

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'enseignement supérieur  
Et de la recherche scientifique  
Université SAAD DAHLEB  
FACULTÉ DE MÉDECINE

وزارة التعليم و البحث العلمي  
الطب  
قسم الصيدلة

Département de pharmacie  
BLIDA

جامعة سعد دحلب كلية

البلدية



## MEMOIRE DE FIN D'ETUDES



En vue de l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie  
Thème :

Qualification : Application à un Chromatographe Liquide Haute  
Performance HPLC couplé à un PDA

Réalisé par :

M<sup>r</sup> GOUASMI Mohammed

Composition de jury :

|                |          |                   |
|----------------|----------|-------------------|
| Dr IMOUDACHE.H | MAA USDB | Président du jury |
| Dr BENGHAZEL.I | MAA USDB | Promoteur         |
| Dr AZZOUZ.L    | MAA USDB | Examinatrice      |
| Dr ARIES .S    | MAA USDB | Examineur         |

ANNEE UNIVERSITAIRE 2020/2021

# REMERCIEMENTS

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous avoir donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui nous voudrions témoigner toute notre reconnaissance.

Nous tenons avant tout à exprimer nos reconnaissances à ; **Dr BENGHAZEL.ISLAM** pour avoir accepté de nous encadrer dans cette étude, et apporter ses éclairages judicieux et ses précieux conseils et suggestion, des éclaircissements qu'il nous a apportés, ainsi que pour ses remarques constructives et la confiance qu'il nous a témoigné tout au long de ce travail nous le remercions aussi pour son implication, son soutien et ses encouragements tout au long de ce travail.

Nous adressons aussi nos remerciements à **Dr BEN AZIZ OUARDA** chef de départementde PHARMACIE et à tous les enseignants de département de pharmacie.

Nos remerciements vont également au **Dr IMOUDACHE.H** et à **Dr AZZOUZ.L** et **Dr ARIES .S** qui ont accepté de faire partie de jury et de consacrer leurs temps en examinant le manuscrit. Nous sommes honorés et nous nous leur exprimer toute notre profonde reconnaissance.

Enfin, nous adressons nos sincères sentiments de gratitude et de reconnaissances à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

# Dédicace

Je dédie ce travail :

*A mes parents,*

*Pour m'avoir soutenue tout au long de mes études.*

*Pour m'avoir permise d'être qui je suis.*

*A ma femme*

*Qui a veillé à m'encourager, à me donner de l'aide, c'est Grâce à son encouragement et sacrifices, elle a pu créer le climat affectueux et propice à la poursuite de cette étude.*

*A mon bébé que dieux le protège*

*A mes enseignants notamment Pr GOUNI Ahmed et Pr BELOUNI*

*A mes frères et sœurs*

*A mes amis surtout Dr OUKID Toufik et à tous ceux que j'aime et qui m'aiment*

*A tous ce qui m'ont supporté, encouragé et soutenu, A tous ceux qui me sont chers*

# Tables des matières

|                             |      |
|-----------------------------|------|
| Tables des matières .....   | I    |
| Liste des abréviations..... | VI   |
| Liste des figures .....     | VIII |
| Liste des tableaux.....     | X    |
| Introduction générale ..... | 13   |

## **Chapitre I: Chromatographie liquide à haute performance HPLC ; Instrumentation :**

|   |    |
|---|----|
| I .1. Chromatographie .....   | 16 |
| I .1. 1. Historique .....   | 16 |
| I .1. 2. Définition de la chromatographie .....                               | 16 |
| I .1.3. Méthodes chromatographiques .....                                     | 17 |
| I .2 Chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....                  | 20 |
| I .2 .1 . Principe de la HPLC .....   | 20 |
| I .2 .2 Appareillage.....   | 21 |
| I .2 .2 .1. Réservoir de la phase mobile .....                                | 22 |
| I .2 .2 .2. Système de pompage.....   | 23 |
| I .2 .2 .2 .1 Pompes .....  | 23 |
| I .2 .2 .2 .2 Types de pompe .....  | 23 |
| I .2 .2 .2 .3 Systèmes de pompage .....                                       | 24 |
| I .2 .2 .3 Injecteur.....   | 26 |
| I .2 .2 .4 Four ou compartiment de colonne .....                              | 28 |
| I .2 .2 .5 Colonne .....  | 28 |
| I .2 .2 .5 .1 Phase stationnaire .....  | 29 |
| I .2 .2 .5 .1.1 Phase stationnaire normale .....                              | 29 |
| I .2 .2 .5 .1.2 Phase stationnaire inversée.....                              | 29 |
| I .2 .2 .6 Détecteurs .....   | 29 |
| I .2 .2 .6 .1 Détecteur par absorption dans l'ultraviolet et le visible ..... | 31 |

## Tables des matières

|  |    |
|--|----|
| I .2 .2 .6 .1 .1 Principes...  | 31 |
| I .2 .2 .6 .1 .2 Instrumentation.....  | 33 |
| I .2 .2 .6 .1 .3 Caractéristiques .....  | 41 |
| I .2 .2 .6 .1 .4 Domaines d'application.....                                       | 41 |
| I .2 .2 .6 .2 Détecteurs spectrofluorimétriques .....                              | 42 |
| I .2 .2 .6 .3 Détecteurs par réfractométrie différentielle .....                   | 43 |
| I .2 .2 .6 .4 Détecteurs par conductimétrie .....                                  | 44 |
| I .2 .2 .6 .5 Autres détecteurs.....   | 44 |
| I .2 .2 .7 Enregistreur.....   | 44 |
| I .2 .3 Domaines d'application de l'HPLC .....                                     | 45 |
| I .2 .4 Application de Chromatographie Liquide Haute Performance à l'analyse ..... | 45 |
| I .2 .4 .1 Caractéristiques du chromatogramme .....                                | 46 |
| I .2 .4 .2 Grandeurs fondamentales.....  | 46 |
| I .2 .4 .2 .1 Grandeurs de rétention .....   | 47 |
| I .2 .4 .2 .2. Efficacité d'une colonne .....                                      | 48 |
| I .2 .4 .2 .3 Sélectivité ( $\alpha$ ).....  | 49 |
| I .2 .4 .2 .4 Résolution $R_s$ .....   | 49 |
| I .2 .4 .2 .5 Perte de charge et facteur de résistance à l'écoulement.....         | 50 |
| I .2 .4 .2 .6 Capacité disponible.....   | 50 |
| I .2 .4 .3 Cinétique .....   | 51 |
| I .2 .4 .3 .1 Grandeurs réduites .....   | 51 |
| I .2 .4 .3 .2 Mécanismes de dispersion d'un pic d'élution .....                    | 52 |

### **Chapitre II: Chromatographie liquide à haute performance HPLC couplée à**

#### **un PDA: principe de fonctionnement.**

|   |    |
|---|----|
| II .1 Détecteur à barrettes de photodiodes..... | 55 |
| II .1 .1 Définition.....                        | 55 |
| II .2 Couplage HPLC-PDA .....                   | 56 |

## Tables des matières

|  |    |
|--|----|
| II .2.1 Historique .....   | 56 |
| II .2.2 HPLC-PDA .....   | 56 |
| II .2.3 Caractéristiques et opérations du détecteur.....             | 58 |
| II .2 .4 Principe de fonctionnement d'une HPLC couplée à un PDA..... | 59 |
| II .2.5 Avantage d'utilisation de HPLC-PDA.....                      | 60 |
| II .2.6 Domaines d'application d'un HPLC couplée à un PDA.....       | 61 |

### Chapitre III: Exigences réglementaires et qualification

|   |    |
|---|----|
| III .1 Exigences réglementaires.....                                    | 63 |
| III .2 validation .....   | 66 |
| III .2 .1 Définition.....   | 66 |
| III .2 .2 activités de planification et exigences.....                  | 67 |
| III .2 .2.1 plan de validation.....                                     | 67 |
| III .2 .2.2 qualification de conception.....                            | 67 |
| III .2 .2 .3 Évaluation du système et évaluation des fournisseurs ..... | 67 |
| III .2 .3 Qualification .....   | 68 |
| III .2 .3 .1 Définition.....  | 68 |
| III .2 .3 .2 activités de qualification .....                           | 68 |
| III .2 .3 .2 .1 Préparation du site.....                                | 68 |
| III .2 .3 .2 .2 Protocoles de qualification .....                       | 69 |
| III .2 .3 .2 .3 Etapes de qualification.....                            | 70 |
| III .2 .3 .2 .3.1 Qualification de l'installation.....                  | 70 |
| III .2 .3 .2 .3.2 Qualification opérationnelle .....                    | 70 |
| III .2 .3 .2.3.3 Qualification des performances .....                   | 71 |

## Tables des matières

|  |    |
|--|----|
| III .2 . 3 . 2 .4 Exceptions de test et révision des données.....                      | 72 |
| III .2 .3 . 2.5 Rapport de synthèse.....   | 72 |
| III .2 .3 . 2.6 Fréquence des tests de QP .....  | 73 |
| III .2 .3 . 2.7 Requalification .....  | 73 |
| III .2 .4 Opérationnel .....   | 73 |
| III .2 .4 . 1 Procédure d'exploitation standard.....                                   | 74 |
| III .2 .4 . 2 Vérification des performances et étalonnage.....                         | 74 |
| III .2 .4 . 3 Entretien .....  | 74 |
| III .2 .4 . 4 Examen périodique .....  | 74 |
| III .2 .4 . 5 Contrôle des changements .....   | 75 |
| III .2 .5 Fin de vie .....   | 77 |
| III .3 Organisation et planification des activités de Qualification / Validation ..... | 77 |

### **Chapitre IV: application à un chromatographe liquide haute performance couplé à un PDA**

|  |    |
|--|----|
| IV. 1 Qualification d'installation.....                                      | 79 |
| IV. 1. 1 Qualification du logiciel.....                                      | 79 |
| IV. 1. 2 Qualification de HPLC couplée à PDA .....                           | 79 |
| IV. 2 Qualification opérationnelle .....                                     | 80 |
| IV.2 . 1 Exigences fonctionnelles typiques pour HPLC avec détecteur PDA..... | 80 |
| IV.3 Qualification de performance .....                                      | 81 |
| IV. 3. 1 Pratiques de vérification des performances.....                     | 82 |
| IV.3 .1. 1 Module de pompe.....  | 82 |
| III.3 .1.1. 1 Précision du débit.....  | 82 |
| IV.3 .1 .1. 2 Précision du gradient... ..                                    | 82 |
| IV.3 .1. 1. 3 Test de pression.....  | 84 |
| IV.3. 1. .2 Module d'injection.....  | 84 |

## Tables des matières

|   |    |
|---|----|
| IV.3. 1 .2. 1 Exactitude.....   | 84 |
| IV.3. 1 .2. 2 Linéarité .....   | 85 |
| IV.3.1 .2. 3 Reporter ou Carry Over .....                                       | 85 |
| IV.3. 1. .3 Module de détection UV-visible .....                                | 86 |
| IV.3.1. 3.1 Précision de la longueur d'onde .....                               | 86 |
| IV.3. 1. 3. 2 Linéarité de la réponse .....                                     | 86 |
| IV.3. 1. 3. 3 Bruit et dérive .....   | 87 |
| IV.3. 1. 4 Module de chauffage de colonne.....                                  | 87 |
| IV.3. 2 Place des Tests de conformité de système HPLC dans le cadre d'une QP .. | 88 |
| IV.3. 3 Conseils d'utilisation pour la vérification des performances HPLC ..... | 88 |
| Conclusion.....   | 89 |
| Références .....  | 91 |
| Annexe .....  | 95 |

Résumé

Abstract

ملخص



## Liste des abréviations

ACN : acétonitrile

AMM : autorisation de mise sur le marché

ASTM: American Society for Testing and Material.

AUFS : Absorbance Unit Full Échelle.

CCD : capteur photographique (charge coupled device).

CE : électrophorèse capillaire

CFR: Code of Federal Regulations

cGMPs: current Good Manufacturing Pratiques

CPG : chromatographie en phase gazeuse

CPL : chromatographie en phase liquide

CPS : chromatographie en phase supercritique

DAD : détecteur à barrette de photodiodes (Diode Array Detector)

dp : Diamètre des particules

3D: 3 dimensions

Ech : échantillon

ERES : enregistrements électroniques et signatures électroniques

FDA: Food and Drug Administration

FT-IR : infrarouge à transformée de Fourier

*GEON*: Réseau général européen (General European Official Medicines Control Laboratories Network).

GLC : chromatographie gaz-liquide

GSC : chromatographie gaz-solide

## Liste des figures

H<sub>2</sub>O : monoxyde de dihydrogène

HPLC : chromatographie liquide à haute performance

Hz : hertz

ISO: Organisation Internationale de normalisation

LC : chromatographie liquide

MeOH : méthanol

min : minute

MS : spectroscopie de masse

nm : nanomètre

OMCL: Official Medicines Control Laboratories

PDA : *détecteur* à barrette de diode

Ph. Eur : pharmacopée européenne.

PSI: pound per square inch

QI : qualification d'installation

QO : qualification opérationnelle

QP : qualification de performance

Réf : référence

RMN : spectroscopie de résonance magnétique

RSD : *Relative Standard Deviation*

ul : microlitre

V : volume

UV-VIS : l'ultraviolet et le visible

## Liste des figures

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 1</b> : Méthodes de séparation en chromatographie en phase liquide.....                     | 19 |
| <b>Figure 2</b> : composition d'une chaine HPLC .....   | 21 |
| <b>Figure 3</b> : Les organes d'une chaine HPLC.....  | 22 |
| <b>Figure 4</b> : pompes à pistons .....  | 24 |
| <b>Figure 5</b> : Pompes isocratique, binaires (haute pression) et quaternaires (basse pression)..... | 25 |
| <b>Figure 6</b> : vanne d'injection à boucle interne.....   | 27 |
| <b>Figure 7</b> : Vanne d'injection à boucle externe.....   | 27 |
| <b>Figure 8</b> : colonne HPLC .....  | 28 |
| <b>Figure 9</b> : domaine spectral du rayonnement Electromagnétique.....                              | 32 |
| <b>Figure 10</b> : Schéma des appareils à simple faisceau.....  | 34 |
| <b>Figure 11</b> : Schéma des appareils à double faisceau .....                                       | 35 |
| <b>Figure 12</b> : schéma de prisme .....   | 36 |
| <b>Figure 13</b> : schéma des réseaux .....   | 36 |
| <b>Figure 14</b> : Montage des chromateurs et spectrographes.....                                     | 38 |
| <b>Figure 15</b> : schéma d'une cellule d'absorption .....  | 39 |
| <b>Figure 16</b> : informations apportées par un chromatogramme .....                                 | 45 |
| <b>Figure 17</b> : Structure d'un pic .....   | 45 |
| <b>Figure 18</b> : chromatogramme montrant la qualité de la séparation chromatographique.....         | 50 |
| <b>Figure 19</b> : Schéma d'un détecteur à barrette de diode .....                                    | 55 |
| <b>Figure 20</b> : chromatogramme 3D d'un étalon .....  | 57 |

## Liste des figures

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 21</b> : Principe de fonctionnement du système optique .....        | 59 |
| <b>Figure 22</b> : phases de validation .....                                 | 66 |
| <b>Figure 23</b> : Mesure de la précision et de la linéarité du gradient..... | 82 |

# Liste des tableaux

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau 1</b> : composant du système optique.....  | 60 |
| <b>Tableau 2</b> : Contrôles périodiques et motivés des instruments .....                     | 64 |
| <b>Tableau 3</b> : Vérifications des instruments en cours d'utilisation .....                 | 65 |
| <b>Tableau 4</b> : Exigences fonctionnelles typiques pour HPLC avec détecteur<br>PDA .....    | 78 |
| <b>Tableau 5</b> : Attributs de performance pour les modules HPLC et fréquence de<br>tes..... | 79 |
| <b>Tableau 6</b> : Programme de test de précision de gradient.....                            | 81 |

# Introduction générale

---

La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) est une technique de séparation, identification et quantification des constituants d'un mélange c'est Parmi les techniques chromatographiques les plus employées actuellement dans les laboratoires d'analyse chimique , Son succès est dû à la meilleure exploitation des mécanismes d'interactions, aux grandes efficacités des phases stationnaires de plus en plus fines et au progrès importants effectués dans le domaine d'appareillage.

L'HPLC se développe de plus en plus pour des très nombreuses molécules (hormones, vitamines, médicaments, ....). C'est un appareil de base indispensable dans tous les laboratoires d'analyse.

Et pour obtenir des informations structurelles conduisant à l'identification des composés présents dans un échantillon brut, la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est liée à des techniques de détection spectroscopiques comme par exemple, l'UV-Vis ou barrette de photodiodes (PDA)

Dans cette étude je suis particulièrement intéressé à la qualification, (QI, QO, QP) et application à une HPLC couplée à un PDA qui est un détecteur à barrette de diode. Le couplage du détecteur PDA à une HPLC permet de fournir la technique de HPLC-PDA.

Or, l'application suivant la réglementation européenne concerne Les tests OQ typiques pour les modules HPLC comprennent la Pompe, le Détecteur, l'Injecteur et le four de colonne et la qualification de performance (PQ) d'un système se fait par des tests qui remettent en question les performances des composants HPLC en tant que système après évaluation des fonctions clé des différents modules qui le composent.

Le contenu de ce présent manuscrit est reparti en quatre chapitres :

Chapitre I : La chromatographie liquide à haute performance HPLC; Instrumentation

Chapitre II: La chromatographie liquide à haute performance HPLC couplée à un PDA: principe de fonctionnement

# Introduction générale

---

Chapitre III: Exigences réglementaires et qualification

Chapitre IV: application à un chromatographe liquide haute performance couplé à un PDA.

**Chapitre I: Chromatographie liquide à haute performance HPLC;  
Instrumentation :**



### I.1. Chromatographie

#### I.1.1. Historique

Bien que certains historiens fassent remonter l'origine de la chromatographie jusqu'à l'Antiquité, on retient, généralement, les travaux du botaniste russe Tswett, qui, en séparant les pigments de la chlorophylle sous la forme d'anneaux colorés sur une colonne remplie de carbonate de calcium, a donné le nom de chromatographie (séparation selon les couleurs) à la méthode (1903). [1].

En 1930-31, la méthode est introduite en pratique dans les laboratoires par Kuhn et Elederer à Heidelberg en Allemagne. [2].

Ont été rassemblées ici quelques grandes dates de l'évolution de la chromatographie :

1903 - Séparation de pigments (Tswett)

1931 - Séparations préparatives (Kuhn et Lederer)

1938 - Chromatographie sur couche mince (Ismailov et Shraiber)

1939 - Chromatographie par échange d'ions (Samuelson)

1941 - Chromatographie de partage (Martin et Synge)

1952 - Chromatographie en phase gazeuse sur colonnes remplies (James et Martin)

1954 - Séparation des acides aminés par chromatographie d'échange d'ions (Moore et Stein)

1959 - Chromatographie en phase gazeuse sur colonnes capillaires (Golay)

1962 - Chromatographie en phase supercritique (Klesper)

1968 - Chromatographie en phase liquide à haute performance (Giddings et Kirkland). [1]

#### I.1.2. Définition de la chromatographie

Est une méthode de séparation des constituants présents dans des mélanges variés. Elle sert en analyse pour identifier et quantifier des composés au sein d'échantillons divers. [3].

Il consiste à faire migrer les constituants à séparer sur phase stationnaire et mobile à l'aide d'une phase mobile liquide ou gazeuse de nature différente. Chaque molécule sera plus ou moins rapidement entraînée selon son affinité pour la phase stationnaire et la phase mobile, permettant la séparation des différents constituants présents dans le mélange. A partir de ce principe très général, il existe de très nombreux types de chromatographies en fonction de la nature de la phase stationnaire et de la phase mobile, ainsi que la nature des interactions entre ces phases et les molécules à purifier ou à séparer. [5].

### I. 1.3 Méthodes chromatographiques

Il existe de très nombreux types de chromatographies en fonction de la nature de la phase stationnaire et de la phase mobile, ainsi que la nature des interactions entre ces phases et les molécules à purifier ou à séparer. [5].

La phase stationnaire peut être disposée :

**I .1. 3. 1** soit dans une colonne et la phase mobile percole celle-ci à débit (ou pression) constant :

C'est la **chromatographie sur colonne** ;

**I .1. 3. 2** Soit en couche mince sur un support plan (plaque de verre, film plastique...) et la phase mobile se déplace par capillarité :

C'est la **chromatographie planaire**.

Dans le premier cas, l'analyste exploite les différences de vitesses de déplacement des différentes espèces en déterminant le temps mis par chacune pour parcourir une longueur égale à celle de la colonne (les solutés sont injectés en mélange à une extrémité de la colonne et détectés à l'autre) : on étudie la distribution isoplane des espèces (c'est-à-dire à distance parcourue fixée).

Dans le second cas, l'analyste exploite ces mêmes différences en termes de distance parcourue par chaque espèce à temps de développement donné : quand le « front » de solvant a parcouru une distance fixée, on repère la position de chaque soluté, par révélation par un système adéquat et on détermine le rapport des vitesses de déplacement (rate factor) que l'on identifie comme étant identique à celui des distances parcourues ; on étudie la distribution isochrone (c'est-à-dire à temps de développement constant). [1].

Suivant l'état physique de la phase mobile, on distingue :

#### **I .1. 3. 3 Chromatographie en phase gazeuse (CPG) :**

Est une technique de séparation analytique utilisée pour analyser les substances volatiles dans une phase mobile gazeuse. Dans la chromatographie en phase gazeuse, l'échantillon est dissous dans un solvant liquide qui sera ensuite vaporisé dans une phase mobile, soit un gaz vecteur inerte (en général, de l'hélium ou de l'azote). La séparation de l'échantillon s'effectue grâce à la répartition des composants entre le gaz vecteur mobile et une phase stationnaire utilisée pour remplir la colonne chauffée. Cette forme de chromatographie fait partie des seules à ne pas faire interagir la phase mobile avec le composé. La phase stationnaire est soit un adsorbant

solide, appelé chromatographie gaz-solide (GSC) ou un liquide reposant sur un support inerte, que l'on appelle chromatographie gaz-liquide (GLC).

La GC est donc l'outil idéal dans l'analyse des échantillons liquides ou gazeux comprenant des centaines ou même des milliers de molécules différentes, car il permet d'identifier les types de molécules présentes ainsi que leurs concentrations.

### **❖ Utilisation**

On peut utiliser cette technique non seulement en médecine légale, dans la détection et l'analyse des drogues et des explosifs, mais elle est aussi extrêmement utile dans le domaine des produits pharmaceutiques et leurs intermédiaires, mais également pour mesurer le taux d'alcool dans le sang ou la présence d'autres métabolites, ou encore analyser les huiles essentielles et une variété d'autres produits alimentaires. [6].

### **I .1. 3. 4 Chromatographie en phase supercritique (CPS) :**

La phase mobile est un fluide supercritique, c'est-à-dire porté au-delà des coordonnées en pression et température du point critique, point à partir duquel il n'existe plus de frontière définie entre les états Liquide et gazeux.

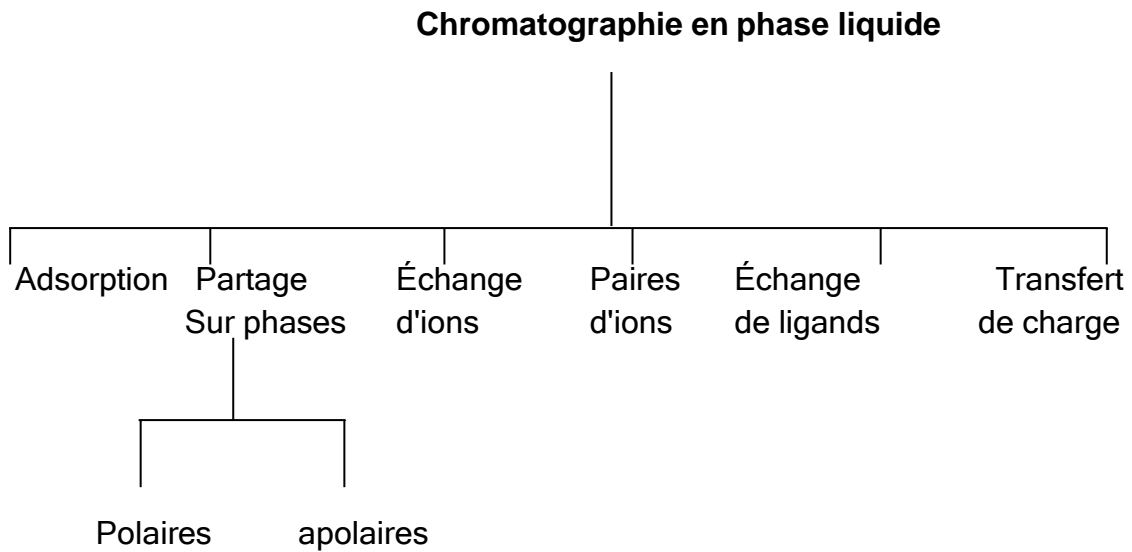
### **I .1. 3. 5 Chromatographie en phase liquide (CPL) :**

La phase mobile est constituée d'un solvant pur ou le plus souvent d'un mélange plus ou moins complexe de solvants de grande pureté ; elle est introduite sur la colonne à débit constant par un système de pompage.

### **❖ Utilisation**

La chromatographie en phase liquide sur colonnes est devenue un outil analytique performant utilisé dans des domaines variés allant de l'analyse de fluides biologiques à celui des produits pétroliers lourds. [24]

Elle peut être utilisée comme technique de séparation pour la qualification, la quantification ou la purification. On distingue plusieurs types de chromatographie en phase liquide sur colonnes [6].



