une part, une solution d'un blanc méthanolique (Figure V.4.) et d'autre part, une solution diluée d'un mélange de pyridoxine (10 µg/mL), de S-timolol (20 µg/mL) et de R-timolol (5 µg/mL) (Figure V.3.).

Dans un second temps, la sélectivité a été évaluée par rapport aux impuretés potentielles de dégradation ou de synthèse du timolol. Pour cela, l'électrophérogramme obtenu en analysant la solution diluée d'un mélange de pyridoxine (10 µg/mL), de S-timolol (20 µg/mL) et de R-timolol (5 µg/mL) (Figure V.3.) a été comparé à celui obtenu avec une solution méthanolique de S-timolol (2,0 mg/mL) contenant la pyridoxine (12,5 µg/mL) et le R-timolol (20 µg/mL), dopée avec des solutions de dimère de timolol (10,3 µg/mL) et d'isotimolol (21,8 µg/mL) (Figure V.5.).

Comme illustré dans les figures V.3. et V.4., aucun pic ni interférence n'a été observé aux temps de migration correspondant à ces trois composés. Ces principales impuretés sont suffisamment séparées des énantiomères du timolol de l'étalon interne. Dans les conditions de séparation électrophorétique utilisées, aucun pic correspondant à l'impureté de synthèse dimorpholinothiadiazole n'a été observé.

