

Benjamin DEBRUS^{1,*}, Pierre LEBRUN¹, Eric ROZET^{1,#}, Iolanda NISTOR^{1,2}, Attilio CECCATO³, Gabriel CALIARO⁴, Radu OPREAN², Bruno BOULANGER⁵, Philippe HUBERT¹

Nouvelle méthodologie pour le développement automatisé de méthodes analytiques en chromatographie liquide pour l'analyse de mélanges de composés inconnus

RÉSUMÉ

De nos jours, de nombreuses stratégies d'optimisation de méthodes chromatographiques sont disponibles. Néanmoins, le développement de méthodes chromatographiques reste l'étape la plus limitante dans les processus de synthèse ou d'identification de nouvelles molécules pouvant conduire à des agents thérapeutiques ou à de nouveaux biomarqueurs et cela malgré la disponibilité de nouvelles technologies tant en chimie (chimie combinatoire, High throughput screening...) qu'en biochimie analytique (protéomique, métabolomique, herbal fingerprinting...). L'objectif de l'étude présentée dans ces pages est d'éprouver une nouvelle méthodologie de développement automatisé de méthodes chromatographiques combinant la planification expérimentale, l'analyse en composantes indépendantes, l'analyse de la propagation de l'erreur prédictive et la modélisation par régression linéaire multiple. Finalement, cette méthodologie automatisée a permis de séparer avec succès les composés d'un mélange inconnu.

MOTS-CLÉS

Chromatographie liquide haute performance, planification expérimentale, analyse en composantes indépendantes.

New methodology for the automated development of analytical method in liquid chromatography for the analysis of unknown compounds mixtures

SUMMARY

Nowadays, many strategies to optimize chromatographic methods are available. However, the development of chromatographic methods remains the most limiting step in the process of synthesis or identification of new molecules that could lead to therapeutic agents or new biomarkers despite the availability of new technologies both in chemistry (chemical combinatorial, high throughput screening...) and in analytical biochemistry (proteomics, metabolomics, herbal ... fingerprinting). Therefore, the aim of this study is to test a new methodology for developing automated chromatographic methods combining experimental planning, independent component analysis, analysis of predictive error propagation and multiple linear regression modeling. Finally, this automated methodology has enabled us to successfully separate the components of an unknown mixture.

KEYWORDS

High performance liquid chromatography, experimental design, independent component analysis.

* : Pour correspondance

: Chargé de recherche F.R.S.-FNRS

¹Laboratoire de Chimie Analytique – CIRM, Université de Liège – Avenue de l'Hôpital 1 – B36 – Tour4 +2 – 4000 Liège – Belgique – E-mail: b.debrus@ulg.ac.be
Tél.: +32 43664324

²Université de Médecine et Pharmacie – "IULIU HATIEGANU" Cluj – Napoca – Rue Victor Babeş 8 – 400012 Cluj-Napoca – Roumanie

³Mithra Pharmaceuticals – Rue Saint-Georges 5 – B-4000 Liège – Belgique

⁴Orailac Quality Solutions, Belgique

⁵UCB Pharma SA – R&D Clinical Pharmacometrics – Allée de la Recherche 60 – B-1070 Bruxelles – Belgique

Nouvelle méthodologie pour le développement automatisé de méthodes analytiques en chromatographie liquide pour l'analyse de mélanges de composés inconnus

I - Introduction

Dans le domaine pharmaceutique, les méthodes analytiques de quantification occupent une place fondamentale à plus d'un égard. En effet, de nouvelles méthodes et technologies tant en chimie (chimie combinatoire, High throughput screening...) qu'en biochimie analytique (protéomique, métabolomique, herbal fingerprinting...) mènent aujourd'hui à la synthèse ou à l'identification d'un nombre considérable de nouvelles molécules pouvant conduire à des agents thérapeutiques potentiels ou de nouveaux biomarqueurs d'un état pathologique. A cette fin, les techniques séparatives et plus particulièrement la chromatographie liquide haute performance (HPLC) sont depuis plusieurs années des techniques de choix pour identifier et quantifier ces molécules d'intérêts. Néanmoins, les paramètres régissant la qualité de la séparation des composés contenus dans un échantillon sont multiples et la mise au point d'une méthode HPLC peut parfois être laborieuse surtout quand la nature de ces molécules est inconnue. De plus, parmi les méthodes d'optimisation existantes (1-4), certaines peuvent requérir des informations préliminaires à propos des propriétés physico-chimiques des composés étudiés et de ce fait limiter l'automatisation des processus d'optimisation dans le cas de mélanges inconnus. Dans cet article est présentée une méthodologie novatrice (5, 6) s'acquittant de pré-requis et permettant d'optimiser la séparation d'un mélange de composé inconnu.

