

IV.4. ETUDE COLLABORATIVE

IV.4.1. INTRODUCTION

Généralement lorsqu'une nouvelle méthode est développée, il n'est pas très courant de réaliser une étude collaborative en vue d'évaluer ses capacités en rapport avec les objectifs assignés, à moins que la méthode proposée soit destinée à être introduite dans une monographie ou utilisée par différents laboratoires. De plus, en tant qu'aspect final du développement et de la validation d'une procédure analytique au sein du laboratoire « émetteur », les études collaboratives peuvent être considérées comme une étape importante qui précède une plus large utilisation de la méthode, ceci dans le but de confirmer son applicabilité et aussi d'évaluer les performances des laboratoires participants. A ce niveau du cycle de vie d'une procédure analytique, les laboratoires participants peuvent être considérés comme des « utilisateurs intermédiaires » dont les résultats seront d'une grande importance pour les prises de décision futures relatives à la méthode et surtout de rassurer les « utilisateurs finals ».

Les paramètres de performance, comme la résolution et le rapport signal/bruit, ainsi que les résultats quantitatifs, tels que la teneur des impuretés dans des échantillons à examiner, peuvent être évalués au sein d'un laboratoire ou entre plusieurs laboratoires au moyen d'une étude collaborative, ce qui permet par ailleurs de normaliser la méthode.

Dans cette partie de notre travail, nous nous sommes fixé comme objectif de mener à bien une étude collaborative en faisant appliquer la méthode de CLHP que nous avons développée et validée, et dont les conditions analytiques ont été jugées robustes. Pour cela, la ligne directrice ISO 5725-2 [52] qui traite des études inter-laboratoires nous servira de guide en vue d'évaluer la répétabilité et la reproductibilité des résultats quantitatifs. Un protocole d'étude élaboré à cet effet permettra l'application de la procédure de l'étude de manière uniformisée au sein de tous les laboratoires participants.

Dans un premier temps, les laboratoires participants devront démontrer leur aptitude à pouvoir mettre en œuvre la méthode qui sera appliquée lors de l'étude collaborative (en anglais « training »). Par la même occasion, ces laboratoires devront se familiariser au protocole d'étude élaboré à cet effet. Sur la base des résultats obtenus, les laboratoires pourront commencer l'étude proprement dite. Au cours de ce test d'aptitude tout comme lors de l'étude collaborative finale, les aspects qualitatifs, à savoir les résolutions entre les pics

consécutifs et entre les pics d'intérêt, seront étudiés. D'autre part, nous nous focaliserons davantage sur les aspects quantitatifs, notamment la teneur du R-timolol et des autres impuretés dans les échantillons de maléate de S-timolol dans le but d'évaluer la répétabilité et la reproductibilité des résultats, ce qui nous permettra d'évaluer leur incertitude dans un autre chapitre.

IV.4.2. MATERIELS ET METHODE

Compte tenu de la particularité de ce chapitre consacré à l'étude inter-laboratoires, il nous a paru plus logique de mentionner ici les points se rapportant aux matériels et à la méthodologie. En effet, la plupart des appareillages ainsi que les réactifs et solvants utilisés dans cette étude appartenaient aux laboratoires participants. D'autre part, une étude inter-laboratoires est généralement suivie d'une évaluation statistique de la qualité des résultats obtenus. Les principaux tests s'y rapportant seront décrits dans cette partie.

IV.4.2.1. APPAREILLAGE

Une étude collaborative implique plusieurs laboratoires, et à l'évidence, plusieurs appareillages comme le montre le tableau IV.16. Quatre types d'équipement de chromatographie liquide à haute performance (CLHP) ont été utilisés : ceux provenant d'Agilent (3 laboratoires), de Waters (3 laboratoires), de Merck-Hitachi (2 laboratoire).

Les détails concernant les autres parties des équipements sont également repris dans le tableau IV.16. Nous pouvons remarquer que le laboratoire N° 6 n'avait pas de chambre de thermostatisation de la colonne. Tous les injecteurs utilisés étaient automatiques.

Tableau IV.16 A. – Appareillages de CLHP utilisés lors de l'étude collaborative

Laboratoire	Marques et fabricants	Pompes	Injecteurs
1	Agilent 110	Agilent 110 Series	Agilent 110 Series
2	Alliance (Waters Corporation)	Alliance 2695 Waters	Alliance 2695 Waters
3	Agilent 110	Agilent 110 Series	Agilent 110 Series
4	Agilent 110	Manual Rheodyne	Agilent 110 Series
5	Merck-Hitachi	Merck-Hitachi L-7100	Merck-Hitachi L-7200
6	Waters	Waters 600 Controler	Waters 717
7	LaChrom (Merck-Hitachi)	LaChrom L-7100, (basse pression)	LaChrom L-7200
8	Alliance (Waters Corporation)	Alliance 2695 Waters	Alliance 2695 Waters

Tableau IV.16 B. – Appareillages de CLHP utilisés lors de l'étude collaborative

Laboratoires	Détecteurs	Thermostatisation de la colonne	Logiciels d'exploitation
1	DAD, Agilent 110 Series	Agilent 110 Series	HP ChemStation
2	Waters 2695 PDA	Waters 2695 Alliance column oven	Waters Millenium 4.0
3	DAD, Agilent 110 Series	Agilent 110 Series	HP ChemStation
4	UV Conventional Agilent 110 Series	Agilent 110 Series	HP ChemStation
5	Merck-Hitachi UV L-7400	Julabo EC – Julabo F10-C/3	D-7000 HSM Merck-Hitachi
6	Waters 486 Tunable Absorbance detector	Aucun	Millenium (Waters)
7	UV LaChrom L-7400	L-7360 Peltier Column oven	D-7000 Chromatography data Station Version 4.1
8	Waters 996, DAD	Bain marie Haak DC1	Waters Millenium 4.0

Concernant la colonne, le protocole élaboré pour l'étude mentionne que chaque laboratoire doit utiliser une colonne Chiralcel OD-H (250 mm de longueur et 4,6 mm de diamètre interne) remplie de la phase stationnaire chirale cellulose tris (3,5-diméthylphénylcarbamate) adsorbée sur les particules de silice (5 µm). Le tableau IV.17. indique que les laboratoires ont utilisé des colonnes Chiralcel provenant d'un même fabricant (Daicel) mais cependant, elles se différencient en termes de lot de fabrication et d'âge. Néanmoins, ces colonnes devaient satisfaire aux exigences des tests prescrits pour la conformité. A l'exception du laboratoire 2 qui avait une colonne ancienne, tous les laboratoires ont utilisé des nouvelles colonnes OD-H.

Afin de protéger les colonnes analytiques, il était recommandé d'utiliser des colonnes de garde (4 x 4 mm, i.d.) remplies de dihydroxypropylsilice (5µm). Seuls, deux laboratoires (2 et 6) en manquaient.

Tableau IV.17. – *Caractéristiques des colonnes chirales utilisées lors de l'étude collaborative*

Laboratoires	Identification de la colonne Chiralcel OD-H0CE (numéro de lot)	Age de la colonne *	Utilisation de la précolonne
1	CK 058	Nouvelle	Oui
2	IB 031	Ancienne	Non
3	BC 081	Nouvelle	Oui
4	CJ 072	Nouvelle	Oui
5	CJ 068	Nouvelle	Oui
6	CJ 120	Nouvelle	Non
7	CJ 011	Nouvelle	Oui
8	CK 055	Nouvelle	Oui

* Une colonne est dite ancienne si la R_s2-3 est inférieure à 1,0, alors que pour une nouvelle, cette résolution sera supérieure à 1,0 dans les conditions de CLHP décrites dans le texte.