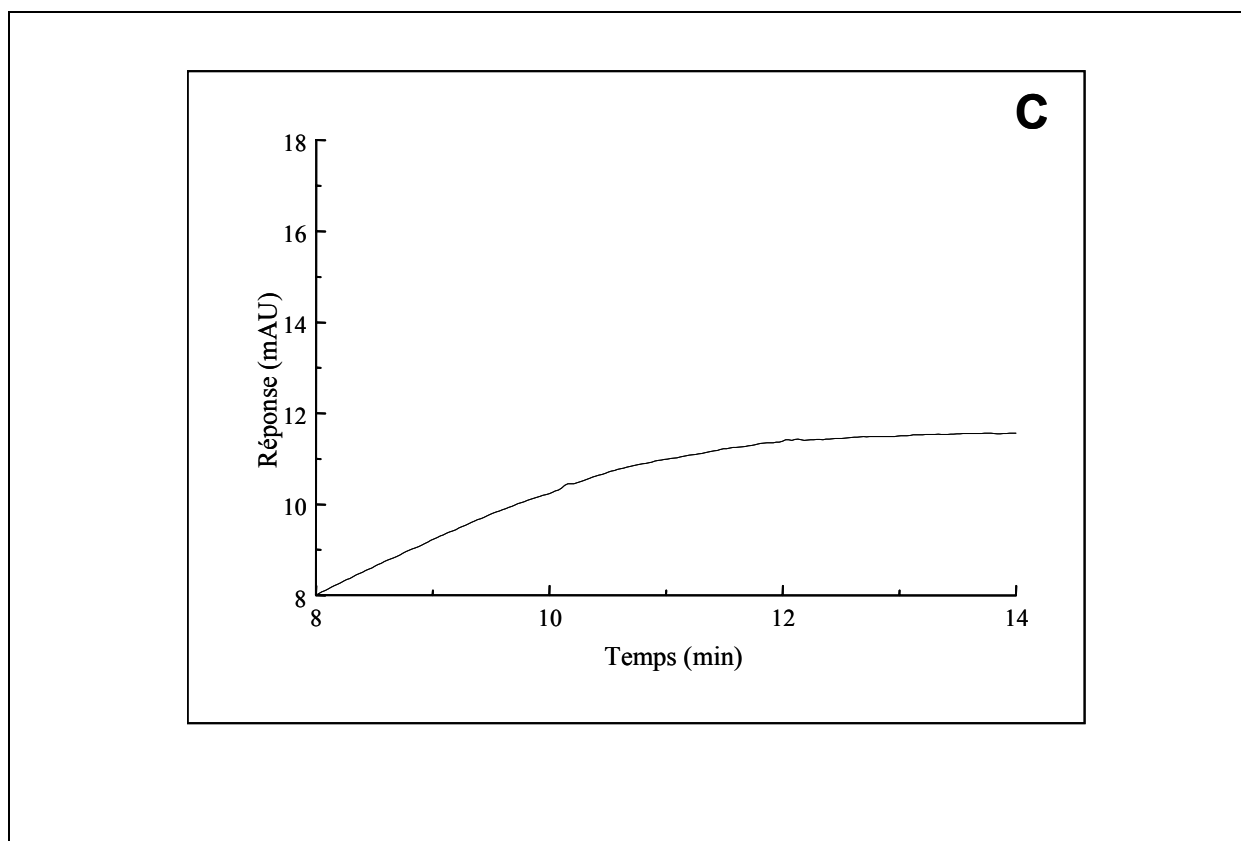


Figure V.4. – Electrophérogramme d'un blanc

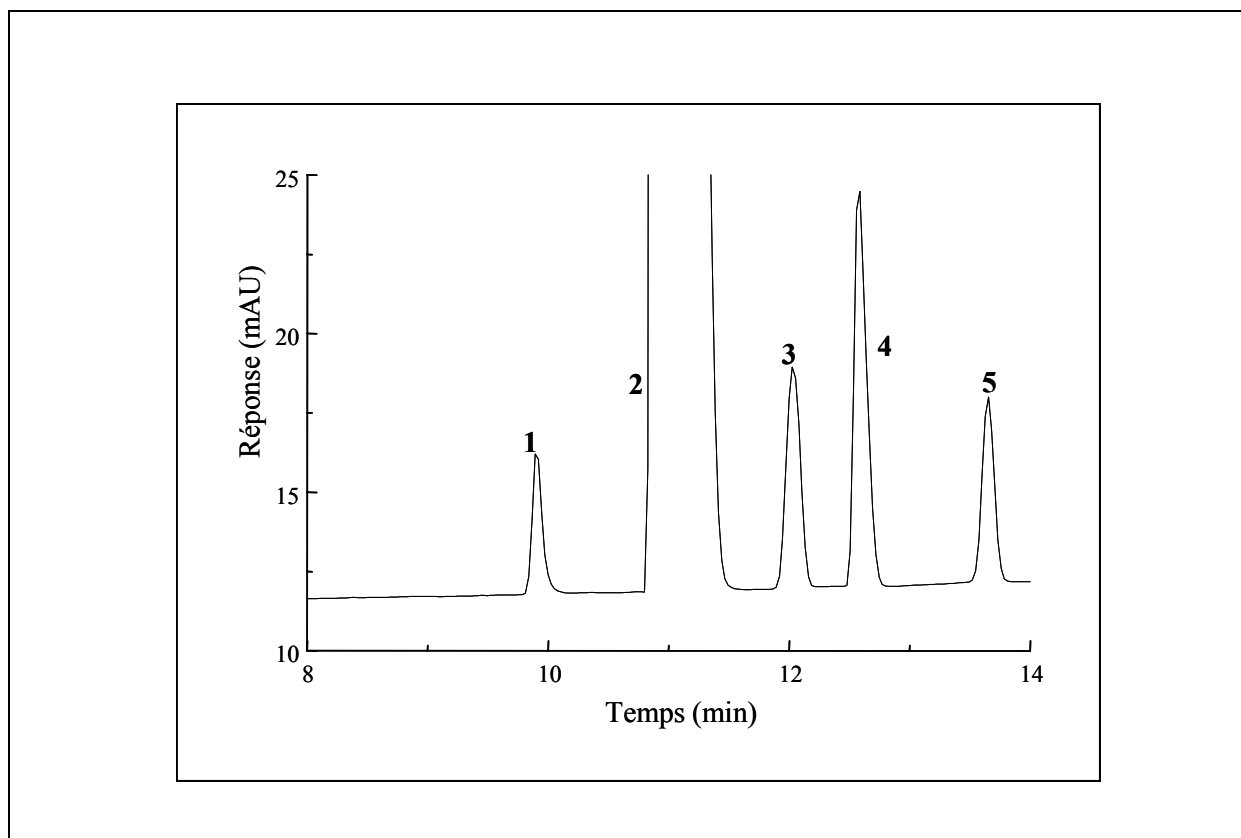


Figure V.5. – *Electrophérogramme d'une solution de maléate de S-timolol dopée avec le R-timolol, l'isotimolol, le dimère de timolol et contenant la pyridoxine*

Pics et concentrations: 1.- Pyridoxine (12,5 $\mu\text{g/mL}$), 2.- S-timolol (2 mg/mL), 3.- R-timolol (1,0 % correspondant à 20 $\mu\text{g/mL}$), 4.- Isotimolol (1,09 % correspondant à 21,8 $\mu\text{g/mL}$) et 5.- dimère de timolol (0,51 % correspondant à 10,3 $\mu\text{g/mL}$).

Enfin, la sélectivité a encore été évaluée en vérifiant l'absence d'interférences au temps de migration du R-timolol résultant éventuellement de la solution de maléate de S-timolol utilisée comme matrice. Nous avons observé un faible pic identifié comme étant le R-timolol, et dont le signal était inférieur à la limite de quantification cible (0,1%). Par conséquent, nous avons évalué son influence sur les résultats en utilisant un test *t* de Student en vue de comparer les pentes ainsi que les ordonnées à l'origine des droites de régression déterminées entre la concentration en R-timolol et la réponse analytique (rapport des aires normalisées entre les pics du R-timolol et de la pyridoxine) obtenues d'une part, en présence de la matrice et d'autre part, en absence de celle-ci [236]. Dans le cas qui nous concerne, uniquement une erreur systématique constante a été observée avec les échantillons analysés

en présence de la matrice. En effet, une différence significative a été observée entre les ordonnées à l'origine (différence = 0,0636, p -value < 0,0001) tandis qu'entre les pentes, il n'y avait aucune différence significative (différence = 0,0007, p -value = 0,11). Dans ces conditions, les concentrations de la matrice ont été corrigées (facteur de correction) [236] en utilisant une constante : « concentration corrigée (en $\mu\text{g/mL}$) = concentration originale (en $\mu\text{g/mL}$) + 0,943 ».

V.2.3.3.2. Analyse de la fonction de réponse et sélection du modèle de régression appropriée

Les objectifs poursuivis lors du développement des deux méthodes de CLHP et d'EC en milieu non aqueux étant les mêmes, nous avons considéré les limites d'acceptation de $\pm 10\%$, tout à fait acceptable pour les impuretés [53].

La fonction de réponse a tout d'abord été investiguée afin d'identifier la relation entre la réponse qui, dans le cas présent, est le rapport des aires normalisées entre les pics du R-timolol et de la pyridoxine, et la concentration en R-timolol ($\mu\text{g/mL}$). La fonction de réponse a été déterminée après avoir appliqué le facteur de correction mentionné ci-dessus. Cette analyse nous a permis de déterminer parmi les différents modèles testés celui qui décrivait le plus adéquatement la fonction de réponse.

A cette fin, les concentrations en retour des standards de validation ont été calculées au moyen des différentes droites de régression investiguées. Cette opération nous a permis de calculer pour chaque niveau de concentration, le biais moyen relatif, l'écart-type de la fidélité intermédiaire ainsi que les limites de tolérances supérieure et inférieure. Ensuite, à partir de ces données, différents profils d'exactitude ont été construits.

Comme cela est couramment indiqué dans les monographies des pharmacopées, le modèle de régression linéaire passant par zéro utilisant un seul niveau de calibration a été aussi investigué. En utilisant la concentration de 24 $\mu\text{g/mL}$ comme unique niveau de calibration (étalonnage externe), le profil d'exactitude obtenu avec un risque α de 5 % (Figure V.6.A.) était inclus dans les limites d'acceptation de 10 % à l'exception du plus faible niveau de concentration pour lequel la limite de tolérance supérieure dépassait très légèrement les limites d'acceptation.