II - Stratégie d'optimisation

1. Planification expérimentale

Ces dernières années, de nombreuses avancées ont été réalisées dans le domaine du développement de méthodes analytiques. Il est aujourd'hui possible d'envisager l'utilisation de diverses stratégies afin de trouver des séparations optimales. Néanmoins, ces stratégies doivent être susceptibles de fournir des prédictions exactes et des optima robustes avant les étapes ultérieures de validation et/ou de transfert de méthodes. La planification expérimentale est l'une de ces stratégies. La première étape de la planification expérimentale consiste à sélectionner des facteurs caractérisés par un effet marqué sur la réponse qui sera modélisée. Dans l'exemple développé dans ces pages, les facteurs sélectionnés sont le pH de la partie aqueuse de la phase mobile et le temps nécessaire pour passer linéairement de 5 % à 95 % en méthanol (ce facteur est communément appelé temps de gradient, T_G). Afin de maximiser les chances d'identifier une séparation optimale, le domaine expérimental est élargi au maximum : la gamme de pH s'étend de 2,6 à 10,0, celle du temps de gradient de 10 à 30 minutes. Des études préliminaires ont démontré que les plans expérimentaux offrant de bonnes propriétés d'orthogonalité et de rotabilité sont à privilégier lors de la modélisation de réponses chromatographiques. Les plans factoriels complets (figure 1) fournissent de meilleures prédictions par rapport aux plans D-optimaux.

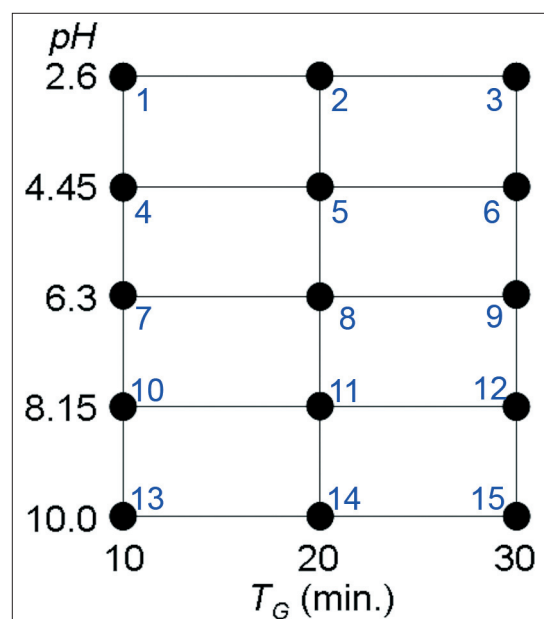


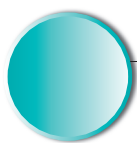
Figure 1

Plan expérimental factoriel complet à deux facteurs. Les conditions expérimentales ont arbitrairement été numérotées en bleu.

Dans un second temps, il convient de sélectionner les réponses qui seront modélisées par des fonctions polynomiales. Certaines précautions doivent être prises lorsque la résolution (R_s) est utilisée comme réponse. La résolution est généralement calculée sur les deux pics les plus proches dans un chromatogramme (la paire critique). Cependant, comme les conditions opératoires comprises dans le domaine expérimental engendrent des sélectivités très différentes, l'ordre des pics change et le calcul de la résolution de la paire critique se base sur des composés différents. Ce problème d'inversion des pics induit des discontinuités dans les réponses. Dès lors, la modélisation de ces réponses grâce à des équations linéaires multiples devient non-cohérente et des erreurs de prédiction très significatives peuvent en découler. De plus, postérieurement à la modélisation, seule une résolution optimale peut être prédite et aucune information supplémentaire concernant le chromatogramme optimal n'est obtenue. Certains travaux antérieurs ont permis de démontrer l'avantage d'utiliser des réponses mieux adaptées. Ainsi, la modélisation des temps au début, au sommet (temps de rétention, t_R) et à la fin de chaque pic est donc réalisée. Ces réponses présentent les avantages d'être modélisables par des fonctions polynomiales et de rendre possible la prédiction d'un chromatogramme optimal complet sur lequel peut être calculé n'importe quels critères chromatographiques (résolution, séparation entre les pics, largeur des pics...).

