

## **IV.1. DEVELOPPEMENT**

### **IV.1.1. INTRODUCTION**

Au terme de notre recherche bibliographique, nous avons relevé quelques techniques développées pour la détermination de la pureté énantiomérique du timolol par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en mode normal couplée à une détection spectrophotométrique UV-Vis [209, 215] ou à une détection par spectrométrie de masse [216]. La technique de résonance magnétique nucléaire [217-220] dont les équipements sont onéreux et celle de polarimétrie [218] qui ne convient pas pour quantifier des faibles teneurs en R-timolol, de l'ordre de 0,1% par exemple, sont aussi utilisées.

D'autres techniques ont été développées pour la détermination des autres impuretés du timolol à savoir la chromatographie sur couche mince [209], la chromatographie sur couche mince à haute performance [135] et quelques méthodes de CLHP en mode inversé [221, 222]. Parmi ces dernières, certaines ont été décrites pour la détermination du maléate de S-timolol [223-224].

Cependant, aucune de ces méthodes n'a été prévue pour une séparation simultanée des énantiomères du timolol et des autres impuretés alors qu'une séparation simultanée est très bénéfique en termes de temps et de coût.

Pour répondre à ce besoin, nous comptons développer une méthode de CLHP en mode normal. Au cours de ce développement, nous examinerons les effets possibles des facteurs observés sur les réponses. Dans un premier temps, nous envisageons de sélectionner les facteurs les plus influents ainsi que leurs domaines expérimentaux et ce, au moyen d'une étude univariée. Cette influence est évaluée sur la séparation des énantiomères et des autres composés. Ensuite, puisque que nous nous attendons à avoir un nombre important de facteurs influents et de réponses, une approche chimiométrique incluant l'utilisation d'un plan expérimental sera appliquée et la fonction de désirabilité sera considérée pour trouver des conditions optimales de séparation chromatographique. Les composés sélectionnés pour réaliser cette étude sont les deux énantiomères du timolol, l'isotimolol, le dimère de timolol et le dimorpholinthiadiazole (cf. Figure III.1).

#### IV.1.2. PRÉPARATION DES SOLUTIONS

Différentes solutions mères de S-timolol, de R-timolol, d'isotimolol, du dimère de timolol et de dimorpholinothiadiazole ont été préparées en dissolvant 10 mg de chacune de ces substances dans 10 mL d'un mélange de 2-propanol et de diéthylamine (99/1, v/v). Ensuite, des dilutions subséquentes ont été faites pour obtenir des solutions filles individuelles de chaque substance à la concentration de 10 µg/mL.

Une autre dilution a été effectuée en vue d'obtenir une solution fille contenant le mélange des cinq substances à la concentration de 10 µg/mL.

Les premières solutions filles ont été utilisées pour déterminer l'ordre d'éluion des composés et la seconde pour l'optimisation de la méthode.

#### IV.1.3. RESULTATS ET DISCUSSION

L'objectif poursuivi dans ce chapitre est d'une part, d'évaluer les effets des différents facteurs sur les réponses chromatographiques, et d'autre part, d'optimiser les conditions de CLHP pour une séparation simultanée du S-timolol, du R-timolol et des substances apparentées.

##### IV.1.3.1. ETUDE PRÉLIMINAIRE UNIVARIÉE ET SÉLECTION DES FACTEURS

Cette étape, considérée comme faisant partie de la sélection de méthode, a servi pour évaluer la plupart des facteurs ayant déjà fait l'objet ou non d'une quelconque étude dans les différentes investigations en rapport avec les composés envisagés dans ce travail. L'étude préliminaire a consisté à tester un facteur à la fois en le faisant varier à plusieurs niveaux et à noter l'effet observé sur le temps de rétention des pics chromatographiques correspondant aux différents composés ainsi que la forme de ces pics. L'efficacité de séparation basée sur le nombre de pics observés est aussi utilisée comme critère d'évaluation. Un facteur qualitatif (type d'alcool dans la phase mobile) et quatre facteurs quantitatifs ont fait l'objet de cette étude préliminaire.

Les autres facteurs tels que le débit de la phase mobile, la phase stationnaire chirale et les dimensions de la colonne, étaient maintenus constants.

Comme le montre le tableau IV.1., un seul facteur qualitatif, le 2-propanol (1 %), a retenu notre attention. En effet, le nombre de pics élués était plus élevé qu'avec l'éthanol, plus éluant que le 2-propanol et donc moins favorable dans ce cas-ci. L'étude univariée a montré que deux facteurs quantitatifs, la température de thermostatisation de la colonne et la proportion du 2-propanol dans la phase mobile, présentaient des résultats intéressants. Pour la diéthylamine nous n'avons observé qu'un très léger changement des temps de rétention et de la forme des pics.

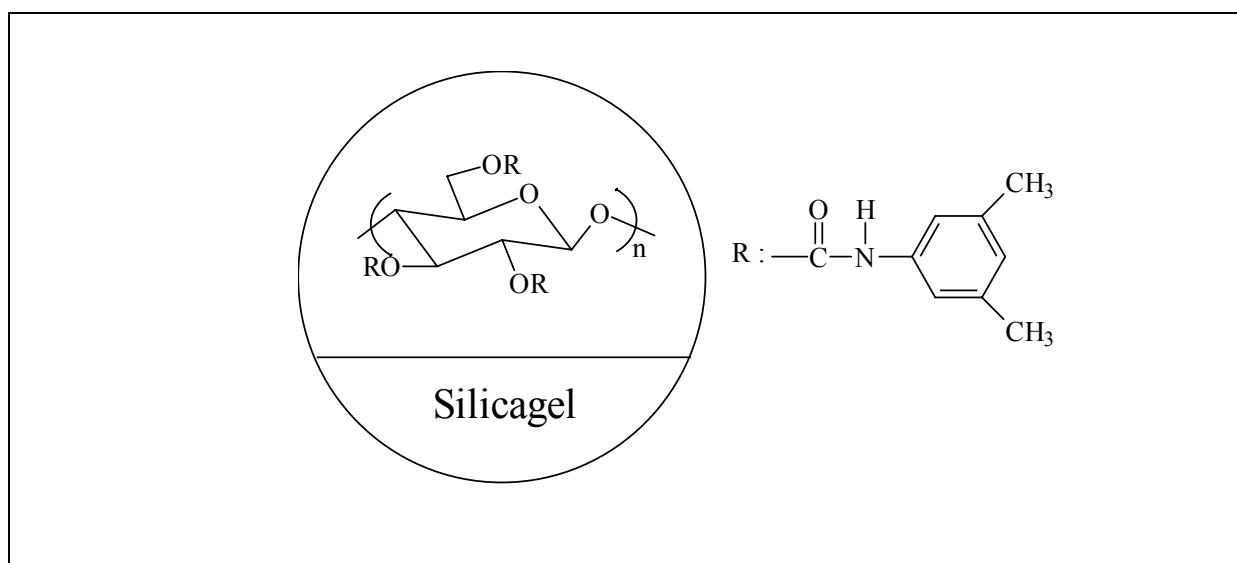
**Tableau IV.1. – Résumé de l'étude préliminaire univariée**

Facteurs	Niveaux	Effets observés
* Type d'alcool	2-propanol : Ethanol :	4 pics observés pour 5 composés. 3 pics observés pour 5 composés.
* Température	12°C : 37°C :	Co-élution des pics de R-timolol et du dimère de timolol. Co-élution des pics de R-timolol et de l'isotimolol.
* Proportion du 2-propanol (% , v/v)	1 % : 10 % :	Pic du DMTDZ non observé jusqu'à 60 min; 4 pics observés pour 5 composés. Excepté le DMTDZ, tous les composés sont quasi non séparés.
* Proportion de la diéthylamine (% , v/v)	de 0,1 % à 0,5 % :	Très léger changement des temps de rétention mais assez significatif pour le S-timolol et le DMTDZ seulement. Légère amélioration de la forme des pics.

Légende : DMTDZ = dimorpholinothiadiazole

L'étude préliminaire univariée nous a permis également de fixer les domaines expérimentaux pour chaque facteur sélectionné sur la base des contraintes chromatographiques et des spécifications instrumentales.

En effet, des conditions opératoires inappropriées et parfois inacceptables ont été relevées. Par exemple, lorsqu'on utilise des phases mobiles contenant des proportions de 2-propanol en dessous de 1 % ou au dessus de 10 %. On observe dans le premier cas un temps d'analyse au-delà de 60 minutes pour le dernier pic élué, ce qui est inacceptable d'un point de vue de la séparation analytique, et dans le second, une élévation de la pression de la colonne au-delà des valeurs maximum tolérées par la phase stationnaire chirale (PSC) (700 psi). Cette situation est inappropriée en particulier pour les PSC du type cellulose tris(3,5-diméthylphénylcarbamate) (Figure IV.1.). En effet, ces PSC sont simplement adsorbées sur des particules de silice, ce qui diminue fortement leur capacité à résister aux fortes pressions exercées par la composition et le débit de la phase mobile. Il est dès lors indispensable de prendre des précautions lors de l'utilisation de ces PSC en vue d'éviter leur désorganisation spatiale. Celle-ci présente comme conséquences la perte de l'efficacité de la séparation et le vieillissement accéléré de la PSC [227]. En dehors de ces précautions d'utilisation de faibles proportions en modificateur organique, il est fortement conseillé lors de la première utilisation d'augmenter progressivement le débit de la phase mobile pour atteindre la valeur indiquée. Les nouvelles générations de PSC dénommées OD-H (H de « high performance » en anglais ou haute performance) présentent une efficacité élevée pour la séparation chromatographique suite à l'augmentation de la surface de contact par la réduction du diamètre des particules à 5  $\mu\text{m}$ , ce qui occasionne par ailleurs une élévation de la pression au sein du système chromatographique.