**Figure 1** : Méthodes de séparation en chromatographie en phase liquide [24].

❖ **Classification selon la finalité :**

On distingue la chromatographie analytique de la chromatographie préparative.

**I.1.3.6 Chromatographie analytique**

Sert à identifier les composants d'un mélange complexe et éventuellement la concentration de ces composants. En revanche,

**I.1.3.7 Chromatographie préparative**

L'objectif assigné à la méthode chromatographique peut être la séparation et la récupération, après fractionnement, de quantités plus importantes des espèces. [1].

### I.2 Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Parmi les techniques chromatographiques les plus employées actuellement dans les laboratoires d'analyse chimique l'HPLC (High Performance Liquid Chromatography ou Chromatographie Liquide à Haute Performance anciennement appelée High-Pressure Liquid Chromatography pour Chromatographie Liquide à Haute Pression). Cette technique est devenue un outil analytique indispensable, elle permet l'identification, la séparation et le dosage des composés chimiques dans un mélange. Son succès est dû à la meilleure exploitation des mécanismes d'interactions, aux grandes efficacités des phases stationnaires de plus en plus fines ( $3\mu$ ) et au progrès importants effectués dans le domaine d'appareillage. [5].

#### I.2.1 Principe de la HPLC

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

La phase mobile, poussée par une pompe sous forte pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté à travers le système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne, grâce à un détecteur approprié, les différents solutés sont représentés par des pics. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

Le mécanisme de la séparation chromatographique s'explique par les différences de répartition des molécules des composés d'un mélange entre deux phases non-miscibles : l'une mobile et l'autre stationnaire [2].

Un appareil d'HPLC comprend différents modules : un réservoir à solvant contenant la phase mobile, un système de pompage permettant d'effectuer des éluations graduées, un injecteur, une colonne, un détecteur et un système d'acquisition de données. Les différents modules sont reliés par des canalisations courtes et de très faibles diamètres internes (0.1 mm). Ce principe est traduit par le schéma suivant [7]:

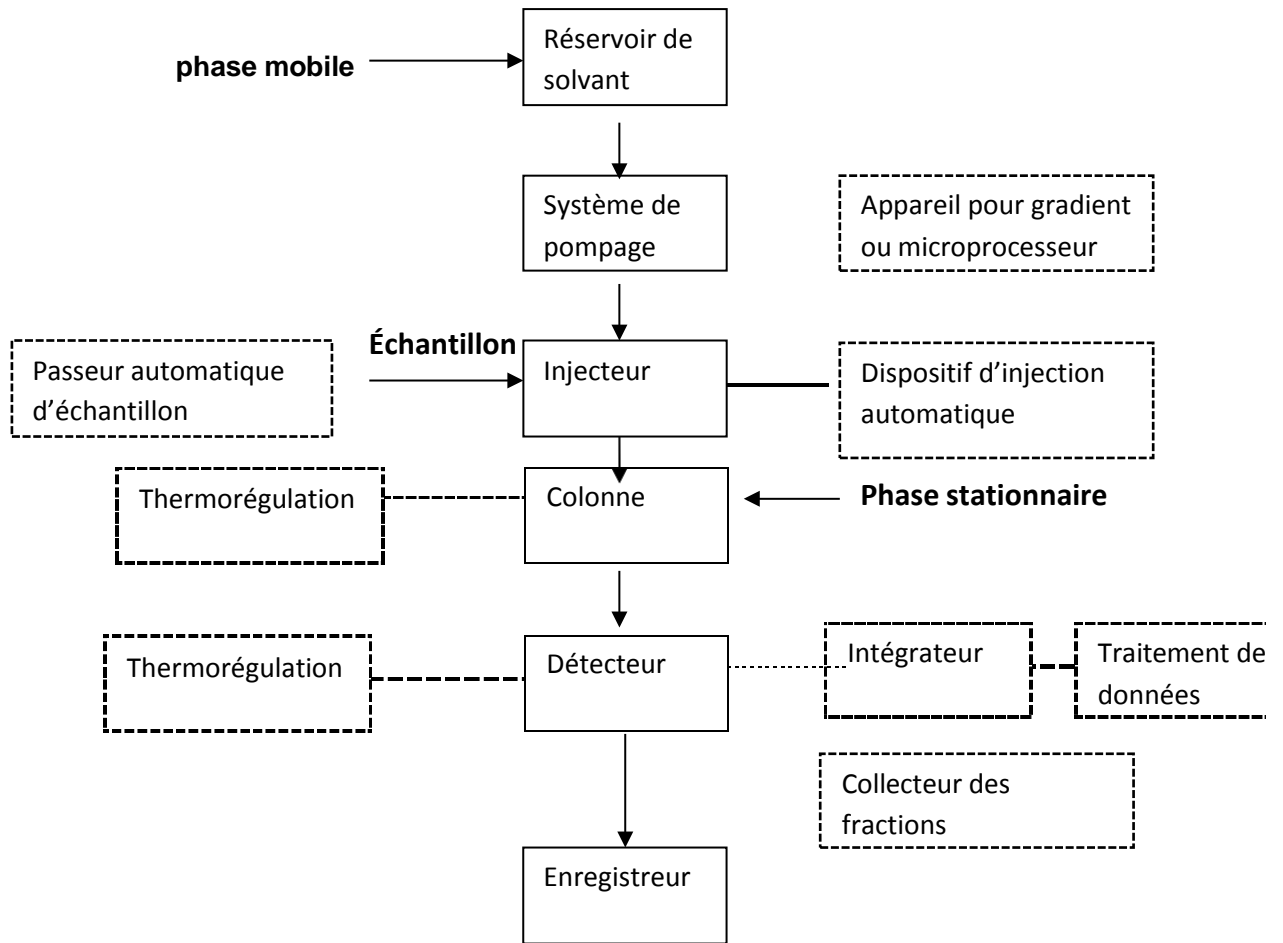


Figure 2: composition d'une chaîne HPLC [7].

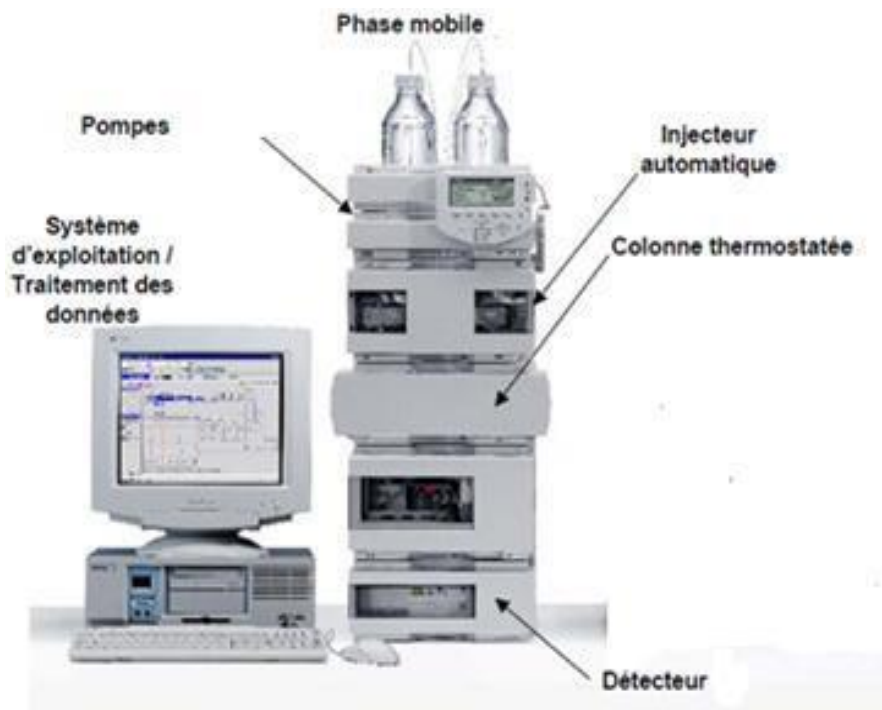
### N.B :

Les éléments en trait plein permettent d'opérer en régime isocratique (c'est-à-dire à composition de phase éluante constante) ; on peut y adjoindre les éléments en tireté pour permettre la mise en œuvre de l'éluion graduée, de l'automatisation des analyses, de l'analyse quantitative et du fractionnement de l'effluent (chromatographie semi-préparative). En général, l'ensemble de ces éléments est piloté à l'aide de microprocesseurs.

### I.2.2 Appareillage

Les différentes composantes d'une chaîne HPLC sont présentées sur le schéma suivant (figure 3). Tous les organes du système sont liés à un micro-

ordinateur qui pilote tous les processus.



**Figure 3:** Les organes d'une chaîne HPLC [8].

### I.2.2.1. Réservoir de la phase mobile

Il contient la phase mobile en quantité suffisante. Plusieurs flacons d'éluant (solvant de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'éluant (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe qui réalise le mélange demandé. [8].

Un appareil HPLC comprend un ou plusieurs réservoirs, en verre ou en acier inoxydable résistants à la corrosion et contenant les solvants.

Des gaz ambiants comme l'oxygène, peuvent être dissous dans les solvants, former des bulles dans la colonne et créer des perturbations dans la détection. De même des poussières en suspension peuvent perturber les séparations et gêner le bon fonctionnement des pompes et des détecteurs. Il est donc souhaitable de dégazer et de filtrer les solvants. Plusieurs techniques sont utilisées:

Le dégazage peut être effectuée par une vive agitation, par ultrasons, par barbotage d'hélium ou par réaction catalytique (platine sur alumine) en présence de méthanol (dans la phase mobile) pour transformer l'oxygène en formaldéhyde ou acide formique. Un barbotage d'hélium permet de retirer

environ 85% de l'oxygène en ~10min. L'hélium ayant une très faible solubilité dans les solvants ordinaires, après barbotage, les solvants sont exempts d'hélium; d'où l'intérêt du barbotage. Afin d'éviter la redissolution des gaz, un barbotage constant d'hélium peut être effectuée. De plus, l'utilisation du téflon, qui laisse passer l'air, est évitée dans les systèmes d'introduction du solvant. [5].

### **I .2 .2 .2. Système de pompage**

#### **I .2 .2 .2 .1 Pompes :**

La pompe d'un chromatographe a pour rôle d'assurer l'écoulement de la phase mobile dans la colonne. Ces pompes doivent être très puissantes car la viscosité des solvants et la granulométrie très fine des phases stationnaires entraînent des différences de pression ou des pertes de charges entre le sommet et l'extrémité des colonnes qui peuvent parfois être importantes (50 à 100 bars). Les plus usuelles permettent d'obtenir des pressions de 420 bars (ou 6000 PSI (1 PSI = 0,07 bar)). Les pompes sont très onéreuses et interviennent pour une très grande part dans le coût élevé des appareils.

#### **I .2 .2 .2 .2 Types de pompe**

Les pompes sont généralement des pompes à deux pistons fonctionnant en alternance (mouvement déphasé). (Voir figure 4). On distingue les montages en parallèle et les montages en série. Pour les modèles en série, le premier piston doit pomper deux fois plus de liquide que le second, soit par un diamètre plus grand, soit par une course plus grande. Les débits généralement utilisés dans les systèmes HPLC varient entre 0,5 et 2 mL/min, pour des pressions de l'ordre de plusieurs dizaines à plus d'une centaine d'atmosphères. [10].

Leur avantage réside principalement dans :

Leur petit volume interne, leur pression de sortie élevée (jusqu'à 700 bars), leur adaptabilité à la technique de gradient d'éluion, la constance de leur débit qui est pratiquement indépendante de la pression dans la colonne et de la viscosité du solvant. [9]



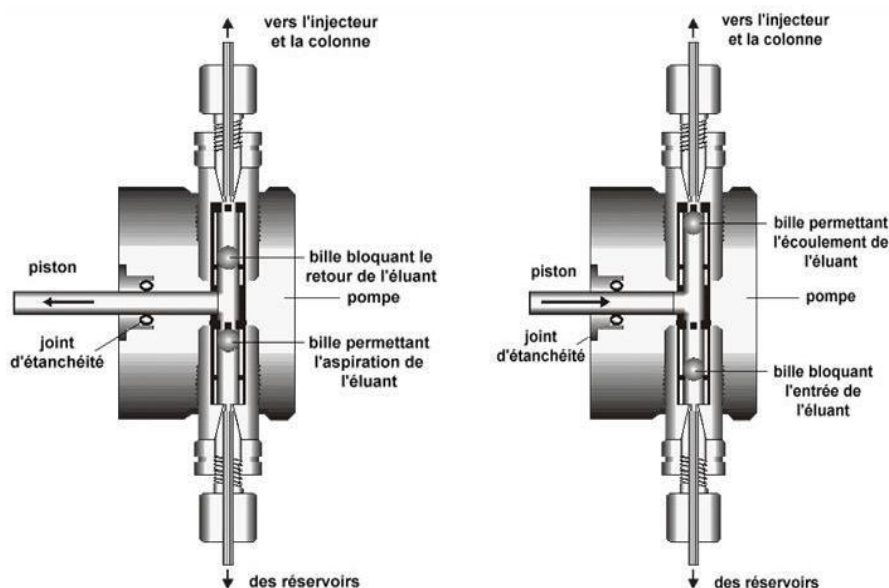


Figure 4 : pompes à pistons

---

### I .2 .2 .2 .3 Systèmes de pompage

#### I .2 .2 .2 .3.1 Système en mode isocratique

En mode isocratique, la composition de la phase mobile demeure constante durant toute l'analyse chromatographique. Si on travaille toujours dans ces conditions, on peut utiliser un système qui ne comporte qu'un seul canal pour le solvant, provenant d'une seule bouteille.

#### I .2 .2 .2 .3.2 Système en mode gradient

Les appareils de chromatographie liquide, HPLC, permettent de faire des analyses chromatographiques en mode gradient, c'est-à-dire en faisant varier la composition du liquide porteur en cours d'analyse, en pompant les solvants contenus dans 2 à 4 réservoirs. On distingue alors deux méthodes de mélange. [10].

#### ❖ Système avec pompe quaternaire et mélange à basse pression

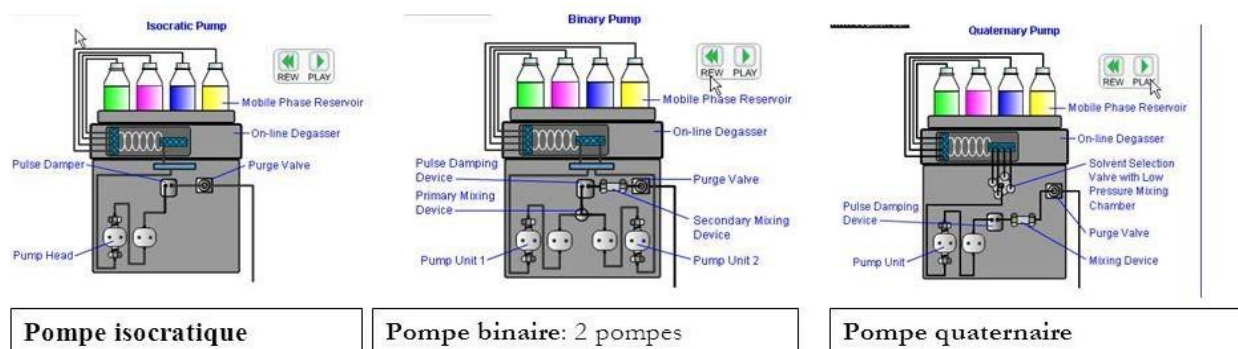
Les solvants sont dosés et mélangés en amont de la pompe en programmant le temps d'ouverture de vannes proportionnelles (système basse pression). Ce système nécessite d'intercaler un système de dégazage en ligne des solvants (souvent effectué par dépression).

### ❖ Système avec pompe binaire et mélange à haute pression

Les solvants sont dosés et mélangés en aval des pompes (système haute pression). Dans ce dispositif, il est nécessaire d'avoir autant de pompes que de solvants. Le gradient est obtenu simplement en modifiant, à débit total constant, le rapport des débits des pompes. (Voir figure 5). [7].

Parmi les avantages de ces systèmes :

- ❖ systèmes de mélange à haute pression, par rapport aux systèmes de mélange à basse pression, réside dans le volume mort de mélange plus petit. Ceci permet d'obtenir plus rapidement la composition désirée lors du travail en mode gradient, particulièrement aux petits débits, typiquement  $< 0,5 \text{ mL/min}$  [10].
- ❖ le système haute pression donne la possibilité de transformation en deux chromatogrammes après l'ajout d'un détecteur et d'un injecteur.
- ❖ dans le système basse pression, le nombre de pièce mobile est moindre. Ce système donne la possibilité de réaliser des gradients quaternaires. Notons enfin qu'un prémélange des solvants avant pompage permet de s'affranchir des phénomènes de contraction de volume. [7].



**Figure 5 :** Pompes isocratique, binaires (haute pression) et quaternaires (basse pression) [9]

Le système de pompage doit:

- Atteindre des pressions élevées:  $\sim 200 \text{ bars}$  ( $20\,000 \text{ kPa}$ ) ou plus;
- Être exempt d'impulsions;
- Imposer des débits reproductibles de  $0,1$  à  $10 \text{ mL. Min}$ ;
- Résister à la corrosion et aux solvants;
- Permettre de délivrer un éluant de composition fixe en mode isocratique ou de composition variable pour travailler en gradient d'éluion [4].

Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques  $\mu\text{L}$  à plusieurs mL/min. La pression à imposer dépend des facteurs suivants :

- ❖ débit de la phase mobile
- ❖ viscosité du modificateur organique
- ❖ taille des grains de la phase stationnaire
- ❖ géométrie de la colonne [13].

### I.2.2.3 Injecteur

L'injection de l'échantillon se fait de deux manières :

#### I.2.2.3.1 Manuelle :

L'injecteur comporte une vanne à plusieurs voies montée sur le parcours de la phase mobile, juste avant la colonne. L'échantillon à analyser est introduit avec une micro-seringue dans un petit volume tubulaire appelé boucle ; l'échantillon est ainsi inséré avec un flux de phase mobile.

#### I.2.2.3.2 Automatique :

L'injection se fait automatiquement, l'injecteur utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe, cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne [13].

L'échantillon est donc injecté à l'aide de vannes à boucle d'échantillonnage interne ou externe. Les vannes peuvent être utilisées soit manuellement, soit commandées par un passeur automatique d'échantillons, soit encore motorisées de façon à ne permettre l'injection que d'une faible partie du contenu de la boucle d'échantillonnage. Cette dernière disposition permet d'optimiser le signal d'entrée sur la colonne (élimination de la traînée arrière du créneau d'injection) et partant de conserver l'efficacité maximale de la colonne.

Le principe de fonctionnement d'une vanne d'injection est le suivant : l'échantillon préalablement introduit dans la boucle interne (figure 6) ou externe (figure 7) de volume connu est entraîné par la phase éluante en tête de colonne par rotation de la vanne. Les vannes à boucle interne se prêtent bien à l'injection de petits volumes ( $< 1 \text{ mL}$ ). Les vannes à boucle externe permettent d'injecter de 1 mL (remplissage partiel de la boucle) à plusieurs mL (enrichissement en tête de colonne).

Le remplissage total de la boucle interne ou externe assure la meilleure reproductibilité du volume d'injection à la condition de s'assurer de la qualité du chargement de la boucle. [25].

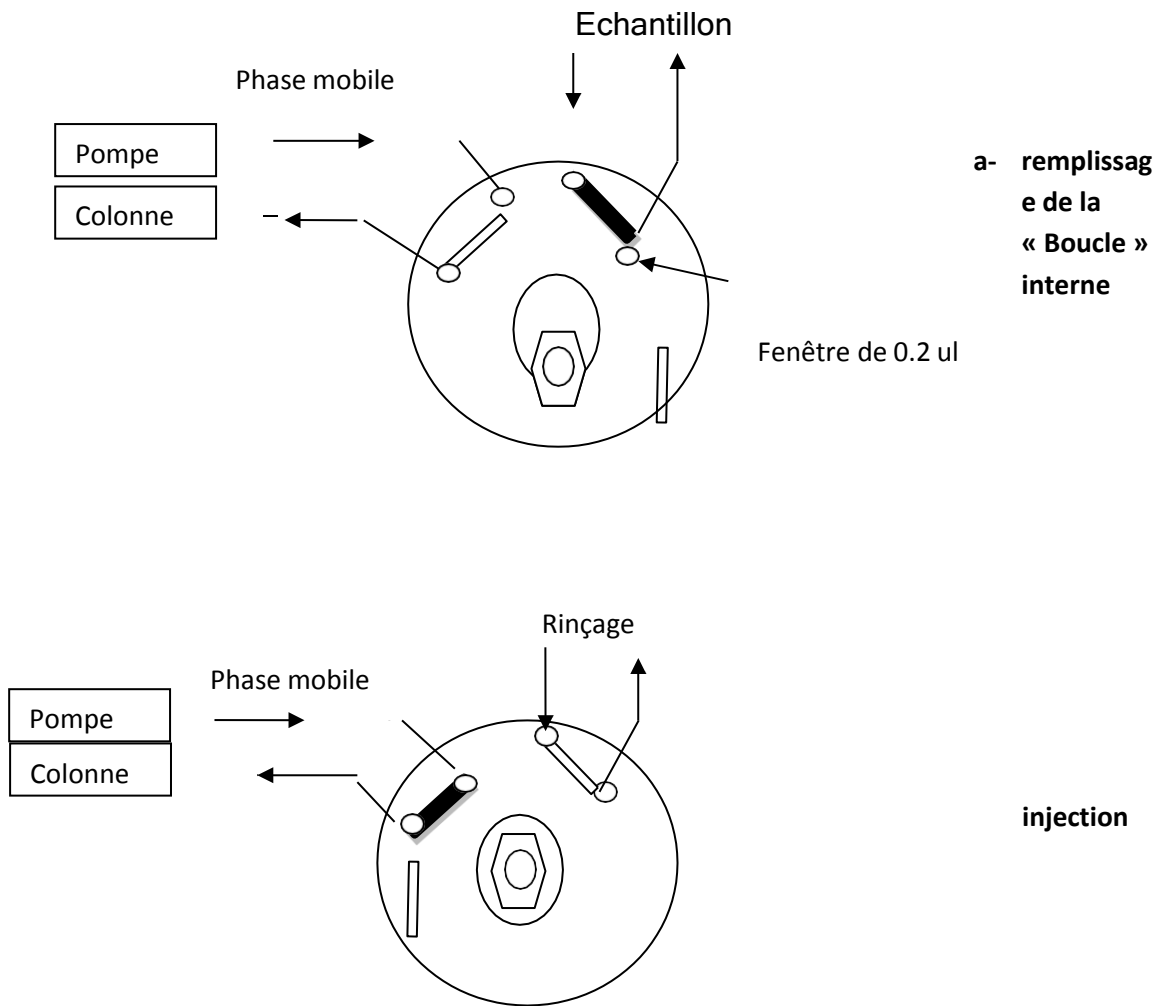


Figure 6 : vanne d'injection à boucle interne.

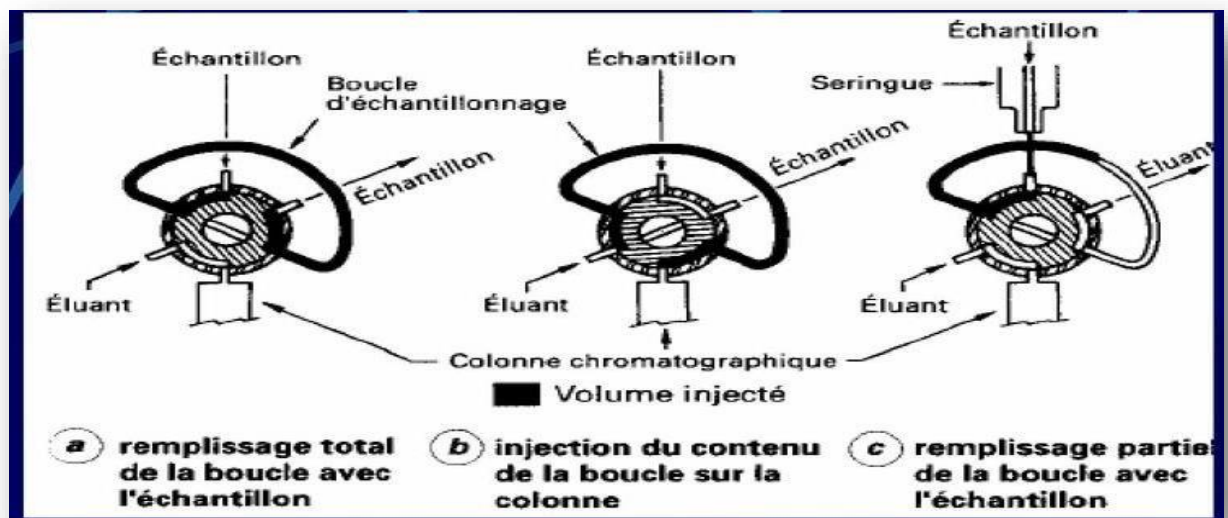


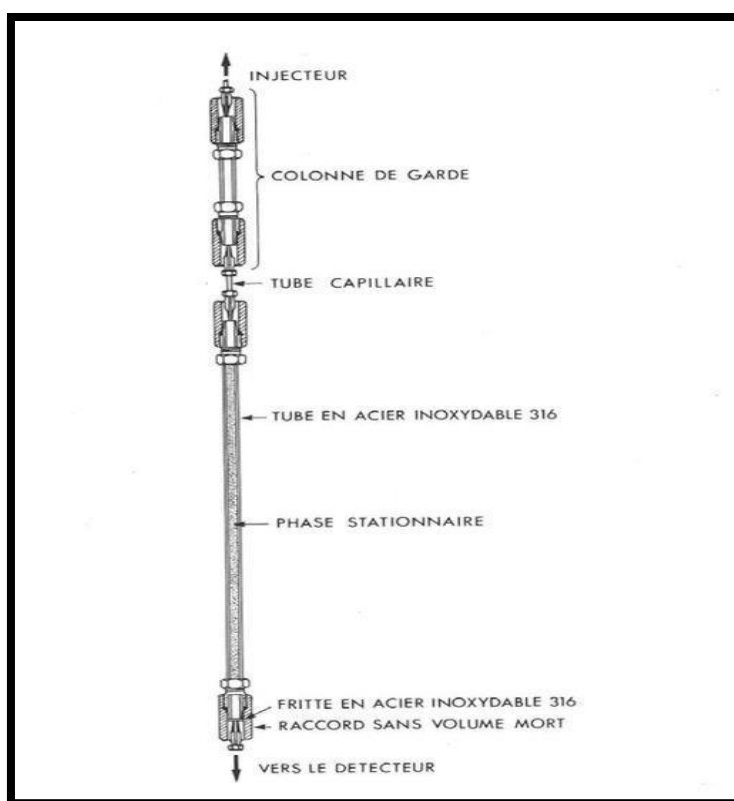
Figure 7 – Vanne d'injection à boucle externe.