IV.4.2.2. PRODUITS CHIMIQUES ET RÉACTIFS

Tous les échantillons utilisés étaient distribués aux laboratoires participants par nos soins. Ce sont des échantillons de maléate d'isotimolol, de maléate du dimère de timolol, du dimorpholinothiadiazole, et les substances chimiques de référence du maléate de R-timolol et du maléate de S-timolol.

Dans le cadre de cette étude, pour la quantification, trois échantillons homogènes de maléate de S-timolol maléate codés A, B et C (N° de lots respectivement A5800, A5799 et 11483) ont été examinés.

En ce qui concerne les solvants, aucune exigence particulière n'était imposée si ce n'est leur qualité. En effet, le n-hexane devait être de qualité pour CLHP, le 2-propanol et la diéthylamine de qualité pour analyse. D'une manière générale les différents laboratoires se sont approvisionnés auprès des fournisseurs suivants :

Fluka, Merck, Janssen Chimica, Acros, Sigma pour la diéthylamine,
Fischer Chemicals, Merck, BDH, Acros, Lab Scan, Carlo Elba, pour le 2-propanol et Biosolve LTD, Fischer Scientifique, Merck Lichrosolv, Acros, Hipersolv, Lab Scan, Carlo Elba pour le n-hexane.

Des filtres PTFE de type FH de 0,5 μm de diamètre des pores ont été utilisés pour la filtration des solutions.

IV.4.2.3. PRÉPARATION DES SOLUTIONS

Tous les échantillons sont dissous dans un mélange de solvants composé de 2-propanol contenant 1 % (v/v) de diéthylamine qui a également servi pour la dilution des solutions. En vue d'assurer une dissolution complète, les solutions des échantillons ont été placées pendant 15 min dans un bain à ultrasons.

IV.4.2.3.1. Solutions de référence

Cinq solutions de référence ont été définies et préparées comme suit :

- i)* une solution de référence contenant un mélange de R-timolol, de S-timolol, d'isotimolol, de dimère de timolol et de dimorpholinothiadiazole, chacun à la concentration de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a été préparée par dilution à partir des solutions mères correspondantes (1 mg/mL),
- ii)* une solution de référence (a) à 3,0 mg/mL, préparée par dissolution de 30 mg de maléate de R-timolol dans 10 mL de solvant de dissolution,
- iii)* une solution de référence (b) contenant du maléate de R-timolol à la concentration de 0,03 mg/mL correspondant à une solution à 1,0 %, préparée en diluant cent fois la solution à 3,0 mg/mL de maléate de R-timolol,
- iv)* une solution de référence (c) contenant du maléate de S-timolol à la concentration de 0,012 mg/mL correspondant à une solution à 0,4 %, préparée

en diluant 250 fois une solution à 3,0 mg/mL préparée par dissolution de 30 mg de maléate de S-timolol dans 10 mL de solvant de dissolution,

- v) une solution de référence (d) correspondant à 0,1 % et obtenue en diluant quatre fois la solution de référence (c).

La solution de référence (d) a été utilisée pour effectuer un premier test de performance du système (SST), notamment le test de sensibilité du détecteur. Ce test est réalisé en déterminant le rapport signal/bruit (S/N) calculé selon la formule de la Pharmacopée Européenne [209] en considérant la hauteur de pic comme décrit par la formule suivante :

$$signal / bruit = \frac{2H}{h} \quad (IV.9)$$

où H = est la hauteur du pic correspondant au S-timolol dans le chromatogramme obtenu en analysant la solution de référence (d) (solution à 0,1 %), mesurée entre le sommet du pic et la ligne de base extrapolée du signal observé sur une distance égale à 20 fois la largeur du pic à mi-hauteur, et

h = l'amplitude du bruit de fond dans un chromatogramme obtenu après injection d'un blanc (2-propanol contenant 0,1 % de diéthylamine), observée sur une distance égale à 20 fois la largeur à mi-hauteur du pic du chromatogramme obtenu avec la solution de référence à 0,1%, et si possible centrée sur l'emplacement où ce pic serait observé.

Si le rapport signal/bruit est au moins de 10, signifiant que la solution analysée présente un signal qui vaut dix fois le bruit de fond, alors la concentration correspondant à 0,1 % est considérée comme limite de quantification et par conséquent il est possible de quantifier toute substance dont la concentration en solution est au dessus de ce seuil. Dans le cas d'un rapport S/N inférieur à 10, le détecteur doit être vérifié et si nécessaire remplacé.

La solution du mélange des cinq produits a été utilisée dans un deuxième test de performance du système de CLHP, en vue d'une part, d'identifier les différents pics dans le chromatogramme, et d'autre part d'évaluer l'efficacité de la colonne analytique basée sur l'énantiorésolution. En appliquant les conditions de CLHP prescrites dans le protocole, cette résolution ne doit pas être inférieure à 4,0. Aussi, les valeurs de résolution entre les pics consécutifs devaient être rapportées. Si le test n'est pas concluant, par exemple si l'énantiorésolution est inférieure à 4,0, le protocole prescrit d'adapter la phase mobile en diminuant la fraction de 2-propanol. En phase d'optimisation, nous avons constaté qu'une

diminution de la fraction de ce modificateur organique dans la phase mobile augmente la résolution entre les énantiomères du timolol, mais diminue celle entre le S-timolol et le dimorpholinothiadiazole.

Un troisième test de performance est la répétabilité du système de CLHP évaluée avec les résultats obtenus en injectant six fois la solution référence (a). Le coefficient de variation de l'aire du pic correspondant au S-timolol doit être inférieur à 0,85 % [209], sinon, les conditions d'intégration et/ou l'équipement doivent être contrôlés et adaptés.

IV.4.2.3.2. Solutions utilisées pour la détermination quantitative

Trois solutions à examiner (A, B et C) ont été définies et contiennent du maléate de S-timolol, chacune à la concentration de 3,0 mg/mL. Ces solutions ont été préparées par dissolution dans 10 mL de solvant de dissolution une quantité exactement pesée approximative de 30 mg d'échantillon à analyser. L'échantillon C a été obtenu par la dégradation du lot N°11483 à la chaleur sèche à 190°C pendant 120 min [130, 135, 224]. Nous avons provoqué cette dégradation dans l'espoir d'obtenir des impuretés du timolol autres que le R-timolol. Les échantillons à analyser ont été fournis aux participants sous formes de poudre homogène.

IV.4.2.4. PROTOCOLE D'EXÉCUTION DE L'ÉTUDE

L'étude collaborative comprend huit laboratoires appartenant à des institutions gouvernementales et universitaires et à des compagnies pharmaceutiques, toutes localisées en Europe. Ce nombre est en accord avec le nombre minimum de laboratoire exigé par le guide ISO 5725-2 ($n = 8$) que nous avons suivi pour réaliser cette étude.

Le protocole d'exécution de l'étude illustré dans la figure IV.17 indique que pour chaque laboratoire, trois échantillons de maléate de S-timolol sont analysés deux fois chacun, c'est-à-dire que deux solutions indépendantes de chaque échantillon sont préparées et analysées ($g = 2$ répétitions) dans les conditions de répétabilité. Chaque laboratoire doit répéter l'ensemble des analyses pendant deux jours (ou séries) ($c = 2$).

Les teneurs du R-timolol et des autres impuretés du timolol sont déterminées dans les trois échantillons de maléate de S-timolol en se référant aux solutions de référence

correspondantes. Il est important de noter que dans la plupart des études inter-laboratoires [79, 245], seuls les niveaux bas et élevés sont concernés. Le protocole que nous proposons est plus élaboré car il permet d'évaluer la fidélité intermédiaire pour chaque laboratoire.

