

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLEB-BLIDA-1

FACULTE DE MEDECINE

DEPARTEMENT DE PHARMACIE



QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT

TYPE : HPLC

Thèse d'exercice présentée en vue de l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie

Session : Juin 2021

Présentée par :

-SAIDANI OUSSAMA

-BENZEKHROUFA SAID

-HAMZA MOHAMMED FATEH

Promotrice du mémoire :

-Dr.BELAIDI.F : Maître assistante en chimie analytique.

Devant le Jury :

-Dr.AZZOUZ.L: Maître assistante en chimie analytique -USDB-1- ..présidente de Jury

. -Dr. BOUZEKRI.F: Maître assistant en chimie thérapeutique-USDB-1- ...Examineur

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE SAAD DAHLEB-BLIDA-1

FACULTE DE MEDECINE

DEPARTEMENT DE PHARMACIE



QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT

TYPE : HPLC

Thèse d'exercice présentée en vue de l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie

Session : Juin 2021

Présentée par :

-SAIDANI OUSSAMA

-BENZEKHROUFA SAID

-HAMZA MOHAMMED FATEH

Promotrice du mémoire :

-Dr.BELAID L.F : Maître assistante en chimie analytique.

Devant le Jury :

-Dr.AZZOUZ L. : Maître assistante en chimie analytique -USDB-1- ...présidente de Jury

-Dr. BOUZEKRI F. : Maître assistant en chimie thérapeutique-USDB-1- ...Examinateur

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Nous vivons pour dessiner un sourire. Et essuyez une larme.
Et soulager la douleur. Et parce que demain nous attend.
Et le passé a disparu, et nous avons daté le nouvel horizon de l'aube.

N'abandonnez pas si vous êtes coincé dans un grand trou.
Tu vas t'en sortir, et tu es plus cohésif et plus fort

Résumé

L'obtention des données analytiques fiables garantissant la protection des patients, nécessite l'utilisation des appareils qualifiés et de haute précision, et c'est ce qui nous incite à savoir comment qualifier les appareils, notamment l'équipement type HPLC (chromatographie liquide haute performance). ?

L'objectif de notre travail est de maîtriser tous les paramètres d'HPLC (principes, mécanismes séparatifs. Appareillage et conception) et savoir exactement comment qualifier une chaîne HPLC suivant quatre étapes nécessaires nommées (Qualification de conception, Qualification d'installation, Qualification opérationnelle, Qualification de Performance) et selon un protocole délivré par les références internationales (pharmacopée, ICH, ASTM et GMP.), contenant un ensemble de tests spécifiques pour chaque étape en exploitant le logiciel system informatisé OQ/PV.

L'optimisation des paramètres de performance tels que la précision de débit et de température et de longueur d'onde, holmium, stabilité du bruit et de la température, précision d'injection/carryover gradient, la linéarité (du débit, d'injecteur et de détecteur) ont été effectués, un exemple pratique sera détaillé dans cet humble travail.

Abstract

Obtaining reliable analytical data guaranteeing the protection of patients, requires the use of qualified and high precision equipment, and this is what prompts us to know how to qualify the equipment, especially the equipment type HPLC (high performance liquid chromatography).

The objective of our work is to understand all the parameters of HPLC (principles, separative mechanisms, equipment and design) and to know exactly how to qualify an HPLC chain according to four necessary steps named (Design Qualification, Installation Qualification, Operational Qualification, Performance Qualification) and according to a protocol issued by international references (ICH pharmacopoeia, ASTM and GMP), containing a set of specific tests for each step by using the computerized software system OQ/PV

The optimization of performance parameters such as flow rate and temperature accuracy and wavelength, holmium, noise and temperature stability, injection accuracy/caryover gradient, linearity (of flow rate, injector and detector) has been performed, a practical example will be detailed in this humble work.

ملخص

لضمان حماية المرضى يتطلب الحصول على بيانات تحليلية موثوقة و ذلك باستخدام أجهزة مؤهلة وذات دقة عالية ، وهذا ما يلهمنا لمعرفة كيفية تأهيل الأجهزة ، ولا سيما المعدات من نوع HPLC (الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء) ؟

إن الهدف من هذا العمل هو معرفة كل ما هو متعلق بالكروماتوغرافيا السائلة عالية الدقة (المبادئ . اليات الفصل .المعدات و التصميم)و معرفة كيفية تأهيلها بصفة خاصة من خلال أربع خطوات ضرورية تحمل اسم(تأهيل التصميم .تأهيل التركيب .تأهيل التشغيل و تأهيل الأداء) و وفقا لبروتوكول صادر عم المراجع الدولية ASTM.HDHC.GMP يحتوي على مجموعة اختبارات محددة لكل الخطوات باستخدام برمجيات النظام الحاسوب OQ/PV

تحقيق الاستفادة المثلى من إعدادات الأداء مثل التدفق . دقة درجة الحرارة .طول الموجة . و اختبار الهولميوم. استقرار خط الأفق.دقة الحقن/اختبار الكاري اوفر .التدفق و الحقن و الكشف) و سوف يتم تفصيل مثال علمي في هذا العمل المتواضع

REMERCIEMENT

Tout d'abord nous tenons à remercier ALLAH, de nous avoir donné la santé, la volonté et la patience pour mener à terme notre formation et pouvoir réaliser ce travail de recherche

À Dr Bouzekri et Dr. Azouz

Merci de nous avoir fait l'honneur de présider ce jury. Veuillez trouver ici l'expression de notre plus profond respect et de notre sincère reconnaissance.

À Dr.Belaidi Farah notre promotrice

Nous tenons à exprimer nos profonds remerciements à notre encadreur qui nous a guidés de ses précieux conseils et suggestion, des éclaircissements qu'elle nous a apportés, ainsi que pour ses remarques constructives et la confiance qu'elle nous témoigné tout au long de ce travail.

À Monsieur FOUAD Besseriani et l'équipe de laboratoire REZGULAB

Un grand merci aussi pour les explications qui nous a fourni et la formation à laquelle on a assisté ou il nous a donné le maximum d'information.

À l'équipe de ANPP Mme (Soraya, Dr. BENSDIRA) et Mr. Chadouli et Mounir

Merci de nous 'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail. Trouvez ici l'expression de nôtres sentiments les plus sincères.

À nos parents

Un immense merci pour votre soutien tout au long de nos études et au cours de la réalisation de ce travail. Merci pour votre confiance à vous qui avez toujours cru en nous.

Merci d'avoir été l'épaule protectrice et réconfortante sur laquelle nous pouvons toujours nous reposer. Merci pour vos conseils, votre implication, votre suivi, votre patience, l'ensemble de nos échanges...

Nous vous remercions du fond du cœur pour tout ce que vous nous 'avez apporté.

À l'ensemble de la famille Saidani Hamza et Benzekhroufa

Merci pour vos encouragements et votre soutien depuis tant d'années.

Merci pour avoir toujours suivi nos études et notre thèse.

À nos amis

Merci pour tout ce que vous m'avez apporté depuis de longues années, de près et de loin.

Ce travail n'aurait pas été le même sans vous.

Que de bons moments passés ensemble et encore beaucoup à venir... Merci d'avoir Supporté nôtres refus de sortie ! Et d'avoir su rester présents. Votre amitié et votre soutien

A nos chers collègues

Merci pour votre support quotidien et votre écoute. Merci pour vos partages de connaissances. C'est un plaisir de travailler avec vous.

Une pensée particulière à la cellule qualification et ses prestataires. Merci pour vos partages et nos échanges.

Et enfin merci à vous tous, familles, amis et collègues, qui êtes présents en ce jour c'est particulier pour nous. Que cette thèse vous témoigne notre affection et vous exprime notre reconnaissance.

Dédicace-

Je dédie ce modeste travail à :

A MES CHERS PARENTS : pour tous leurs sacrifices, leurs amour, leur tendresse et leur soutien tout au long de mes études

A MES chères sœur : pour leur encouragements permanents et leurs soutien moral

A MES CHERS FRERES : pour leur appui et leur encouragement

A TOUTE MA FAMILLE : pour leurs soutien tout au long de mon parcours universitaire

A MA GRANDE MERE : La personne qui n'a jamais cessé de me soutenir et de m'épauler

Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés et qui m'ont accompagnaient durant mon chemin d'études supérieures, mes amiables amis et collègue d'étude

SAIDANI OUSSAMA

Dédicace

Je dédie ce modeste travail, à

À ma chère mère

À celle qui m'a donné la vie, symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma très chère mère Kihali. H

À mon cher père

À mon père Mahdi, éccle de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années d'études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner de l'aide et à me protéger.

Que dieu les gardes et les protèges

À ma chère femme

À ma femme Bouziane. Oh, pour la patience et le soutien dont elle a fait preuve pendant toute la durée de cette thèse et mes études.

À mes sœurs et mes frères

À mes chères frères Ahmed, Abou-elfadl et Mohamed à mes précieuses sœurs Djamila et Amina et Amaria

Les mots ne peuvent résumer ma reconnaissance et mon amour à votre égard.

À ma grand-mère et grand père

Que dieu les gardes et les protèges

À Mes nièces et neveux

Abdelmalek, Razane, Haroun, Jaber, Riadh, Moussa, Laide, Youssef, Abed el Rahim, Abed el Ber, Raïhana

À mes cousins et cousines et À mes deux tantes toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,

À tous mes amis

À tous mes amis avec lesquels j'ai partagé mes moments de joie et de bonheur.

Merci pour votre présence, vos scurires et votre soutien. À tous Mes enseignants tout au long de mes études et à mes amis de promotion À vous tous, je dédie ce modeste travail

BENZEKHROUFA SAID

Dédicace

À ma très chère Maman Hamza Amina, la lumière de mes jours, celle qui m'a donné la vie, la femme qui formule tout le temps des prières à mon égard, merci pour sacrifices pour me voir toujours en haut, de m'avoir poussée et motivée dans toutes les étapes de ma vie vois à travers ce travail mon amour sincère et ma gratitude. Que Dieu te garde toujours pour nous.

À la mémoire de mon Papa Hamza Abderrahmane disparu trop tôt, avant même de partager cette joie avec moi. Mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que je ne cesse d'admirer de m'avoir guidée et conseillée dans ma vie, que dieu te garde en son vaste paradis.

À mon futur épouse Mansour. M, La personne qui n'a jamais cessé de me soutenir et de m'épauler, "ma fierté" qui partage avec moi les plus petits détails de ma vie

Je prie dieu de te protéger pour moi

À mes chères sœurs, mes sources de joie et de bonheur ; Ahlem, Lahira (Samra), Rachida et bien-sûr ma petite ange Malak Sirine.

À mon frère, mon soutien inestimable Mohamed Anir Eddine (Mirou)

À mon frère-ami Mohamed Salim et l'ensemble de sa famille Chabi, et mon ami Islam Kobbli

À tous mes amis

À l'ensemble de mes deux familles Hamza pour leurs soutiens et l'encouragement

Aussi l'ensemble des familles: Chikh, Mouaici, Chambi et Mansour

À mes cousins et cousines et À mes deux tantes À toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,

Et bien-sûr tous mes enseignants depuis la période de primaire jusqu'à ce jour.

Et à toute personne qui a contribué à la réalisation de ce mémoire, de près ou de loin

HAMZAMOJHAMMED FATEH

Table of Contents

1	-Chapitre1 : Chromatographie en phase liquide haute performance HPLC	5
1.1	Historique :	5
1.2	Définition	6
1.3	Principe :	7
1.4	Mécanismes séparatifs de la chromatographie liquide haute performance (HPLC) :	8
1.4.1	Chromatographie de partage :	8
1.4.2	Chromatographie d'exclusion :	11
1.4.3	Chromatographie d'adsorption :	11
1.4.4	Chromatographie échangeuses d'ions :	13
1.4.5	Chromatographie chirale :	14
1.5	Appareillage :	16
1.5.1	Conception :	16
1.5.2	Système de pompage du solvant :	17
1.5.3	Le système D'injection :	24
1.5.4	La Colonne :	29
1.5.5	Phase Stationnaire :	32
1.5.6	Phases mobiles :	36
1.5.7	Le détecteur :	39
1.5.8	Système informatisée (logiciel et chromatogramme) :	43
1.6	Pic chromatographique :	43
1.6.1	. Grandeurs de rétention :	44
1.6.2	Données chromatographiques :	47
1.6.3	Paramètres de séparation :	49
1.7	La perte de charge dans une colonne :	52
1.8	Le comportement d'un pic chromatographique :	53
1.8.1	Facteur de symétrie AS :	54
1.8.2	Facteur d'asymétrie (ou facteur de trainé tf) :	55
1.9	Test de conformité de système (TCS) :	56

1.9.1	Définition du test de conformité du système (TCS) :	56
1.9.2	Période d'application du test :	58
1.9.3	Les paramètres à vérifier pour l'évaluation d'un système chromatographique :	58
1.10	Domaines d'application de la Chromatographie liquide haute performance (HPLC) :	60
1.11	Avantages et limites :	63
2	Chapitre II : La qualification.....	66
2.1	Concept et définitions.....	66
2.1.1	Qualification :	66
2.1.2	Nécessité de la qualification	69
2.2	Réglementations applicables à la qualification des équipements de laboratoires et systèmes informatisés associés.	71
2.2.1	Textes réglementaires.....	71
2.2.2	Guides :	73
2.3	Divers guides et réglementations dans un même but	76
2.4	La mise au point sur la terminologie	77
2.5	Classification des équipements selon l'USP <1058>.....	78
2.6	Organisation et Planification des activités de Qualification.....	79
2.6.1	Stratégie globale de qualification des équipements, définie au Plan de Qualification/Validation du site	79
2.6.2	Etablissement des rôles et responsabilités des différents acteurs d'un projet de qualification.....	80
2.6.3	Notion de cycle de Qualification	82
2.7	Etapas de Qualification des équipements	83
2.7.1	Consolidation de l'analyse et définition des tests à réaliser	83
2.7.2	Tests de vérification d'installation et de configuration (QI)	83
2.7.3	Tests de vérification fonctionnelle (QO).....	83
2.7.4	Tests de vérification de performance (QP).....	85
2.7.5	La Qualification de Conception (QC)	85
2.7.6	Factory Acceptance Testing (FAT) / Site Acceptance Testing (SAT).....	85
2.7.7	La Qualification d'Installation (QI).....	86
2.7.8	La Qualification Opérationnelle (QO).....	86
2.7.9	La Qualification de Performance (QP).....	87
2.7.10	La Requalification	88

2.8	Documentation des activités de qualification (QI, QO, QP et Requalification).....	88
2.8.1	Protocole de Qualification.....	88
2.8.2	Fiche de Test	89
2.8.3	Ecart de qualification.....	89
2.8.4	Rapport de Qualification	90
2.8.5	Documents annexes	90
2.8.6	La vie du système après qualification initiale.....	92
2.9	Enjeux de la stratégie de qualification.....	93
3	Chapitre III: Qualification d'un équipement type HPLC	96
3.1	Qualification de Conception (QC) :	96
3.2	Qualification d'installation QI :	98
3.3	Qualification opérationnelle :	99
3.4	La qualification de performance	100
4	Chapitre IV: Partie critique	103
4.1	Introduction	103
4.2	PRESSION ANORMALE :	103
4.3	FUITES	107
4.4	PROBLEMES AFFECTANT LE CHROMATOGRAMME	109
4.5	PROBLEMES liés à l'injecteur	117
4.6	PROBLEMES DECELES PAR L'ODORAT, LA VUE OU L'OUÏE.....	118
5	Chapitre V :La partie expérimentale.....	122
5.1	Objectif :	122
5.2	Matériels.....	123
5.3	Logiciel.....	124
5.4	Documentation.....	124
5.5	Méthodes	125
5.6	Procédure	125
5.6.1	Préparation du matériel	125
5.6.2	Préparer la pompe de régénération.....	126
5.6.3	Préparer l'instrument	126
5.6.4	Préparation de l'échantillonneur automatique :	127
5.6.5	Terminer la préparation	127

5.7	Tests de qualification de performance/QO.....	128
5.7.1	Test de précision du débit	128
5.7.2	Précision de la température du compartiment à colonnes	130
5.7.3	Précision de la longueur d'onde - VWD.....	132
5.7.4	Holmium	134
5.7.5	Stabilité du bruit / de la température	135
5.7.6	Précision d'injection / carryover	137
5.7.7	Linéarité de la réponse	139
5.7.8	Gradient.....	140
5.7.9	Gradient- Canaux C / D.....	146
6	chapitre VI: Interprétation des résultats	152
6.1	Précision du débit.....	152
6.2	Précision de température.....	154
6.3	Précision de la longueur d'onde	155
6.4	Holmium	157
6.5	Stabilité du bruit / de la température	158
6.6	Test de Précision d'injection/carryover.....	159
6.7	Teste de Linéarité de la réponse	161
6.8	Gradient de Composition	162

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Classification des solvants selon leur polarité et leur pouvoir d'éluion dans la chromatographie de partage en phase inverse et en phase normale [10] [11]. _____	10
Figure 2 : Principe de la chromatographie d'exclusion [13]. _____	11
Figure 3: Adsorption et désorption dans la chromatographie d'adsorption [8]. _____	12
Figure 4: Interactions entre soluté-solide adsorbant- éluant dans la chromatographie d'adsorption [14]. _____	12
Figure 5: Principe de la chromatographie échangeuse d'ions [16]. _____	13
Figure 6: Principe de la chromatographie échangeuse d'ions [16]. _____	16
Figure 7: La vanne de mélange et le dégazeur en ligne en fonctionnement. [22] _____	17
Figure 8: Vanne de mélange d'un HPLC [22] _____	18
Figure 9: schéma représentatif d'un dégazeur HPLC [15] _____	19
Figure 10: une pompe HPLC _____	20
Figure 11: D'UNE POMPE ALTERNATIVE [21] _____	22
Figure 12: montage à piston double. [19] _____	23
Figure 13: montage à deux tetes de pompe. [19] _____	23
Figure 14: vanne d'injection d'un HPLC [19] _____	25
Figure 15 une boucle d'échantillonnage pour HPLC [21] _____	26
Figure 16: Vanne à boucle d'échantillonnage _____	27
Figure 17 : Vanne d'injection pour HPLC et boucles assorties de différents volumes [19] _____	27
Figure 18: une boucle d'injection d'un HPLC _____	28
Figure 19: COLONNE HPLC [19] _____	30
Figure 20: Aspects extérieurs éclaté et assemblé d'une colonne et pré-colonne pour HPLC [18] _____	31
Figure 21:: Pouvoir d'éluion de certains solvants. _____	38
Figure 22: cellule d'un détecteur uv-visible (19) _____	40
Figure 23: Principaux paramètres d'un chromatogramme [32] _____	43
Figure 24: Chromatogramme illustrant le t_R , t'_R , t_M [32] _____	44
Figure 25: : Chromatogramme et largeurs du pic chromatographique [10]. _____	47
Figure 26: Illustration du modèle de plateaux théoriques [32]. _____	49

Figure 27: Chromatogramme et résolution [38].	50
Figure 28: Exemples de séparation chromatographique de deux composés	50
Figure 29: : Paramètres pour calculer la sélectivité	52
Figure 30: : pics chromatographiques [45]	54
Figure 31: : Exemple d'une asymétrie de pic chromatographique.	55
Figure32 Figure 32: : Illustration de l'aspect qualitatif et quantitatif de l'HPLC [03].	61
Figure 34: Cycle de Qualification/Validation d'un système	82
Figure 35: Equipements et solvants	123
Figure 36 : chromatogramme de débit de pompe	153
Figure 37: chromatogramme de la longueur d'onde	154
Figure 38: chromatogramme de température	155
Figure 39: chromatogramme de précision de la longueur d'onde	156
Figure 40 : chromatogramme de test d'holmium	157
Figure 41: chromatogramme de test de Stabilité du bruit / de la température	158
Figure 42: qualification des équipement	
Figure 43: chromatogramme Test de Précision d'injection/carryover 02	160
Figure 44: chromatogramme Test de Précision d'injection/carryover 03	161
Figure 45 : chromatogramme de Teste de Linéarité de la réponse	162

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1:: Composition des phases mobiles et stationnaires dans la chromatographie de partage en phase inverse et en phase normale [8].	10
Tableau 2: Les paramètres du test de conformité du système.	58
Tableau 3: Limites de paramètres de TCS selon les renseignements de l'USP et FDA [54] [07] [55] >	59
Tableau 4: Avantages et limites de la HPLC	64
Tableau 5: Les trois catégories des équipements selon l'USP (1058)	78
Tableau 6: les principaux requis en matière de rôles et de responsabilités conformément aux GMP, à l'USP <1058> et à l'Annexe M3 du GAMP 5 (56) :	80
Tableau 7: Profondeur des tests réalisés en fonction du niveau GxP	84
Tableau 8: Les enjeux de la stratégie de qualification	94
Tableau 9: Les éléments de la qualification de conception et ses exemples	96
Tableau 10/ Les paramètres des test et critères d'acceptation de la QO	99
Tableau 11: Normes OQ / PV requises pour tout Détecteur UV série 1100/1200 :	127
Tableau 12: Conditions préalables spécifiques aux tests	128
Tableau 13: Les équipements de test	129
Tableau 14: Limites d'acceptation définies du test de précision de débit	130
Tableau 15: Conditions de Précision de la température du compartiment à colonnes	130
Tableau 16: Équipement du test de Précision de la température du compartiment à colonnes	131
Tableau 17: Limites d'acceptation définies Précision de la température du compartiment à colonnes	131
Tableau 18 : Conditions Précision de la longueur d'onde - VWD	132
Tableau 19: Équipement du test de Précision de la longueur d'onde - VWD	132
Tableau 20: Maximum et minimum définis pour la solution de caféine	133
Tableau 21: Limites d'acceptation définies de Précision de la longueur d'onde - VWD	133
Tableau 22: Conditions d' Holmium	134
Tableau 23: Longueurs d'onde des maximums définis d' Holmium	135
Tableau 24 : Conditions du test de Stabilité du bruit / de la température	135
Tableau 25: Limites d'acceptation définies du Stabilité du bruit / de la température	136
Tableau 26: Conditions du test de Précision d'injection / caryover	137
Tableau 27 : Équipement de test de Précision d'injection / caryover	137
Tableau 28 : Conditions du test de linéarité de la réponse	139
Tableau 29: Équipement du test de linéarité de la réponse	139
Tableau 30: Conditions du test de gradient	140
Tableau 31: Équipement de test de gradient	143
Tableau 32: Conditions du test de gradient- Canaux C / D	146

Tableau 33: Équipement du test de gradient- Canaux C / D	148
Tableau 34: Limites d'acceptation définies du test de gradient- Canaux C / D	150
Tableau 35: Les résultats des tests de débit	152
Tableau 36: Résultats du test de Précision d'injection/carryover	161
Tableau 37: Resultats du test de gradient de concentration	162

LISTE DES ABREVIATION

AAPS: American Association of Pharmaceutical Chemists

AMM : autorisation de mise sur marché

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament

AS ; Facteur de symétrie

ASTM: American Society for Testing and Materials

BPF : bonnes pratiques de fabrication

CCM : Chromatographie sur couche mince

CE : l'électrophorèse capillaire

CPG : chromatographie phase gazeuse

DAD : **D**é**t**ecteur Autonome Déclencheur /**d**é**t**ecteur à barrette de diodes

DI : diamètre interne

FAT/SAT:Factory Acceptance Test / Site Acceptance Test

FDA : Food and Drug Administration

FIP : International Pharmaceutical Federation

GAMP: Good AutomatedManufacturing Practices

GMP: Good Manufacturing Pratices

GxP: Good x Practices

HEPT = Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique

HILIC : Chromatographie d'interaction hydrophile

HPLC : chromatographie liquide haute performance

ICH: International Conference on Harmonization

ISO: International Organization of Standardization

ISPE: International Society for Pharmaceutical Engineering

KC = coefficient de distribution à l'équilibre (ou constante de distribution),

L : Longueur de la colonne

LC : chromatographie liquide

LSC : chromatographie liquide solide

MWD : **détecteur** de longueurs d'ondes multiples

N : nombre apparent de plateaux théoriques de la colonne

ODS : groupement diméthyl-octadécylsilane

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PASG: Pharmaceutical Analytical Science Group

PC : Chromatographie sur papier

PDA : Détecteur à barrette de diodes

PDV : Plan Directeur de Validation

PEEK : polyétherétherkétone

PSC : la phase stationnaire chirale

QC : qualification de conception

QI : qualification d'installation

QO : qualification opérationnelle

QP : qualification de performance

RSD : Relatif standard déviation = Répétabilité Sr

SFC : Chromatographie fluide supercritique

SI: Systeme international

SST : System Suitability Test (test de compétence du système)

TCC : Le compartiment à colonnes thermostaté Agilent est un compartiment à colonnes pour CPL à régulation thermostatique. Il existe sous la forme d'un module indépendant ou intégré à un système Agilent. Il est utilisé pour le chauffage et le refroidissement afin d'optimiser la reproductibilité des temps de rétention

TCS : Test de conformité de système .

USP : l'United States Pharmacopiea

UV : ultra-violet

VM = volume de la phase mobile

VR : volume de rétention

VS = volume de la phase stationnaire,

VWD : variable waevlength detector/ **Détecteur** à longueur d'onde variable

ZAC : Zones à Atmosphère Contrôlées

4Q = c'est-à-dire les quatre étapes de la qualification (qc+qi+qo+qp)

21 CFR part 11 de FDA : code of federal régulation title 21 (code électronique des règlementation fédéral)

Liste des indices

tR : temps de rétention

Dm : Coefficient de distribution massique

tM : temps (ou volume) de rétention ou distance sur la ligne de base entre le point d'injection et la perpendiculaire abaissée du maximum du pic correspondant à un composant non retenu (« hold-up time »)

tt= temps (ou volume) de rétention ou distance sur la ligne de base entre le point d'injection et la perpendiculaire abaissée du maximum du pic correspondant à un composant ayant accès à tous les pores de la phase stationnaire

wh= largeur du pic à mi-hauteur

Rs : résolution

« r » : La rétention relative

rG : La rétention relative non ajustée

α : La sélectivité

tf : Facteur d'asymétrie (ou facteur de trainé)

n : Nombre des valeurs individuelles

K' : Facteur de capacité

yi : Valeurs individuelles (surfaces ou hauteurs de pic ou rapport de surface pour méthode d'étalon).

\bar{y} : Moyenne des valeurs individuelles.

Svt : souvent

Qqs : quelques

GLOSSAIRE

VALIDATION : l'Etablissement de la preuve, en conformité avec les principes de bonnes pratiques de fabrication, que la mise en œuvre ou l'utilisation de tout processus, procédure, matériel, matière première, article de conditionnement ou produit, activité ou système permet réellement d'atteindre les résultats escomptés

QUALIFICATION Vérification du bon fonctionnement d'un appareil, à savoir s'il est capable de produire les résultats pour lesquels il est conçu tout au long de sa vie.

ADSORPTION : est un phénomène de surface par lequel des molécules de gaz ou de liquides se fixent sur les surfaces solides des adsorbants. Les molécules ainsi adsorbées constituent l'adsorbat.

CHROMATOGRAPHIE : est une technique permettant de séparer plusieurs constituants d'un mélange en les faisant migrer, sur une phase immobile, par une phase liquide ou gazeuse.

PRECISION : La précision signifie être en mesure d'obtenir la même réponse pour un échantillon particulier à chaque fois, lorsque nous répétons une analyse sur cet échantillon.

ELUANT : Solvant frais employé en chromatographie en phase liquide pour séparer un corps absorbé sur un support. L'**éluant** peut-être un mélange d'eau et d'éthanol.

SENSIBILITE : En analyse qualitative c'est la quantité minimale d'une substance nécessaire pour obtenir un spectre de masse interprétable.

PHASE INVERSE : 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 polaire (Acétonitrile ACN), Méthanol, H₂O)

PHASE MOBILE : Les molécules à séparer sont entraînées par un fluide (liquide) que l'on appelle la phase mobile

PHASE STATIONNAIRE : un support (ou matrice) fixe (un solide ou un liquide fixé) de fine granulométrie.

TEMPS DE RETENTION : est le temps au bout duquel un composé est élué de la colonne et détecté), caractérise qualitativement une substance.

DESORPTION : consiste alors à remettre, à l'aide d'un éluant approprié, la substance en solution par rupture des liaisons précédentes.

DES COMPLEXES DIASTEREOISOMERES : sont des molécules qui ont le même enchaînement d'atomes, mais qui ne sont ni superposables, ni image l'une de l'autre dans un miroir.

ACIER INOXYDABLE : couramment appelé **acier inox** ou **inox**, est un acier avec plus de 10,5 % de chrome, dont la propriété est d'être peu sensible à la corrosion et de ne pas se dégrader en rouille.

BARBOTAGE : le passage d'un gaz chimiquement inerte à travers un liquide.

STATOR : est la partie fixe d'une machine rotative et la partie rotative dite rotor

Colonne baptisées narrow-bore : un type de colonne standard

REPETABILITE : Fidélité obtenu dans la condition dans laquelle, les résultats sont obtenus par la même méthode sur des échantillons d'essais identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur et avec du matériel identique.

Résolution chromatographique

INDICE DE REFRACTION : est une grandeur sans dimension caractéristique d'un milieu, décrivant le comportement de la lumière dans celui-ci ; il dépend de la longueur d'onde de mesure mais aussi des caractéristiques de l'environnement (notamment pression et température)

CONSTANT DIELECTRIQUE : ou *constante électrique*, également nommée *permittivité du vide* ou encore *permittivité diélectrique du vide*, est une constante physique. Elle est notée par ϵ_0

CONDUCTIVITE : ou **conductibilité** ; caractérise la capacité des matériaux à diffuser la chaleur, conduire l'électricité ou laisser passer un fluide, sous l'effet d'un gradient de température, de potentiel ou de pression.

POLAROGRAPHIE : est une forme particulière de la voltampèremètre qui utilise comme électrode de travail une électrode à gouttes tombantes de mercure (en) et dans laquelle la solution n'est pas agitée.

FLACON VIAL : matériel de laboratoire sous forme de flacon remplie d'échantillon

REQUALIFICATION : Vérification à fréquence appropriée selon des

TESTES REGLEMENTAIRES : Ce sont des **textes** émanant directement ou indirectement du pouvoir législatif.

CARRY-OVER : Test de dosage de traces résiduelles.

BRUIT DE FOND : En traitement du signal, on appelle bruit de fond toute composante non désirée affectant la sortie d'un dispositif indépendamment du signal présent à son entrée.

Teste d'holmium : test utiliser pour la qualification de la longueur d'onde de détecteur d'équipement type HPLC

ChemStation : Système informatisé qui est utilisé par l'équipement HPLC Agilent 1100/1200

ASTM : **ASTM International** est un organisme de normalisation qui rédige et produit des normes techniques concernant les matériaux, les produits, les systèmes et les services. Il a été fondé en 1898 aux États-Unis sous la direction de Charles Benjamin Dudley. Il portait alors le nom de *American society for testing material* (société américaine pour les essais des matériaux).

Introduction générale

Introduction générale

Dans l'industrie pharmaceutique, la mise sur le marché d'un produit de haute qualité nécessite une maîtrise parfaite des différentes étapes de la vie d'un médicament.

La qualité d'un produit regroupe ses facteurs intrinsèques, physico-chimiques et microbiologiques, mais également extrinsèques tels que le conditionnement ou les conditions de stockage et de distribution.

Il existe pour chaque étape, de la fabrication à la distribution, de nombreux contrôles en cours de production ainsi que des analyses sur le produit fini permettant de vérifier que les critères qualitatifs d'un produit ont été respectés. L'ensemble de ces données prouve a posteriori la conformité du produit.

Ces nombreux essais effectués au niveau du laboratoire de contrôle qualité avec différentes méthodes d'analyse.

Nous sommes particulièrement intéressées à la Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) qui est une méthode de séparation de plus en plus utilisée en industrie pharmaceutique de par sa vitesse d'exécution, son grand pouvoir de résolution et son aptitude à analyser de manière qualitative et quantitative de faibles quantités d'échantillons. Les résultats sont faciles à lire et les tests aisément reproduits via le processus automatisé. Aussi, afin de prouver que le système chromatographique fonctionne correctement au moment de l'analyse, on doit être sûre que la méthode est validée et l'équipement d'HPLC est qualifié.

La validation et la qualification sont des pratiques démontrant par une série de tests que les procédés de production, de stockage ou de distribution permettront d'assurer au produit un haut degré de qualité.

La validation et la qualification sont devenues incontournables lors de la mise en place d'un nouveau procédé ou lors d'une modification impactant fortement le procédé déjà établi. La validation démontre la robustesse du procédé avant sa mise en place alors que la qualification, également appelée validation d'équipement, prouve la fiabilité d'un équipement à délivrer un

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

résultat conforme. Ces deux pratiques sont étroitement liées et les équipements utilisés dans un procédé doivent être qualifiés avant que celui-ci ne soit validé.

Dans le cadre de la réalisation de notre projet de fin d'étude nous a proposé de faire une étude concernant la qualification d'un équipement type HPLC

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Première partie : Etude bibliographique

-Chapitre I :
Chromatographie en phase
liquide haute performance
HPLC

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

1 -Chapitre1 : Chromatographie en phase liquide haute performance HPLC

1.1 Historique :

La Chromatographie comme méthode physico-chimique pour la séparation du complexe mélanges a été découvert au tout début du XXe siècle par Le botaniste russo-italien MS Tswet. Dans son article « Sur la nouvelle forme de phénomène d'adsorption et son application à l'analyse biochimique » présenté le 21 mars 1903 à la réunion ordinaire de la section de biologie de la Varsovie Société des sciences naturelles, Tswet a donné une description très détaillée des phénomènes récemment découverts de séparation par adsorption de mélanges complexes, qu'il a appelé plus tard « chromatographie » comme une translittération du grec « Ecriture couleur ». Par hasard, la signification du mot russe « Tswet » signifie en fait la couleur.

Bien que dans toutes ses publications, Tswet ait mentionné que l'origine du nom de sa nouvelle méthode était basée sur l'image colorée de sa première séparation de pigments végétaux, il a involontairement porté son propre nom au nom de la méthode qu'il a inventée.

La méthode chromatographique n'a pas été appréciée par les scientifiques de l'époque de la découverte, ainsi qu'après presque 10 ans lorsque LS Palmer aux États-Unis et C. Dhery en Europe a publié indépendamment la description d'un processus de séparation similaire. Vingt-cinq ans plus tard, en 1931, Lederer a lu le livre de LS Palmer et a trouvé plus tard une publication originale de MS Tswett, et en 1931 il (ensemble avec Kuhn et Winterstein) ont publié un article sur la purification de xanthophylles sur CaCO₃ colonne d'adsorption suivant la procédure décrite par MS Tswet. En 1941, AJP Martin et RLM Synge à l'Université de Cambridge, au Royaume-Uni ont découvert la chromatographie de partition pour laquelle ils ont obtenu le Prix Noble en 1952. La même année, Martin et Synge ont publié un article qui, avec l'article d'AT James et AJP Martin, jeté une base solide pour la croissance rapide des techniques chromatiques sous forme de chromatographie en phase gazeuse et partiellement en couche mince et liquide – liquide chromatographie.

Renaissance de la chromatographie liquide dans sa modernité forme et sa croissance

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

extrêmement rapide en avaient fait la principale technique du XXI^e siècle qui peut être attribuée partie aux travaux pionniers du Prof. C. Horvath à l'Université de Yale.

Au milieu des années 60 Prof. Horvath, qui a précédemment travaillé sur le développement d'une poreuse colonne tubulaires ouvertes à couches pour la chromatographie en phase gazeuse, avait décidé d'utiliser pour chromatographie liquide petites billes de verre avec une couche poreuse sur leur surface pour faciliter le transfert de masse entre la phase liquide et la surface.

Colonnes emballées avec ces billes a développé une résistance significative au flux liquide, et le professeur Horvath a été graphiques qui bientôt suivi. La chromatographie a été découverte par Tswet sous forme de chromatographie liquide-solide (LSC), mais son développement s'est poursuivi pendant plus de 50 ans principale montrait de construire un instrument permettant le développement d'un écoulement continu du liquide à travers la colonne.

C'était l'origine de la chromatographie liquide haute performance (HPLC), et le nom de cette méthode de séparation a été introduit par le professeur Horvath en 1970 à la vingt et unième Conférence de Pittsburgh à Cleveland. La première séparation sur une surface chimiquement modifiée avec un l'éluant, qui a plus tard obtenu le nom de « phase inversée », a également été inventé par Horvath, il a démontré la première séparation en phase inversée de acides gras sur billes de verre pelliculaire recouvertes de noir de carbone graphitées. [1]

1.2 Définition

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) est une technique largement utilisée pour l'analyse des produits pharmaceutiques, des biomolécules, des polymères et de nombreux composés organiques et ioniques. La chromatographie liquide (LC) est une technique de séparation physique menée entre deux phases une phase solide et une phase liquide. Un échantillon est séparé en son constituant composants (ou analytes) en les distribuant (par partitionnement, adsorption ou autres interactions) entre la phase mobile (un liquide qui coule) et une phase stationnaire solide (sortants emballés à l'intérieur d'une colonne).

Par exemple, le liquide qui s'écoule peut-être un solvant organique tel que l'hexane et la phase

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

stationnaire peut être les particules de silice poreuses emballées dans une colonne. HPLC est une forme moderne de LC qui utilise des colonnes de petites particules à travers lesquelles la phase mobile est pompée à haute pression. [2]

1.3 Principe :

La chromatographie en phase liquide sous haute performance est une méthode de séparation qui fait sensiblement appel aux mêmes éléments de base que ceux employés pour la chromatographie classique sur colonne, soit un ou plusieurs solvants liquides constitue(nt) la phase mobile et une colonne remplie avec une phase stationnaire. [3]

Cependant, au lieu que le solvant passe à travers la colonne sous le seul effet de la force de gravité prenant plus de temps pour éluer, en HPLC la durée d'élution est plus courte et est obtenue par l'application d'une pression élevée de l'ordre de 100 bars grâce à une pompe qui maintient constant le débit du liquide. La méthode est hautement automatisée et extrêmement sensible. [3] [4]

Les molécules à séparer sont entraînées par un fluide (liquide) que l'on appelle la phase mobile. Elles interagissent ou au contraire n'interagissent pas avec un support (ou matrice) fixe (un solide ou un liquide fixé) que l'on appelle la phase stationnaire de fine granulométrie. Cette caractéristique de la phase stationnaire permet une meilleure séparation des composants. [3]

En effet, pour un même volume de phase stationnaire, la surface d'échange augmente si les « grains » qui la composent sont du diamètre plus petit. Les pics obtenus sont plus étroits, donc la résolution est améliorée (les pics sont bien séparés, on peut donc bien les différencier), le seuil de détection est également plus bas (des pics étroits et hauts sont plus faciles à isoler du bruit de fond que des pics larges et bas).[3]

La combinaison de ces attributs - rapidité et résolution élevées - conduit à l'appellation « haute performance ».[3]

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Il y a donc une distribution ou partition des composants entre ces deux types de phases. Le flux du fluide vecteur étant continu, c'est la rétention plus ou moins longue des différentes molécules sur le support fixe, qui va les séparer les unes des autres [3].