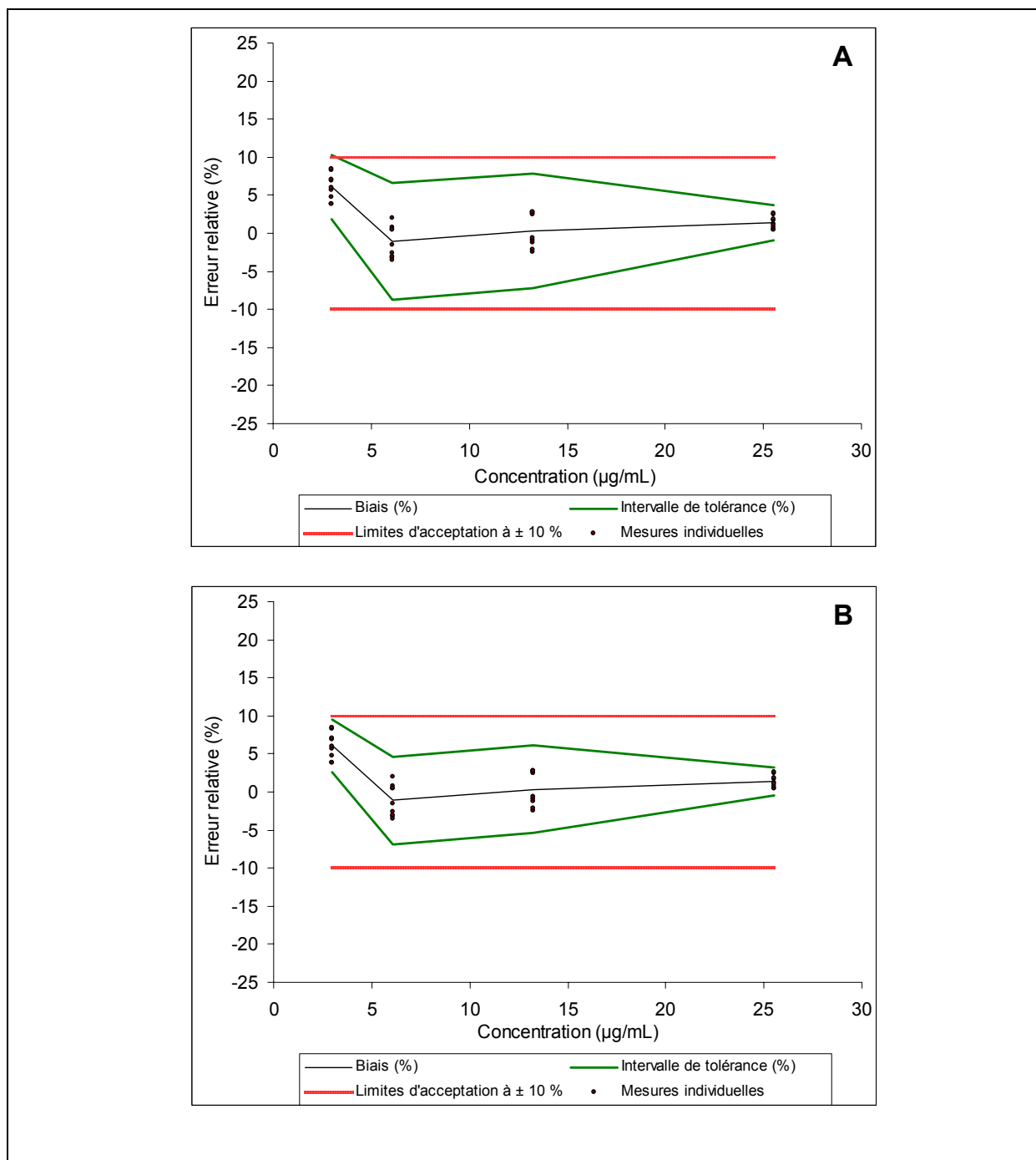
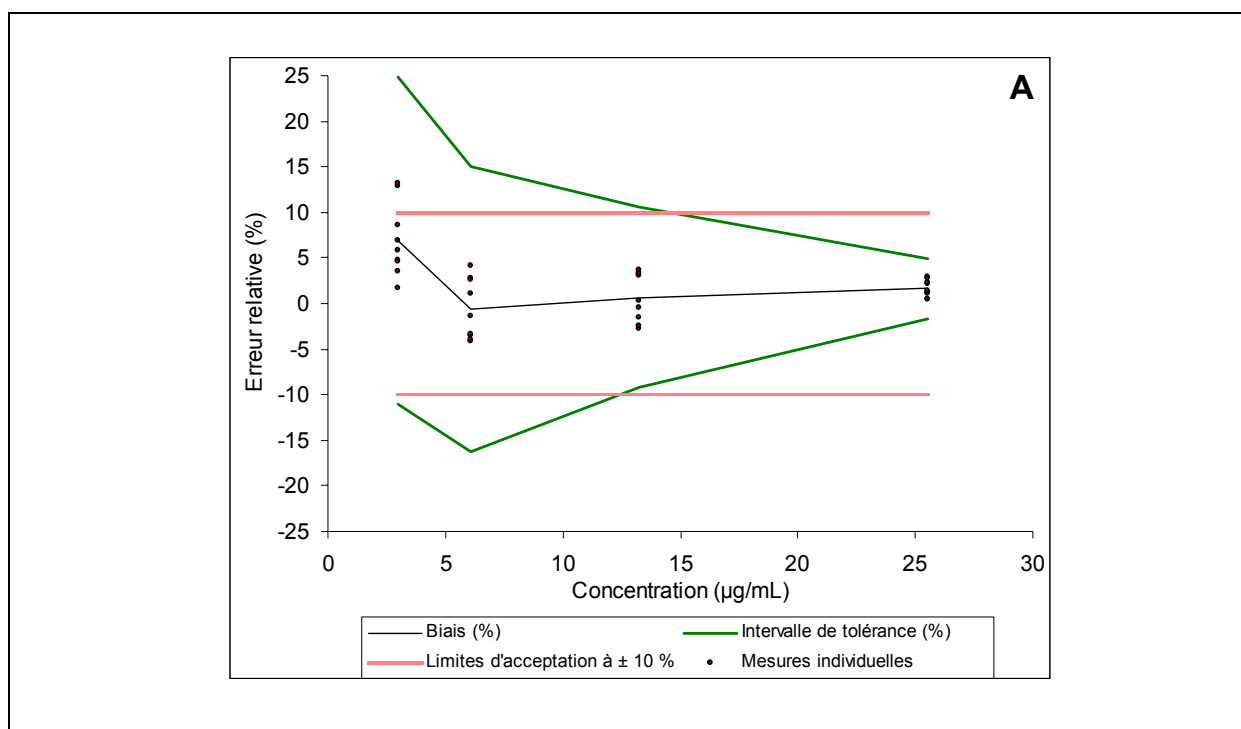


Figure V.6. – Profils d'exactitude obtenus en considérant le modèle de régression linéaire passant par 0 et ajusté avec 24,0 µg/mL en prenant un risque de 5 % (A) et un risque de 10 % (B).

Cependant, en prenant un risque de 10 %, cette limite de tolérance supérieure était comprise dans les limites d'acceptation (Figure V.6.B.). D'autre part, il peut être remarqué qu'aux niveaux des concentrations au dessus de la teneur maximum tolérée pour l'impureté

R-timolol ($\geq 20 \mu\text{g/mL}$) [209], les limites d'acceptation pouvaient même être réduites à 5 %. En conséquence, ce modèle de régression simple a été retenu pour évaluer les différents critères de validation. Dans ces conditions, nous pouvons dire en acceptant 10 chances sur 100 de nous tromper que la procédure de calibration externe avec le niveau de concentration le plus élevé convient pour quantifier l'impureté R-timolol dans le maléate de S-timolol en utilisant la méthode d'électrophorèse capillaire en milieu non aqueux.