**I.2.2.4. Four ou compartiment de colonne** : qui assure la justesse et linéarité de la température [22].

### I.2.2.5 Colonne

Les colonnes d'HPLC sont généralement courtes et droites en acier inoxydable 316 capable de résister aux fortes pressions. La plupart des colonnes ont une longueur de 10 à 25 cm et un diamètre de 4 à 5 mm. Ces colonnes sont remplies de phase stationnaire, maintenue entre deux disques poreux situés aux extrémités et dont la taille des particules varie de 5 à 10  $\mu\text{m}$ .

La colonne est souvent précédée par une colonne de garde, ces colonnes ont pour rôle d'augmenter la durée de vie de la colonne d'analyse en retenant tous les composés qui ne sont pas élués, elle est plus courte (0.4 à 1 cm) et est remplie de la même phase stationnaire. Cette colonne sera changée périodiquement. [7].



**Figure 8** : colonne HPLC [7].

La colonne est l'élément majeur de la chaîne HPLC. Le choix d'une colonne HPLC est lié aux paramètres suivants :

- ❖ Type de la phase stationnaire
- ❖ Longueur
- ❖ Diamètre des particules (dp)
- ❖ Débit de la phase mobile supportable. [11].

### I.2.2.5.1. Phase stationnaire

#### I.2.2.5.1.1. La phase stationnaire normale

La phase normale est constituée de gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaires qui sortent en tête.

#### I.2.2.5.1.2. La phase stationnaire inversée

La phase inverse est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant B polaire (ACN, Me OH, H<sub>2</sub>O). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante. [12].

En chromatographie liquide à haute performance de phase inversée, la phase stationnaire est apolaire et la phase mobile modérément polaire, l'efficacité de remplissage est fortement affectée par la qualité du gel de silice de la phase stationnaire. On peut utiliser une colonne de type C18, qui a plusieurs avantages et est fréquemment utilisée pour les analyses des produits pharmaceutiques par HPLC.

La phase stationnaire apolaire, est formée d'un gel de silice dans lequel on a greffé des fonctions chimiques le plus souvent de chaînes alkyles à 18 atomes de carbone, hydrophobes.

La phase stationnaire est maintenue entre deux disques frittés [13].

### I.2.2.6 Détecteurs

Ils permettent de visualiser la séparation, voire d'améliorer la sélectivité dans le cas où celle du système chromatographique est insuffisante et, pour les plus performants d'entre eux, d'apporter des informations quant à l'unicité des pics chromatographiques ou encore l'identification des solutés.

Un grand nombre de détecteurs fondés sur des principes différents sont commercialisés compte tenu de l'absence d'un détecteur qui soit à la fois sensible et universel. On peut donc les classer soit selon leur principe de mesure, soit selon le degré d'information qu'ils peuvent apporter.

Dans le premier classement, on distingue les détecteurs mettant en œuvre une propriété spécifique du soluté (détection directe), une propriété spécifique d'un des constituants de l'éluant (détection indirecte) ou une différence de propriété entre le soluté et la phase éluante provoquant des variations au niveau de l'effluent (détection différentielle) (**voir annexe 1**). [25]

Dans le second classement, on les regroupe en trois catégories (**annexe 2**) [1] :

- **Détecteurs simples :**

Qui n'assurent qu'une visualisation du chromatogramme ;

- **Détecteurs semi-informatifs :**

Qui fournissent des critères de pureté (mesure du rapport des absorbances à deux longueurs d'onde différentes le long d'un pic d'éluant) ou encore permettent d'optimiser la sélectivité (programmation, dans le temps par exemple)

- **« Détecteurs intelligents » :**

Fournissant des éléments d'identification du soluté (par exemple, spectrophotomètre à barrette de diodes autorisant la mesure et le stockage des spectres UV ou visibles des espèces éluées puis leur comparaison à ceux d'une bibliothèque).

➤ **Caractéristiques d'un détecteur**

Les principales caractéristiques d'un détecteur sont les suivantes :

- ❖ bruits à court et à long termes qui conditionnent la détectabilité ;
- ❖ dérive, souvent occasionnée par la variation de la température, la variation de la composition de la phase éluante et l'usure de la source lumineuse ;
- ❖ sensibilité au débit de la phase éluante et à la pression dans la cuve de détection ;
- ❖ domaine de linéarité de la réponse et concentration minimale détectable (le domaine linéaire est défini par le rapport :

$$C_h/C_{min}$$

Où

$C_h$  : est la limite supérieure du domaine de linéarité définie comme la concentration de la solution du soluté test introduit directement dans la cellule du détecteur fournissant une réponse correspondant à un écart à la linéarité de 5 %,

$C_{min}$  : est la concentration du soluté dont l'introduction directe dans la cellule donne un signal égal à deux fois le bruit de fond à court terme). [1].

Les détecteurs absorptiométriques dans l'ultraviolet ou le visible et le réfractomètre différentiel sont les plus utilisés. [25]

### **I .2 .2 .6 .1 Détecteur par absorption dans l'ultraviolet et le visible**

La spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible (UV-VIS) est une technique d'un âge respectable encore très utilisée dans les laboratoires et dans l'industrie. Elle a bénéficié des progrès technologiques et des moyens de calcul apportés par l'outil informatique. De plus, c'est une technique bien adaptée aux moyens de contrôle et de validation qui permettent de produire des données de qualité reconnue et quantifiée. [26].

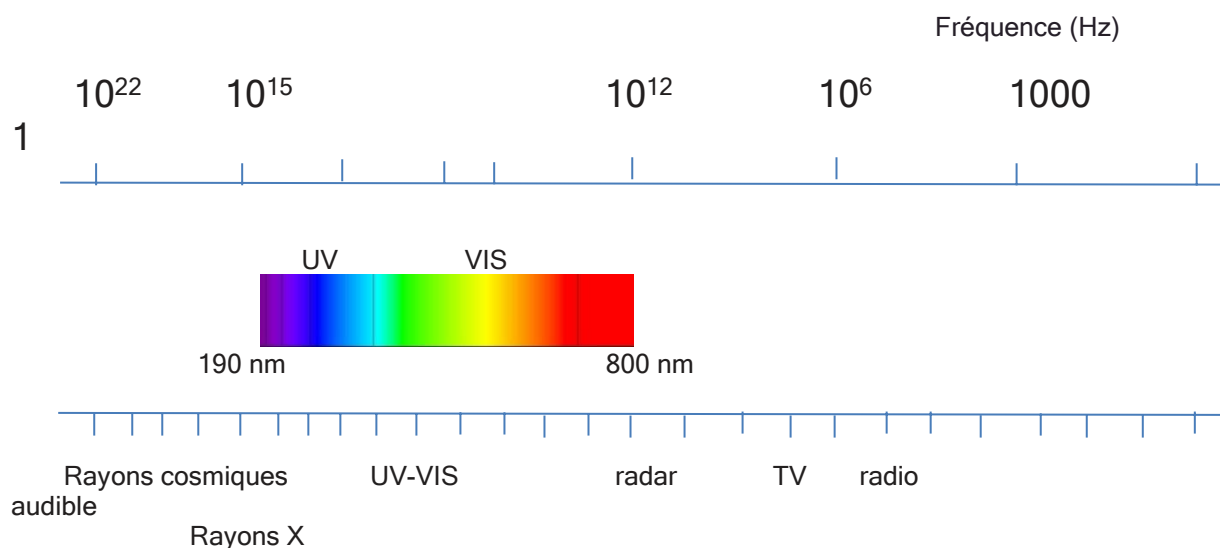
Ces détecteurs sont les plus couramment utilisés en HPLC car ils sont peu sensibles aux fluctuations de débit et de température et un grand nombre de solvants ont une bonne transparence dans l'UV. [7].

#### **I .2 .2 .6 .1 .1 Principes**

##### **➤ Absorption du rayonnement dans le domaine UV-VIS**

Le principe de la spectrométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible repose sur l'absorption du rayonnement par les molécules dans le domaine allant de 190 à 800 nm, ce qui correspond à l'ultraviolet (190-400 nm) et au visible (400-800 nm). Certains spectrophotomètres couvrent aussi le proche infrarouge jusqu'à 2 500 nm par exemple. Ce domaine est illustré dans la figure 9.





**Figure 9 :** domaine spectral du rayonnement Electromagnétique

On remarque que le domaine UV-VIS n'occupe qu'une faible partie du domaine d'existence des rayonnements, allant des rayons cosmiques aux ondes radios. [26].

### ➤ Spectres obtenus, analyse qualitative

- Pour les nombreuses molécules gazeuses qui absorbent dans l'UV-VIS comme le monoxyde d'azote NO, le dioxyde de soufre SO<sub>2</sub>, l'ammoniac NH<sub>3</sub>, le chlore Cl<sub>2</sub>, l'hydrogène sulfuré H<sub>2</sub>S, le benzène C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> ... les spectres obtenus sont une véritable empreinte digitale de ces molécules
- Dans le cas des liquides et des solutions, les interactions moléculaires viennent masquer les structures fines observées pour les gaz : on ne retrouve alors que des bandes plus ou moins larges qui peuvent rendre plus douteuse l'identification des molécules, ce qui explique que la spectrométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible est surtout une méthode d'analyse quantitative.
- Dans le cas de mélanges simples avec peu de constituants qui absorbent, on peut cependant identifier des espèces.

### ➤ Lois de l'absorption, analyse quantitative

L'absorption du rayonnement UV-VIS par les molécules permet de mesurer le nombre (ou plutôt la concentration) de ces molécules présentes dans le trajet du rayonnement. On ne mesure pas directement ce nombre, mais on procède à un étalonnage en utilisant des mélanges étalons de concentrations connues des molécules que l'on veut doser. Ces étalons sont placés dans des cellules d'absorption traversées par le rayonnement UV-VIS. La quantité de

rayonnement absorbée dans les zones d'absorption spécifiques des molécules à doser est déterminée par le spectrophotomètre. À une longueur d'onde où la molécule absorbe, il existe une loi simple entre quantité de rayonnement transmis par le milieu et concentration des molécules qui absorbent (on suppose que seule l'espèce à doser absorbe à cette longueur d'onde). [26].

C'est la loi de Beer-Lambert qui relie l'absorption, à une longueur d'onde  $\lambda$ , et concentration  $c$  des molécules qui absorbent. Si l'intensité du rayonnement à la longueur d'onde  $\lambda$ , avant traversée de la cellule, est  $I_{\lambda}^0$ , l'intensité, après traversée de la cellule, sera  $I_{\lambda}$  reliée à  $I_{\lambda}^0$  par la relation :

$$I_{\lambda} = I_{\lambda}^0 \exp(-\epsilon_{\lambda}lc)$$

Ou encore

$$A_{\lambda} = \lg I_{\lambda}^0 / I_{\lambda} = \epsilon_{\lambda}lc$$

Avec

$A_{\lambda}$  absorbance du milieu à la longueur d'onde  $\lambda$ , exprimée en nm dans l'UV-VIS,

$\lg I_{\lambda}^0 / I_{\lambda}$  logarithme en base 10,

$\epsilon_{\lambda}$  coefficient spécifique d'absorbance molaire en  $L \cdot \text{mole}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ,

$l$  trajet optique de la cellule en cm,

$c$  concentration en  $\text{mole} \cdot L^{-1}$  des molécules qui absorbent à la longueur d'onde  $\lambda$ .

### I.2.2.6.1.2 Instrumentation

#### ➤ Organisation des composants

On peut classer les appareils en deux catégories :

- **les appareils à simple faisceau**, eux-mêmes subdivisés en appareils à montage optique direct ou à montage optique inversé ;
- **les appareils à double faisceau**, à montage optique direct.

Le choix des appareils va dépendre des problèmes à résoudre : on peut dire que les appareils à double faisceau sont les appareils les plus performants en

## Chapitre I : Chromatographie liquide à haute performance HPLC

termes de possibilités d'analyses diverses et de caractéristiques métrologiques ;

En revanche, beaucoup d'appareils à simple faisceau utilisent des techniques récentes comme les détecteurs à barrettes de diodes, les fibres optiques, les monochromateurs et lampes miniatures... Ils sont souvent constitués de modules simples à assembler, ce qui peut permettre de construire des spectrophotomètres bien adaptés aux problèmes à résoudre.

La figure 10 présente le schéma des appareils à simple faisceau, avec les deux montages existants, [26].

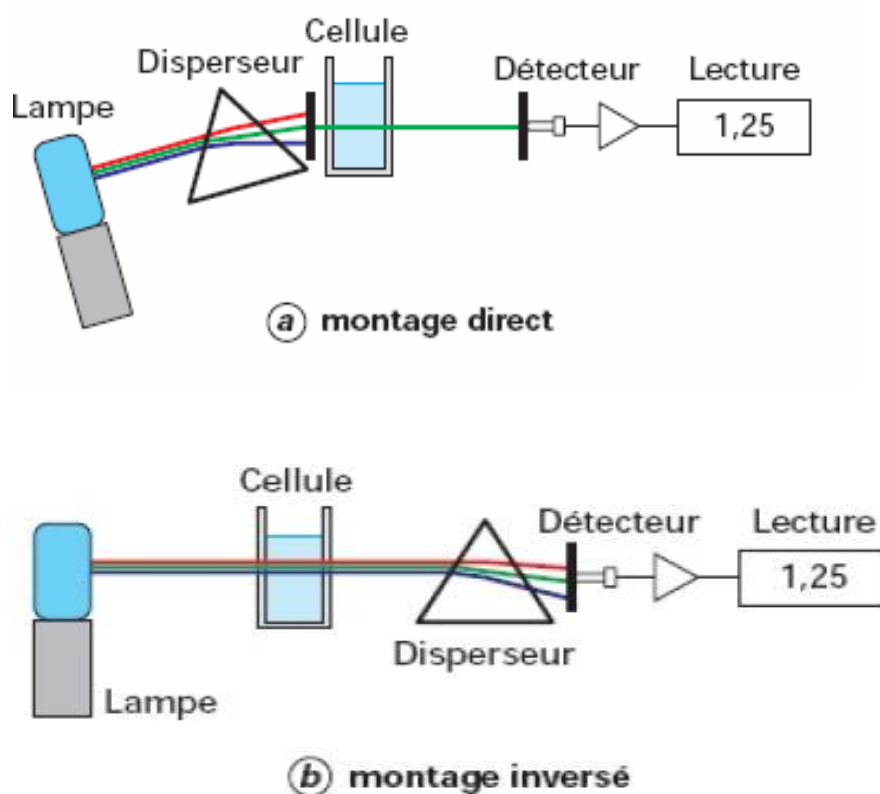
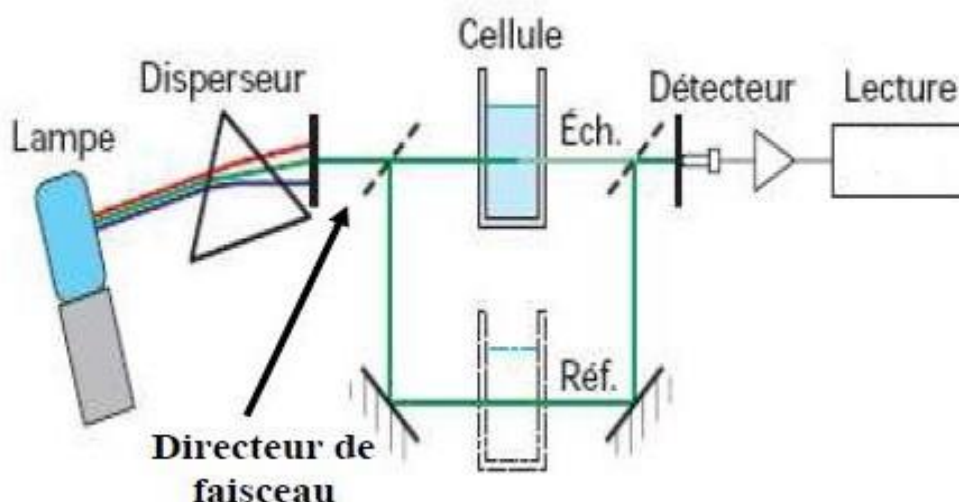


Figure 10 : Schéma des appareils à simple faisceau



**Figure 11** : Schéma des appareils à double faisceau

Le schéma 11 de principe des spectrophotomètres à double faisceau est présenté dans cette figure. Les constituants sont les mêmes, et on utilise pratiquement toujours le montage à optique directe. À la sortie du monochromateur, un dispositif optique sépare le faisceau monochromatique en deux faisceaux qui vont traverser deux cuves de mesure :

- la cuve de **mesure** où se trouve l'échantillon ;
- la cuve de **référence** qui contient en général le solvant ou une solution dont la matrice est, si possible, identique à celle des échantillons, mais sans la molécule soumise à l'analyse.

Les spectrophotomètres à double faisceau sont des appareils à balayage en longueurs d'onde. Ils sont en général d'une technologie plus compliquée et sont plus chers que les appareils à simple faisceau. [26]

### ➤ Sources de rayonnement

La source lumineuse idéale consiste à la production d'une intensité constante à toutes les longueurs d'onde, avec un faible bruit et une bonne stabilité. Afin d'atteindre au maximum ces objectifs les sources de rayonnement sont constituées généralement de deux lampes pour couvrir tout le domaine UV- VIS:

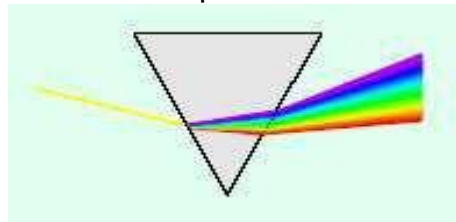
- Dans le domaine UV, on utilise une lampe au deutérium (domaine spectral : 190 à 400 nm)
- Dans le visible, on utilise la lampe à filament de tungstène (domaine spectral : 350 à 1300 nm)

- Dans certains cas, on peut n'utiliser qu'une seule lampe comme la lampe au xénon à haute pression, dont le spectre couvre tout le domaine UV- VIS. [28].

➤ **Les unités de dispersion**

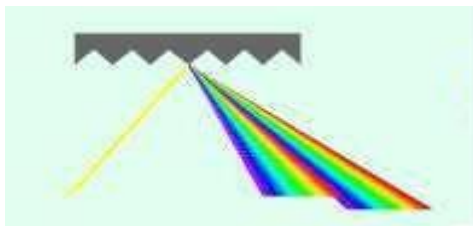
Le but d'une unité de dispersion est de sélectionner une longueur d'onde parmi le spectre du rayonnement incident. Deux types d'unité de dispersion sont utilisés :

- les prismes (qui ne sont plus utilisés dans les appareils récents), qui génèrent un arc-en-ciel à partir de la lumière du soleil



**Figure 12** : schéma de  
prisme

- les réseaux (unité de verre spécifique sur laquelle des rainures très étroites sont tracées) [28].



**Figure 13** : schéma des réseaux

- **Réseaux de diffraction**

La plupart des systèmes actuellement commercialisés font appel au réseau à cause de ses meilleures caractéristiques de dispersion. Un réseau de diffraction consiste en une série de traits périodiques et parallèles sur une surface plate ou concave.

- **Production des réseaux**

Deux types de fabrication de réseaux sont actuellement disponibles:

- le réseau gravé
- le réseau interférométrique (ou holographique).

Le premier est obtenu par gravure à l'aide d'un diamant. Le second type de réseau est obtenu en utilisant les interférences produites par la recombinaison de deux faisceaux provenant d'un même laser.

### **- Types de réseaux**

On distingue deux types de réseaux :

- réseaux standards ou conventionnels
- Réseaux du type échelle

Dans le cas des réseaux standards, on distingue également deux formes de réseaux, les réseaux plans et les réseaux concaves. Les réseaux échelle sont toujours des réseaux plans [27].

### **- Résolutions théorique et pratique**

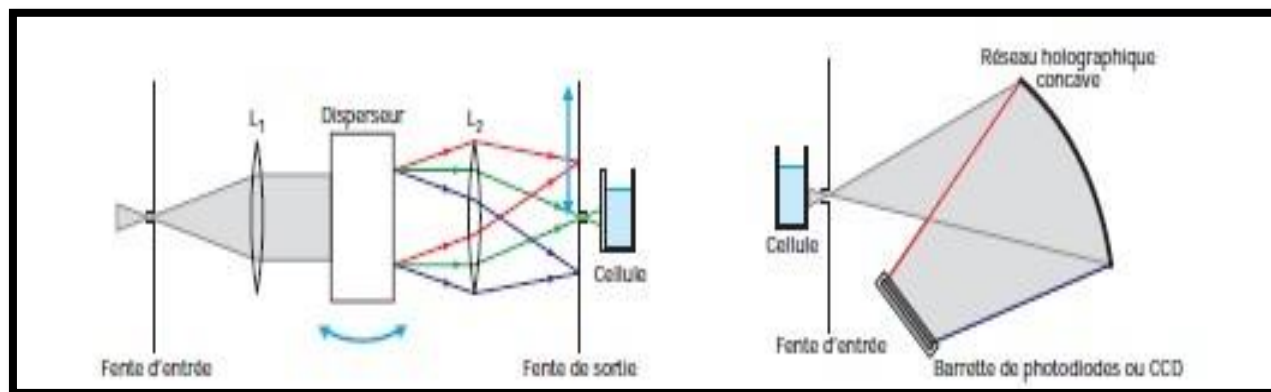
La résolution pratique d'un système dispersif est sa capacité à séparer deux raies adjacentes. La résolution est exprimée en unité de longueur d'onde ( $\mu\text{m}$ ) alors que le pouvoir de résolution est le rapport de la longueur d'onde (à laquelle a été mesurée la résolution) sur la résolution. Le pouvoir de résolution est donc sans unité. La résolution pratique dépend :

- de la résolution théorique donnée par la diffraction du réseau ;
- de la bande passante ;
- des aberrations optiques. [27]

Les unités de dispersion sont utilisés dans deux types de montage : [28].

### **❖ Monochromateurs et spectrographes (polychromateurs)**

On utilise les deux termes pour distinguer les montages à optique directe (monochromateurs) et ceux à optique inversée (spectrographes ou polychromateurs.) La figure 14 présente les montages de monochromateurs et spectrographes.



1-Monochromateur dispersif séquentiel à montage optique direct inversé

2-spectrographe à montage optique inversé

**Figure 14 :** Montage des chromateurs et spectrographes [26].

### - Les monochromateurs (montage à optique directe)

Un monochromateur est un spectromètre qui isole une seule bande spectrale spécifique à un moment donné. Cette bande peut être fixe, ou bien le monochromateur peut balayer de façon continue un domaine donné de longueur d'onde, ou encore le monochromateur peut se déplacer séquentiellement d'une bande à une autre. Dans ce dernier cas, le monochromateur est appelé système séquentiel. [27]

Dans le montage « direct », le monochromateur est placé entre la source et la cellule de mesure, qui est donc traversée par un rayonnement monochromatique. Le rayonnement transmis est alors projeté sur le détecteur. Le montage optique est complexe ce qui entraîne une lenteur au niveau de l'acquisition à cause du balayage. En revanche cette méthode permet d'avoir un large domaine spectral et une haute résolution

Le balayage est obtenu par rotation du dispersour, par un mécanisme qui peut limiter l'exactitude et la répétabilité des longueurs d'onde. Les dispersours les plus courants sont des réseaux de diffraction plans, de forme rectangulaire, qui font en même temps office de miroir plan et de séparation des longueurs d'onde. Cette séparation est obtenue par des sillons parallèles.

Les dimensions des réseaux sont de l'ordre de quelques cm, et ils peuvent contenir plusieurs centaines de milliers de sillons. [26].

### - Les polychromateurs ou spectrographes (montage à optique inversée)

Un polychromateur est un spectromètre qui isole simultanément plusieurs bandes spectrales spécifiques. [27].

Dans le cas des polychromateurs, le disperseur se situe derrière l'échantillon: l'échantillon donc reçoit tout le rayonnement UV ce qui peut être néfaste pour certains types d'échantillons. De plus, le domaine spectral est peu étendu. En revanche on a une bonne reproductibilité des mesures et une excellente vitesse d'acquisition.