**Figure IV.1.** – Structure de la cellulose tris(3,5-diméthylphénylcarbamate) adsorbée sur des particules de silice (5  $\mu\text{m}$ )

Les proportions de la diéthylamine ont été sélectionnées en suivant les recommandations du fabricant de la phase stationnaire [227]. En effet la DEA doit être utilisée à des concentrations les plus faibles possibles car au-delà de 0,5 %, elle pourrait se révéler néfaste pour la PSC en la détériorant et causer ainsi une perte d'efficacité de séparation. L'effet compétiteur de l'amine est observé déjà à partir de 0,1 %.

Quant à la température de thermostatisation de la colonne, des valeurs en dessous de 15°C ne peuvent simplement pas être atteintes aussi facilement en routine avec les équipements usuels. De plus, il faudrait des conditions supplémentaires (température conditionnée) au niveau du local de travail. Au dessus de 40°C, valeur correspondant au maximum pour les conditions opératoires indiquées par le fabricant de la colonne [227], nous n'avons pas observé de changement significatif dans l'ordre d'éluion ni dans le temps de rétention des pics.

Ainsi, sur la base des résultats de cette l'étude préliminaire univariée, la température de la colonne ( $X_1$ ), la proportion de la diéthylamine (DEA) ( $X_2$ ) et celle du 2-propanol ( $X_3$ ) ajoutées dans la phase mobile ont été sélectionnées comme facteurs pour l'optimisation de la méthode. La DEA a été retenue comme facteur opératoire surtout à cause de son effet compétiteur indispensable pour cette séparation, étant donné le caractère basique des

composés concernés dans ce travail. De plus, il serait intéressant d'examiner ses effets quadratiques potentiels et ses interactions avec d'autres facteurs sur les réponses.

#### **IV.1.3.2. DOMAINE EXPERIMENTAL ET SELECTION DES REPONSES**

Les trois facteurs sélectionnés dans l'étape précédente sont testés à trois niveaux comme indiqués dans le tableau IV.2.

Dans des situations où une inversion de l'ordre d'élution des pics est susceptible de survenir, la résolution n'est plus indiquée comme réponse pour la modélisation. En effet, les outils mathématiques usuels ne conviennent pas pour établir une relation modélisable entre cette réponse et les facteurs étudiés. Dans ce cas, il convient de transiter via les réponses directement modélisables qui permettent d'estimer les réponses non modélisables.

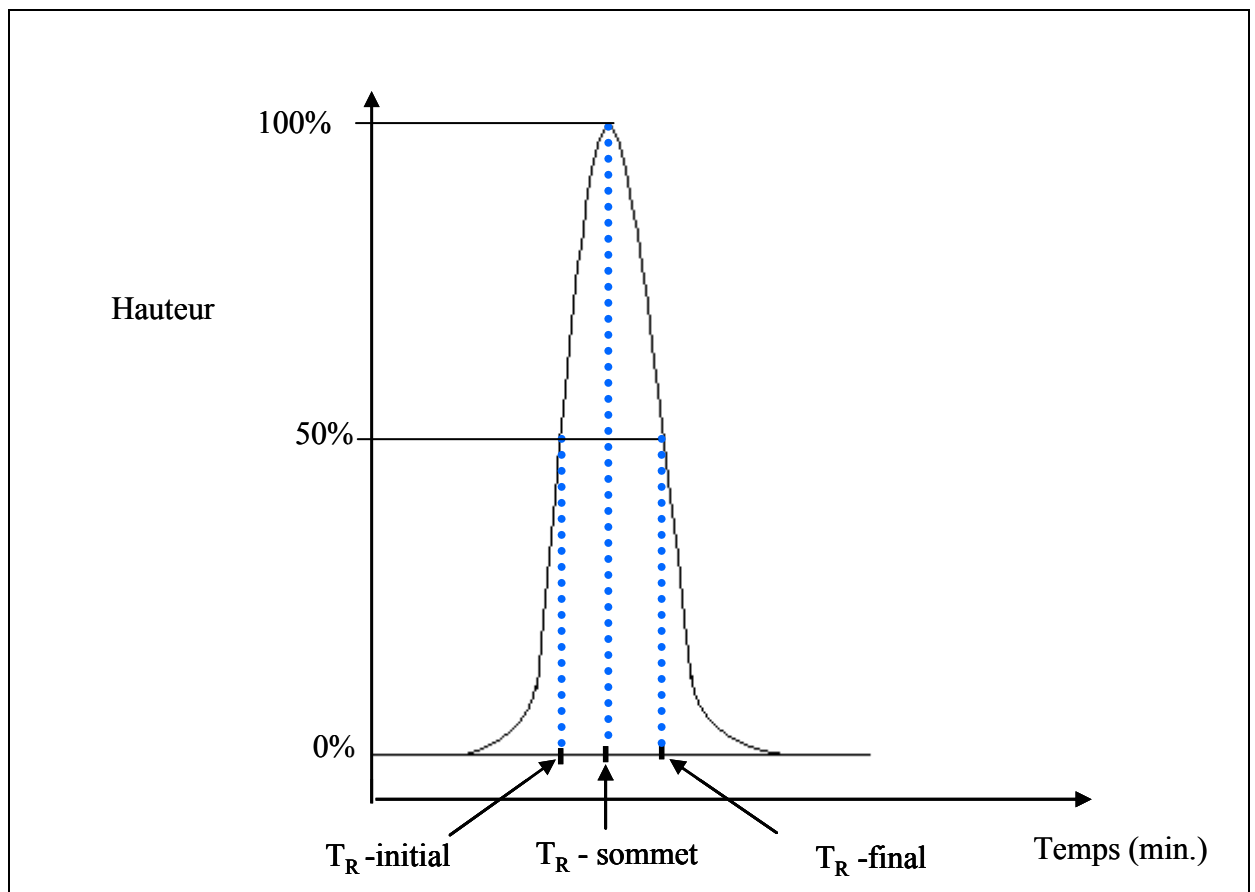
*Tableau IV.2. – Domaine expérimental*

<b>Facteurs quantitatifs</b>	<b>Niveau inférieur (-1)</b>	<b>Niveau central (0)</b>	<b>Niveau supérieur (+1)</b>
Température de la colonne (°C); $X_1$	15,0	22,5	30,0
Proportion de la DEA dans la phase mobile (%); $X_2$	0,1	0,3	0,5
Proportion du 2-propanol (%); $X_3$	2,0	5,0	8,0

Puisque lors de l'étude préliminaire univariée nous avons observé une co-élution des paires de pics de R-timolol / isotimolol et de S-timolol / dimorpholinothiadiazole, il est tout à fait possible d'observer une inversion de l'ordre d'élution des pics lors de l'étude multivariée. Par conséquent, nous avons sélectionné comme réponses les temps de rétention des pics chromatographiques correspondant au dimère de timolol, au R-timolol, à l'isotimolol, au S-

timolol et au dimorpholinothiadiazole (DMTDZ). Toutefois, étant donné que la résolution demeure le paramètre fréquemment utilisé comme critère pour juger de la qualité d'une séparation chromatographique et électrophorétique, nous envisageons d'effectuer une modélisation par approche indirecte en considérant les trois temps d'un pic chromatographique comme illustré dans la figure IV.2., ce qui nous permettra de calculer la résolution.

Du fait que le facteur de rétention  $k'$  d'un pic chromatographique associé à son temps de rétention au sommet du pic présente une distribution logarithmique normale [13], les trois temps associés aux pics des cinq composés seront préalablement transformés en logarithme népérien avant leur modélisation.



**Figure IV.2.** – Temps de rétention ( $t_R$ ) correspondant au sommet du pic ( $t_R$  sommet), à la largeur à mi-hauteur de la montée ( $t_R$  initial) et de la descente ( $t_R$  final) du pic.

La modélisation par approche indirecte a été faite en deux étapes. La première a consisté à modéliser les trois temps associés aux cinq pics chromatographiques issus de la réalisation des expériences et dans la seconde étape, différentes réponses d'intérêt ont été estimées à partir de ces trois temps modélisés.