2. Lecture automatique des chromatogrammes

L'utilisation de plans expérimentaux et donc de conditions opératoires drastiquement différentes induit des sélectivités très distinctes. Dès lors, la détection et l'identification des pics sont généralement des étapes délicates et qui nécessitent beaucoup de temps. L'analyse en composantes indépendantes (ACI) permet de séparer les composantes d'un chromatogramme enregistré en UV-DAD. Même coélus, les pics dont les spectres UV sont nettement différents et qui



présentent des temps de rétention distincts peuvent être numériquement séparés. L'ACI est donc utilisée pour séparer les pics, les détecter et les identifier de manières automatiques. Il ne relève pas du propos de cet article de donner le détail de la méthode ACI, le lecteur intéressé par celle-ci pourra trouver dans la littérature, publications de travaux réalisés par Hyvärinen *et al.* (7) ou encore par notre équipe (8), de plus amples informations sur celle-ci.

3. Modélisation mathématique et prédiction

Les réponses modélisées sont les logarithmes des facteurs de rétention (équation 1).

$$\bullet \text{ Log}(k) = \text{Log} \left[\frac{(t_R - t_0)}{t_0} \right] \quad \text{Equation 1}$$

où k est le facteur de rétention, t_R est le temps de rétention du composé étudié et t_0 est le temps de rétention pour un composé non-retenu. La modélisation mathématique de ces logarithmes est effectuée à l'aide d'équations linéaires multiples (équation 2).

$$\bullet \text{ Log}(k) = \beta_0 + \beta_1 \cdot \text{pH} + \beta_2 \cdot \text{pH}^2 + \beta_3 \cdot \text{pH}^3 + \beta_4 \cdot \text{pH}^4 + \beta_5 \cdot T_G + \beta_6 \cdot T_G^2 + \beta_7 \cdot \text{pH} \cdot T_G + \varepsilon \quad \text{Eq. 2}$$

où β_0, \dots, β_7 sont les paramètres du modèle mathématique, pH et T_G étant les facteurs du plan expérimental et ε est l'erreur de prédiction. Une régression pas à pas est utilisée afin de maximiser le coefficient de détermination multiple ajusté ($R^2_{\text{ajusté}}$) (9). Le comportement chromatographique de chaque composé est modélisé par trois équations. Une modélisant le logarithme du facteur de rétention et deux modélisant les logarithmes de la demi-largeur à gauche (du début au sommet du pic) et à droite (du sommet à la fin du pic). L'erreur prédictive, dont les sources sont systématiques et aléatoires, est également analysée. Une analyse de Monte Carlo est conjointement effectuée et permet d'estimer l'ampleur que cette erreur aura sur la prédiction des réponses. Il est alors possible de connaître la distribution des réponses pour chaque condition opératoire donnée et de propager cette erreur sur les critères (e.g. la résolution). L'utilisation de la résolution comme critère peut se révéler être inadéquat. En effet, la résolution est définie comme étant le rapport entre la différence des temps de rétention de deux pics et la moyenne des largeurs de ces pics. Lors de la propagation de l'erreur au critère, cette division peut engendrer des valeurs infinies et une erreur exagérée entache alors la prédiction. La séparation entre les pics (S) se définissant comme la différence entre le temps au début d'un pic et le temps à la fin du pic précédent est donc utilisée. La distribution des réponses étant connue, il est possible de calculer, à chaque condition opératoire, la probabilité que le critère atteigne un seuil prédéfini. Cette information est essentielle car elle permet d'évaluer le risque que l'écart entre valeurs prédites et observées soit trop important. Dans cette optique, plutôt que de représenter des surfaces de réponses, des surfaces de probabilités sont calculées.

On peut alors définir le Design Space (DS) (équation III) qui est la zone dans laquelle la probabilité pour qu'un critère atteigne le seuil prédéfini soit supérieure à une valeur sélectionnée. En d'autres termes, toutes les conditions opératoires comprises à l'intérieur du DS présenteront, par exemple, une probabilité d'au moins 90 % que la séparation entre les pics les plus proches soit d'au moins 1 minute. Le DS représente une avancée majeure car il permet d'estimer la robustesse des conditions opératoires optimales.

$$\bullet \text{ DS} = \left\{ \mathbf{x}_0 \in \chi \mid E_{\hat{\theta}} [P(S > \lambda)] \geq \pi \right\} \quad \text{Equation 3}$$

où \mathbf{x}_0 est un point du domaine expérimental, χ , λ est la limite d'acceptation pour le critère sélectionné (S) et π est le niveau de qualité. $\hat{\theta}$ est l'ensemble des paramètres estimés du modèle. P représente l'estimateur de probabilité et E , l'estimateur de l'espérance mathématique.