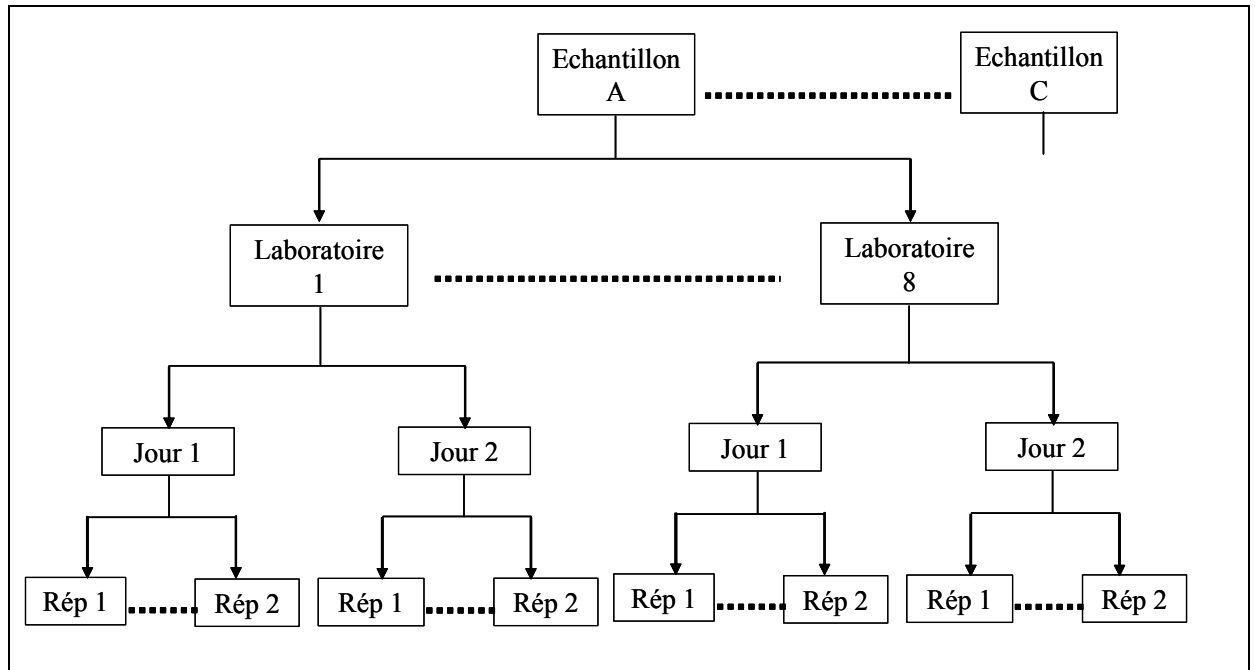


Figure IV.17. – Protocole d'exécution de l'étude collaborative pour chaque échantillon analysé ($r = 8$ laboratoires, $c = 2$ séries (jours) et $g = 2$ répétitions).

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

IV.4.2.5. ANALYSE STATISTIQUE DES RÉSULTATS QUANTITATIFS

Avant leur utilisation, les résultats quantitatifs sont examinés statistiquement en vue d'évaluer la présence de valeurs aberrantes ou des valeurs suspectes. Deux approches sont définies par les lignes directrices ISO 5725-2 [52] à savoir les évaluations graphiques et les tests numériques. Du point de vue graphique, la variabilité intra-laboratoire est évaluée au moyen du test statistique k de Mandel [52] et la variabilité inter-laboratoires au moyen du test statistique h de Mandel [52].

La valeur du test k de Mandel est calculée comme suit :

$$k_{ij} = \frac{s_{ij} \sqrt{p_j}}{\sqrt{\sum s_{ij}^2}} \quad (\text{IV.10})$$

avec p le nombre total de laboratoires ($i = 1$ à p), j les substances analysées et s_{ij} l'écart-type de n résultats pour une substance j analysée par un laboratoire i . Les valeurs calculées de k sont utilisées pour construire un graphique permettant une évaluation visuelle de la variation intra-laboratoire. Le test de Cochran [52] est utilisé pour évaluer l'homogénéité de la variance de tous les laboratoires. Le test statistique C est calculé en utilisant la formule suivante :

$$C = \frac{s_{\max}^2}{\sum_{i=1}^p s_i^2} \quad (\text{IV.11})$$

avec s_{\max}^2 la variance la plus élevée d'un jeu de variances, s_i^2 , ($p = 8$), toutes calculées à partir du même nombre de résultats des répétitions ($n = 2$). Un laboratoire est considéré comme aberrant lorsque la valeur du test C de Cochran obtenue est plus grande que le seuil critique à 1 %. Lorsque cette valeur est plus petite que le seuil critique à 1% mais supérieure au seuil critique à 5%, le laboratoire est suspecté d'être aberrant.

La valeur du test h de Mandel est calculée comme suit :

$$h_{ij} = \frac{\bar{y}_{ij} - \bar{\bar{y}}_j}{\sqrt{\frac{1}{p_{j-1}} \sum_{i=1}^{p_j} (\bar{y}_{ij} - \bar{\bar{y}}_j)^2}} \quad (\text{IV.12})$$

avec p le nombre total de laboratoires ($i = 1$ à p), j les substances à analyser, \bar{y}_{ij} la moyenne du laboratoire i pour la substance j , et $\bar{\bar{y}}_j$ la moyenne générale de tous les laboratoires pour la substance j . Différents tests de Grubb [52, 246] sont définis pour l'évaluation numérique à savoir le G_l pour la plus petite valeur suspectée aberrante (équation IV.13), le G_p pour la plus grande valeur suspectée aberrante (équation IV.14), le $G_{p,p-1}$ pour les deux grandes valeurs suspectées aberrantes (équation IV.15) et le $G_{l,2}$ pour les deux plus petites valeurs suspectées aberrantes (équation IV.16). Un autre test décrit par Kelly [247] est utilisé pour déceler une

paire de valeur polaire suspectée aberrante c'est-à-dire la plus petite valeur et la plus grande valeur (équation IV.17). Les différentes équations s'y rapportant sont détaillées ci-après :

$$G_1 = \frac{\bar{x} - x_1}{s} \quad (\text{IV.13})$$

$$G_p = \frac{x_p - \bar{x}}{s} \quad (\text{IV.14})$$

avec x_1 et x_p respectivement la plus petite et la plus grande valeur moyenne du laboratoire, \bar{x} et s respectivement la moyenne générale et l'écart-type considérant tous les laboratoires.

$$G_{p-1,p} = \frac{SS_{p-1,p}}{SS} \quad (\text{IV.15})$$

où $SS = \sum_{i=1}^p (x_i - \bar{x})^2$ et $SS_{p-1,p} = \sum_{i=1}^p (x_i - \bar{x}_{p-1,p})^2$, avec $\bar{x}_{p-1,p} = \frac{1}{p-2} \sum_{i=1}^{p-2} x_i$, x_i le résultat du laboratoire i , et $\bar{x}_{p-1,p}$ la moyenne de tous les laboratoires excepté les deux plus grandes.

$$G_{1,2} = \frac{SS_{1,2}}{SS} \quad (\text{IV.16})$$

où $SS_{1,2} = \sum_{i=3}^p (x_i - \bar{x}_{1,2})^2$, $\bar{x}_{1,2} = \frac{1}{p-2} \sum_{i=3}^p x_i$ et $\bar{x}_{1,2}$ la moyenne de tous les laboratoires excepté les deux plus petites.

$$G_{1,n} = 100 \left(1 - \frac{s_{1,n}}{s_0} \right) \quad (\text{IV.17})$$

où $s_{1,n}$ est l'écart-type des résultats sans la valeur la plus élevée ni la valeur la plus petite, et s_0 l'écart-type de tous les résultats.