#### **IV.1.3.3. MODELISATION ET PLAN D'EXPERIENCES**

Avant d'exécuter la première étape, nous avons d'abord défini le modèle mathématique qui sera utilisé en vue d'examiner la relation entre les différentes réponses sélectionnées, à savoir les logarithmes népériens ( $\ln$ ) des trois temps de rétention correspondant aux cinq pics chromatographiques, et les facteurs sélectionnés. Le modèle de régression multiple présenté dans l'équation IV.1. a été utilisé pour les quinze réponses et comporte 10 coefficients ( $\beta_0$  l'ordonnée à l'origine,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_3$  les effets principaux,  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$  et  $\beta_{33}$  les termes quadratiques et  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$  et  $\beta_{23}$  les termes d'interaction de premier ordre entre facteurs).

$$\ln_{TR} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \varepsilon \quad (\text{IV.1}).$$

Dans cette équation,  $X_1$  représente la température de thermostatisation de la colonne,  $X_2$  la proportion de la diéthylamine dans la phase mobile,  $X_3$  la proportion du 2-propanol dans la phase mobile et  $\varepsilon$  l'erreur résiduelle.

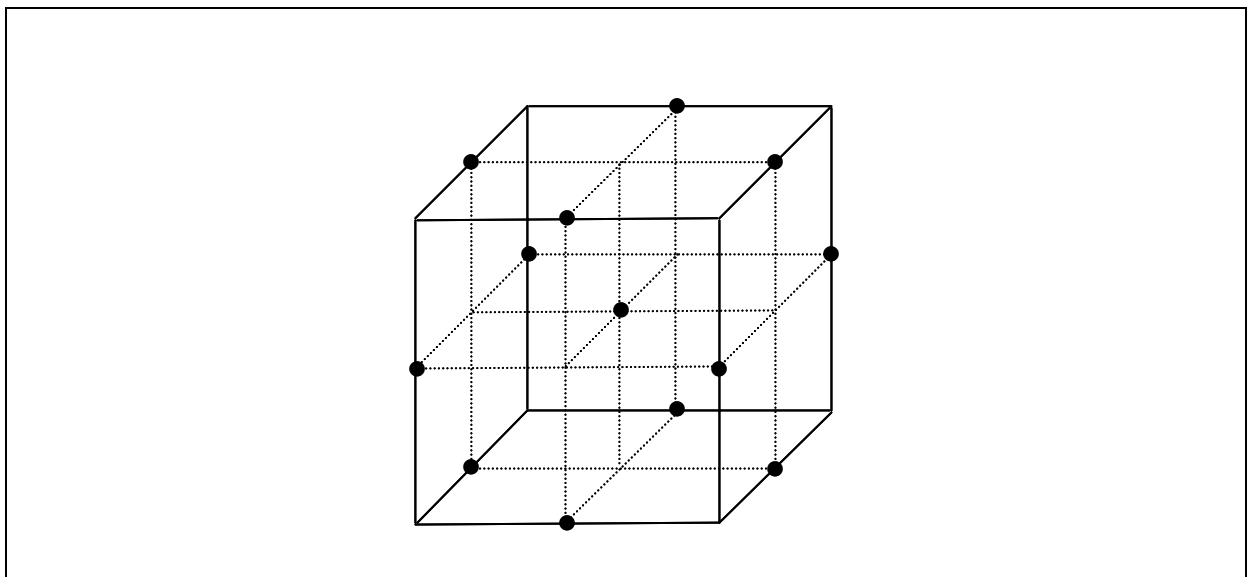
Pour réaliser les expériences, nous avons sélectionné le plan expérimental à trois niveaux de Box-Behnken. Le plan de Box-Behnken convient bien pour cette situation. En effet, c'est un plan factoriel incomplet à trois niveaux [10, 228]. Comme le montre la figure IV.3., sa construction est faite en combinant un plan factoriel comportant  $k$  facteurs et  $p$  niveaux ( $2^{k-p}$ ) avec un plan de type « bloc balancé incomplet » de façon à obtenir un plan à trois niveaux. La particularité de cette combinaison est qu'elle permet la rotation du plan tout en évitant les sommets du cube.

Ce type de plan ne présentant pas de points axiaux permet l'exécution des expériences dans des zones expérimentales tout à fait praticables du point de vue analytique. Il en est de



même pour les points extrêmes qui ne sont jamais exécutés simultanément, ce qui est un avantage considérable pour la réalisation des expériences impliquant des facteurs quantitatifs et pour lesquels certaines expériences sont des contraintes, comme dans le cas présent [10, 20, 27, 228-231].

De plus, ce plan comporte un nombre limité d'expériences comme l'indique le tableau IV.3. On note un total de 15 points expérimentaux exécutés de manière randomisée et répartis en 12 expériences plus 3 répétitions au niveau central.



*Figure IV.3. - Plan de Box-Behnken pour trois facteurs*

Avant chaque expérience, la phase stationnaire a été conditionnée et équilibrée avec la phase mobile correspondante pendant au moins 3 heures. Chaque expérience a été répétée deux fois et pour chaque réponse la moyenne a été considérée.

En considérant le modèle de régression multiple associé à chaque réponse sélectionnée, il en résulte un total de 225 équations (15 réponses x 15 points expérimentaux) à modéliser et à partir desquelles les effets principaux, les termes quadratiques et les termes d'interaction de premier ordre entre facteurs sont évalués.

Chaque équation a été ajustée selon la méthode des moindres carrés ordinaires, ce qui a permis d'estimer les coefficients à partir de données expérimentales collectées.

**Table IV.3. – Plan d'expériences**

<b>Expériences</b>	<b>Température</b>	<b>Diéthylamine</b>	<b>2-propanol</b>
1	15,0 °C	0,1 %	5,0 %
2	30,0 °C	0,1 %	5,0 %
3	15,0 °C	0,5 %	5,0 %
4	30,0 °C	0,5 %	5,0 %
5	15,0 °C	0,3 %	2,0 %
6	30,0 °C	0,3 %	2,0 %
7	15,0 °C	0,3 %	8,0 %
8	30,0 °C	0,3 %	8,0 %
9	22,5 °C	0,1 %	2,0 %
10	22,5 °C	0,5 %	2,0 %
11	22,5 °C	0,1 %	8,0 %
12	22,5 °C	0,5 %	8,0 %
13	22,5 °C	0,3 %	5,0 %
14	22,5 °C	0,3 %	5,0 %
15	22,5 °C	0,3 %	5,0 %

#### **IV.1.3.4. EVALUATION DES EFFETS DES FACTEURS**

La qualité de chaque modèle considéré a été évaluée par la fraction de variation de réponse expliquée par le modèle ( $R^2$ ). Toutes les valeurs de  $R^2$  obtenues étaient au dessus de 0,99, ce qui démontre la qualité de l'ajustement.

Des calculs statistiques ont été effectués en vue d'estimer les significations des effets des facteurs. Le tableau IV.4. présente les valeurs de  $p$  au seuil d'incertitude de 5 % correspondant aux trois temps associés aux cinq pics chromatographiques.

La valeur de  $p$  ou probabilité de dépassement est le risque  $\alpha$  de se tromper en rejetant l'hypothèse selon laquelle il n'y a aucun effet observé sur la réponse. Si la valeur de  $p$  ( $p$ -value) est inférieure à 0,05, il y a un effet significatif qui se traduit par l'existence d'une

relation linéaire ou quadratique entre la réponse considérée et le facteur concerné, ou l'existence d'une interaction entre deux facteurs concernés sur la réponse considérée.

*Tableau IV.4. – Signification statistique (p-values) des effets principaux, quadratiques et des interactions*

Composés	Termes	Temps de rétention		
		sommet	initial	final
<b>Dimère de timolol</b>	$\beta 0$	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
	$\beta 1$	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
	$\beta 2$	0,3190	0,5363	0,2963
	$\beta 3$	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
	$\beta 11$	0,6488	0,8168	0,6029
	$\beta 12$	0,6418	0,6655	0,7401
	$\beta 13$	0,1231	0,2154	0,1498
	$\beta 22$	0,6049	0,6797	0,4924
	$\beta 23$	0,2192	0,6018	0,1866
	$\beta 33$	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
<b>R-timolol</b>	$\beta 0$	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
	$\beta 1$	0,0110	0,0142	0,0091
	$\beta 2$	0,4010	0,4057	0,3702
	$\beta 3$	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
	$\beta 11$	0,7614	0,8619	0,7906
	$\beta 12$	0,7427	0,7896	0,7299
	$\beta 13$	0,6997	0,6112	0,6869
	$\beta 22$	0,2805	0,3184	0,2570
	$\beta 23$	0,8818	0,8815	0,9095
		$\beta 33$	< 0,0001	< 0,0001