III - Matériels et méthodes

1. Réactifs et échantillons

Le méthanol (HPLC gradient grade), l'acide formique (> 98 %) et l'hydrogénocarbonate d'ammonium (99,7 %) ont été fournis par VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Le formiate d'ammonium (99 %) a été acheté chez Alfa Aesar (Karlsruhe, Allemagne). L'eau de qualité ultra-pure (18,2 M Ω) a été obtenue grâce à un appareil Milli-Q Plus 185 de Millipore (Billerica, Etats-Unis). L'échantillon a gracieusement été fourni par Eli Lilly Company (Indianapolis, Etats-Unis). Le volume d'injection était de 0,5 μ L. Les solutions tampons consistaient en des solutions de concentration de 10 mM en acide formique à pH 2,6 ; en formiate d'ammonium à pH 4,45 et pH 6,3 ; et en hydrogénocarbonate d'ammonium à pH 8,15 et pH 10,0. Le pH a été ajusté aux valeurs désirées grâce à de l'acide formique concentré et à une solution 35 % en ammoniacale. La concentration des tampons (10 mM) a été ajustée afin de maintenir un pouvoir tampon suffisant et de minimiser la modification des comportements chromatographiques (i.e. des temps de rétention) lors du changement de la nature de tampon. Le plan expérimental factoriel complet comportait 15 conditions expérimentales (figure 1) dont la condition opératoire centrale a été répétée indépendamment (préparations des nouveaux tampons) à deux reprises.

2. Appareillages

La colonne chromatographique est une XBridge C18 (100x2,1 mm i.d. ; 3,5 μ m) de la société Waters (Milford, USA). Les chromatogrammes ont été enregistrés sur un équipement Waters Alliance 2695 couplé à un détecteur UV-DAD 996, à un débit de 0,25 mL.min⁻¹ et à une température de 30 °C. Tous les chromatogrammes ont été enregistrés de 210 nm à 400 nm avec une résolution de 1,2 nm et une fréquence d'acquisition de 2 Hz. L'intégration des pics a été réalisée à 280

Nouvelle méthodologie pour le développement automatisé de méthodes analytiques en chromatographie liquide pour l'analyse de mélanges de composés inconnus

nm afin d'obtenir un rapport signal sur bruit suffisant pour chacun des pics.

3. Logiciel

Un algorithme a été développé pour réaliser l'ACI et les régressions linéaires multiples. Il a été écrit dans le langage statistique R 2.8.1 pour Windows® qui est gratuitement distribué à l'adresse <http://www.r-project.org>. Ces programmes ont été exécutés sur un ordinateur personnel.

IV - Résultats et discussions

1. Plan expérimental

Lors de l'obtention des 17 chromatogrammes aux 15 conditions expérimentales différentes, un maximum de 9 pics a pu être observé. Le mélange inconnu devait donc contenir au minimum 9 composés. Certains des chromatogrammes obtenus ainsi que les conditions opératoires correspondantes sont présentées en Figure 2.

2. Lecture automatique par ACI

Chaque chromatogramme a été traité par ACI afin de pouvoir réaliser les intégrations sur les composantes indépendantes plutôt que sur les pics pouvant résulter de composés coéluants. En effet, lorsque deux composés coéluent, la détermination des limites d'intégration est biaisée car même si la coélution est légère ($1,0 < R_s < 1,5$), les limites d'intégration sont généralement obtenues à l'aide d'un séparateur placé au minimum de la vallée entre les deux pics. Cette approximation restreint la justesse de cette mesure et empêche l'obtention de modèle mathématique reflétant, le plus exactement possible, le comportement chromatographique des composés présents dans le mélange. Dans le cas d'une coélution importante ($0 < R_s < 1$), l'estimation des largeurs des pics est faussée et entache les prédictions fournies par les modèles mathématiques sur l'ensemble du domaine expérimental. Dès lors, les bornes d'intégration (i.e. le début et la fin d'un pic) sont déterminées automatiquement sur les composantes indépendantes. En partant du sommet d'un pic et en se déplaçant vers la gauche ou vers la droite, le premier point dont la hauteur est inférieure à deux fois le bruit est respectivement sélectionné comme le début ou la fin du pic. La Figure 3 illustre certains des résultats obtenus pour la séparation numérique (par ACI) de pics coéluants. Le traitement de l'ensemble des chromatogrammes par ACI a d'ailleurs permis de confirmer la présence de 9 composés dans le mélange inconnu.