D'autres modèles de régression ont aussi été testés. Les profils obtenus avec les modèles de régression linéaire simple en considérant respectivement des risques de 5 % (Figure V.7.A.) et de 10 % (Figure V.7.B.) ont été évalués ainsi que ceux utilisant un modèle de régression linéaire pondéré avec un facteur de pondération de $1/X$ (X étant la concentration) au mêmes niveaux de risques de 5 % (Figure V.8.A.) et de 10 % (Figure V.8.B.). Ces profils ne se sont pas révélés plus appropriés. En effet, leurs intervalles de tolérance respectifs ne sont pas compris dans les limites d'acceptation de $\pm 10 \%$.



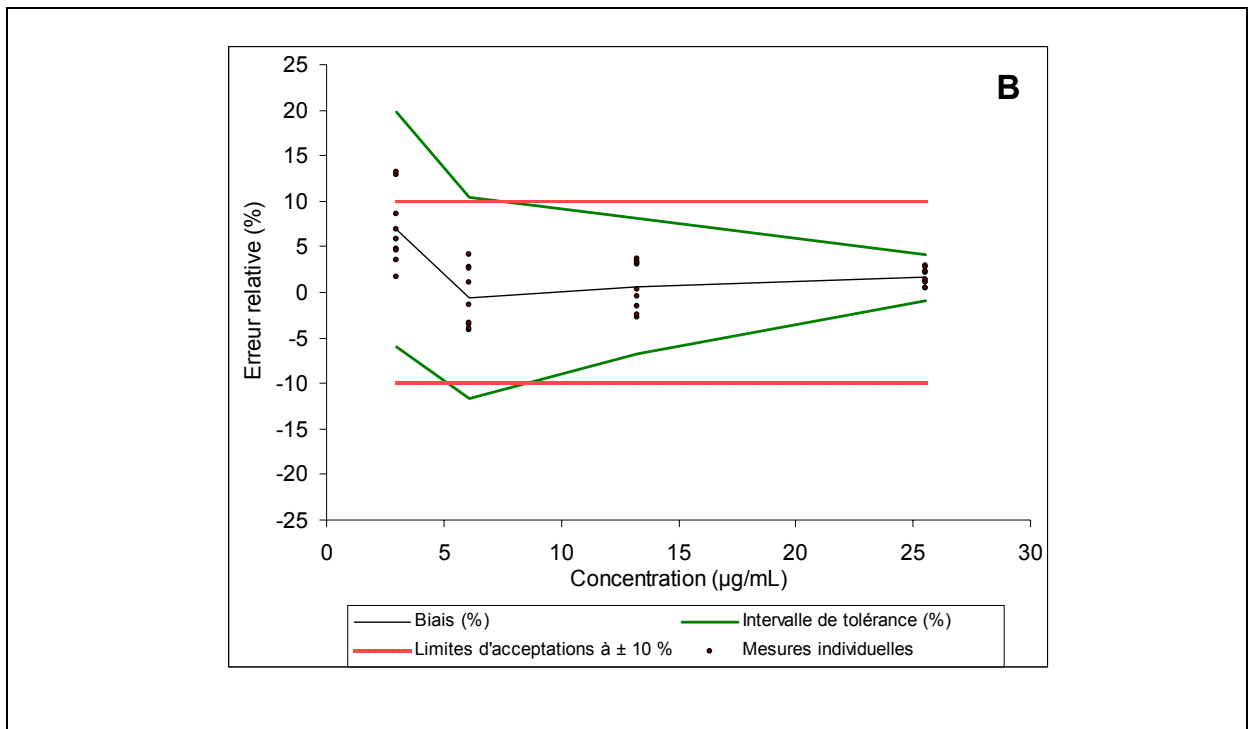
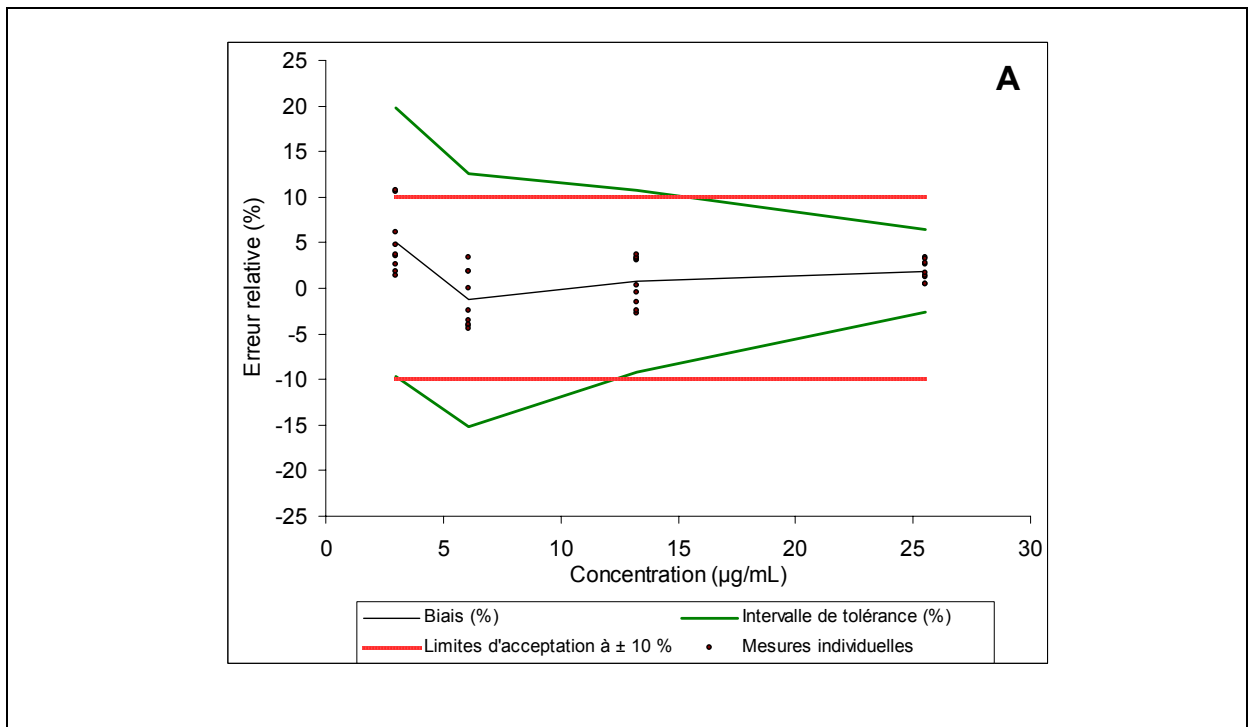


Figure V.7. – Profils d'exactitude obtenus en considérant le modèle de régression linéaire avec un risque de 5 % (A) et un risque de 10 % (B).