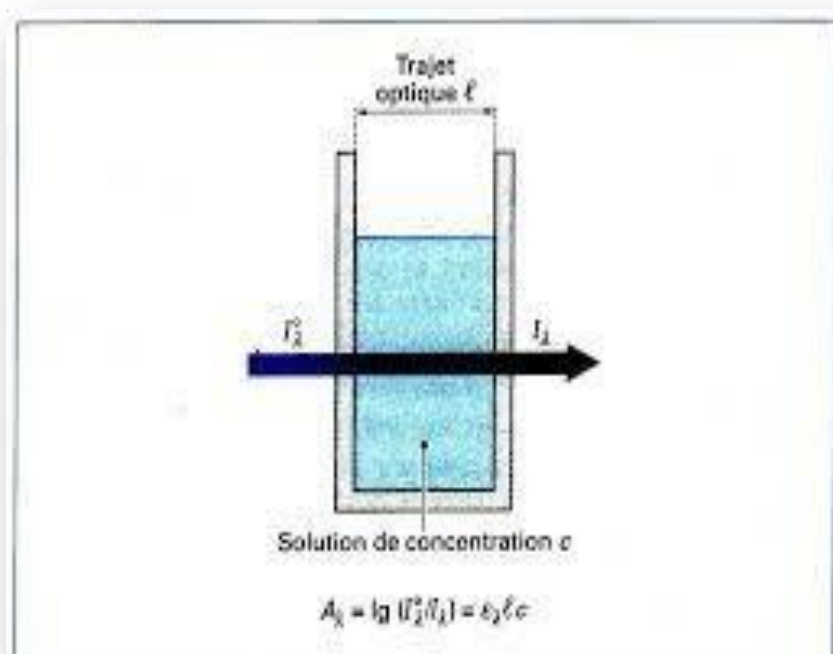
Pour les appareils à simple faisceau à montage inversé, le disperseur est le plus souvent un réseau holographique concave qui sert de disperseur et de miroir concave projetant le spectre sur les pixels de la barrette de photodiodes ou du détecteur CCD. Chaque pixel « voit » une longueur d'onde, la largeur du pixel conditionnant la bande passante du polychromateur.

- **Remarque :**

Dans le cas des spectrophotomètres équipés de détecteurs à barrettes de diodes ou de CCD, on utilise le montage inversé. [26]

➤ **Cellules d'absorption**

Elles dépendent de l'état physique des échantillons. Il existe une très grande variété de cellules et de compartiments où s'installent ces cellules dont les trajets optiques peuvent aller de quelques micromètres (détecteurs de chromatographie liquide à haute pression), à quelques centaines de mètres (mesure des polluants atmosphériques en trajet ouvert). Voir figure 15. [26]



**Figure 15 :** schéma d'une cellule d'absorption



## **Chapitre I : Chromatographie liquide à haute performance HPLC**

---

Pour les solutions, on utilise le plus souvent des cellules parallélépipédiques appelées aussi cuvettes dont le trajet optique est généralement de l'ordre du cm. Les matériaux utilisés pour les fenêtres sont soit du quartz fondu, transparent jusqu'à 200 nm, soit la silice fondue qui permet de descendre jusqu'à 170 nm. Il existe des cellules à usage unique en matière plastique, transparentes jusqu'à 320 nm, et des cellules en verre transparentes jusqu'à 340 nm.

### ➤ **Détecteurs**

Le détecteur fournit une tension électrique proportionnelle ou inversement proportionnelle à l'intensité du rayonnement.

- Les détecteurs de type photodiode ou photomultiplicateur qui équipent les montages à optique directe sont placés derrière la fente de sortie du monochromateur. Ils reçoivent donc le rayonnement monochromatique,  $\lambda$ , isolé par le monochromateur.

Les spectres sont obtenus par rotation du disperseur, et les différentes longueurs d'onde défilent devant le détecteur. Le système est dit à balayage.

- Pour les spectrophotomètres équipés de détecteurs « multi-longueurs d'onde », comme le sont les barrettes de photodiodes et les CCD, le polychromateur disperse et projette directement le spectre sur les pixels (éléments unitaires du détecteur. voir figure 10). Il s'agit dans ce cas de montages de type inversé.

Tous les éléments spectraux sont mesurés simultanément, et le système optique ne comporte plus aucune pièce mobile, ce qui apporte un certain nombre d'avantages :

- acquisition rapide des spectres permettant de les accumuler afin d'augmenter le rapport signal/bruit ;
- choix étendu de longueurs d'onde disponibles ;
- répétabilité des longueurs d'onde ;
- miniaturisation et portabilité des spectrophotomètres

### ➤ **Traitement des données**

Les spectrophotomètres actuels sont en général pilotés par des ordinateurs équipés de logiciels plus ou moins sophistiqués. [26]

### **I .2 .2 .6 .1 .3 caractéristiques**

Si cette technique est encore largement utilisée, c'est qu'elle présente des qualités, dont on peut citer les plus évidentes :

- technique d'un coût raisonnable, de l'ordre de 10 000 à 30 000 € ;
- vérification et validation des données bien documentées ;
- travail entre deux « bornes » : 0 et 100 % de transmission, facilement vérifiables ;
  
- de nombreuses espèces à l'état gazeux, liquide ou solide absorbent dans l'UV-VIS, soit directement, soit après développement d'espèces absorbantes ;
  
- on dispose d'une abondante bibliographie et de notes d'applications dans de nombreux domaines ;
- on peut obtenir de bonnes sensibilités, soit par préparation des échantillons, soit en modifiant des paramètres physiques comme la longueur du trajet optique par exemple ;
- les temps de réponse peuvent être très courts, même pour l'enregistrement de spectres complets ;
- on trouve sur le marché des composants miniatures, des fibres optiques et des cellules couplées qui permettent de faire des mesures déportées, ce qui permet d'adapter facilement la technique à des problèmes particuliers ;
- les méthodes modernes de traitement des données permettent de résoudre des problèmes difficiles d'analyse multi-composants ou de suppression des interférences ;
  - on peut coupler la spectrométrie UV-VIS avec d'autres techniques comme la chromatographie

### **I .2 .2 .6 .1 .4 Domaines d'application**

La spectrophotométrie est utilisée dans beaucoup de domaines : chimie, pharmacie, environnement, agroalimentaire, biologie etc., aussi bien au laboratoire que sur site industriel.

Dans l'industrie pharmaceutique, de nombreux tests de dissolution de médicaments sont réalisés par spectrophotométrie d'absorption UV-VIS. [26].

Il est actuellement utilisé dans la recherche pharmaceutique et le développement:

- Pour purifier les produits synthétiques ou naturels.
- Caractériser les métabolites.
- Pour doser les ingrédients actifs, les impuretés, les produits de dégradation et dans les essais de dissolution.

## **Chapitre I : Chromatographie liquide à haute performance HPLC**

---

- Dans les études pharmacodynamiques et pharmacocinétiques. [18].

Les spectrophotomètres UV-VIS peuvent aussi être utilisés pour la mesure des épaisseurs des films transparents, pour la couleur des solutions, notamment des effluents industriels (peinture, teinturerie), pour la mesure des pouvoirs réflecteurs des solides, à l'aide de sphères d'intégration. [26].

- **Applications particulières, couplages**

Comme applications particulières, on peut citer :

- Les spectrophotomètres peuvent servir de détecteurs

Pour d'autres techniques analytiques comme la chromatographie liquide à haute pression (HPLC). Ce sont généralement des appareils à barrettes de photodiodes bien adaptés à ce type de détection : les espèces séparées par la colonne de chromatographie passent individuellement devant le détecteur qui peut acquérir le spectre complet pendant le temps de passage du constituant. [26].

### **I.2.2.6.2 Détecteurs spectrofluorimétriques**

Ce mode de détection a une grande sélectivité et une grande sensibilité. Il exploite les propriétés qu'ont certaines molécules en solution d'absorber des radiations dans l'ultraviolet (passage à un état excité) et de réémettre une fraction de la lumière absorbée donc à une longueur d'onde supérieure, l'autre fraction étant convertie en énergie interne (conversion interne).

On obtient pour une molécule deux spectres différents : un spectre d'absorption (excitation) et un spectre d'émission (désexcitation radiative) :

La loi fondamentale en fluorimétrie est que l'intensité  $I_f$  du rayonnement émis par fluorescence est proportionnelle pour un volume donné, à l'intensité lumineuse absorbée :

$$I_f = k I_{abs} = k (I_0 - I_t)$$

En remplaçant l'intensité transmise  $I_t$  par son expression donnée par la loi de Beer-Lambert, on peut calculer  $I_f$ :

$$I_f = k I_0 (1 - 10^{-\epsilon C})$$

Il existe trois types d'appareillage :

- ✓ les spectrofluorimètres munis d'un monochromateur à l'excitation et d'un filtre à l'émission,
- ✓ les spectrofluorimètres munis de monochromateurs à l'excitation et à l'émission,
- ✓ les spectrofluorimètres programmables en longueur d'onde dans le temps. Ceci permet d'optimiser la sensibilité et la sélectivité.

### I.2.2.6.3 Détecteurs par réfractométrie différentielle

Le réfractomètre différentiel mesure en continu la différence d'indice de réfraction entre la phase mobile et l'effluent de la colonne chromatographique. La limite de détection dépend à la fois de la nature du soluté et de celle de la phase éluante. En effet, la réponse  $R_1$  du réfractomètre est donnée par la relation :

$$R_1 = Z (n - n_0)$$

Avec :

- Z constante caractéristique de l'appareil,
- n indice de réfraction de l'effluent,
- $n_0$  indice de réfraction de la phase éluante.

Ce type de détecteur sera utilisé comme un détecteur complémentaire au détecteur à absorption lumineuse lorsque celui-ci ne convient pas. Il est surtout utilisé en chromatographie d'exclusion (analyse des distributions de masses moléculaires de polymères) et en chromatographie préparative.

Les réfractomètres sont de trois types :

- ✓ le réfractomètre de Fresnel (basé sur la réflexion de Fresnel : la fraction de lumière réfléchie ou transmise par une interface verre liquide est proportionnelle aux indices de réfraction des deux substances) ;
- ✓ le réfractomètre à déviation (la déviation d'un faisceau lumineux traversant une cellule séparée en deux compartiments de forme triangulaire par une cloison en verre, chaque compartiment contenant un liquide différent, est fonction de la différence d'indices des deux liquides) ;
- ✓ le réfractomètre interférométrique (la différence des vitesses de la lumière dans les deux liquides est mesurée à l'aide d'un interféromètre).

### I.2.2.6.4 Détecteurs par conductimétrie

Ce détecteur est limité à la détection des espèces ionisées et est surtout utilisé en chromatographie ionique. Son principe repose sur la mesure, en sortie de colonne, de la conductance de la phase mobile riche en composé ionique. La difficulté dans cette analyse est de reconnaître dans le signal global la part de conduction due aux ions ou substances ioniques faiblement chargées appartenant à l'échantillon de celle de l'électrolyte contenu dans la phase mobile.

La conductance d'une solution est donnée par la relation :

$$G = \sum \lambda_i z_i C_i / 10^{-3} K$$

Avec : G : conductance de la solution  $\mu\text{s}$

$\lambda_i$  : conductivité ionique de l'ion i ( $\text{S cm}^2 \text{mol}^{-1}$ )

$C_i$  : concentration de l'ion i ( $\text{mol l}^{-1}$ )

$z_i$  : valeur absolue de la charge de l'ion i

K : constante de la cellule conductimétrique ( $\text{cm}^{-1}$ ) [7].

### I.2.2.6.5 Autres détecteurs

Outre les détecteurs classiques précédents, il existe différentes possibilités de couplage parmi lesquelles on peut citer : les spectrométries de masse, de résonance magnétique nucléaire et les détecteurs de radioactivité pour les molécules marquées. [25].

### I.2.2.7 Enregistreur

L'enregistreur reçoit un signal électrique proportionnel à la concentration de l'analyte qui traverse le détecteur. Ce signal est traité, amplifié puis utilisé pour tracer le chromatogramme. Pour qu'un pic soit exploitable, on considère généralement que le rapport signal / bruit doit être au moins de trois. Le bruit se traduit par des oscillations plus ou moins marquées autour de la ligne de base, ce bruit de fond aléatoire provient de diverses causes :

- ❖ la variation de température
- ❖ de la pression
- ❖ l'instabilité électronique

Par ailleurs on doit avoir une ligne de base aussi proche que possible de l'horizontale.

## Chapitre I : Chromatographie liquide à haute performance HPLC

### I.2.3 Domaines d'application de l'HPLC

La chromatographie liquide haute performance a pour objet plus une analyse quantitative que qualitative car il paraît difficilement envisageable de balayer tout l'intervalle de longueur d'onde accessible pour détecter n'importe quel produit contenu dans la solution étudiée.

- L'HPLC se développe de plus en plus pour des très nombreuses molécules (hormones, vitamines, médicaments, ...). C'est un appareil de base indispensable dans tous les laboratoires de recherches. [5].

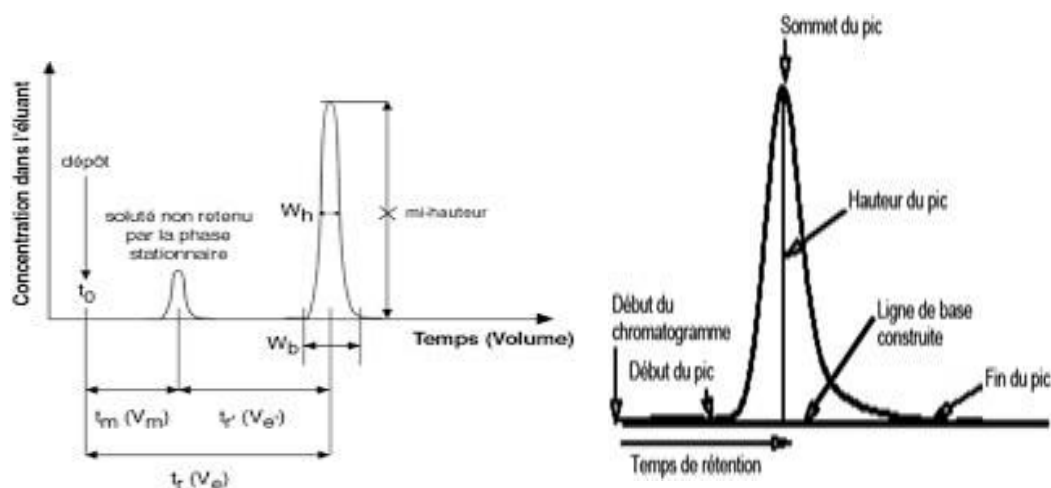
- La HPLC est employée pour l'analyse des produits médicamenteux de finition. Puisque la HPLC peut séparer des composés, elle est également appliquée pendant la fabrication. Par cette séparation, la HPLC peut fournir aux produits commençants critiques pour la fabrication des médicaments neufs, ou à la caractérisation des molécules le potentiel d'être fabriqué dans des médicaments. [29].

- L'HPLC est aussi employée en cosmétologie elle permet l'analyse soit des substances thermiquement instable soit des substances peu volatiles, soit encore des substances ionisées

- Les molécules d'intérêts biologiques comme les vitamines, les sucres et les acides aminés peuvent être analysées directement sans passer par la formation de dérivés, et la séparation des protéines et de polymères synthétiques peut être réalisée même si leur masse est élevée. [5].

### I.2.4 Application de Chromatographie Liquide Haute Performance à l'analyse

- Informations apportées par un chromatogramme



**Figure 16 :** informations apportées par un chromatogramme **Figure 17 :** Structure d'un pic [14].

Un chromatogramme est un digramme montrant l'évolution du signal du détecteur (proportionnel à la concentration en soluté) en fonction du temps d'élution (plus rarement du volume d'élution). Comme illustrée ci-dessous :

### I.2.4.1 Caractéristiques du chromatogramme

T=0 : Le temps du début d'injection

T<sub>m</sub> : Le temps mort

t<sub>r</sub> : Le temps de rétention

t'<sub>r</sub> ; Le temps de rétention réduit : est le temps passé par un soluté dans la phase stationnaire, soit :

$$t'_r = t_r - t_m$$

ω : largeur du pic à la base, définie comme la distance entre les points d'intersection des tangentes d'inflexion avec la ligne de base,

ω<sub>1/2</sub> ou δ : La largeur du pic à mi hauteur exprimée en unité de temps.

h : La hauteur du pic.

Ecart type relatif des aires du pic :  $1/16 \sum (y_i - Y')^2$

Avec :

y<sub>i</sub> est l'aire du pic pour l'injection i donné par l'intégration du pic.

$Y' = 1/16 (y_1 + y_2 + \dots + y_6)$  la moyenne des aires du pic.

On peut calculer l'écart type relatif en pourcentage : % RSD =  $100 \sigma / Y'$

RSD : Relative Standard Deviation. . [5].

### I.2.4.2 Grandeurs fondamentales

Les séparations sont fondées sur la différence de distribution des espèces entre deux phases non miscibles, l'une stationnaire (silice vierge ou greffée, polymère moléculaire ou échangeur d'ions), l'autre mobile (phase liquide constituée par un solvant pur ou plus souvent par un mélange de solvants). Pour un système chromatographique donné, on caractérise la distribution de chaque soluté entre les deux phases par le coefficient de distribution (ou coefficient de partage) K défini par la relation :

$$K = C_s / C_m$$

C<sub>s</sub> et C<sub>m</sub> désignant respectivement les concentrations du soluté à l'équilibre dans les phases stationnaire et mobile.

Une bonne séparation en chromatographie en phase liquide implique :

— que les divers constituants du mélange soient retenus dans la colonne, donc

## **Chapitre I : Chromatographie liquide à haute performance HPLC**

---

présentent une affinité pour la phase stationnaire suffisante pour qu'ils apparaissent dans l'effluent après un volume supérieur au volume de phase mobile contenu dans la colonne ;

- que les différents pics soient bien séparés, ce qui, pour deux pics consécutifs, implique que les bandes de solutés se séparent entre elles (sélectivité) plus vite qu'elles ne s'étalent (efficacité) ;
- que l'analyse soit aussi rapide que possible. [24].

### **I.2.4.2.1 Grandeurs de rétention**

#### **- Temps de rétention**

Le temps de rétention est une grandeur caractéristique d'un analyte dans des conditions opératoires données, c'est le temps écoulé entre l'injection et le maximum du pic du composé élué, noté  $t_r$  et exprimé en minutes. On utilise ce paramètre pour identifier les composés dans un chromatogramme. Il varie en fonction du débit de la phase mobile et de leur composition, de la température d'élution et de la nature de colonne utilisée.

Le temps de rétention  $t_r$  d'un soluté est fonction de son affinité avec l'éluant d'une part et avec la phase stationnaire d'autre part.

#### **❖ Temps mort**

Le temps mort est le temps nécessaire pour qu'un composé non retenu traverse la colonne ; il est noté  $t_m$  ou  $t_o$  et exprimé en minutes.

$$t_m = t_o = L / V$$

Avec:

$L$  : la longueur de la colonne.

$V$  : la vitesse de la phase mobile.

#### **❖ Volume de rétention**

C'est le volume de la phase mobile nécessaire pour éluer un composé d'un mélange à analyser. Ce volume est caractéristique d'un seul composé dans des conditions opératoires données. Il est lié au temps de rétention  $t_r$  d'un soluté et au débit d'écoulement de la phase mobile  $D$ . Le volume de rétention est noté  $V_r$ .

$$V_r = t_r \cdot D$$



### ❖ Facteur de rétention $k'$

Le facteur de rétention  $k'$  représente l'affinité d'un composé vis-à-vis de la phase stationnaire. C'est un paramètre important indépendant du débit de la phase mobile et des dimensions de la colonne. Si pour deux analyses identiques, dans les mêmes conditions opératoire, on obtient deux valeurs de temps de rétention identiques et deux valeurs de  $k'$  différentes, cela signifie qu'il y a une fuite de phase mobile avant la colonne. Et si on a deux valeurs de  $t_r$  et deux valeurs de  $k'$  différentes, ce qui indique qu'il y a des problèmes au niveau de la phase mobile ou phase stationnaire. [14].

$$k' = (t_r - t_m) / t_m$$

### I.2.4.2.2. Efficacité d'une colonne

L'efficacité d'une colonne chromatographique, dont dépend l'étalement des pics, est mesurée, pour chaque composé, par le nombre de plateaux théoriques  $N$  de la colonne. On établit que le nombre de plateaux théoriques d'une colonne s'exprime, pour un soluté donné, par les relations :

$$N = 16(t_r/\omega)^2 = 5,54 (t_r/\delta)^2$$

En pratique, on mesure directement  $t_r$  et  $\delta$  (ou  $\omega$ ) sur le chromatogramme, préférant en général la mesure de  $\delta$  à celle de  $\omega$  pour des raisons de meilleure répétabilité. Pour pouvoir comparer entre elles des colonnes de différentes longueurs, on définit la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT ou  $H$ ) :

$$H = L / N$$

Avec

$L$  : longueur de la colonne. [24].

L'efficacité d'une colonne dépend de trois facteurs principaux :

- ❖ De sa géométrie : plus une colonne sera longue et plus elle sera efficace.
- ❖ De son garnissage : plus les particules de silice seront fines et plus la colonne sera efficace.

## Chapitre I : Chromatographie liquide à haute performance HPLC

---

- ❖ Du débit de l'éluant : Il existe un débit optimal d'utilisation d'une colonne pour lequel son efficacité est la plus grande. [14].

### I .2 .4 .2 .3 Sélectivité ( $\alpha$ )

Pour préciser la position relative de 2 pics adjacents A et B sur un chromatogramme on exprime le facteur de séparation (ou sélectivité)  $\alpha$  selon:

$$\alpha = t'_{rB}/t'_{rA}$$

Il ne permet pas de savoir à lui seul si la séparation est réellement possible, mais plus  $\alpha$  est élevé plus la séparation est facile.

En pratique  $\alpha$  toujours  $\geq 1$  car on choisit  $t'_{rB} > t'_{rA}$

$\alpha = 1$  pas de séparation

$\alpha > 1$  séparation plus facile plus  $\alpha$  augmente [5].

### I .2 .4 .2 .4 Résolution $R_s$

La résolution est une mesure de la qualité d'une séparation de point de vue chevauchement de deux signaux consécutifs. Elle est exprimée à partir des temps de rétention. La résolution est calculée à partir de la relation suivante :

$$R_s = 2 (t_{r2} - t_{r1}) / (\omega_{1/2}(1) + \omega_{1/2}(2))$$

Avec :

Si  $R_s < 1$  : une mauvaise résolution.

Si  $1 < R_s < 1,5$  : une résolution acceptable.

Si  $R_s \geq 1,6$  : une bonne résolution.

Si  $1,4 < R_s < 1,6$  : une résolution optimale.

Deux caractéristiques déterminent le degré de recouvrement des pics:

- ❖ la distance séparant les sommets de deux pics mesurée par les temps de rétention  $t_{r2}$  et  $t_{r1}$ .
- ❖ la largeur des pics à la base  $\omega_{1/2}$  (pic1) et  $\omega_{1/2}$  (pic2). [14].

#### ✓ Notion de qualité de la séparation

Une bonne séparation se traduira par une séparation distincte des pics correspondant à chacun des produits.



**Figure 18** : chromatogramme montrant la qualité de la séparation chromatographique.

### I.2.4.2.5 Perte de charge et facteur de résistance à l'écoulement

Une autre caractéristique importante d'une colonne chromatographique est sa résistance à l'écoulement. La perte de charge d'une colonne est donnée par la loi de Darcy :

$$\Delta P = \frac{\Phi \eta L u}{(d_p)^2}$$

Avec :

Dp (cm) diamètre moyen des particules,  
L (cm) longueur de la colonne,

$\Delta P$  (Pa) perte de charge ( $10^{-6}$  bar  $\approx 10^{-6}$  atm  $\approx 10^{-1}$  Pa),  
U (cm · s<sup>-1</sup>) vitesse linéaire de la phase mobile,  
 $\eta$  (Pa · s) viscosité dynamique de la phase mobile,  
 $\Phi$  (sans dimension) facteur de résistance à l'écoulement.

En pratique, la valeur de  $\Phi$  dépend de la forme des particules, de leur répartition granulométrique autour de la valeur moyenne, de la texture de la phase stationnaire et de la qualité du remplissage.

### I.2.4.2.6 Capacité disponible

La capacité disponible CD d'une phase stationnaire est définie comme la quantité de soluté injectée qui provoque la saturation de la phase stationnaire contenue dans la colonne dans des conditions déterminées. On l'exprime en nombre de millimoles de solutés par gramme de phase stationnaire :

$$CD = QS/m$$

## Chapitre I : Chromatographie liquide à haute performance HPLC

---

Avec :

QS quantité de soluté fixée à l'équilibre (à saturation) par la phase stationnaire,

m masse de phase stationnaire contenue dans la colonne.

Les variations de la capacité disponible CD en fonction de la concentration du soluté dans la phase mobile constituent l'isotherme de distribution.

### I.2.4.3 Cinétique

#### I.2.4.3.1 Grandeurs réduites

Dans la théorie des plateaux, la HEPT déduite de la variance  $\sigma^2$  du pic d'élution :

$$H = L/N = L\sigma^2/t_r$$

N'apparaît que comme une mesure globale de l'influence de tous les paramètres expérimentaux mis en jeu, mais elle ne permet pas de préciser la part revenant à chacun de ceux-ci dans l'étalement du pic au fur et à mesure de sa progression dans la colonne. Or l'étalement dépend :

- du diamètre et de la nature des particules de la phase stationnaire,
- de la nature et de la vitesse de la phase éluante,
- de la nature du soluté,
- de l'homogénéité du remplissage de la colonne.

Afin de préciser la contribution de chaque paramètre à la HEPT globale et de permettre une optimisation aisée des conditions d'une analyse, on utilise la notion de grandeurs réduites, adimensionnelles. Ces dernières permettent alors de comparer entre elles des colonnes remplies avec des particules de phase stationnaire de dimension et de nature différentes et utilisées dans des conditions opératoires variées.