Ainsi, sous certaines conditions dynamiques chaque composant du mélange atteint un équilibre de distribution en fonction de son affinité pour les deux phases et /ou de sa taille moléculaire. Il en résulte le déplacement des composés à différentes vitesses et c'est le détecteur placé à la sortie de la colonne, couplé à un enregistreur qui permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme. [5]

En effet, il dirige sur un enregistreur un signal constant appelé ligne de base en présence de la phase mobile seule, par la suite ; au passage de chaque soluté séparé il conduit dans le temps à l'enregistrement d'un pic. [5]

Dans des conditions chromatographiques données, le "temps de rétention" (temps au bout duquel un composé est élué de la colonne et détecté), caractérise qualitativement une substance. L'amplitude de ces pics, ou encore l'aire limitée par ces pics et la prolongation de la ligne de base permettent de mesurer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté. [5]

1.4 Mécanismes séparatifs de la chromatographie liquide haute performance (HPLC) :

1.4.1 Chromatographie de partage :

La séparation dépend des différences de solubilité des solutés dans la phase mobile et des différentes interactions des solutés avec les groupements organiques greffés sur la phase stationnaire. L'affinité de chaque constituant pour la phase stationnaire dépend de sa solubilité dans cette phase et de sa polarité. Les forces qui entrent en jeu sont donc les forces de Vander Waals, les ponts hydrogène... etc. C'est la technique de chromatographie liquide la plus utilisée, elle fonctionne donc par partage de solutés entre deux phases non miscibles. Ce mécanisme est surtout utile pour la séparation de molécules très polaires de masses molaires inférieures à 3000g/mol (composés non-ioniques).

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Il existe deux types de chromatographie de partage selon la polarité des phases stationnaires et mobiles [6] [4] :

1) Chromatographie de partage sur phase normale :

La phase normale est constituée du gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire [4]. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaires qui sortent en tête.[7] [8]

L'inconvénient d'une telle phase, est la détérioration rapide au cours du temps du gel de silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations.[8]

2) Chromatographie de partage sur phase inverse :

La phase inverse est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18) [16] Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (Acétonitrile (ACN), Méthanol, H₂O). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier.[4] [8] [9]

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 [8].

Les silices greffées conduisent en général à une perte importante de polarité. Avec une phase greffée, l'ordre d'éluion est opposé à celui auquel on est habitué avec les phases normales [8].

Ainsi, avec un éluant polaire, un composé polaire migre plus vite qu'un composé apolaire. Dans ces conditions les hydrocarbures sont fortement retenus. On réalise des gradients d'éluion en diminuant au cours de la séparation la polarité de l'éluant (ex : mélange eau /acétonitrile dont la concentration en acétonitrile va en croissant au cours de l'éluion). On peut en mélangeant plusieurs solvants, ajuster le pouvoir d'éluion de la phase mobile [8].

Le tableau ci-dessous présente quelques exemples de la composition des phases mobiles et stationnaires dans la chromatographie de partage en phase inverse et en phase normale :

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Tableau 1:: Composition des phases mobiles et stationnaires dans la chromatographie de partage en phase inverse et en phase normale [8].

Phase	Phase inversée	Phase normale (classique)
Phase stationnaire	Non polaire ex. - silice greffée par une chaîne alkyle ou phényle Polaire	Polaire ex. - C ₃ H ₆ NH ₂ - C ₃ H ₆ N(CH ₃) ₂ - diol
Phase mobile	Polaire ex. - eau - méthanol - acétonitrile - tétrahydrofurane	Non polaire Ex . - n-hexane - chloroforme - éther

Le pouvoir d'éluion des solvants diffère selon le type de chromatographie de partage (en phase inverse ou en phase normale), comme l'illustre le tableau suivant :

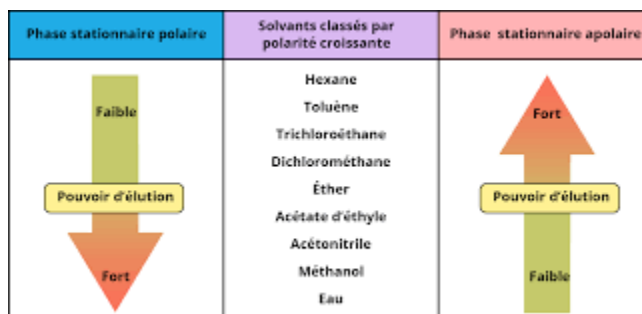


Figure 1 : Classification des solvants selon leur polarité et leur pouvoir d'éluion dans la chromatographie de partage en phase inverse et en phase normale [10] [11].

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

1.4.2 Chromatographie d'exclusion :

Ce type de chromatographie est encore appelé : tamisage moléculaire, gel filtration ou perméation de gel.

Cette technique permet la séparation des molécules en fonction de leur taille (leur volume hydrodynamique), de leur forme et poids moléculaire. Elle est notamment utilisée pour évaluer la distribution des volumes hydrodynamiques dans un échantillon de polymères.

On utilise pour cela des granules de gel poreux [4]. Les molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues et sont donc éluées les premières, au niveau du volume mort (V_m ou V_0). Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car induites dans le gel, leur migration est freinée [12]. Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse de leurs masses moléculaires comme l'illustre la figure suivante :

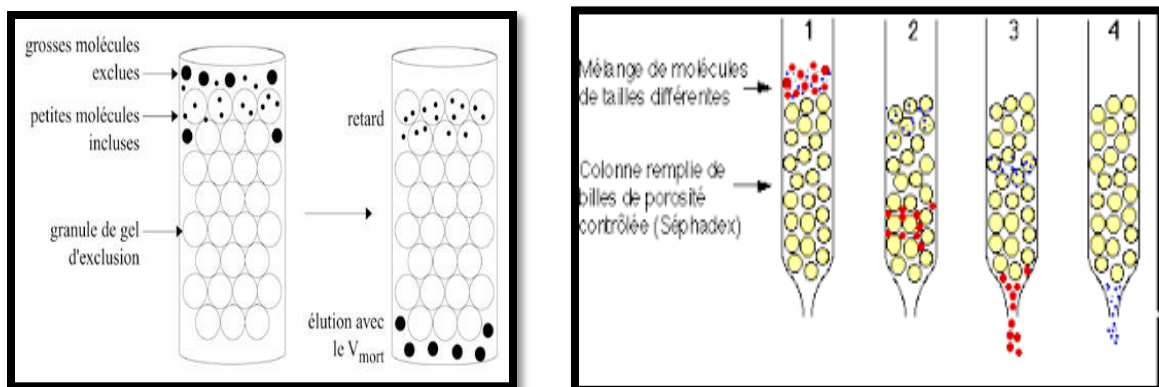


Figure 2 : Principe de la chromatographie d'exclusion [13].

1.4.3 Chromatographie d'adsorption :

C'est la première chromatographie réalisée : séparation des pigments végétaux par adsorption sur de la craie [4]. Cette chromatographie est basée sur la mise en jeu d'un phénomène physico-chimique : l'adsorption qui consiste en la fixation d'une substance à l'état liquide sur une surface solide [8].

Ce phénomène fait intervenir des forces complexes entre le soluté et l'adsorbant : forces électrostatiques, forces inductives, forces de liaisons hydrogènes, forces de transfert de

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

charges et autres. Mais pour que cette adsorption soit utilisable à des fins séparatives, il faut que cette fixation soit réversible comme l'illustre la figure 2.8 ci-dessous. La désorption consiste alors à remettre, à l'aide d'un éluant approprié, la substance en solution par rupture des liaisons précédentes. Des relations d'équilibre règlent les interactions réciproques [8].

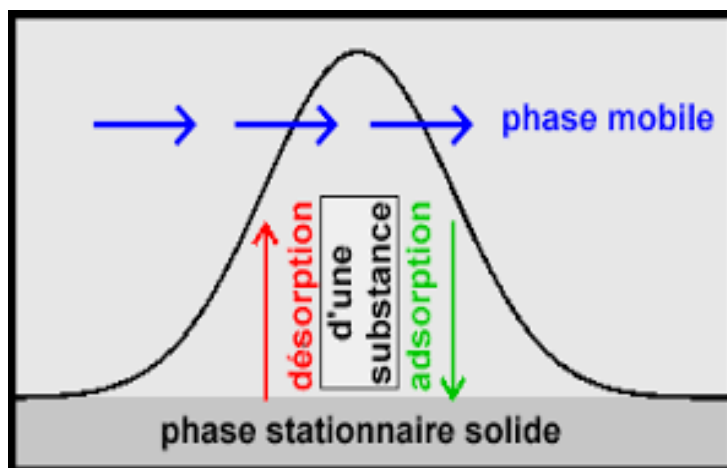


Figure 3: Adsorption et désorption dans la chromatographie d'adsorption [8].

Chacun des solutés est soumis à une force de rétention (par adsorption) et une force d'entraînement par la phase mobile. L'équilibre qui en résulte aboutit à une migration différentielle des solutés de l'échantillon à analyser, ce qui permet leur séparation [14].

Le schéma ci-après résume les interactions entre le soluté, le solide adsorbant et l'éluant :

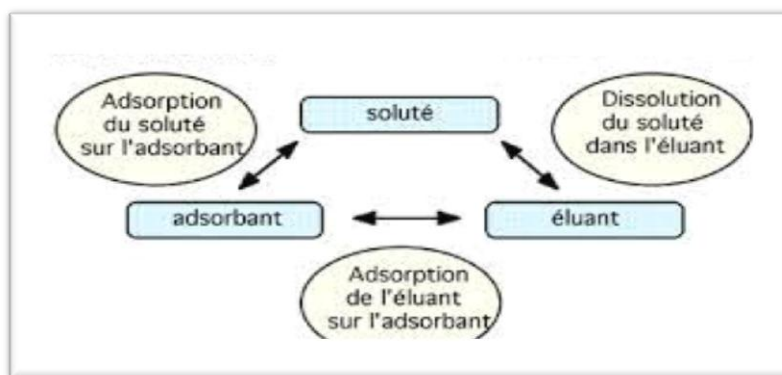


Figure 4: Interactions entre soluté-solide adsorbant- éluant dans la chromatographie d'adsorption [14].

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

1.4.4 Chromatographie échangeuses d'ions :

Appelée chromatographie à ions ou chromatographie échangeuse d'ions, il s'agit d'un type de chromatographie en phase liquide permettant d'isoler une substance chargée électriquement (ionique) d'un mélange de molécules chargées (liquide). Pour cela, on fait passer le mélange sur une phase stationnaire chargée, déjà associée à des ions connus. Ces ions sont remplacés par les ions/molécules chargés du mélange à séparer. Elle est basée sur l'affinité que les ions en solution ont pour les ions de charge opposée de la phase stationnaire. Cette phase stationnaire est généralement une résine sur laquelle sont liés chimiquement des groupements ioniques. La phase mobile est une solution aqueuse tamponnée dans laquelle se trouvent les ions possédant les charges opposées à celles de la phase stationnaire. La rétention sur la colonne est dictée par la compétition qui existe entre le soluté et le contre-ion pour le site ionique. C'est une technique chromatographique couramment utilisée en chimie analytique, notamment pour le contrôle de la qualité de l'eau [3] [15].

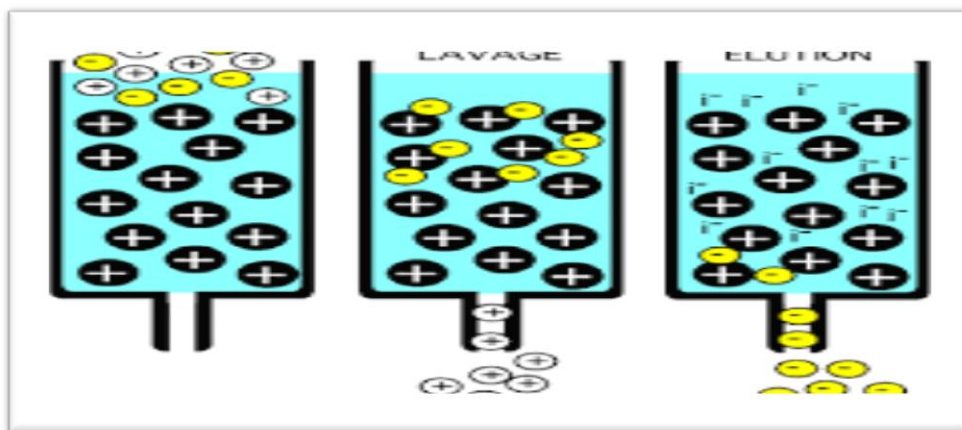


Figure 5: Principe de la chromatographie échangeuse d'ions [16].

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

1.4.5 Chromatographie chirale :

La chromatographie chirale est une technique très importante pour l'étude des molécules chirales grâce à la séparation analytique des énantiomères [12].

Elle permet au niveau analytique de mesurer des excès énantiomériques, et au niveau préparatif d'isoler des énantiomères purs [12].

Elle consiste en la formation de liaisons non covalentes entre les énantiomères du substrat et l'absorbant chromatographique chiral donnant des complexes diastéréoisomères ayant des affinités de liaisons différentes [12].

Dans cette technique, le mélange racémique à séparer est introduit et va interagir avec la phase stationnaire chirale (PSC). L'obtention de la séparation des énantiomères passe par la formation réversible de complexes diastéréoisomères dans la colonne de chromatographie (par liaison de van Der Waals entre les solutés que l'on veut séparer et le sélecteur chiral).

L'intérêt est que les complexes diastéréoisomères ainsi formés possèdent des propriétés physiques différentes ; ainsi l'un des isomères sera plus accroché que l'autre et migrera donc plus lentement, permettant leur séparation physique [12].

A l'heure actuelle, parmi les nombreuses méthodes de discrimination chirale, l'HPLC représente une technique de choix pour la purification et la quantification d'énantiomères.

En effet, outre le fait qu'elle allie à la fois rapidité, efficacité et sensibilité, elle permet également la séparation de composés chiraux sur des phases stationnaires chirales ou après addition de réactifs chiraux à la phase mobile [11] [12].

Outre les quatre principaux modes de séparation HPLC, plusieurs autres souvent rencontrés en HPLC ou des techniques apparentées sont indiqués ci-dessous.

Chromatographie affinité 9 : Basé sur une interaction (récepteur / ligand) dans laquelle des ligands immobilisés (enzymes, antigènes ou hormones) sur des supports solides sont utilisés pour isoler des composants sélectionnés à partir d'un mélange. Les composants conservés peuvent ensuite être libérés à l'état purifié.

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC) 9 : Ceci est quelque peu similaire à la chromatographie en phase normale utilisant une phase stationnaire polaire telle que la silice ou des matériaux d'échange d'ions mais éluée avec un mobile polaire

QUELQUES COROLLARIES DE SENS COMMUN 11 phases de solvants organiques et tampons aqueux. Il est le plus couramment utilisé pour séparer les analytes polaires et les peptides hydrophiles.

Chromatographie d'interaction hydrophobe 4,9 : Analogue au RPC, sauf que des phases mobiles de faible teneur en solvant organique et de fortes concentrations de sel sont utilisées pour la séparation de protéines qui sont facilement dénaturées par des phases mobiles avec des concentrations élevées de solvants organiques utilisés dans le RPC.

Électro chromatographie : Utilise l'électrophorèse capillaire 17 (CE) avec une colonne HPLC capillaire garnie. La phase mobile est entraînée par la force électromotrice d'une source haute tension par opposition à une pompe mécanique. Il est capable d'une très grande efficacité.

Chromatographie fluide supercritique (SFC) 18 : Utilise des colonnes à garnissage HPLC et une phase mobile de fluides supercritiques sous pression (c'est-à-dire du dioxyde de carbone modifié avec un solvant organique polaire). Utile pour les analytes non polaires et les applications préparatives où les matériaux purifiés peuvent être récupérés facilement par évaporation du dioxyde de carbone. Les pompes HPLC et les détecteurs de type GC sont souvent utilisés.

Autres formes de chromatographie liquide basse pression :

- Chromatographie sur couche mince (CCM) 19 utilise des plaques de verre recouvertes d'adsorbants et l'action capillaire comme force motrice. Utile pour le dépistage d'échantillons et l'analyse semi-quantitative.

- Chromatographie sur papier (PC), une forme de chromatographie de partition utilisant le papier comme phase stationnaire et l'action capillaire comme force motrice.

- La chromatographie flash, technique de purification d'échantillons utilisant des colonnes NPC en verre jetables et une phase mobile entraînée par des pompes à pression de gaz ou à basse pression. [17]

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

1.5 Appareillage :

En raison de sa polyvalence et du vaste domaine de ses applications, la chromatographie liquide haute performance (CLHP ou HPLC) est actuellement la plus utilisée de toutes les techniques de séparation. Le champ d'application de ce type de chromatographie recouvre une grande partie du domaine de la chromatographie en phase gazeuse auquel s'ajoute l'analyse : -des composés thermosensibles, des composés très polaires, ainsi que des composés de masses molaires élevées. [18]

1.5.1 Conception :

Une installation de HPLC comporte divers modules spécialisés qui se présentent dans des boîtiers distincts ou sont intégrés dans un même châssis pour moins d'encombrement. [18]

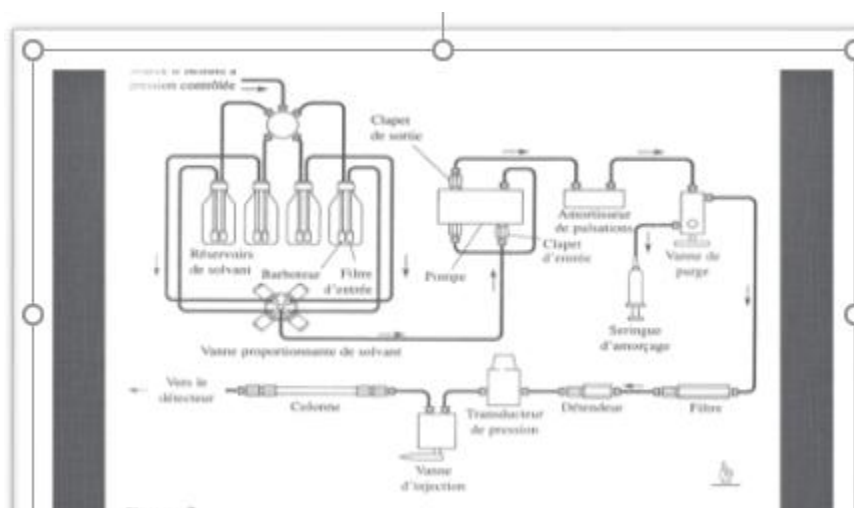


Figure 6: Principe de la chromatographie échangeuse d'ions [16].

Le principe de fonctionnement d'un HPLC consiste à éluer des composés sur une phase stationnaire à l'aide d'une phase mobile en fonction de l'affinité du composé pour les différentes phases. Le système est donc composé :

* Le système de pompage du solvant : comprend les réservoirs à solvant, dégazeur, les pompes à solvant, un atténuateur de pulsations et les valves permettant de choisir la concentration des différents solvants.

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

- * L'injecteur : comprend une seringue qui permet d'aspirer l'échantillon dans une boucle d'injection.
- * La colonne est remplie d'une fine granulométrie, soit des grains de l'ordre du micromètre, et permet la rétention des composés. Servant à la séparation des composés
- * le détecteur est un instrument permettant la quantification du composé élué en donnant un signal de l'intensité en fonction du temps d'éluion.
- * le système informatisé : un micro-ordinateur muni d'un logiciel spécialisé pour l'intégration et l'acquisition des données. [20]

1.5.2 Système de pompage du solvant :

1.5.2.1 Les réservoirs à solvants :

Les appareils HPLC sont équipés d'un ou plusieurs réservoirs de solvant en verre ou parfois en acier inoxydable de contenance d'environ 1 litre, ce qui permet de réaliser un nombre important d'analyses sans interruption. Ces réservoirs sont souvent étanches afin d'éviter l'évaporation des solvants (et ainsi la modification de la composition du mélange) ou leur contamination. [19]

On y adjoint souvent des dispositifs qui permettent d'en éliminer les poussières et les gaz dissous. En effet, ces derniers peuvent former des bulles au sein de la colonne, ce qui cause un élargissement des pics ; en outre, bulles et poussières perturbent le fonctionnement du détecteur. [21]

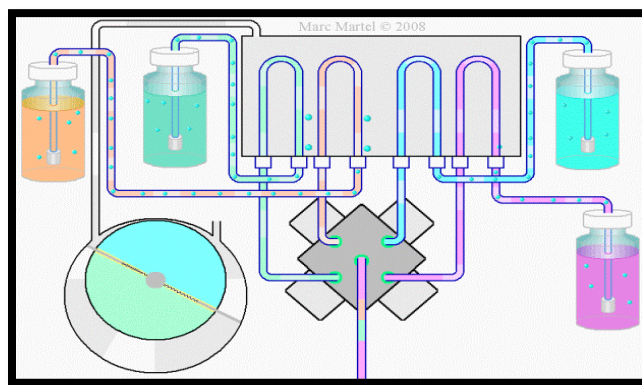


Figure 7: La vanne de mélange et le dégazeur en ligne en fonctionnement. [22]

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

1.5.2.2 Vanne de mélange :

C'est un dispositif, piloté par micro-ordinateur qui permet la délivrance, par unité de temps, de solvants composant la phase mobile en proportion désirée. En pratique, la pompe aspire le débit désiré et 4 vannes reliées aux réservoirs de solvants sont ouvertes pendant un laps de temps correspondant à la proportion désirée de chaque solvant pur dans la phase mobile.[22]

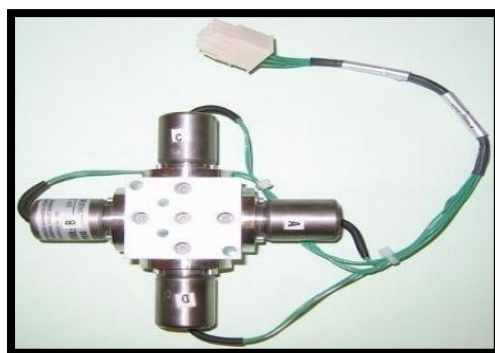


Figure 8: Vanne de mélange d'un HPLC [22]

1.5.2.3 Dégazeur :

Les réservoirs de solvants peuvent être équipés de dispositifs de dégazage (barbotage d'hélium ou mise sous vide) permettant d'éliminer les gaz dissous et en particulier l'oxygène. [19]

Le dégazage peut s'effectuer par barbotage, procédé par lequel les gaz dissous sont chassés de la solution par l'action de fines bulles d'un gaz inerte, insoluble dans la phase mobile. [21]

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

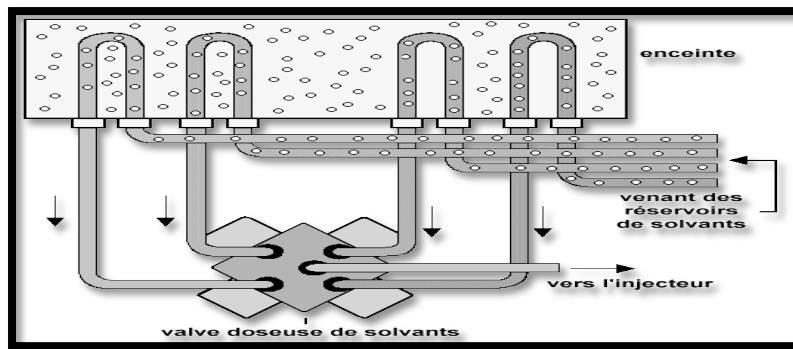


Figure 9: schéma représentatif d'un dégazeur HPLC [15]

Remarque : L'effet de l'oxygène sur l'analyse chromatographique :

L'oxygène est souvent nuisible à l'analyse chromatographique :

*il augmente le risque de dégradation des échantillons et abrège la durée de vie des colonnes car les phases stationnaires sont facilement oxydables.

* il augmente le risque de formation de bulles gazeuses dans le détecteur ce qui conduit à un bruit de fond important et rend l'analyse impossible.

*il diminue le seuil de détection lors d'une analyse par spectroscopie d'absorption à faible longueur d'onde, par fluorimétrie ou par électrochimie.

*il contribue à la corrosion des pièces en contact avec la phase mobile. La corrosion augmentant avec la pression, les pistons et les joints des pompes sont souvent en saphir, agate, Téflon ou en alliages spéciaux.

Il est donc préférable de dégazer les solvants soit par ultrasons soit par barbotage d'hélium soit par filtration avant d'introduire les solvants dans leur réservoir. [19]

1.5.2.4 Les 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). [19]

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

La pompe est constituée d'un piston en saphir synthétique qui se meut au sein d'un cylindre en acier inoxydable muni de deux clapets anti-retours.

Le mouvement de ce piston est piloté par une came en acier inox et par un ressort.

La came pousse le piston pour lui faire expulser le solvant contenu dans le cylindre à travers le clapet de sortie.

Le ressort oblige le piston à suivre la came au cours du mouvement de retour, remplissant ainsi le cylindre de solvant par le clapet d'entrée.

La came est usinée de telle façon que le solvant est expulsé avec un débit constant et que le retour et le remplissage se fassent en un minimum de temps. (22)

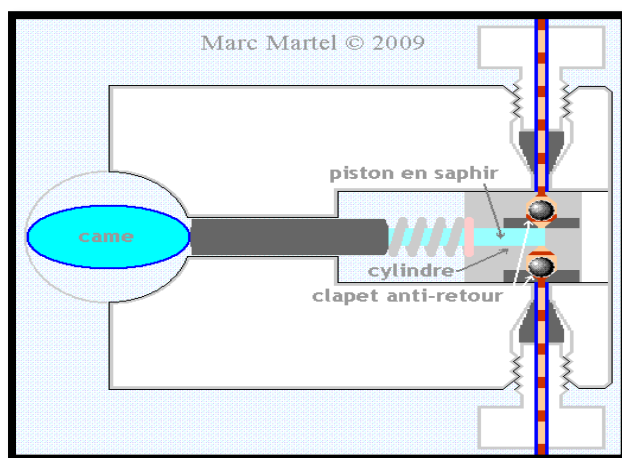


Figure 10: une pompe HPLC

Ce système à deux corps de pompe fonctionnant en alternance a été un des premiers systèmes permettant la délivrance d'un débit constant. (22)

Aujourd'hui grâce aux progrès de l'informatique qui permet de piloter finement la vitesse des pistons dans les corps de pompe et par là de contrôler parfaitement le débit, la plupart des constructeurs ont adopté la configuration suivante ; un corps de pompe suivi d'un réservoir qui permet au mélange de solvants de s'homogénéiser (nous sommes après la vanne de mélange) puis un second corps de pompe délivrant le débit demandé. (22)

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Les plus usuelles permettent d'obtenir des pressions de 420 bars (ou 6000 PSI (1 PSI = 0,07 bar)). [19]

Les pompes doivent répondre à des exigences rigoureuses :

- ① obtention de pressions jusqu'à au moins 420 bars ;
- ② absence de pulsations ;
- ③ débit compris entre 0,1 ml et 10 ml/min ;
- ④ contrôle du débit meilleur que 0,5 % ;
- ⑤ résistance à la corrosion quel que soit le solvant.

[21]

Les pompes sont très onéreuses et interviennent pour une très grande part dans le coût élevé des appareils. [19]

N.B !! Il faut noter que les pressions très élevées engendrées par les pompes HPLC ne présentent aucun danger d'explosion car les liquides ne sont pas très compressibles. La rupture d'une pièce mécanique n'entraîne qu'une fuite de solvant. [19]

La grande majorité des appareils est équipée par des pompes à pistons alternatifs. [19]

1.5.2.4.1 Types des pompes :

Les pompes alternatives : comprennent une petite chambre cylindrique qui se remplit et se vide en fonction du mouvement de va-et-vient d'un piston. Ce mouvement donne naissance à un écoulement pulsé qui doit être amorti. [21]

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

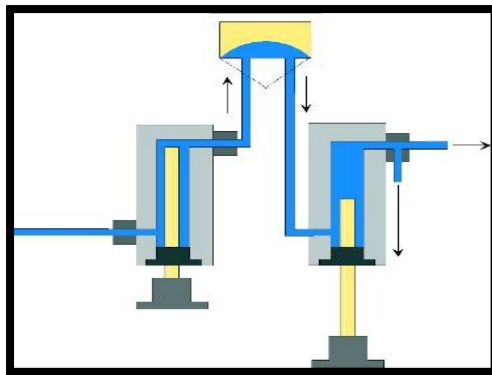


Figure 11: D'UNE POMPE ALTERNATIVE [21]

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 élution,
- *la constance de leur débit qui est pratiquement indépendante de la pression dans la colonne et de la viscosité du solvant.

Afin d'éviter l'écoulement pulsé qui est propre au mouvement de va-et-vient du piston (remplissage-expulsion), les constructeurs ont mis au point **des pompes à deux pistons** qui fonctionnent soit en mode série soit en mode parallèle.

a/ En mode série, le piston amont (piston A) refoule une quantité de solvant deux fois plus importante que le piston aval, soit parce que son diamètre est plus important, soit parce que sa course est plus grande. Les deux pistons sont déphasés : lorsque l'un aspire, l'autre refoule. Dans ce système, pendant que le piston A aspire une quantité d éluant, le piston B refoule la phase mobile dans la colonne. Ensuite, lorsque le piston A refoule l éluant, une partie de ce dernier vient remplir le cylindre du piston B qui règle ainsi le débit nominal et l'autre partie est refoulée dans la colonne. Ces montages nécessitent des vannes en amont et en aval de chaque piston. [19]

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

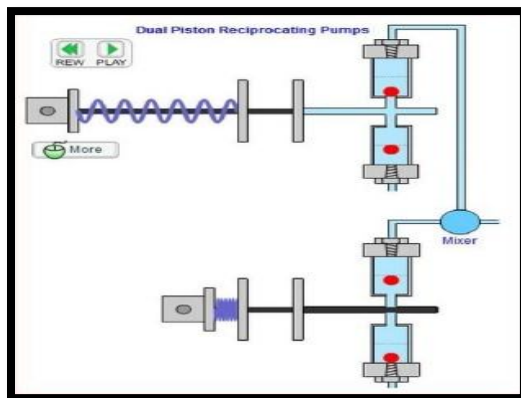


Figure 12: montage à piston double. [19]

b/ en mode parallèle système de pompe est constitué de deux têtes de pompe fonctionnant en opposition permettant d'obtenir un débit de phase liquide sans pulsations.[19]

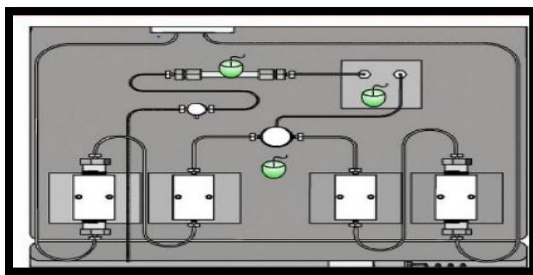


Figure 13:montage à deux tetes de pompe.[19]

Modes de gradient :

Deux modes de gradients peuvent être déduits :

A. / Gradient d'éluant :

L'éluant gradué lors de la séparation de mélanges complexes permet, en modifiant la composition de l'éluant, d'optimiser les facteurs de capacité et de réduire les temps d'analyse. [19]

Les gradients peuvent être réalisés de **deux manières** différentes :

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

01. 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).

02. 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. [19]

La programmation de solvant est destinée à améliorer l'efficacité de la séparation, tout comme la programmation de température en CG. Les appareils modernes de CLHP sont souvent équipés de vannes proportionnelles qui permettent d'injecter les liquides de deux ou plusieurs réservoirs à des vitesses qui varient de manière continue. [21]

B/ Mode isocratique :

Une élution isocratique est une élution au cours de laquelle la composition de la phase mobile n'est pas modifiée au cours du temps.

1.5.3 Le système D'injection :

La solution à examiner est introduite dans la phase mobile qui circule en tête de colonne, ou à proximité de celle-ci, à l'aide d'un système d'injection conçu pour fonctionner à pression élevée. [22]

L'injection d'un volume précis d'échantillon doit se faire en un temps bref afin de perturber le moins possible le régime de circulation de la phase mobile.[18]

On doit injecter rapidement un volume précis sans arrêter l'écoulement du solvant à un endroit où règne une pression élevée.[22]

La difficulté consiste à introduire en tête de colonne un volume d'échantillon là où la pression atteint plusieurs dizaines de bars. [19]

1.5.3.1 Vannes De Remplissage :

Ce type de vannes peut être utilisé soit manuellement soit commandé par un passeur automatique d'échantillons. [19]

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Le remplissage partiel des boucles manuellement, peut entraîner une moindre fidélité du volume injecté. [4]

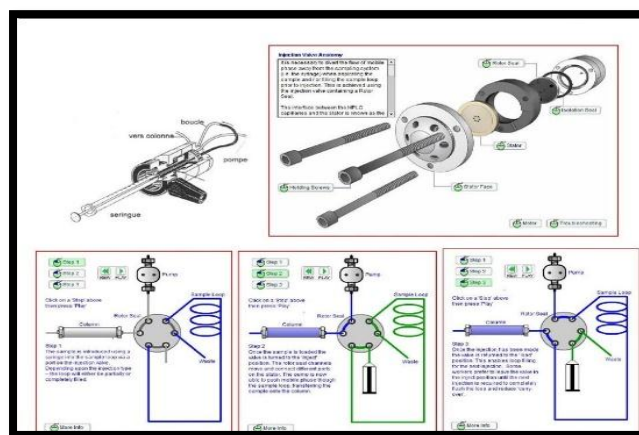


Figure 14: vanne d'injection d'un HPLC [19]

1.5.3.2 Vanne D'injection :

C'est un injecteur à boucles d'échantillonnage. Il existe des boucles de différents volumes, nous utiliserons une boucle de 20 μ l. Le choix du volume de la boucle se fait en fonction de la taille de la colonne et de la concentration supposée des produits à analyser. Le système de la boucle d'injection permet d'avoir un volume injecté constant, ce qui est important pour l'analyse quantitative. [24]

➤ On injecte souvent l'échantillon à l'aide d'une seringue à travers un septum en élastomère ; toutefois, cette procédure n'est pas très reproductible et reste limitée aux pressions ≤ 100 bars. [21]

➤ En injection à écoulement bloqué, on arrête momentanément le flux de solvant, on ouvre un ajustage au-dessus de la colonne et on y injecte l'échantillon à l'aide d'une seringue. la méthode d'introduction emploie des boucles d'échantillonnage. [21]

➤ Ces dispositifs font partie intégrante de l'appareillage de HPLC moderne qui possède des boucles interchangeables permettant de choisir des volumes d'échantillon compris entre 5 et

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

500 μ L. Avec ce système, la reproductibilité des volumes injectés est de quelques dixièmes de %. [21]

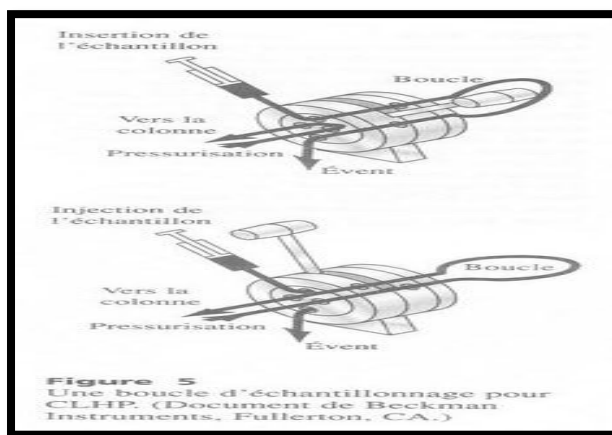


Figure 15 une boucle d'échantillonnage pour HPLC [21]

La vanne d'injection fonctionne en deux temps :

► **En position « Chargement »**, seule la communication entre pompe et colonne est assurée et l'échantillon est introduit dans la boucle à l'aide d'une seringue. La reproductibilité des volumes n'est atteinte que si la boucle a été totalement remplie par l'échantillon. Le volume prélevé est donc toujours largement supérieur à celui de la boucle. [18]

► **En position « Injection »**, l'échantillon est inséré dans le flux de phase mobile par rotation de 60° d'un levier qui permet d'inverser le sens de circulation dans la boucle. [18]

Le type d'injecteur le plus couramment utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe (10, 20, 50 μ L..). Cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne. [25]

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

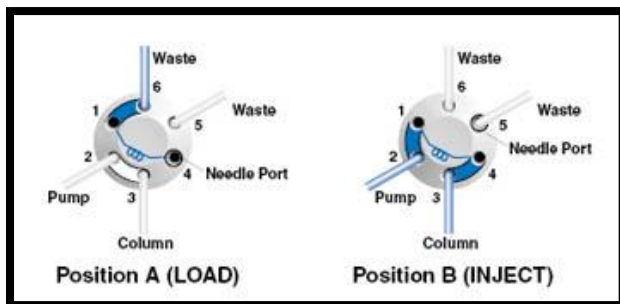


Figure 16: Vanne à boucle d'échantillonnage

N.B !!! L'injecteur et la colonne doivent être adaptés. [19]

1.5.3.3 Boucle D'injection :

Le fait de travailler en phase liquide (difficilement compressible) et à haute pression, ne permet pas d'introduire l'échantillon en jouant sur la compressibilité du milieu comme avec un septum dans le cas de la CPG. Ce problème technique a été résolu en allongeant la longueur de circuit à l'aide d'une boucle d'injection.[22]

La vanne est placée juste avant la colonne. Cette pièce de précision qui doit résister à des pressions pouvant dépasser 300 bars est raccordée à une boucle d'injection de volume précis. Ces boucles sont disponibles avec différents volumes et sont soit externes, soit intégrées dans le corps de la vanne. [18]

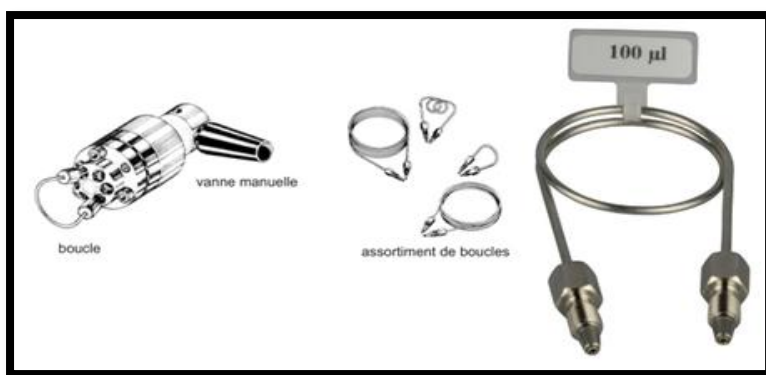


Figure 17 : Vanne d'injection pour HPLC et boucles assorties de différents volumes [19]

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Cette boucle est constituée d'un corps métallique cylindrique statique percé de 6 trous disposés en hexagone régulier et d'une partie mobile portant à sa surface 3 arcs de cercle creusés représentant chacun 1/6 de périmètre du même cercle.

Ces canaux en arcs de cercles permettent de relier deux à deux les 6 trous du stator.[22]



Figure 18: une boucle d'injection d'un HPLC

Les trous sont reliés :

- à la pompe
- à la boucle d'injection (entrée)
- à la connexion de remplissage
- à la sortie (poubelle)
- à la boucle d'injection (sortie)
- à la colonne

Selon la position de la partie mobile on observe 2 cas différents

Boucle 1er cas

La pompe est reliée à la colonne

La connexion de remplissage est reliée à l'entrée de la boucle

La sortie de la boucle est reliée à la poubelle

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Ceci est la position de chargement de la boucle.

2ème cas

La pompe est reliée à l'entrée de la boucle

La connexion de remplissage est reliée à la poubelle

La sortie de la boucle est reliée à la colonne.[22]

Ce système évite les brusques variations de pression dans l'appareil et est d'une grande reproductibilité car il y a peu d'irrégularité dans les injections étant donné que la quantité introduite est obligatoirement celle du volume de la boucle. Les volumes injectés sont fixés par la capacité de la boucle qui a des volumes variables allant du microlitre au millilitre. [19]

Dans ce cas la pompe est reliée à la boucle puis à la colonne. C'est la position d'injection.