3. Modélisation mathématique et prédiction

Afin de vérifier la qualité des régressions linéaires multiples, les coefficients de détermination ajusté ($R^2_{\text{ajusté}}$) obtenus pour chaque composé sont

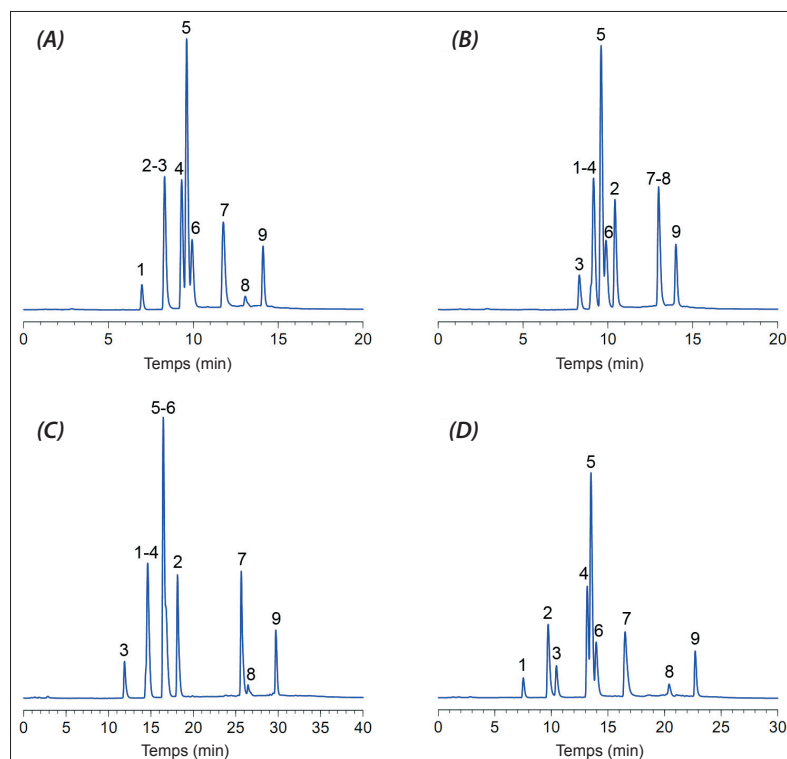


Figure 2
Exemples de chromatogrammes obtenus lors de la réalisation du plan expérimental. (A) condition expérimentale 10 (B) condition expérimentale 13 (C) condition expérimentale 15 (D) condition expérimentale 8.

repris au Tableau I (voir page suivante). L'adéquation existant entre les temps de rétention prédits par les modèles et ceux observés lors de l'enregistrement des chromatogrammes permet également de confirmer la qualité de l'ajustement.

La Figure 4 (voir page 32) illustre les relations entre réponses observées et réponses prédites, ainsi que les résidus correspondants. Il est à noter que la distribution Normale des résidus ainsi que la réalisation d'un test de manque d'ajustement (*lack of fit test*) ont également permis de confirmer la qualité de l'ajustement.

Dès lors que la qualité des régressions linéaires multiples a été vérifiée, c'est-à-dire que les réponses ont été correctement modélisées, il est possible de réaliser une optimisation sur les critères sélectionnés. Dans notre cas, et pour les raisons énoncées précédemment, le critère retenu est la séparation entre les pics de la paire critique, S. La Figure 5 (voir page 32) représente

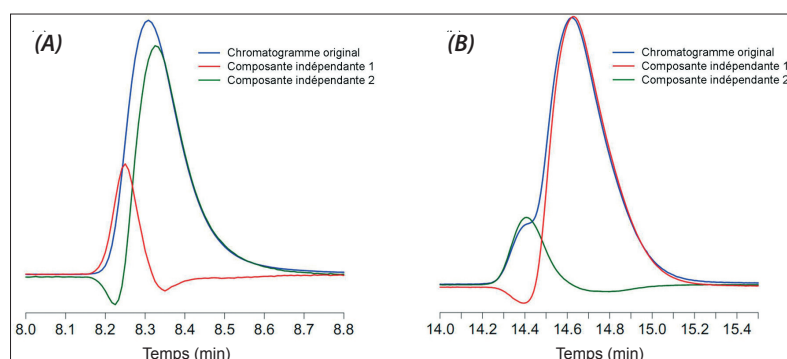


Figure 3

Exemple de séparations numériques obtenues par ACI pour des composés coéluants.

(A) coélution des composés 2 et 3 du chromatogramme représenté à la Figure 2A.

(B) coélution des composés 1 et 4 du chromatogramme représenté à la Figure 2C.