<b>Isotimolol</b>	$\beta$ 0	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
	$\beta$ 1	<b>0,0010</b>	<b>0,0012</b>	<b>0,0008</b>
	$\beta$ 2	0,1914	0,2775	0,1638
	$\beta$ 3	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
	$\beta$ 11	0,8082	0,9005	0,8107
	$\beta$ 12	0,8432	0,8598	0,8632
	$\beta$ 13	0,5865	0,7052	0,5301
	$\beta$ 22	0,2378	0,2771	0,2160
	$\beta$ 23	0,7051	0,4992	0,7650
	$\beta$ 33	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>S-timolol</b>	$\beta$ 0	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
	$\beta$ 1	<b>0,0125</b>	<b>0,0130</b>	<b>0,0117</b>
	$\beta$ 2	0,9579	0,9617	0,9356
	$\beta$ 3	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
	$\beta$ 11	0,6002	0,6001	0,5917
	$\beta$ 12	0,4997	0,4915	0,5061
	$\beta$ 13	0,7273	0,7401	0,7111
	$\beta$ 22	0,2180	0,2233	0,2079
	$\beta$ 23	0,9498	0,9478	0,9409
	$\beta$ 33	<b>0,0011</b>	<b>0,0010</b>	<b>0,0011</b>
<b>DMTDZ</b>	$\beta$ 0	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
	$\beta$ 1	<b>0,0002</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0003</b>
	$\beta$ 2	0,4400	0,4288	0,4452
	$\beta$ 3	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
	$\beta$ 11	0,3891	0,3905	0,3861
	$\beta$ 12	0,7453	0,7430	0,7529
	$\beta$ 13	0,6684	0,6717	0,6621
	$\beta$ 22	0,0898	0,0089	0,0912
	$\beta$ 23	0,9858	0,9859	0,9768
	$\beta$ 33	<b>0,0386</b>	<b>0,0363</b>	<b>0,0413</b>

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

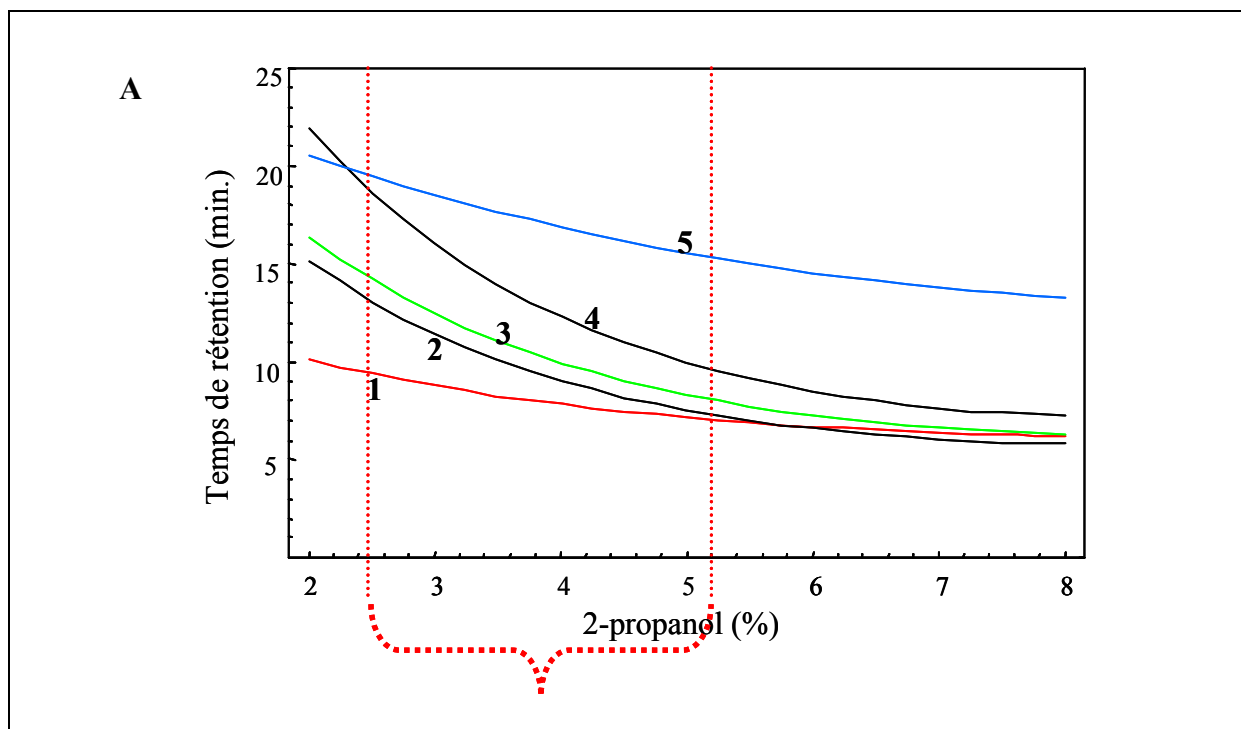
A la lumière des résultats présentés dans le tableau IV.4., il existe une relation linéaire et une relation quadratique entre le 2-propanol et les différents logarithmes de tous les temps associés aux cinq pics (valeurs de  $p$  pour  $\beta_3$  et  $\beta_{33}$  significatives au seuil de 5 %).

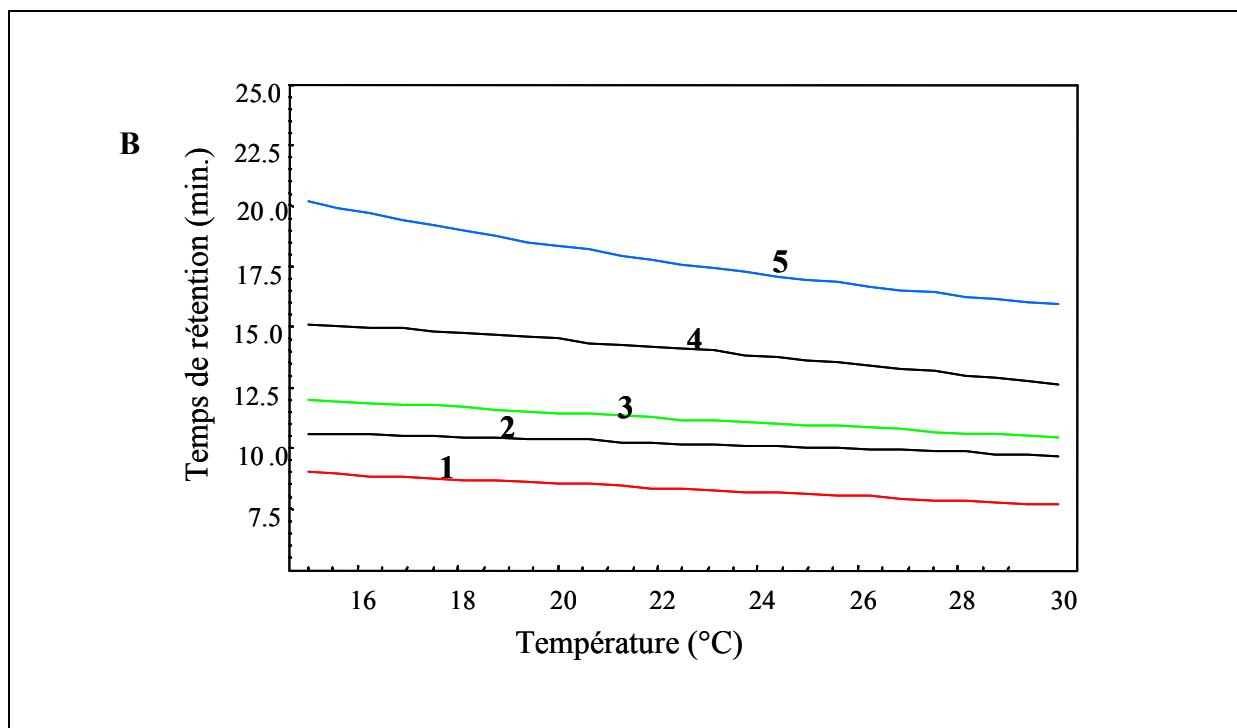
D'autre part, une relation linéaire a été observée entre la température de thermostatisation de la colonne et les différents logarithmes de tous les temps associés aux cinq pics (valeurs de  $p$  pour  $\beta_1$  significatives au seuil de 5 %). Aucun effet quadratique de ce facteur n'a été observé sur les différentes réponses (valeurs de  $p$  pour  $\beta_{11}$  non significatives au seuil de 5 %).

Pour la diéthylamine, aucun effet linéaire ni quadratique n'a été observé sur les différents logarithmes de tous les temps associés aux cinq pics (valeurs de  $p$  pour  $\beta_2$  et  $\beta_{22}$  non significatives au seuil de 5 %). De plus, aucune interaction entre les différents facteurs n'a été notée au seuil d'incertitude de 5 %.

Aussi pour l'optimisation, la proportion du 2-propanol et la température ont été considérées, la diéthylamine étant maintenue à sa valeur du niveau inférieur du domaine expérimental.

Ensuite, les trois temps de rétention pour chaque pic ont été dérivés à partir des modèles (voir Figure IV.4.).