Entre ces deux positions, on voit que la longueur de canalisation entre la pompe et la colonne s'est agrandie de la longueur de la boucle et d'un arc de cercle.

L'injection se fait en deux temps : le chargement et l'injection proprement dite. Le chargement de la boucle n'est optimal et reproductible que s'il a été effectué avec un volume d'au moins 5 fois celui de la boucle (Pour une boucle de 20 μ L, le chargement doit être fait avec un volume de 100 μ L minimum de solution).

1.5.4 La Colonne :

Les colonnes d HPLC sont généralement courtes et droites en acier inoxydable 316 capable de résister aux fortes pressions. [19]

La colonne se présente comme un tube, le plus souvent en acier inoxydable, dont la longueur et le diamètre sont différents selon les modèles. [18]

Les colonnes dites « standard » ont un diamètre interne (I.D.) de 4,6 ou 5 mm et une longueur entre 100 et 250 mm Des colonnes de plus faibles diamètres, baptisées narrow-bore (I.D. 2-4 mm), micro bore (I.D. 1-2mm) et capillaires remplies (I.D. 0,1-1 mm) sont apparues

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

suite à l'évolution des phases stationnaires mais surtout pour simplifier le couplage avec la spectrométrie de masse. [18]

La plupart des colonnes ont une longueur de 10 à 25 cm et un diamètre de 4 à 5 mm [19]

Ce type de colonne offre souvent de 40000 à 60000 plateaux/m. [21]

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 μm . Ce type de colonne offre souvent de à plateaux par mètre. Le débit de la phase mobile ne peut dépasser quelques ml/min. [19]

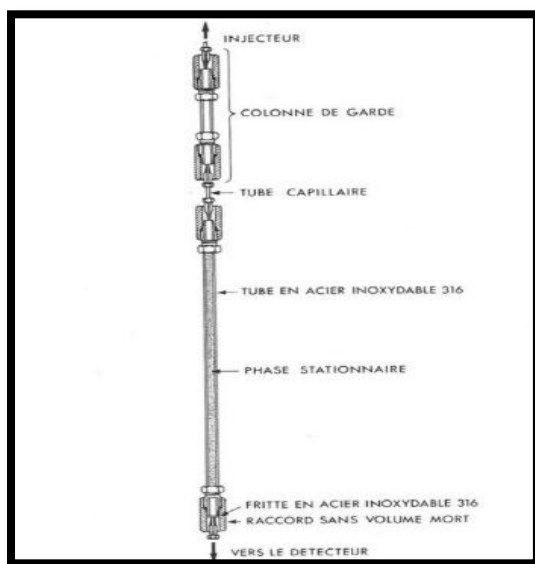


Figure 19: COLONNE HPLC [19]

1.5.4.1 Pré-Colonne (Colonne De Garde) :

La colonne est souvent précédée d'un filtre de porosité inférieure à 0,5 mm et d'une pré-colonne, dite « colonne de garde », courte (0,4 à 1 cm) et remplie de la même phase stationnaire. Ces derniers, doivent être changés régulièrement (périodiquement) car ils retiennent les impuretés et préviennent le colmatage de la colonne. Ils permettent ainsi d'allonger sa durée de vie et de préserver ses performances. [18]

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

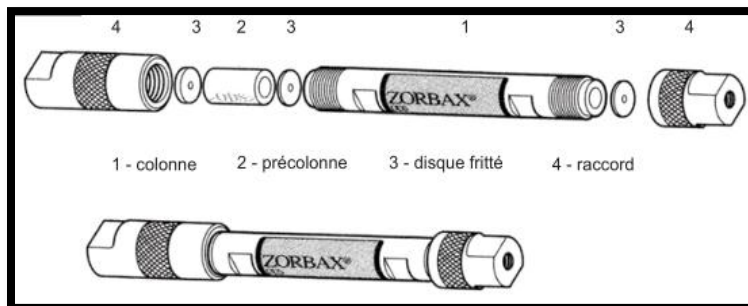


Figure 20: Aspects extérieurs éclaté et assemblé d'une colonne et pré-colonne pour HPLC

[18]

➤ Il existe des micro-colonnes à haute performance qui ont un diamètre intérieur de 1 à 4,6 mm et une longueur de 3 à 7,5 cm. Ces colonnes, remplies de particules de 2 à 5 μm , offrent jusqu'à 100000 plateaux/théorique et présentent les avantages de rapidité et d'une consommation minimale de solvant. [21]

Ces colonnes ont l'avantage :

- * de la rapidité de l'analyse,
- *de consommer moins de solvant (les solvants de haute pureté pour l HPLC sont très coûteux),
- *de conduire à une meilleure résolution de l'analyse (par suite d'une moindre diffusion),
- * de permettre de faire du couplage HPLC/MS. [19]

1.5.4.2 Four A Colonne :

Au cours des mesures, la température ne doit pas varier plus de ± 1 °C. [26]

Une modification de la température de colonne en HPLC modifie en général le temps de rétention et compromet la reproductibilité des résultats. En effet, la constante de rétention est diminuée de 0,5% /°C lorsque le méthanol est utilisé comme solvant et d'environ 0,2% /°C avec l'acétonitrile. Pour pallier à cet inconvénient des fours sont utilisés pour fixer la température de la colonne et permettent à la fois d'améliorer l'efficacité de celle-ci, d'assurer

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

la répétabilité des analyses ou encore d'utiliser la température comme paramètre de séparation (Flanagan,2007).[18]

Lorsque le four à colonne n'est pas disponible, la colonne ne devra pas être placée dans des endroits où elle sera sujette à de grandes variations de températures par exemple directement exposée au soleil ou à proximité d'une fenêtre ou d'un climatiseur. [18]

1.5.5 Phase Stationnaire :

De nombreux types de phases stationnaires sont utilisés en HPLC, notamment :

- De la silice, de l'alumine ou du graphite poreux, utilisé en chromatographie en polarité de phase normale, où la séparation repose sur une adsorption différentielle et/ou une distribution de masse [27] ;
- Des résines ou polymères à groupement acides ou basiques utilisés en chromatographie à échange d'ions, où la séparation repose sur la compétition entre les ions à séparer et ceux de la phase mobile [27] ;
- De la silice ou des polymères poreux utilisés en chromatographie d'exclusion où la séparation repose sur les différences de volumes entre molécules, ce qui correspond à une exclusion stérique [27] ;
- Divers supports chimiquement modifiés préparés à partir de polymères de silice utilisés en HPLC en polarité de phase inversée, où la séparation repose :

Principalement sur le partage des molécules entre la phase mobile et la phase stationnaire [27].

- Des phases stationnaires chimiquement modifiées spéciales, tels que des dérivés de la cellulose ou de l'amylose, des protéines ou des peptides, des cyclodextrines... etc. Pour la séparation des énantiomères (chromatographie chirale) [27].

La surface du support (par exemple les groupes silanols de la silice) est mise en présence de différents réactifs de la famille des silanes, avec lesquels elle réagit en formant

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

par liaison covalente, des dérivés silylés qui occupent un nombre variable de sites actifs de la surface du support [28].

La recherche d'une bonne résolution chromatographique et par conséquent d'une efficacité élevée, a conduit à la création de phases stationnaires de nature et de structure très variées parmi lesquelles, le gel de silice garde une place prépondérante. Lors de la préparation de ce gel par des procédés de polymérisation d'un tétra alcoxysilane au sein d'un liquide et sous l'effet d'une hydrolyse catalysée, un certain nombre de groupements silanols (Si-OH) résistent à la phase finale de déshydratation thermique et confèrent des propriétés catalytiques acides à ce matériau très polaire. [18]

1.5.5.1 Procédé De Préparation Du Gel De Silice :

Pour diminuer la polarité du gel de silice, jugée excessive, on le rend essentiellement hydrophobe en mettant à profit la réactivité des fonctions silanols libres pour fixer des molécules organiques par des liaisons covalentes. Ces phases greffées, dont la faible polarité peut être ajustée avec précision, sont à l'origine de la chromatographie de partage à polarité de phase inversée, utilisée dans quasiment toutes les séparations. [18]

Une fraction des groupements silanols demeure cependant intacte et peut être la cause d'interactions polaires gênantes ou au contraire souhaitée afin d'élargir l'analyse à des composés peu à assez polaires. Les modifications de la surface du gel de silice conduisent à deux types de phases :

1/ Phases monomériques : (10–15 μm d'épaisseur) Obtenues en faisant réagir un monochlorosilane en présence d'une base sur les fonctions silanols de surface. On prépare ainsi les phases classiques RP-8 ou C8 (groupement diméthyl-octylsilane) et RP-18 ou C18 (groupement diméthyl-octadécylsilane, ou ODS). [18]

2/ Phases polymériques : (≥ 25 μm d'épaisseur) On utilise un di- ou trichlorosilane en présence de vapeur d'eau qui provoque une polymérisation en solution du réactif avant dépôt et greffage sur la silice. On obtient ainsi une couche polymérique réticulée. L'architecture finale du revêtement est difficile à se représenter. [18]

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Les gels de silice précédents, comportant des greffons alkyles à 8 ou 18 atomes de carbone, sont polyvalents et par conséquent très utilisés (65 % des applications), mais pour améliorer la séparation de certaines classes de composés, il est fait appel à des phases stationnaires spécifiques à polarités variées. Sur une âme de silice, sont fixés des ligands porteurs de fonctions (groupements amino-propyle, cyanopropyle, benzyle) ou des greffons dipolaires (zwitterions) pour conférer une polarité intermédiaire à la phase stationnaire. La séparation des mélanges comportant à la fois des constituants polaires et non polaires, qui exigent des phases mobiles riches en eau, s'en trouve améliorée (Rouessac,2004). [18]

La nature de la phase greffée est un paramètre déterminant pour les propriétés de séparation du système chromatographique [28].

Les phases greffées les plus couramment utilisées sont :

-Octyl = Si-(CH ₂) ₇ -CH ₃	C8
-Octadécyl = Si-(CH ₂) ₁₇ -CH ₃	C18
-Phényl = Si-(CH ₂) _n -C ₆ H ₅	C ₆ H ₅
-Cyanopropyl = Si-(CH ₂) ₃ -CN	CN
-Aminopropyl = Si-(CH ₂) ₃ -NH ₂	NH ₂

Les colonnes en phase inversée à base de silice sont considérées comme stables pour les phases mobiles de pH apparent compris entre 2 et 8 [28].

La silice utilisée pour les colonnes en phase inversée est une silice amorphe et poreuse, elle est utilisée sous forme de granules ou de microparticules régulières poreuses préparées par le procédé sol-gel. La réactivité de la silice est essentiellement gouvernée par la nature des groupements présents à sa surface parmi lesquels : les groupements silanols (Si-OH) et les groupements siloxanes [28].

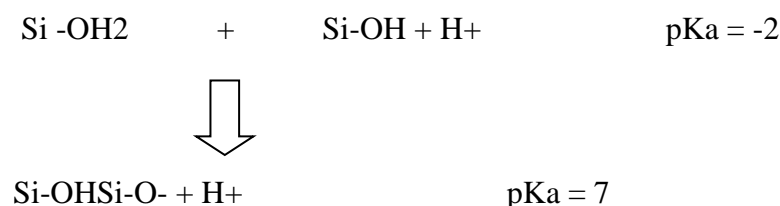
QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

- **Les groupements silanols (Si-OH) :**

Elles conditionnent la réactivité de la silice. Ils participent aux processus de rétention par l'adsorption, site d'échange d'ion et par une influence de la solvation sélective de la région

Interface : trois types de groupements silanols (silanols libres ou isolés, silanol vicinaux ou ponts et silanols géminaux) [29] [28].

Les groupements silanols ont un caractère amphotère résumé par les deux équations ci-dessous [28] :



- **Les groupements siloxanes**

Ils sont générés par dihydroxylation à haute température (environ 1000°C) et cela se fait par une condensation de deux groupements silanols voisins avec élimination d'eau.

Du fait de leur caractère hydrophobe et leur faible réactivité, ces groupements sont très peu impliqués dans la chimie de surface en solution aqueuse [28].

En chromatographie analytique la taille des particules constituant les phases stationnaires les plus souvent utilisées est comprise entre 3-10µm. Elles sont en acier inoxydable, et sont de longueur et de diamètre intérieur variables [27].

La température de la phase mobile et de la colonne doit être maintenue constante pendant toute la durée de l'analyse. La plupart des séparations sont effectuées à température ambiante, mais il est possible de chauffer les colonnes pour obtenir une efficacité supérieure [27].

Il est toutefois recommandé de ne pas dépasser 60°C, sous peine de dégradation de la phase stationnaire ou d'altération de la composition de la phase mobile [27].

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

1.5.6 Phases mobiles :

Les différentes parties de l'appareillage en contact avec la phase mobile sont généralement construites en acier inoxydable [type 316] qui présente l'avantage de la tenue à la pression et d'une bonne résistance à la corrosion chimique. [19]

En raison des pressions élevées qui doivent être appliquées pour assurer des débits raisonnables et de l'utilisation de supports dont le diamètre particulaire est de l'ordre de 2 à 10 μm , l'appareillage requis pour cette méthode d'analyse est ainsi nécessairement plus sophistiqué et plus coûteux que celui utilisé pour d'autres méthodes chromatographiques. [29]

Les canalisations de très faible diamètre interne (0,1 mm) qui assurent la circulation de la phase mobile sont soit en acier inoxydable soit en polymère de type PEEK (polyétherétherkétone) qui est un polymère plus économique que l'acier, souple, coloré et qui résiste aux solvants usuels à pH souvent corrosif, même pouvant résister aux solvants sous des pressions élevées jusqu'à 350 bars.[19]

Pour la chromatographie en phase normale, les solvants utilisés sont de faible polarité. Un contrôle strict de la présence d'eau dans la phase mobile est nécessaire pour obtenir des résultats reproductibles [27].

La plupart des applications actuelles font appel à la chromatographie à polarité de phase inversée où les phases stationnaires peu polaires imposent l'utilisation de phases mobiles polaires pour l'élution. [18]

Pour l'HPLC en phase inversée, on utilise des phases mobiles aqueuses avec ou sans modifiants organiques. Les composants de la phase mobile sont généralement filtrés pour éliminer les particules de taille supérieure à 0,45 μm . Les phases mobiles à plusieurs composants sont préparées par mesure de volumes requis (à moins que les proportions ne soient spécifiées en masse) pour chaque composant, puis par mélange des différents composants [27]

Une autre méthode possible consiste à délivrer les solvants au moyen de pompes individuelles commandées par des vannes à débit proportionnant [27].

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Les solvants sont normalement dégazés avant le pompage, par passage d'un courant d'hélium, sonication ou traitement en ligne par des modules membranes/vidé, pour éviter la formation de bulles de gaz dans la cellule de détection [27].

Les solvants utilisés pour préparer la phase mobile sont normalement exempts d'agents stabilisants, et transparents à la longueur d'onde de détection si on utilise un détecteur UV haute pureté, non corrosive et de faible viscosité [07][27].

Les solvants et autres composants utilisés doivent être de qualité appropriée.

La sélectivité du solvant est basée sur le triangle de Snyder, qui guide le choix du solvant ou des solvants à choisir ainsi que la phase stationnaire pour optimiser la séparation de l'analyte. Chaque apex du triangle représente une caractéristique d'un solvant, soit accepteur de proton, donneur de proton ou ayant un dipôle. Les solvants sont classés dans le triangle, de façon à les catégoriser selon les interactions possibles du solvant avec l'analyte [30].

Les gels de silice greffés sont dotés d'une mauvaise mouillabilité, l'eau ne doit pas être utilisée seul au risque de provoquer un dégrafage des chaines. La phase mobile est par conséquent, une phase polaire hydro-organique contenant de l'eau et un modifieur organique moins polaire qui ne doit pas, ou très peu, absorber dans l'intervalle de longueurs d'ondes choisit pour l'analyse. (Kintz,1998). [18]

Le méthanol et l'acétonitrile sont les modifieurs les plus utilisés, d'une part pour leur force d'élution supérieure à celle de l'eau en phase inverse mais surtout parce qu'ils forment avec l'eau un mélange de viscosité moyenne, ce qui évite l'augmentation de la pression entête de colonne. (Rouessac,2004). [18]

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC



Phase stationnaire polaire	Solvants classés par polarité croissante	Phase stationnaire apolaire
	Hexane Toluène Trichloroéthane Dichlorométhane Éther Acétate d'éthyle Acétonitrile Méthanol Eau	

Figure 21.: Pouvoir d'élution de certains solvants.

Le **pH** de la phase mobile est un facteur important qui conditionne la séparation des composés et oriente la rétention en fonction de leur pKa. En phase inverse, les performances de rétention sont abaissées pour les molécules ionisées, c'est pourquoi un pH pour lequel la molécule se trouve sous forme non-ionisée est souvent choisit. [18]

L'ajustement du pH, s'il y a lieu doit être exclusivement effectué sur le composant aqueux de la phase mobile et non sur le mélange [31] [27]

Si des solutions tampons sont utilisées, il convient de rincer soigneusement le système avec un mélange d'eau et du modifiant organique de la phase mobile (5% V/V) une fois la chromatographie terminée, afin d'éviter la cristallisation des sels [30] [27]

La **polarité** de la phase conditionne aussi l'ordre et le temps d'élution. Avec un éluant polaire, un composé polaire migre plus vite qu'un composé apolaire. Dans ces conditions, les composés polaires sont assez difficiles à séparer entre eux tandis que les composés apolaires fortement retenus tardent à migrer. [18]

Dans le cas où plusieurs composés de polarités différentes doivent être analysés simultanément, il faut réaliser un gradient d'élution en modifiant la polarité du solvant en cours d'analyse pour obtenir la meilleure séparation possible dans un temps d'analyse

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

raisonnable. En phase inverse, on diminue progressivement la concentration en eau (polaire) au profit du modifiant choisi (moins polaire). [18]

Les phases mobiles peuvent contenir des additifs, comme par exemple un contre-ion dans le cas d'une chromatographie à appariement d'ions, ou un sélecteur chiral dans le cas d'une chromatographie avec phase stationnaire achirale [30] [27]

1.5.7 Le détecteur :

En HPLC, il n'existe pas de détecteurs universels aussi sensibles que ceux utilisés en CG.

Dès lors, le dispositif utilisé dépend de la nature de l'échantillon.

Un Détecteur Consiste à mesurer l'absorbance absolue d'un soluté.

Un détecteur placé à la sortie de la colonne couplé à un intégrateur permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme. Il dirige sur l'intégrateur un signal constant appelé ligne de base en présence du fluide porteur seul ; au passage de chaque soluté séparé, il conduit dans le temps à l'enregistrement d'un pic.

1.5.7.1 Principes de détection et classification des détecteurs :

Les détecteurs sont classés aussi sur leurs bases de fonctionnement, en deux :

- **Le premier** est basé sur les propriétés générales (solvant + soluté); ex: indice de réfraction, conductivité, constante diélectrique,...
- **Le second** est basé sur les propriétés des solutés ; ex : UV, polarographie, radioactivité. [16]

1.5.7.1.1 Détecteurs par absorption dans l'ultra-violet et le visible :

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.

Consiste à mesurer l'énergie de fluorescence d'un soluté excité par une radiation ultraviolette.

Les photomètres utilisent souvent les raies à 254 et 280 nm du mercure parce que de nombreux groupements fonctionnels organiques absorbent dans cette région . Les

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

détecteurs les plus utilisés sont basés sur l'absorption du rayonnement UV-Visible. [21]

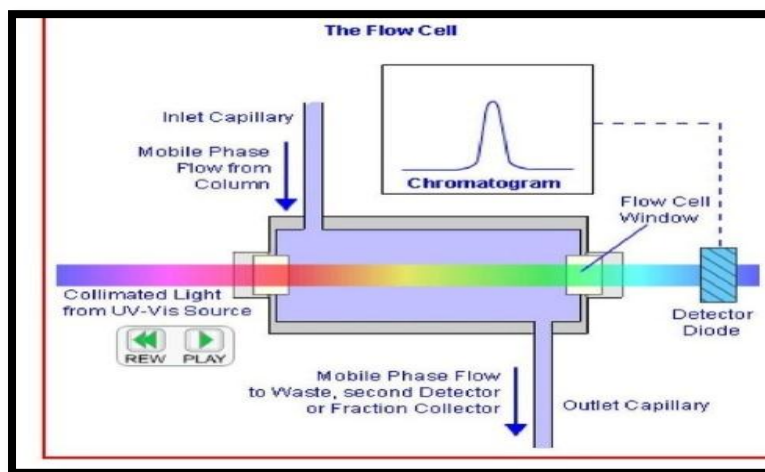


Figure 22: cellule d'un détecteur UV-visible (19)

On mesure en permanence l'absorbance de la phase mobile en sortie de la colonne à une ou plusieurs longueurs d'onde. Le signal donné par ces détecteurs est proportionnel à la concentration du soluté dans l'effluent de la colonne chromatographique. En effet, l'absorbance A est liée à la concentration.

La limite de détection dépend : du coefficient d'absorption du soluté, de sa concentration dans l'effluent lors de la traversée dans la cellule de mesure c'est-à-dire de la dilution apportée par la colonne, du bruit de fond du détecteur.

L'absorbance A est liée à la concentration par la relation de Beer Lambert : **$A = \epsilon \lambda l C$**

Avec : $\epsilon \lambda$: coefficient d'absorption molaire, l : trajet optique C : concentration du soluté dans l'effluent. (2)

1.5.7.1.2 Détecteurs spectrofluorimétrique :

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

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

longueur d'onde supérieure, l'autre fraction étant convertie en énergie interne (conversion interne). (19)

1.5.7.1.3 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. (19)

1.5.7.1.4 Détecteurs par spectrométrie de masse :

Le couplage HPLC/MS est en plein essor et devient un outil puissant d'identification et de détection.

Cependant deux caractéristiques de HPLC rendent le couplage difficile :

1) les méthodes d'ionisation de la spectrophotométrie de masse nécessitent que l'échantillon soit vaporisé sous un vide poussé d'où une décomposition possible du produit pendant ce processus. En fait l'ionisation chimique du soluté par les molécules de solvant protège celui-ci de toute dégradation. Des composés de masse moléculaire aussi élevée que 1500 ont déjà été détectés.

2) la quantité de phase mobile utilisée est beaucoup plus grande que celle pouvant être raisonnablement introduite dans la chambre du spectromètre. (19)

1.5.7.1.5 Détecteurs par réfractométrie différentielle :

Le principe repose sur les lois de Fresnel de transmission de la lumière dans les milieux transparents dont l'indice de réfraction est n . Schématiquement, un faisceau lumineux (mono ou polychromatique) passe à travers une cellule comportant deux compartiments dont l'un est rempli avec l'éluant seul et l'autre avec la phase mobile en sortie de colonne. La différence de l'indice entre les deux liquides, qui apparaît lorsqu'un composé est mélangé à l'éluant se traduit par un déplacement angulaire du rayon réfracté.

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

La limite de détection de la réfractométrie n'est pas très bonne. Elle dépend à la fois de la nature du soluté et de celle de la phase éluant. (19)

1.5.7.1.6 Spectroscopie infra-rouge :

Permet de caractériser la masse des produits à l'état de traces et permet d'obtenir des informations poussées sur la structure. (19)

1.5.7.1.7 Détecteur à barrette de diode :

Les spectrophotomètres à barrette de diodes permettant l'enregistrement tridimensionnel absorbance-temps-longueur d'ondes. De ce fait, on dispose à tout moment du spectre UV-Visible de la phase mobile éluee, ce qui est une aide à l'identification de solutés inconnus par comparaison des spectres UV des solutés avec ceux des composés purs stockés en bibliothèque. Ce type de détecteur permet de sélectionner la longueur d'onde optimale de détection pour chaque soluté. (19)

1.5.7.2 Facteurs influençant la forme du spectre UV :

A/ Le pH de la phase mobile

Le spectre des composés acides ou basiques peut être complètement différent à l'état protonique ou non si le groupement acide ou basique est une partie du chromophore. Dans ce cas, une modification même faible du pH peut changer la forme du spectre si le pKa de la molécule est proche du pH du tampon. [18]

B/ La polarité de la phase mobile

Le spectre UV peut aussi varier selon la polarité du solvant et sa capacité à former ou non des liaisons hydrogènes. En général une déviation vers les longueurs d'ondes plus grande et un élargissement des bandes d'absorption est observé avec l'augmentation de la polarité du solvant. [18]

En mode inverse, l'eau étant le solvant le plus polaire dans la phase mobile il domine dans les interactions solvant-soluté. Ainsi le type et la concentration du modificateur organique n'influence pas beaucoup la forme des spectres même en mode gradient d'élution. [18]

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

1.5.8 Système informatisée (logiciel et chromatogramme) :

Les détecteurs sont munis de logiciels appropriés qui permettent d'acquérir simultanément le chromatogramme, le spectre UV spécifique à chaque molécule éluée et parfois le spectrochromatogramme en trois dimension (temps, absorbance, longueur d'onde λ). [18]

Le chromatogramme change d'aspect selon la longueur d'onde de détection qui peut être modifiée au cours de l'analyse. On choisit en générale la λ max du composé analysé ou celle qui permet d'avoir le moins d'interférences due à la matrice ou à la phase mobile. [18]

La détection est basée sur la loi de Beer-Lambert ($A = \epsilon \cdot c$) : l'absorbance A de la phase mobile est mesurée en continue en sortie de colonne, à une longueur d'onde pour laquelle elle n'absorbe pas. Le détecteur donne ainsi pour chaque composé élué une réponse proportionnelle à sa concentration instantanée. L'intensité de l'absorption dépend aussi du coefficient d'absorption molaire ϵ , ce qui rend impossible, par la simple observation d'un chromatogramme, de se faire une idée de la concentration des espèces repérées, même de manière très approximative (Rouessac,2004). [18]

1.6 Pic chromatographique :

Le résultat observable d'une analyse HPLC se présente sous la forme d'un « chromatogramme »

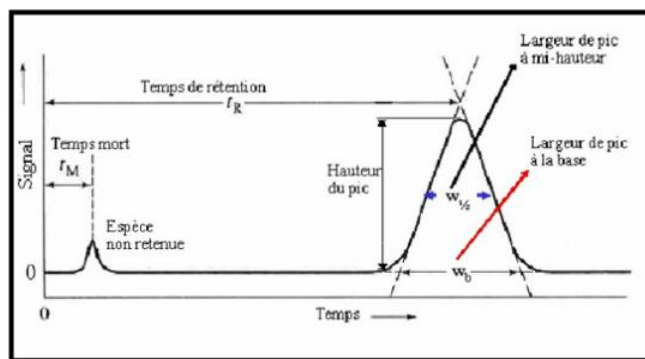


Figure 23: Principaux paramètres d'un chromatogramme [32]

Le chromatogramme est une représentation, graphique ou autre, de la réponse d'un détecteur, de la concentration d'un effluent ou d'une autre grandeur utilisée comme mesure de la concentration d'un effluent en fonction du temps, du volume ou de la distance. Idéalement,

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Un chromatogramme se présente comme une séquence de pics gaussiens au-dessus d'une ligne de base [27].

1.6.1 . Grandeurs de rétention :

Plusieurs grandeurs nous renseignent sur la conformité du système chromatographique :

Temps de rétention t_R :

En chromatographie d'éluion, les mesures de rétention peuvent être exprimées en termes de temps de rétention t_R directement défini par la position du maximum du pic dans le chromatogramme [27].

Ce temps de rétention peut être déduit par le calcul de volume de rétention V_R :

* t_R = temps de rétention ou distance sur la ligne de base entre le point d'injection et la perpendiculaire abaissée du maximum du pic correspondant au composant considéré

* v = débit de la phase mobile [27].

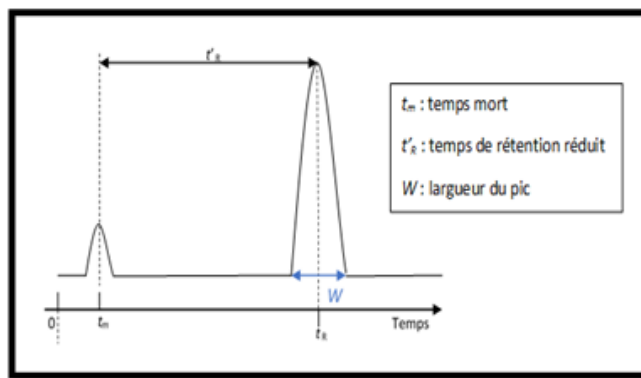


Figure 24: Chromatogramme illustrant le t_R , t'_R , t_m [32]

Le temps de rétention représente le temps que met le soluté à sortir de la colonne, c'est-à-dire le temps écoulé entre l'injection et le maximum du pic du composé élué, c'est la principale grandeur de rétention [28] [33].

Il varie en fonction du débit, de la température d'éluion, de la composition de la phase mobile et du vieillissement de la colonne [33].

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Le volume de rétention de chaque soluté représente le volume de phase mobile nécessaire pour le faire migrer d'une extrémité à l'autre de la colonne [27].

Coefficient de distribution massique D_m

Le coefficient de distribution massique ou facteur de capacité k' ou facteur de rétention k est défini comme suit :

$$D_m = \frac{\text{quantité du soluté dans la phase stationnaire}}{\text{quantité du soluté dans la phase mobile}} = K_C \frac{V_S}{V_M}$$

* K_C = coefficient de distribution à l'équilibre (ou constante de distribution),

* V_S = volume de la phase stationnaire,

* V_M = volume de la phase mobile [27].

Le coefficient de distribution massique d'un composant peut être déterminé à partir du chromatogramme, à l'aide de l'expression :

$$D_m = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

* t_R = temps (ou volume) de rétention ou distance sur la ligne de base entre le point d'injection et la perpendiculaire abaissée du maximum du pic correspondant au composant considéré,

* $t_M = t_0$ = temps (ou volume) de rétention ou distance sur la ligne de base entre le point d'injection et la perpendiculaire abaissée du maximum du pic correspondant à un composant non retenu (« hold-up time ») [27].

* $t_M = t_0$ = temps (ou volume) de rétention ou distance sur la ligne de base entre le point d'injection et la perpendiculaire abaissée du maximum du pic correspondant à un composant non retenu (« hold-up time ») [27].

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Le temps mort représente le temps mis par la phase mobile pour aller de l'injecteur au détecteur.

Le coefficient de distribution massique D_m est un paramètre expérimental important qui traduit l'affinité d'un composé pour la phase stationnaire. Il rend compte de la faculté plus ou moins grande de la colonne à retenir un composé. Ce paramètre ne dépend pas du débit de la phase mobile, ni des dimensions de la colonne mais affecté par toutes les autres conditions chromatographiques [34] [15]

Coefficient de partage :

En chromatographie d'exclusion, les caractéristiques d'élution d'un composant dans une colonne particulière peuvent être décrites par le coefficient de partage K_o , calculé à l'aide de l'expression :

$$K_o = \frac{t_R - t_o}{t_t - t_o}$$

* t_R = temps (ou volume) de rétention ou distance sur la ligne de base entre le point d'injection et la perpendiculaire abaissée du maximum du pic correspondant au composant considéré,

* $t_0 = t_M$ = temps (ou volume) de rétention ou distance sur la ligne de base entre le point d'injection et la perpendiculaire abaissée du maximum du pic correspondant à un composant non retenu (« hold-up time ») [27],

* t_t = temps (ou volume) de rétention ou distance sur la ligne de base entre le point d'injection et la perpendiculaire abaissée du maximum du pic correspondant à un composant ayant accès à tous les pores de la phase stationnaire [27].

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

1.6.2 Données chromatographiques :

A/ Largeur d'un pic chromatographique :

Les pics chromatographiques ont une allure gaussienne. Un pic peut être défini par sa surface A (calculée en assimilant le pic à un triangle), par sa hauteur h ainsi que sa largeur, comme illustré par la figure ci-dessous [27] [10].

La largeur d'une courbe de Gauss est définie par :

* $w = \omega$ = largeur à la base du pic

* $w_h = \delta$ = largeur à mi-hauteur

* σ = écart type = $\frac{1}{2}$ largeur du pic à la hauteur des points d'inflexion, à 60,6% de la hauteur [10].

* σ = écart type = $\frac{1}{2}$ largeur du pic à la hauteur des points d'inflexion, à 60,6% de la hauteur [10].

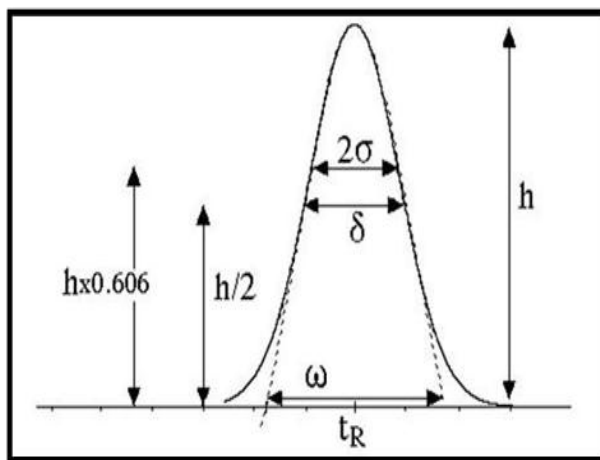


Figure 25: : Chromatogramme et largeurs du pic chromatographique [10].

B/ Performance d'une colonne et nombre apparent de plateaux théoriques :

La performance d'une colonne (efficacité apparente) peut être calculée, à partir de données obtenues dans des conditions isothermes, isocratique ou isodenses, selon la technique utilisée,

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

en termes de nombre apparent de plateaux théoriques N , à l'aide de l'expression suivante, où les valeurs de t_R et w_h doivent être exprimées dans la même unité (de temps, volume ou distance) [27] :

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

* t_R = temps (ou volume) de rétention ou distance sur la ligne de base entre le point d'injection et la perpendiculaire abaissée du maximum du pic correspondant au composant considéré,

* w_h = largeur du pic à mi-hauteur [27].

Le nombre apparent de plateaux théoriques dépend du composant considéré, ainsi que de la colonne et du temps de rétention [35] [27].

L'efficacité d'une colonne chromatographique est mesurée pour chaque composé, par le nombre apparent de plateaux théoriques N de la colonne [36].

Cette théorie est née à la recherche d'un modèle permettant de décrire le fonctionnement d'une colonne chromatographique comme celui d'une colonne à distiller [31] [27][07][29].

Au lieu de considérer le déplacement réel, continu de la phase mobile, on admet que celle-ci progresse par sauts successifs et donc que chaque soluté se déplace progressivement dans la colonne en une suite d'étapes distinctes. A chacune de ces étapes, la concentration du soluté dans la phase mobile est en équilibre avec la concentration du soluté dans la phase stationnaire. On peut alors imaginer la colonne de chromatographie comme une série de compartiments distincts dans lesquels s'établit l'équilibre de répartition du soluté. Ces compartiments imaginaires sont ce qu'on appelle les « plateaux théoriques ». A chaque nouvel équilibre, le soluté a progressé d'un petit disque supplémentaire dans la colonne [32].

La chromatographie est décrite comme une suite de temps d'équilibration suivis de glissements de la phase mobile d'un plateau par rapport à la phase stationnaire [32].

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

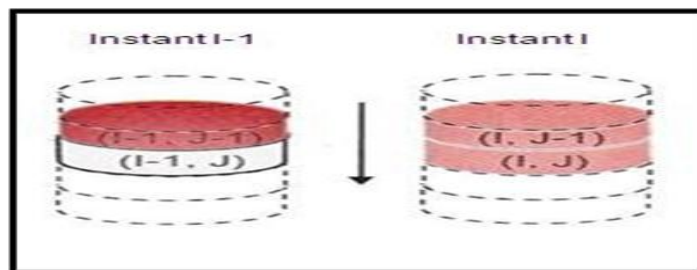


Figure 26: Illustration du modèle de plateaux théoriques [32].

La colonne de longueur L est donc découpée en N petits disques fictifs ou « plateaux théoriques » de même hauteur, dans chacun d'eux s'établit l'équilibre de répartition du soluté entre la phase stationnaire et la phase mobile, d'où l'expression :

$$N = \frac{L}{HEPT}$$

*N = Nombre apparent de plateaux théoriques.

*L = Longueur de la colonne (cm).

*HEPT = Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique (cm)[33].

1.6.3 Paramètres de séparation :

A/ Résolution R_s :

La résolution correspond à une grandeur numérique caractérisant l'aptitude du système chromatographique (colonne, solutés, solvants) à séparer deux composés d'un mélange. Ce paramètre nous renseigne sur la qualité de la séparation [37] [29].

La résolution R_s entre deux pics peut être calculée à l'aide de l'expression suivante :

$$R_s = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$
$$t_{R2} > t_{R1}$$

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

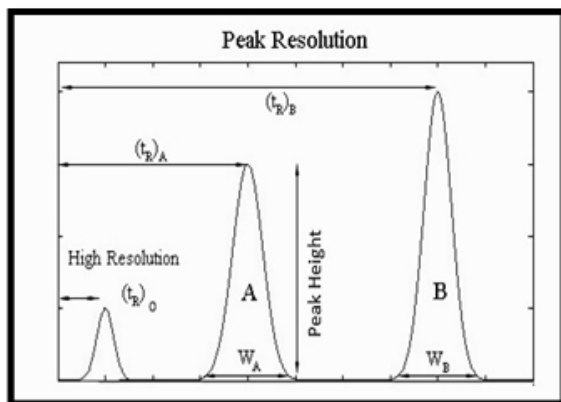


Figure 27: Chromatogramme et résolution [38].

* t_{R1} et t_{R2} = temps de rétention ou distances sur la ligne de base entre le point d'injection et les perpendiculaires abaissées des maximums de deux pics adjacents,

* W_{h1} et W_{h2} = largeur des pics à mi-hauteur [27].

Une résolution supérieure à 1,5 correspond à une séparation jusqu'à la ligne de base.

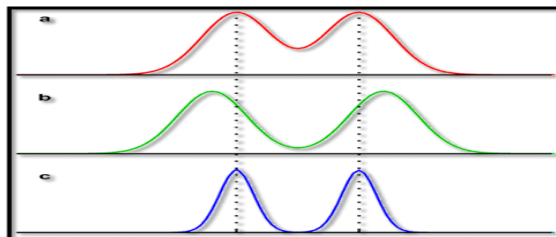


Figure 28: Exemples de séparation chromatographique de deux composés

Les trois chromatogrammes ci-dessous illustrent des exemples de séparation chromatographique de deux composés :

Les trois chromatogrammes ci-dessous illustrent des exemples de séparation chromatographique de deux composés :

(a) Les pics se recouvrent.

(b) La distance séparant les sommets des pics est plus grande mais les largeurs à la base sont les mêmes qu'en (a).

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

(c) La distance séparant les sommets des pics est égale à celle trouvée en (a) mais les largeurs à la base sont plus petites qu'en (b).

Comme la montre la figure ci-dessus, la séparation idéale est réalisée en (c).

B/ Réention relative :

La réention relative « r » est une estimation calculée à l'aide de l'expression :

$$r = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M}$$

t_{R2} = temps de réention du pic considéré,

t_{R1} = temps de réention du pic de référence (généralement celui de la substance à examiner),

t_M = temps de réention ou distance sur la ligne de base entre le point d'injection et la perpendiculaire abaissée du maximum du pic correspondant à un composant non retenu (« hold-up time »)[39].

t_M = temps de réention ou distance sur la ligne de base entre le point d'injection et la perpendiculaire abaissée du maximum du pic correspondant à un composant non retenu (« hold-up time »)[39].