Le test pour une observation suspectée d'être aberrante est significatif si le $G_{calculé}$ est plus grand que la valeur correspondant au seuil critique. Dans le cas de deux observations extrêmes suspectées d'être aberrantes, le test est significatif si le $G_{calculé}$ est plus petit que la valeur correspondant au seuil critique

IV.4.3. RESULTATS ET DISCUSSION

IV.4.3.1. TEST D'APTITUDE (TRAINING)

Avant d'entamer l'étude inter-laboratoires proprement dite, il était indispensable de s'assurer de la mise en œuvre de la méthode et du protocole de l'étude par les laboratoires participants et ce, au moyen d'un test d'aptitude. Pour cela, différents tests de performance du système de CLHP ont été prévus. Ils sont basés, d'une part sur la détermination des réponses qualitatives à savoir la résolution entre les paires de pics critique et énantiomérique, la détectabilité, la répétabilité du système d'injection, et d'autre part sur la détermination quantitative. Pour cette dernière, il s'agissait de quantifier le R-timolol dans un seul échantillon de maléate de S-timolol (lot N°A5799). Un autre objectif de ce test d'aptitude était d'évaluer l'âge des colonnes chirales et de les classer selon ce critère.

Les résultats initiaux de ce test d'aptitude rapporté par deux laboratoires ont révélé la difficulté quant à la satisfaction aux exigences concernant la résolution de la paire énantiomérique (Rs 2-4). En effet, les laboratoires 4 et 5 avaient obtenu des valeurs respectives de 3,5 et 3,9 pour cette résolution, la valeur attendue étant d'au moins 4,0. Sur la base de ces résultats initiaux, nous avons revu la procédure analytique en modifiant la composition de la phase mobile comme suit : n-hexane, 2-propanol et diéthylamine (970/30/1, v/v/v). Dans le même ordre d'idée, nous avons constaté qu'en réduisant de moitié le volume d'injection, cette résolution était davantage améliorée. Par conséquent, nous avons décidé de diminuer le volume d'injection à 5 μ L, ce qui par ailleurs, a nécessité de doubler la concentration des solutions à examiner à 3,0 mg/mL en vue de maintenir l'équivalence de la quantité introduite au sein de la colonne.

Finalement, le test d'aptitude a été effectué avec ces nouvelles modifications introduites dans le protocole. Les résultats qualitatifs ont été trouvés très satisfaisants pour tous

les laboratoires à l'exception du laboratoire 7 qui, malgré tout, a procédé à une nouvelle modification de la composition de la phase mobile (975/25/1, v/v/v) en vue de satisfaire aux exigences pour la résolution de la paire énantiomérique. D'autre part, pour le laboratoire 2, la résolution de la paire critique (Rs2-3) était inférieure à 1,0, confirmant ainsi l'ancienneté de la colonne Chiralcel OD-H utilisée. Les valeurs des rapports signal/bruit étaient toutes supérieures à 10. En ce qui concerne la répétabilité évalué sur six injections, les laboratoires 4 et 5 ont présenté des valeurs limites, respectivement de 0,87 % et de 0,94 %. Enfin, quant aux résultats quantitatifs, tous les laboratoires ont présenté des teneurs en R-timolol comprises entre 0,26 % et 0,33 % avec une moyenne de 0,28 %, ce qui est tout à fait proche des résultats obtenus (0,24 %) lors de la quantifications de cet échantillon décrit au point IV.2.3.5.

Au vu des résultats du training, nous avons estimé que l'étude inter-laboratoires pouvait commencer. Toutefois, compte tenu des problèmes rapportés, il a été demandé aux laboratoires 2, 4, 5 et 7 d'examiner attentivement leur système de CLHP lors de l'étude inter-laboratoires.

IV.4.3.2. ETUDE INTER-LABORATOIRES

IV.4.3.2.1. Vérification du système de CLHP et réponses chromatographiques

Avant de procéder aux analyses, comme lors du test d'aptitude tous les laboratoires devaient conditionner leur système de CLHP avec la phase mobile pendant trois heures minimum. L'adéquation du système de CLHP est vérifiée en analysant la solution de référence du mélange des cinq composés (solution *i*). Si les exigences prescrites sont rencontrées, les autres solutions peuvent être injectées en suivant l'ordre d'analyse présenté dans la figure IV.18.

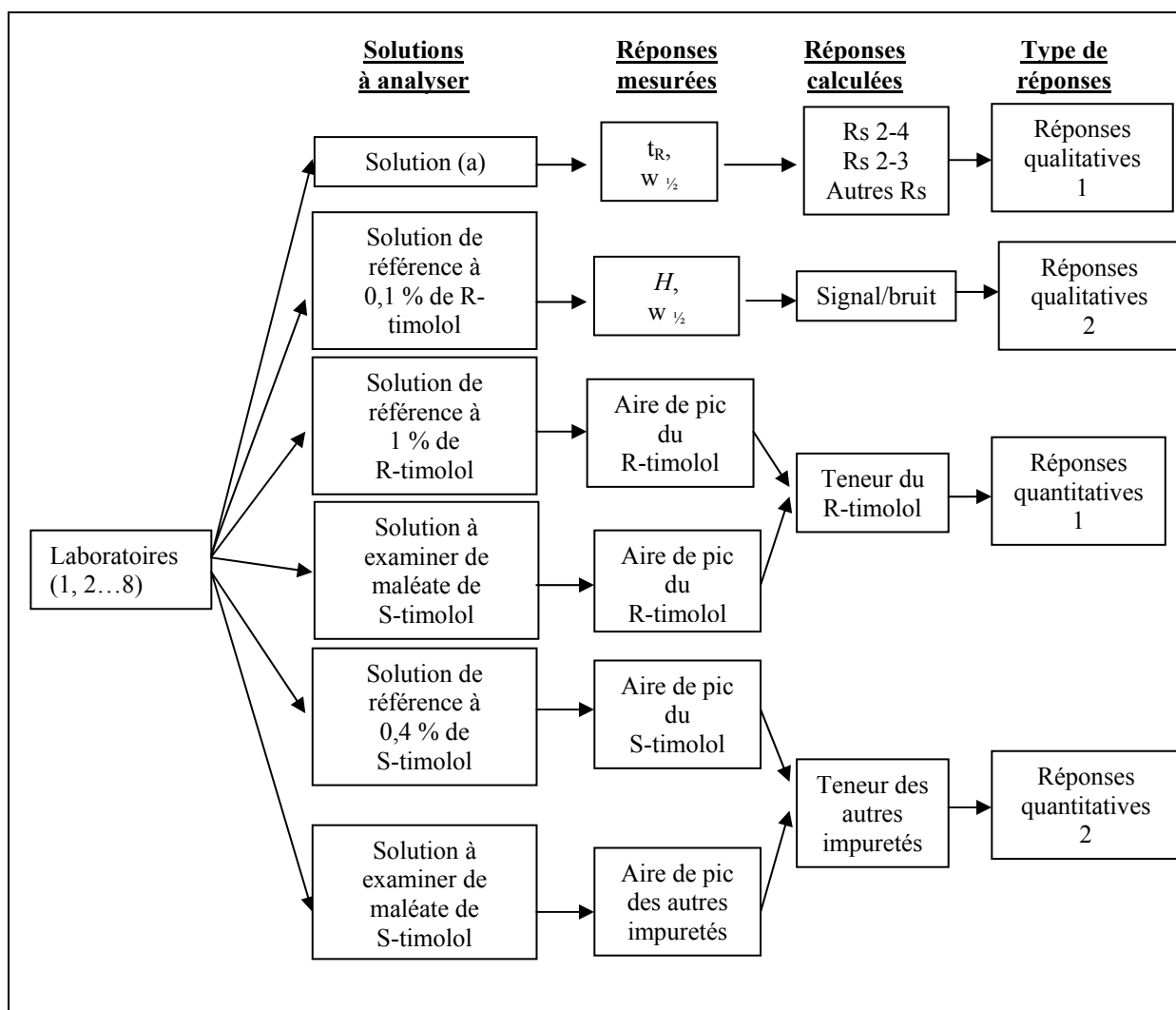


Figure IV.18. – Représentation schématique pour l'exécution des tests et la détermination des différentes réponses

Légende : t_R = temps de rétention des pics ; $w_{1/2}$ = largeur de pic à mi-hauteur ; Rs = résolution ; Rs2-4 = résolution de la paire énantiomérique ; Rs2-3 = résolution de la paire critique ; H = hauteur de pic.