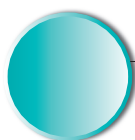


Tableau I
Coefficient de détermination ajusté ($R^2_{ajusté}$) pour le logarithme des facteurs de rétention ($\log(k)$), pour le logarithme de la demi-largeur à gauche ($\log(w_g)$) et à droite ($\log(w_d)$).

Composé N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Moyenne
$R^2_{ajusté}$										
$\log(k)$	0,991	0,993	0,999	0,997	0,999	0,998	0,999	0,998	0,999	0,997
$\log(w_g)$	0,901	0,801	0,453	0,959	0,643	0,797	0,935	0,512	0,303	0,700
$\log(w_d)$	0,955	0,696	0,444	0,780	0,942	0,833	0,768	0,491	0,372	0,698

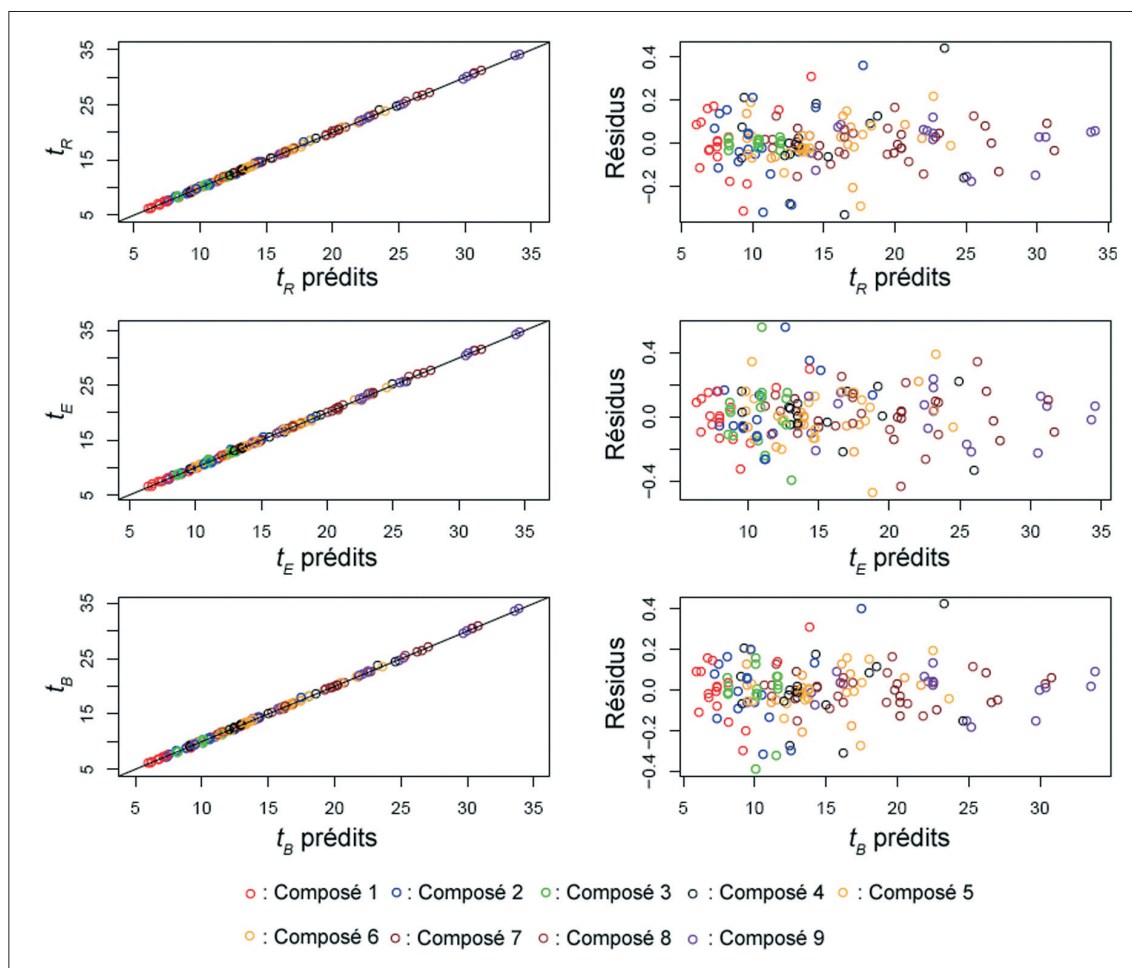
la surface de probabilité que S soit plus grand que 0. Sur cette figure est également indiqué le DS pour un niveau de qualité π égal à 85 %. Afin de pouvoir confirmer la capacité du DS à prédire des conditions opératoires offrant une séparation au moins égale à 0, un ensemble de chromatogrammes ont été enregistrés à des conditions opératoires se trouvant à l'intérieur ou à proximité de ce dernier. Le Tableau II résume les résultats obtenus.