La réention relative non ajustée r_G calculée à l'aide de l'expression :

$$r_G = \frac{t_{R2}}{t_{R1}}$$

Sauf indication contraire, les valeurs de réention relative indiquées dans les monographies correspondent à la réention relative non ajustée [39].

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

C/ Sélectivité α :

Le facteur de sélectivité α est défini par le rapport de coefficient de distribution de l'espèce la plus retenue, au coefficient de distribution de l'espèce la plus rapidement élué, il est calculé à partir de l'équation suivante :

On a
$$\begin{aligned} K_2 &= t_{R'2} / t_M \\ K_1 &= t_{R'1} / t_M \end{aligned}$$

Donc:
$$\alpha = t_{R'2} / t_{R'1}$$

$$\alpha = t_{R'2} / t_{R'1}$$

Donc, elle représente le rapport entre deux temps de rétention réduit [41]:

La sélectivité α permet de préciser les positions relatives de deux pics adjacents 1 et 2 sur un chromatogramme [34] [29].

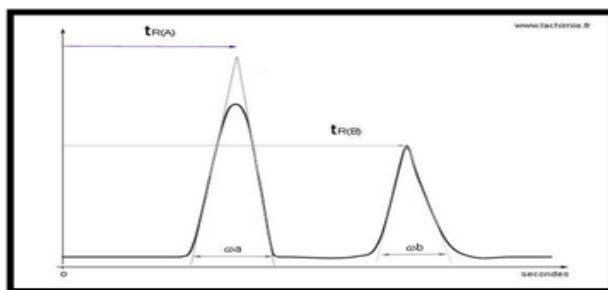


Figure 29: : Paramètres pour calculer la sélectivité

1.7 La perte de charge dans une colonne :

La perte de charge est une caractéristique de la colonne. Elle exprime sa résistance à l'écoulement de la phase mobile. Elle est appelée aussi pression de la colonne [34].

La perte de charge Δp dans une colonne est donnée par la loi de DARCY :

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

$$\Delta p = \eta L u / B_o \quad (16)$$

ΔP : Perte de charge en pascalle (Pa). 1 Pa = 1.10⁻⁵ bar.

η : Viscosité de la phase mobile en Pa.s.

L : Longueur de la colonne (m).

U : Vitesse linéaire de la phase mobile (m.s.⁻¹).

B_o : Perméabilité spécifique (m²). [34]

La perméabilité spécifique d'une colonne remplie est:

$$B_o = d_p^2 / \Phi$$

[34]

d_p : Diamètre des particules de remplissage [34].

Φ : Facteur de résistance à l'écoulement

La perte de charge montre que, sous certaines conditions, le débit peut être augmenté sans changement de la pression de travail si la viscosité diminue, ce qui peut être obtenu par élévation de la température. Une plus grande diminution du temps d'analyse peut être obtenue à la suite de la réduction du facteur de rétention due à l'effet de l'augmentation de la température, phénomène qui est largement déterminé par l'enthalpie d'interaction du soluté avec la phase stationnaire. [42]

1.8 Le comportement d'un pic chromatographique :

Les pics obtenus dans les différentes conditions d'analyse présentent une forme gaussienne.

La vérification d'une bonne symétrie de pic a été effectuée : cela signifie que les pics présentent une symétrie entre 0,8 et 1,4. En effet, pour une valeur inférieure à 0,8 cela signifie qu'une déformation du pic est présente à l'avant du pic (« fronting ») et pour une valeur supérieure à 1,4

Une déformation est présente en fin de pic (« tailing »). [43]

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Dans les conditions idéales, un pic chromatographique doit avoir une forme gaussienne et présente une symétrie parfaite, mais en pratique plusieurs pics n'ont pas une meilleure symétrie, en plus un pic chromatographique peut présenter soit un trainé ou un fronting[44].

Le phénomène d'adsorption et les bandes élargies de pré-colonne, provoquent un trainé de pic, tandis que la surcharge de la colonne ou une réaction chimique de l'analyte pendant l'élution entraînent un fronting du pic [07].

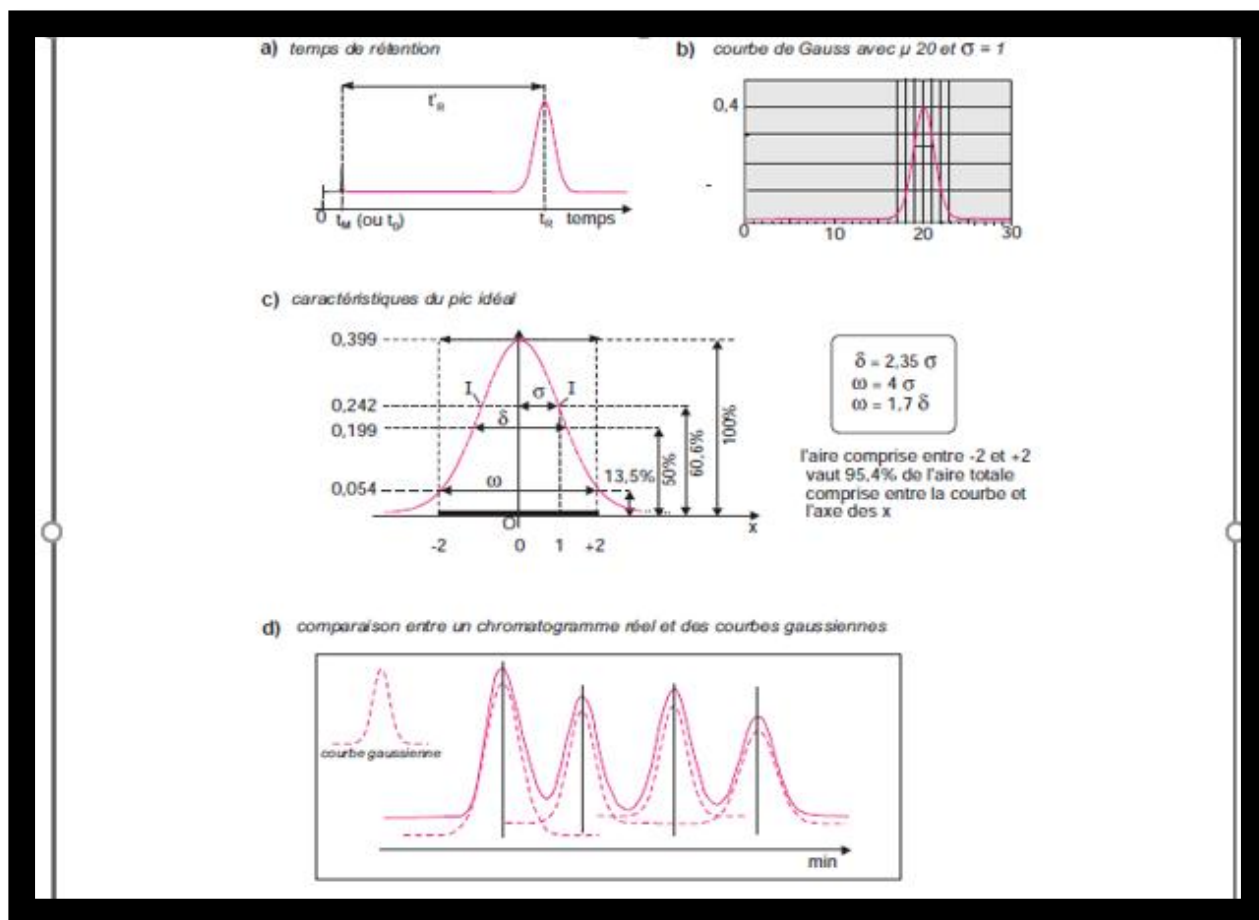


Figure 30: : pics chromatographiques [45]

1.8.1 Facteur de symétrie AS :

Le facteur de symétrie As d'un pic est calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$As = W_{0.05}/2d \quad [27]$$

$W_{0.05}$: Largeur du pic au vingtième de sa hauteur.

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

d: Distance entre la perpendiculaire abaissée du maximum du pic et le bord d'entrée du pic au vingtième de sa hauteur [27].

En HPLC, un pic idéal tend vers une courbe d'aspect gaussien. Il est possible de calculer la symétrie du pic par l'intermédiaire du facteur **AS**, qui est le rapport entre la largeur du pic au 1/20 de sa hauteur et la distance entre la perpendiculaire abaissée du sommet du pic et le bord d'entrée au 1/20 de sa hauteur [46].

Les valeurs idéales de **AS** sont comprises entre 0,8 et 1,3. Le pic est alors symétrique. Si le pic présente une trainée d'entrée, **AS** sera inférieur à 1, s'il présente une queue, **AS** sera supérieur à 1,5 [47].

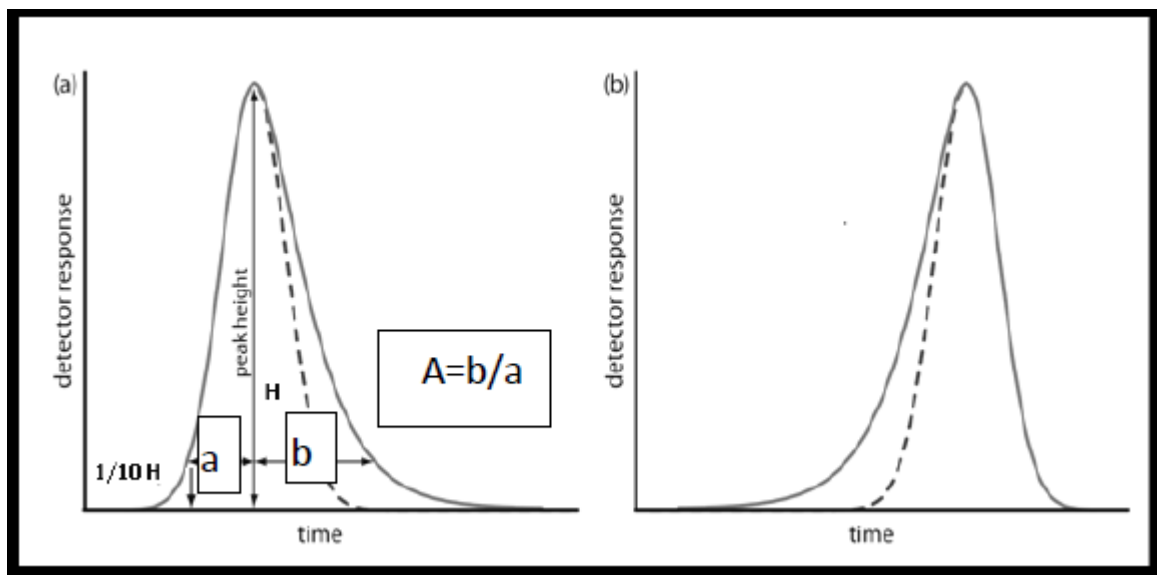


Figure 31: : Exemple d'une asymétrie de pic chromatographique.

Avec : (a) représente une trainée de pic, (b) représente un [48]

1.8.2 Facteur d'asymétrie (ou facteur de trainé t_f) :

Selon l'United States Pharmacopiea (USP), le facteur de trainé est calculé à l'aide de l'équation suivante:

$$Tf = \frac{a+b}{2a}$$

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

a : Distance entre la perpendiculaire abaissée du maximum du pic et le bord d'entrée du pic (mesurée à 5% de la hauteur du pic).

b : distance entre la perpendiculaire abaissée du maximum du pic et le bord de sortie du pic (mesurée à 5% de la hauteur du pic) [07.].

Dans le cas d'une forte asymétrie, il est préférable d'utiliser la relation empirique de Foley et Dorsey. [49]

1.9 Test de conformité de système (TCS) :

Le test de conformité du système constitue l'une des parties les plus importantes dans l'analyse chromatographique dont l'objet de ce test est de s'assurer de la performance du système utilisé pour l'analyse et de montrer que le système de mesure est satisfaisant au moment de l'analyse [27]

Lors d'optimisation d'une méthode HPLC les différents éléments de l'appareillage doivent être qualifiés afin d'atteindre la performance requise pour la réalisation des analyses considérées.

Les essais de conformité du système font partie intégrante de la méthode. Ils visent à vérifier les performances du système chromatographique. Les paramètres généralement utilisés pour évaluer les performances de la colonne sont (ANONYME 11, 2011).

L'efficacité apparente ;

Le facteur de rétention (coefficient de distribution massique) ;

La résolution ;

La rétention relative ;

Le facteur de symétrie [50]

Les critères de conformité sont ceux de 2018 de la FDA.

1.9.1 Définition du test de conformité du système (TCS) :

Un test de ce type est généralement effectué pour vérifier la séparation de deux substances ayant un temps de migration voisin, la substance proprement dite et une substance proche

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

(couple critique). Il faut démontrer que la séparation de ces deux substances constitue une garantie de l'adéquation du système chromatographique. Ce critère de conformité est essentiel dans le cas des essais des substances apparentées. [51]

Conformément à l'USP, les tests de conformité du système (en anglais, Système Suitability tests) font partie intégrante des méthodes chromatographiques gazeux et liquides. Ils visent à vérifier la performance du système chromatographique, par la vérification de quelques paramètres tels que la résolution et la reproductibilité de ce système [52] [34] [27].

La conformité du système renseigne sur l'aptitude du système à effectuer l'analyse suivant des critères préétablis. Elle sera démontrée en analysant 06 fois la solution standard.

Les paramètres à évaluer sont :

Ecart type relatif du signal pour les 06 injections de la solution standard (Relatif standard déviation : RSD), moyenne et écart type ;

Le nombre de plateaux théoriques ;

Facteur de symétrie ;

La résolution. [50]

Normes:

-Le %RSD des aires du pic de Principe actif pour les 06 injections de la solution standard

Doit être $\leq 2,0$.%

-Le % RSD des aires du pic de conservateur pour les 06 injections de la solution standard

Doit être $\leq 2,0$.%

-Le nombre de plateaux théoriques doit être supérieur ou égal à 50 % de celle trouvées durant la validation analytique

-le facteur de symétrie doit être compris entre 0,8 et 1,5. [53]

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

1.9.2 Période d'application du test :

Le système doit satisfaire aux critères de conformité pendant toute la procédure chromatographique. Il revient à l'analyste de définir, en fonction de facteurs tels que la fréquence d'utilisation de la procédure et son expérience du système chromatographique, un programme de contrôle approprié pour assurer le suivi de la conformité.

Selon les derniers directifs de l'USP et L'ICH, le TCS doit être effectué avant et pendant tous les essais réglementés [07] [27].

Cependant le plus souvent, le test de conformité du système (TCS) est fait au moment de lancement de l'analyse.

1.9.3 Les paramètres à vérifier pour l'évaluation d'un système chromatographique :

Le test de conformité du système (TCS) est effectué en injectant jusqu'à six injections de la même Vial du standard. Il permet d'évaluer la performance et de juger sur la capacité d'un système chromatographique à séparer les constituants d'un composé par l'utilisation des paramètres regroupés dans le tableau ci-dessous, dont les normes soit fixées dans la procédure interne du laboratoire ou dans les référentiels tels que United States Pharmacopoeia (USP) et la Pharmacopée européenne (Ph.Eur)[07] [27].

Tableau 2: Les paramètres du test de conformité du système.

Paramètres	Description
Résolution Rs	Mesure du degré de séparation des pics au niveau du chromatogramme
Répétabilité Sr (ou RSD)	Mesure de la reproductibilité du système durant l'analyse chromatographique.
Facteur de capacité K'	Mesure du degré de rétention de l'analyte.
Nombre de plateaux théoriques N	Mesure l'efficacité de la séparation.
Facteur de symétrie As(ou Tf)	Mesure de la symétrie d'un pic.

Les limites de ces paramètres sont mentionnées sur le tableau suivant :

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Tableau 3: Limites de paramètres de TCS selon les renseignements de l'USP et FDA [54] [07] [55] >

Paramètres	Résolution% (Rs)	Répétabilité (Sr ou RSD)	Facteur de capacité	Nombre de plateaux théoriques	Facteur de symétrie As (ou tffacteur de trainé)
Limites	>2,0	≤ 1.0 pour 5 injections répétées >2,0	>2.0	>2000	≤2,0 selon USP 0,8 ≤ As ≤ 1,5 Selon l'EP

La répétabilité est exprimée en pourcentage par l'écart type relatif Sr (selon l'USP il est désigné par RSD, relative standard déviation), estimé à partir des résultats d'une série d'au moins 3 mesures consécutives réalisées par injection d'une solution témoin, il est calculé à l'aide de l'équation suivante : [27]

$$Sr(\%) = 100 / \bar{y} [\sqrt{\sum (y_i - \bar{y})^2} / n - 1]$$

yi: Valeurs individuelles (surfaces ou hauteurs de pic ou rapport de surface pour méthode d'étalon).

ȳ: Moyenne des valeurs individuelles.

n: Nombre des valeurs individuelles

Si au moins l'un des paramètres du système est non conforme à la norme fixée dans la procédure analytique, il convient de prendre les mesures suivantes :

- 1) Arrêter immédiatement de la séquence à réaliser.
- 2) Procéder à un diagnostic convenable pour résoudre le problème.
- 3) Faire les ajustements requis.
- 4) Réaliser un autre test de la conformité du système (TCS) [07.].

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

1.10 Domaines d'application de la Chromatographie liquide haute performance (HPLC) :

Les domaines d'application de l'HPLC sont extrêmement nombreux et vastes .Elle est utilisée comme méthode d'analyse qualitative et quantitative aussi bien dans les services de recherche et développement que dans le domaine du contrôle [56].Son champ d'activité couvre les organismes d'État et les industries de la chimie, biochimie, pharmacie et parachimie (agrochimie, cosmétiques, parfums, caoutchoucs, polymères, matériaux composites, fermentations) et même la médecine (humaine et vétérinaire), la génétique, la toxicologie, la pharmacognosie, l'environnement, le droit et la justice (police scientifique, douanes, répression des fraudes) [37] [03] [56].

En raison de sa polyvalence et du vaste domaine de ses applications, la chromatographie liquide haute performance (CLHP ou HPLC) est actuellement la plus utilisée de toutes les techniques de séparation.

-Le champ d'application de ce type de chromatographie recouvre une grande partie du domaine de la chromatographie en phase gazeuse auquel s'ajoute l'analyse des composés thermosensibles des composés très polaires ainsi que des composés de masses molaires élevées.[50]

Citons plus particulièrement trois domaines dans lesquels l'utilisation de l'HPLC reste incontestable :

- Contrôle de la pureté optique des molécules thérapeutiques.
- Analyse des résidus et des traces dans le domaine environnemental.
- Suivi des concentrations des composés cytotoxiques (chimiothérapie anticancéreuse) [03].

L'HPLC permet l'analyse, le dosage et l'étude de la stabilité soit de substances thermiquement instables, puisque l'opération s'effectue à température ambiante, soit de substances peu volatiles de masse moléculaire pouvant atteindre 2 000 000, soit encore de substances ionisées [56]. C'est donc, une méthode « douce » avec les molécules. La grande importance de l'HPLC provient de sa vitesse d'exécution, de son grand pouvoir de résolution et de son aptitude à analyser de manière qualitative et quantitative de faibles quantités d'échantillon [08] :

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

L'analyse qualitative consiste à identifier les substances à analyser par leur temps de rétention, lequel pour des conditions données (solvant, débit, colonne, etc...) est caractéristique du composé [Chromatographie en phase liquide, Saint Etienne Ecole des mines.].

L'analyse quantitative consiste à déterminer la quantité de chaque composé du mélange qui pour des conditions données est proportionnelle à la surface du pic correspondant [03].

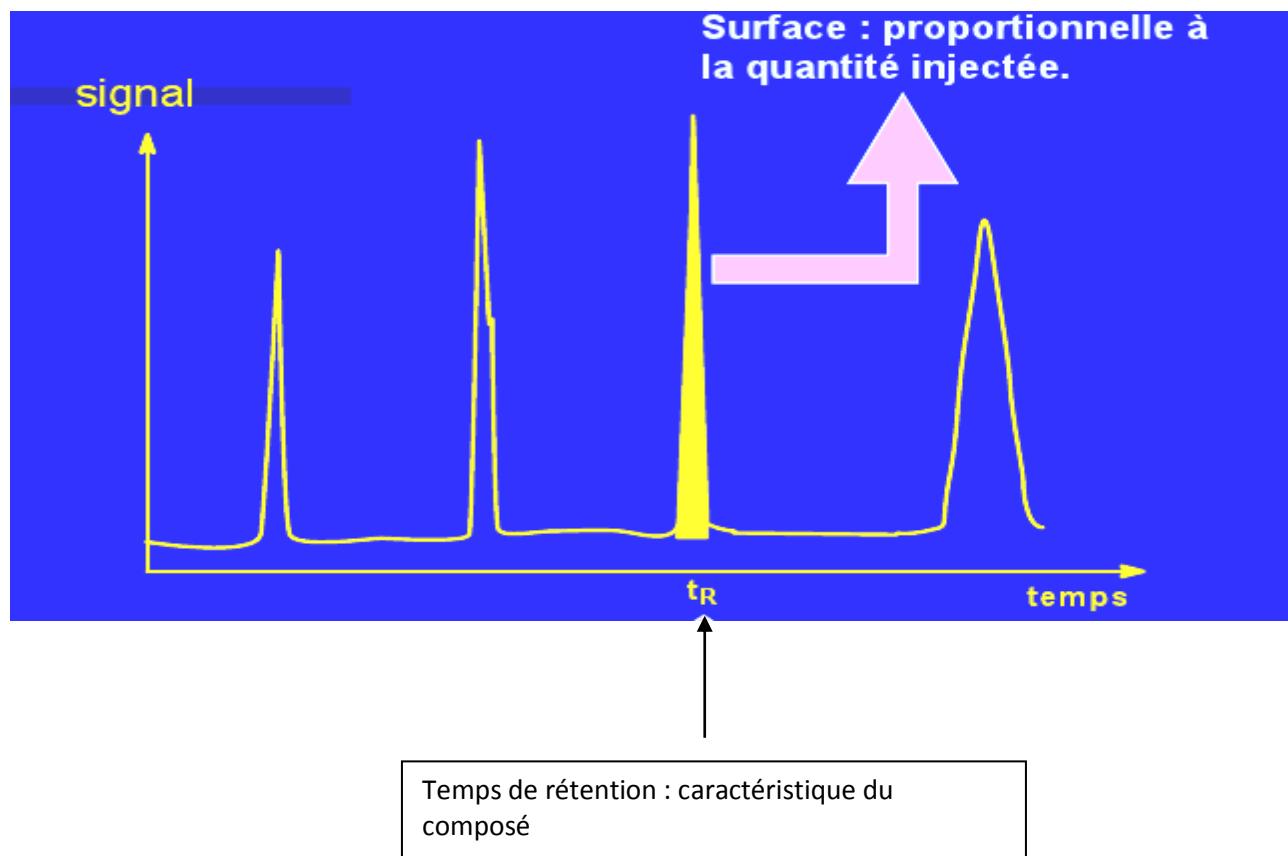


Figure32 Figure 32: : Illustration de l'aspect qualitatif et quantitatif de l'HPLC [03].

Les applications sont innombrables. La méthode permet de séparer des composés de masse molaires variables (de 100 à 2000), de natures chimiques différentes et même les isomères.

La HPLC est un très bon complément de la GC pour :

- les **substances peu volatiles** : molécules de masse molaire > 300 .

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

- les **substances thermolabiles** comme les médicaments issus des biotechnologies ou les composés d'origine biologique ;

-les substances **ionisées**.

En effet la HPLC n'est pas limitée par la volatilité de l'échantillon ni par sa stabilité thermique. De plus, la préparation de l'échantillon avant son injection est souvent plus simple qu'en phase gazeuse.

LA HPLC est complémentaire de la chromatographie sur couche mince CCM.

Elle couvre tous les domaines d'applications. Citons dans les domaines :

- **De l'agroalimentaire :**

- La détermination de la teneur en acide carboxyliques (acide lactique, acétique, tartrique, succinique et citrique).

- **De la pharmacie :**

- la recherche **d'impureté** dans les matières premières ;

- Analyse quantitative** et **identification** de principe actif dans les préparations pharmaceutiques.

A titre d'exemple, rappelant :

Le protocole de la Pharmacopée Européenne pour l'analyse de la **composition du distéarate de glycol** par perméation de gel avec une colonne de 0.6 de diamètre 7 mm remplie avec du styrène-divinylbenzene (5 µm) et du tétrahydrofurane comme phase mobile. La teneur en mono, di et très acylglycérols doit être respectivement de l'ordre de 8 à 22 %, 40 à 60 %, et 25 à 35 %.

- L'analyse d'un mélange de **catécholamines** avec et sans paires d'ions

- L'analyse de dextrans par perméation surgel.

- Les études de **stabilité** des matières premières et des spécialités pharmaceutiques.

- les études **pharmacocinétique** et **métabolique** de médicaments ;

- Les études de **suivi thérapeutiques** : analyse de médicaments à marge thérapeutique étroite dans les milieux biologiques (plasma) pour ajuster leur posologie.

à titre d'exemple :

Leclonazépam, l'amphotéricine B, l'itraconazole, la chloroquine, la ranitidine et le clobazam avec un détecteur spectrophotométrique UV/visible,

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

. La lévodopa avec un détecteur électrochimique.

- **Biopharmaceutique** ou biologique

Analyse de masses molaires de polypeptides, protéines, nucléotides analyse protéomique (caractérisation des protéines) [37]

1.11 Avantages et limites :

Le tableau 1.1 met en évidence les avantages et les limites de la HPLC. HPLC est une technique de séparation de premier ordre capable d'analyser à plusieurs composants des échantillons réels et des mélanges complexes. Peu de techniques peuvent égaler sa polyvalence et sa précision de <0,5% d'écart type relatif (RSD). HPLC est hautement automatisée, utilisant des échantillonneurs automatiques et des systèmes de données sophistiqués pour une analyse sans surveillance et la génération de rapports. Une multitude de détecteurs étendent les limites de détection aux niveaux de nanogramme, de picogramme et même de femtogramme. En tant que technique de préparation, il permet une récupération quantitative de nombreux composants labiles en quantités de milligramme à kilogramme. Plus important encore, la HPLC est susceptible de 60% à 80% de tous les composés existants, contre environ 15% pour GC. 3,4 HPLC souffre de plusieurs inconvénients bien connus ou de limitations perçues. Premièrement, il n'y a pas de détecteur universel, comme l'équivalence du détecteur à ionisation de flamme en GC, donc la détection est plus problématique si l'analyte n'absorbe pas les foins UV ou ne peut pas être facilement ionisé pour la détection par spectrométrie de masse. Deuxièmement, l'efficacité de séparation est sensiblement inférieure à celle de la GC capillaire, ainsi, l'analyse des mélanges complexes est plus difficile. Enfin, la HPLC a de nombreux paramètres de fonctionnement et est plus difficile pour un novice. Comme montré dans les chapitres suivants, ces limitations ont été largement minimisées grâce au développement des instruments et des colonnes

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Tableau 4: Avantages et limites de la HPLC

Avantages

- Analyse quantitative rapide et précise
- Fonctionnement automatisé
- Détection haute sensibilité
- Récupération d'échantillons quantitative
- Adapté à divers échantillons

Limitations

- Pas de détecteur universel
- Moins d'efficacité de séparation que GC capillaire
- Plus difficile pour les novices

**Chapitre II : La
qualification**

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

2 Chapitre II : La qualification

2.1 Concept et définitions

La qualification des équipements de laboratoires est l'un des nombreux éléments permettant d'être en conformité avec les réglementations dans le but ultime d'offrir aux patients des produits innovants, sûrs et efficaces.

La qualification des équipements de laboratoires et systèmes informatisés date de 2001 avec la naissance de l'Annexe 15. [61]

2.1.1 Qualification :

La qualification est définie par les BPF comme étant « l'action de prouver et de documenter qu'un équipement ou ses systèmes auxiliaires sont installés convenablement, travaillent correctement et conduisent réellement aux résultats attendus [61].

La qualification est constituée d'une succession de 4 étapes :

- Avant l'achat
- Qualification de la conception (QC)
- Après l'achat
- Qualification à l'installation (QI)
- Qualification opérationnelle (QO)
- Qualification des performances (QP)

- **Qualification de Conception (QC)** : étape qui documente toute la phase de conception avant la décision d'achat d'un nouvel équipement et qui démontre la conformité de la conception par rapport aux bonnes pratiques. La QC commence dès l'étape de définition des besoins utilisateurs et s'étend jusqu'au suivi du fournisseur lors de la réalisation de la qualification de l'équipement. [60]

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

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

- Etablir le budget nécessaire à l'acquisition et à la maintenance.
- Considérer que l'utilisation est facile. [78]

- **Qualification d'Installation (QI)** : « vérification documentée que les installations, systèmes et équipements, tels qu'ils ont été installés ou modifiés, sont conformes à la conception approuvée et aux recommandations du fabricant » [61]

. La QI teste la partie physique de l'équipement.

Elle couvre les procédures qui se déroulent à l'installation de l'appareil dans son environnement, durant cette phase, il doit vérifier que l'appareillage :

- Est accompagné de la documentation requise.
- Est conforme à la commande et livré sans dommage physique
- Est installé dans un environnement qui convient à son utilisation
- Le logiciel et les composants du système communiquent entre eux de façon satisfaisante.
- A l'installation, une étiquette est apposée sur l'appareil comportant un numéro d'identification propre au laboratoire et le numéro de série de l'appareil. [78]

Documents fournis lors de la qualification d'installation :

Caractéristiques techniques et documentation

- des éléments de construction de l'enceinte climatique,
- des éléments de production thermique, chauffage, production d'humidité,
- schémas de fonctionnement.
- des systèmes de commandes et de puissance des installations, régulateurs de température et d'humidité, schémas électriques.
- des capteurs de température, d'humidité, enregistreur de température et d'humidité.
- Principe de fonctionnement des enceintes climatiques, mode opératoire et procédure de mise en service.
- Liste des pièces détachées, procédure de maintenance des équipements[85]

- **Qualification Opérationnelle (QO)** : « vérification documentée que les installations, systèmes et équipements, tels qu'ils ont été installés ou modifiés, fonctionnent comme prévu sur toute la gamme d'exploitation. » [61]

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

La QO teste les caractéristiques dynamiques de l'équipement.

Elle couvre le processus permettant d'établir que l'appareil ou les modules qui le constituent fonctionnent dans leur environnement, dans un intervalle d'utilisation représentatif, suivant les spécifications opérationnelles et que les systèmes informatiques et de sécurité fonctionnent correctement. [78]

Le protocole de qualification opérationnelle présente :

- les objectifs de la qualification,
- les éléments à vérifier,
- la méthode retenue,
- les exigences (limite, nominal, tolérance),
- les fréquences de requalification,
- tests de défaillance et maintenance curative avec indication des risques majeurs et mineurs.

Une mise au point est effectuée par le fournisseur, en présence du personnel client.

Cette opération permet de déterminer et de valider les paramètres et les sécurités du process.[85]

Qualification de Performance (QP) :« vérification documentée que les installations, systèmes et équipements, tels qu'ils ont été agencés, sont en mesure de fonctionner de manière efficace et reproductible, sur la base de la méthode opérationnelle approuvée et de la spécification du produit » [61]

Elle couvre le processus servant à démontrer que l'appareil continue à fonctionner de façon régulière et constante selon les spécifications appropriées à son usage de routine,

Il peut être effectué de façon classique ou automatique avec un logiciel intégré, la qualification de performance est en général faite par l'utilisateur et sous sa responsabilité, à condition qu'il y'ait le matériel et les intrants à cette qualification. Des organismes externes accrédités sont souvent désignés pour assurer les QP.

Pour chaque étape, la démarche de traçabilité est la suivante : Protocole, test et rapport.

[Waters corporation, Waters AQUITY UPLC système OQ / PQ kits de solution de test :

- Pour les cellules d'écoulement de 10 mm, numéro d'article, 700002642,
- Pour les cellules d'écoulement de 25 mm, numéro d'article, 700002846]

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Pour y satisfaire, le fournisseur de l'équipement doit lui aussi avoir été au préalable qualifié.

Dans l'industrie pharmaceutique, sont qualifiés :

- Les équipements : de production et de laboratoire de contrôle, y compris des systèmes informatiques de type « hardware »
- Les locaux (Zones à Atmosphère Contrôlées ou ZAC)

La notion de « Qualification » ne doit pas être confondue avec le terme de « Validation » qui est « l'Etablissement de la preuve, en conformité avec les principes de bonnes pratiques de fabrication, que la mise en œuvre ou l'utilisation de tout processus, procédure, matériel, matière première, article de conditionnement ou produit, activité ou système permet réellement d'atteindre les résultats escomptés » [61]

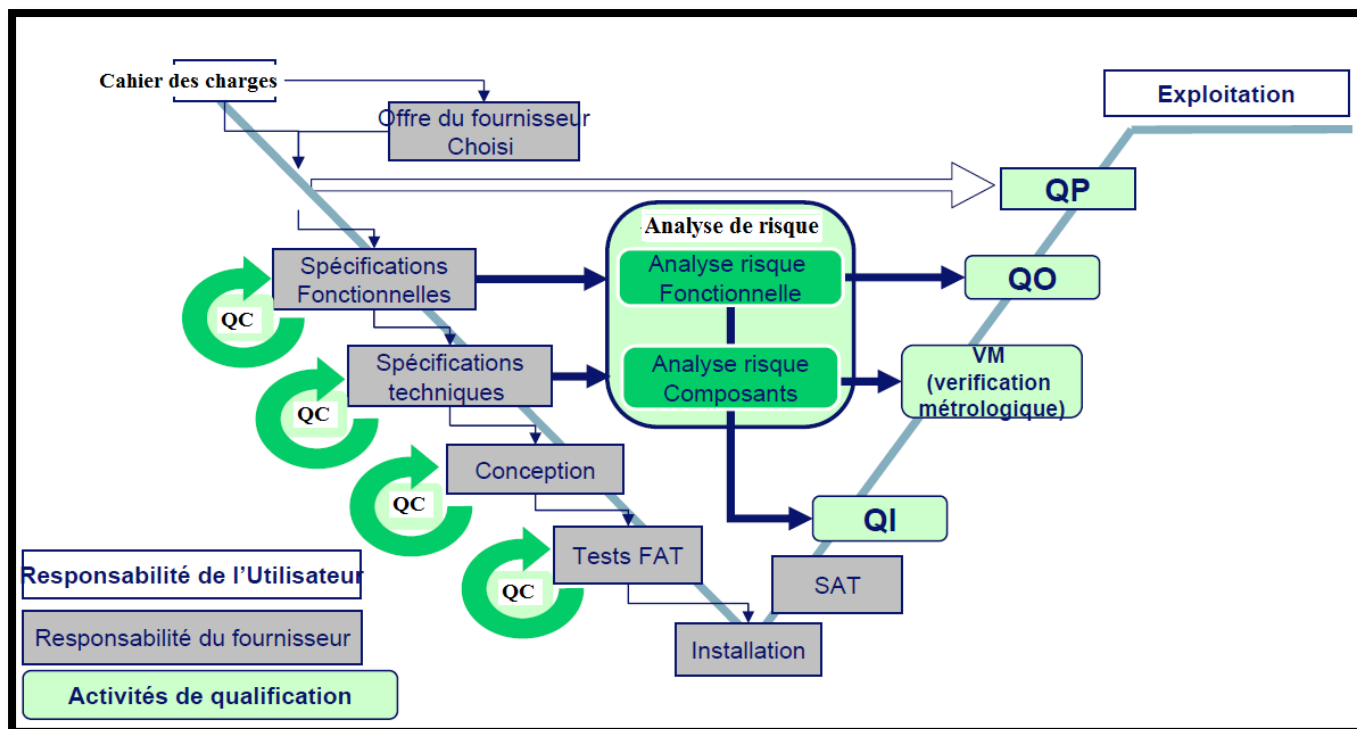


Figure 42 Qualification des équipements

2.1.2 Nécessité de la qualification

La nécessité de qualifier les équipements de laboratoires découle de trois principales raisons :

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

a) Raison légale :

La qualification des équipements est une obligation légale. L'Annexe 15 des GMP « Qualification et Validation », le 21CFR Part 211 abordent la nécessité de qualifier tout équipement de production et de laboratoire

L'USP <1058> Analytical Instrument Qualification et les autres guides tels de le PIC/S, le GAMP 5 établissent des aides pour qualifier/valider, en accord avec les requis réglementaires, les équipements et systèmes informatisés associés, qui seront détaillées.

b) Economique :

Tel que mentionné dans le guide GAMP des laboratoires (ISPE (International Society for Pharmaceutical Engineering). GAMP 5 : A Risk-Based Approach to Compliant GxP Computerized Systems, 2nd édition, 2008.), la mauvaise application des recommandations de validation et de qualification peut impliquer des résultats hors spécifications, des coûts supplémentaires, des pertes de temps, un risque de non-conformité et des problèmes d'intégrité des données. Dans un contexte de concurrence rude des industries pharmaceutiques, la mise en conformité et la démonstration de sa capacité à être performant constitue un véritable enjeu stratégique [64]

Par exemple, un équipement non qualifié ne permettra pas de justifier de la fiabilité des données obtenues. Certes la démarche de qualification/validation demande un investissement mais ce coût est infime comparé aux conséquences d'une non-conformité pouvant conduire à l'arrêt de la production ou à une amende de plusieurs centaines de milliers d'euros [65]

C) Morale :

C'est une question de responsabilité par rapport à la santé publique. L'utilisateur final est un malade, auquel le rôle des industries pharmaceutiques produisant des médicaments une fois l'AMM obtenue est de garantir la qualité, la sûreté et l'efficacité du produit fini. Tout lot libéré doit être conforme au dossier d'AMM tel que celui-ci a été déposé.

La qualification permet de sécuriser les données de manière maximale afin d'éviter que toute personne mal intentionnée ne puisse falsifier un résultat analytique. Ceci conduirait à des effets potentiellement dramatiques une fois administré au patient (effets indésirables, hospitalisation voire décès).

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

2.2 Réglementations applicables à la qualification des équipements de laboratoires et systèmes informatisés associés.

Tout appareil et équipement utilisés dans un laboratoire de contrôle de qualité de produits pharmaceutiques doit être vérifié et qualifié pour l'utilisation à laquelle il est destiné avant sa mise en service, puis au cours de sa vie, le maintien de cette capacité doit être prouvé par des tests appropriés, de manière à garantir l'exactitude et la validité du résultat.

Pour ce faire, des séries de normes ont été établies et mises en œuvre pour répondre aux besoins et attentes des parties intéressées. Voici quelques extraits des normes applicables lors de la qualification des équipements de laboratoire :

La norme ISO 9001 : 2008 - système de management de la qualité / Section 7.6 : 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... »

La norme ISO 17025 : 2005 - laboratoires d'étalonnages et d'essais / Un extrait sur les équipements de laboratoire « Personnel autorisé, identification, numéro de série, fabricant, vérification de conformité, instructions du fabricant, plan de maintenance, dates et copies des rapports, étalonnage, ajustages, critères d'acceptation, certificats d'étalonnage » [81]

« Le matériel de mesure, de pesée, d'enregistrement, de contrôle doit être étalonné et vérifié à intervalles définis et par des méthodes appropriées. Les comptes rendus de ces contrôles doivent être conservés ». [79] [80]

2.2.1 Textes réglementaires.

Les textes réglementaires sont ceux issus des BPF/GMP Européennes et cGMP américaines.

2.2.1.1 Textes orientés équipement

La qualification des équipements de laboratoires a vu le jour dans les années 1990 où de nombreux articles ont été publiés. Le modèle de qualification par 4Q, c'est-à-dire les quatre étapes de la qualification, a été publié en 1995 au Royaume-Uni par le Pharmaceutical Analytical Science Group (PASG)[64].