**Figure IV.4.** – Evolution des temps de rétention prédits au sommet des différents pics en fonction de la proportion du 2-propanol (A) et de la température (B)

**A :** Température à 22,5°C et DEA à 0,1 %, **B :** 2-propanol à 5,0 % et DEA à 0,1 %.

**Courbes :** 1. Dimère de timolol – 2. R-timolol – 3. isotimolol – 4. S-timolol – 5. DMTDZ.

L'examen des figures IV.4.A. et IV.4.B. montre que:

- les temps de rétention au sommet des pics du R-timolol, de l'isotimolol et du S-timolol décroissent beaucoup plus rapidement que ceux du dimère de timolol et du DMTDZ lorsque la concentration du 2-propanol est augmentée jusqu'à 5 %.
- A des proportions de 2-propanol proches de 2,5 %, une co-élution des pics correspondant au S-timolol et au DMTDZ est observée.
- Une autre co-élution est aussi remarquée pour les pics correspondant au dimère de timolol et au R-timolol lorsque la proportion du 2-propanol est aux alentours de 5,5 %.
- Au dessus de cette concentration, les temps de rétention au sommet des pics du dimère de timolol, du R-timolol et de l'isotimolol sont proches.

Lors de l'étude préliminaire univariée, nous avons déjà mentionné le risque de l'obtention du phénomène d'inversion de l'ordre d'élution.

En conséquence, l'intervalle de concentration allant de 2,5 à 5,5 % a été considéré comme zone optimale pour le 2-propanol et ce, à la valeur du niveau central de la température.

D'autre part, une légère diminution des temps de rétention aux sommets des cinq composés a été observée avec l'augmentation de la température de thermostatisation de la colonne. Aucune co-élution de pics n'a été observée avec ce facteur.

La seconde étape de l'approche indirecte est basée sur le fait que les réponses chromatographiques sont fonction des trois temps associés aux cinq composés. Par conséquent, l'estimation de ces différentes réponses, qui par ailleurs sont des réponses d'intérêt, sera obtenue par le remplacement des temps de rétention par leurs estimations respectives [24]. Ainsi, puisque les temps de rétention prédits à partir des facteurs testés permettent à leur tour de prédire les réponses d'intérêt, il sera possible d'envisager la prédiction des conditions chromatographiques optimales correspondant aux facteurs sélectionnés et testés.

#### **IV.1.3.5. OPTIMISATION DES CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES**

##### IV.1.3.5.1. Sélection des réponses d'intérêt

La qualité d'une méthode est évaluée selon des réponses en fonction des objectifs assignés à cette méthode. Quatre réponses d'intérêt ont été définies en vue de juger la qualité de la méthode chromatographique:

- la résolution minimum ( $R_{S_{\min}}$ ) entre tous les pics consécutifs. Elle est très importante pour évaluer la qualité globale d'une séparation chromatographique.
- Le temps de rétention ( $t_{R_{\max}}$ ) au sommet du dernier pic duquel dépend le temps de la séparation analytique,
- la résolution entre la paire des pics énantiomériques ( $R_{S_{2-4}}$ ). Cette réponse d'intérêt est fonction des spécifications de la Pharmacopée Européenne.
- La résolution entre le pic du produit parent (S-timolol) et celui éluant juste après (DMTDZ) ( $R_{S_{4-5}}$ ). L'objectif de la méthode étant de déterminer aussi bien l'impureté chirale que les autres impuretés du S-timolol dont le DMTDZ, il est indispensable de considérer la problématique liée à son élution. En effet, pour déterminer les impuretés, on utilise des solutions très concentrées du produit parent, ce qui, dans les techniques de séparation, occasionne souvent des

phénomènes de traînée du pic correspondant, pouvant devenir gênant pour la visualisation, l'intégration des pics d'impuretés éluant après, et donc pour leur quantification. Il sera important de définir une résolution suffisamment élevée entre les pics du produit parent et celui de l'impureté éluant après.

Ces quatre réponses ont été sélectionnées pour prédire les conditions de CLHP qui satisfont aux spécifications pour la séparation énantiomérique telle que décrite dans la monographie du maléate de timolol (valeur minimale de 4,0 pour la  $Rs_{2-4}$ ) [209] et aussi permettent une quantification adéquate du composé éluant en dernier lieu (DMTDZ) (valeur minimale de 5,0 jugée acceptable pour la  $Rs_{4-5}$ ) dans des échantillons de maléate de S-timolol et ce, en un temps d'analyse acceptable.

Ces réponses ont été calculées en utilisant les équations suivantes :

$$\hat{R}s_{\text{Min}} = \underset{\substack{\text{Pics } i,j \\ i \neq j}}{\text{Min}} (\hat{R}s_{ij}) \quad (\text{IV.2})$$

$$\hat{R}s = 1,18 \times \left( \frac{\hat{t}_{R,B} - \hat{t}_{R,A}}{\hat{w}_{(0,5)A} + \hat{w}_{(0,5)B}} \right) \quad (\text{IV.3})[209]$$

$$\hat{t}_{R,\text{Max}} = \underset{\text{Pic } i}{\text{Max}} (\hat{t}_{R,i}) \quad (\text{IV.4})$$

ou  $\hat{R}s_{\text{Min}}$  est la valeur minimale obtenue pour la résolution entre les pics  $i$  et  $j$ ,  
 $\hat{t}_{R,A}$  et  $\hat{t}_{R,B}$  les valeurs estimées des temps de rétention des pics A et B,  
 $\hat{w}_{(0,5)A}$  et  $\hat{w}_{(0,5)B}$  les valeurs estimées de largeurs à mi-hauteur des pics A et B,  
 $\hat{t}_{R,\text{Max}}$  la valeur estimée du temps de rétention au sommet du dernier pic.

#### IV.1.3.5.2. Fonction de désirabilité

Lorsqu'il y a plusieurs réponses à optimiser, et en particulier lorsque ces réponses ont toutes la même importance, il est indiqué d'optimiser les conditions opératoires en se servant des critères de décision [25, 26, 29].

La fonction de désirabilité de Derringer a été définie pour chaque réponse d'intérêt. L'optimisation a été accomplie en calculant la désirabilité individuelle ( $d_i$ ) pour chaque



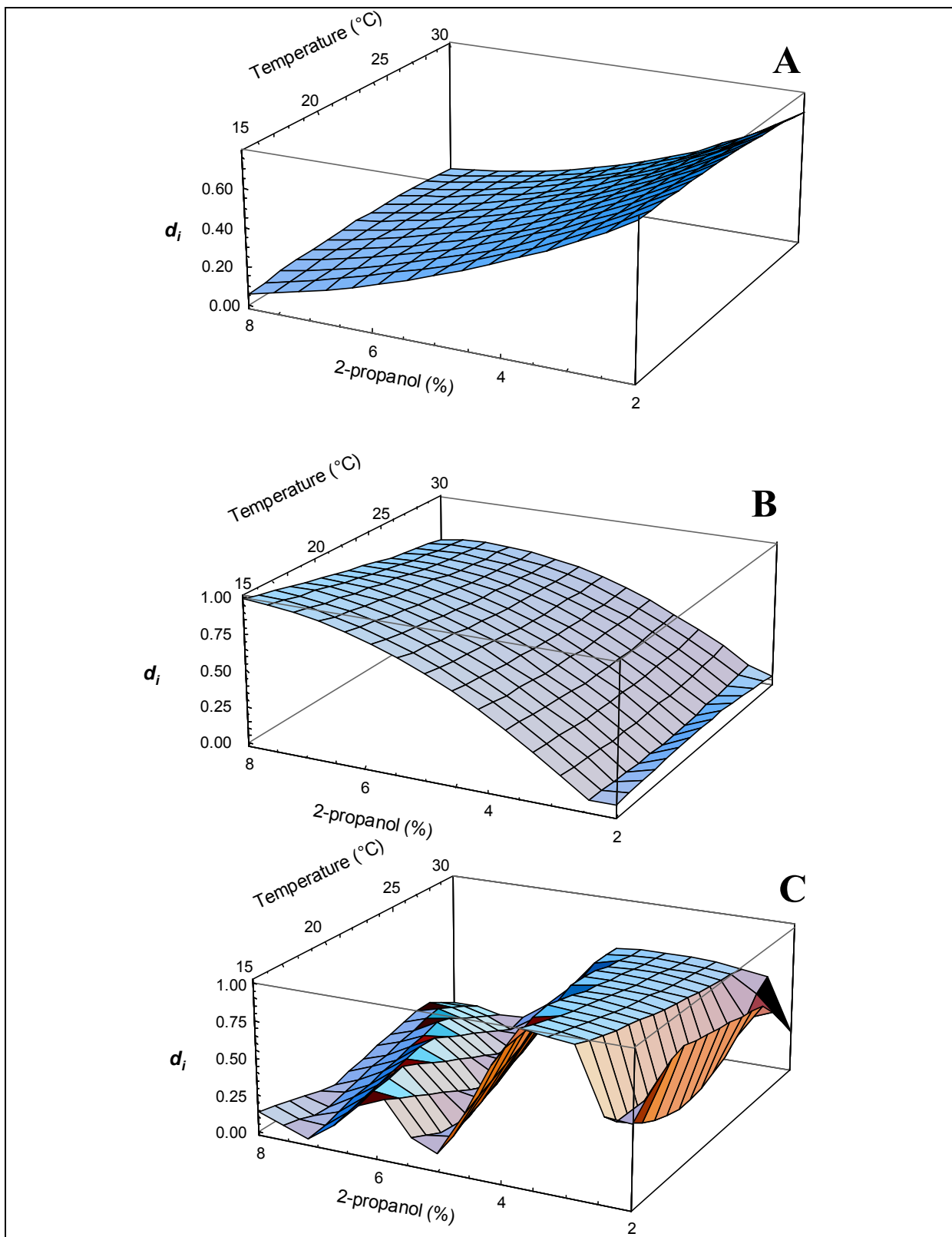
réponse. Ensuite, les valeurs de  $d_i$  obtenues ont été combinées en vue de calculer leur moyenne géométrique, c'est-à-dire la désirabilité combinée ou globale ( $D$ ). En maximisant  $D$ , les valeurs optimales des facteurs peuvent être déduites. Les réponses complètement indésirables ( $d_i = 0$ ) et celles totalement désirables ( $d_i = 1$ ) pour  $R_{S_{Min}}$ ,  $R_{S_{2-4}}$ ,  $R_{S_{4-5}}$  and  $t_{R_{Max}}$  ont été fixées et sont présentées dans le tableau IV.5. Les calculs ont été effectués au moyen du logiciel Mathematica 4.0.