#### ➤ Longueur réduite

Elle représente le nombre de « tranches » de particules (d'épaisseur  $d_p$ ) contenues dans la colonne. Pour des colonnes ayant même longueur réduite, une molécule de soluté rencontrera en moyenne le même nombre de particules au cours de sa progression dans la colonne, et l'on montre que cela conduit à une même efficacité si elles sont mises en œuvre avec la même vitesse réduite.

#### ➤ Hauteur de plateau réduite

La hauteur de plateau réduite  $h$  est définie par la relation :

$$h = H/d_p = l/N$$

Elle représente le nombre de couches de particules par plateau théorique.  $h$  permet de comparer entre elles les efficacités de colonnes remplies avec des particules de taille différente. Une colonne efficace utilisée au voisinage des conditions optimales a une hauteur de plateau réduite comprise entre 2 et 4 environ.

### ➤ Vitesse réduite de la phase mobile

La vitesse réduite est le rapport de la vitesse linéaire de la phase éluante et de la vitesse de diffusion du soluté sur une distance égale au diamètre d'une particule.

### I .2 .4 .3 .2 Mécanismes de dispersion d'un pic d'éluion

Pour obtenir le nombre maximal de plateaux théoriques  $N$  dans une colonne, il faut définir les conditions où la hauteur de plateau réduite  $h$  est minimale ( $N = l/h$ ). On est ainsi conduit à étudier les différents mécanismes d'élargissement d'une bande de soluté au cours de sa progression au sein

d'une colonne chromatographique et à préciser l'influence de chacun de ceux-ci sur la valeur de  $h$ . On peut considérer, dans le cas du développement par éluion linéaire, que l'étalement d'une bande de soluté a trois origines :

- la dispersion des molécules par diffusion longitudinale ;
- l'existence de « chemins multiples » dus au remplissage (anisotropie d'écoulement) ;
- la résistance au transfert de masse dans chacune des deux phases ;

### ➤ Diffusion moléculaire longitudinale

Ce terme, de la forme  $h_{\text{diff. long.}} = B/n$  traduit l'influence de la dispersion des molécules du soluté par diffusion longitudinale, c'est-à dire dans une direction parallèle à l'axe de la colonne. Dans toute bande de soluté, il apparaît un gradient de concentration, parallèle à l'axe de la colonne, lors de sa migration. Il en résulte une diffusion du soluté des régions de fortes concentrations vers celles de faibles concentrations ; cette diffusion intervient aussi bien dans la phase mobile circulant dans et autour des particules de la phase stationnaire que dans la phase liquide stationnaire tapissant les pores.

### ➤ Anisotropie d'écoulement

Il existe, pour la phase mobile, plusieurs chemins possibles à travers le lit de particules de la phase stationnaire et un profil de vitesse au sein de chaque

## **Chapitre I : Chromatographie liquide à haute performance HPLC**

---

veine liquide. La vitesse moyenne au sein de chaque veine liquide varie et ce d'autant plus que les chemins sont plus différents. Alors que le temps de rétention est régi par la vitesse moyenne  $u$ , ces différences entraînent un certain étalement du profil de concentration du soluté, c'est-à-dire un étalement du pic. Cependant, ce phénomène se trouve atténué par le fait que les molécules de soluté ne sont pas prisonnières d'une veine liquide, mais au contraire peuvent changer de veine par diffusion transversale. Cela contribue à une relaxation du profil des vitesses et limite la dispersion du soluté d'autant mieux que le remplissage de la colonne est plus homogène. Cette dernière condition implique une méthode de remplissage efficace et une distribution étroite du diamètre des particules de la phase stationnaire. [24].

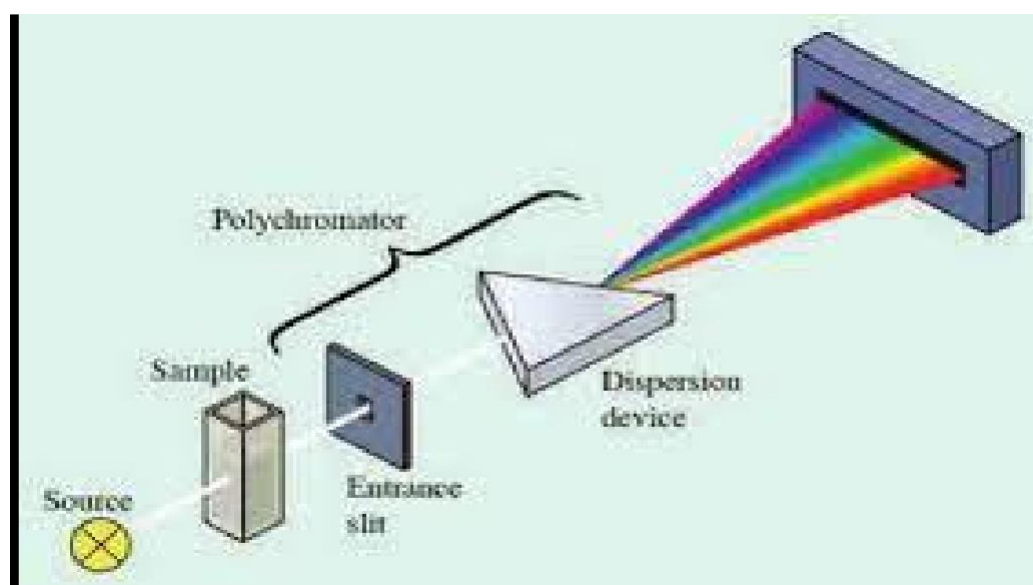
**Chapitre II: Chromatographie liquide à haute performance  
HPLC couplée à un PDA: principe de fonctionnement**

## II .1 Détecteur à barrettes de photodiodes

### II .1 .1 Définition :

Le détecteur à barrette de photodiodes (DAD) est un détecteur permettant une saisie en trois dimensions absorbance- longueur d'onde- temps, ce qui autorise l'identification des solutés par comparaison de leur spectres UV avec ceux stockés dans une bibliothèque ou encore la mise en œuvre d'un critère de pureté du soluté correspondant à un pic d'éluion. Ce dernier est fondé sur une combinaison des absorbances mesurées à différents endroits du pic d'éluion et à différentes longueurs d'onde. [25].

Un schéma général d'un détecteur à barrette de diodes est présenté à la Figure 19 :



**Figure 19** : Schéma d'un détecteur à barrette de diode

Donc, Le détecteur étant un détecteur à barrette de diode, il permet de mesurer l'absorbance d'une solution sur une gamme de plusieurs longueurs d'onde à la fois. L'acquisition est donc rapide. C'est grâce à cela que des spectres tridimensionnels (temps, absorbance, longueur d'onde) peuvent être produits. L'exploitation de ces spectres tridimensionnels permettra d'avoir des informations globales sur la matière organique dissoute non seulement sur leur taille, grâce à un étalonnage des temps de rétention, mais aussi de leur nature en comparant les absorbances à différentes longueurs d'onde. [16].



## **II .2 Couplage HPLC-PDA**

### **II .2.1 Historique :**

Il y a quelques décennies, Hirschfeld a introduit le terme césure pour désigner la combinaison d'une technique de séparation et d'une ou plusieurs techniques de détection par spectroscopie. Cette technique développée à partir du couplage d'une technique de séparation et d'une technique de détection par spectroscopie est connue récemment sous le nom de technique de césure.

Ces dernières années, les techniques de césure ont fait l'objet d'une attention de plus en plus comme principal moyen de résoudre les problèmes analytiques complexes. Le pouvoir de combiner les technologies de séparation avec les techniques spectroscopiques a été démontré au fil des années pour l'analyse à la fois quantitative et qualitative de composés inconnus dans des extraits ou des fractions complexes de produits naturels.

Pour obtenir des informations structurales conduisant à l'identification des composés présents dans un échantillon brut, la chromatographie liquide (LC), généralement une chromatographie liquide à haute performance (HPLC), chromatographie en phase gazeuse (GC) ou électrophorèse capillaire (CE) est liée à des techniques de détection spectroscopiques, par exemple, infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR), Absorbance UV-Vis barrette de photodiodes (PDA) ou émission de fluorescence, spectroscopie de masse (MS) et la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN), entraînant l'introduction de diverses techniques modernes de césure, par exemple, CE-MS, GC-MS, LC-MS et LC-RMN.

La HPLC est la méthode analytique la plus utilisée comme technique de séparation pour la détermination qualitative et quantitative de composés dans des extraits de produits naturels.

Le couplage de la séparation et les techniques de détection peuvent impliquer plus d'une technique de séparation ou de détection, par exemple, LC-PDA- MS, LC-MS-MS, LC-NMR-MS, LC-PDA-NMR-MS,

### **II .2.2 HPLC-PDA**

Le détecteur spectroscopie ultraviolet-visible (UV-Vis) est considérée comme un détecteur universel pour tout système de chromatographie liquide. Le détecteur PDA est un détecteur UV-vis avancé qui peut être couplé à une HPLC pour fournir la technique de césure HPLC-PDA également connuesous le nom LC-PDA.

## Chapitre II : Chromatographie liquide à haute performance HPLC couplée à unPDA: principe de fonctionnement

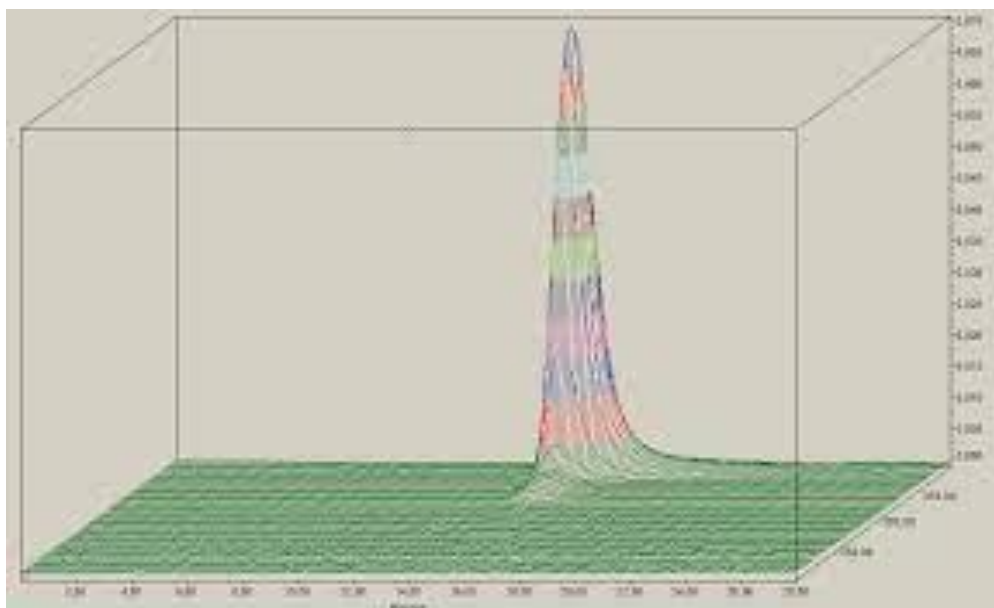
---

un détecteur PDA peuvent aider à analyser les pics LC individuels après la fin d'une analyse et pour obtenir le spectre UV-VIS complet des composés individuels.

Le chromatogramme complet à plusieurs longueurs d'onde peut être récupéré à partir des fichiers de données après analyse. Le temps de rétention de HPLC et le spectre UV-VIS pour quelconque composé (LC-PDA) peuvent être caractéristiques de certains composés.

Le détecteur PDA permet également de générer des données UV 3D consistant généralement en des spectres d'absorption UV de 190 à 500 nm pour chaque point le long du chromatographe de l'HPLC. Les données peuvent être rapidement prévisualisées pour des zones d'absorption uniques en corrélation avec des composés spécifiques ou des groupes fonctionnels.

Des chromatogrammes indépendants peuvent également être construits pour chaque longueur d'onde pour augmenter la sélectivité des données. [17].



**Figure 20** : chromatogramme 3D d'un étalon

La figure 20, nous montre un chromatogramme 3D d'un étalon qui sera utilisé avec le temps de rétention (en minutes) en abscisse, l'absorbance en ordonnée et les longueurs d'onde (en nm) sur l'axe z. Ce chromatogramme permet donc de voir le temps de rétention d'un composé, qui est en fonction de sa masse moléculaire, ainsi que le domaine de détection. En effet, on observe une zone de longueur d'onde où l'intensité du pic est la plus intense (entre 200 et 250 nm) ainsi que l'absence d'absorption pour les longueurs d'onde supérieures à 300 nm. [16].

## Chapitre II : Chromatographie liquide à haute performance HPLC couplée à un PDA: principe de fonctionnement

---

Le choix de la phase mobile de la chromatographie liquide est crucial pour le fonctionnement du HPLC-PDA et doit être réalisée en fonction de son point de coupure UV inhérent afin d'éviter toute interférence de la phase mobile. Les systèmes LC-PDA modernes sont gérés par un logiciel sophistiqué qui permet la constitution de bibliothèques spectrales pour les composés de référence et la recherche automatisée de composés. . [17].

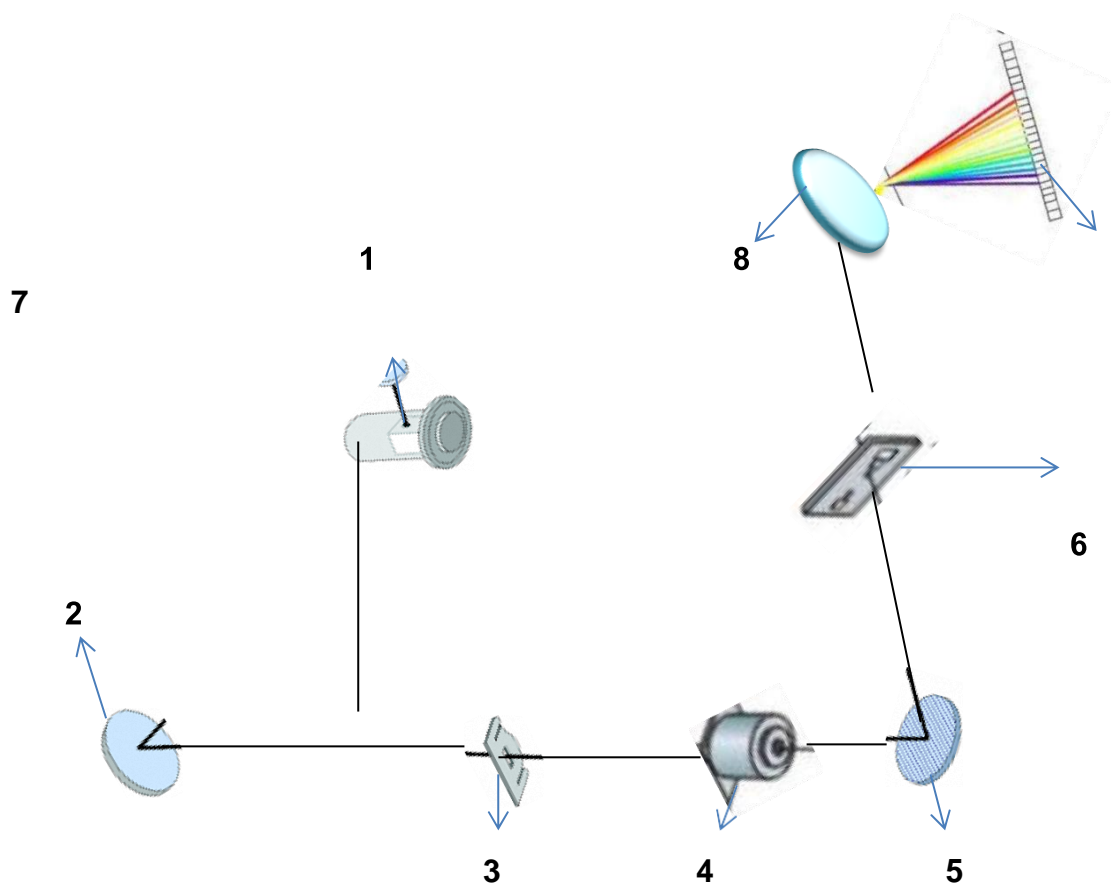
### II .2.3 Caractéristiques et opérations du détecteur

- ❖ En fonction de la longueur d'onde, une lampe au tungstène et une lampe au deutérium est utilisées comme sources lumineuses.
- ❖ Le faisceau de lumière polychromatique est focalisé sur une cellule d'écoulement (volume de 8 à 13  $\mu\text{L}$ ) et ensuite dispersé par un réseau holographique ou un prisme de quartz.
- ❖ La lumière spectrale atteint alors une puce qui contient 100 à 1000 diodes photosensibles disposées côte à côte.
- ❖ Chaque diode enregistre seulement une fraction bien définie de l'information et de cette manière toutes les longueurs d'onde sont mesurées en même temps. Il convient de noter que si la présence de plus de diodes dans un réseau augmente la résolution des spectres UV, elle diminue la sensibilité absolue car une moindre quantité de rayonnement est absorbée par chaque diode.
- ❖ La résolution en longueur d'onde des détecteurs les plus récents est de l'ordre de 1 nm par diode, avec une précision de longueur d'onde supérieure à  $\pm 1$  nm et une sensibilité inférieure à  $10^{-4}$  unités d'absorption.
- ❖ Toutes les opérations du détecteur sont commandées par un ordinateur: correction des fluctuations de l'énergie de la lampe, collectes des signaux ( $I_\lambda$ ) de toutes les diodes, stockage des données de la phase mobile ( $I_0\lambda$ , mesurée au début du chromatogramme) et calcul de l'absorbance selon la loi de Beer-Lambert de  $I_\lambda$  à  $I_0\lambda$ .
- ❖ Le nombre de spectres enregistrés par seconde peut être choisi entre 0,1 et 10; habituellement, un spectre / seconde est optimal en ce qui concerne la résolution chromatographique et le bruit.
- ❖ En fin de parcours, un spectrochromatogramme tridimensionnel (absorbance en fonction de la longueur d'onde et du temps) est stocké sur l'ordinateur et peut être évalué qualitativement et quantitativement.

**II .2 .4 Principe de fonctionnement d'une HPLC couplée à un PDA**

Le détecteur est conçu pour la spectroscopie par absorption de rayons ultraviolets (UV) et visibles (VIS), en association avec des séparations HPLC. Après une séparation suffisante des autres composés de l'échantillon, l'analyse du composé cible suit la loi de Beer-Lambert. Autrement dit, la réponse du détecteur est proportionnelle à la concentration en analyte.

L'image suivante représente le système optique du détecteur et illustre le fonctionnement de celui-ci



**Figure 21** : Principe de fonctionnement du système optique

Les différents composants du système optique sont mentionnés dans le tableau ci-dessous.

## Chapitre II : Chromatographie liquide à haute performance HPLC couplée à unPDA: principe de fonctionnement

---

**Tableau 1** : composant du système optique

| N° | Description                     |
|----|---------------------------------|
| 1  | Lampe au deutérium              |
| 2  | Miroir de la lampe              |
| 3  | Palette de filtres (obturateur) |
| 4  | Cellule à écoulement            |
| 5  | Miroir du spectrographe         |
| 6  | Fente d'entrée                  |
| 7  | Réseau                          |
| 8  | Barrette de diodes              |

Une lampe au deutérium (1) sert de source lumineuse et émet de la lumière dans le domaine spectral des UV et des VIS. Le miroir de la lampe (2) concentre la lumière sur l'entrée de la cellule à écoulement (4). L'obturateur (palette de filtres motorisée, 3) peut être ouvert sur le trajet lumineux en amont de la cellule d'écoulement.

La lumière traverse le trajet d'écoulement de l'échantillon, dans le conduit de lumière de la cellule à écoulement. Après avoir quitté la cellule à écoulement via la fibre de sortie, la lumière atteint le miroir du spectrographe.

Le miroir du spectrographe (5) concentre la lumière sur la fente d'entrée ajustable (6) du spectrographe. La portion de lumière qui traverse la fente d'entrée atteint le réseau (7) et est transmise à la barrette de photodiodes (8). Les signaux mesurés de toutes les photodiodes sont traités numériquement, et un spectre d'absorption résolu dans le temps est calculé pour l'échantillon. [15].

### II .2.5 Avantage d'utilisation de HPLC-PDA

La détection des barrettes de diodes offre plusieurs avantages :

- ❖ La connaissance des spectres des composés d'intérêt permet d'éliminer les pics d'interférence de sorte qu'une quantification précise des pics d'intérêt peut être obtenue malgré une résolution moins qu'optimale.
- ❖ La détection simultanée à deux longueurs d'onde permet de calculer un rapport d'absorbance. Si ce rapport n'est pas constant à travers un pic, le pic n'est pas pur, quel que soit son aspect.

## **Chapitre II : Chromatographie liquide à haute performance HPLC couplée à un PDA: principe de fonctionnement**

---

- ❖ Un avantage supplémentaire de la détection par réseau de diodes est la soustraction d'une longueur d'onde de référence. Cela réduit la dérive de la ligne de base pendant l'élution du gradient. [18].

### **II .2.6 Domaines d'application d'un HPLC couplée à un PDA**

Au cours des deux dernières décennies, la détection par PDA a été utilisée pour l'analyse d'extraits de produits bruts d'origines diverses. Une HPLC-PDA est extrêmement utile pour l'analyse de produits naturels contenant des chromophores tels que les composés phénoliques, y compris les flavonoïdes, les isoflavonoïdes, les coumarines, les ptérocarpanes...etc. [17].

Les systèmes HPLC-PDA liés aux banques de spectres UV sont particulièrement utiles en toxicologie clinique et médico-légale pour le criblage de médicaments dans des échantillons biologiques. [18].

**Chapitre III: Exigences réglementaires et qualification**

La fiabilité des données analytiques générées à partir d'analyses chimiques et physiques dépend essentiellement de trois facteurs:

1. La validité des méthodes analytiques utilisées
2. La fiabilité des instruments utilisés pour les expériences
3. Formation adéquate des analystes

Ces trois facteurs, liés entre eux par les cGMPs (current Good Manufacturing Pratiques), fournissent l'assurance fondamentale de la qualité des données.

Les agences de régulation de la plupart des pays exigent l'utilisation d'instruments étalonnés pour la génération de données. [20].

### III .1 Exigences réglementaires

- **ISO 9001, section 7.6, 2008: Maîtrise des dispositifs de laboratoire:**

"Les équipements de mesure doivent être étalonnés ou vérifiés à intervalles spécifiés par rapport à des étalons internationaux..., réglés..., identifiés..., protégés contre des réglages susceptibles d'invalider les résultats de mesure, protégés contre tout dommage..." [19].

- **FDA cGMP [Code of Federal Regulations (CFR), Subpart I:**

L'étalonnage des instruments, appareils, jauges et appareils d'enregistrement à des intervalles conformément à un programme écrit établi contenant les directives, les horaires, les limites d'exactitude et de précision et les dispositions pour action en cas de non-respect des limites d'exactitude et / ou de précision de l'événement. Instruments, les appareils, jauges et appareils d'enregistrement ne répondant pas aux spécifications établies doivent ne pas être utilisés. [20].

- **Ligne directrice du réseau OMCL (GEON) (Réseau général européen)**

Suivant la ligne directrice du réseau OMCL (GEON) (Réseau général européen) l'annexe 1 « qualification des équipements » qualification des appareils de chromatographie liquide.

- Les qualifications de niveau III et IV doivent être effectuées étant une exigence ISO 17025. [21].



- **Niveau III. Contrôles périodiques et motivés des instruments**  
**Recommandations pour les instruments LC et limites d'acceptation typiques associées** (voir le tableau 2).

**Tableau 2 : Contrôles périodiques et motivés des instruments [21]**

| <b>Instrument module</b>                             | <b>Paramètre à vérifier</b>   | <b>Limites d'acceptation typiques</b>                              |
|--|---|--|
| <b>système distribution de solvant</b>               | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Exactitude du débit</li> <li>• Exactitude du débit</li> <li>• Exactitude de la composition du gradient</li> <li>• Ondulation dégradée</li> </ul> | $\pm 5.0 \%$<br>$RSD \leq 0.5 \%$<br>$\pm 2.0 \%$<br>$\leq 0.2 \%$ |
| <b>Injecteur</b>                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Exactitude du volume</li> <li>• Carry Over</li> </ul>  | $RSD \leq 1.0 \%$<br>$\leq 0.2 \%$                                 |
| <b>Échantillonneur automatique</b>                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Exactitude de la thermostatisation</li> </ul>  | $\pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$                                     |
| <b>Four ou appareil de refroidissement (colonne)</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Exactitude de la thermostatisation</li> <li>• Stabilité thermostatique</li> </ul>  | $\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$<br>$\leq 1 \text{ }^\circ\text{C}$  |
| <b>Détecteur à Longueur d'onde multiple</b>          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Linéarité</li> <li>• Exactitude de la longueur d'onde</li> </ul>   | $r^2 \geq 0,9990$<br>$\pm 2 \text{ nm}$                            |

- **Niveau IV. Vérifications des instruments en cours d'utilisation**  
**Recommandations pour les instruments LC et limites d'acceptation typiques associées.** (Voir tableau 3). [21]

**Tableau 3 : Vérifications des instruments en cours d'utilisation [21]**

| <b>Paramètre à vérifier</b>   | <b>Limites d'acceptation typiques</b>   |
|---|---|
| <b>Conformité du système</b>  | Selon Ph. Eur. ou dossier titulaire de l'AMM ou méthode interne validée   |
| <b>Exactitude de la zone de pic (dosage, applicable au pic principal de l'analyte lorsqu'il n'est pas saturé)</b>                     | RSD ≤ 1,5 %<br>(min. 5 d'essai injections ou de solution de référence)<br>(sauf indication contraire dans le système pertinence de la méthode, par ex. spécifique exigences de la Ph. Eur. Chapitre 2.2.46, Ph. Eur. Monographies, ou dossier titulaire de AMM)   |
| <b>Exactitude de la zone de pic (Substances apparentées)</b>  | RSD ≤ 5,0 %<br>(minimum 3 injections de la solution diluée ou solution de référence utilisée pour quantification)<br>(sauf indication contraire dans le système pertinence de la méthode, par ex. spécifique exigences de la Ph. Eur. Chapitre 2.2.46, Ph. Eur. monographies ou Dossier titulaire de AMM) |
| <b>Exactitude du temps de rétention (applicable au sommet principal de la solution standard lorsqu'elle n'est pas saturée)</b>        | RSD ≤ 2,0%<br>(min. 5 injections d'essai. ou solution de référence)   |
| <b>Report (en comparant Des injections consécutives d'une solution standard de la substance a quantifié et une injection à blanc)</b> | ≤ 0,2 % (dosage)<br>En dessous de la limite de non-respect (Substances apparentées)   |
| <b>Rapport signal/bruit (à appliquer pour test de substances apparentées uniquement)</b>  | Selon la Ph. Eur. 2.2.46.<br>(sauf disposition contraire de la Ph. Eur. monographies ou dossier titulaire de l'AMM)   |

Cette annexe contient des procédures et leurs limites d'acceptation types pour plusieurs paramètres pour effectuer la qualification de niveau III de différents modules de l'HPLC. (Voir annexe 3).