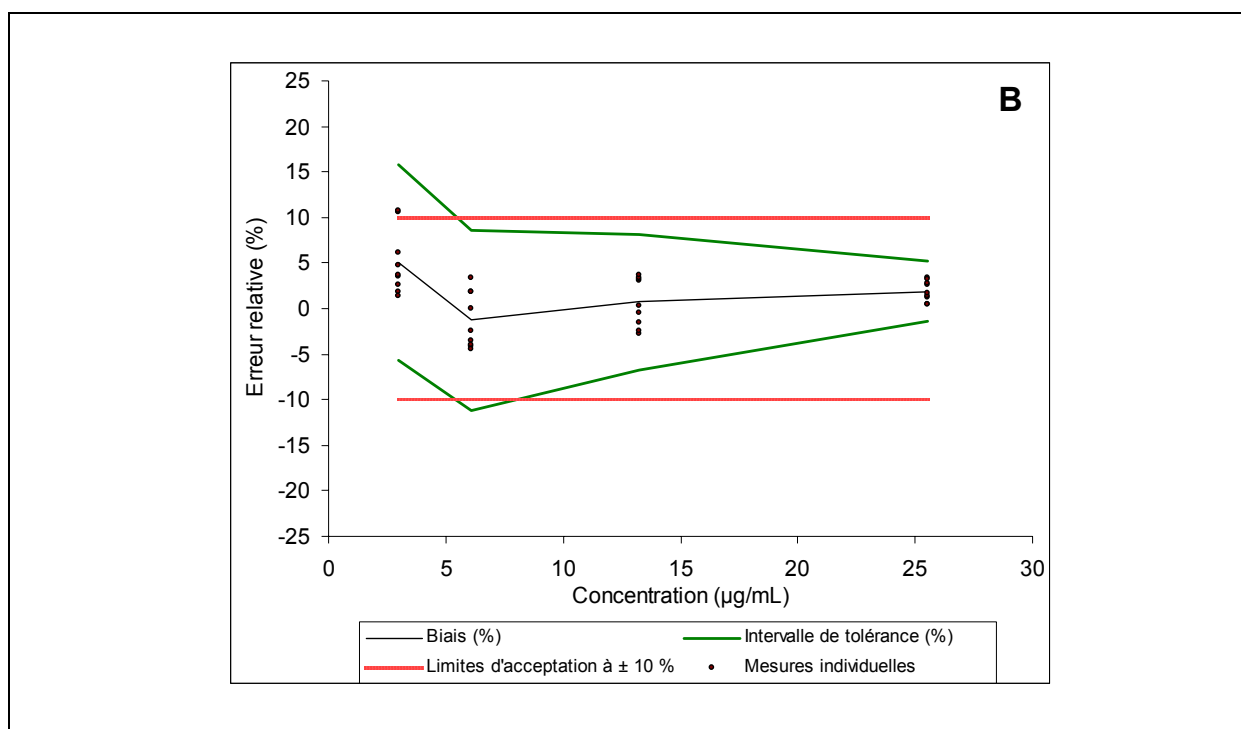


Figure V.8. – Profils d'exactitude obtenus en considérant le modèle de régression linéaire pondéré (facteur de pondération $1/X$, X étant la concentration) avec un risque de 5 % (A) et un risque de 10 % (B).

V.2.3.3.3. Justesse

Ainsi que nous l'avons déjà mentionné, la justesse fournit une indication sur les erreurs systématiques de la procédure analytique [123]. Elle s'exprime en termes de biais (en µg/mL) ou de biais relatif (%) et a été estimée au moyen des standards de validation dans la matrice à quatre niveaux de concentration (de 2,0 à 24 µg/mL).

Comme le montre le tableau V.3., les biais relatifs de la méthode ont été trouvés acceptables puisqu'ils sont relativement proches de zéro sauf au niveau de concentration le plus faible où un biais relatif de l'ordre de 6 % a été enregistré.

Tableau V.3. - Justesse de la méthode

<u>Niveaux de concentration</u> (n = 3, p = 3)	<u>Biais absolu : µg/mL</u> (biais relatif : %)	<u>Récupération</u>
2,0 µg/mL	0,182 (6,07 %)	106,1 %
5,0 µg/mL	-0,068 (-1,12 %)	98,88 %
12,0 µg/mL	0,049 (0,370 %)	100,4 %
24,0 µg/mL	0,350 (1,37 %)	101,4 %

V.2.3.3.4. Fidélité

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

Ainsi que le montre le tableau V.4., les coefficients de variation de répétabilité qui reflètent la fidélité intra-jour pour chaque niveau de concentration ne dépassent pas 1,8 %. Pour la fidélité intermédiaire, les coefficients de variation ne dépassent pas 2,4 %, ce qui démontre l'excellente fidélité de la méthode d'EC développée [53] et ce malgré l'utilisation de solvant non aqueux.

Tableau V.4. - Fidélité de la méthode

<u>Niveaux de concentration</u> (n = 3, p = 3)	<u>Répétabilité</u> (coefficients de variation %)	<u>Fidélité intermédiaire</u> (coefficients de variation %)
2,0 µg/mL	1,8	1,8
5,0 µg/mL	1,4	2,3
12,0 µg/mL	1,7	2,4
24,0 µg/mL	0,7	0,8

V.2.3.3.5. Exactitude

L'exactitude se réfère à l'étroitesse de l'accord entre le résultat obtenu et la valeur de référence ou la valeur acceptée comme conventionnellement vraie [123]. L'exactitude tient compte de l'erreur totale liée au résultat, c'est-à-dire des erreurs systématique et aléatoire.

L'exactitude de la méthode est représentée à partir du profil d'exactitude telle qu'illustrée par la figure V.6.B. Au vu des résultats présentés dans le tableau V.5., la méthode d'EC proposée est exacte étant donné qu'à chaque niveau de concentration, les différentes limites de tolérance du biais restent incluses dans les limites d'acceptation de $\pm 10\%$.

En considérant la teneur maximum tolérée de 1 % pour le R-timolol, teneur qui est la valeur cible pour décider de l'acceptation ou du rejet d'un lot d'échantillon de maléate de S-timolol selon le test de pureté énantiomérique [209], nous voyons qu'aux alentours de cette valeur cible, l'exactitude de la méthode d'EC en milieu non aqueux est particulièrement bonne.