L'écart existant entre les valeurs de S prédites et celles observées est clairement non négligeable. Plusieurs raisons sont à l'origine de cette différence. Premièrement, parmi les réponses modélisées, les logarithmes de demi-largeur de pic sont celles qui offrent la moins bonne justesse en prédiction (cf. tableau I). Quoiqu'il en soit, le choix de ces réponses est motivé par leurs indépendances, en effet, des réponses indépendantes sont préférables pour une bonne analyse de l'erreur prédictive globale. Les demi-largeurs modélisées permettent de recalculer les temps en début et en fin de pic grâce à la valeur du temps de rétention qui lui-même est affecté de son erreur de prédiction. C'est ainsi que la source de l'erreur observée pour les temps

en début et en fin de pic est double, car dépendant de l'erreur de prédiction sur le facteur de rétention et de l'erreur de prédiction propre aux modélisations de ces demi-largeurs. Par ailleurs, S étant directement calculé à partir des temps en début et fin de deux pics, sa valeur se trouve également entachée d'une erreur (cependant moins que R_s) ayant une double origine. En ce qui concerne la résolution, les valeurs prédites sont nettement inférieures à 1,5 et les écarts entre R_s observés et R_s prédits sont beaucoup plus significatifs. Deuxièmement, comme observé à la Figure 3, les composantes indépendantes correspondant à des composés coéluants peuvent être affectées d'une déformation vers des valeurs négatives à l'endroit de la coélution. Ceci peut être clairement remarqué sur les composantes indépendantes 1 et 2 de la Figure 3A. Cette déformation génère une sous-estimation des largeurs de pics, ce qui engendre une surestimation de la séparation prédite. Des travaux sont en cours afin de palier ce problème.

Néanmoins, les prédictions sont en moyenne très exactes. Le coefficient de corrélation linéaire entre les temps de rétention prédits et observés rapportés sur la

Figure 4
Corrélations obtenues pour les temps de rétention (t_R) prédits et observés, ainsi que pour les temps au début des pics (t_E) et à la fin des pics (t_B).



Nouvelle méthodologie pour le développement automatisé de méthodes analytiques en chromatographie liquide pour l'analyse de mélanges de composés inconnus

N°	pH	T _g (min)	P(S>0)	S prédit (min)	S observé (min)
Optima 1	3,14	30,0	88 %	0,37	-0,25
Optima 2	2,9	30,0	86 %	0,34	-0,09
Optima 3	3,65	30,0	85 %	0,27	0,11
Optima 4	2,9	27,5	80 %	0,26	-0,28
Optima 5	2,9	25,0	77 %	0,19	-0,19
Optima 6	2,9	20,0	70 %	0,10	-0,18

Tableau II

Adéquation entre séparations (S) prédites et observées pour les 6 conditions expérimentales définies à la Figure 5.

Figure 6A est de 0,998. Le chromatogramme enregistré à la condition opératoire optimale 2 (cf. figure 6B) permet également de confirmer que la coélution existant entre les composés 4 et 6 n'empêche pas de quantifier ceux-ci.

Finalement, la majorité des composés ont été identifiés grâce à leur spectre UV. Initialement numéroté de 1 à 9, les composés sont respectivement, l'aténolol, le pindolol, un composé inconnu, la warfarine, l'indoprofène, le naproxène, le propranolol, une impureté de l'acide rétinolique et l'acide rétinolique.