### III .2 validation

#### III .2.1 définition

Selon la norme ISO 17025 : la validation est : «la confirmation par examen et la démonstration par preuves que les performances de la méthode permettent de répondre aux exigences de l'usage auquel elle est destinée. Elle est basée sur une analyse statistique de plusieurs paramètres.» [32]

Aussi

La validation fait référence au processus permettant de garantir que l'instrument est adapté pour l'application prévue pendant toute la durée de vie de l'instrument.

D'un point de vue conceptuel, une approche du cycle de vie de la validation des instruments de laboratoire peut être divisée en quatre phases, comme le montre la figure 22.

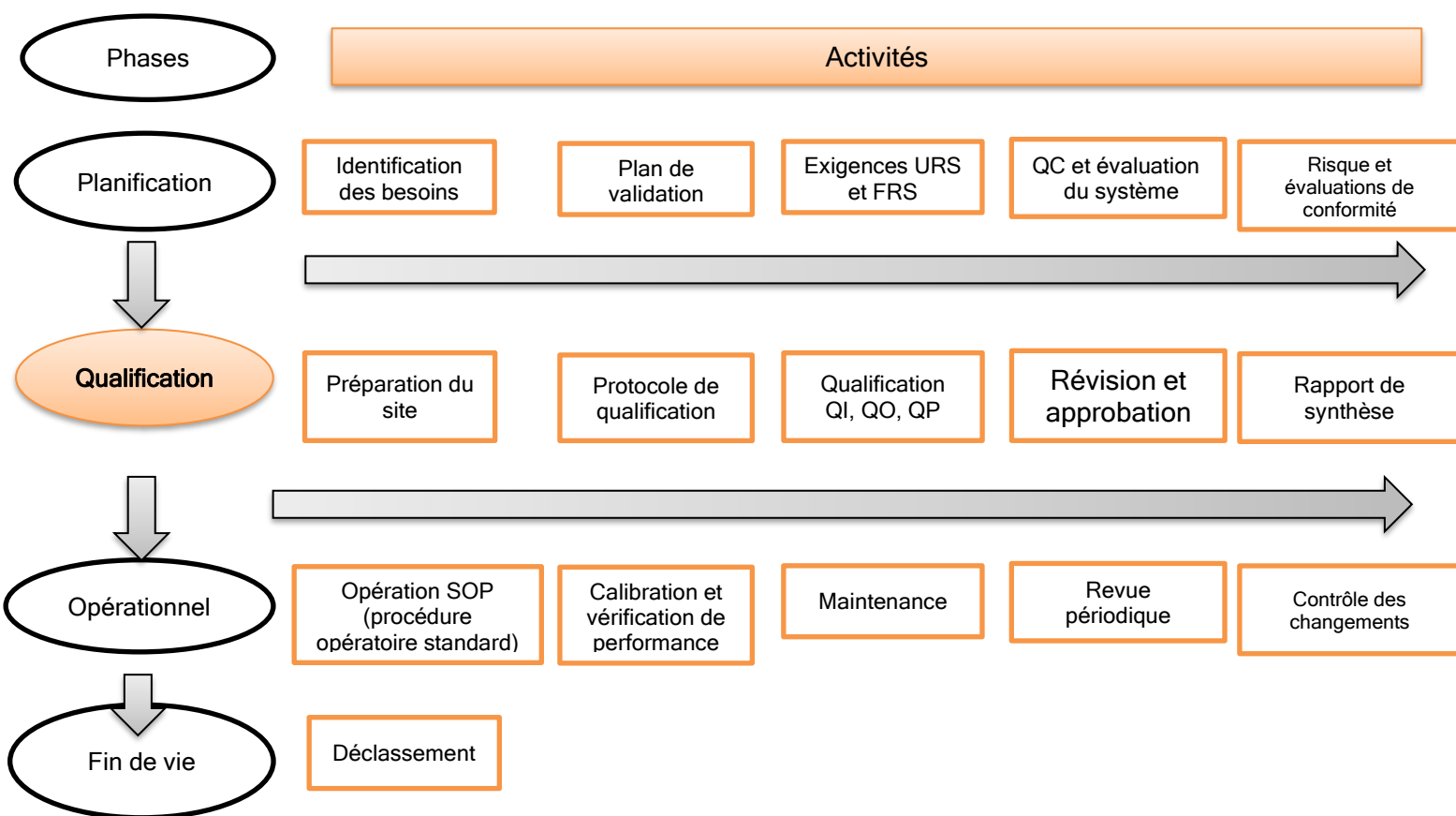


Figure 22: Phases de validation [23].

### **III .2.2 activités de planification et exigences**

Les activités de la phase de planification sont lancées après un besoin commercial de mise en œuvre d'un instrument du laboratoire a été identifié. - activités de phase Planification inclure la documentation de façon concise les exigences des utilisateurs et les exigences fonctionnelles de l'instrument. Une fois établies, les exigences sont ensuite utilisées pour évaluer l'instruments candidats disponibles auprès des fournisseurs.

#### **III .2.2 .1 Plan de validation**

Un plan de validation est préparé pour mettre en évidence les activités et livrables requis dans la mise en œuvre de l'instrument de laboratoire. [23].

#### **III .2.2 .2 Qualification de conception**

Elle couvre toutes les procédures qui se déroulent avant l'installation, elle est pratiquement toujours réalisée chez le vendeur ou le fabricant, le rôle de l'utilisateur est:

- D'identifier les besoins de laboratoire.
- Etablir en fonction des usages prévus, des spécifications opérationnelles et fonctionnelles
- Etablir le budget nécessaire à l'acquisition et à la maintenance.
- Considérer que l'utilisation est facile. [13]

#### **III .2.2 .3 Évaluation du système et évaluation des fournisseurs**

En général, il existe de nombreux choix et fournisseurs d'instruments de laboratoire courants. Les besoins des utilisateurs et les exigences opérationnelles fourniront les critères de base pour la sélection. Évidemment l'instrument choisi doit être en mesure de remplir les principales exigences pour sa destination utilisation. D'autres facteurs concernant l'instrument tels que sa facilité d'utilisation, son entretien, et la réputation des fournisseurs en termes de qualité, de fiabilité et d'assistance doivent être pris en considération. D'un point de vue pratique, un audit fournisseur peut ne pas être viable ou nécessaires pour les instruments couramment utilisés. Une évaluation du fournisseur est parfois utilisé pour évaluer si le fournisseur a mis en place un système de bonne qualité pour soutenir le développement et la fabrication de l'instrument d'intérêt. Le besoin pour une évaluation fournisseur dépend de la criticité et de la complexité du système à obtenir.[23].

### III .2.3 qualification

#### III.2 .3 .1 Définition

Opération destinée à démontrer que le matériel ou l'équipement utilisé donne des résultats attendus pour l'usage auquel il est destiné. [22].

**Aussi ;**

Le terme qualification fait référence à la préparation du site et les tests utilisés pour démontrer que l'instrument est correctement installé dans un environnement adapté et que la performance répond aux spécifications prédéterminées pour son utilisation prévue. La qualification fait partie de tout le cycle de vie de la validation.

#### III. 2 .3 .2 activités de qualification

##### III.2 .3 .2 .1 Préparation du site

Avant l'installation de l'instrument dans le laboratoire, tous les préparatifs qui soutiennent le fonctionnement de l'instrument doivent être prêts. Le fournisseur fournit généralement un document de préparation du site qui décrit les informations des installations nécessaires pour soutenir les opérations de l'instrument. . [23].

Le document de préparation du site comprend généralement les informations suivantes:

- Dimensions physiques et poids de l'instrument
- Conditions environnementales pour un fonctionnement correct: température, humidité et contrôle des vibrations
- Utilitaires: alimentation électrique, eau, gaz, drainage, ventilation, raccordement au réseau
- Exigences en matière de santé et de sécurité

Les utilisateurs doivent étudier attentivement le guide de préparation du site pour s'assurer que les préparatifs nécessaires pour loger le nouvel instrument dans le laboratoire sont terminés avant l'installation. Une préparation inadéquate du site peut entraîner des inconvénients majeurs et de longs retards dans le processus d'installation.

### III .2 .3 .2 .2 Protocoles de qualification

Le fournisseur fournit souvent des tests protocoles des tests de qualification d'installation et de qualification opérationnelle. C'est une pratique courante d'acheter les services de qualification auprès du fournisseur pour exécuter les tests. Le fournisseur doit avoir une bonne connaissance de l'installation et la qualification de l'instrument et, par conséquent, l'utilisation de leurs services pour effectuer ces étapes peut fournir des gains de temps et de ressources. Cependant, il est de la responsabilité de l'utilisateur de revoir le protocole de test pour des tests significatifs, que des procédures appropriées seront utilisées, et que des critères d'acceptation raisonnables pour les essais afin de garantir et satisfaire l'objectif des tests. Les procédures et / ou tests du fournisseur doivent être compatibles avec les procédures et pratiques de l'entreprise utilisatrice. [23].

Les protocoles doivent être approuvés avant exécution.

Le protocole de test a généralement une description générale du système, les configurations, et l'utilisation prévue. Les scripts de test dans le protocole de test fournissent des informations sur les procédures d'essai. Dans chaque script de test, les informations suivantes devraient être fournies:

- Description du module à tester
- But et objectif des tests
- Portée et limites
- Procédure de test
- Critères d'acceptation des tests
- Sections pour capturer les résultats des tests
- Une section pour documenter les écarts et exceptions rencontrés lors de l'essai. [23].

### III 2. .3 .2 .3 étapes de qualification

#### III .2. 3 .2 .3.1 Qualification de l'installation

La qualification de l'installation fournit des preuves documentées que l'instrument a été reçu et installé avec succès conformément à les exigences de conception approuvées et correctement installé dans un environnement approprié pour son fonctionnement. Une installation correcte est la première étape pour garantir que l'instrument fonctionnera correctement. Un instrument mal installé est susceptible de causer des problèmes pendant la qualification opérationnelle et la qualification des performances. Ce qui suit sont quelques vérifications pour le processus IQ:

Vérifications IQ avant l'installation de l'instrument:

- Vérifiez le matériel et les logiciels par rapport à la liste d'expédition.
- Vérifiez les dommages visibles.
- Liste de contrôle complète de la préparation du site.
- Précautions de santé et de sécurité.
- Ajoutez l'instrument à la liste d'inventaire des instruments.

Vérifications IQ lors de l'installation:

- Documentez l'emplacement de l'instrument.
- Documentez tous les composants matériels, y compris l'ordinateur, l'imprimante, interfaces et connexion réseau...
- Documentez toutes les applications logicielles, du système d'exploitation et du stockage et emplacement du progiciel.
- Documentez la configuration du système.

Vérifications IQ après l'installation:

- Le système se met correctement sous tension.
- Initialisation et position de référence appropriées.
- Une bonne communication entre les modules.
- Calibrage des modules si nécessaire.
- Vérification de la version du logiciel.
- Lancement correct du logiciel et compatibilité avec le matériel.
- Sauvegardez les fichiers critiques pour les paramètres système.
- Mettre en place un journal de bord. [23].

#### III. 2.3 .2 .3.2 Qualification opérationnelle

La qualification opérationnelle fournit des preuves documentées que l'instrument fonctionnera conformément à ses exigences fonctionnelles dans toute la plage de fonctionnement représentative dans un environnement

approprié. Pour les systèmes moyennement complexes, OQ vérifie le bon fonctionnement du matériel et le logiciel de l'instrument.

Les tests pour un système HPLC comprendrait le fonctionnement de la pompe, de l'injecteur et du détecteur.

Les tests OQ typiques pour les modules HPLC incluent :

- Pompe : précision du débit et précision du gradient
- Détecteur : linéarité de la réponse, bruit, dérive et précision de la longueur d'onde
- Injecteur : exactitude, linéarité et transfert
- Colonne chauffante : précision de la température [23].
  - appareil fonctionne comme prévu selon les spécifications définies
  - soit test modulaire
  - soit test holistique [19].

### III. 2.3 .2.3.3 Qualification des performances

La qualification des performances est le processus qui fournit des preuves documentées pour démontrer que l'instrument a satisfait les exigences d'utilisateur.

Test holistique qui implique tous les composants fonctionnels du système est requis pour le test PQ.

La qualification des performances peut être démontrée en exécutant une application typique qui nécessite que tous les modules fonctionnent ensemble comme un système complet pour fournir l'application prévue et les résultats.

Il est avantageux d'exécuter un test hautement fiable qui est fréquemment effectuées par les utilisateurs sur un type particulier d'instrument pour le PQ, avec laquelle l'utilisateur a une expérience approfondie. Dans ce cas, les résultats du test refléteront principalement la performance de l'instrument et ne sera pas affecté par l'incertitude de la méthode utilisée. [23].

La qualification d'Installation (IQ), la qualification opérationnelle (OQ) et la qualification de performance (PQ) sont effectuées pour fournir la preuve que les spécifications des exigences de l'utilisateur (URS), spécifications des exigences fonctionnelles (FRS) et qualification de la conception (QC) ont été respectées. [23].



### III .2 .3 .2 .4 Exceptions de test et révision des données

Si les résultats du test ne satisfont pas aux critères d'acceptation, une enquête est nécessaire pour déterminer la cause de l'échec. Les échecs peuvent être causés par des erreurs d'exécution de la procédure de test ou par problèmes liés à l'instrument. Sur la base du résultat de l'enquête, les actions correctives peuvent être prises pour rectifier le problème. Une fois le problème résolu, un nouveau test peut être exécuté pour confirmer que les opérations de l'instrument satisfont aux exigences. Une enquête sur les défaillances, une analyse d'impact, des actions correctives et un nouveau test doivent être

Documenté dans le journal des exceptions des tests de qualification. Après la qualification le test est terminé, le processus de test, les données générées et les résultats doivent être examinés pour l'exactitude, l'exhaustivité et les écarts justifiables. Tous les problèmes majeurs avec la conformité doit être abordée avant de mettre l'instrument pour utilisation de production. [23].

### III .2 .3 . 2. 5 Rapport de synthèse

Une fois les activités de qualification terminées, un rapport de synthèse doit être préparé pour résumer tous les tests de qualification et les résultats et les écarts par rapport au plan de validation et inclure une conclusion indiquant si l'instrument est prêt pour ses utilisations prévues. Tout écart par rapport aux activités planifiées y compris les échecs de test et les exigences non satisfaites par le système doivent être traités dans le rapport.

Le rapport de synthèse comprend généralement les éléments suivants sections:

- Introduction
- Description du système
- Documents de référence
- Activités de validation, tests, critères d'acceptation et résultats
- Résumé des écarts, problèmes et atténuations
- Restrictions sur le système (le cas échéant)
- Résultats
- Conclusion

Pour les instruments analytiques simples, un tableau simple pour résumer les tests de qualification, les critères d'acceptation, les résultats et la décision de réussite / échec des tests.

Pour les systèmes analytiques complexes, un tableau plus complexe souvent appelé une matrice de traçabilité qui retrace les exigences, les tests, les critères d'acceptation, les tests résultats et emplacements de stockage des documents de validation, des données de test et autres les documents sont généralement

## **Chapitre III : Exigences réglementaires et qualification**

---

inclus dans le rapport de synthèse pour faciliter leur examen et références rapides.

Après les tests de qualification proprement dits et les tests réguliers de vérification des performances, les documents et les données de test associées sont la seule preuve que l'instrument a subi de tels tests et a été correctement installé et entretenu pour prendre en charge ses applications prévues. Le document doit être stocké systématiquement dans un emplacement et entretenu avec soin afin d'éviter toute perte. [23].

### **III 2. .3 .2 .6 Fréquence des tests de QP**

Le laboratoire doit déterminer la fréquence des tests de QP et les intégrer dans la QO régulière et dans le cycle de maintenance préventive. Par exemple :

- Visite de maintenance préventive par le prestataire de services
- QO annuelle
- QP holistique après la QO
- QP holistique périodique
- Résultats des Tests de conformité des systèmes (SST) rassemblés et présentés sous forme de tendances chaque fois qu'une analyse est réalisée pour satisfaire aux exigences.

### **III 2. .3 .2 .7 Requalification**

Est une vérification périodique du fonctionnement répétable du système dans le temps. Les tests effectués en requalification ne doivent pas couvrir l'ensemble des tests de QI, QO et QP. Seuls les tests couvrant les points les plus critiques doivent être effectués. La fréquence est en générale annuelle mais peut différer. L'analyse de risque détermine la périodicité de requalification.

La requalification s'effectue via un protocole, rédigé par le responsable équipement ou tout utilisateur formé qui connaît le sujet, sous la supervision du pôle qualification/validation de l'entreprise et du (des) responsable(s) de laboratoires de contrôle qualité. [30].

### **III. 2 .4 opérationnel**

Une fois qu'un instrument a été qualifié, il est prêt à être utilisé en production. Les activités dans la phase opérationnelle soutenir l'utilisation quotidienne et maintenir l'instrument en un état validé. [23].

### **III. 2 .4.1 Procédure d'exploitation standard**

Une SOP doit être écrite pour fournir des instructions pour le fonctionnement, l'entretien et l'étalonnage du nouvel instrument.

Pour les réparations majeures et mineures et remplacement de pièces qui nécessiteront une requalification de l'instrument. Par exemple, le remplacement d'une lampe UV dans le détecteur UV ne nécessite pas une requalification complète, alors qu'un remplacement du circuit imprimé justifiera une requalification complète. [23].

### **III. 2 .4.2 Vérification des performances et étalonnage**

Afin de maintenir l'instrument dans un état validé, une vérification régulière des performances et un étalonnage sont nécessaires pour démontrer que l'instrument fonctionne de manière fiable selon un ensemble prédéterminé de critères pour prendre en charge les applications requises dans les exigences des utilisateurs. [23].

#### **➤ Fréquence des tests de vérification des performances**

Doit être basée sur les connaissances de la fiabilité de fonctionnement pour le type d'instrument et le type d'opérations que l'instrument soutiendra. La fréquence initiale peut être selon la recommandation du fournisseur. Un bon dossier de performance peut justifier une vérification moins fréquente. Un inconvénient potentiel en cas de dépassement la période entre la vérification des performances peut être l'augmentation de l'impact évaluation sur les données générées depuis la dernière vérification des performances en cas de défaillance du système. L'exécution des tests d'adéquation du système avant l'analyse ne peut pas remplacer le besoin d'un étalonnage régulier de l'instrument. [23].

### **III. 2 .4.3 Entretien**

L'usure normale ainsi que le vieillissement de divers composants peuvent compromettre les performances de l'instrument ou entraîner un dysfonctionnement. L'instrument doit être entretenu pour fonctionner de manière cohérente et fiable. Un programme de maintenance préventive qui identifie et remplace les consommables Les pièces permettront probablement d'économiser du temps et de l'argent à long terme. Les dossiers d'utilisation et de service sont conservés avec l'instrument pour fournir un historique des performances du système. [23].

### **III. 2.4 .4 examen périodique**

Les performances de l'instrument doivent être examinées sur une base régulière, généralement une fois tous les deux ou trois ans, pour s'assurer que l'instrument est toujours fiable et qu'il continue de répondre aux exigences des utilisateurs. [23].

#### **III. 2.4 .4 .1 Résoudre les non-conformités**

Un élément clé de tout système qualité est de répondre de manière appropriée aux non-conformités (c'est-à-dire les écarts par rapport aux exigences établies dans le cadre du système qualité pour Attributs de qualité du matériau en cours de fabrication ou du produit final, paramètres de contrôle du processus, dossiers, procédures, etc.). Les non-conformités peuvent être détectées à n'importe quelle étape du processus de fabrication ou pendant les activités de contrôle qualité. La réglementation cGMP exige l'ouverture d'une enquête et que l'enquête, la conclusion et le suivi soit documenté.

La réponse aux non-conformités doit être basée sur les risques et peut inclure les composants suivants :

- Évaluation de la façon dont la non-conformité affectera la qualité du produit fini (c'est-à-dire déterminer si la non-conformité a entraîné, ou pourrait entraîner, dans un produit qui ne respecte pas sa pureté, sa puissance et sa qualité Caractéristiques spécifiées).
- Déterminer toutes les actions nécessaires pour assurer que le produit qui ne répond pas à ses exigences spécifiées n'est pas produite et que les mesures appropriées sont prises à l'égard de tout produit non conforme qui a été fabriqué pour assurer que les consommateurs ne soient pas lésés et que les exigences réglementaires soient satisfait.
- Déterminer la cause de la non-conformité.
- Identifiez les actions nécessaires pour corriger la cause et prévenir la récurrence.
- Documenter l'enquête, les conclusions et les actions de suivi.
- Évaluer l'efficacité des actions de suivi.
- Répétez le cycle au besoin. Une non-conformité ne peut pas avoir pour conséquence que le produit fini ne réponde pas à ses conditions; cependant, l'enquête sur la non-conformité peut identifier le processus ou déficiences du système qualité qui nécessitent une attention particulière. Par exemple, un petit mais inattendu écart par rapport à une exigence de contrôle de processus (par exemple, température, mélange temps) ne doit pas dépasser la limite pour laquelle le procédé a été initialement validé et ne devrait donc pas avoir d'effet négatif sur le produit fini, mais pourrait suggérer un problème émergent de contrôle de processus ou d'équipement qui, s'il n'est pas corrigé, pourrait entraîner

Des futures non-conformités des produits. De même, les non-conformités sous forme d'erreurs ou les omissions dans les enregistrements de production ou les

## **Chapitre III : Exigences réglementaires et qualification**

---

écarts par rapport aux procédures écrites peuvent ne pas entraîner toujours une non-conformité du produit, mais peuvent suggérer une formation, une conception de processus, ou d'autres problèmes qui devraient être traités.

### **III. 2 .4 .4 .2 Mener des audits internes**

L'audit interne n'est pas spécifiquement requis par la réglementation cGMP, mais les fabricants ont traditionnellement utilisé les audits internes comme outil d'auto-évaluation et pour se préparer aux inspections. La FDA a reconnu depuis un certain temps la valeur de l'audit interne et encourage les entreprises à effectuer des audits en ne pas examiner les résultats des audits internes lors des inspections.

Les modèles actuels de système qualité exigent que des audits soient effectués à des intervalles planifiés évaluer la mise en œuvre et le maintien efficaces du système qualité et déterminer si les processus et les produits répondent aux paramètres et aux spécifications établis. Les normes internationales fournissent des conseils sur l'audit

Les procédures d'audit doivent être élaboré et documenté pour s'assurer que le calendrier d'audit prévu tient compte des risques relatifs des différentes activités du système qualité. Des facteurs qui peuvent être intégré dans une approche fondée sur les risques pour planifier la fréquence et la portée des audits inclure les éléments suivants [6] :

- Exigences légales existantes (par exemple, cGMP)
- Statut de conformité global et historique de l'entreprise ou de l'installation
- Robustesse des activités de gestion des risques qualité d'une entreprise
- Complexité du site
- Complexité du processus de fabrication
- Complexité du produit et son importance thérapeutique
- Nombre et importance des défauts de qualité (par exemple, rappel)
  - Résultats des audits/inspections précédents pouvant inclure un audit interne antérieur les résultats ainsi que les organismes de réglementation (par exemple, les organismes de réglementation étatiques, fédéraux ou autres) et audits tiers
- Changements majeurs de bâtiment, d'équipement, de processus et de personnel clé
- Expérience de la fabrication d'un produit (par exemple, fréquence, volume, nombre de lots)
- Résultats des tests des laboratoires de contrôle officiels [23].

### **III. 2 .4 .5 Contrôle des changements**

Le contrôle des modifications fournit un mécanisme structuré pour demander, autoriser, évaluer, tester, mettre en œuvre et publier des modifications systèmes. Il doit être effectué conformément aux normes approuvées et procédures documentées.

### **III. 2.5 Fin de vie**

Le déclassement d'un instrument est la dernière étape du cycle de vie de la validation. [23].

### **III. 3 Organisation et Planification des activités de Qualification / Validation**

Pour chaque entreprise, l'organisation des activités de qualification découle de procédures générales internes. Il est primordial d'établir en amont les rôles et responsabilités des acteurs (utilisateur, vérificateur, AQ...) ainsi que la stratégie applicable. [30].