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

La qualification des équipements permet de satisfaire à l'objectif quotidien d'un laboratoire de contrôle qualité qui est l'obtention de données analytiques fiables.

Le chapitre spécifique au contrôle de la qualité des BPF (chapitre 6) ne stipule pas clairement la démarche à adopter pour qualifier les équipements mais se borde à dire que les équipements doivent être qualifiés et entretenus [61]

Il en est de même pour les cGMP au point 211.160b(4) (section I) : « L'étalonnage à intervalle réguliers des instruments, appareils... selon un programme établi qui contient des indications spécifiques, plannings, limites de précision et d'exactitude et des dispositions concernant les actions correctives dans le cas où les limites d'exactitude et/ou de précision ne sont pas respectées. Les instruments, appareils, indicateurs et dispositifs d'enregistrement qui ne répondent pas aux spécifications établies ne doivent pas être utilisés » [67]

En complément de ce paragraphe, les paragraphes 211.63 et 211.65 (a/b) (section D) des cGMP concernent la conception, la construction, la taille et la localisation des équipements qui doit être adaptée à l'usage prévu (facilité de nettoyage, maintenance) et ne doit pas altérer la sécurité, l'identité, l'efficacité, la qualité ou la pureté du produit pharmaceutique.

Les textes présentés ci-dessous définissent plus spécifiquement les objectifs à atteindre pour qualifier conformément aux exigences réglementaires.

1.2.1.1.1L'Annexe 15 des GMP : Qualification et Validation

La Ligne Directrice 15 « Qualification et de la Validation » a été révisée depuis la version de 2001. La nouvelle version est entrée en vigueur depuis le 1er Octobre 2015. Cette révision est en faveur d'un rapprochement de l'Europe vers les exigences de la FDA en matière de validation des procédés par l'intégration des ICH Q8 (« Développement Pharmaceutique »), Q9, Q10 et Q11 (« Développement et fabrication de substances actives »).

L'ensemble de l'Annexe 15 a été profondément révisée et sa structure modifiée. Des changements notables affectent les activités de qualification des équipements.

En effet, les Spécifications Besoins Utilisateurs (document qui établit les besoins spécifiques de l'utilisateur à la fois par rapport à l'utilisation souhaitée de l'appareil et sa conformité aux GMP) deviennent obligatoires pour tout nouvel équipement. La notion de FAT/SAT (Factory Acceptance Test/Site Acceptance Test) est également intégrée. Il s'agit des tests effectués par le fournisseur à la fois sur son site de fabrication et sur le site de production du client.

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Ces changements ont été incorporés dans le but d'une harmonisation avec les autres textes réglementaires et guides ICH, PIC/S et le GAMP 5. La nouvelle version fait également référence au processus déviation (une déviation est un écart par rapport à une instruction approuvée ou à un standard établi).

Pour la première fois, cette annexe recouvre les systèmes informatisés en précisant qu'ils doivent être validés en accord avec les exigences de l'Annexe 11.

Le tableau ci-dessous (tableau I) présente un comparatif entre l'ancienne et la nouvelle version de l'Annexe, applicable à la qualification.

Tableau I: Comparatif qualification Annexe 15 ancienne et nouvelle version

	Annexe 15 Ancienne Version	Annexe 15 Nouvelle Version
Qualification	Description QC, QI, QO, QP en tant que phases indépendantes les unes des autres (pas de possibilité de combinaison ou de passage à étape ultérieure sans une libération officielle par approbation de l'assurance qualité)	Intégration des spécifications besoins utilisateurs Intégration FAT/SAT Combinaison QI/QO Possibilité d'approbation conditionnelle pour passer à l'étape suivante de qualification en cas de déviation si pas d'impact critique
Requalification	Terme employé : revalidation Vérification des paramètres et limites pour variables critiques Pas de notion de fréquence de Revalidation	Terme employé : requalification Vérification à fréquence appropriée selon des critères d'évaluation prédéfinis

2.2.2 Guides :

2.2.2.1 Pour les systèmes informatisés des équipements

Les systèmes utilisant des enregistrements et des signatures électroniques doivent être en conformité avec les exigences du 21 CFR Part 11 de la FDA et du guide Scope and Application associé lorsqu'un industriel vend ses produits aux Etats-Unis. Si la vente

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

s'effectue en Europe, c'est l'annexe 11 des GMP et le document du PIC/S PI011-3 qui seront pris en compte. Mais au-delà des Etats-Unis et de l'Europe, de nombreuses agences réglementaires internationales font maintenant partie du PIC/S, faisant ainsi du PI 011-3 la référence internationale pour la gestion des systèmes informatisés et automatisés. Le GAMP 5, guide reconnu par les industriels et les instances réglementaires, n'est pas en reste puisqu'il intègre toutes les exigences du PIC/S [60]

2.2.2.2 L'USP <1058> (United States Pharmacopoeia)

Le chapitre général <1058> de la Pharmacopée US, intitulé Analytical Instrument Qualification datant de 2008, explique la manière d'obtenir des données de qualité. Contrairement aux validations de méthodes et aux SST, la qualification des équipements analytiques n'a pas de guidance spécifique. Le texte souligne également le fait que diverses opinions existent à ce sujet, ce qui implique une diversité d'options et de démarches pratiques au sein des industries pharmaceutiques. Le chapitre ne prétend qu'apporter une approche scientifique à l'activité de qualification, considérant que cette activité est l'un des éléments majeurs permettant de générer des données cohérentes et reproductibles.

2.2.2.3 Le GAMP 5

GAMP 5 découle un ensemble de guides pratiques (Good Practice Guides) pour les infrastructures, les enregistrements électroniques et signatures, l'archivage des données etc. Il fournit une vue d'ensemble du cycle de validation des systèmes informatisés de laboratoires, depuis le concept jusqu'au retrait du SI. Comparé aux textes réglementaires, ce guide apporte des compléments indispensables quant à comment procéder pour valider les systèmes. Il insiste notamment sur l'importance de l'étude de la documentation fournisseur et sur les connaissances nécessaires quant à l'utilisation souhaitée en interne afin d'éviter les tests inutiles sans valeur ajoutée.

L'approche requière une meilleure connaissance de l'utilisation du système et du procédé en vue d'améliorer l'efficacité et la productivité en se focalisant sur les activités les plus critiques.

Le laboratoire de contrôle doit maîtriser les risques liés à l'intégrité des données en fonction de leur importance. Les efforts prouvant que le système correspond à l'utilisation

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

souhaitée doit être basée sur les aspects critiques que sont l'intégrité de données, la sécurité du patient et la qualité du produit. Ces aspects critiques doivent être identifiés, spécifiés et vérifiés. Il est préférable d'intégrer la vérification à la fois du hardware et du software. Des instructions pour l'utilisation des données électroniques critiques, en accord avec les réglementations telles que le 21 CFR part 11, sont également fournies (ISPE (International Society for Pharmaceutical Engineering). GAMP 5: A Risk-Based Approach to GxP Compliant Laboratory Computerized Systems (Second Edition), October 2012.).

Le guide contient également 13 annexes dont la catégorisation détaillée des logiciels, les requis de validation selon la catégorisation, l'intégrité des données, le management de la sécurité des SI de laboratoires, la définition des enregistrements et données brutes.

Le GAMP 5 établit les rôles et responsabilités des propriétaires et administrateurs d'un SI. Le propriétaire du système est la personne responsable des ressources financières et humaines nécessaires à la vie du système. Il s'agit habituellement du responsable du laboratoire. Il est responsable du système durant toute sa durée de vie, s'assure du respect des procédures associés au système et constitue le contact privilégié auprès des autorités réglementaires ou tierce-parties.

L'administrateur du système est responsable du bon fonctionnement de l'application et de l'infrastructure du système au cours de son cycle de vie. Cette personne dispose d'une expertise du système pour des activités demandant une compétence spécifique (tel que la sauvegarde et la sécurité des données) tout en respectant les procédures générales informatiques. Cette personne ne constitue en aucun cas un utilisateur en routine du système, mais elle s'assure du maintien du système dont elle est en charge [72]

2.2.2.4 L'ICH

Le terme qualification est utilisé pour les équipements, installations, utilités et locaux.

La validation du procédé de fabrication ne peut être réalisée que sur des équipements qualifiés. La qualification est essentielle pour une mesure précise et juste : si le matériel n'est pas qualifié, assurant que les résultats indiqués sont dignes de confiance, tout autre travail basé sur l'utilisation de ce matériel sera suspect. La qualification est « l'action de fournir et documenter que l'équipement ou les matériels annexes sont correctement installés, fonctionnent correctement et fournissent en réalité les résultats attendus. La qualification est

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

partie intégrante de la validation mais les étapes de qualification seules ne constituent pas la validation de procédé. » [74]

2.3 Divers guides et réglementations dans un même but

La stratégie de qualification des équipements de laboratoire repose sur plusieurs textes (réglementaires et guides). Tous ne couvrent pas les mêmes requis. Une étude attentive de la littérature s'avère nécessaire afin de construire sa propre stratégie tout en respectant la législation.

Le tableau II ci-dessous présente les diverses approches des étapes de qualification selon les GMP Européennes, l'USP <1058> et le GAMP 5 :

	Approche GMP (Annexe 15)	Approche USP <1058>	Approche GAMP 5
QC	Etape qui démontre que la conception proposée par le fournisseur a été comparée par rapport aux spécifications, aux GMP et au cahier des charges définissant le projet	Vérification documentée des activités qui ont permis de définir les spécifications fonctionnelles et opérationnelles de l'équipement et les critères de sélection ayant permis de choisir le fournisseur Basée sur l'utilisation souhaitée de l'équipement	Revue du design. Evaluation des livrables pour s'assurer qu'ils satisfont aux besoins spécifiés
QI	Etape démontrant que la construction et l'installation sont conformes à ce qui avait été prévu dans le cahier des charges et la QC. La QI prouve via vérifications techniques et documentaires que l'équipement construit, réceptionné et installé dans l'industrie est conforme au cahier des charges pré établi.	Documentation des activités permettant d'établir qu'un équipement est livré tel que dessiné et spécifié, qu'il est convenablement installé dans l'environnement sélectionné, et que cet environnement lui est adapté description détaillée des activités et documentation caractéristiques	Vérification, tests ou autre vérification démontrant : Une installation correcte du software et de l'hardware La configuration correcte du software et de

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

			l'hardware
QO	Phase prouvant au travers d'un certain nombre de tests que l'équipement tel qu'il est installé, fonctionne conformément aux spécifications du fabricant	Vérification documentée que le système fonctionne selon les spécifications opérationnelles écrites et préétablies dans l'environnement défini Description détaillée des paramètres fixes à tester, tests fonctionnels et sécurité des Données	Vérification que le système fonctionne selon les spécifications déterminées dans la plage de mesure souhaitée
QP	Etape démontrant qu'un procédé s'exécute correctement et qu'il produit de manière répétitive un résultat conforme à ses spécifications dans des conditions réelles, c'est à dire normales et limites («worst case»). Il donne lieu à la libération officielle des installations, systèmes et équipements	Vérification documentée que le système fonctionne conformément aux spécifications souhaitées par l'utilisateur et que l'équipement est approprié pour l'usage souhaité	Vérification démontrant l'aptitude à l'usage prévu et permettant l'acceptation du système selon les exigences spécifiques

2.4 La mise au point sur la terminologie

Les terminologies utilisées dans ces divers textes sont différentes. Alors que l'Annexe 15 établit clairement une différence entre la qualification et la validation, le GAMP 5 et l'USP<1058> utilisent le terme de vérification. Ce terme inclus à la fois la qualification et la validation en tant que preuve que le système est adapté à l'usage prévu selon la définition de l'ASTM (American Society for Testing and Materials) Standard E2500. La vérification est l'approche systématique de vérifier que la fabrication des systèmes, qu'ils soient seuls ou

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

combinés, sont adaptés à l'usage prévu, sont installés et fonctionnent correctement. Il s'agit d'un terme générique englobant tous types d'approches pour garantir une utilisation adaptée dans la qualification, la mise en service, la validation du système ou autres appellations.[75] En Mars 2003, un groupe de travail, sponsorisé par l'ISPE, l'AAPS (American Association of Pharmaceutical Chemists) et le FIP (International Pharmaceutical Federation), statua sur l'approche scientifique de la qualification des instruments analytiques. L'ensemble des parties (regroupant utilisateurs, spécialistes de l'assurance qualité, fournisseurs, consultants et affaires réglementaires) s'accordèrent pour statuer qu'un procédé se valide et qu'un équipement se qualifie.[76]

C'est pourquoi le terme choisit dans le cadre de ce travail sera celui de qualification lorsqu'il s'agit des activités de QI, QO, QP. Cet ensemble intégrera la validation en lui-même du système (équipement plus système informatisé).

Un autre point, pouvant prêter à confusion par la traduction des termes anglais utilisés, est que l'Annexe 15 présente bien le terme équipement tandis que l'USP <1058> utilise le terme instrument. Un instrument est un type d'équipement s'il est utilisé pour la fabrication, l'emballage ou au laboratoire.[77]

. Ces deux termes sont considérés comme équivalents dans le cadre de ce travail puisque les équipements de laboratoires sont concernés.

Bien que les définitions des phases de qualification présentent certaines différences, l'essentiel est de s'appuyer sur la catégorisation des équipements qui permettra de savoir la stratégie de qualification/validation à adopter.

2.5 Classification des équipements selon l'USP <1058>

L'USP <1058> classe les équipements en trois catégories :

Tableau 5: Les trois catégories des équipements selon l'USP (1058)

Catégorie	Description
Équipement USP <1058>	
Groupe A	Équipement standard ne donnant pas de résultat tels que des agitateurs magnétiques, les vortex ou encore les centrifugeuses. La conformité des

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

	équipements du groupe A aux besoins utilisateurs peut être vérifiée et documentée par observation visuelle du bon fonctionnement.
Groupe B	Equipements standard, instruments donnant des valeurs mesurées et équipements contrôlant des paramètres physiques (pression, température...) nécessitant un étalonnage. Cette catégorie comprend par exemple les balances, les pH-mètres, les titrateurs, les viscosimètres ou encore les réfrigérateurs, fours, pompes, diluteurs. La conformité des équipements de catégorie B est déterminée selon les procédures normalisées d'exploitation de l'instrument et documentées pendant la QI et la QO.
Groupe C	Equipements comprenant un système informatisé, tel que spectrophotomètres infrarouges, UV/visible, chromatographies en phase gazeuse, lecteurs de microplaques... La conformité des instruments du groupe C aux besoins des utilisateurs est déterminée par les tests fonctionnels spécifiques et les tests de performance. Un processus de qualification complet, tel que décrit dans l'USP <1058> devrait s'appliquer à ce type d'instruments.

L'USP précise que pour un équipement donné, sa catégorie doit être évaluée par l'utilisateur en fonction des exigences requises (57) .

2.6 Organisation et Planification des activités de Qualification

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.

2.6.1 Stratégie globale de qualification des équipements, définie au Plan de Qualification/Validation du site

Selon les GMP, les activités relatives à la qualification/validation doivent être planifiées via un Plan Directeur de Validation (PDV), ou documents équivalents, décrivant les principales activités afin d'assurer le niveau de qualité approprié tout au long du cycle de qualification/validation. Ces activités sont réalisées par des personnes formées suivant des

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

procédures approuvées par l'Assurance Qualité. Véritable document support, le PDV décrit la politique et la stratégie à déployer pour la réalisation et le suivi des activités de qualification de ses équipements. Ce document peut regrouper l'ensemble des systèmes, équipements, procédés, matériels et locaux du site. Habituellement, un plan est dédié par famille : qualification, validation de procédé et nettoyage. Le PDV appliqué aux équipements intègre :

- La politique de Qualification du site
- La structure organisationnelle des activités de qualification
- Les responsabilités des diverses parties
- Le relevé des équipements et SI associés à qualifier et existants (en utilisation ou en cours de retrait)
- Les modèles requis pour chaque document de qualification (QI, QO, QP)
- Les méthodologies employées (certains équipements simples ne requièrent pas de QP)
- La notion de maîtrise des changements : selon la gestion des Change Control en interne.

Le programme de qualification global peut ensuite être retranscrit sous forme de planning afin de prioriser les projets de qualification (33) (55).

2.6.2 Etablissement des rôles et responsabilités des différents acteurs d'un projet de qualification

Les rôles et responsabilités des divers acteurs peuvent légèrement différer selon les industries. Le tableau ci-dessous (tableau VIII) résume les principaux requis en matière de rôles et de responsabilités conformément aux GMP, à l'USP <1058> et à l'Annexe M3 du GAMP 5 (56)

Tableau 6: les principaux requis en matière de rôles et de responsabilités conformément aux GMP, à l'USP <1058> et à l'Annexe M3 du GAMP 5 (56) :

Acteur	Rôles/Responsabilités
Technicien de laboratoire (pour l'équipement dont il est responsable)	- Rédaction des documents reliés à la qualification/requalification de l'équipement - Suivi documentaire de l'équipement

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

	<ul style="list-style-type: none"> - Exécutant des tests de qualification/requalification - Vérificateur des tests effectués par une entreprise extérieure (sous-traitance) - Maintenance préventive et curative de l'équipement
Responsable de laboratoire	<ul style="list-style-type: none"> - Exprime les besoins quant à l'acquisition d'un nouvel équipement - Vérificateur de l'ensemble des documents de qualification/requalification, manuel d'utilisation, d'administration de son laboratoire/unité - Nomme le responsable équipement et son suppléant en cas d'indisponibilité de celui-ci
Responsable/coordonateur qualification	<ul style="list-style-type: none"> - Rédaction du Plan de Qualification global - Gestion des activités de qualification - Vérificateur de l'ensemble des documents de qualification/requalification, manuel d'utilisation - Rédaction des Plan de Qualification système, Analyse de Criticité, Analyse de Risques, matrice de traçabilité - Planification des activités de qualification et de requalification - Interlocuteur privilégié des fournisseurs
Administrateur des systèmes informatisés	<ul style="list-style-type: none"> - Vérificateur de l'ensemble des documents de qualification/requalification - Rédaction des manuels d'instructions d'administration, sauvegarde et restauration du système - Rédaction et exécution des tests liés au système Informatisé
Assurance Qualité	<ul style="list-style-type: none"> - Approbation des documents de qualification (protocoles et rapports) - S'assure du respect de la réglementation - Evalue les demandes de changements via Change Control

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

	- Gestion des écarts/déviations du site
--	---

Les utilisateurs peuvent être aidés d'autres personnes qualifiées tels que des consultants et des spécialistes. Cependant, c'est aux utilisateurs que revient la responsabilité finale de la qualification du système.

La responsabilité des fabricants est explicitée à la fois dans l'Annexe 15, l'USP<1058> et le GAMP 5. Ils sont à la fois responsables de la QC, de la validation du process et de la fabrication en elle-même de l'équipement qu'ils doivent tester avant expédition (impliquant la notion de Factory Acceptance Test). La version draft de l'USP <1058> renforce également leur responsabilité en indiquant qu'ils doivent fournir aux utilisateurs les formations et un support technique (maintenance, réparation). Un accord établissant les rôles et responsabilités de chaque tierce partie doit exister entre l'utilisateur et le fournisseur.

2.6.3 Notion de cycle de Qualification

La validation d'un système informatisé ou d'un procédé est modélisée selon un cycle en V

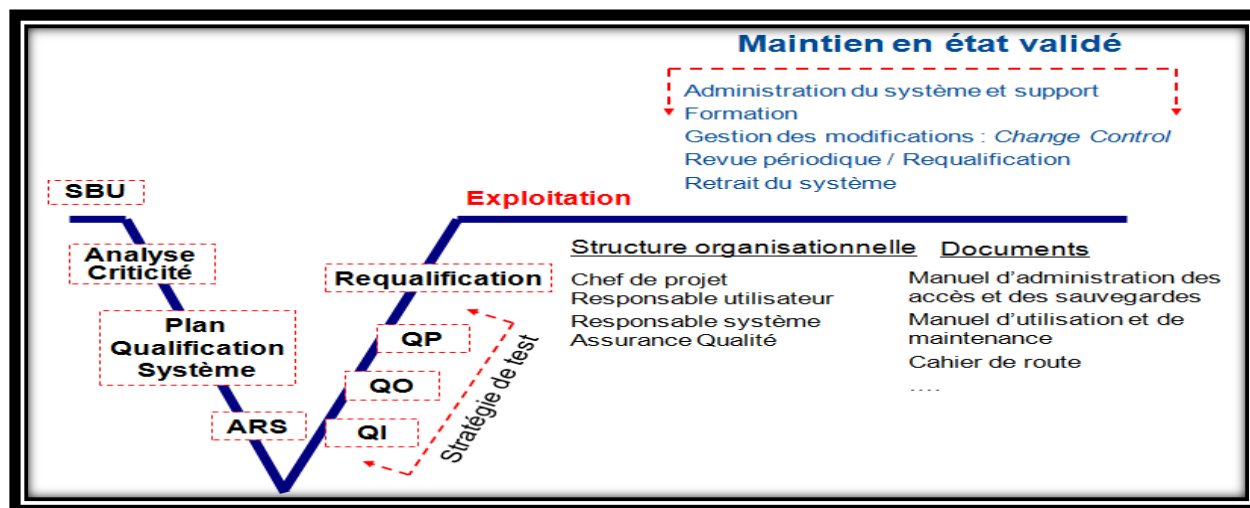


Figure 33: Cycle de Qualification/Validation d'un système

Ce cycle en V regroupe les différentes étapes du cycle de vie d'un système, depuis l'établissement des besoins utilisateurs jusqu'à sa mise en exploitation et son maintien. Le retrait intervient à la fin de l'exploitation du système (notion uniquement présente dans le GAMP 5). Selon le GAMP, « l'approche du cycle de vie implique de définir et de mener à bien des activités de façon systématique à partir de la conception, de comprendre les

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

exigences à travers le développement, la libération et l'exploitation opérationnelle jusqu'au retrait du système » (7).

La plupart des systèmes informatisés de laboratoires sont des standards ou des produits configurables dont le hardware et la partie logicielle sont étroitement liées et qualifiées en tant qu'unité. La validation du SI s'effectue en même temps que la qualification de l'équipement analytique. Par exemple, il serait inapproprié de tester séparément la partie logicielle de la partie matérielle d'un spectrophotomètre proche infrarouge

2.7 Etapes de Qualification des équipements

Selon la figure 6, le cycle en V illustre la validation par différentes phases depuis le développement initial des spécifications des besoins des utilisateurs (SBU), en passant par la planification des activités, l'analyses de risques et tests de qualification initiale permettant l'utilisation en routine du système jusqu'à la fin de son utilisation. Chaque étape de qualification satisfaisant aux critères élaborés au protocole fait l'objet d'une libération officielle par l'Assurance Qualité pour réaliser l'étape suivante.

L'Annexe 15 des GMP autorise la combinaison d'étapes de qualification (tel que QI avec QO). Une autorisation de passage à l'étape ultérieure de qualification via une approbation conditionnelle de l'assurance Qualité est envisageable (3).

2.7.1 Consolidation de l'analyse et définition des tests à réaliser

L'Analyse de Risques est ensuite revue, analysée et consolidée en réunion avec les divers acteurs du projet, avec identification du type de test à réaliser.

2.7.2 Tests de vérification d'installation et de configuration (QI)

Les tests de QI doivent couvrir l'ensemble des composants en rapport avec le système informatisé et démontrer que les risques identifiés sont sous contrôle.

Ce sont des tests de vérification documentaire, de vérification physique / logique / paramétrage par rapport à des spécifications dites techniques. Ce type de spécification décrit les contraintes et les environnements dans lesquels doivent évoluer les systèmes.

2.7.3 Tests de vérification fonctionnelle (QO)

Les tests de QO doivent couvrir l'ensemble des fonctions identifiées comme critiques.

Le tableau XII ci-dessous montre la profondeur des tests à réaliser selon le niveau de risque

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Associé :

Tableau 7: Profondeur des tests réalisés en fonction du niveau GxP

Niveau GxP/ Priorité de risque	Notation	De risque Notation Profondeur de test
Pas d'impact GxP (Business)	Faible	Pas de test obligatoire
	Moyen	Test fonctionnel (potentiellement réalisé par le fournisseur)
	Elevé	Vérification de procédures
Impact mineur	Faible	Pas de test ou test fonctionnel ou vérification de procédure
Impact majeur	Moyen	Test nominal
Impact critique	Elevé	Test fonctionnel nominal et des tests défailants/ dans des conditions de stress / tests limites à réaliser selon applicabilité. Test nominal Test de défaillance Tests aux limites

Le tableau XII met en évidence quatre types de tests de qualification :

- Tests fonctionnels : Test de fonctionnement élémentaire que le composant est opérationnel dans une configuration standard. Ce test est en général réalisé par le fournisseur.
- Test nominal : Le test nominal vérifie que le composant est opérationnel dans des plages de fonctionnement représentatives prévues dans les spécifications de l'entreprise avec un paramétrage ou un réglage représentatif des conditions réelles d'exploitation prévues. Ce type de test démontre que le système fait bien ce qu'il est censé faire.
- Test de défaillance : Le test de défaillance vérifie la réponse du système dans des conditions anormales de fonctionnement. Ce type de test démontre que le système

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

ne fait pas ce qu'il n'est pas censé faire.

- Test aux limites : Le composant est opérationnel et détecte, ou rejette, les données ou les situations erronées ou les états d'anomalie. Le test aux limites vérifie le fonctionnement dans les limites extrêmes du fonctionnement standard, c'est-à-dire dans les situations les plus défavorables de fonctionnement.

2.7.4 Tests de vérification de performance (QP)

En QP, les vérifications effectuées doivent couvrir l'ensemble des processus en rapport avec le système. Des vérifications documentaires (procédures, formation...) sont principalement réalisées. D'autres tests sur le système sont réalisés et visent à démontrer la performance du système dans son environnement de routine et dans le temps.

2.7.5 La Qualification de Conception (QC)

La Qualification de Conception (QC) documente toute la phase de conception avant la décision d'achat d'un nouvel équipement. Cette phase démontre la conformité de la conception par rapport aux besoins des utilisateurs et aux bonnes pratiques. La QC commence dès l'étape de définition des besoins utilisateurs et s'étend jusqu'au suivi du fournisseur lors de la réalisation de la qualification de l'équipement.

2.7.6 Factory Acceptance Testing (FAT) / Site Acceptance Testing (SAT)

La notion de FAT et de SAT est nouvelle dans les GMP Européennes (3). Les Tests d'Acceptation Fournisseur ou Factory Acceptance Testing (FAT) sont des tests exécutés chez le fournisseur. Il s'agit d'une vérification de la conformité de l'équipement vis-à-vis de la SBU/spécifications fonctionnelles générales, avant d'accepter l'envoi sur site du système (33).

La FAT s'applique plus particulièrement aux technologies nouvelles et complexes (elle n'est donc pas directement applicable à la catégorie 3 du GAMP 5). Certains tests de QI/QO pourraient être effectués à la FAT sans nécessité d'être déroulés sur site de livraison si une justification de la non altération de la fonctionnalité par le transport et l'installation est apportée.

Les Tests d'Acceptation sur Site ou Site Acceptance Testing (SAT) font suite à la réception de l'équipement sur le site de fabrication et complètent ainsi la FAT. Les mêmes vérifications

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

sont effectuées que durant la FAT, mais après réception sur site. La FAT et la SAT doivent être déroulées avec l'équipe projet et le fournisseur

2.7.7 La Qualification d'Installation (QI)

La qualification d'installation fournit la preuve documentée que les composants matériels et logiciels sont installés selon les spécifications écrites et approuvées au préalable. Elle est destinée à vérifier que le système est correctement installé. Différents types de tests sont envisagés :

- Vérification de l'environnement (température, humidité relative, vibrations etc.)
- Vérification de l'installation physique (branchements, câbles, imprimante, PC etc.)
- Vérification de l'installation du logiciel (version installée, paramétrage des droits de Windows, écran de veille etc.) et du paramétrage de l'application (profils utilisateurs, activation de l'audit trail etc.)
- Vérification de la présence de la documentation fournisseur (manuels d'utilisation, documents de qualification, Curriculum Vitae de l'installateur etc.)

2.7.8 La Qualification Opérationnelle (QO)

La qualification opérationnelle fournit la preuve documentée que le système fonctionne selon les spécifications écrites et approuvées. La QO teste le fonctionnement du système.

La vérification fonctionnelle du système se traduit par :

- La vérification du bon fonctionnement des profils utilisateurs et de la sécurité des accès
- Des tests de vérification du pilotage de l'équipement par le système et de l'acquisition des données
- Des tests de vérification des calculs : précision, exactitude...
- Des tests de vérification de la sécurité des données informatisées (non supprimables, non modifiables etc.)
- Des tests de répétabilité d'injection ou de prélèvement...

En accord avec l'Analyse de Risques, la QO n'est pas une vérification du fonctionnement de toutes les fonctions, mais une vérification des fonctions critiques utilisées (par exemple : tests de répétabilité d'injection sur substance la plus visqueuse, définie comme la plus critique).

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Ces deux phases QI et de QO peuvent être regroupées dans un seul et même document selon la nouvelle version de l'Annexe 15 des GMP. Les deux phases sont ainsi formalisées dans un protocole / rapport identifié Qualification d'Installation et Opérationnelle, la partie protocole étant signée avant la réalisation des tests. Suite à la réalisation des tests de QI et de QO, une partie rapport doit être renseignée. La signature de la partie rapport permet de statuer sur la poursuite de la qualification en QP (voir autorisation de passage en QP même si QI/QO non finalisé si pas d'impact).

2.7.9 La Qualification de Performance (QP)

La Qualification de Performance (QP) vérifie le processus d'utilisation et de performance du système avec le personnel. La QP fournit la preuve documentée que le système est capable de réaliser les analyses pour lequel il été configuré, selon les spécifications écrites et approuvées au préalable, dans son environnement de routine.

La QP peut contenir plusieurs phases, par exemple :

- Une première phase couvrant la vérification d'aptitude du système où la documentation de son utilisation (manuel utilisateur équipement et administration) est vérifiée ainsi que le fonctionnement répétable et sous contrôle du système
- Attestation de formation des utilisateurs selon leurs niveaux (utilisateur, administrateur)
- Attestation de formation du formateur
- Vérification que des manuels d'utilisation du système et d'administration sont disponibles
- Vérifier que ces manuels sont exacts...

L'approbation du rapport de la première phase permet le déroulement de la seconde phase qui correspondra à la vérification de la performance analytique du système dans son environnement d'utilisation de routine et dans le temps. La QP d'un système doit être effectuée avant la validation des méthodes analytiques.

Le rapport de QP conclut quant à l'acceptation finale de l'utilisation du système, son approbation atteste du statut qualifié (opérationnel et maîtrisé). Lorsque le système peut être libéré pour être mis en routine, une étiquette de conformité est apposée sur l'équipement et signifie qu'il peut être utilisé jusqu'à la date définie de la requalification.

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

2.7.10 La Requalification

La requalification d'un équipement consiste à prouver que le système fonctionne toujours selon les spécifications établies, c'est-à-dire qu'il donne toujours des résultats analytiques fiables. La fréquence de requalification doit être évaluée et appropriée (ni trop souvent, ni pas assez) selon l'analyse de risques. La requalification est essentielle puisqu'elle garantit l'intégrité des données sur toute la période d'utilisation de l'équipement.

2.8 Documentation des activités de qualification (QI, QO, QP et Requalification)

2.8.1 Protocole de Qualification

Le protocole est un document écrit précisant les modalités de mise en œuvre des activités de qualification, les étapes critiques et critères d'acceptation de conformité aux tests effectués. Quel que soit le type de protocole choisi (la rédaction n'étant pas normalisée), son approbation par l'Assurance Qualité est obligatoire avant la réalisation des essais.

Un protocole de qualification doit, à minima, contenir les éléments suivants :

- Description générale de l'équipement/système à qualifier
- Objet de la qualification, périmètre (service, produit concerné), pré requis au déroulement (exemple pour la QP : approbation du rapport de QO)
- Description des responsabilités de chaque service acteur de la qualification (technicien de laboratoire de contrôle, responsable laboratoire, assurance qualité, pôle qualification/validation)
- Les instructions à suivre pour la réalisation des tests, description des paramètres mesurés
- Description de la méthode d'analyse des résultats
- Critères d'acceptation
- Description de la gestion des éventuels écarts, déviations liées au protocole selon les procédures internes et dans le respect des GMP

Si ce protocole est fourni par un tiers (exemple : fournisseur), le personnel approprié doit juger de sa conformité vis-à-vis des procédures internes. Un protocole fournisseur peut être complété par des protocoles internes additionnels.

Tout changement significatif par rapport au protocole approuvé durant l'exécution des tests (exemple : critères d'acceptation), doit être documenté comme un écart et justifié de manière

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

scientifique. Les résultats ne satisfaisant pas aux critères d'acceptation sont enregistrés en tant qu'écart et investigués en accord avec les procédures internes (33), pouvant aboutir à des déviations selon la criticité.

2.8.2 Fiche de Test

La Fiche de Test permet de renseigner les tests à réaliser, l'environnement et les résultats. Les fiches de test vierges se trouvent habituellement en annexe du protocole.

Celles complétées lors de l'exécution des tests sont en annexe du rapport.

Les éléments ci-dessous doivent être trouvés dans les fiches de tests (liste non exhaustive) :

- Liste des participants aux tests : rôles, date et visas
- Liste et identification du matériel utilisé
- Pré requis si applicable (exemple : accès utilisateur au système informatisé)
- Conformité de chaque cas de test vis-à-vis des critères d'acceptation (un test est considéré comme conforme lorsque le résultat obtenu correspond aux spécifications)
- Conformité de la fiche de test (si l'un des critères d'acceptation n'est pas conforme, l'ensemble de la fiche de test est considérée comme non conforme)
- Fiche d'écart ou d'incident lors d'anomalies de qualification

Lors de leur exécution, ces fiches doivent être complétées dans le respect des bonnes pratiques documentaires (écrire avec un stylo indélébile, barrer d'un simple trait toute erreur, dater et viser).

Chaque test est déroulé par le testeur attitré (technicien pour exécution des analyses, administrateur pour tâches informatiques d'administration du système). Un vérificateur l'accompagne dans sa démarche et s'assure de la réalisation correcte du test. Les fiches de tests sont revues par l'Assurance Qualité en même temps que le rapport de qualification

2.8.3 Ecart de qualification

Tout écart de qualification par rapport aux critères d'acceptation devra être traité. Le cas échéant, une fiche d'incident sera complétée. Celle-ci contiendra à la fois une description de l'anomalie constatée, son impact (réglementaire ou business), sa cause probable et l'action corrective mise en place. Une non-conformité majeure peut aboutir à une déviation.

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Dans le cas d'une non-conformité nécessitant la réexécution de la fiche de test (ou uniquement du test ayant engendré l'anomalie), une nouvelle fiche de test sera déroulée et jointe au rapport.

2.8.4 Rapport de Qualification

L'exécution de l'ensemble des tests relatifs à la phase de qualification (QI, QO, QP) effectuée, un rapport de qualification est alors rédigé. L'ensemble de la qualification doit être étudiée, les conclusions reportées et les résultats obtenus résumés par rapport aux critères d'acceptation : « Toute modification ultérieure des critères d'acceptation doit être scientifiquement justifiée et une recommandation finale faite quant à l'issue de la validation » (1).

Le rapport combine les essais ayant été déroulés et leur conformité pour apporter une décision finale au passage ou non à l'étape ultérieure. Le rapport est indépendant du protocole mais est relié à celui-ci par un numéro.

Les informations figurant dans le rapport de qualification sont les suivantes :

- Historique des qualifications antérieures, si applicable
- Période d'exécution des tests
- Résultats de la conformité de chaque fiche de test et synthèse globale
- Liste des écarts relevés (et déviations le cas échéant)
- Conclusion générale

Avant utilisation du système en routine, un rapport final de qualification peut être rédigé. Il couvre la totalité des résultats et résume les anomalies rencontrées. Le statut final du système est alors défini (qualifié, non qualifié, qualifié sous réserve) (3) (33).

2.8.5 Documents annexes

2.8.5.1 Rédaction d'un manuel opérationnel

Le manuel opérationnel standardisé est un document qualité décrivant les modalités d'utilisation et de maintenance pour chaque équipement. Ces manuels peuvent être regroupés par famille d'équipements. Les flux de processus et responsabilités liées l'utilisation du système sont décrits. Ce document doit être précis, directif et sans ambiguïté, puisqu'il est utilisé par les techniciens en routine.

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Dans ce manuel, le flux nécessaire depuis la mise en route de l'équipement jusqu'à l'obtention des données brutes, leur exploitation, le nettoyage et l'arrêt est scrupuleusement détaillé.

Les contrôles à effectuer avant analyse (SST, calibration), les programmes à utiliser, la manière de codifier la séance d'analyse et les échantillons, la manière de générer les rapports et impressions sont ainsi procédurées. Tout utilisateur doit se conformer à ce qui est écrit dans ce manuel. Le document est situé à côté de l'équipement et doit toujours être disponible.

Le manuel décrit également les actions à mener en cas de panne sur l'un des composants du système ou selon les messages d'erreurs pouvant être générés.

2.8.5.2 Rédaction d'un manuel d'administration

Le manuel d'administration système est spécifique à la gestion de chaque SI de laboratoire. Il est rédigé par l'administrateur des systèmes informatisés.

Ce manuel comporte à la fois :

- La configuration minimale du système et des sécurités générales :
 - PC client : connexion au poste, horloge du système, langage, antivirus...
 - Applicatif : chemin complet des exécutables de lancement, verrouillage des accès, déconnexion automatique...
- La gestion des utilisateurs (profils et privilèges, création, modification, désactivation, déblocage de compte)
- La gestion des méthodes, des données et signatures (si gestion électronique ou papier), la gestion des rapports d'analyse
- La sauvegarde, l'archivage et la restauration du système
- La conservation et la sécurisation des données
- La gestion l'audit trail
- La surveillance du système (vérification espace disque, des sauvegardes, des messages d'erreurs...) et des accès

Ce document permet de définir les différents niveaux d'accès selon les requis réglementaires. L'administrateur système ne doit pas pouvoir lancer d'analyse. Certains opérateurs ont le droit de créer et de modifier des méthodes (sous couvert qualité), alors que d'autres ne feront que les analyses de routine.

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

2.8.5.3 Le Cahier de Route

Selon les BPF, (§4.31) : « Les équipements principaux ou critiques en fabrication comme en contrôle de la qualité et les locaux de production doivent être accompagnés d'un cahier de route mentionnant, par ordre chronologique, et selon les cas, l'utilisation qui en est faite, les opérations d'étalonnage, d'entretien, de nettoyage ou de réparation avec les dates et le nom des personnes ayant effectué ces opérations » (1).

Le Cahier de Route doit se trouver à côté de l'équipement. Il doit exister depuis l'installation de l'équipement au laboratoire, avant le démarrage des étapes de qualification.

Toutes les informations décrites aux GMP doivent y figurer, de même que les étapes de vie du système (qualification, requalification) et les événements (messages d'erreurs...) pouvant survenir tout au long de la vie du système

2.8.6 La vie du système après qualification initiale

2.8.6.1 Requalification

La qualification initiale d'un équipement ne permettant pas de garantir le maintien de ce statut, garantir la maîtrise de son équipement pendant toute sa période d'exploitation est nécessaire. Par conséquent, l'objectif de la requalification est de reconduire le statut qualifié de l'équipement par l'établissement de la preuve documentée que les paramètres critiques du système ont été maîtrisés et que l'intégrité des données est toujours assurée.