L'analyse de la solution i contenant un mélange de R-timolol, S-timolol, dimère de timolol, isotimolol et dimorpholinothiadiazole (DMTDZ), dont le chromatogramme correspondant est illustré à la figure IV.19. montre une très bonne séparation de ces cinq composés.

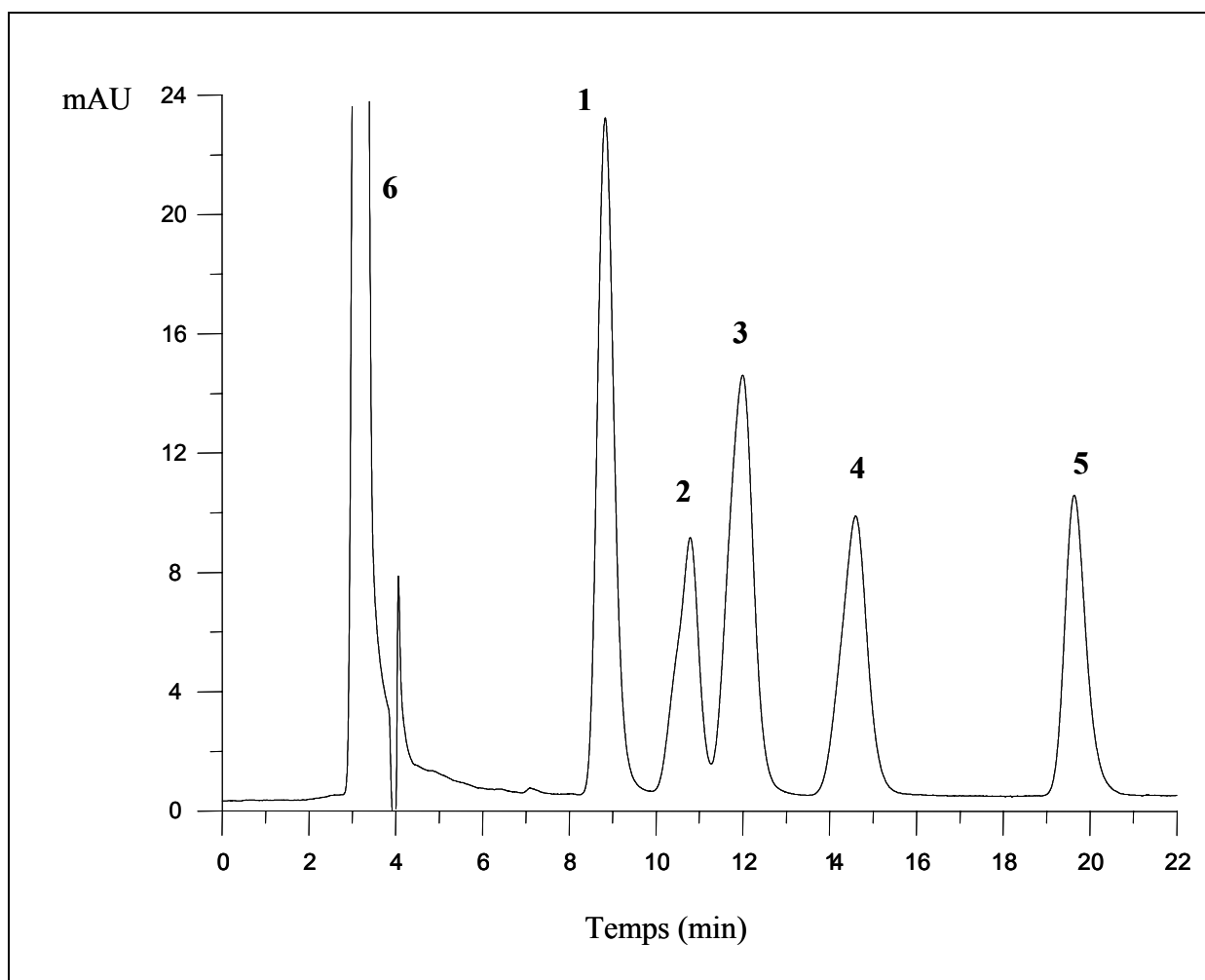


Figure IV.19. – Chromatogramme d'une solution des cinq composés obtenu par le laboratoire N° 4

Pics: Dimère de timolol (1), *R*-timolol (2), isotimolol (3), *S*-timolol (4), dimorpholinothiadiazole (5), front de solvant (6).

Comme l'indique le tableau IV.18., les temps de rétention de ces différents composés sont très proches pour les différents laboratoires, ce qui a permis leur identification par comparaison avec le chromatogramme témoin qui figurait dans le protocole de l'étude. L'ordre d'élution de ces composés est identique à celui observé dans ce chromatogramme témoin.

Les pressions résultantes des colonnes OD-H sont acceptables et permettent de garantir une bonne longévité de la phase stationnaire chirale. Ces colonnes peuvent supporter

des pressions jusqu'à 50 bars. Toutefois le laboratoire 6 a constaté une pression élevée qui n'a pas semblé avoir affecté les analyses ultérieures.

Tableau IV.18. – Résultats qualitatifs (temps de rétention) obtenus avec la solution de mélange des cinq composés

Laboratoires	Temps de rétention (min.)					Pressions au sein de la colonne
	1	2	3	4	5	
1	8,6	9,9	11,2	13,3	19,5	38
2	7,1	9,2	9,6	13,7	14,8	35
3	8,1	10,1	11,0	14,2	18,5	41
4	8,8	10,8	12,0	14,6	19,6	34
5	8,9	11,1	12,2	16,1	19,4	33
6	9,4	11,9	13,2	16,8	20,8	780 psi
7	8,7	10,7	11,9	14,6	19,6	32
8	9,1	11,1	12,2	15,7	20,3	39

Légende: 1 = Dimère de timolol ; 2 = R-timolol ; 3 = isotimolol ; 4 = S-timolol ; 5 = dimorpholinothiadiazole.

Les résolutions entre les pics consécutifs ainsi qu'entre les énantiomères (Rs2-4) ont aussi été calculées. Les résultats présentés dans le tableau IV.19 montre que tous les laboratoires, excepté le laboratoire 7, ont satisfait à l'exigence de l'énantiorésolution (valeur de Rs 2-4 supérieure à 4,0). Pour ce laboratoire, bien qu'une première modification de la composition de la phase mobile ait été effectuée lors du test d'aptitude, une modification supplémentaire (n-hexane / 2-propanol / DEA; 975/25/1, v/v/v) a été faite en vue de satisfaire à cette exigence.

Concernant les résolutions entre les pics consécutifs, les valeurs observées sont supérieures à 1,2 exceptée celle de la Rs2-3 pour le laboratoire 2. En effet, il n'a été observé qu'une valeur de 0,7 pour ce laboratoire, situation déjà rapportée lors du test d'aptitude. De plus, ce laboratoire a présenté une valeur considérablement faible de la résolution Rs4-5 (Rs = 1,4). En revanche, la résolution entre les pics 3 et 4 était la plus élevée. Notons que ce laboratoire a utilisé une colonne ancienne qui a montré une diminution de son efficacité à

l'égard des paires de pic isotimolol/R-timolol et S-timolol/DMTDZ. Toutefois, puisque l'exigence pour la séparation énantiomérique était toujours satisfaisante, la colonne a été utilisée pour la suite des analyses. Ceci indique clairement le risque de rencontrer des problèmes lors de la quantification du R-timolol et de l'isotimolol lorsque ces deux substances sont présentes à des concentrations importantes dans un échantillon à examiner. Finalement, comme aussi relevé lors de l'optimisation de la méthode, la résolution de la paire critique a été confirmée comme étant celle constituée par l'isotimolol et le R-timolol puisqu'elle était toujours la plus faible au sein de chaque laboratoire.