Tableau V.5. - Exactitude de la méthode

<u>Niveaux de concentration</u> ($n = 3, p = 3$)	<u>Limites de tolérance</u> (en $\mu\text{g/mL}$)	<u>Limites de tolérance</u> (en %)
2,0 $\mu\text{g/mL}$	3,07 à 3,27	2,64 à 9,51
5,0 $\mu\text{g/mL}$	5,64 à 6,34	-6,89 à 4,65
12,0 $\mu\text{g/mL}$	12,5 à 14,1	-5,40 à 6,14
24,0 $\mu\text{g/mL}$	25,4 à 26,3	-0,45 à 3,20

V.2.3.3.6. Linéarité

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

Pour toutes les séries (jours) de validation, une droite de régression a été ajustée sur les concentrations calculées par rapport aux concentrations introduites en appliquant le modèle de

régression linéaire pour lequel le coefficient de détermination (r^2), la pente et l'ordonnée à l'origine sont présentés dans le tableau V.6.

Tableau V.6. - Linéarité de la méthode

$n = 3$ répétitions	<u>Intervalle de dosage</u>	2 µg/mL – 24 µg/mL
$m = 4$ niveaux de concentrations	<u>Pente</u>	1,012
$p = 3$ séries (jours)	<u>Ordonnée à l'origine</u>	-0,0141
$N = 36$ observations totales	<u>r^2</u>	0,9994

Comme nous l'avons déjà mentionné lors de l'examen de la linéarité de la méthode de CLHP, nous avons appliqué l'approche basée sur les limites de tolérance absolue pour évaluer la qualité de la linéarité de la méthode d'EC en milieu non aqueux et ce, en fonction de limites fixées *a priori*. Puisque les limites de tolérance en valeurs absolues telles qu'illustrées dans la figure V.9. sont comprises dans les limites d'acceptation de $\pm 10\%$, la linéarité de la méthode d'EC est ainsi démontrée.

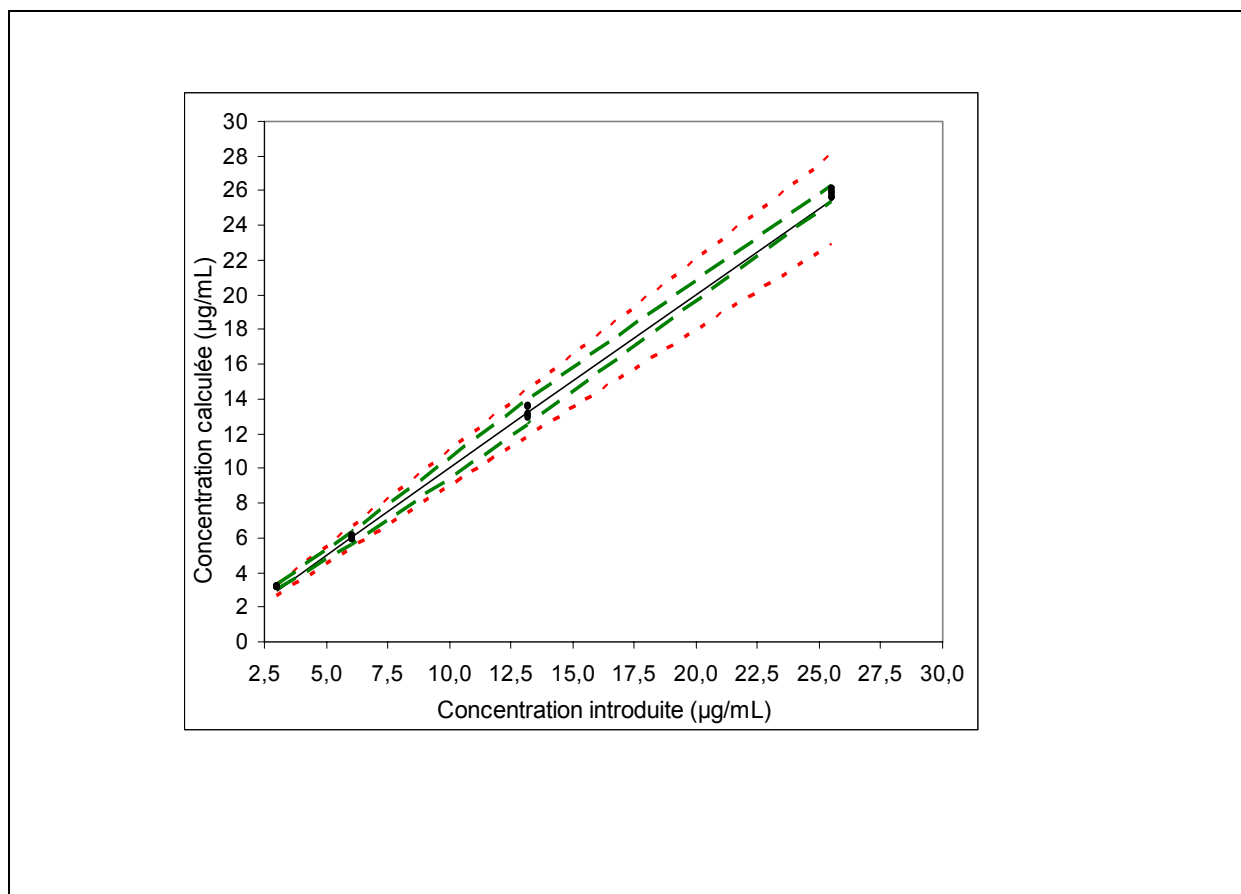


Figure V.9. – Graphe de la linéarité se rapportant à la méthode EC en milieu non aqueux pour la détermination du R-timolol

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

V.2.3.3.7. Limites de détection (LD) et de quantification (LQ)

En appliquant la méthode de calcul décrite dans la partie relative à la validation de la méthode de CLHP [46, 50], la LD de la méthode d'EC en milieu non aqueux a été estimée à 0,694 $\mu\text{g/mL}$ (soit 0,03 % exprimé par rapport à la concentration de 2,0 mg/mL).

En ce qui concerne la LQ [46, 50], étant donné que le profil d'exactitude obtenu en considérant le modèle de régression sélectionné est inclus dans les limites d'acceptation, le

niveau le plus bas de concentration (2,0 µg/mL ou 0,1 % exprimé par rapport à la concentration de 2,0 mg/mL) investigué correspond à la limite de quantification.

Enfin, nous avons encore vérifié si la LD estimée équivalait à celle calculée en suivant l'approche classique basée sur l'évaluation du rapport signal/bruit. Pour cela, nous avons effectué quelques expériences supplémentaires en analysant six solutions d'échantillon de maléate de S-timolol contenant du R-timolol à des concentrations proches de la LD. Un rapport signal/bruit autour de 3 a été obtenu pour ces concentrations avec une moyenne de 0,547 µg/mL (correspondant à 0,03 % avec un coefficient de variation de 36,3 %), ce qui démontre que la concentration de 0,694 µg/mL correspond à la LD [235] et qu'il existe une très bonne adéquation entre les valeurs de LD obtenues avec les deux approches.