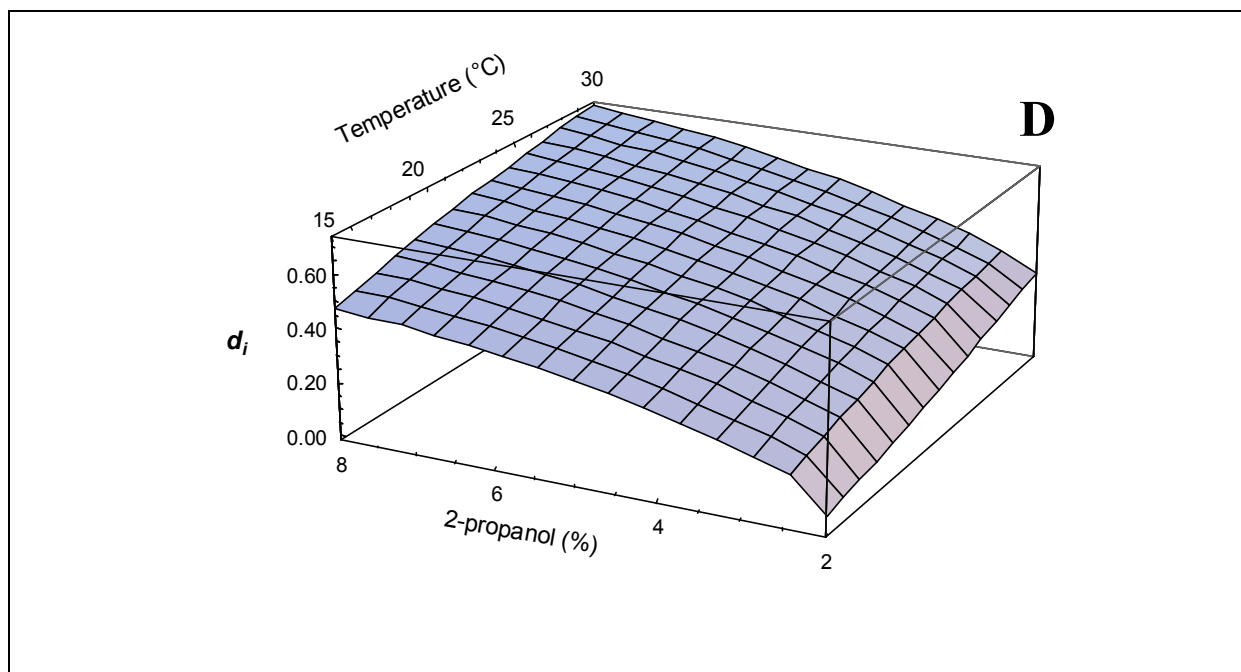
**Tableau IV.5. - Valeurs de désirabilité pour les réponses d'intérêt**

	Désirabilité = 1	Désirabilité = 0
$R_{S_{Min}}$	> 2.0	< 1.5
$R_{S_{2-4}}$	> 5.0	< 4.0
$R_{S_{4-5}}$	> 5.0	< 4.0
$t_{R_{Max}}$	< 20 min.	> 25 min.

Le but de l'optimisation est d'obtenir une séparation chromatographique en un temps d'analyse ciblé à 20 minutes avec des résolutions cibles d'au moins 2 entre les pics adjacents, et plus spécifiquement d'au moins 5 pour la paire énantiomérique et la paire S-timolol/DMTDZ. Pour y parvenir,  $R_{S_{Min}}$ ,  $R_{S_{2-4}}$  et  $R_{S_{4-5}}$  doivent être à leur maximum alors que  $t_{R_{Max}}$  est à son minimum, ce qui correspond aux désirabilités proches de 1 (Tableau IV.5.). Une interpolation linéaire a été utilisée pour obtenir les valeurs de  $d_i$  entre 0 et 1.

Différentes surfaces de diagrammes de la désirabilité ont été obtenues pour les différentes réponses d'intérêt et sont présentées dans la figure IV.5.





**Figure IV.5.** – Désirabilités individuelles pour la  $R_{S2-4}$  (A), la  $R_{S4-5}$  (B), la  $R_{S_{Min}}$  (C) et le  $T_{R_{Max}}$  (D) à 0,1 % de diéthylamine.

Comme le montre la figure IV.5.A., des valeurs élevées de  $d_i$  pour la résolution de la paire énantiomérique ( $R_{S2-4}$ ) ont été observées surtout aux alentours de 2 % en 2-propanol. Pour ce facteur, des concentrations au dessus de 4 % correspondent à de moins bonnes valeurs de désirabilité. D'autre part, le facteur température ne présente qu'une faible influence.

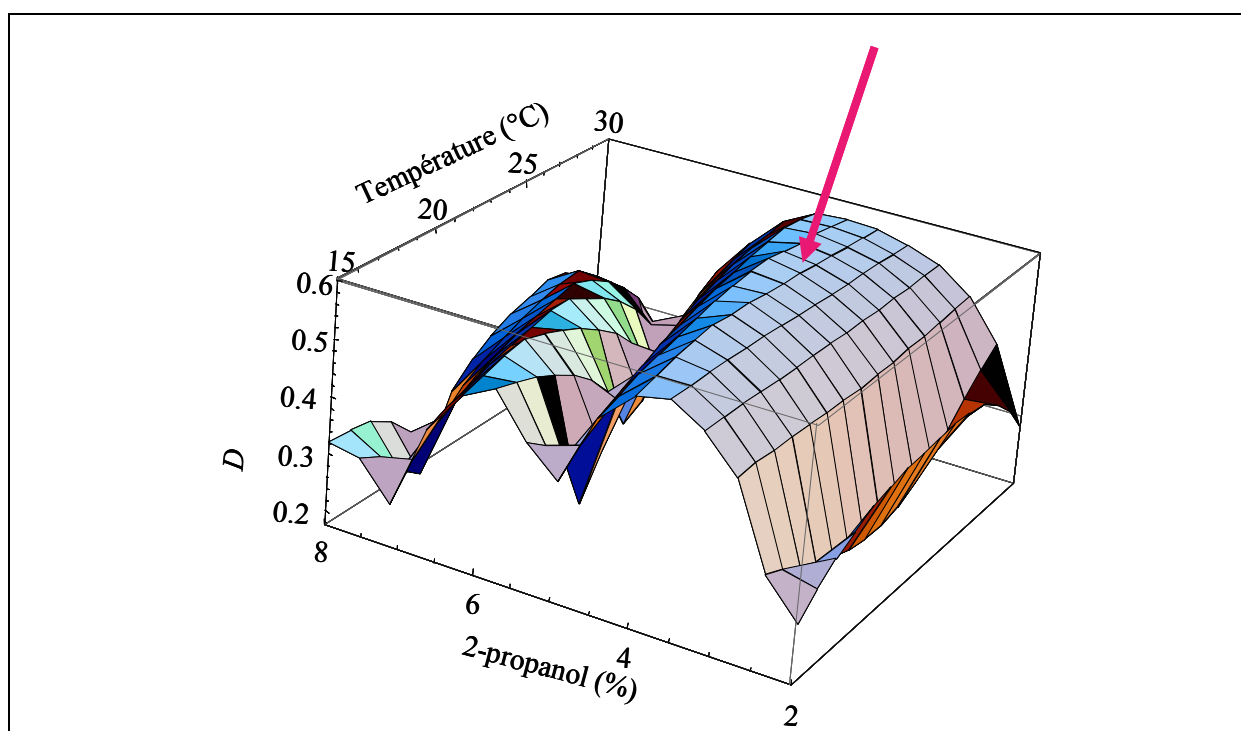
Dans la figure IV.5.B. en opposition avec les valeurs de  $d_i$  pour  $R_{S2-4}$ , les valeurs désirables ont été observées surtout à des concentrations élevées en 2-propanol pour la  $R_{S4-5}$ . Des faibles valeurs de  $d_i$  ont été observées aux alentours de 2,5 %, en raison de la co-élution des pics correspondant au S-timolol et au DMTDZ. Ce phénomène a été prédit dans la figure IV.4.A. suite à l'allure des courbes. D'autre part, un effet significatif du facteur température a été observé sur la  $R_{S4-5}$  seulement aux concentrations élevées en 2-propanol. En effet, des valeurs de  $d_i$  proche de 1 ont été notées à des faibles températures.