Tableau IV.19. – *Résultats qualitatifs (résolutions) obtenus avec la solution de mélange des cinq composés et autres tests de performance des systèmes de CLHP*

Laboratoires	Résolutions					S/B	Répétabilité (CV %, n = 6)
	Rs1-2	Rs2-3	Rs3-4	Rs4-5	Rs2-4		
1	2,0	1,7	2,6	6,4	4,2	36	0,41
2	3,3	0,7	4,7	1,4	5,3	19	0,41
3	3,4	1,5	4,1	5,3	5,8	36	0,38
4	2,3	1,2	2,2	5,1	4,0	28	0,87
5	3,5	1,6	4,4	3,8	6,4	51	0,72
6	3,5	1,6	3,8	3,9	5,5	18	0,56
7	3,0	1,5	2,8	4,9	3,5*/ 4,6	69	0,39
8	2,2	1,3	2,9	3,4	4,2	15	0,60
Moyenne	2,9	1,4	3,4	4,3	5,0		

*Légende: 1 = Dimère de timolol ; 2 = R-timolol ; 3 = isotimolol ; 4 = S-timolol ; 5 = dimorpholinthiadiazole ; Rs = résolution ; S/B = signal/bruit ; CV = coefficient de variation, * valeur avant la modification de la phase mobile.*

La détectabilité des systèmes de CLHP a aussi été évaluée. Comme l'indique le tableau IV.19., tous les laboratoires ont présenté des valeurs de signal/bruit supérieures à 10, montrant ainsi une détectabilité acceptable des systèmes de CLHP utilisés.

Enfin, nous avons aussi examiné la précision du système d'injection des différents équipements de CLHP (Tableau IV.19.). Excepté le laboratoire 4 qui avait un résultat à la limite de la non conformité, les valeurs des coefficients de variation étaient toutes en dessous de 0,85 %, ce qui est acceptable [209]. Ce laboratoire tout comme le laboratoire 5 avaient déjà rapporté lors du test d'aptitude des résultats supérieurs à cette limite d'acceptation. Cependant pour le laboratoire 5, nous avons observé une amélioration de la performance du système d'injection.

IV.4.3.2.2. Réponses quantitatives : teneur du R-timolol et des autres impuretés

Comme constaté lors du test de robustesse de la méthode envisagée dans cette étude (Figure IV.16.), tous les laboratoires n'ont observé qu'un seul pic d'impureté correspondant au R-timolol dans les chromatogrammes obtenus avec les solutions échantillons A et B. Par contre dans le chromatogramme correspondant à la solution d'échantillon C (Figure IV.20.) plusieurs pics ont été observés.

En effet, la dégradation du S-timolol a généré plusieurs produits de dégradation non identifiés éluant respectivement à environ 7 min, 47 min et 55 min, avec des surfaces de pic supérieures à celle correspondant au pic obtenu en injectant la solution (c) dont la concentration représente la limite de quantification des impuretés. Tous les laboratoires ont observé ces pics correspondant aux produits de dégradation non identifiés excepté les laboratoires 6 et 7. En particulier, les aires des pics des deux produits les plus retenus étaient très importantes. D'autres impuretés étaient aussi formées, notamment le R-timolol, l'isotimolol et le DMTDZ, mais à des concentrations moins importantes. Ces impuretés n'ont pas été prises en compte lors de l'analyse quantitative de l'étude inter-laboratoires.

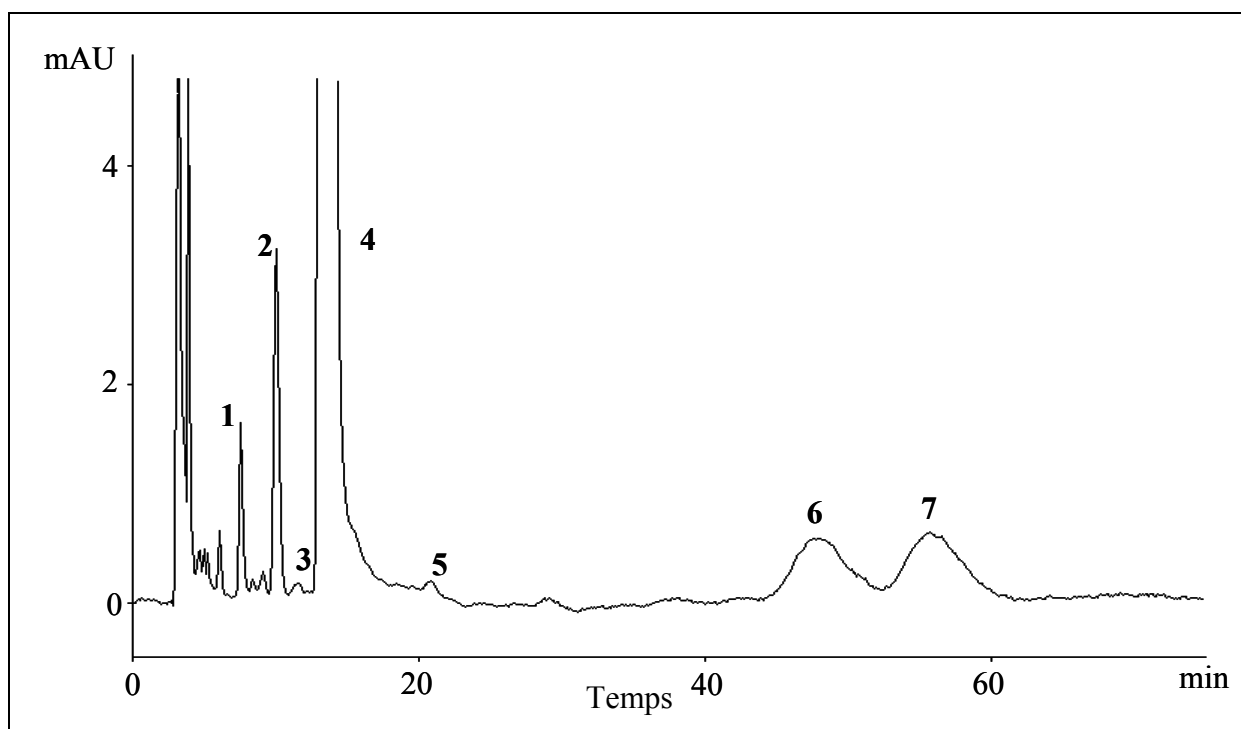


Figure IV.20. – Chromatogramme typique d'une solution de mélange des cinq composés obtenu par le laboratoire émetteur

Légende: impureté non identifiée 1 (1) ; R-timolol (2) ; isotimolol (3) ; S-timolol (4) ; dimorpholinthiadiazole (5) ; impureté non identifiée 2 (6) ; impureté non identifiée 3 (7).

La teneur en R-timolol dans les échantillons A et B a été déterminée en comparant la surface de pic normalisée correspondant au R-timolol obtenue en analysant les solutions d'échantillons A et B de maléate de S-timolol (ANE) à celle correspondant au R-timolol dans la solution de référence (b) (ANR) en utilisant la formule suivante :

$$\text{Teneur en R-timolol (\%)} = \frac{ANE}{ANR} \times 1\% \quad (\text{IV.18})$$

La normalisation de l'aire de pic est effectuée comme suit :

$$\text{Aire de pic normalisée} = \frac{\text{Aire de pic} \times 30}{\text{prise d'essai (en mg)}} \quad (\text{IV.19})$$

Les résultats présentés dans le tableau IV.20. montrent que les teneurs de R-timolol sont comprises entre 0,27 % – 0,57 % pour l'échantillon A et entre 0,15 % – 0,28 % pour l'échantillon B.