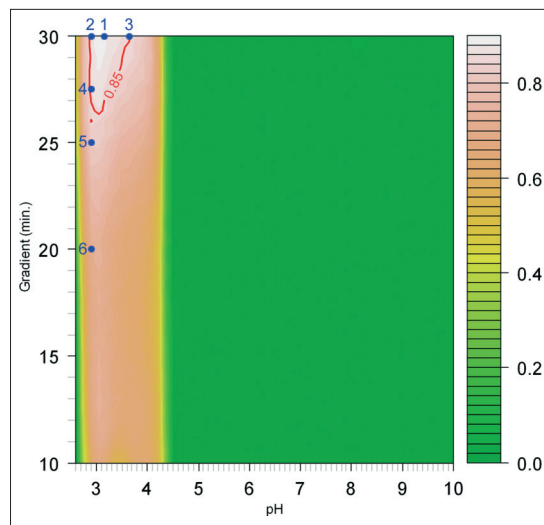
V - Conclusions

L'optimisation automatisée de séparations réalisées en chromatographie liquide constitue la première étape critique dans le domaine du développement automatisé de méthodes chromatographiques. Cette méthodologie qui repose sur les notions de planification expérimentale, d'analyse en composantes indépendantes, de régressions linéaires multiples, de propagation de l'erreur prédictive et de Design Space a été appliquée avec succès pour séparer les composés d'un mélange inconnu. D'autres travaux pourront permettre d'améliorer la qualité des prédictions, grâce à l'amélioration, d'une part, de la modélisation des réponses corrélées, et d'autre part, de la qualité des séparations numériques obtenues par ACI. Quoi qu'il en soit, cette méthodologie globale représente déjà un outil puissant susceptible d'améliorer la qualité et la quantité des résultats fournis par un laboratoire de recherche et/ou d'analyse dans des domaines aussi variés que les sciences biomédicales et pharmaceutiques, l'agroalimentaire, l'industrie chimique, la pharmacognosie et le chimiotaxonomie.

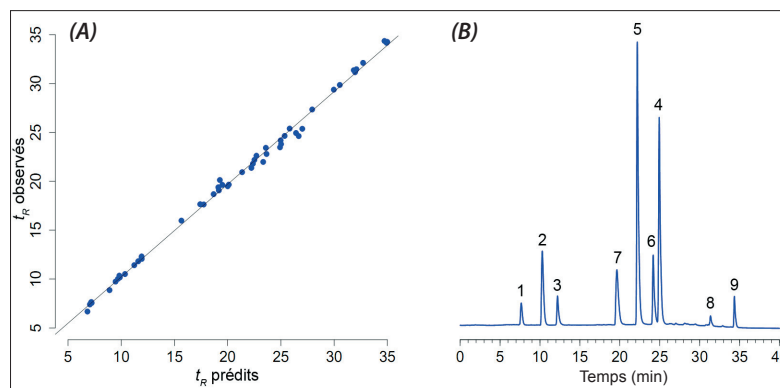
BIBLIOGRAPHIE

- (1) BERGES R., SANZ-NEBOT V., BARBOSA J., Modelling retention in liquid chromatography as a function of solvent composition and pH of the mobile phase, *J. Chromatogr. A*, 2000, 869, 27-39.
- (2) GARCIA-ALVAREZ-COQUE MC, TORRES-LAPASIO JR, BAEZA-BAEZA JJ, Models and objective functions for the optimisation of selectivity in reversed-phase liquid chromatography, *Analytica Chimica Acta*, 2006, 579, 125-145.
- (3) NIKITAS P., PAPPALOUISI A., Retention models for isocratic and gradient elution in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216, 1737-1755.
- (4) SNYDER LR, KIRKLAND JJ, GLAJCH JL, Practical HPLC Method Development, Wiley & Sons, 2nd edn., New York, 1997.
- (5) LEBRUN P., GOVAERTS B., DEBRUS B., CECCATO A., CALIARO G., HUBERT PH, BOULANGER B., Development of a new predictive modelling technique to find with confidence equivalence zone and design space of chromatographic analytical methods, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 2008, 91, 4-16.

- (6) DEWÉ W., MARINI R., CHIAP P., HUBERT PH, CROMMEN J., BOULANGER B., Development of response models for optimising HPLC methods, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 2004, 74, 263-268.
- (7) HYVÄRINEN A., KARHUNEN J., OJA, E., Independent Component Analysis, Wiley, New York, 2001.
- (8) DEBRUS B., LEBRUN P., CECCATO A., CALIARO G., GOVAERTS B., OLSEN BA, ROZET E., BOULANGER B., HUBERT PH, A new statistical method for the automated detection of peaks in UV-DAD chromatograms of a sample mixture, *Talanta*, 2009, 79, 77-85.
- (9) MARTENS H., MARTENS M., Experimental Designs, 2nd edn., Wiley, 2001.


Figure 5

Surface de probabilité d'atteindre $S > 0$ min. Le DS avec un niveau de qualité de 85 % est entouré par la ligne rouge. Les conditions expérimentales en bleu sont numérotées arbitrairement et définissent les conditions optimales testées.


Figure 6

(A) Corrélation entre les temps de rétention prédits et observés pour les chromatogrammes enregistrés aux conditions opératoires optimales (1, 2, 3, 4, 5, 6).
(B) Chromatogramme enregistré à la condition optimale 2.