La 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 CQ. La démarche de protocole, avec fiches de tests vierges devant être approuvées par l'AQ avant déroulement, est identique à celle décrite au §2.5.1. Il est préférable de programmer les opérations de requalification un mois avant échéance. Une étiquette de validité est apposée sur l'instrument après chaque

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

requalification conforme. Cette étiquette comporte la période de validité du système jusqu'à la prochaine vérification périodique. En cas de dépassement de la durée de validité ou de non-conformité lors du déroulement des tests, une étiquette de non-validité de l'instrument se substitue à celle de validité. L'équipement est alors inutilisable jusqu'à nouvel ordre. Toute analyse qui serait effectuée durant cette période sera invalide.

La requalification est dite partielle lorsqu'elle concerne les équipements et systèmes qualifiés ayant subi des modifications techniques (changement d'un composant). Elle est basée sur l'analyse de risques qui définit les tests devant être déroulés lors de la modification ou de la réparation de chaque composant. En reprenant l'Analyse de Risques de l'osmomètre à point de congélation, un exemple de tests à effectuer selon changement de certains composants est disponible à l'Annexe 2. Les protocoles/fiches de tests sont des documents vivants, liés à l'Analyse de Risques. Si un test n'est plus pertinent, il faut le supprimer ou le remplacer par un test plus adapté.

2.8.6.2 Revue périodique

La revue périodique est une revue de l'ensemble du système, à savoir l'équipement, le logiciel et les utilisateurs. Le suivi correct du processus de gestion des modifications doit être vérifié à intervalles réguliers. La périodicité est évaluée selon la criticité du système, sa fréquence d'utilisation, le volume de données générées, le nombre d'utilisateurs potentiels... L'absence de modifications « sauvages » sans autorisation et sans traçabilité (par exemple, modification d'un paramètre critique d'une méthode analytique au sein du logiciel) doit être prouvée lors de cette revue. La vérification du relevé des divers incidents est également effectuée, de même que la gestion des résultats hors spécifications ayant eu lieu durant la période en cours et leur gestion. Les acteurs de cette revue sont le responsable équipement et l'administrateur du système informatisé. Cette revue sera approuvée par l'Assurance Qualité. La totalité des attendues de cette revue figurent à l'Annexe O8 du GAMP 5 (7).

2.9 Enjeux de la stratégie de qualification

L'objectif de ce travail, en regard des éléments réglementaires développés ci-dessus est d'adapter la démarche de qualification en fonction des catégories d'équipements/systèmes et en fonction de leur usage. La réglementation rend obligatoire la qualification des équipements

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

et SI associés de laboratoires. Cependant, la véritable démarche relève de stratégies plus particulièrement déployées en mettant en commun l'USP <1058> et le guide GAMP 5. Rappelons que l'USP <1058> va être prochainement révisée pour intégrer le GAMP 5. Quoiqu'il en soit, la stratégie reste toujours basée sur l'évaluation des risques selon l'ICH Q9.

Tableau8: Les enjeux de la stratégie de qualification

Objectifs	Méthodes
Efficacité et productivité tout au long du cycle de vie du système	<ul style="list-style-type: none">- Elimination des activités redondantes- Elimination des activités sans valeur ajoutée ou de « Sur-qualité »- Catégorisation des équipements/SI- Evaluation des fournisseurs- Optimisation du système documentaire
Garantir la fiabilité et l'intégrité des données tout au long du cycle de vie du système	<ul style="list-style-type: none">- Comprendre l'utilisation du système et du processus analytique associé- Comprendre à quoi servent les données générées- Mettre en place une structure adaptée- Mettre en place des moyens de contrôle- Mettre en place des vérifications du fonctionnement du système

**Chapitre III : Qualification d'un
équipement type HPLC**

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

3 Chapitre III: Qualification d'un équipement type HPLC

Les tests de qualifications ont été développés spécifiquement pour garantir que l'instrument fonctionne comme prévu sur des plages de fonctionnement représentatives, tout au long de la durée de vie prise en charge par le fabricant de l'instrument

La qualification est constituée d'une succession d'étapes :

3.1 Qualification de Conception (QC) :

Avant l'achat d'un nouveau instrument décrit les exigences de l'utilisateur et définir les spécifications fonctionnelles et opérationnelles de l'instrument. QC doit garantir que l'instrument acheté possède les fonctions et les performances nécessaires qui permettant une application prévue appropriée.

Tableau 9: Les éléments de la qualification de conception et ses exemples

Les éléments de conception	Les exemples
Utilisation prévue	Analyse des médicaments et des impuretés
Spécification des exigences de l'utilisateur pour l'analyse HPLC	-Plus de 100 échantillons -analyse automatisée pendant la nuit - limite de quantification 0.1% -confirmation automatisée de l'identité et de la pureté des pics avec détection par DAD -quantification automatisée des composés et impression du rapport
Spécification fonctionnelle :	-gradient binaire ou supérieur
Pompe	-uv/vis 190/900nm
Détecteur	- 100 échantillons, volume (0.5ul _5ml)
Echantillonneur automatique	, contrôle de 15 à 60 C
Compartiment de colonne	- Contrôle de système, acquisition des données

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Ordinateur	<p>pour les signaux et les spectres, intégration des pics et quantification</p> <ul style="list-style-type: none">- Evaluation spectral pour la pureté du pic et la confirmation des composes- Enregistrement électronique de tous les chromatogrammes génère par le système
Spécification opérationnelle	<ul style="list-style-type: none">- Détecteur : bruit inférieur à 5×10^{-5}- Echantillonneur : précision de volumes injecte inférieur à 0.5% RSD, échantillon carryover inférieur à 0.5%- Pompe : précision du temps de rétention
Instruction de l'utilisateur	<ul style="list-style-type: none">- Manuel d'utilisation sur papier- Tutoriel sur l'ordinateur
Qualification	Le fournisseur doit fournir des procédures et des services pour QI et QO
Maintenance	<p>Le fournisseur doit fournir la procédure de maintenance et le calendrier recommander</p> <p>L'instrument doit inclure un retour d'information sur la maintenance pour un échange rapide de la pièce de maintenance les plus importantes</p> <p>La procédure de maintenances doit être fournie sur un CD ROM multimédia</p>
Formation	Le fournisseur doit fournir une familiarisation et une information

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

3.2 Qualification d'installation QI :

La qualification d'installation établis que l'instrument reçu comme la conception est spécifié

Il est établi que l'instrument est correctement installé dans l'environnement sélectionner et que l'environnement doit être approprier pour le fonctionnement de l'instrument

Les échantillons de test vérifient une installation correcte de tous les modules, des connections électriques et fluides

Avant l'installation :

- 1- Obtenir les recommandations des fabricants pour les exigences des sites d'installation
- 2- Vérifier que les recommandations du fabricant (électricité, humidité, température) sont respectées pour ce site
- 3- Laisser suffisamment d'espace sur les étagères pour l'équipement, les manuels d'utilisation ...)

Pendant l'installation

- 1- Comparer les équipements tels que reçu, avec la commande d'achat (accessoires, pièces de rechanges et logiciel)
- 2- Vérifier la documentation pour l'exhaustivité (manuel d'utilisation, instruction de maintenance, procédure d'exploitation, standard pour les tests, certificat de validation et de sécurité)
- 3- Vérifier les équipements pour tout dommage
- 4- Installer le matériel (ordinateur, équipements, raccord et tube pour les connections fluides, colonne, câble d'alimentation, et table de contrôle d'instrument)
- 5- Activer l'instrument et s'assurer que tous les modules mettent en évidence et effectuaient un auto test électronique

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

- 6- Identifier une fiche de description de tout matériels, inclure des dessins si nécessaire
- 7- Exécuter l'échantillon de test et comparer les chromatogrammes avec celles de références
- 8- Préparer un rapport d'installation.

3.3 Qualification opérationnelle :

C'est le processus de démontrer qu'un instrument fonctionnera selon sa spécification opérationnelle dans l'environnement sélectionné. Il vérifie que le système HPLC compile avec la fonction clé et les exigences opérationnelles indiquées dans la QC.

Dans la spécification opérationnelle, le fournisseur doit définir exactement les conditions qui doivent être observées avec des conditions variables (par exemple : la température ambiante déférente)

Avant d'effectuer tout autre test d'exécutions d'abord l'essai de fuite s'il est échoué, la plupart du test restant s'échappera

Tableau 10/ Les paramètres des test et critères d'acceptation de la QO

Paramètres	Procédure	Limite d'utilisateur
Test de fuite	Test de débit en volume/temps ou poids/temps	+/- 5%
Dérive de ligne de base	ASTM (American society for testing materiel) method E19.09.20min	$<2 \times 10^{-3}$ AU
Bruit de ligne de base	ASTM (American society for testing materiel) method E19.09.20min*1	$<5 \times 10^{-5}$ AU
Précision de volume d'injection	6*injection de caféine standard RSD surface de pic	0.3%RSD

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Précision de débit	6*injection de caféine standard RSD temps de rétention	0.5% RSD (waters) 0.999(Agilent)
Linéarité de détecteur	Injection 5 standard	>1.5 AU, 5%RSD
Précision de longueur d onde	Filter d 'oxide d 'holmium	+/-1nm (waters) +/-2nm (Agilent)
Précision de température	Comparaison avec un appareil de mesure externe	+/-1C (waters) +/-2 (Agilent)
Echantillonneur et carryover	Injection d'un grand nombre d 'injection de concentration déférents	<0.5% (waters) <0.4% (Agilent)
Précision de la composition de la phase mobile (gradient)		+/-1% (waters) 0.999 % (Agilent)

3.4 La qualification de performance

C'est le processus de démonstration qu'un instrument fonctionne de manière cohérente selon une spécification appropriée pour son utilisation de routine. Important ici est le mot constamment. La fréquence de test est beaucoup plus élevée que pour OQ. Une autre différence est que la PQ doit toujours être effectuée dans des conditions similaires à l'analyse d'échantillon de routine. Pour un chromatogramme, cela signifie utiliser la même colonne, les mêmes conditions d'analyse et les composés d'essai identiques ou similaires.

La QP doit être effectuée quotidiennement ou chaque fois que l'instrument est utilisé. *

La fréquence de test ne dépend uniquement de la stabilité de l'équipement mais de tout le système qui peut contribuer à l'analyse du résultat

Pour un chromatographe en phase liquide, cela peut être la colonne de chromatographie ou une lampe de détection

* Les critères de test et la fréquence doivent être déterminés lors de l'élaboration et de la validation de la méthode analytique.

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

En pratique, PQ signifie test de stabilité du système, où les caractéristiques de performance clés du système sont mesurées et comparées à une limite prédéfinie documentée.

Par exemple, un étalon bien caractérisé peut être injecté 5 ou 6 fois et l'écart type des quantités est ensuite comparé à la valeur prédéfinie.

Les tests PQ sont spécifiques à l'application.

Si les limites de détection et de quantification sont critiques, le profil d'intensité des lampes ou la ligne de base doit être testés

* Ils doivent utiliser la même colonne et les mêmes produits chimiques pour l'échantillon réel.

Le test doit inclure :

- Précision des quantités
- Précision des temps de rétention
- Résolution entre deux pics
- Largeur de pic à mi-hauteur
- Queue de pic
- Bruit de base
- Précision de la longueur d'onde du détecteur de longueur d'onde uv/vis, de préférence en utilisant des filtres holmium - oxyde intégrés

Chapitre IV : Partie critique

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

4 Chapitre IV : Partie critique

4.1 Introduction

Localisation et correction du problème

Pour le dépannage de système HPLC, la meilleure approche est une approche systématique qui mène à l'identification du problème. Pour aider à identifier la source des problèmes rencontrés, on a cinq catégories principales :

- Anomalies liées à la pression
- Fuites
- Problèmes affectant le chromatogramme
- Problèmes liés à l'injecteur
- Autres problèmes décèlent par l'odorat, la vue ou l'ouïe

Après la correction du problème, il est conseillé de consigner l'incident dans le registre du système, afin d'aider à la résolution de tout problèmes ultérieurs.

PREVENTION :

En HPLC, il est possible d'éviter un grand nombre de problèmes par une maintenance préventive de routine. Par exemple, le remplacement des joints de la pompe a intervalles réguliers permet d'éviter les dysfonctionnements a ce niveau et donc d'éviter les problèmes associés. Le paragraphe VII détaille les problèmes les plus courants pour chaque module d'un système HPLC, ainsi que les procédures de maintenance qui permettent d'en réduire la fréquence. Il convient de modifier ces suggestions pour les adapter a votre module de HPLC particulier, puis de les inclure dans la routine de votre laboratoire.

4.2 PRESSION ANORMALE :

Une modification de la pression de fonctionnement est un signe indiquant un éventuel problème. Choisissez ci-dessous la catégorie qui correspond le mieux aux symptômes observés, puis suivez les conseils pour résoudre le problème.

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

. A- Aucune indication de pression, aucun débit :

Causes possibles	Solutions
1. Pas de courant / hors-tension	1. Mettre sous tension
2. Fusible fondu	2. Remplacer le fusible
3. Réglage ou défaillance du contrôleur	3. a. Vérifier que les réglages sont adéquats b. Réparer ou remplacer le contrôleur
4. Piston casse	4. Remplacer le piston
5. Air piégé dans la pompe	5. Dégazer les solvants ; purger l'air de la pompe, amorcer la pompe
6. Phase mobile insuffisante	6. a. remplir le réservoir b. remplacer la frite d'admission s'il est bloqué
7. Clapet(s) anti-retour défectueux	7. Remplacer le ou les clapets anti-retour
8. Fuite importante	8. Serrer ou remplacer les raccords

B. aucune indication de pression, le débit et normal

Causes possibles	Solutions
1. Compteur défectueux	1. Remplacer le compteur
2. Transducteur de pression défectueux	2. remplacer le transducteur

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

C. aucune élevée et uniforme

Causes possibles	Solutions
1. Débit trop élevé	1. Ajuster le réglage
2. Fritté de la colonne bloqué	2. A/ rincer la colonne (si possible) B/ remplacer le fritté* C/ remplacer la colonne
3. Phase mobile incompatible	3. A/ utiliser une phase mobile adéquate B/ laver la colonne
4. Colonne inadéquate	4. Utiliser une colonne adéquate
5. Blocage au niveau de l'injecteur	5. A éliminer le blocage ou remplacer l'injecteur
6. Température de la colonne trop basse	6. Elever la température
7. Dysfonctionnement du contrôleur	7. Réparer ou remplacer le contrôleur
8. Colonne de garde bloqué	8. enlever/remplacer la colonne de garde
9. Filtre en ligne bloqué	9. Enlever/remplacer le filtre en ligne

Vérifier d'abord la garantie du fabricant de la colonne .le retrait des raccords d'extrémité peut annuler la garantie. .

D. Pression basse et uniforme

Cause possible	Solution
1. Débit réglé trop bas	1. Ajuster le débit
2. Fuite dans le système	2. Localiser et corriger la fuite
3. Colonne inadéquate	3.Utiliser une colonne adéquate

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

4. Température de la colonne trop élevée	4. Abaisser la température
5. Dysfonctionnement du contrôleur	5. Réparer ou remplacer le contrôleur

E. Augmentation de la pression :

CAUSE POSSIBLE	SOLUTION
Voir paragraphe C	Voir paragraphe C

F. Chute de la pression jusqu'à zéro

CAUSE POSSIBLE	SOLUTION
Voir paragraphes A et B	Voir paragraphes A et B

G. Chute de la pression mais pas jusqu'à zéro

CAUSE POSSIBLE	SOLUTION
Voir paragraphe D	Voir paragraphe D

H. Fluctuations de la pression

CAUSE POSSIBLE	SOLUTION
Présence d'air dans la pompe	a. Dégazer le solvant b. Purger l'air de la pompe
Clapet(s) anti-retour défectueux	Remplacer le ou les clapets antiretours
Défaillance du joint de la pompe	Remplacer le joint de la pompe
Dégazage insuffisant	a. Dégazer le solvant b. Modifier les méthodes de dégazage (utiliser le dégazeur en ligne Degassex™)
Fuite dans le système	Localiser et corriger la fuite
Utilisation d'un gradient d'élution	Les fluctuations de la pression sont normales en raison des variations de la

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

	viscosité
--	-----------

4.3 FUITES

Il est généralement possible d'arrêter les fuites en serrant ou en remplaçant un raccord. Cependant, garder à l'esprit que les raccords métalliques de compression trop serrés peuvent fuir et que les dispositifs de serrage en plastique peuvent s'user. Si une fuite de raccord persiste après un léger resserrage du raccord, démontez-le et vérifiez qu'il n'est pas endommagé (par exemple, fêlures déformées ou présence de particules sur la surface d'étanchéité). Il convient d'éliminer les raccords endommagés

A. Fuites au niveau des raccords

CAUSE POSSIBLE	SOLUTION
Raccord desserré	Resserrer le raccord
Raccord endommagé	Resserrer le raccord
Raccord excessivement serré*	a. Desserrer et resserrer le raccord b. Remplacer le raccord
Raccord sale	a. Démontez et nettoyez le raccord b. Remplacer le raccord
Pièces inadaptées	Utiliser des pièces de même marque

B. Fuites au niveau de la pompe

CAUSE POSSIBLE	SOLUTION
Clapets anti-retours desserrés	a. Resserrer le clapet anti-retour (ne pas serrer excessivement) b. Remplacer le clapet anti-retour
Raccords desserrés	Resserrer les raccords (ne pas serrer excessivement)
Défaillance du joint du mélangeur	a. Remplacer le joint du mélangeur. b. Remplacer le mélangeur
Défaillance du joint de la pompe	Réparer ou remplacer le joint de la pompe
Défaillance du transducteur de pression	Réparer ou remplacer le transducteur de pression.
Défaillance de l'amortisseur d'impulsions	Remplacer l'amortisseur d'impulsions

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Défaillance de la vanne doseuse	a. Vérifier les diaphragmes, remplacer si présence de fuites b. Contrôler le bon état du
Vanne de purge	. a. Serrer la vanne de purge b. Remplacer la vanne de purge

*Utiliser des raccords d'extrémités avec dispositifs de serrage pour éviter des problèmes d'étanchéité et la nécessité de clés

C. Fuites au niveau de l'injecteur

CAUSE POSSIBLE	Solution
Défaillance du joint du rotor	Remonter ou remplacer l'injecteur
Boucle d'échantillonnage bloquée	Remplacer la boucle d'échantillonnage
Joint de l'orifice d'injection desserre	ajuster le joint
Diamètre inadéquate de l'aiguille de seringue	Utiliser une seringue inadéquate
Siphonnement de la ligne d'évacuation	Garder la ligne d'évacuation au-dessus de l'évacuation de surface
Blocage de la ligne d'évacuation	Remplacer la ligne d'évacuation

D. Fuites au niveau de la colonne

CAUSE POSSIBLE	Solution
. Raccord d'extrémité desserre	resserrer le raccord d'extrémité
Présence de remplissage de la colonne au niveau de la férule	démontrer, rincer le serre-joint et remonter
Epaisseur incorrecte du fritte	utiliser un fritte adéquat (voir diagramme ci-dessous)

E. Fuites au niveau du détecteur

CAUSE POSSIBLE	Solution
Défaillance du joint de la cellule	a. Eviter une contre pression excessive b. remplacer le joint statique
Fenêtre(s) de la cellule craquelée	Remplacer la ou les fenêtre

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Fuites au niveau des raccords	.serrer ou remplacer les raccords
Ligne d'évacuation bloquée	remplacer les conduit d'évacuation
Cuve de circulation bloquée	remonter ou remplacer la cuve de circulation

4.4 PROBLEMES AFFECTANT LE CHROMATOGRAMME

Un grand nombre des problèmes rencontrés avec le système d'HPLC se manifestent sous forme de modifications du chromatogramme. Certains d'entre eux peuvent être résolus par des changements de matériel ; cependant d'autres exigent des modifications de la méthode d'essai. La sélection des types de colonne et de phase mobile adéquats est un élément déterminant pour une bonne chromatographie »

A. Etalement des pics

CAUSE POSSIBLE	SOLUTION
Fritté bloqué	a. Inverser la colonne de rinçage (si possible) b. Remplacer le fritté d'admission*
Vide à l'intérieure de la colonne	Comblé le vide ou changer la colonne
Pic interférent	a, Utiliser une colonne plus longue b. Changer de phase mobile et/ou de colonne/sélectivité
pH de la phase mobile incorrect	Ajuster le pH. Dans le cas des composés basiques, un pH plus faible fournit généralement des pics plus symétriques

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

. L'Echantillon réagit avec des sites actifs	<p>a. Ajouter un réactif a paire d'ions ou un modificateur basique volatil</p> <p>b. Changer de colonne</p>
--	---

B. Pics frontaux

CAUSE POSSIBLE	SOLUTION
Température trop basse	. Augmenter la température de la colonne
Solvant d'échantillon incorrect	. Utiliser la phase mobile comme solvant d'injection
Surcharge d'échantillon (saturation de la colonne)	. Diminuer la concentration de échantillon
. Choix de colonne incorrect	. Voir A.1. et A.2.

C. Pics divisés

CAUSE POSSIBLE	SOLUTION
Impuretés sur la colonne de garde ou sur l'admission de la colonne analytique	Retirer la colonne de garde et tenter une analyse. Remplacer la colonne de garde
Pics divisés	Conseil: Si la colonne analytique est bouchée, l'inverser et la rincer. Si le problème persiste, il se peut que la colonne soit bloquée par des impuretés fortement retenues. Utiliser une procédure de restauration adéquate. Si le problème persiste, il se peut que l'admission soit bouchée. Changer le fritté ou remplacer la colonne
Solvant de échantillon incompatible avec la phase mobile	Changer de solvant. Lorsque cela est possible, injecter les échantillons dans la phase mobile

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

CAUSE POSSIBLE	SOLUTION
Effets ne concernant pas la colonne (longueur des tubes etc.)	a. Refaire les canalisations du système (tubes plus courts et plus étroits) b. Utiliser une cellule de détecteur de plus petit volume

D. D. Malformation des pics les plus hauts

CAUSE POSSIBLE	SOLUTION
Surcharge d'échantillon (saturation de la colonne)	Diminuer la taille de échantillon

E. Malformation des pics précoces

CAUSE POSSIBLE	SOLUTION
Solvant d'injection incorrect	a. Diminuer le volume d'injection b. Utiliser un solvant d'injection plus faible

F. Etalement grandissant au fur et à mesure que k' augmente

CAUSE POSSIBLE	SOLUTION
Effets de rétention secondaire mode phase inverse	a ajouter de la triméthylamine (échantillons basiques) b. ajouter de l'acétate (échantillons acides) c. ajouter du sel ou un tampon (échantillons ionique) d. essayer une colonne différente
. Effets de rétention secondaire mode phase normale	a ajouter de la triméthylamine (composé basique) b. ajouter de l'acide acétique (composés acide)
Effets de rétention secondaire, mode phase normale	c. Ajouter de l'eau (composés polyfonctionnel] d. Essayer une méthode d'HPLC différente
. Effets de rétention secondaire, paire d'ions	Ajouter de la triméthylamine (échantillons basiques)

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

G. Etalement des pics acides ou basiques

CAUSE POSSIBLE	SOLUTION
Tamponnage inadéquat	a.Utiliser une concentration de tampon de 50 a 100 mM b.Utiliser un tampon de pKa égal au pH de la phase mobile

H. Pics supplémentaires

CAUSE POSSIBLE	SOLUTION
Présence d'autres composants dans échantillon	Normal
Pic d'éluion tardive d'injection préalable	a.Augmenter le temps de passage ou la pente du gradient b. Augmenter le débit
Absence de pics ou pics fantômes	a.Vérifier la pureté de la phase mobile b.Utiliser la phase mobile comme solvant d'injection c.Diminuer le volume d'injection

I. Dérives des temps de rétention

CAUSE POSSIBLE	SOLUTION
Contrôle médiocre de la température	. Utiliser un thermostat pour régler la température de la colonne
Changement de la phase mobile	Eviter les changements (évaporation, réaction, etc.)
Equilibrage médiocre de la colonne	Laisser davantage de temps pour équilibrage de la colonne entre les différents passages

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

J. Changements brusques des temps de rétention

CAUSE POSSIBLE	SOLUTION
Changement de débit	Réinitialiser le débit
Présence de bulles d'air dans la pompe	Purger l'air de la pompe
Phase mobile inadéquate	a. Remplacer par une phase mobile adéquate b. Installer un mélange de phase mobile adéquat sur le contrôleur

K. Dérive de la ligne de base

CAUSE POSSIBLE	SOLUTION
. Fluctuations de la température de la colonne	Vérifier la température de la colonne et celle de la phase mobile; utiliser un Changeur de chaleur avant le détecteur
Phase mobile non homogène	. Utiliser des solvants de qualité HPLC des sels de forte pureté et des additifs. Dégazer la phase mobile avant utilisation, faire barboter à l'hélium pendant l'utilisation.
Accumulation d'impuretés ou d'air dans la cellule du détecteur	Rincer la cellule avec du méthanol ou un autre solvant fort. Au besoin nettoyer la cellule avec du HNO ₃ 1N (ne jamais utiliser d'HCl)
Ligne de sortie bouchée après le détecteur	. Déboucher ou remplacer la ligne Se reporter au manuel du détecteur pour remplacer la fenêtre
Problème de mélange de la phase mobile ou changement de débit	Corriger la composition/le débit Pour éviter ce problème, surveiller régulièrement la composition et le débit
Equilibrage lent de la colonne, en particulier lors du changement de phase mobile	Rincer avec un solvant de force intermédiaire, faire passer 10 à 20 volumes de colonne de la nouvelle phase mobile avant l'analyse
Phase mobile contaminée, détériorée ou préparée à partir de produits de qualité douteuse	Vérifier la fabrication de la phase mobile. Utiliser des substances chimiques et des solvants de grade HPLC.

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Les matériaux fortement retenus dans l'échantillon (k' élève) peuvent Bluer sous forme de pics tits larges et ressembler	Utiliser une colonne de garde Au besoin, rincer la colonne avec un solvant fort entre les injections ou périodiquement pendant l'analyse
Phase mobile recyclée mais détecteur non réglé	Réinitialiser la ligne de base Utiliser une nouvelle phase mobile lorsque la plage dynamique du détecteur est dépassée
Le détecteur (UV) n'est pas réglé sur l'absorbance maximale mais sur une pente de la courbe	Modifier la longueur d'onde vers une absorbance UV maximale

L. Bruit de la ligne de base (irrégulier)

Causes possibles	Solutions
1 . Fuite	1 . Voir paragraphe III. Vérifier l'absence de dessarage des raccords. Vérifier l'absence de fuites, d'accumulation de sels ou de bruits anormaux dans la pompe. Au besoin, changer les joints Contrôler l'absence de fuites dans la cellule du détecteur
2 . Phase mobile contaminée, détériorée ou préparée a partir de matériaux de	2 . Verifier la fabrication de la phase mobile
3 . Solvants de la phase mobile non miscibles	3 . Ne choisir et n'utiliser que des solvants miscibles
4 . Electronique du détecteur/enregistreur	4 . Isoler le détecteur et l'enregistreur du point de vue électronique. Se reporter au manuel d'instruction pour corriger le problème .
5 . Air piégé dans le système	5 . Rincer le système avec un solvant fort
6 . Air piégé dans le système	6 . Purger le détecteur. Installer un dispositif de contre-pression après le détecteur .
7 . . cellule du détecteur contaminée (même une légère quantité d'impuretés peut provoquer du bruit	7 . . Nettoyer la cellule on rinçant avec du HNO ₃ . 1N (ne jamais utiliser d'HCl)

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

8 . Lampe du détecteur faiblissant	8 . Remplacer la lampe
9 . Fuite de silice ou de remplissage de la colonne	9 . Remplacer la colonne
10 . Mélangeur de phase mobile inadéquat ou ne fonctionnant pas correctement	10 . Réparer ou remplacer le mélangeur ; ou mélanger hors ligne si la phase mobile est isocratique

M . Pics larges :

Causes possibles	Solutions
Changement de la composition de la phase mobile	Préparer une nouvelle phase mobile
Débit de la phase mobile trop faible	Ajuster le débit
Fuites (en particulier entre la colonne et le détecteur)	Voir paragraphe III. Vérifier l'absence de desserrage désaccords. Vérifier l'absence de fuites, d'accumulation de sels ou de besoin dans la pompe. Au besoin, changer les joints ajuster les réglages
Réglages du détecteur incorrects	Ajuster les réglages
Effets ne concernant pas la colonne : <ul style="list-style-type: none"> a. Saturation de la colonne b. Temps de réponse du détecteur trop long ou volume de la cellule trop petit c. Tube trop long entre la colonne et le détecteur ou DI trop élevé d. Temps de réponse de l'enregistreur trop long 	<ul style="list-style-type: none"> a. Injecter un volume plus faible (par exemple 10 µl au lieu de 100 µl) ou dilutions au 1/10 et 1/100 de l'échantillon b. Raccourcir le temps de réponse ou utiliser une cellule de plus faible volume. c. Utiliser un tube de DI 0,18 à 0,25 mm le plus court possible d. Diminuer le temps de réponse
Concentration du tampon trop faible	Augmenter la concentration
Colonne de garde contaminée/usée	Remplacer la colonne de garde
Colonne contaminée/usée Nombre de plateaux réduit	Remplacer la colonne par une nouvelle colonne de même type. Si la nouvelle colonne produit des pics symétriques, rincer l'ancienne colonne avec un solvant fort.
Vide au niveau de l'admission de la colonne	Ouvrir l'extrémité de l'admission et combler le vide ou remplacer la colonne

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Le pic représente deux composés ou plus, de résolution médiocre	Changer le type de la colonne pour améliorer la séparation
Température de la colonne trop basse	Augmenter la température Ne jamais dépasser 75°C à moins qu'une température
Constante de temps du détecteur trop élevée	Utiliser une constante de temps plus faible

N. Perte de résolution

CAUSE POSSIBLE	SOLUTION
.Phase mobile contaminée/usée	Préparer une nouvelle phase mobile
Colonne de garde ou analytique bouchée	. Retirer la colonne de garde et tenter une analyse. Remplacer la colonne de garde au besoin. Si la colonne analytique est bouchée, l'inverser et rincer. Si le problème persiste, il se peut que la colonne soit encrassée par des impuretés fortement retenues. Utiliser une procédure de rétablissement adéquate le problème persiste, il se peut que l'admission soit bouchée. Changer le fritté ou remplacer la colonne.

O. Tous les pics sont trop petits

CAUSE POSSIBLE	SOLUTION
Trop forte atténuation du détecteur.	Réduire atténuation
Constante de temps du détecteur trop élevé	Utiliser une constante de temps plus faible
Volume d'injection trop faible	Utiliser une boucle d'échantillonnage plus grande
Branchement incorrect de l'enregistreur	Utiliser un branchement adéquat

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

P . Tous les pics sont trop grands

Cause possible	solution
Atténuation du détecteur trop faible	. Augmenter l'atténuation
Volume d'injection trop élevée	Utiliser une boucle d'échantillonnage de plus faible volume
Branchement incorrect de l'enregistreur	Utiliser un branchement adéquat

4.5 PROBLEMES liés à l'injecteur

Ces problèmes sont généralement détectés lors de l'utilisation de la vanne d'injection. Les fuites au niveau des vannes d'injection sont traitées au paragraphe 3 (fuite)

A . Injecteur manuel, difficile à tourner :

Cause possible	solution
. Joint du rotor endommagé	Remonter ou remplacer la vanne
Rotor trop serré	Régler la tension du rotor

B . Injecteur manuel, difficile à charger :

Cause possible	solution
Mauvais alignement de la vanne	Régler l'alignement
Boucle bloquée	Remplacer la boucle
Seringue sale	Nettoyer ou remplacer la seringue
Conduits bloqués	Éliminer le blocage ou remplacer les lignes

C . Auto-injecteur, ne tourne pas

Cause possible	solution
Absence de pression d'air	Fournir la pression
. Rotor trop serré	Régler la tension du rotor
Mauvais alignement de la vanne	Régler l'alignement de la vanne

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

D. Auto-injecteur, autres problèmes

Cause possible	solution
Blocage	Eliminer le blocage ou remplacer la portion bloquée
Contrôleur défectueux	. Réparer ou remplacer le contrôleur

4.6 PROBLEMES DECELES PAR L'ODORAT, LA VUE OU L'OUÏE

Il est nécessaire de faire appel à tous vos sens pour identifier les problèmes en HPLC. Il convient de prendre l'habitude de consacrer quelques minutes tous les jours pour mettre vos sens (hormis le goût) au contact de l'HPLC de manière à en « ressentir » le fonctionnement normal. Cela vous aidera à localiser rapidement les problèmes. Par exemple, il est possible de sentir une fuite avant de la voir. La plupart des problèmes sont identifiés par la vue, et sont traités au paragraphe précédent.

A. Odeur de solvant

Cause possible	solution
Fuite	Voir paragraphe III
Voir paragraphe III	a. Vérifier l'absence de débordement du récipient à déchets b. Localiser le déversement et le nettoyer

B. Odeur de « chaud »

Cause possible	solution
Module en surchauffe	a. Vérifier que la ventilation est adéquate, régler au besoin b. Vérifier le réglage de la température, ajuster c. Éteindre le module.

C. Relèves de compteur anormaux

Cause possible	solution
Pression anormale	Voir paragraphe II

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Problème lie au four de la colonne	a. Vérifier les réglages, ajuster b. Vérifier le réglage de la limite, ajuster
------------------------------------	---

D. alarmes

Cause possible	solution
Fuite/déversement de solvant	localisation et corriger la fuite/le déversement

E. grincements et couinements

Cause possible	solution
Lubrification médicore	Lubrifier comme il convient

PROBLEMES CLES ET MAINTENANCE PREVENTIVE

Le diagramme ci-dessous énumère les problèmes les plus courants rencontrés avec chaque module d'HPLC. La colonne de droite contient les pratiques de maintenance préventive qui peuvent réduire le taux de défaillance. Les nombres entre parenthèses représentent les intervalles recommandés entre deux actions de maintenance. Les manuels de l'opérateur et d'entretien de votre HPLC peuvent contenir des recommandations supplémentaires pour la maintenance préventive de votre module d'HPLC.

^A Réservoir

Probleme	solution
Fritte d'admission bloquée	a. Remplacer la fritte (3 à 6 mois) b. Filtrer la phase mobile, filtre de 0.5

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

	pm
Bulles de gaz	Dégazer la phase mobile

B . Pompe

Problème	solution
Bulles d'air	Dégazer la phase mobile
Défaillance du joint de la pompe	Remplacer le joint de la pompe (03mois)
Défaillance du clapet anti-retour	. Filtrer la phase mobile, utiliser le fritte de la ligne d'admission. Conserver une pièce de rechange

C . Injecteur

Problèmes	solution
Usure du joint du rotor	a. Ne jamais serrer excessivement b. Filtrer les échantillons

D . Colonne

Problèmes	solution
Fritte bloquée	a. Filtrer la phase mobile b. Filtrer les échantillons c. Utiliser un filtre et/ou une colonne de garde en ligne
Vide au niveau de la tête de la colonne	a. Eviter une phase mobile de pH > 8 (pour la majorité des colonnes à base de silice) b. Utiliser une colonne de garde c. Utiliser une pré-colonne (colonne de saturation)

E . Détecteur

Problèmes	solution
défaillance de la lampe ; réponse du détecteur diminuée ; bruit du détecteur accru	a. Remplacer (6 mois) ou conserver une lampe de rechange
Bulles dans la cellule	a. Garder la cellule propre b. Utiliser un restricteur après la cellule

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

	c. Dégazer la phase mobile
--	----------------------------

F. Généralités

Problèmes	solution
Dommages corrosifs/abrasifs	Rincer le tampon de d'HPLC et nettoyer lorsqu'elle n'est pas utilisée.

Deuxième partie : Expérimentation

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

5 Chapitre V :La partie expérimentale

5.1 Objectif:

Dans le cadre de qualifier un équipement de type HPLC nous avons assisté à la qualification de la chaîne HPLC au niveau de laboratoire RezguiLab situé à CAFE CHARGUI d'Alger dont l'objectif étant d'établir une instruction opérationnelle d'utilisation de l'équipement en se basant sur une série de qualifications (QO, QP) réalisées par le fournisseur de l'équipement d'HPLC Agilent Séries 1100/1200.

. Cette instruction d'utilisation servira comme protocole à suivre en routine par les opérateurs (les bio-analystes):

Noter : Une ChemStation portable n'est requise que si le système n'est pas connecté à une ChemStation pendant le fonctionnement normal ou si la version de ChemStation utilisée ne prend pas en charge les tests nécessaires. De plus, les plaques à puits et les tapis de fermeture ne sont nécessaires que lorsqu'un échantillonneur à plaques à puits (thermostaté) fait partie du système.		Équipements et solvants									
		Acétone	L'eau	Kit détaillons de glycérine	Kit détaillons de caféine	Demi-plateau 40 x 2 ml	Plaques de puits et Tapis de fermeture	Flacons, bouchons et septa	Thermomètre digital	Débitmètre numérique	Capillaire de restriction
MODULE	TEST										
Toute pompe	Precision / précision du débit	X	X							X	
Tous les UV	Précision WL	X			X	X				X	
Tous les UV	Holmium	X								X	

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

TCC	Précision de la température		X						
FLD	Précision EM / EX WL	X						X	
Tous les UV, RID	Bruit / stabilité de la température	X						X	
FLD	Signal / bruit	X						X	
Tous UV, MSD	Inj. précision / report	X		X	X		X	X	
DÉBARRASSER	Inj. précision / report	X		X	X			X	X
FLD	Inj. précision / report	X		X	X		X	X	
Tous UV, MSD	Linéarité de la réponse	X		X	X		X	X	
DÉBARRASSER	Linéarité de la réponse	X		X	X			X	X
Bin / quat. et UV	Composition dégradée	X						X	X
Collecteur de fractions	Collection de fractions	X		X	X	X	X	X	
ALS / WPS thermostaté	Temp contenu du flacon / puits. acc.		X	X	X			X	

Equipements et solvants

5.2 Matériels

❖ Matériels constituant HPLC

- Ce protocole s'applique à la Agilent 1100/1200 Instrument HPLC de série qui comprend les modules suivants.
- Pompe principale:
- Dégazeur
- Pompe quaternaries
- Échantillonneur:

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

- Échantillonneur automatique
- Compartiment à colonne thermostaté
- Détecteur:
- Détecteur à barrette de diodes

❖ Matériels utilisés dans la préparation des échantillons :

- Thermomètre digitale
- Micropipettes de haute précision.
- Filtre à base de cellulose.
- Conductimètre

❖ Verre

- Flacons volumétriques
- Bêchers
- Fioles jaugées

5.3 Logiciel

L'instrument complet est testé dans sa configuration d'origine (test complet du système) avec des performances automatisées et une évaluation des tests réalisés à l'aide du logiciel ChemStation.

Si une ChemStation portable est fournie par Agilent Technologies,

- 1) utilise uniquement une ChemStation portable avec une ChemStation OQ / PV valide effectuée sur cet appareil avant d'exécuter 1100/1200OQ / PV ;
- 2) joindre une copie du certificat Portable ChemStation OQ / PV à ce protocole ;
- 3) exécutez ChemStation Communications comme premier 1100/1200 Test OQ / PV

5.4 Documentation

1. Rapport de correction des écarts

2. Rapport OQ / PV

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

3. Certificat OQ / PV de la ChemStation portable

4. Certificat d'étalonnage du débitmètre

5. Certificats de kit de normes OQ / PV

6. Certificat d'étalonnage du thermomètre numérique

7. Certificat de formation du représentant de service qualifié

5.5 Méthodes

- Préqualification

Avant d'entamer la qualification de la chaîne HPLC, il faut :

Avoir un certificat de qualification de la personne spécialiste responsable de cette action.

qualification, délivré par la société Agilent ;

Procéder à l'installation de l'équipement en vérifiant les connexions électriques ;

Procédure du rinçage et dégazage de l'équipement de la chaîne HPLC :

C'est le nettoyage de système dont le but est d'éliminer toute sorte d'impuretés (traces de selle de tampon...) et chasser les bulles d'aires.