La figure IV.5.C. montre que les deux facteurs, 2-propanol et température, ont des effets significatifs sur le  $R_{S_{Min}}$ . Ces effets sont variables selon la zone du diagramme. Un plateau comprenant des valeurs de  $d_i$  proche de 1 a été observé aux pourcentages de 2-propanol entre 2,5 et 4,0 %. La grandeur de ce plateau était plus importante aux températures supérieures à 20°C. Des proportions autour de 2,5 % de 2-propanol montrent une faible valeur de  $d_i$  liée à une co-élution des pics correspondant au S-timolol et au DMTDZ telle que prédite

dans la figure IV.3.A. Ces valeurs de  $d_i$  décroissent également suite à la co-élution des pics correspondant au dimère de timolol et à l'isotimolol lorsque le pourcentage du 2-propanol est plus grand que 4,0 %. Aux alentours de 8 % en 2-propanol, des faibles valeurs de  $d_i$  correspondent à la diminution de toutes les résolutions entre les différentes paires de pics consécutifs, excepté celle entre la paire 4-5.

Enfin, dans la figure IV.5.D., les valeurs élevées de  $d_i$  pour le  $t_{RMax}$  sont observées aux concentrations élevées de 2-propanol et à des températures élevées.

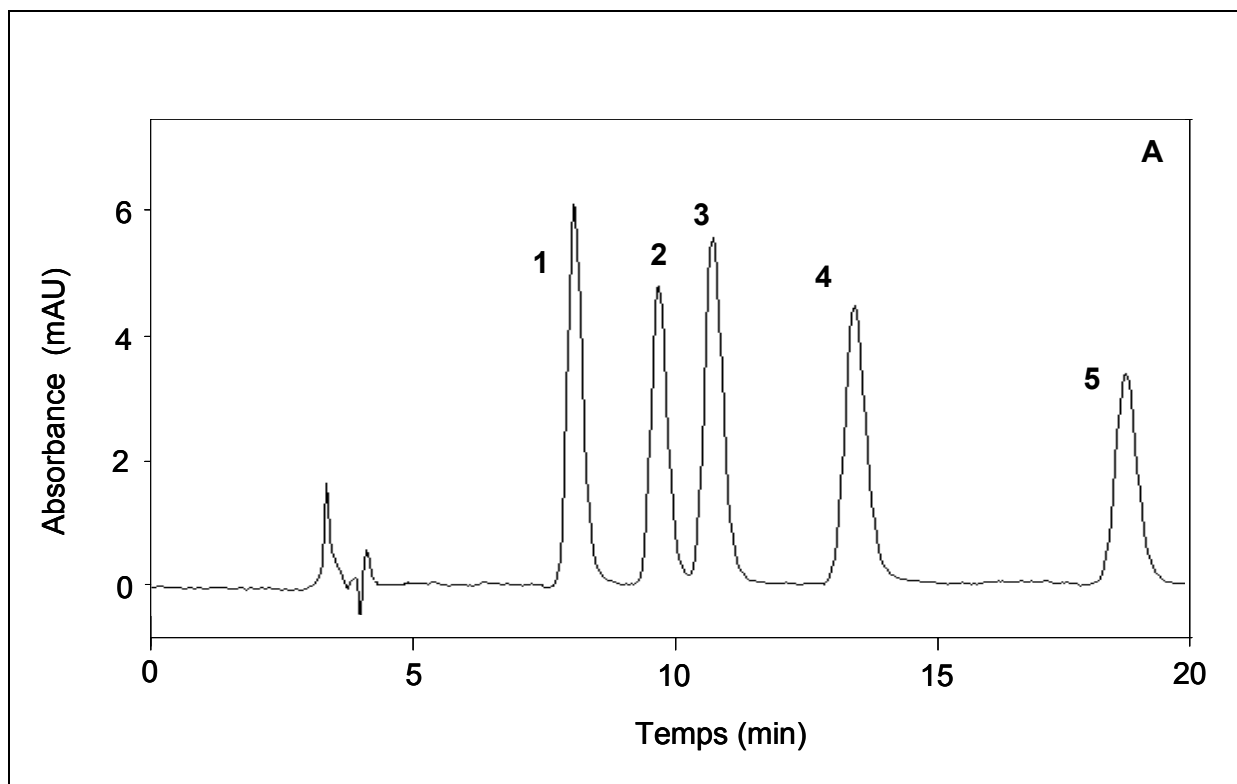
Considérant les effets opposés observés dans les figures IV.5.A. et IV.5.B. ainsi que les désirabilités pour la  $R_{sMin}$  et le  $t_{RMax}$ , il nous a paru indispensable de trouver un compromis qui combinerait toutes les désirabilités individuelles en une seule, la désirabilité globale ( $D$ ) (figure IV.6.), en vue de trouver des conditions optimales de séparation. Un poids égal a été attribué à toutes les désirabilités individuelles.

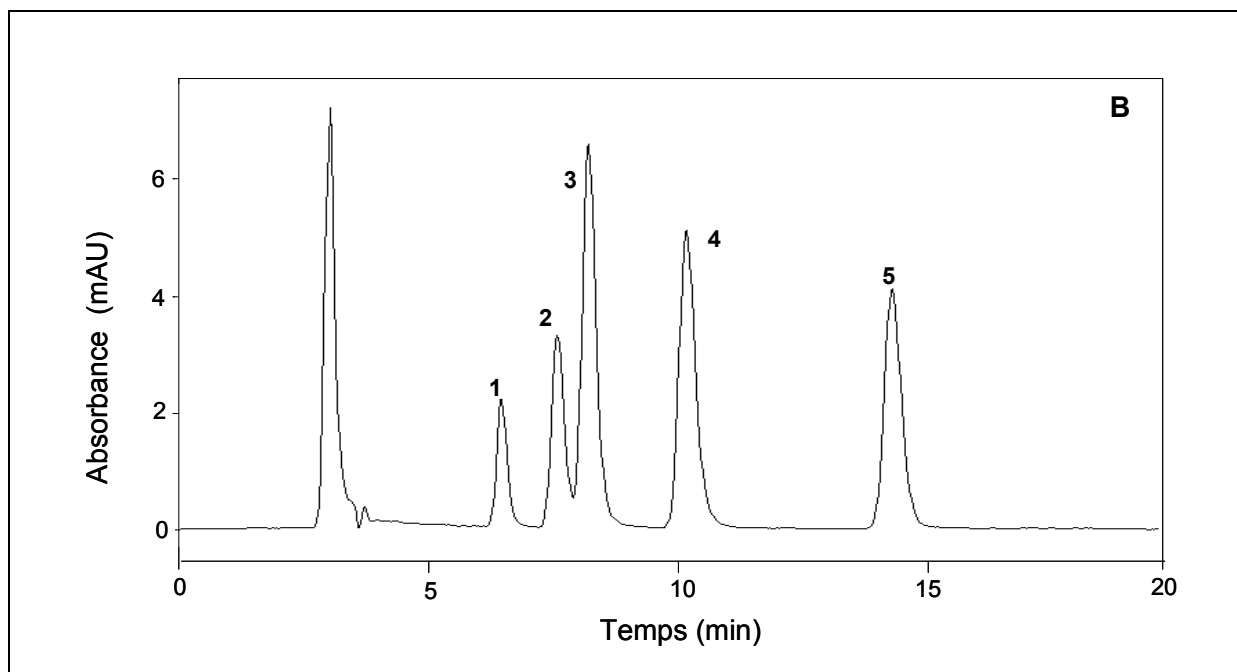


**Figure IV.6.** – Graphique de surface-réponse montrant la relation entre la désirabilité combinée de la  $R_{sMin}$ , la  $R_{s2-4}$ , la  $R_{s4-5}$  et le  $t_{RMax}$  ( $D$ ) et la température et la concentration du 2-propanol, à 0,1% de diéthylamine

Des valeurs élevées de  $D$  ont été observées lorsque la température est comprise entre 20 et 25°C et la proportion du 2-propanol varie de 3,0 à 3,8 % (figure IV.6). La valeur la plus élevée de  $D$  a été calculée et correspond aux conditions suivantes : Température = 23°C, concentration de la DEA = 0,1 % et proportion du 2-propanol = 3,5 %.