**Chapitre IV: application à un chromatographe liquide haute  
performance couplé à un PDA**

## **Chapitre IV : Application à un chromatographe liquide haute performance couplé à un PDA**

---

La qualification de l'HPLC est requise pour établir la capacité fonctionnelle et la fiabilité d'un système pour son utilisation prévue dans un environnement approprié. La qualification est divisée en trois étapes : l'installation, opérationnelle et la performance.

### **IV. 1 Qualification d'installation QI**

La qualification d'installation est constituée de deux parties essentielles:

- Qualification du logiciel et
- Qualification de HPLC couplée à PDA.

#### **IV. 1 .1 Qualification du logiciel**

- identification des différents composants du PC (micro-ordinateur reliant la partie Informatique à l'HPLC et au PDA),
- vérification de l'installation des logiciels. (C'est à-dire la connexion du logiciel avec les différents modules de la chaine HPLC-PDA,
- configuration de l'ensemble des modules du PC et les périphériques, lors de l'installation du logiciel.
- Inspectez les dommages visibles.
- Documentez le modèle, la configuration et les numéros de série des composants du système.
- Documentez le modèle, la configuration et les numéros de série de l'ordinateur
- Téléchargez tous les fichiers dans le logiciel d'application/de contrôle et vérifiez.
- Établir une bonne communication entre les composants du système et l'ordinateur
- Mettre en place un journal de bord de l'instrument.
- Calibrez les modules du système si nécessaire.

#### **IV. 1. 2 Qualification de HPLC couplée à PDA**

Pour effectuer les procédures de qualification sur l'instrument, une check-list doit être renseignée, et que tous les conditions seront conformes aux normes, cette étape sera validée, le responsable de la qualification passe à la qualification opérationnelle.



## Chapitre IV : Application à un chromatographe liquide haute performance couplé à un PDA

### IV. 2 Qualification opérationnelle

Les tests OQ typiques pour les modules HPLC comprennent:

- Pompe: précision du débit et précision du gradient
- Détecteur: linéarité de la réponse, du bruit, de la dérive et de la précision de la longueur d'onde
- Injecteur: précision, linéarité et transfert
- Réchauffeur de colonne: précision de la température

En plus de tester les composants du système, un test de la fonctionnalité du logiciel serait effectué pour tester le fonctionnement du logiciel du système et les enregistrements électroniques et la conformité des signatures électroniques (ERES) (sécurité, intégrité des données, sauvegarde des données, et archives)

#### IV. 2.1 Exigences fonctionnelles typiques pour HPLC avec détecteur PDA

Tableau 4 : Exigences fonctionnelles typiques pour HPLC avec détecteur PDA [23].

| modules                            | Exigences fonctionnelles   |
|------------------------------------|--|
| <b>Pompe</b>                       | La pompe doit être capable d'un débit compris entre 0,50 et 5,00 ml/min. <ul style="list-style-type: none"><li>• La pompe doit être une pompe à gradient quaternaire et avoir une composition de <math>\pm 1,5\%</math> des valeurs théoriques pour les quatre canaux.</li><li>• La pompe doit avoir un écart type relatif (RSD) de <math>\leq 2,0\%</math> pour six lectures successives à partir d'un débitmètre.</li></ul>  |
| <b>Échantillonneur automatique</b> | L'échantillonneur automatique doit avoir un injecteur capable d'injecter volumes d'échantillons de 1 à 100 $\mu$ L. <ul style="list-style-type: none"><li>• L'injecteur doit avoir une exactitude de <math>\leq 1,5\%</math> RSD.</li><li>• Le transfert de l'injecteur doit être <math>\leq 0,5\%</math> de la zone de pic.</li><li>• L'échantillonneur automatique doit sélectionner le bon flacon.</li><li>• Les racks d'échantillons à température contrôlée doivent être capables de maintenir les échantillons dans la plage de température de 4 à 15 ° C (<math>\pm 3^{\circ}</math>C).</li></ul> |
| <b>Détecteur PDA</b>               | Les détecteurs doivent fonctionner avec une gamme de longueurs d'onde allant de 200 à 800 nm. <ul style="list-style-type: none"><li>• Le détecteur doit avoir une exactitude de longueur d'onde de <math>\pm 2</math> nm.</li><li>• La réponse du détecteur doit être linéaire avec une corrélation coefficient <math>r^2</math> d'au moins 0,999 sur toute la plage dynamique.</li><li>• La plage linéaire doit aller jusqu'à 2,0 Absorbance Unit Full Échelle (AUFS).</li></ul>  |
| <b>Compartment de colonne</b>      | Le four à colonne doit être capable de maintenir une plage de température de 5 °C au-dessus de la température ambiante à 60 °C.  |

## Chapitre IV : Application à un chromatographe liquide haute performance couplé à un PDA

- |  |  |
|--|--|
|  | • Le four doit être à $\pm 3$ °C de la température réglée et la précision de la température doit être 2,0% |
|--|--|

### IV. 3 Qualification de performance

La performance d'un système HPLC peut être évaluée en examinant les fonctions clé des différents modules qui composent le système, suivis par des tests qui remettent en question les performances des composants HPLC en tant que système. Le test holistique est communément appelé la qualification de performance (PQ). [20].

Le test modulaire de divers composants, qui est souvent effectué dans la qualification d'opération (OQ), peut fournir des informations détaillées sur le fonctionnement des composants individuels de la HPLC. Il est important de faire à la fois les tests de composants individuels et le test holistique pour la vérification des performances du système. Les attributs de performance communs pour chaque module HPLC, et les attentes générales pour chaque attribut, sont répertoriés dans le Tableau 5. [20].

**Tableau 5** : Attributs de performance pour les modules HPLC et fréquence de test

| Module             | Attributs de Performance  | Expectations Générales   | Fréquence                            |
|--------------------|---|--|--------------------------------------|
| <b>la pompe</b>    | Précision du débit<br>Précision du gradient<br><br>Test de pression           | + .2% du débit réglé<br>+ .1% de l'étape de gradient de composition<br>Bon fonctionnement du clapet anti-retour<br>Chute de pression : <75 psi/min<br>Pas de fuite de la pompe | 6 mois<br>6 mois<br><br>6 mois       |
| <b>l'injecteur</b> | Exactitude<br>Linéarité<br>carry over   | 1% RSD<br>$r \geq 0.999$<br><1%  | 6 mois<br>12 mois<br>6 mois          |
| <b>Détecteur</b>   | Précision de la longueur d'onde<br>Linéarité de la réponse<br>Bruit et dérive | •+- 2 nm<br><br>$r \geq 0.999$<br><br>Bruit: 10 <sup>-5</sup> AU<br>dérive: 10 <sup>-4</sup> AU/h  | 6 mois<br><br>12 mois<br><br>12 mois |
| <b>Colonne</b>     | Précision de la température   | + - 2°C de la température de consigne  | 6 mois                               |

### **IV. 3. 1 Pratiques de vérification des performances**

#### **IV.3 .1. 1 Module de pompe**

##### **III.3 .1.1. 1 Précision du débit.**

L'une des principales exigences de performance de la pompe est la capacité de maintenir un flux précis et cohérent de la phase mobile. Ceci est nécessaire pour fournir des interactions stables et reproductibles entre les analytes et la phase stationnaire. Une mauvaise précision du débit affectera le temps de rétention et la résolution de la séparation. La précision du débit de la pompe peut être évaluée simplement en calculant le temps nécessaire pour recueillir un volume de phase mobile à différents réglages de débit.

#### **Par exemple :**

La précision du débit à 2 mL / min peut être vérifiée à l'aide d'un chronomètre étalonné pour mesurer le temps nécessaire pour collecter 25 mL d'effluent de la pompe dans une fiole jaugée de 25 mL. Un débitmètre étalonné peut être utilisé pour déterminer le débit aussi. L'acceptation typique de la précision du débit est énumérée dans le tableau 3.

#### **IV.3 .1 . 1. 2 Précision du gradient.**

Pour l'analyse de gradient, la capacité de la pompe pour délivrer la phase mobile à différentes concentrations de solvants au fil du temps en faisant varier la composition avec précision de la phase mobile est cruciale pour obtenir la bonne séparation chromatographique et reproductibilité. La précision de l'opération de gradient peut être évaluée indirectement en surveillant l'écart-type relatif temps de rétention des pics dans les chromatographes à partir d'injections répétées.

L'exactitude et la linéarité de la distribution de solvant en gradient peuvent être vérifiées indirectement en surveillant le changement d'absorbance lorsque la composition des deux solvants de deux canaux différents change. Le gradient à haute pression implique généralement deux systèmes de solvants.

Les pompes LC à gradient de pression inférieure sont généralement équipées de vannes de dosage quaternaires, pouvant gérer jusqu'à quatre solvants. Le test sera effectué pour deux canaux à la fois.

#### **Par exemple :**

Une pompe LC à gradient a quatre canaux: A, B, C et D. Le canal A est rempli avec un solvant pur tel que le méthanol, tandis que le canal B est rempli d'un solvant contenant un traceur UV-actif tel que la caféine (environ

## Chapitre IV : Application à un chromatographe liquide haute performance couplé à un PDA

15 mg par litre de solvant). Un mélange 99,5: 0,5 (v / v) de méthanol et d'acétone est souvent utilisé comme traceur. Le profil de gradient est programmé pour faire varier la composition du mélange de 100% A à 100% B dans un court laps de temps, puis de nouveau à 100% A par étapes (Tableau 6). Le changement d'absorbance de 100% A (ligne de base) à 100% B est mesuré et exprimé en hauteur H dans le tracé d'absorbance en fonction du temps (Figure 23). Lorsque le pourcentage de solvant B diminue le mélange de solvants, l'absorbance UV du mélange doit diminuer en conséquence.

Si la composition du mélange 20% A et 80% B est exacte, la hauteur B1, qui correspond à l'absorbance à 80% B, doit être proche de 80% de la hauteur H. De même, les vérifications de précision peuvent être déterminées à 60%, 40%, 20% et 0% B. La linéarité de la distribution du gradient peut être vérifiée en traçant l'absorbance à diverses compositions de phase mobile par rapport à la composition théorique, ou simplement déduite par la précision du gradient sur la gamme de diverses compositions de solvants. L'ensemble du processus peut être répété pour les canaux C et D. [20].

**Tableau 6** : Programme de test de précision de gradient

| Étape | Temps (min) a | Débit (mL) | Solvant Canal A | Solvant Canal B |
|-------|---------------|------------|-----------------|-----------------|
| 1     | 0-1           | 3          | 100             | 0               |
| 2     | 1-2           | 3          | 0               | 100             |
| 3     | 2-3           | 3          | 20              | 80              |
| 4     | 3-4           | 3          | 40              | 60              |
| 5     | 4-5           | 3          | 60              | 40              |
| 6     | 5-6           | 3          | 80              | 20              |
| 7     | 6-7           | 3          | 100             | 0               |
| 8     | 7-9           | 3          | 100             | 0               |
|       |               |            |                 |                 |

a : Maintenir la composition de solvant

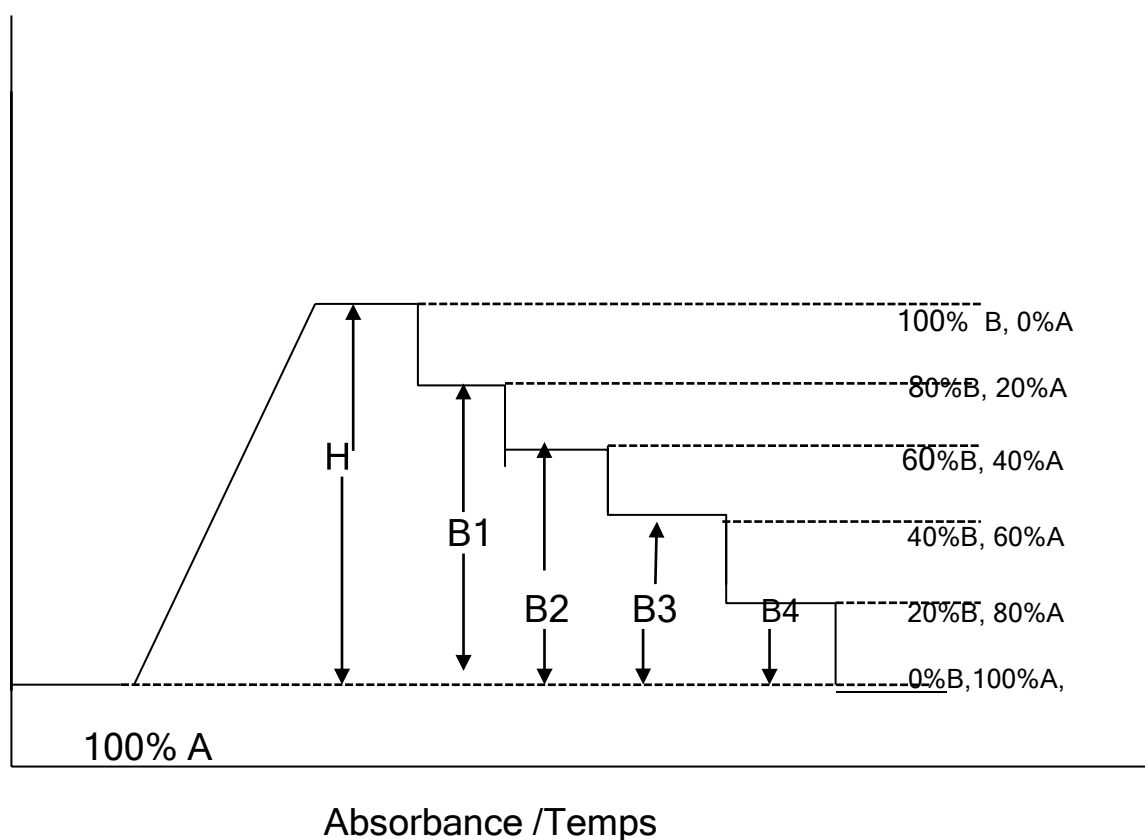


Figure 23 : Mesure de la précision et de la linéarité du gradient.

#### IV.3 .1. 1. 3 Test de pression :

Les performances de la pompe dépendent du bon fonctionnement du joint de la pompe, des clapets anti-retour et du bon raccordement du tube. Des clapets anti-retour et des raccords de tuyauterie fonctionnant correctement sont importants pour maintenir un débit de phase mobile et une pression du système stables. Pour pompe systèmes qui produisent la lecture de la pression dans la tête de pompe au fil du temps, un simple test de pression peut être un test qualitatif utile pour vérifier les performances des joints et clapets anti-retour et pour déterminer s'il y a ou non des fuites dans le système.

#### IV.3 .1. 2 Module d'injection

##### IV.3 .1. 2. 1 Exactitude.

La capacité de l'injecteur à prélever la même quantité d'échantillon et la répétition des injections est cruciale pour la précision et l'exactitude de la zone de pic ou de la hauteur de pic comparaison pour la quantification

standard externe. Si la variabilité de l'échantillon et l'étalon injectés dans la colonne ne sont pas étroitement contrôlés, le principe de base de la quantification standard externe est gravement compromis. Aucune comparaison significative entre les réponses de l'échantillon et la norme ne peut être faite. La précision absolue du volume d'injection n'est pas critique tant que la même quantité d'étalon et d'échantillon est injectée. La précision volumique de l'injecteur peut être démontrée en faisant au moins six injections répétées à partir d'un échantillon. L'écart type relatif (% RSD) de la réponse des injections est alors calculé pour évaluer la précision.

### **IV.3 .1. 2. 2 Linéarité :**

La plupart des injecteurs LC automatisés sont capables de faire varier le volume de l'injection. Un volume variable d'échantillon sera aspiré dans une boucle d'injection d'échantillon par une seringue ou un autre dispositif de dosage. L'uniformité de la boucle d'échantillonnage et la capacité du doseur à prélever différentes quantités d'échantillon dans une proportion appropriée affectera la linéarité du volume d'injection. La linéarité est important pour les méthodes qui nécessitent l'utilisation de volumes d'injection variables, tels que comme méthode haut-bas pour la quantification des impuretés

La linéarité de l'injecteur peut être démontré en faisant des injections, généralement 5, 10, 20, 50 et 100  $\mu\text{L}$ , pour couvrir la plage de 0 à 100  $\mu\text{L}$ . La réponse de l'injection est tracée par rapport au volume d'injection.

### **IV.3 .1. 2. 3 Reporter ou Carry Over (effet mémoire de l'injecteur).**

De petites quantités d'analyte peuvent être transférées de la précédente injection et contaminer le prochain échantillon à injecter. Le report va modifier la quantification précise de l'échantillon suivant. Ainsi Le problème est lorsqu'un échantillon dilué est injecté après un échantillon concentré. Éviter la contamination croisée de l'injection d'échantillon précédente, toutes les pièces de l'injecteur qui entre en contact avec l'échantillon (la boucle d'injection, l'injection l'aiguille et le siège de l'aiguille) doivent être nettoyés efficacement après l'injection.

Le report peut être évalué en injectant un blanc après un échantillon contenant une concentration élevée d'analyte. La réponse de l'analyte trouvé dans le blanc échantillon exprimé en pourcentage de la réponse de l'échantillon concentré peut être utilisée pour déterminer le niveau de Carry Over. La caféine peut être utilisée pour test de transfert du système pour évaluer les performances d'un injecteur et sert de norme commune pour comparer les performances de différents injecteurs.

### IV.3 .1. 3 Module de détection UV-visible

#### IV.3 .1. 3. 1 Précision de la longueur d'onde :

La précision de la longueur d'onde est définie comme l'écart de la lecture de longueur d'onde dans une bande d'absorption ou d'émission à partir de la longueur d'onde connue de la bande.

La précision et la sensibilité de la mesure seront compromises s'il y a un problème de précision de longueur d'onde. Pour les dosages d'impuretés, l'analyte principal et les impuretés peuvent avoir un profil UV très similaire. Un décalage de la longueur d'onde de détection du réglage optimal requis par la méthode peut avoir un effet important sur la quantification des impuretés en relation avec le pic principal [12]. La quantité d'impureté peut être largement surestimée ou sous-estimée, selon que le décalage se rapproche ou s'éloigne de la valeur  $\lambda_{\max}$  de l'impureté.

Il existe de nombreuses façons de vérifier la précision de la longueur d'onde d'un détecteur UV – Vis.

Pour les détecteurs avec vérification de longueur d'onde intégrée, la raie du deutérium à 656 nm ou les bandes d'absorption à 360, 418, 453 et 536 nm dans un filtre à oxyde d'holmium sont souvent utilisés. La ligne de deutérium et les bandes d'oxyde d'holmium sont faciles à utiliser mais sont limités à la plage visible. La vérification de la longueur d'onde de l'UV gamme, où la plupart des analyses quantitatives peut être effectuée en remplissant la cellule avec une solution d'un composé qui a profil d'absorption dans UV bien caractérisée. La solution est analysée pour les maxima et minima d'absorption. Le  $\lambda_{\max}$  ou la valeur  $\lambda_{\min}$  du profil de balayage est alors comparée à la valeur  $\lambda_{\max}$  ou  $\lambda_{\min}$  connue du composé pour déterminer la précision de la longueur d'onde. Une solution de dichromate de potassium dans l'acide perchlorique et l'oxyde d'holmium dans l'acide perchlorique peuvent être utilisés.

Cependant, ces solutions acides sont difficiles à utiliser, car la cellule à écoulement doit être nettoyée à fond pour éliminer les résidus organiques. Les résidus peuvent être oxydés par le bichromate et peut modifier l'absorbance. La cellule doit être soigneusement nettoyée à nouveau après la mesure pour éliminer toute trace de fluorescence de la solution de bichromate de potassium. [20].

#### IV.3 .1. 3. 2 Linéarité de la réponse :

Étant donné que l'analyte dans les échantillons peut varier en concentration, la capacité d'un détecteur à produire une réponse linéaire à la variation de concentration dans une plage raisonnable est importante pour la précision du

pic par comparaison de la surface et de la hauteur des pics entre les étalons et les échantillons. La linéarité de la réponse du détecteur peut être vérifiée en pompant ou en remplissant la cuve à circulation avec une série de solutions étalons de différentes concentrations. Les solutions de Caféine aqueuse sont pratiques pour la mesure de la linéarité. La gamme de concentration devrait généralement générer des réponses de zéro à au moins 1,5 UA. Absorbances au-delà de 1,5 UA sont plus sujets à la déviation due à la lumière parasite.

### **IV.3 .1. 3. 3 Bruit et dérive :**

Bruit électronique, de pompe et photométrique; faible intensité de la lampe, une cuve à circulation sale et l'instabilité thermique contribuent au bruit global et à la dérive dans le détecteur. Un bruit excessif peut réduire la sensibilité du détecteur et affectent donc la quantification des analytes de bas niveau. La précision des données sont liées au rapport signal sur bruit. La dérive du détecteur peut affecter la ligne de base détermination et intégration des pics. De nombreuses procédures pour le bruit et la dérive du détecteur où les estimations sont basées sur l'ASTM (American Society for Testing and Material).

De nos jours, la plupart des logiciels de chromatographie sont capables de calculer le bruit et dérive du détecteur. En règle générale, le détecteur doit pouvoir se réchauffer et se stabiliser avant le test. Les fluctuations de température doivent être évitées pendant le test. Les tests de bruit et de dérive peuvent être effectués dans des conditions statiques et dynamiques.

### **IV.3 .1. 4 Module de chauffage de colonne**

L'efficacité d'une colonne HPLC varie avec la température de la colonne. En général, le facteur de capacité  $k$  diminue avec la température, et donc la rétention de l'analyse diminue avec la température. La rétention diminue de 1 à 3% pour chaque augmentation de 1°C. La capacité de maintenir une colonne stable et précise la température est essentielle pour atteindre le temps de rétention et la résolution souhaités des exigences dans la séparation de manière cohérente. L'utilisation d'un chauffe-colonne est une solution de contrôler et de maintenir une température de colonne constante. Même pour séparation effectuée à température ambiante, le réchauffeur de colonne peut également être utilisé pour maintenir une température de colonne constante pour éviter les décalages de temps de rétention de pointe dus à la variation de température dans le temps due à la climatisation et au chauffage / refroidissement des cycles.

La précision de la température du réchauffeur de colonne est évaluée en plaçant un thermomètre calibré dans le compartiment de la colonne pour



mesurer le compartiment réel Température. Les lectures du thermomètre sont comparées à la température préréglée à 40 et 60 ° C. De nombreux fabricants d'équipements LC ont l'exigence réglée à  $\pm 2^{\circ}\text{C}$ . La stabilité en température du compartiment de la colonne peut être évaluée indirectement en comparant le temps de rétention de certains pics du chromatogramme durant le temps.

### **IV. 3. 2 Place des Tests de conformité de système HPLC dans le cadre d'une QP**

Conçus pour satisfaire aux exigences des pharmacopées, comme l'USP ou le chapitre 2.2.46 de la pharmacopée européenne, les tests de conformité du système (SST) jouent un rôle pivot dans la documentation des performances du système de chromatographie au niveau de l'analyse [31].

### **IV. 3. 3 Conseils d'utilisation pour la vérification des performances HPLC**

1-Un entretien de routine tel que le remplacement du joint de pompe doit être effectué avant le test de performance.

2-Vérifiez l'intensité et les heures d'utilisation des lampes avant les tests de performance. Lampes utilisées depuis longtemps ont généralement une faible intensité, un niveau de bruit élevé et production instable d'énergie.

3-Effectuez le test de pression avant le test de précision du débit pour assurer que le joint de la pompe et les clapets anti-retour fonctionnent correctement et qu'il y a aucune fuite dans le système.

4-Assurez que la cellule à écoulement est propre et exempte de bulles de gaz lors de l'exécution des tests de performance du détecteur. La cellule d'écoulement et les bulles de gaz sales sont les principales raisons des mauvais résultats pour le bruit et la dérive du détecteur.

5-Une pression constante doit être maintenue dans la cellule à écoulement lors de l'exécution de test de linéarité du détecteur. Remplissage de la cellule à écoulement avec la solution d'essai manuellement avec une seringue conduit parfois à des fluctuations de pression et donc des lectures instables. Une alternative consiste à utiliser la pompe pour effectuer solution d'essai. dans la cuve à circulation. Cependant, cette option nécessite un grand volume de solution d'essai.

6-Une température stable doit être maintenue lors de l'exécution du bruit et essais de dérive. [20].

## Conclusion générale

---

La qualification des appareils est l'un des facteurs qui contribuent à la fiabilité du résultat analytique, Aussi bien pour une chaîne HPLC que pour d'autres équipements de laboratoire, la qualification permet de vérifier avec preuves que les équipements fonctionnent correctement.

Le but principal de ce projet était de montrer la qualification et l'application à une HPLC couplée à un PDA, pour ce faire, une étude détaillée a été faite sur l' HPLC et sur le spectrophotomètre UV-VIS détecteur à barrette de diode qui permet de visualiser l'étendue et l'importance d'utilisation de l'HPLC couplée à un détecteur PDA.

Les définitions des diverses activités relatives à la qualification des équipements dans l'industrie pharmaceutique sont apportées par Les textes réglementaires.

Une qualification réussie commence par un établissement des besoins utilisateurs adaptés aux requis réglementaires applicables à l'industrie pharmaceutique. Ceci permettra aux utilisateurs de bénéficier d'un système de routine convenable. Il est donc nécessaire de sélectionner les textes réglementaires ou les guides qui s'appliquent dans le contexte dans lequel le système à valider sera utilisé. De ces textes et des guides, les exigences s'appliquant au type de système sont extraites.

Cependant, dans notre étude on a suivi la ligne directrice du réseau OMCL (GEON) (Réseau général européen) l'annexe 1 « qualification des équipements » qualification des appareils de chromatographie liquide qui permettre de nous visualisé les différents Niveaux. Cela concerne :

- le niveau III. Contrôles périodiques et motivés des instruments et
- le Niveau IV. Vérifications des instruments en cours d'utilisation suivant des Recommandations et les limites d'acceptation typiques associées.