. Le nettoyage se fait avec de l'eau ultra pure à 40° c et filtrer à 0.45 micromètre et à 1 microsiemens de conductivité.

On met les voies de la phase mobile dans l'eau et on lance une purge à 5 ml et on ouvre la vaine de purge à ¼ (90°) pour assurer la purge passe uniquement par la pompe et le dégazeur.

N.B il faut débrancher le détecteur avant commencer le rinçage

5.6 Procédure

5.6.1 Préparation du matériel

1. Installer le capillaire de restriction (colonne de qualification) à la place de la colonne HPLC.

2. Installer le thermostat numérique avec les capteurs en contact étroit avec les échangeurs de chaleur gauche et droit.

Utilisez la procédure du manuel de référence pour Compartiment à colonne thermostatée (TCC) série 1100/1200.

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

3. Effectuez l'une des actions suivantes.
 - a. Si un détecteur UV est installé, installe le débitmètre numérique avec l'entrée connectée au capillaire de sortie du détecteur UV.
 - b. Si un RID est le seul détecteur, connecter la sortie du TCC à l'entrée du débitmètre (la sortie du détecteur ne convient pas).
4. Dirigez les déchets du débitmètre dans un récipient approprié.
5. Pour les instruments équipés de pompes binaires ou quaternaires, procédez comme suit.
 - a. Installer le solvant A (eau de qualité HPLC) et B (0,5% d'acétone* dans de l'eau de qualité HPLC) et purger les deux canaux individuellement à 5ml / minute pendant au moins 10 minutes.
 - b. Si les canaux C et D de la pompe quaternaire doivent être qualifiés, purger également le solvant A (eau de qualité HPLC) par le canal C et le solvant B (0,5% d'acétone * dans l'eau de qualité HPLC) par le canal D à 5 ml / minute pendant un minimum de 10 minutes.
6. Pour les instruments équipés d'une pompe isocratique, installer le solvant A (eau de qualité HPLC) et purgez à 5 ml / minute pendant au moins 10 minutes.

N.B* L'acétone à 0,5% n'est nécessaire que si le système comprend un détecteur UV et que le test de composition du gradient est programmé.

5.6.2 Préparer la pompe de régénération

1. Si l'instrument comprend une pompe de régénération isocratique ou quaternaire, installe le solvant A et purge le canal A à 5 ml / minute pendant au moins 10 minutes.
2. Si l'instrument comprend une pompe de régénération binaire, installe le solvant A et le solvant B (tous deux de l'eau de qualité HPLC) et purgez les deux canaux individuellement à 5 ml / minute pendant au moins 10 minutes.

5.6.3 Préparer l'instrument

1. Régler la température du thermostat de colonne sur 40°C.

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

2. Si un échantillonneur automatique thermostaté est installé, réglez la température de son thermostat sur 40°C.
3. Une fois la purge terminée, chargez la méthode OQ FLOW.M

5.6.4 Préparation de l'échantillonneur automatique :

1. Bouchon lâche tous les flacons requis contenant les standards OQ / PV et les blancs et charge les flacons dans le plateau d'échantillons comme indiqué dans le tableau ci-dessous.
2. Si l'échantillonneur automatique est thermostaté, suivez ces étapes supplémentaires.
 - a. Distribue 1 ml d'eau de qualité HPLC dans chacun des quatre flacons de volume nominal de 2 ml et sceller chaque flacon avec un capuchon et un septum.
 - b. Utilisez un cure-dent pour percer le centre de chaque septum, puis insérez environ 1 cm de tube en plastique de 1,6 mm de diamètre intérieur à travers le septum.
 - c. Placez les flacons aux positions 23, 28, 45 et 75 dans le plateau d'échantillons.

5.6.5 Terminer la préparation

Remettez en place les capots avant de tous les modules.

Tableau 11: Normes OQ / PV requises pour tout Détecteur UV série 1100/1200 :

Kit de normes de caféine		P / N 50014486 lot: 465651AX20
N.	Standard	Position du plateau
1	0,5 µg / ml ± 5% de caféine dans l'eau	1
2	1.0 µg / ml ± 3% de caféine dans l'eau	2
3	5,0 µg / ml ± 2% de caféine dans l'eau	3
4	25,0 µg / ml ± 2% de caféine dans l'eau	4
5	50,0 µg / ml ± 2% de caféine dans l'eau	5

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

6	Vierge (phase mobile A)	6
---	-------------------------	---

5.7 Tests de qualification de performance/QO

5.7.1 Test de précision du débit

Cette procédure utilise un débitmètre numérique traçable pour déterminer l'exactitude et la précision du débit pour l'Instrument HPLC de série 1100/1200.

L'utilisation d'HyperTerminal pour capturer les lectures de flux est facultative, pas obligatoire.

Lorsque HyperTerminal est utilisé, les conditions préalables doivent être remplies. Sinon, enregistrez simplement les mesures directement dans la boîte de dialogue ChemStation.

Conditions préalables spécifiques aux tests

- Configurez le débitmètre en mode terminal.
- Configurez HyperTerminal pour capturer automatiquement les lectures de débit.

Les instructions sont fournies dans le document Procédure de configuration de la mesure du débit.

Tableau 12: Conditions préalables spécifiques aux tests

Méthode	OQFLOW.M	
Debit	2.000 ml / minute	
Temps d'arrêt	10,00 minutes	
Solvant A	Eau de qualité HPLC	
Tableau des temps	Temps	Debit
	3.20	2. 000
	3.21	1. 000
Temperature	40,0°C	

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Séquence	OQFLOW.S
Ligne 1	1 blanc d'injection sans injection

Tableau 13: Les équipements de test

Description de l'équipement	Débitmètre numérique
spécification	Précision $\pm 1\%$, précision 0,5% RSD
Période de recalibrage	12 mois
Lors de l'utilisation du type de débitmètre le plus ancien (PSL68001), le temps de collecte des mesures avec HyperTerminal peut être trop court. Modifiez la méthode pour passer de 2 à 1 ml / minute à 3,7 minutes et arrêter l'analyse à 11 minutes. A.09.03 fournit cette méthode / séquence personnalisée (oqflowa.m / s).	

Procédure

Ce test est partiellement automatisé par le logiciel ChemStation.

Capturer des lectures avec HyperTerminal

1. Lorsque le débitmètre est allumé et que la tubulure est correctement connectée, le débitmètre numérique affiche les lectures à des intervalles de temps cohérents.

Les intervalles varient en fonction du type de débitmètre utilisé et le temps écoulé est affiché sous forme de caractère changeant.
2. Chaque fois que l'électrovanne s'ouvre (et clique), une lecture de débit est ajoutée au fichier texte spécifié dans la configuration HyperTerminal.
3. Au temps de fonctionnement de 3,2 minutes, le débit passe à 1.000 ml / minute.
4. Lorsque l'analyse s'arrête, fermez HyperTerminal.
5. Ouvrez le fichier texte, imprimez-le et ajoutez-le au protocole.

Entrer les mesures dans la ChemStation

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

1. Entrez les 10 valeurs du fichier texte qui apparaît avant le commutateur de débit dans le tableau de gauche de la boîte de dialogue ChemStation.
2. Entrez la première lecture de débit après le changement de débit dans le champ approprié.
3. Entrez les 10 lectures du fichier texte qui apparaît avant la lecture finale de 1 ml / minute dans le tableau de droite de la boîte de dialogue ChemStation.

Noter : Certains débitmètres indiquent 4 chiffres dans le fichier texte. Arrondissez ces nombres à trois chiffres pour qu'ils correspondent à la boîte de dialogue : 4e chiffre 0-4, vers le bas ; 4e chiffre 5-9, vers le haut.

4. Cliquez sur Terminer le test.

Calculs

1. La précision du débit est calculée pour chaque débit comme la différence absolue en% entre la moyenne des 10 lectures de débit et le débit réglé.
2. La précision du débit est calculée comme le% RSD des 10 lectures de débit pour chaque débit.
3. La précision du débit et les valeurs de précision sont comparées aux limites d'acceptation définies.
4. Une fois les tests d'exactitude / précision du débit terminés, retirez le débitmètre numérique du capillaire d'entrée.

Tableau 14: Limites d'acceptation définies du test de précision de débit

Précision	5	%
RSD	0,50	%

5.7.2 Précision de la température du compartiment à colonnes

Cette procédure utilise un thermomètre numérique traçable pour déterminer la précision de la température de l'Instrument HPLC de série 1100/1200

Tableau 15: Conditions de Précision de la température du compartiment à colonnes

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Temps d'arrêt	5,00 minutes
Température	40,0°C

Ligne 1	1 injection sans injection de blanc
---------	-------------------------------------

Tableau 16: Équipement du test de Précision de la température du compartiment à colonnes

Description de l'équipement	Thermomètre digital
Specification	Résolution d'affichage 0,1 ° C
Fournisseur d'équipement	Voir la section Liste des équipements.
Période de recalibrage	12 mois

Procédure

Ce test est partiellement automatisé par le logiciel ChemStation.

1. Le thermomètre numérique affiche une lecture des températures des échangeurs de chaleur gauche et droite à un point de consigne de 40,0°C.
2. Entrez les 2 lectures dans la boîte de dialogue ChemStation pendant le test.
3. Le test se termine après 5 minutes.
4. La précision de la température est calculée pour chaque échangeur de chaleur comme la différence absolue entre les lectures de température et le point de consigne.
5. La valeur de précision de la température est comparée aux limites d'acceptation définies.

Tableau 17: Limites d'acceptation définies Précision de la température du compartiment à colonnes

Précision à gauche	2,0 ° C
Exactitude juste	2,0 ° C

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

5.7.3 Précision de la longueur d'onde - VWD

Cette procédure utilise une solution de caféine traçable pour déterminer la précision de la longueur d'onde UV pour l'Instrument HPLC de série 1100/1200

Tableau 18 : Conditions Précision de la longueur d'onde - VWD

Débit	1. 000 ml / minute
Temps d'arrêt	1,00 minutes
Solvant A	Eau de qualité HPLC
Longueur d'onde	273 nm
Volume d'injecteur	20,0 µl
Température	40,0°C

Ligne 1	1 flacon d'injection 4 standard 4
---------	-----------------------------------

Tableau 19: Équipement du test de Précision de la longueur d'onde - VWD

Description de l'équipement	Kit d'étalons de caféine - Standard 4
Specification	25 µg / ml ± 2%
Fournisseur d'équipement	Technologies Agilent

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Procédure

Ce test est exécuté automatiquement par le logiciel ChemStation.

1. Le spectre UV du pic dû au 20,0 μ L injection de l'étalon de caféine éluée à 1.000 ml / minute à partir du solvant A (eau de qualité HPLC) est mesurée.
2. Les longueurs d'onde des maxima d'absorbance trouvés dans le spectre de l'échantillon sont comparées aux maxima et minimum définis pour la solution de caféine ci-dessous.
3. La précision de longueur d'onde est calculée comme la différence absolue entre les longueurs d'onde des maxima et minimum trouvés dans le spectre et les longueurs d'onde des maxima et minimum définis.
4. Les valeurs de précision de longueur d'onde sont comparées aux limites d'acceptation définies.

Tableau 20: Maximum et minimum définis pour la solution de caféine

1er maximum	205,0 nm
Le minimum	245,0 nm
2ème maximum	273,0 nm

Tableau 21: Limites d'acceptation définies de Précision de la longueur d'onde - VWD

Précision 1er maximum	2,0 nm
Précision minimum	2,0 nm
Précision 2ème maximum	2,0 nm

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

5.7.4 Holmium

Cette procédure utilise un filtre interne en oxyde d'holmium traçable. C'est la deuxième des deux procédures utilisées pour déterminer la précision de la longueur d'onde UV / visible pour l'Instrument HPLC de série 1100/1200.

Tableau 22: Conditions d'holmium

debit	1 .000 ml / minute
Temps d'arrêt	Automatique
Solvant A	Eau de qualité HPLC

Filtre à l'oxyde d'holmium	Détails dans le manuel de référence du détecteur ou dans le certificat de conformité.
----------------------------	---

Équipement de test d'holmium

Aucun équipement de test spécifique n'est requis.

Procédure

Ce test est exécuté automatiquement par le logiciel ChemStation.

1. Le spectre UV du filtre à oxyde d'holmium est mesuré avec un débit de 1.000 ml / minute de solvant A (eau de qualité HPLC) à travers la cuve à circulation du détecteur.
2. Les longueurs d'onde des maxima d'absorbance trouvés dans le spectre sont comparées aux maxima définis pour le filtre à oxyde d'holmium (ci-dessous).
3. La précision de longueur d'onde est calculée comme la différence absolue entre les longueurs d'onde des maxima trouvés dans le spectre et les longueurs d'onde des maxima définis.
4. Les valeurs de précision de longueur d'onde sont comparées aux limites d'acceptation définies.

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Tableau 23: Longueurs d'onde des maximums définis d'Holmium

Détecteur de longueur d'onde variable	Détecteur à barrette de diodes / détecteur à longueurs d'onde multiples
360,8 nm	361,0 nm
418,5 nm	453,7 nm
536,4 nm	536,7 nm

Limites d'acceptation définies d'Holmium

Précision	2 Nm
-----------	------

5.7.5 Stabilité du bruit / de la température

Cette procédure basée sur la norme ASTM E 685-93 détermine le bruit, le dérapage, la dérive et la stabilité en température de l'Instrument HPLC de série 1100/1200.

Tableau 24 : Conditions du test de Stabilité du bruit / de la température

Débit	1. 000 ml / minute
Temps d'arrêt	20,00 minutes
Solvant A	Eau de qualité HPLC
Longueur d'onde	254 nm
Température	40,0°C

Ligne 1	1 injection sans injection de blanc
---------	-------------------------------------

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Equipment de test

Aucun équipement de test spécifique n'est requis.

Procédure

Ce test est exécuté automatiquement par le logiciel ChemStation.

1. Le signal d'absorbance est acquis sur une période de 20 minutes à une longueur d'onde de 254 nm avec un débit de 1.000 ml / minute de solvant A (eau de qualité HPLC).
2. Si un TCC est installé, la température de ses côtés gauche et droit est surveillée pendant cette période de 20 minutes à l'aide de capteurs internes.
3. Le bruit, la déambulation et la dérive sont calculés selon la méthode décrite dans la norme ASTM E 685-93.
4. La stabilité de la température est calculée comme la différence absolue entre la température la plus élevée et la plus basse surveillée des deux côtés du TCC.
5. Les valeurs de bruit, de dérapage, de dérive et de stabilité en température sont comparées aux limites d'acceptation définies.

Tableau 25: Limites d'acceptation définies du Stabilité du bruit / de la température

VWD	Bruit	0,040 mAU
	Errer	0,200 mAU
	Dérive	0,500 mAU / heure
DAD / MW D	Bruit	0,050 mAU
	Errer	0,200 mAU
	Dérive	5.000 mAU / heure

TCC	Stabilité à gauche	0,50 ° C *
	Stabilité droite	0,50 ° C *

** S'applique uniquement si l'instrument comprend un Compartiment colonne thermostaté série 1100/1200*

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

5.7.6 Précision d'injection / caryover

Cette procédure utilise une solution de caféine traçable pour déterminer la précision de l'injection et le report pour le 1100/1200 Instrument HPLC de série.

Tableau 26: Conditions du test de Précision d'injection / caryover

Débit	1 .000 ml / minute
Temps d'arrêt	1,00 minutes
Solvant A	Eau de qualité HPLC
Longueur d'onde	273 nm
Volume d'injecteur	20,0 µL
Température	40,0°C

Ligne 1	Flacon de 3 injections 6 blancs
Ligne 2	Flacon de 6 injections 4 standard 4
Ligne 3	1 flacon d'injection 6 blancs

Tableau 27 : Équipement de test de Précision d'injection / caryover

Description de	Kit d'étalons de caféine - Standard 4
Specification	25 µg / ml ± 2%
Fournisseur d'équipement	Technologies Agilent

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Procédure

Ce test est exécuté automatiquement par le logiciel ChemStation.

1. Les surfaces et les hauteurs des pics sont mesurées pour trois 20,0µl injections de phase mobile suivies de six 20,0 µl injections de caféine standard et un quatrième 20,0 µl injection de phase mobile éluée à 1.000 ml / minute à partir du solvant A (eau de qualité HPLC).
2. Si un injecteur manuel est installé, utilisez une technique d'injection correcte.
3. La précision d'injection est calculée pour la surface et la hauteur comme le% RSD des réponses de pic standard de caféine (surface et hauteur).
4. Le rapport d'injection est calculé à la fois pour la surface et la hauteur comme la réponse maximale (surface et hauteur) dans la quatrième injection à blanc, la réponse maximale de la troisième injection à blanc étant soustraite en tant que pourcentage de la réponse du sixième pic standard de caféine.
5. La précision d'injection et les valeurs de rapport sont comparées aux limites d'acceptation définies.

Noter :Une valeur de rapport calculée de 0,00% ou moins indique seulement qu'aucun rapport n'a été détecté par la méthode d'essai utilisée.

Limites d'acceptation définies

Zone de pic de précision	1000	% RSD
Hauteur de pointe de précision	2 000	% RSD
Zone de report	0,200	%
Porter sur la hauteur	0,400	%

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

5.7.7 Linéarité de la réponse

Cette procédure utilise une solution de caféine traçable pour déterminer la linéarité de la réponse pour l'instrument HPLC de série 1100/1200.

Tableau 28 : Conditions du test de linéarité de la réponse

Débit	1 .000 ml / minute
Temps d'arrêt	1,00 minutes
Solvant A	Eau de qualité HPLC
Longueur d'onde	273 nm
Volume d'injecteur	20,0 µl
Température	40,0°C

Ligne 1	1 flacon d'injection 1 standard 1
Ligne 2	1 flacon d'injection 2 standard 2
Ligne 3	1 flacon d'injection 3 standard 3
Ligne 4	1 flacon d'injection 4 standard 4
Ligne 5	1 flacon d'injection 5 standard 5

Tableau 29: Équipement du test de linéarité de la réponse

Description de l'équipement	Kit de normes de caféine
Spécification	0,5 ± 5%, 1,0 ± 3%, 5,0 ± 2%, 25 ± 2% et 50 ± 2% µg / ml
Fournisseur d'équipement	Technologies Agilent

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Procédure

Ce test est exécuté automatiquement par le logiciel ChemStation.

1. Les surfaces et les hauteurs des pics sont mesurées pour 20,0 µl injections de 5 standards de caféine de concentration croissante éluées à 1.000 ml / minute à partir du solvant A (eau de qualité HPLC).
2. Si un injecteur manuel est installé, utilisez une technique d'injection correcte.
3. La linéarité de la réponse est calculée comme la corrélation de la courbe d'étalonnage pour la surface du pic. Les concentrations standard nominales sont utilisées dans les calculs.
4. La corrélation est comparée aux limites d'acceptation définies.

Limites d'acceptation définies

Corrélation (limite basse)	0,9990
----------------------------	--------

5.7.8 Gradient

Cette procédure utilise un traceur d'acétone pour déterminer l'exactitude, la précision, la linéarité et l'ondulation de la composition du gradient pour l'Instrument HPLC de série 1100/1200.

Tableau 30: Conditions du test de gradient

Débit	2.000 ml / minute	
Temps d'arrêt	10,00 minutes	
Solvant A	Eau de qualité HPLC	
Solvant B	0,5% d'acétone dans de l'eau de qualité HPLC *	
Tableau des temps	Temps	Solvant. B
	0,01	100,0
	8,00	100,0
	8.01	0,0

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Longueur d'onde	265 nm
Température	40,0°C
<i>* Si l'instrument comprend également un Détecteur sélectif de masse en série 1100/1200, le solvant B sera 0,1% d'acide acétique + 0,5% d'acétone dans de l'eau de qualité HPLC.</i>	

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Débit	2.000 ml / minute	
Temps d'arrêt	55,00 minutes + 10 minutes de pré-purge	
Solvant A	Eau de qualité HPLC	
Solvant B	0,5% d'acétone dans de l'eau de qualité HPLC	
Tableau des temps	Temps	Solvant. B
	1,00	0,0
	1,01	100,0
	6,00	100,0
	6.01	90,0
	9h00	90,0
	9.01	89,0
	12h00	89,0
	12.01	51,0
	16.00	51,0
	16.01	50,0
	19.00	50,0
	19.01	6,0
	23,00	6,0
	23.01	5,0
	26,00	5,0
	26.01	0,0
	29,00	0,0
	29.01	5,0
	32,00	5,0
32.01	6,0	
35,00	6,0	
35.01	50,0	
39,00	50,0	
39,01	51,0	

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

	42,00	51,0
	42,01	50,0
	45,00	50,0
	45,01	6,0
	49,00	6,0
	49,01	5,0
	52,00	5,0
	52.01	0,0
Longueur d'onde	265 nm	
Température	40,0°C	

Ligne 1	1 blanc d'injection sans injection (flush)
Ligne 2	1 injection sans injection de blanc

Tableau 31: Équipement de test de gradient

Description du solvant	Acétone
------------------------	---------

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Procedure

Ce test est exécuté automatiquement par le logiciel ChemStation.

1. Avant le gradient de test, une pré-purge de 10 minutes du canal B (OQFLUSH.M) est effectuée.
2. La hauteur moyenne et le bruit de crête à crête de chaque étape du signal d'absorbance à 265 nm généré par un gradient défini de 2.000 ml / minute de solvant A (eau de qualité HPLC) et de solvant B (0,5% d'acétone en qualité HPLC l'eau*) est mesuré.
3. La hauteur et le bruit sont remis à l'échelle des valeurs d'absorbance aux valeurs de composition (% B).
4. La précision de la composition est calculée pour chaque pas comme la différence absolue entre la hauteur de pas mesurée remise à l'échelle et la valeur de composition de gradient correspondante.

Pour la pompe quaternaire, la différence est typiquement beaucoup plus grande pour les compositions % B plus élevées que pour les niveaux 6% et 5% B. Cela est dû au réglage automatique du canal primaire de la pompe sur A.

5. La précision de composition est calculée comme le % SD des hauteurs de pas mesurées rééchelonnées pour les 3 répétitions des valeurs de composition de gradient 50,0% B, 6,0% B et 5,0% B.
6. La linéarité de la composition est calculée comme la corrélation de la régression linéaire des hauteurs de pas mesurées remises à l'échelle par rapport à la première répétition des valeurs de composition du gradient 100,0% B, 90,0% B, 89,0% B, 51,0% B, 50,0% B, 6,0% B, 5,0% B et 0,0% B.
7. L'ondulation de la composition est calculée comme le bruit de crête à crête redimensionné des étapes correspondant à chaque valeur de composition de gradient.
8. Le volume de retard de l'instrument est calculé comme le temps de retard multiplié par le débit.
9. Les valeurs d'exactitude, de précision, de linéarité et d'ondulation de la composition sont comparées aux limites d'acceptation définies.

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

* Si l'instrument comprend également un Détecteur sélectif de masse en série 1100/1200, le solvant B est 0,1% d'acideacétique plus 0,5% d'acétone dans de l'eau de qualité HPLC.

Limites d'acceptation définies

Ondulation	0,500	%
Pompe binaire de précision	0,700	%
Pompe quaternaire de précision	1.500	%
Précision	0,500	% DAKOTA DU SUD
Corrélation	0,999	Limite basse

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

5.7.9 Gradient- Canaux C / D

Cette procédure utilise un traceur d'acétone pour déterminer l'exactitude, la précision, la linéarité et l'ondulation de la composition du gradient des canaux de pompe quaternaires C et D pour l'Instrument HPLC de série 1100/1200.

Tableau 32: Conditions du est de gradient- Canaux C / D

Débit	2.000 ml / minute		
Temps d'arrêt	10,00 minutes		
Solvant C	Eau de qualité HPLC		
Solvant D	0,5% d'acétone dans de l'eau de qualité HPLC *		
Tableau des temps	Temps	Solvant C	Solvant D
	0,01	0,0	100,0
	8,00	0,0	100,0
	8.01	100,0	0,0
Longueur d'onde	265 nm		
Température	40,0°C		
* Si l'instrument comprend également un détecteur sélectif de masse en série 1100/1200, le solvant D sera 0,1% d'acide acétique + 0,5% d'acétone dans de l'eau de qualité HPLC.			

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Débit	2.000 ml / minute		
Temps d'arrêt	55,00 minutes + 10 minutes de pré-purge		
Solvant C	Eau de qualité HPLC		
Solvant D	0,5% d'acétone dans de l'eau de qualité HPLC		
Tableau des temps	Temps	Solvant C	Solvant D
	1,00	100,0	0,0
	1,01	0,0	100,0
	6,00	0,0	100,0
	6.01	10,0	90,0
	9h00	10,0	90,0
	9.01	11,0	89,0
	12h00	11,0	89,0
	12.01	49,0	51,0
	16.00	49,0	51,0
	16.01	50,0	50,0
	19.00	50,0	50,0
	19.01	94,0	6,0
	23,00	94,0	6,0
	23.01	95,0	5,0
	26,00	95,0	5,0
	26.01	100,0	0,0
	29,00	100,0	0,0
	29.01	95,0	5,0
	32,00	95,0	5,0
	32.01	94,0	6,0
	35,00	94,0	6,0
	35.01	50,0	50,0
39,00	50,0	50,0	
39,01	49,0	51,0	
42,00	49,0	51,0	

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

	42,01	50,0	50,0
	45,00	50,0	50,0
	45,01	94,0	6,0
	49,00	94,0	6,0
	49,01	95,0	5,0
	52,00	95,0	5,0
	52.01	100,0	0,0
Longueur d'onde	265 nm		
Température	40,0°C		

Ligne 1	1 blanc d'injection sans injection (flush)
Ligne 2	1 injection sans injection de blanc

Tableau 33: Équipement du test de gradient- Canaux C / D

Description du solvant	Acétone
------------------------	---------

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

Procédure

Ce test est exécuté automatiquement par le logiciel ChemStation.

1. Avant le gradient de test, une pré-purge de 10 minutes du canal D (OQFLUSCD.M) est effectuée.
2. La hauteur moyenne et le bruit de crête à crête de chaque étape du signal d'absorbance à 265 nm généré par un gradient défini de 2.000 ml / minute de solvant C (eau de qualité HPLC) et de solvant D (0,5% d'acétone en qualité HPLC l'eau*) est mesuré.
3. La hauteur et le bruit sont rééchelonnés des valeurs d'absorbance aux valeurs de composition (% D).
4. La précision de la composition est calculée pour chaque pas comme la différence absolue entre la hauteur de pas mesurée remise à l'échelle et la valeur de composition de gradient correspondante.

Pour la pompe quaternaire, la différence est typiquement beaucoup plus grande pour les compositions % D plus élevées que pour les niveaux 6% et 5% D. Cela est dû au réglage automatique du canal primaire de la pompe sur A.

5. La précision de composition est calculée comme le % SD des hauteurs de pas mesurées rééchelonnées pour les 3 répétitions des valeurs de composition de gradient 50,0% D, 6,0% D et 5,0% D.
6. La linéarité de la composition est calculée comme la corrélation de la régression linéaire des hauteurs de pas mesurées remises à l'échelle par rapport à la première répétition des valeurs de composition du gradient 100,0% D, 90,0% D, 89,0% D, 51,0% D, 50,0% D, 6,0% D, 5,0% D et 0,0% D.
7. L'ondulation de la composition est calculée comme le bruit de crête à crête redimensionné des étapes correspondant à chaque valeur de composition de gradient.
8. Le volume de retard de l'instrument est calculé comme le temps de retard multiplié par le débit.
9. Les valeurs d'exactitude, de précision, de linéarité et d'ondulation de la composition sont comparées aux limites d'acceptation définies.

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

* Si l'instrument comprend également un Détecteur sélectif de masse en série 1100/1200, le solvant D sera 0,1% d'acideacétique plus 0,5% d'acétone dans de l'eau de qualité HPLC.

Tableau 34: Limites d'acceptation définies du test de gradient- Canaux C / D

Ondulation	0,500	%
Pompe quaternaire de précision	1.500	%
Précision	0,500	%
Correlation	0,999	Limite basse

Chapitre VI: Interprétation des
résultats

6 Chapitre VI : Interprétation des résultats

6.1 Précision du débit

Les résultats des tests de débit sont introduits dans le tableau :

Tableau 35: Les résultats des tests de débit

lecture	Le débit réglé (ml / min)	Débit réel (ml / min)
1	2.000	1.990
2	2.000	1.990
3	2.000	1.990
4	2.000	1.990
5	2.000	1.990
6	2.000	1.990
7	2.000	1.990
8	2.000	1.980
9	2.000	1.980
10	2.000	1.980

Moyenne = 1.987 ml /

RSD = 0.24%

lecture	Le débit réglé (ml / min)	Débit réel (ml / min)
11	1.000	0.990
12	1.000	0.990
13	1.000	0.990
14	1.000	0.990
15	1.000	0.990
16	1.000	0.990
17	1.000	0.990
18	1.000	0.990
19	1.000	0.990
20	1.000	0.990

Moyenne = 0.990 ml / min

RSD = 0,00%

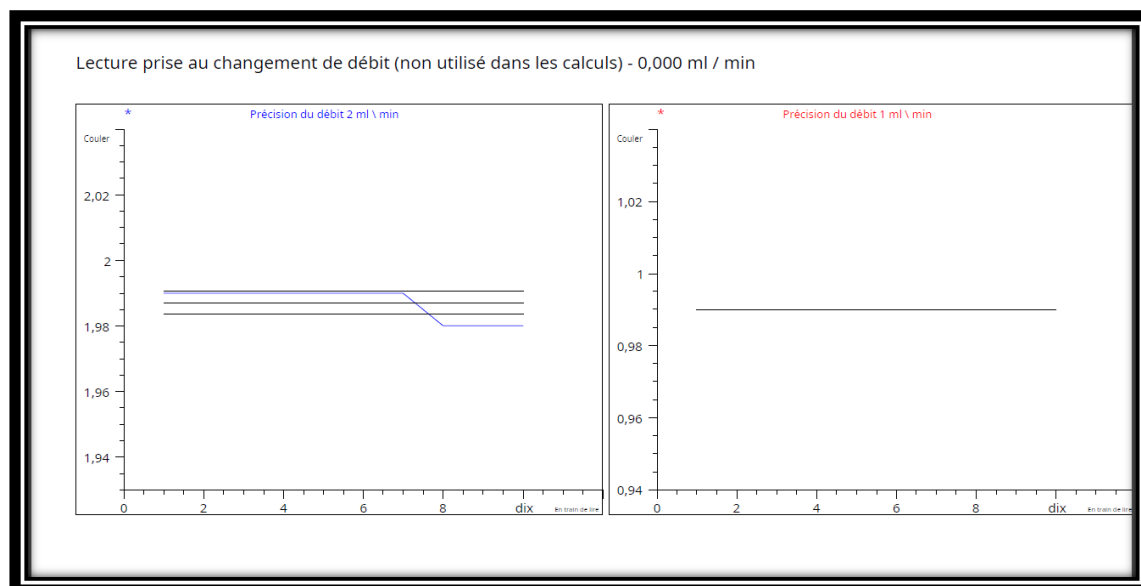


Figure 34 : chromatogramme de débit de pompe

	Limite	Résultat	Statut
Precision%	5 %	1 %	Acceptée
RSD %	0,50 %	0.2431%	Acceptée

- La valeur de débit de la pompe calculé est dans l'intervalle de la norme arrêtée

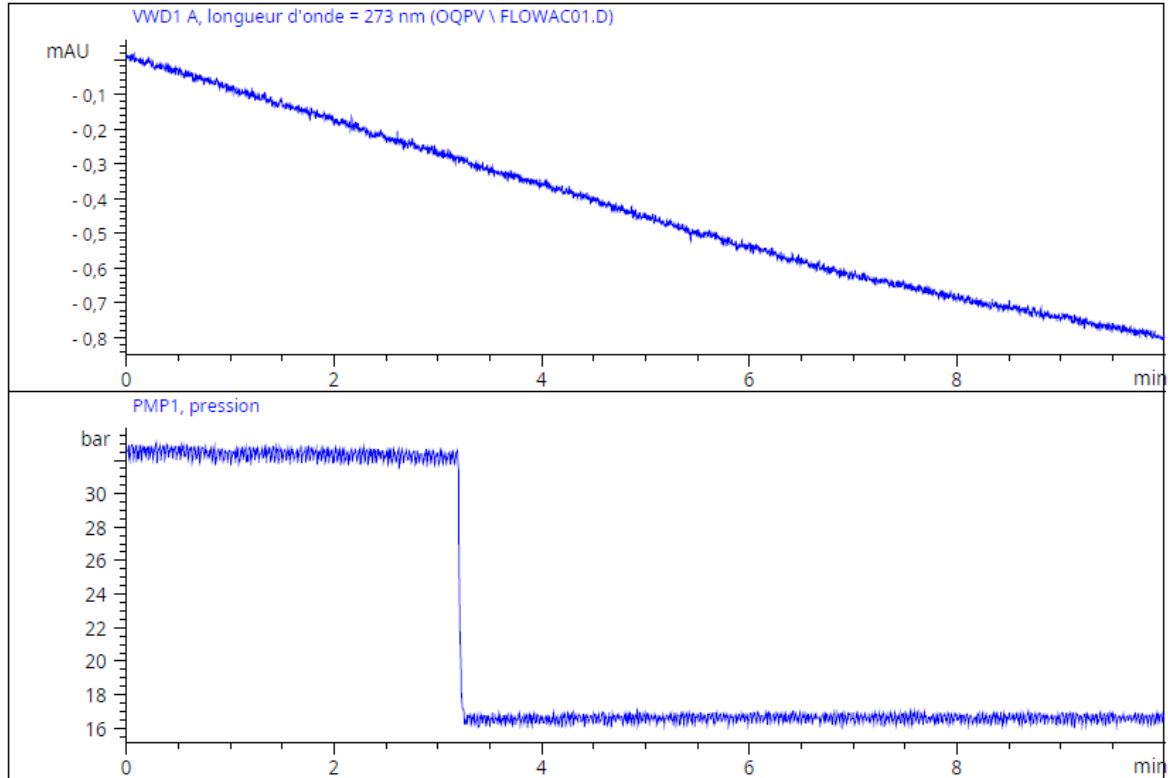


Figure 35: chromatogramme de la longueur d'onde

6.2 Précision de température

La température du compartiment à colonne droite	La température du compartiment à colonne gauche
40.30°C	40.40°C

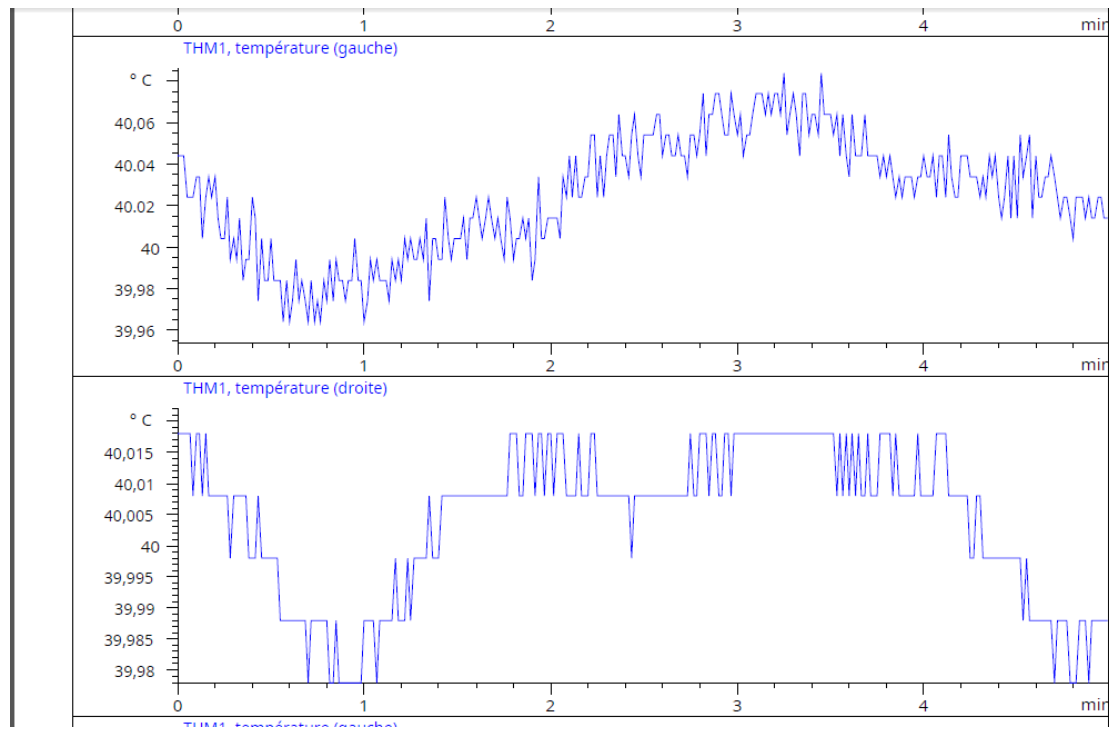


Figure 36: chromatogramme de température

	Limite	Résultat	Statut
Précision du côté droit	2°C	-0.40°C	Acceptée
Precision du côté gauche	2°C	-0.30°C	Acceptée

Les températures de la chambre et la température du compartiment à colonne droite et gauche de la colonne répondent aux normes de température fixées au préalable.