L'application de ces conditions de CLHP a permis d'obtenir une séparation chromatographique des cinq composés pour laquelle les valeurs des différentes réponses étaient 6,2 pour la  $R_{s2-4}$ , 4,5 pour la  $R_{s4-5}$ , 1,7 pour la  $R_{s_{Min}}$  et 18,5 min. pour la  $t_{R_{Max}}$  (figure IV.7.A.).





**Figure IV.7.** – Chromatogramme d'une solution de S-timolol, de R-timolol et des substances apparentées dans les conditions optimales (A) et selon les conditions\* décrites dans la monographie de la Pharmacopée Européenne (B).

**Pics:** 1. - Dimère de timolol, 2.- R-timolol; 3.- isotimolol; 4.- S-timolol; 5.- DMTDZ.

\* : *n*-hexane/2-propanol/diéthylamine (960/40/2, v/v/v), température de la colonne non indiquée.

Puisque d'une part, ces valeurs rencontrent les exigences indiquées dans le tableau IV.5. et que d'autre part, les différents temps de rétention sont en parfait agrément avec les valeurs prédites, nous pouvons dire que l'adéquation du modèle proposé a été démontrée.

Par ailleurs, nous avons comparé les résultats obtenus avec cette méthode et ceux obtenus après application de la méthode de CLHP de la Pharmacopée Européenne [209] en se basant sur la résolution de la paire critique qui correspond à la plus petite résolution observée. Dans le cas présent, la paire critique est constituée des pics de R-timolol et isotimolol. Le chromatogramme de la figure IV.7.B. montre une résolution incomplète de la paire critique ( $R_s = 1,3$ ) en appliquant la méthode décrite dans la monographie du maléate de S-timolol. Cependant, dans les conditions de CLHP optimisées dans ce travail, une valeur de résolution élevée a été atteinte ( $R_s = 1,7$ ) (Figure IV.7.A.).

Nous avons aussi noté l'absence d'indications sur la température avec la méthode de la Pharmacopée Européenne alors que ce facteur présente un effet significatif sur la résolution de la paire énantiomérique du timolol et sur la paire critique.

De plus, dans la méthode développée une faible concentration en diéthylamine a été utilisée en vue d'éviter la perte d'efficacité de la phase stationnaire chirale.

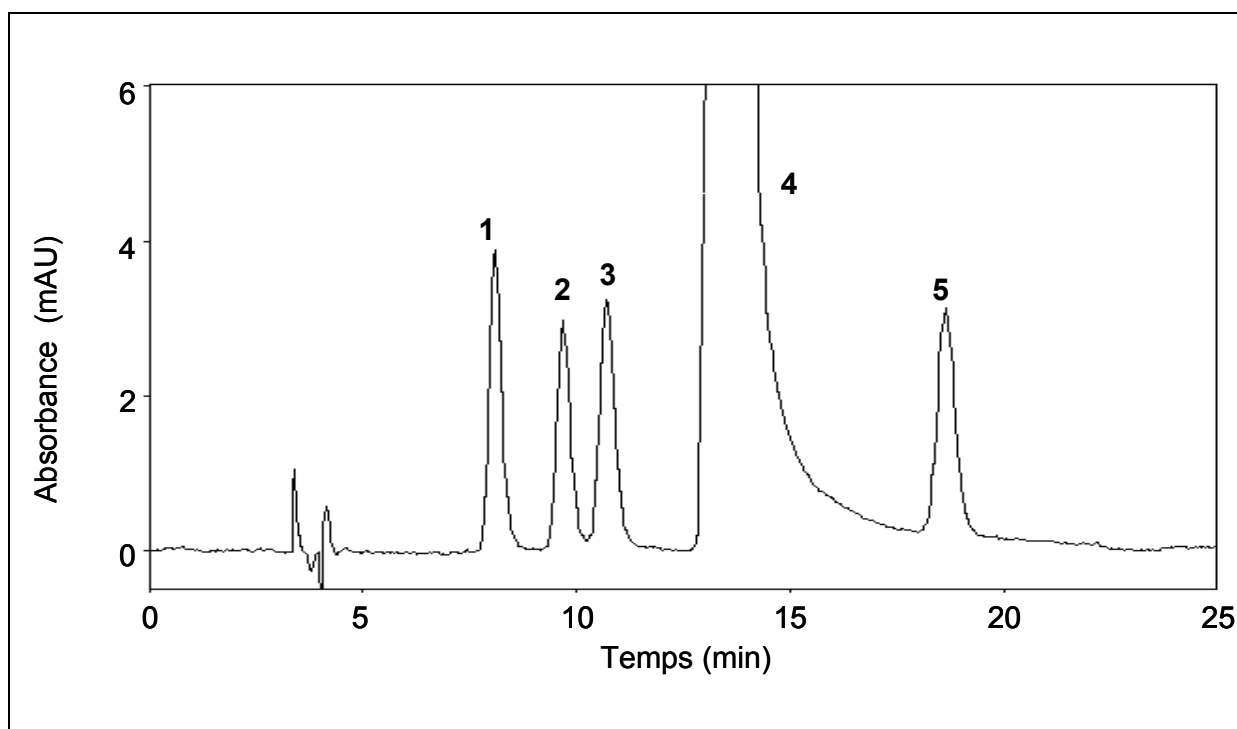
Un autre avantage est l'utilisation d'une plus faible concentration en 2-propanol qui a amélioré la séparation énantiomérique.

#### **IV.1.3.6. APPLICATION**

##### **IV.1.3.6.1. Evaluation de la capacité de la méthode pour l'usage requis**

Dans le souci d'évaluer l'applicabilité de la méthode de CLHP par rapport aux objectifs fixés lors de l'optimisation dans des cas proches de la réalité, nous avons voulu démontrer la possibilité de quantifier le R-timolol et les autres impuretés à des faibles teneurs et ce, en présence du pic parent (S-timolol) utilisé à des concentrations élevées.

Pour cela, une solution concentrée de maléate de S-timolol à 1,5mg/mL a été dopée avec des solutions de concentrations connues de dimère de timolol, de R-timolol, d'isotimolol et de DMTDZ pour obtenir des concentrations finales comprises entre 0,1 et 1,0 %. Comme illustré à la figure IV.8., le chromatogramme montre que ces différentes impuretés peuvent être aisément quantifiées. En voyant l'allure des pics chromatographiques, il est possible d'envisager des limites de quantification plus basses, par exemple de l'ordre de 0,1 %.



*Figure IV.8. – Chromatogramme d'une solution dopée de maléate de S-timolol*

**Pics et concentrations** : 1.- Dimère de timolol (0,7 %; 10,54  $\mu\text{g/mL}$ ); 2.- R-timolol (0,8 %; 12,62  $\mu\text{g/mL}$ ); 3.- isotimolol (0,7 %; 10,98  $\mu\text{g/mL}$ ); 4.- S-timolol (1,5 mg/mL); 5.- DMTDZ (0,7 %; 10,98  $\mu\text{g/mL}$ ).

#### IV.1.3.6.2. Stabilité des composés

Avant de valider la méthode, nous avons jugé utile de tester la stabilité du maléate de S-timolol. Puisque cette méthode de CLHP permet de séparer les impuretés de S-timolol, il est tout à fait possible de suivre l'évolution de la surface des pics, signe d'une dégradation. Pour cela, des solutions stock de maléate de S-timolol ont été placées dans des récipients en verre protégés contre la lumière et gardés à la température ambiante pendant trois jours.

Aucun des produits de dégradation séparés avec la méthode développée dans ce travail n'a été observé durant cette période de stockage. Les informations issues de la littérature [135] renseignent qu'à l'état solide et en solution aqueuse le maléate de timolol est très stable à la température ambiante lorsqu'elle est protégée contre la lumière. Toutefois, l'isotimolol peut



être formé lorsque le maléate de timolol en solution aqueuse est soumis à des températures élevées ou exposé à la lumière UV.

#### IV.1.4. CONCLUSION

Dans ce travail, le S-timolol, le R-timolol et les autres impuretés, isotimolol, dimère de timolol et dimorpholinothiadiazole, ont été séparés en moins de 20 minutes en appliquant les conditions de CLHP optimisées.

Un plan expérimental de Box-Behnken a été utilisé pour fixer les points expérimentaux. Pour l'optimisation des conditions de CLHP, une approche indirecte a été suivie.

Parmi les trois facteurs quantitatifs qui ont été sélectionnés et étudiés, la proportion du 2-propanol et dans une moindre mesure la température de thermostatisation de la colonne ont affecté les différentes réponses sélectionnées à savoir les trois temps associés aux pics des cinq composés concernés.

La désirabilité globale, qui dans le cas présent est la moyenne géométrique des désirabilités individuelles des quatre réponses d'intérêt sélectionnées, a été utilisée pour déduire les conditions optimales de CLHP. Les valeurs exigées pour ces différentes réponses ont pu être satisfaites.

La méthode de CLHP développée a amélioré la résolution de la paire de pics critique (R-timolol/isotimolol) ainsi que celle de la paire énantiomérique, par rapport à la méthode de CLHP de la Pharmacopée Européenne. De plus, il est possible de quantifier les autres impuretés présentes dans les échantillons de maléate de S-timolol.