L'annexe 1 contient des procédures et leurs limites d'acceptation types pour plusieurs paramètres pour effectuer la qualification de niveau III de différents modules de l'HPLC.

## Conclusion générale

---

L'application est réalisée suivant les exigences fonctionnelles typiques pour HPLC avec détecteur UV-Vis qui sont détaillées dans le cadre d'une qualification opérationnelle (OQ) pour les modules HPLC qui comprennent :

- La Pompe
- le Détecteur
- l'Injecteur et
- le Réchauffeur de colonne

Une qualification de performance suit la QO qui remet en question les performances des composants HPLC en tant que système avec des Pratiques de vérification des performances des différents Modules de HPLC Couplée à un détecteur UV-Vis.

## Références

---

- [1] M. Caude, A. Jardy ; « méthodes chromatographiques introduction » PE 1445-1-3-4.
- [2] J-L. Cuq ; « Cours chromatographie liquide » Université Montpellier, P3 - 15 ; (2001).
- [3] F. Rouessac, A. Rouessac ; «Méthodes et techniques instrumentales modernes- 6ème édition »; Paris ; (2014).
- [4] « La chromatographie en phase liquide CPL » ; MariePauleBassez <http://chemphys.ustrasbg.fr/mpb>.
- [5] L. Selila, Z. Grine ; « Mise au point et validation d'une méthode de dosage de l'irbisartan dans des comprimés de 150 mg par la chromatographie liquide à haute performance » ; mémoire de fin d'étude En vue de l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie, Tizi Ouzo ; P 51-53-57 ; (2018).
- [6] Fisher scientific ; « focus chromatographie flacons, bouchons et produits chimiques » ; Edition thermo Fisher scientific Inc ; P 9 ; 2016.
- [7] V. Jacob ; « la chromatographie liquide haute performance (HPLC) salle de TP de génie analytique, présentation théorique de la HPLC » ; p1-12-13- 14-19-20.  
; 2010.
- [8] J.Dgraeve, F.Berthou ; « Méthodes chromatographiques » ; 2ème édition; p392; (1986).
- [9] M. Teixeira ; « La Chromatographie liquide haute performance » ; 2003.
- [10] M. Maheux; « Stratégies analytiques par chromatographie liquide avec détection en spectrométrie de masse afin d'évaluer l'activité de neuf enzymes du cytochrome p450 » ; Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval, Québec ; dans le cadre du programme de maîtrise en chimie pour l'obtention du grade de Maître es Sciences (M.Sc.) ; p 17-18-19 ; (2012).
- [11] L.Bensaad ; « étude de la séparation des fluoroquinolones par HPLC : application a l'étude de leur dégradation par rayonnement gamma » ; master en chimie analytique ; p17 ; 2013.

## Références

---

- [12] A. Coursimault; « STP pharma pratiques » ; 2<sup>ème</sup> édition ; P478-488 ; 1998.
- [13] T. Briere ; Département de Chimie, Université de La Réunion ; p36-37-44-45 ; 2001.
- [14] C. Jardy, A. Jardy ; « Chromatographie en phase liquide, théorie des méthodes de séparation » ; 4<sup>ème</sup> édition ; p12 ; 2004.
- [15] Vanquish ; « Manuel d'utilisation des détecteurs à barrette de diodes Vanquish (VH-D10) » ; Edition © Thermo Fisher Scientific Inc. ; p32-33 ; 2017.
- [16] A. Ramgulam ; « Mise en place et validation d'une méthode de caractérisation de la matière organique dissoute dans les eaux résiduaires par chromatographie d'exclusion de taille (HP-SEC) couplée à un détecteur UV à barrette de diode (PDA) » ; P7 ; 2020.
- [17] D. satyajit sarker zahid latif alixander, I. gray ; « natural product isolation » ; 2<sup>eme</sup> édition ; p233-237 ; 2006.
- [18] Bensakhria ; « Chromatographie liquide haute performance (HPLC) » ; 2016.
- [19] M-D. Blanchin ; « Qualification des instruments de laboratoire » ; université Montpellier ; p 5-13 ; 2010.
- [20], H. Lam; PH.D, "analytical method validation and instrument performance verification "procurement, qualification and calibration of laboratory instruments" an overview" performance verification of HPLC"; Edited by Chung Chow  
Chan, Herman Lam, Y. C. Lee, and Xue-Ming Zhang; P139-140 -141-173- 174-176-177-178-184; 2004.
- [21] General European OMCL network (GEON) Quality management document, PA/PH/OMCL (11) 04 R6; "Qualification of equipment, annexe 1: qualification of liquid chromatography equipment"; p2-3-6; 2018.
- [22] Ph. Hubert. A. Dispas, J. Mbinze, F. Lecomte, R. Marini ; « Qualification d'un Equipement » ; Master complémentaire - pharmacien d'industrie ; p10 ; 2015.

## Références

---

- [23] H. Lam; “ validation of laboratory instruments”; edition Wild Crane Horizon Inc; Scarborough, Ontario, Canada; p795-797-798-799-800-801- 802-803; 2008.
- [24] M. Caude, A. Jardy ; « chromatographie en phase liquide théorie et méthode de séparation », PE1455-2-4-5-6-7.
- [25] M. Caude, A. Jardy ; « chromatographie en phase liquide appareillage et application » , PE 1456-1-2-5-6-7-9-10.
- [26] D. Di benedetto, P. Breuil ; “Spectrophotométrie d’absorption dans l’ultraviolet et le visible » ; Editions T.I ; P 2 795v2-1-2-3-4-5-6-7-8-9-19-20.
- [27] J.M. Mermet. « Systèmes dispersifs en spectrométrie atomique » ; Laboratoire des sciences analytiques de l’université Claude-Bernard (Lyon I) ; Editions Techniques de l’Ingénieur, traité Analyse et Caractérisation ; P2 660- 2-4-8.
- [28] Bureau d’études industrielles - énergies renouvelables et environnement-projet « Amélioration de la gestion de l’eau sur le site de l’INP Toulouse Labège »; 2011.
- [29] S. Ryding « Application de Chromatographie liquide haute (HPLC) performance»; 2018.
- [30] L. Aubry «Stratégie de qualification des équipements de laboratoires et systèmes informatisés associés basée sur les référentiels réglementaires européens et américains»; mémoire en vue de l’obtention Diplôme d’État de Docteur en Pharmacie de, Strasbourg, 2016, p 87.
- [31]. Dr R. D. McDowall R. D. P. A. Smith «Que signifie vraiment la qualification des performances ? » Agilent Technologies, Inc, p6-8, 2018
- [32] VIAL.J. Journée de formation scientifique en spectrométrie atomique. « Définition de la validation de méthode et outils associés ». Laboratoire environnement et chimie analytique de l’ESPCI. Paris. 2006.

# Annexes

## Annexe

### Annexe 1 :

Classement des modes de détection selon leur principe de mesure et dans l'ordre décroissant d'utilisation

| Détection directe du soluté (1)   | Détection indirecte du soluté   | Détection différentielle   |
|---|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"><li>- Absorptiométrie UV et IR</li><li>- Electrochimie</li><li>- Diffusion de la lumière</li><li>- Techniques de dérivation</li><li>- Polarimétrie</li><li>- Radioactivité</li><li>- Spectrométrie de masse</li><li>- Résonance magnétique nucléaire</li><li>- Flammes (émission ou absorption)</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>- Absorptiométrie UV</li><li>- Fluorimétrie (mesure de la diminution de l'absorbance)</li><li>- Fluorimétrie (mesure de la diminution de la fluorescence)</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>- Réfractométrie</li><li>- Conductométrie</li><li>- Permittivité</li></ul> |
| (mesure de la diminution de la fluorescence)  |   |  |



**Annexe**

**Annexe 2 :**

Classement des détecteurs en fonction du degré de l'information fournie

| <b>Détecteurs simples</b>  | <b>Détecteurs semi-informatifs</b>   | <b>Détecteurs « intelligents »</b>  |
|--|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"><li>- Absorptiométrie UV-visible</li><li>- Fluorimétrie</li><li>- Réfractométrie</li><li>- Détecteur électrochimique</li><li>- Conductométrie</li><li>- Radioactivité</li><li>- Diffusion de la lumière</li><li>- Réactions de dérivation post -et précolonne</li><li>- Ionisation et émission de flamme</li><li>- Absorption atomique</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>- Spectrophotomètre UV programmable (temps et longueur d'onde)</li><li>- Spectrophotomètre à deux longueurs d'onde</li><li>- Spectrofluorimètre programmable (temps et longueurs d'onde)</li><li>- Détecteur électrochimique programmable et à plusieurs électrodes indicatrices</li><li>- Polarimètre</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>- Spectromètre de masse</li><li>- Spectrophotomètre à barrette de diodes</li><li>- Spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier</li><li>- Spectromètre de résonance magnétique nucléaire</li></ul> |

## Annexe 3

L'annexe 1 « qualification des équipements » qualification des appareils de chromatographie liquide contient des procédures et leurs limites d'acceptation types pour plusieurs paramètres pour effectuer la qualification de niveau III de différents modules de l'HPLC

### ➤ **Système de distribution de solvant**

Les tests suivants sont proposés pour le contrôle périodique et motivé de système de distribution du solvant HPLC : test de débit et de gradient.

#### • **Précision et précision du débit**

##### **Méthode 1**

##### **Matériaux:**

- ❖ Bécher (capacité de 5-10 ml) ou récipient de pesée
- ❖ Thermomètre étalonné
- ❖ Chronomètre calibré
- ❖ Balance d'analyse calibrée

##### **Paramètre:**

- ❖ Phase mobile : eau dégazée pour chromatographie R
- ❖ Capillaire par ex. Capillaire 2000 x 0,12 mm pour contre-pression

##### **Débit:**

Système HPLC : 0,5 mL/min et 5,0 mL/min ou débit maximal utilisé

Si des systèmes de mélange à haute pression sont installés, ce test doit être effectué sur chaque canal de solvant.

##### **Procédure:**

Régalez le débit à un niveau souhaité (testez au moins un débit, le niveau opérationnel inférieur utilisé) et laissez l'eau s'écouler dans le bécher ou le récipient de pesée préalablement pesé (vide). Après un temps défini (par exemple 5,0 min) peser à nouveau le bécher contenant l'eau distribuée. Mesurer la température de l'eau utilisée. Répétez la procédure au moins 3 fois. Calculer le volume livré au bécher et le débit :

$$V = m/\rho$$

m .....poids d'eau distribuée dans le temps mesuré [g]

## Annexes

---

$\rho$  ..... densité de l'eau à la température réelle du tableau [g/mL]

V ..... volume distribué [mL]

$$f = V/t$$

f ..... débit mesuré [mL/min]

t ..... temps écoulé [min]

V ..... volume délivré [mL]

D ..... écart [%]

F ..... débit nominal [mL/min]

f ..... débit mesuré [mL/min]

### **Limites:**

Précision : HPLC :  $D \leq 5,0 \%$

UHPLC :  $D \leq 3,0 \%$

Précision (HPLC) : L'écart type relatif doit être  $\leq 0,5 \%$ .

### **❖ Précision et ondulation de la composition du gradient**

#### **Paramètres:**

Capillaire par ex. 2000 x 0,12 mm pour contre-pression

Détection : 265 nm

Phase mobile A : eau pour chromatographie R

Phase mobile B : eau pour chromatographie R contenant 0,5% d'acétone

Débit : 1,0 ml/min

#### **Procédure:**

Le test est effectué de la manière suivante en utilisant un programme de gradient en fonction du nombre des canaux de solvant et la configuration du système :

A-B

A-B et A-C

A-C, A-B et B-D

Tableau III - Exemple de configuration du système A-B :

## Annexes

| temps [min] | % mobile phase A<br>(eau) | % mobile phase B<br>(eau/mélange acetone ) |
|-------------|---------------------------|--|
| 0.0         | 100                       | 0  |
| 0.1         | 90                        | 10   |
| 10          | 90                        | 10   |
| 10.1        | 50                        | 50   |
| 20          | 50                        | 50   |
| 20.1        | 10                        | 90   |
| 30          | 10                        | 90   |
| 30.1        | 0                         | 100  |
| 40          | 0                         | 100  |
| 40.1        | 100                       | 0  |

Commencez le test en pompant de l'eau pendant au moins 10 min pour équilibrer le système.

La valeur zéro % au début du test est la ligne de base. Tous les pas sont mesurés au début de

la partie horizontale de la ligne soit par logiciel (comme unités d'absorption) soit manuellement sur l'impression papier

à l'aide d'une règle. La hauteur du mélange 100 % eau/acétone est utilisée comme H dans le calcul qui suite

$$\%H = 100 \cdot h/H$$

%H ..... composition calculée

h ..... hauteur de la ligne mesurée

H ..... hauteur de la ligne de mélange 100% eau/acétone (phase mobile B)

d ..... écart

G ..... composition du gradient nominal [% mélange eau/acétone = phase mobile B]

### Limites:

Précision :  $\pm 2,0$  %

L'ondulation de la composition du gradient est le pourcentage de bruit de la ligne à 50 % du programme de gradient

$$\%R = 100 \cdot N/h_{50}$$

%R ..... ondulation

$h_{50}$  ..... hauteur de la ligne 50 %

N ..... hauteur du bruit, c'est-à-dire la différence entre le minimum et le maximum des 50 % de la ligne mesurée pendant 1 minute dans la zone linéaire

Limite :  $\leq 0,2 \%$

### ➤ **Injecteur**

La précision volumique et le report sont les tests proposés pour le contrôle périodique et motivé de l'Injecteur de LC.

### ❖ **Précision du volume et transfert**

#### **Méthode 1**

#### **Solutions:**

Solvant A : eau pour chromatographie R : méthanol R (40:60 V/V)

Solution témoin (a) : dissoudre 15,0 mg de méthylparabène et 15,0 mg de propylparabène dans le solvant A et diluer à 100,0 mL avec le même solvant.

Solution de référence (b) : Diluer 1,0 mL de solution de référence (a) à 10,0 mL avec le solvant A.

#### **Paramètres:**

Colonne : Lichrospher 100 RP8, 5 m, 125 x 4 mm, sans pré-colonne ou équivalent

Phase mobile : eau pour chromatographie R : méthanol R (40:60 V/V)

Débit : 1,0 ml/min

Détection : 254 nm

Volume injecté :

❖ HPLC (flow-cell à voie courte, par exemple 5 ou 10 mm) : 20 L

#### **Procédure:**

Schéma d'injection :

- 1 x solvant A (injection à blanc 1)
- 6 x solution de référence (b)

- 1 x solution de référence (a)
- 1 x solvant A (injection à blanc 2)
- 1 x solution de référence (b)

### **Limites:**

Répétabilité des aires de pic : l'écart type relatif des aires de pic du méthylparabène et propylparabène dans les chromatogrammes des six injections consécutives de solution témoin (b) devrait être 1.0 %

Carry-over : Le pourcentage de la surface du pic correspondant au propylparabène dans le blanc d'injection 2 ne dépasse pas 2 % de l'aire du pic du propylparabène dans le chromatogramme obtenu avec solution de référence (b) injectée après l'injection à blanc 2, cela correspond à 0,2 %

#### ➤ **Échantillonneur automatique**

La précision de la thermostatisation peut être testée dans le cadre du contrôle périodique et motivé de l'échantillonneur automatique.

#### ❖ **Précision de la thermostatisation**

### **Matériaux:**

Thermomètre étalonné (électronique) avec une sonde appropriée.

### **Procédure:**

Sélectionnez une température le long de la plage de température opérationnelle ou requise de l'équipement (par exemple, le point le plus bas peut être vérifié, par exemple + 5 °C, ou la température typique utilisée). Attendez jusqu'à ce que le système est équilibré. À l'aide du thermomètre étalonné, mesurez la température réelle dans l'échantillonneur automatique et comparez à la température sélectionnée. Comme procédure alternative, remplissez un flacon avec de l'eau, attendez jusqu'à ce que l'équilibre et mesurez la température de l'eau à l'aide d'une sonde appropriée. Le cas échéant, répétez la mesure à partir de plusieurs points de l'échantillonneur automatique (cartographie) en suivant les instructions fournis par le fabricant.

### **Limites:**

La température réelle doit être comprise entre □ 3°C par rapport à la température sélectionnée.

#### ➤ **Appareil de four /refroidissement**

La précision et la stabilité de la thermostatisation sont les paramètres testés dans cet exemple de contrôle périodique et vérification motivée de l'étuve/du dispositif de refroidissement.

### ❖ Précision et stabilité de la thermostatisation

#### **Matériaux:**

Thermomètre calibré.

#### **Procédure:**

- 1) Régler la température du four à colonne à 40 °C, attendre environ 30 minutes pour équilibrer le système, mettre un thermomètre calibré dans le four et prendre 6 relevés de température à 4 minutes intervalles.
- 2) Le cas échéant, répétez cette procédure en réglant le four/refroidisseur à d'autres températures de fonctionnement en fonction de la plage de température de fonctionnement de l'équipement. La précision est calculée comme une moyenne de 6 lectures de température.

**Limites** :  $\pm 2$  °C

La stabilité est vérifiée à l'aide des résultats obtenus dans le test de précision. La stabilité est calculée pour chaque température comme la différence entre la température la plus élevée et la plus basse des six lectures.

Limites :  $\leq 1$  °C

### ➤ Détecteur de longueurs d'onde multiples

Le contrôle périodique et motivé des détecteurs LC UV/visible et DAD peut être effectué par tester la linéarité, la précision de la longueur d'onde et la dérive.

### ❖ Linéarité

#### **Solutions:**

Std. 1 : 0,5 g/mL de caféine

Std. 2 : 1,0 g/mL de caféine

Std. 3 : 5,0 g/mL de caféine

Std. 4: 25,0 g/mL de caféine

Std. 5 : 50,0 /g/mL de caféine

Std. 6 : eau pour chromatographie R (blanc)

## Annexes

---

Par exemple, préparez une solution mère (Std. 0) en pesant environ 10,0 mg de caféine et remplissez jusqu'à 20,0 ml avec de l'eau pour chromatographie R (dissoudre par sonication ou mélanger). Diluer cette solution, par exemple en suivant le schéma suivant :

Std. 5 : diluer 10,0 mL de solution mère à 100,0 mL

Std. 4: diluer 5,0 ml de solution mère à 100,0 ml

Std. 3: diluer 1,0 ml de solution mère à 100,0 ml

Std. 2 : diluer 10,0 mL de Std. 3 à 50,0 ml

Std. 1 : diluer 10,0 mL de Std. 3 à 100,0 ml

Utiliser de l'eau pour chromatographie R pour diluer.

### **Paramètres:**

Colonne : colonne ou capillaire approprié (par exemple RP 18)

Phase mobile : acétonitrile R : eau pour chromatographie R (15:85 V/V)

Température du four : 40 °C

Débit: HPLC 1,0 mL/min

Détection : 273 nm

Volume injecté :

HPLC (flow-cell à voie courte, par exemple 5 ou 10 mm) : 20 L

### **Procédure:**

Schéma d'injection :

2 x vierge

1 x standard. 1

1 x standard. 2

1 x standard. 3

1 x standard. 4

1 x standard. 5

**Limites** :  $r^2 \geq 0,9990$



**Remarque** : Comme ce test utilise différentes solutions de test à injecter, il couvre également le contrôle de positionnement correct des flacons dans le passeur d'échantillons.

### ❖ Précision de la longueur d'onde

La précision de la longueur d'onde (et l'ajustement connexe) peut être effectuée par des procédures de test intégrées, suivant les instructions du manuel/du fabricant de l'instrument. Dans tous les autres cas, utilisez la procédure décrite ci-dessous.

#### **Solutions:**

Caféine Std. 5 du test de linéarité

#### **Paramètres:**

Utilisez les conditions de fonctionnement décrites dans les tests de linéarité, sauf pour la détection.

#### **Procédure:**

Injectez la solution de caféine et enregistrez le spectre en balayant de 190 à 290 nm (1 nm

étapes incrémentielles, dans la mesure du possible). Les maxima sont à 205 nm et 273 nm, le minimum à 245nm.

**Limites** :  $\pm 2$  nm

**Dérive** : Généralement, la vérification de la dérive est effectuée par des procédures de test intégrées. Suivez les instructions du manuel/fabricant de l'instrument.

**Limites** : selon le fabricant

# RÉSUMÉ

l'HPLC est parmi les techniques chromatographiques les plus employées actuellement dans les laboratoires d'analyse chimique. Le détecteur PDA est un détecteur UV-VIS avancé qui peut être couplé à une HPLC pour fournir la technique HPLC-PDA.

Le couplage HPLC-PDA est une méthode d'analyse de plus en plus utilisée pour détecter, identifier et quantifier les différents constituants d'un mélange complexe.

L'objectif de notre travail est de démontrer la qualification (QI, QO, QP), application à un HPLC couplée à un PDA suivant la ligne directrice du réseau OMCL (GEON) (Réseau général européen) l'annexe 1 « qualification des équipements » qualification des appareils de chromatographie liquide.

Nous avons initié ce travail par une étude Instrumentale de la HPLC; suivi par le principe de fonctionnement de l'HPLC couplée à un PDA, Dans un 3eme chapitre une revue des exigences réglementaires et description détaillée de la qualification. dans le Chapitre IV, nous avons effectué une application à une HPLC couplée à un PDA l'application suivant la réglementation européenne concerne les tests OQ typiques pour les modules HPLC et la qualification de performance (PQ) se fait par des tests des performances des composants HPLC en tant que système après évaluation des fonctions clé des différents modules qui le composent.

Les données des tests de qualification et les tests réguliers de vérification des performances, sont la seule preuve que l'instrument a été correctement installé et entretenu pour prendre en charge ses applications prévues.

**Mots clés** : chromatographie liquide à haute performance (HPLC), détecteur ultraviolet-visible (UV-Vis), détecteur PDA, couplage HPLC-PDA, Exigences réglementaires, ligne directrice du réseau OMCL (GEON), qualification, application.

# ABSTRACT

HPLC is one of the most widely used chromatographic techniques in chemical analysis laboratories today. The PDA detector is an advanced UV-VIS detector which can be coupled with HPLC to provide the HPLC-PDA technique.

The coupling HPLC-PDA is an analytical method increasingly used to detect, identify and quantify the different constituents of a complex mixture.

The objective of our work is to demonstrate the qualification (QI, QO, QP), application to an HPLC coupled to a PDA following the guideline of the OMCL network (GEON) (European general network) appendix 1 "equipment qualification  
»Qualification of liquid chromatography equipment.

We initiated this work with an Instrumental study of HPLC; followed by the operating principle of HPLC coupled to a PDA, In a 3<sup>rd</sup> chapter a review of regulatory requirements and detailed description of the qualification. In Chapter IV, we have carried out an application to an HPLC coupled to a PDA the application according to the European regulations concerns Typical OQ tests for HPLC modules and the performance qualification (PQ) is done by tests of performance of HPLC components as a system after evaluation of the key functions of the various modules that compose it.

Qualification test data and regular performance verification tests are the only proof that the instrument has been properly installed and maintained to support its intended applications.

**Keywords:** high performance liquid chromatography (HPLC), ultraviolet-visible (UV-Vis) detector, PDA detector, the coupling HPLC-PDA, Regulatory requirements, OMCL network guideline (GEON), qualification, application.

## ملخص

كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء HPLC هي واحدة من أكثر تقنيات الكروماتوغرافيا المستخدمة على نطاق واسع في مختبرات التحليل الكيميائي .

كاشف الصفيغ الضوئي PDA هو كاشف متقدم للأشعة المرئية وفوق البنفسجية والذي يمكن أن يقترن بـ كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء لتوفير تقنية. كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء- كاشف الصفيغ الضوئي

اقتران كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء- كاشف الصفيغ الضوئي هو طريقة تحليلية تستخدم بشكل متزايد لاكتشاف وتحديد وقياس المكونات المختلفة لخليط معقد. الهدف من عملنا هو إثبات المؤهلات QI مؤهل التركيب ، QO المؤهل التشغيلي ، مؤهل الأداء QP ، والتطبيق على كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء مقترن بـ كاشف الصفيغ الضوئي وفقاً للمبادئ التوجيهية لشبكة (GEON) OMCL الشبكة العامة الأوروبية) الملحق 1 "تأهيل المعدات" تأهيل معدات الكروماتوغرافيا السائلة.

بدأنا هذا العمل من خلال دراسة لـ كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء ؛ متبوعاً بمبدأ تشغيلها مقترناً بـ كاشف الصفيغ الضوئي ، في الفصل الثالث يوجد مراجعة للمتطلبات التنظيمية ووصف مفصل للمؤهلات. في الفصل الرابع ، قمنا بتنفيذ تطبيق على HPLC مقترن بـ PDA ، التطبيق وفقاً للوائح الأوروبية فيما يتعلق باختبارات OQ النموذجية لوحدات HPLC ويتم إجراء تأهيل الأداء (PQ) عن طريق اختبارات أداء المكونات HPLC كنظام بعد تقييم الوظائف الرئيسية للوحدات المختلفة التي تتكون منها .

بيانات اختبار التأهيل والاختبارات المنتظمة للتحقق من الأداء هي الدليل الوحيد على أن الجهاز قد تم تثبيته وصيانته بشكل صحيح لدعم التطبيقات المقصودة.

**الكلمات الرئيسية:** كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء (HPLC) ، كاشف مرئي فوق بنفسجي (UV-Vis) ، كاشف الصفيغ الضوئي PDA ، اقتران HPLC-PDA ، المتطلبات التنظيمية ، دليل شبكة (GEON) OMCL ، التأهيل ، التطبيق