V.2.3.4. PROFIL DE RISQUE

Tout comme pour la méthode de CLHP [242], nous avons investigué le profil de risque à chaque niveau de concentration utilisé en validation. Nous n'avons considéré que le modèle de régression passant par zéro et utilisant 24 µg/mL pour établir le profil de risque (Figure V.10.) puisqu'il était le seul qui répondait à l'objectif de la méthode d'EC.

La figure V.10. montre que le risque d'avoir des futures mesures en dehors des limites d'acceptation de 10 % est pratiquement nul au niveau de concentration le plus élevé. Même si une augmentation a été observée (2,7 % à 12 µg/mL, 4,2 % à 5 µg/mL et 8,9 % à 2 µg/mL), ce risque ne dépasse pas 9 %. Ceci signifie qu'en analysant les échantillons de S-timolol contenant du R-timolol à n'importe quelle concentration comprise dans l'intervalle de concentration sélectionné (0,1 % à 1,2 %) et en appliquant le modèle de régression sélectionné, au moins 91 fois sur 100, les futures mesures fournies par la méthode EC développée seront incluses dans les limites d'acceptation. Ce risque a été considéré comme acceptable eu égard aux objectifs de la méthode.

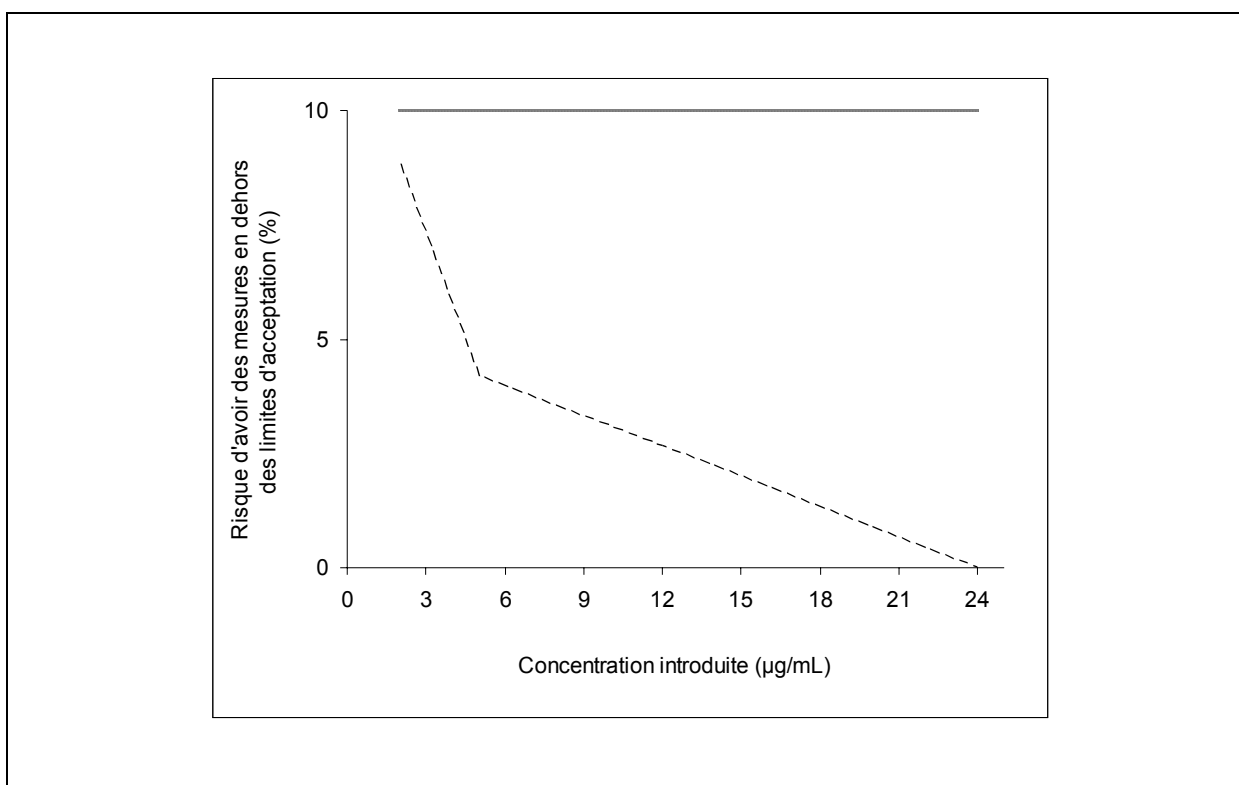


Figure V.10. – Graphique du profil de risque considérant le modèle de régression ajusté avec 24 µg/mL comme niveau de concentration (ligne discontinue), avec un niveau de risque fixé à priori à 10 %.

V.2.3.5. DÉTERMINATION DU R-TIMOLOL

V.2.3.5.1. Quantification dans des échantillons de maléate de timolol

Lorsque des échantillons réels des substances à analyser sont disponibles, il est toujours intéressant de confirmer l'adéquation de la méthode concernée en déterminant la teneur de ces substances dans ces échantillons. Puisque dans notre cas, c'était possible. Nous avons analysé différents lots d'échantillons de maléate de S-timolol provenant de plusieurs sources et contenant du maléate de R-timolol à différentes concentrations. La teneur de l'impureté chirale dans ces échantillons a été déterminée en considérant le modèle de régression sélectionné en phase de validation et les limites d'acceptation correspondantes. Les

réponses analytiques sont les rapports des aires normalisées des pics de R-timolol et de la pyridoxine obtenues, d'une part avec les différentes solutions d'échantillon et d'autre part, avec la solution de référence à 1,0 % de R-timolol. Chaque échantillon a été analysé en trois reprises. Les résultats présentés dans le tableau V.7. montre que la teneur en R-timolol dans tous les échantillons de maléate de S-timolol analysés n'excède pas 1,0 %, qui est la teneur maximum tolérée pour cette impureté [209]. Par ailleurs, à l'exception du lot N°11351, la variabilité était dans tous les cas inférieure à 10 %.