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

Laboratoires	Echantillon A		Echantillon B	
	Série 1	Série 2	Série 1	Série 2
1	0,53	0,53	0,28	0,27
	0,57	0,50	0,27	0,27
2	0,53	0,49	0,28	0,24
	0,52	0,51	0,28	0,27
3	0,49	0,50	0,25	0,26
	0,49	0,50	0,26	0,27
4	0,54	0,51	0,27	0,26
	0,53	0,51	0,26	0,26
5	0,50	0,51	0,25	0,26
	0,51	0,50	0,25	0,26
6	0,48	0,56	0,23	0,27
	0,44	0,50	0,23	0,26
7	**0,27	0,40	**0,15	0,18
	**0,41	0,46	**0,22	0,23
8	0,48	0,55	0,25	0,25
	0,49	0,49	0,25	0,26
Moyenne	0,49 %		0,25 %	

**** valeurs aberrantes supprimées après l'évaluation statistique des données.**

La teneur des impuretés non identifiées a été déterminée en comparant les aires de leurs pics normalisées obtenues en analysant la solution d'échantillon C de maléate de S-timolol (ANE) à celle correspondant au S-timolol dans la solution de référence (c) (ANR) en utilisant la formule suivante :

$$\text{Teneur en impureté (\%)} = \frac{ANE}{ANR} \times 0,4\% \quad (\text{IV.20})$$

Les résultats présentés dans le tableau IV.21 montrent que les teneurs des impuretés non identifiées 1, 2 et 3 varient respectivement de 0,12 % à 0,53 %, de 0,34 % à 2,78 %, et de 0,34 % à 3,65 %. Les laboratoires 6 et 7 n'ont pas pu quantifier les impuretés 2 et 3.

Tableau IV.21. – Teneurs (%) des impuretés dans l'échantillon C

Laboratoires	Impureté 1		Impureté 2		Impureté 3	
	Série 1	Série 2	Série 1	Série 2	Série 1	Série 2
1	0,15	0,14	0,66	0,70	0,73	0,74
	0,15	0,16	0,65	0,66	0,84	0,87
2	0,19	0,13	0,35	0,39	0,34	0,41
	0,20	0,15	0,34	0,35	0,34	0,38
3	0,16	0,16	0,77	0,77	0,88	0,84
	0,15	0,15	0,79	0,73	0,81	0,83
4	0,13	0,18	0,65	0,65	0,80	0,86
	0,13	0,18	0,66	0,58	0,79	0,78
5	0,13	0,12	0,65	0,59	0,84	0,80
	0,13	0,12	0,66	0,63	0,83	0,83
6	0,36	**0,48	-	-	1,05	1,22
	0,39	**0,53	-	-	1,06	1,14
7	0,29	0,25	-	-	1,05	1,22
	0,32	0,26	-	-	1,06	1,14
8	0,39	0,43	**2,78	2,68	2,70	**3,65
	0,38	0,45	**2,38	2,46	2,75	**3,14
Moyenne	0,15 %		0,66 %		0,81 %	

Légende : ** = valeurs aberrantes supprimées après l'évaluation statistique des données ;

- = données non rapportées.

IV.4.3.2.3. Examen critique des données quantitatives

Lors de l'exécution d'une étude inter-laboratoires, contrairement aux réponses qualitatives pour lesquelles des critères d'acceptation par rapport aux exigences de la méthode sont définis avec des moyens prévus pour remédier en cas de non conformité, aucun critère d'acceptation n'est défini pour les réponses quantitatives. Par contre, au terme de l'étude, un certain nombre de tests statistiques sont proposés en vue d'examiner la qualité des données quantitatives fournies. Ce sont les tests numériques appliqués pour l'homogénéité des variances (test de Cochran) et pour la détection des valeurs aberrantes (tests de Grubb) [248]. Les tests graphiques correspondants sont respectivement les tests de Mandel k et de Mandel h . A ce stade de l'étude collaborative, les tests permettent d'évaluer l'existence de problèmes éventuels au sein d'un laboratoire, avec un échantillon examiné ou avec une substance analysée.

IV.4.3.2.3.1. Evaluation intra-laboratoire

Comme illustré dans le graphique de Mandel k (figure IV.21), une grande variabilité intra-laboratoire a été observée pour l'impureté non identifiée 1 et pour la teneur en R-timolol dans les deux échantillons A et B et ce, dans les laboratoires 6 et 7. Le laboratoire 8 a montré une variabilité particulièrement élevée pour les deux impuretés non identifiées 2 et 3. Cette observation peut être due à un problème d'intégration de pic, spécialement pour ces deux impuretés. En effet, comme observé dans le chromatogramme de la figure IV.20, ces impuretés sont très retenues sur la colonne avec une élution tardive et un étalement de leurs pics. Il en résulte une difficulté d'intégration de leurs aires et par conséquent, une variabilité importante des mesures effectuées. De plus, ces pics pourraient empêcher la visualisation d'un autre pic mineur, qui a été observé et rapporté par un laboratoire (N° 2). Comme précédemment mentionné, ce laboratoire utilise une colonne ancienne qui, une fois de plus, semble avoir une influence sur la séparation de ces deux impuretés.

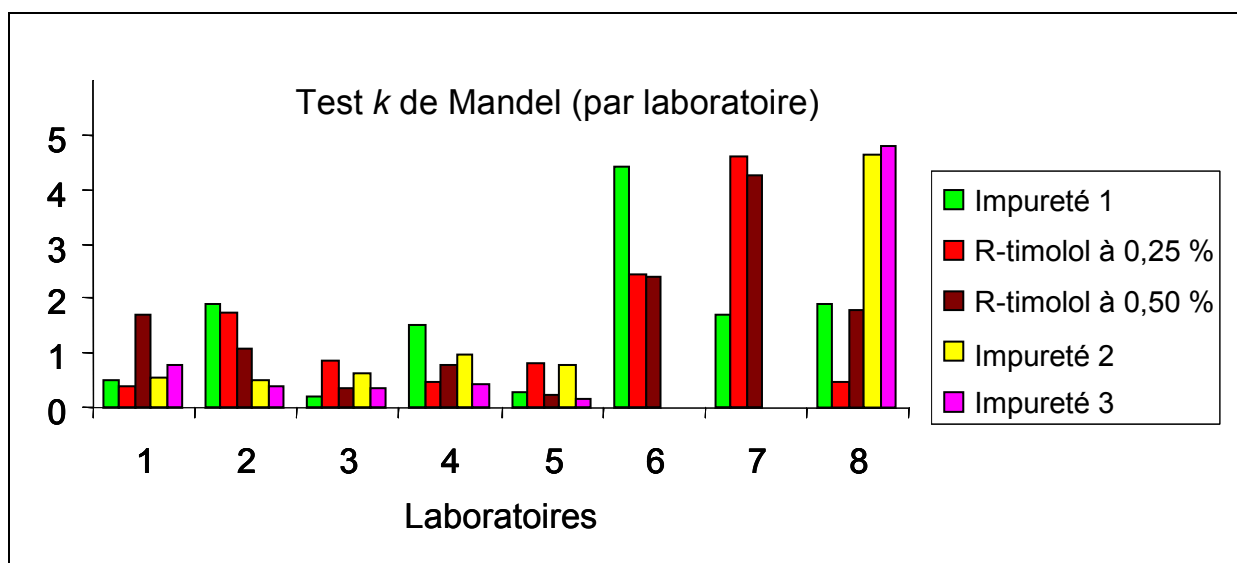


Figure IV.21. – Test k de Mandel pour l'évaluation de la variabilité intra-laboratoire.