6.3 Précision de la longueur d'onde

1er maximum	205,0 nm
Le minimum	244,0 nm
2ème maximum	271,0 nm

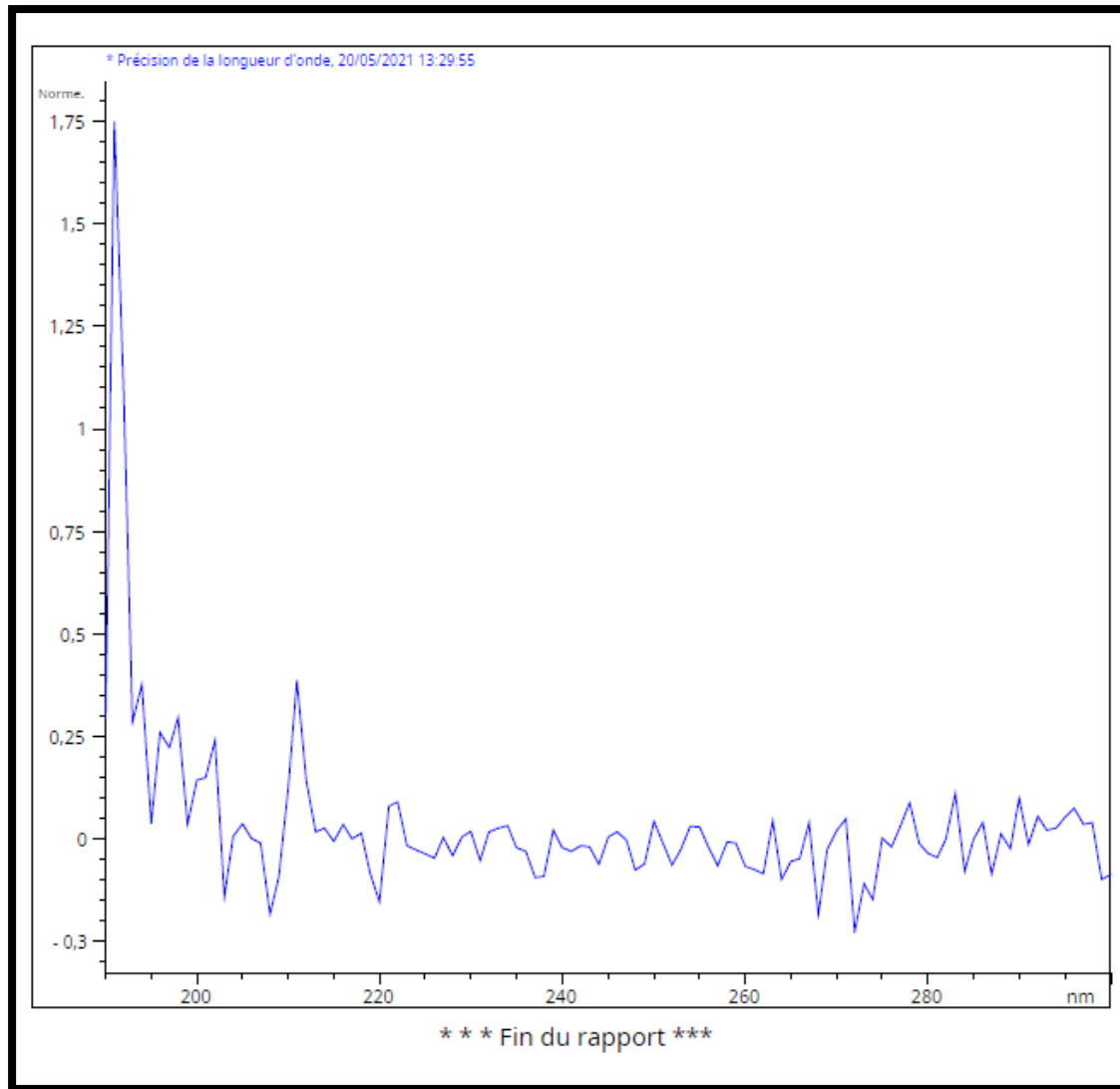


Figure 37: chromatogramme de précision de la longueur d'onde

	Limite	Résultat	Statut
Precision 1er maximum	2.0nm	0.0	Acceptée
Précision minimum	2.0nm	1.0	Acceptée
Précision 2ème maximum	2.0nm	2.0	Accepté

La longueur d'onde répond aux normes fixées au préalable

6.4 Holmium

Requis (nm)	Mesuré (nm)	Différence (nm)
360.8	360.8	0.0
418.5	418.5	0.0
536.4	536.5	0.1

La plus grande différence absolue = 0,1

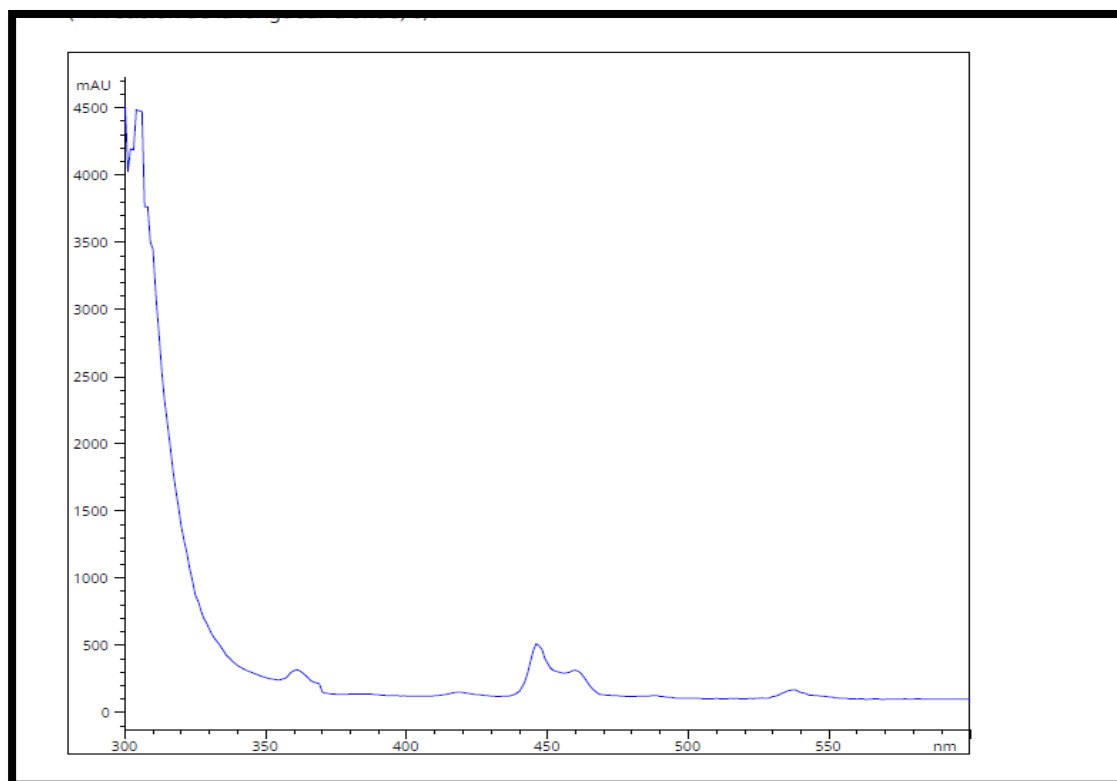


Figure 38 : chromatogramme de test d'holmium

	Limite	Résultat	Statut
Precision de holmium	2.0nm	0.1	Acceptée

Le test d'holmium répond aux normes fixées au préalable.

6.5 Stabilité du bruit / de la température

Test	Limite	Résultat	Statut
bruit	0.04	1.72e-2	acceptée
Erreur	0.2	5.029e-2	acceptée
derive	0.5	1.753e-1	Acceptée
Temps de stabilite gauche	0.5	0.1	Acceptée
Temps de stabilite droite	0.5	0.06	Acceptée

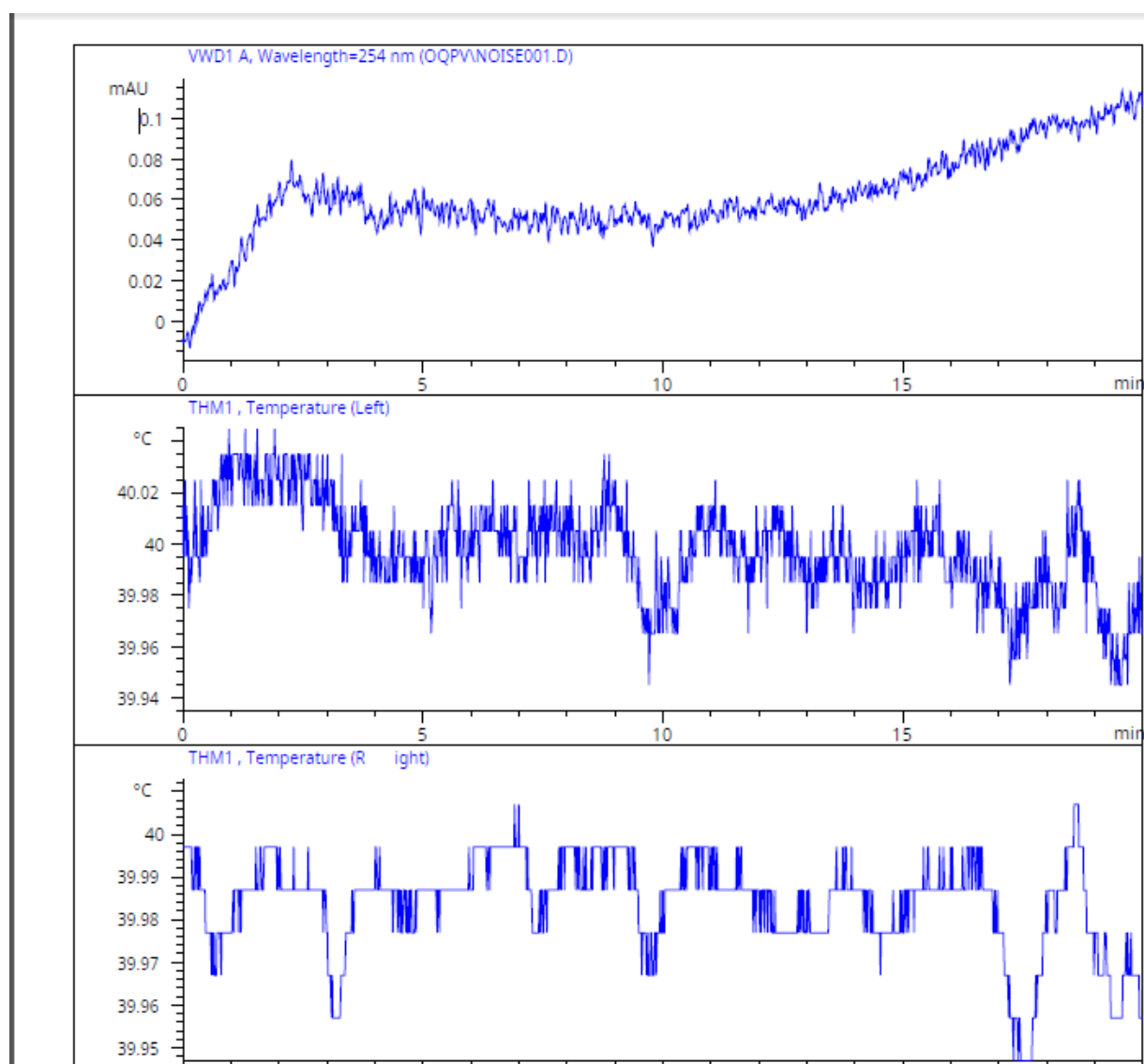


Figure 39: chromatogramme de test de Stabilité du bruit / de la température

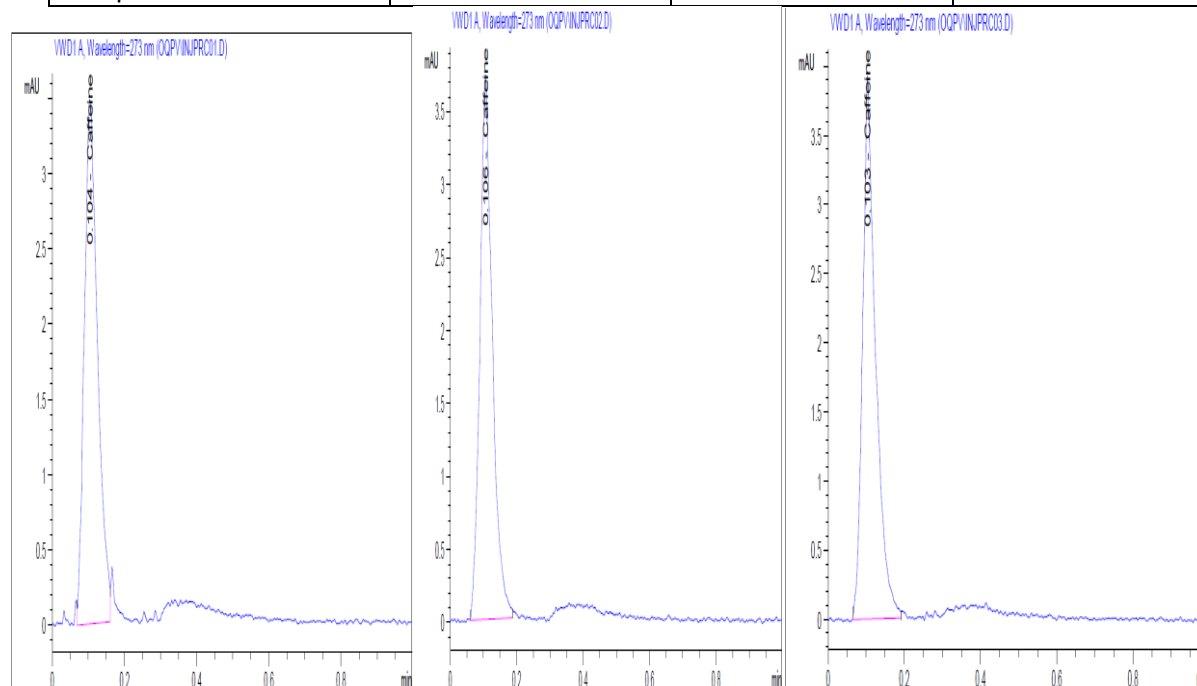
Le test de Stabilité du bruit / de la température répond aux normes.

6.6 Test de Précision d'injection/carryover

1/ Ligne 1: 3 injections de flacon 6 blanc

Échantillon d'informations : BLANK 1 - PHASE MOBILE

Ligne 1	Inj1	Inj2	Inj3
Temps de rétention	0.104 s	0.106 s	0.103 s



Ligne 2: 6 injections de flacon 4 standard 4

Échantillon d'informations : STD4 - 25,0ug / ml de caféine dans l'eau

Ligne 2	Inj1	Inj2	Inj3	Inj4	Inj5	Inj6
Temps de rétention	0.116	0.115	0.116	0.115	0.116	0.116

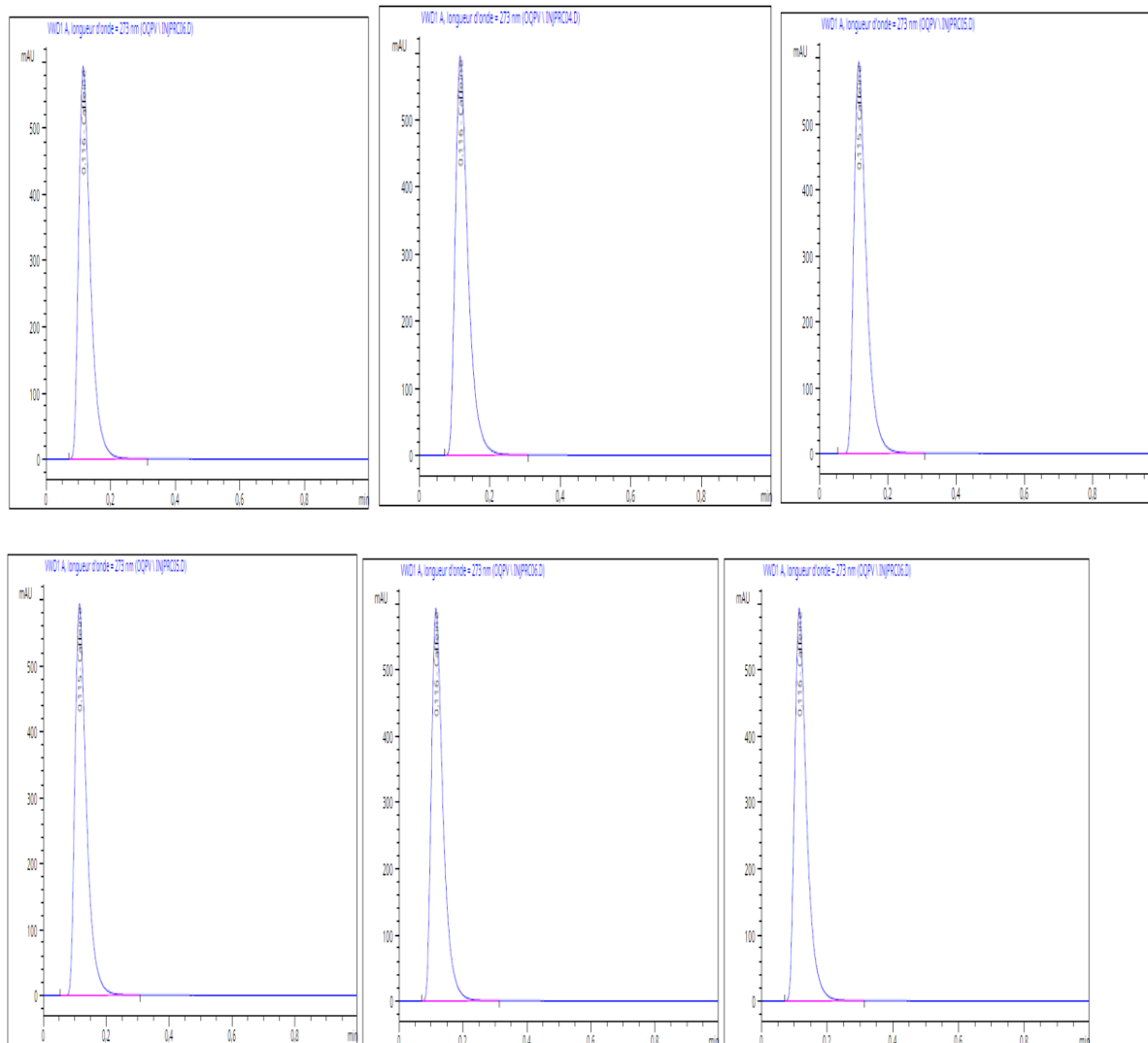


Figure 40: chromatogramme Test de Précision d'injection/carryover 02

Ligne 3: 1 injection de flacon 6 blanc

Échantillon d'informations : **BLANC 2 - PHASE MOBILE**

Ligne 3	Inj1
Temps de rétention	0.104

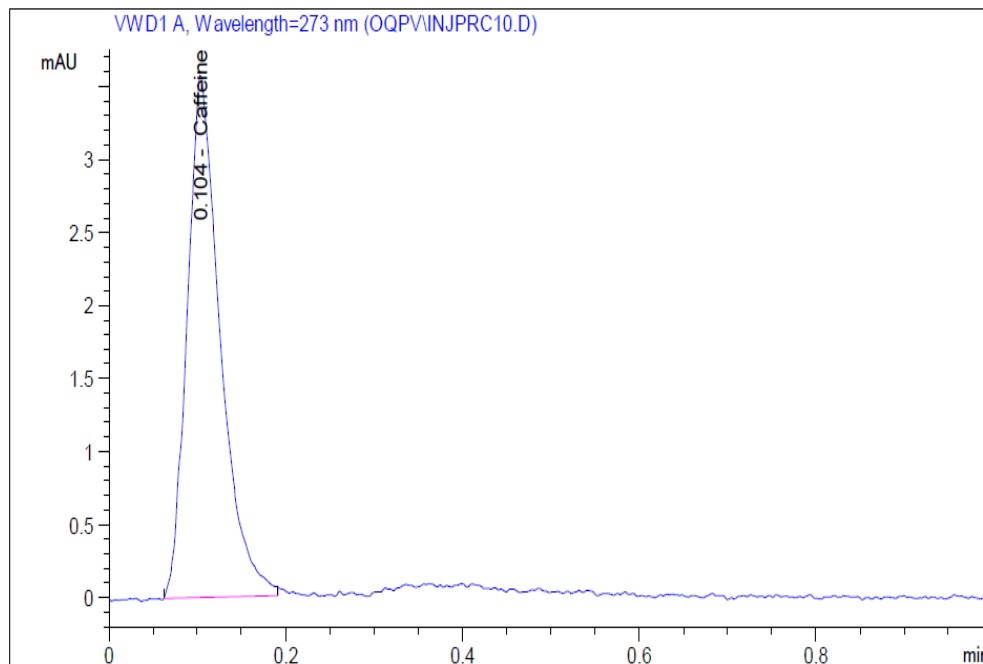


Figure 41: chromatogramme Test de Précision d'injection/carryover 03

Tableau 36: Résultats du test de Précision d'injection/carryover

Le test	Les résultats	Les limites	statut
Precision de surface	0.0537	1.000 % RSD	acceptée
précision Hauteur de pointe	0.3843	2.000 % RSD	Acceptée
surface de carryover	-0.0009	0,200 %	Acceptée
Hauteur de carryover	-0.0593	0,400 %	acceptée

Les Tests de Précision d'injection/carryover répondent à la norme

6.7 Teste de Linéarité de la réponse

Le test	resultat	Limite	statut
Corrélation (limite basse)	0.999	0,9990	acceptée

Teste de Linéarité de la réponse répond aux normes

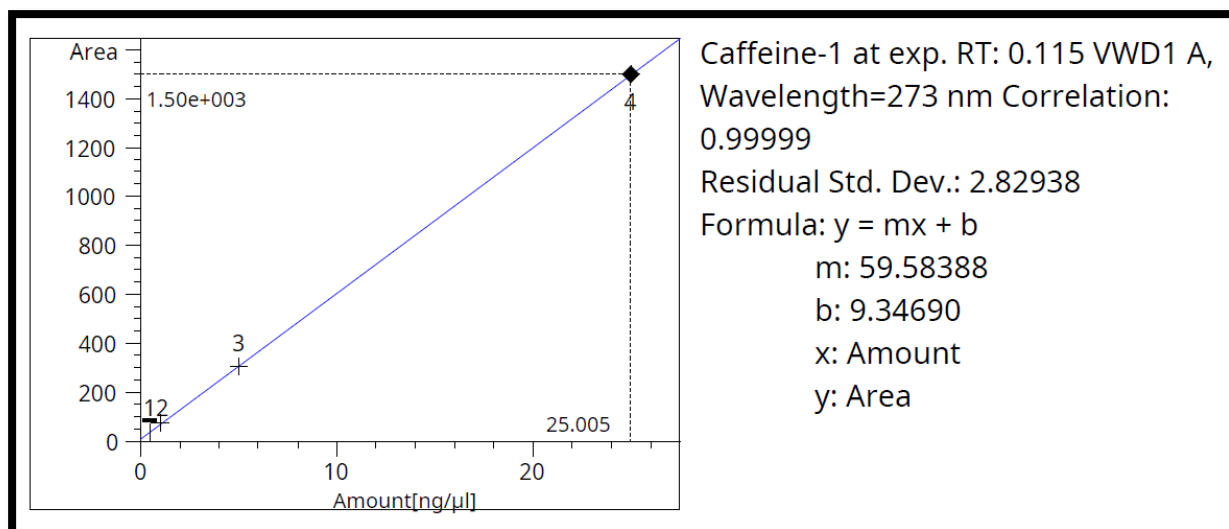


Figure 42 : chromatogramme de Teste de Linéarité de la réponse

6.8 Gradient de Composition

Tableau 37: Résultats du test de gradient de concentration

Les tests	Résultats	Limites	statut
Ondulation	0.086	0,500%	Acceptée
Pompe quaternaire de précision	0.752	1.500%	Acceptée
Précision	0.033	0.500%	Acceptée
Corrélation	0.999968	0,999 %	Acceptée

Le test de Gradient de Composition répond aux normes

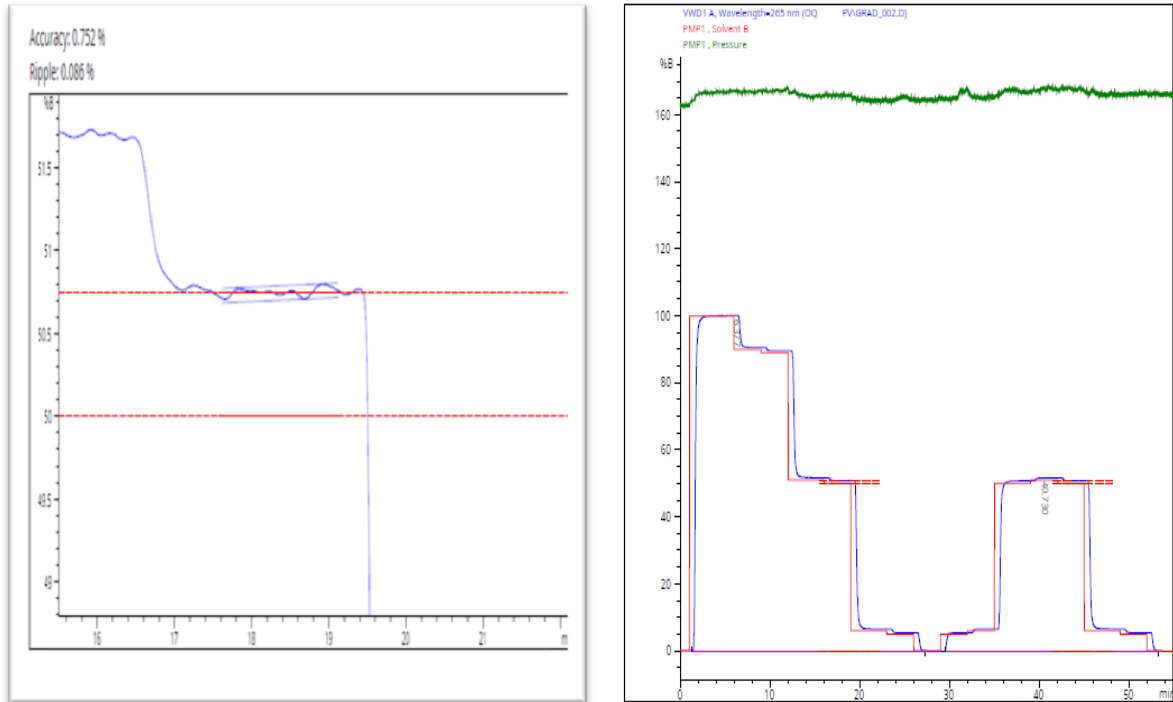


Figure 46 : de précision de gradient

Au cours de cette étude consacrée à la qualification d'une chaîne HPLC au niveau du Laboratoire REZGUI LAB situé à CAFE CHARGUI d'Alger, les résultats de cette dernière nous ont permis de tirer les conclusions suivantes :

- la chaîne HPLC a été bien installée selon des conditions environnementales convenables,
- Le logiciel ChemStation® qui pilote l'ensemble du système est bien connecté aux différents modules de la chaîne.
- La vérification du fonctionnement de la chaîne par le logiciel ChemStation® a donné des résultats satisfaisants (corrects et bien précis).

Compte tenu des résultats des tests de la précision de débit et de température et de longueur d'onde, holmium, stabilité du bruit et de la température, précision d'injection/caryover, gradient, la linéarité (du débit, d'injecteur et de détecteur)...etc. obtenus lors de la qualification de la chaîne HPLC ce dernier est déclaré conforme et qualifié en QI QO QP pendant une année (périodicité de requalification).

conclusion

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) est une technique largement utilisée pour l'analyse des produits pharmaceutiques, des biomolécules, des polymères et de nombreux composés organiques et ioniques, pour détecter, identifier et quantifier les différents constituants d'un mélange complexe.

Aujourd'hui, la technologie HPLC créant de nouvelles opportunités de rentabilité et apportant un nouveau sens au mot « qualité » dans les laboratoires analytiques.

Dans l'industrie pharmaceutique, la qualification des équipements de laboratoires et systèmes informatisés associés est le pré-requis indispensable à l'obtention de données analytiques fiables garantissant la protection des patients. La stratégie à mettre en place consiste à adapter la démarche de qualification en fonction des catégories d'équipements/systèmes

Qualification est constitué de quatre étapes :

- Qualification de conception : avant l'achat des équipements
- Qualification d'installation
 1. Avant installation
 2. Pendant l'installation
- Qualification opérationnelle
- Qualification de performance

Nous avons pu déceler plusieurs anomalies et de ce fait proposer des solutions pour les différents problèmes encore triés ;

Et pour dire que les appareils sont qualifiés ils doivent subir périodiquement des tests de qualification dans un certain laps de temps (1ans).

Les résultats de qualification doivent être acceptés par les référence internationales

Les références :

- [1]- 2007 HPLC For Pharmaceutical Scientists. YURI KAZAKEVICH – ROSARIO LOBRUTTO.
- [2]- 2019 John Wiley & Sons, Inc. HPLC AND UHPLC FOR PRACTICING SCIENTISTS.
- [3]- Chromatographie en phase liquide, Saint Etienne Ecole des mines.
- [4]- SKOOG. WEST. HOLLER, Traduction et révision par BUESS-HERMAN Claude, DAUCHOT-WEYMERRS Josette et DUMONT Freddy, Chimie Analytique (SKOOG. WEST.HOLLER), 1997.
- [5]- Chromatoguide Appendix F. 1, F.20.
- [6]- MENDHAM et al 2008, Analyse Chimique Quantitative de VOGEL, traduction et révision scientifique de la 6^e édition anglaise par Jon Toulle et Monique Mottet.
- [7]- DONG W. MICHAEL, 2006. Modern HPLC for Practicing Scientists, New Jersey: John Wiley and sons.
- [8]- DUBEREUIL.P, Introduction à la chromatographie.
- [9]- AHUJA Satinder, 1989. Selectivity and detectability Optimization in HPLC, by John Wiley.
- [10]- Théorie de la chromatographie, cour de chromatographie (Master 2 chimie), Orsay.
- [11]- UMBER. J, Chromatographie Liquide Haute performance, Nancy-Metz.
- [12]- VAN THUYNE 2010, La chromatographie sur support chiraux, Montpellier.
- [13]- VERGE, 2012. Chromatographie Liquide Haute performance, Paris.
- [14]- Méthodes physiques de séparation et d'analyse / Méthodes de dosage des biomolécules, Paris: Université Pierre et Marie Curie.
- [15]- KAZAKEVICH Yuri, ROSARIO Lobrutto, 2007. HPLC for Pharmaceuticals Scientists, New Jersey John and Sons.
- [16]- Leblanc B. Purification des protéines, Université Sherbrooke.
- [17]- Livre: MODERN HPLC FOR PRACTICING SCIENTISTS A JOHN WILEY & SONS, INC., PUBLICATION

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

- [18]-Analyticaltoxicology<https://docplayer.fr/33421281-Principe-chromatographie-liquide-haute-performance-hplc-sommaire.html>
- [19]- La chromatographie liquide haute performance (hplc) , V.JACOB , IHT de chimie de grenoble 22/08/2010 https://docplayer.fr/8331861-La-chromatographie-performance-hplc-salle-de-tp-de-genie-analytique-presentation-theorique-de-la-hplc-type-de-document-dt.html#show_full_text
- [20]- Analyse des modifications de la cytosine après oxydation de l'ADN par digestion enzymatique et HPLC-MS/MS , Par François Samson-Thibault Département de médecine nucléaire et radiobiologie, Sherbrooke, Québec, Canada Janvier 2012 . <https://docplayer.fr/11876761-Universite-de-sherbrooke-analyse-des-modifications-de-la-cytosine-apres-oxydation-de-l-adn-par-digestion-enzymatique-et-hplc-ms-ms.html>
- [21]- CPL-HPLC-CFS CHROMATOGRAPHIE PLANNAIRE <https://docplayer.fr/23340047-Cpl-hplc-cfs-chromatographie-planaire.html>
- [22]- <http://atechimie.univ-lille.fr/Chromatographie-Phase-Liquide/> [23]- DUBEREUIL.P, Introduction à la chromatographie
- [24]- COLOMB.F, HPLC: Principe et Appareillage, Rouen.
- [25]- HPLC Principe et appareillage- Ressources pédagogiques - Biochimie et Bio moléculaire
- [26]- (journal officiel de l'union europeenne)1.3.2016 154/9
- [27]- Pharmacopée Européenne neuvième édition, Tome I, 2017.
- [28]- COLIN F. Poole, 2003.The essence of Chromatography, Elsevier.
- [29]- AHUJA Satinder, ROSMUSSEN Henrik, 2007. HPLC Method developpement for pharmaceuticals, separation science and technologies, v. 8. UK: Academy Press.
- [30]- LOUGH J W, WAINER I.W, 1996. High Performance Liquid Chromatography Fundamental Principles and Practice, Chapman & Hall.
- [31]- KROMIDAZ Stavros, 2016. The HPLC Expert Possibilities and Limits of Modern High Performance Liquid Chromatography, Wiley VCH.
- [32]- Mortier Aspects Théoriques de la séparation Chromatographique.
- [33]- SKOOGS Douglas. NIEMAN A. Timothy. HOLLER F. James, 2003. Principes d'analyses Instrumentales, De Boeck
- [34]- DE GRAVE Jean, BERTHOU François et PROST Michel avec la collaboration de

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

ARPINO Patrick et PROMÉ Jean Claude, 1956. Méthodes Chromatographiques Couplées à la Spectrométrie de Masse (Technologie et application dans les domaines de l'environnement, la pharmacologie et à la biochimie), 1956.

[35]- KROMIDAZ Stavros, 2006. HPLC Made to Measure, A Practical Handbook for Optimization Wiley-VCH Verlag GmbH.

[36]- KROMIDAZ Stavros, 2016. The HPLC Expert Possibilities and Limits of Modern High Performance Liquid Chromatography, Wiley VCH.

[37]- BURGOT Gwenola, BURGOT Jean-Louis, 2006. Méthodes instrumentales d'analyse 2e chimiques et applications, édition Paris Lavoisier.

[38]- HPLC: Critères de conformité 2000.

[39]- 2e IBS Sina, 1995. Dictionnaire Thérapeutique édition. Médecine Digest. Diagnostic.

[40]- ICH Guide ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical procedure Text and Methodology Q2.(R1) November 2005.

[41]- AHUJA Satinder, SCYPINSKI Stephen, 200. Handbook of Modern Pharmaceuticals Analysis, separation science and technology, V. 3 USP. Academie Press.

[42]- [Kaliszan R., 1987. Quantitative Structure Chromatographic Retention Relationships. Wiley Interscience. New York]

[43]- THÈSE DE DOCTORAT soutenue le 17/10/2014 par Marie MÉJEAN (Développement d'un couplage de chromatographie en phase supercritique et spectrométrie de masse pour l'analyse de substances naturelles Directeur)

[44]- DONG W. MICHAEL, 2006. Modern HPLC for Practicing Scientists, New Jersey: John Wiley and sons

[45]- ANALYSE CHIMIQUE Méthodes et techniques instrumentales modernes 6e édition Francis Rouessac Annick Rouessac avec la collaboration de Daniel Cruché

[46]- Stavros Kromidas «Practical Problem Solving in HPLC» WILEY-VCH 2004

[47]- Jack Cazes «Encyclopedia of Chromatography» 2004 Update Supplement p 5-15

[48]- fronting [<https://www.austinpublishinggroup.com/chromatography>]

[49]- Rosset, R., Caude, M., and Jardy, A., Chromatographies en phases liquide et supercritique Masson, Paris, 1991

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

[50]- MEMOIRE DE FIN D'ETUDE : Mise au point, Optimisation et validation d'une méthode d'analyse physico-chimique d'un produit pharmaceutique par HPLC

[51]- guide_technique_pour_l_elaboration_des_monographies_7eme_edition_2015

[52]- AHUJA Satinder, SCYPINSKI Stephen, 200. Handbook of Modern Pharmaceuticals Analysis, separation science and technology, V. 3 USP.AcademiePress

[53]- mémoire de fin d'étude : mise au point et validation des méthodes de contrôle de qualité d'un médicament synthétique antifongique sous forme d'une crème

[54]- CAZES Jack, 2004. Analytical Instrumentation Handbook, 3e édition Taylor and François group LC

[55]- USP 40, Chromatography, Physical test Chapitre"621".

[56]- SKOOGS Douglas. NIEMAN A. Timothy. HOLLER F. James, 2003. Principes d'analyses Instrumentales, De Boeck

[57]- D.J. Carrier, C. Eckers, J.-C. Wolff, "In-source" fragmentation of an isobaric impurity of lamotrigine for its measurement by liquid chromatography tandem mass spectrometry after pre-concentration using solid phase extraction, J. Pharm. Biomed. Anal. 47 (2008) 731–737.

doi: 10.1016/j.jpba.2008.03.002

[58]- E.F. Hewitt, P. Lukulay, S. Galushko, Implementation of a rapid and automated high performance liquid chromatography method development strategy for pharmaceutical drug candidates, J. Chromatogr. A. 1107 (2006) 79–87. doi:10.1016/j.chroma.2005.12.042

[59]- livre : MODERN HPLC FOR PRACTICING SCIENTISTS A JOHN WILEY & SONS, INC., PUBLICATION page 19

[60]- université de LORRAINE ;thèse : Stratégie de qualification des équipements de laboratoires et systèmes informatisés associés basées sur les référentiels réglementaires européens et américains .

[61]-» ANSM, "ANSM (Agence Nationale de Sécurité des Médicaments). Bonnes Pratiques de Fabrication. Vol N°2014/1 bis, 2014. Vol. N°14bis

[62]- (ROUSSEAU J.F. La validation des systèmes informatisés dans l'industrie pharmaceutique: réglementation, méthodologie et application au laboratoire de contrôle. Thèse de doctorat en pharmacie. Nantes: Université de Nantes, 2012, 113 p

[63]- ISPE (International Society for Pharmaceutical Engineering). GAMP 5 : A Risk-Based Approach to Compliant GxP Computerized Systems, 2nd edition, 2008

[64]- (PONCELET C. Coûts de la Qualité et de la Non-Qualité. La Vague, Février 2013, 36, pp.16-17

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

- [65]-(POUPRY E. Mise en oeuvre du 21CFRPart11 ? C'est moins cher quand le logiciel est « étudié pour »... Mesures, Septembre 2003, 757, pp.49-51.)
- [66]-(FDA (Food and Drug Administration). 21 CFR 210 : Current Good Manufacturing Practice in Manufacturing, Processing, Packing, or Holding of Drugs. Avril 2015
- [67]-(W.SIGVARDSON K., A.MANALO J., W.ROLLER R et al. Laboratory Equipment Qualification.Pharmaceutical Technology, October 2001, pp.102-108
- [68]-(POMMERANZ S. The new Annex 15: A Comprehensive Analysis. GMP Journal, October/November 2015, 15, pp4-9.).
- [69]-(Société de conseil et d'expertise AKTEHOM. Révision de l'annexe 15: les ICH imposés, disponible sur: <http://www.industrie.com/pharma/revision-de-l-annexe-15-les-ich-imposes,53278> (page consultée le 25/04/2021). [En ligne]
- [70]-(VUOLO-SCHUESSLER L., E.NEWTON M., SMITH P et al. Harmonizing USP <1058> and GAMP for Analytical Instrument Qualification. Pharmaceutical engineering, January/February 2014, 34(1)
- [71]-(McDOWALL R.D. What's New in the Proposed USP <1058> Update ? Spectroscopy, Septembre 2015, 32, pp.32-38
- [72]-(ROMANET ROBINEAU N. Classification des systèmes informatisés selon les besoins du 21CFR part 11. La Vague, Cahier Pratique, Septembre 2010, 30
- [73]-(International Conference on Harmonization. Quality Risk Management: Q9. 2005
- [74]-(ICH (International Conference on Harmonization). ICH Q10: Pharmaceutical Quality System, Juin 2008.)
- [75]-American Society for Testing and Materials. ASTM Standard 2500: Standard Guide for Specification, Design, and Verification of Pharmaceutical and Biopharmaceutical Manufacturing Systems and Equipment, 2007
- [76]- (SWARTZ M., KRULL I. Validation, Qualification, or Verification ? LCGC North America, Octobre 2005, 23(10), p.1100.).
- [77]-FITZ J. Laboratory instrument Qualification: Solving the Puzzle. Pharmaceutical Engineering, March/April 2006, 26(2).).
- [78]- [Qualification des instruments de laboratoire Journées Qualité et Chimie 2010]
- [79] Jérôme VIAL, Laboratoire Environnemental et Chimie Analytique de l'ESPCI
- [80] S.Crauste-Manciet APHBP 20 novembre 2008- Validation des Equipements et Processus de Fabrication

QUALIFICATION D'UN EQUIPEMENT TYPE : HPLC

[81]-Les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) ligne directrice 13 Pharmacie / Qualification et validation .

[82]-pharmacopée européenne 2.2.35 chromatographe HPLC

[83]-guide de qualification d'équipement et instrument d'analyse

[84]-journal de de perkin elmer life et science analytique

[85]-Validation QI, QO, QP selon les recommandations ICH. (gazettelabo.fr)