Tableau V.7. – Teneur (%) en R-timolol dans 7 échantillons de maléate de S-timolol (n = 3)

	Echantillons de maléate de S-timolol						
	Lot N° 11351	Lot N° 11486	Lot N° A5799	Lot N° 11483	Lot N° 11484	Lot N° A5800	Lot N° 107200204
Méthode EC	0,089	0,114	0,280	0,283	0,334	0,554	0,663
	0,099	0,104	0,244	0,293	0,358	0,479	0,676
	0,112	0,101	0,269	0,295	0,348	0,534	0,640
Moyenne (%)	0,10	0,11	0,26	0,29	0,35	0,52	0,66
CV (%)	11,4	6,3	6,8	2,3	3,4	7,4	2,8
Méthode CLHP	0,112	0,115	0,229	0,249	0,300	0,484	-
	0,106	0,117	0,232	0,252	0,308	0,482	-
	0,113	0,116	0,245	0,250	0,322	0,493	-
Moyenne (%)	0,11	0,11	0,24	0,25	0,31	0,49	-
CV (%)	2,1	4,7	3,7	0,6	3,4	1,2	-

Légende : - = non quantifié

V.2.3.5.2. Comparaison des résultats de l'EC avec ceux de la CLHP

Nous avons poursuivi notre démarche de vérification de la fiabilité de la méthode chirale d'EC validée en comparant les résultats précédents avec ceux obtenus au moyen de la méthode de CLHP (Tableau V.7). Il est important de rappeler que la méthode de CLHP a été validée et testée au niveau de la robustesse. De plus, cette méthode peut être considérée

comme standardisée car elle a été soumise à une procédure de normalisation à travers une étude collaborative. Pour cette comparaison, la méthodologie décrite par Bland et Altman [261] a été appliquée. Elle est basée sur l'évaluation des différences des moyennes des résultats obtenus à partir des deux méthodes à comparer. En considérant les limites d'agrément de 95 % (différence de moyenne $\pm 1,96$ écart type) [262], il est possible d'évaluer si les résultats issus de la méthode d'EC ne dévient pas des ceux obtenus avec la méthode de CLHP par une valeur supérieure aux limites d'agrément aussi appelée imprécision inhérente liée aux deux méthodes. Comme l'illustre le tableau V.7, les mêmes échantillons ont été analysés au moyen des deux méthodes. La figure V.11. montre quant à elle que les deux méthodes analytiques sont équivalentes puisque la différence observée entre les moyennes est comprise dans les limites. De plus, les résultats observés sont compris dans les limites d'acceptation de 10 % représentant les spécifications des méthodes analytiques pour le dosage des impuretés [53]. Un biais positif a toutefois été observé aux faibles concentrations en R-timolol. Celui-ci est néanmoins similaire à celui observé avec le profil d'exactitude obtenu en validation pour les deux méthodes.

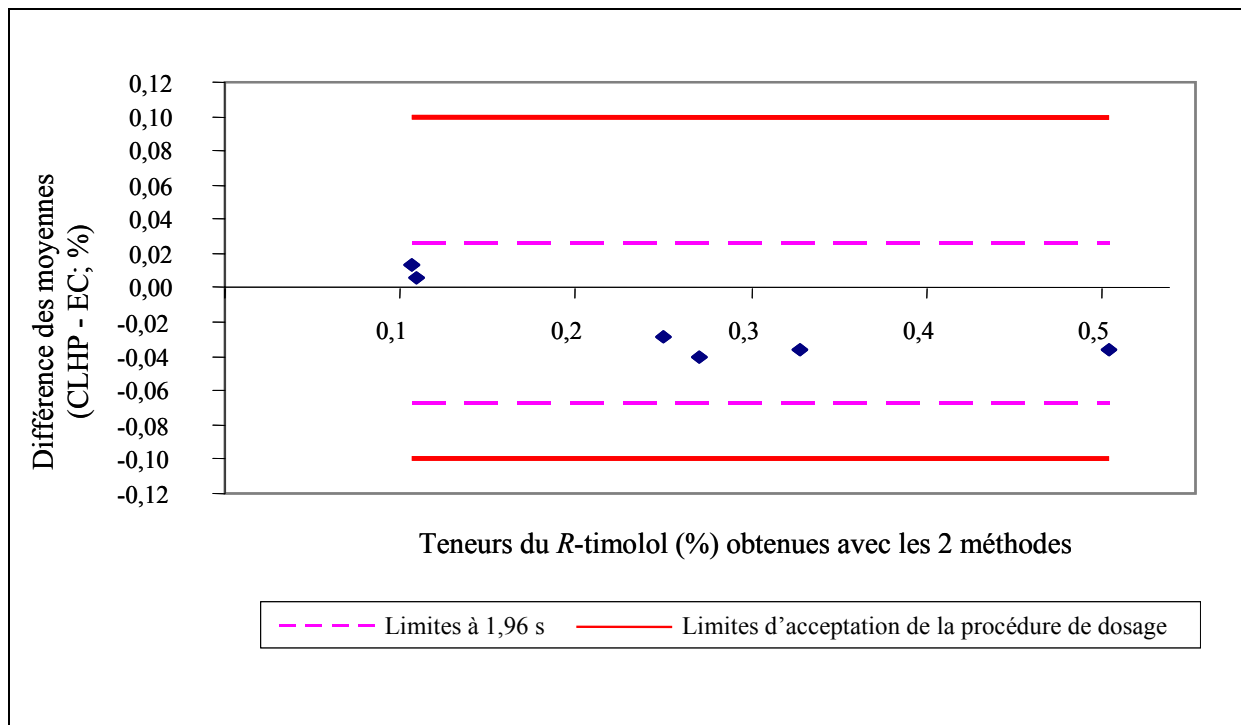


Figure V.11. – Différences des moyennes des teneurs en R-timolol (%) obtenues avec la méthode d'EC et la méthode de CLHP

V.2.4. CONCLUSION

Dans cette étude consacrée à la validation de la méthode d'EC en milieu non aqueux, la stratégie basée sur le profil d'exactitude a été appliquée avec succès afin de démontrer l'aptitude de la méthode à quantifier le R-timolol dans le maléate de S-timolol.

Le modèle de régression linéaire passant par zéro et utilisant un seul standard de calibration (24 µg/mL) s'est révélé adéquat au seuil de risque de 10 %.

Les différents critères de validation ont été évalués en appliquant ce modèle de régression et ont tous été trouvés tout à fait acceptables.

Le profil de risques a ensuite été investigué comme nouvel outil pour la gestion de risque en vue de confirmer la probabilité d'obtenir les futurs résultats en dehors des limites d'acceptation.

La méthode a aussi été appliquée avec succès à la détermination du R-timolol ainsi que les autres impuretés dans sept lots différents de maléate de S-timolol. Pour terminer, nous avons comparé les résultats obtenus avec la méthode d'EC en milieu non aqueux avec ceux obtenus avec la méthode de CLHP. A cette fin l'analyse statistique préconisée par Bland et Altman a été utilisée. Il a ainsi pu être démontré que la différence des moyennes des résultats obtenus avec les deux techniques est comprise dans les limites d'agrément à 95 %. Les deux méthodes peuvent donc être déclarées équivalentes pour la détermination du R-timolol dans le maléate de S-timolol et ce, dans l'intervalle de dosage validé.