Les valeurs calculées de Cochran pour les impuretés non identifiées 2 ($C = 0,84$) et 3 ($C = 0,90$) étaient plus élevées que les seuils critiques de 5 % (0,68) et de 1 % (0,79) pour le laboratoire 8, indiquant la présence de valeurs aberrantes dans ce laboratoire. Par contre, aucune valeur n'était suspecte. En conséquence, excepté pour le laboratoire 8, la variabilité intra-laboratoire observée pour les cinq substances est similaire pour tous les laboratoires participants.

IV.4.3.2.3.2. Evaluation inter-laboratoires

L'évaluation graphique de la variabilité inter-laboratoires au moyen du test de Mandel h (Figure IV.22.) indique que la majorité des laboratoires (de 1 à 6) présentent une distribution aléatoire des valeurs autour de zéro, alors que le laboratoire 7 présente des valeurs négatives pour le R-timolol et le laboratoires 8 des valeurs positives pour toutes les impuretés, suggérant une erreur systématique. Les laboratoires ont été informés de ce problème.

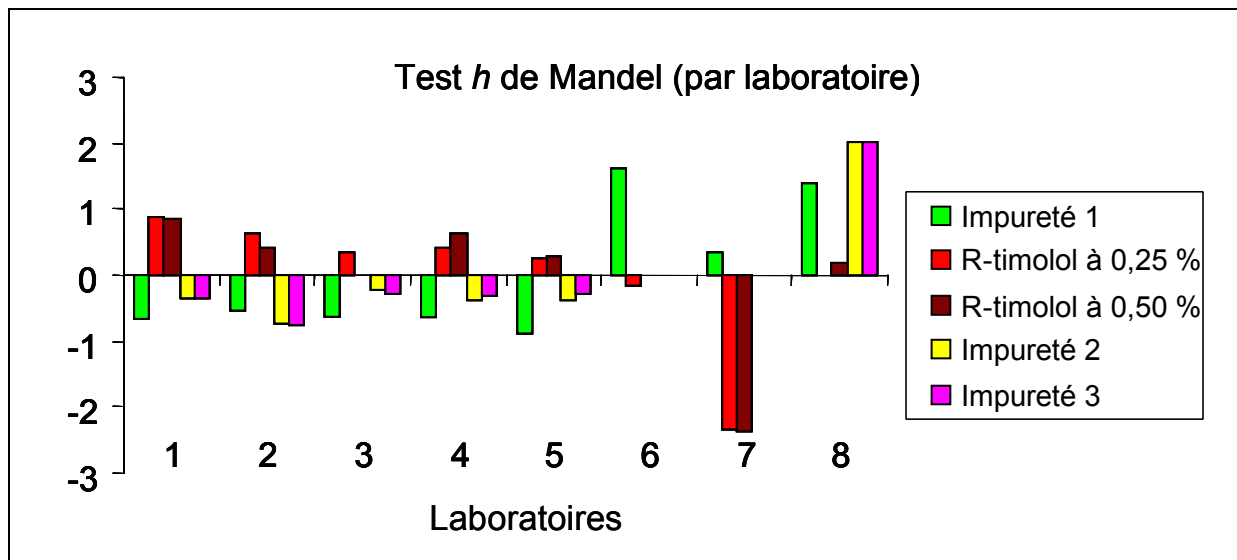


Figure IV.22. – Test h de Mandel pour l'évaluation de la variabilité inter-laboratoires.

Différents tests de Grubb ont été appliqués en vue d'identifier les valeurs aberrantes. Les résultats présentés dans le tableau IV.22. indiquent la présence de valeurs aberrantes dans le laboratoire 7 (teneur en R-timolol dans les échantillons A et B), dans le laboratoire 6 (impureté non identifiée 1) et dans le laboratoire 8 (impuretés non identifiées 2 et 3).

Au terme de l'évaluation statistique de la qualité des données quantitatives, le guide ISO 5725-2 [52] demande d'investiguer si la présence des valeurs aberrantes ou des valeurs suspectes statistiquement évaluées peut être expliquée par une quelconque erreur pouvant être survenue à la suite de problèmes techniques ou de transcription des données. Dans ce cas, des corrections appropriées doivent être apportées. Dans l'étude que nous avons menée, les laboratoires participants qui ont présenté des valeurs aberrantes n'ont rapporté aucun problème particulier durant l'exécution des tests, pouvant être à l'origine des valeurs aberrantes. Dans ce cas, lorsque n'importe quelle valeur aberrante ou valeur suspecte demeurent non expliquée ou rejetée comme appartenant à un laboratoire aberrant, le guide ISO 5725-2 indique que les valeurs suspectes soient maintenues comme items corrigés et les valeurs aberrantes soient supprimées. Par conséquent, les valeurs aberrantes obtenues par les laboratoires 6, 7 et 8 ont été annotées dans les tableaux IV.20. et IV.21. et exclues parmi les jeux de données.

Tableau IV.22 – Résultats des tests de Grubb

Tests de Grubb	Test statistique					Seuil critique	
	R-timolol (échantillon A)	R-timolol (échantillon B)	Echantillon C			$p = 8$	
			Impureté 1	Impureté 2	Impureté 3	5 %	1 %
G_1	4.05*	3.79*	0.95	0.79	1.22	2.13	2.27
G_p	1.49	0.94	2.39*	2.42*	2.76*	2.13	2.27
$G_{1,2}$	1.04	1.05	1.01	1.00	1.01	0.11	0.06
$G_{p,p-1}$	1.01	1.00	1.02	1.04	1.04	0.11	0.06
G	35.2	27.0	8.4	11.6	16.8	64.5	74.9
Valeurs aberrantes	Laboratoire 7	Laboratoire 7	Laboratoire 6	Laboratoire 8	Laboratoire 8		

* indication de valeurs aberrantes

IV.4.4. CONCLUSION

Une étude collaborative a été menée avec succès en vue de déterminer, d'une part la teneur en R-timolol dans deux lots d'échantillons de maléate de S-timolol, et d'autre part les teneurs des autres impuretés du timolol dans un échantillon de maléate de S-timolol dégradé à la chaleur sèche.

Auparavant, un test d'aptitude a été effectué en vue de s'assurer de la bonne mise en œuvre de la méthode et de l'adéquation du protocole de l'étude. Les problèmes survenus lors de ce test d'aptitude, relatifs à la non satisfaction du critère d'énantiorésolution, ont conduit à modifier légèrement la méthode de CLHP initiale. Ainsi, au niveau de la composition de la phase mobile la proportion du 2-propanol a été légèrement diminuée, le volume d'injection a été diminué de moitié, ce qui a nécessité de doubler les concentrations des solutions à examiner et d'adapter les solutions de référence pour la quantification.

L'étude a montré que les laboratoires participant ont présenté une performance équivalente quant aux réponses qualitatives, notamment les résolutions de la paire critique et de la paire énantiomérique, le rapport signal/bruit et la répétabilité du système d'injection.

Au niveau des réponses quantitatives, excepté le laboratoire 7 qui a présenté des valeurs aberrantes, tous les laboratoires ont présenté des résultats satisfaisant quant à la teneur en R-timolol dans les deux lots d'échantillons de maléate de S-timolol. Ce laboratoire avait adapté la composition de la phase mobile en vue de satisfaire aux exigences d'énantiosélectivité. En ce qui concerne les impuretés non identifiées, leurs teneurs ont été également déterminées. Nous avons constaté que les résultats étaient très variables. Les laboratoires 6 et 8 ont présenté des résultats aberrants pour ces impuretés.

A l'issue de cette étude collaborative, la méthode de CLHP peut être valablement utilisée pour évaluer n'importe quel laboratoire dans le cadre des tests de compétence.