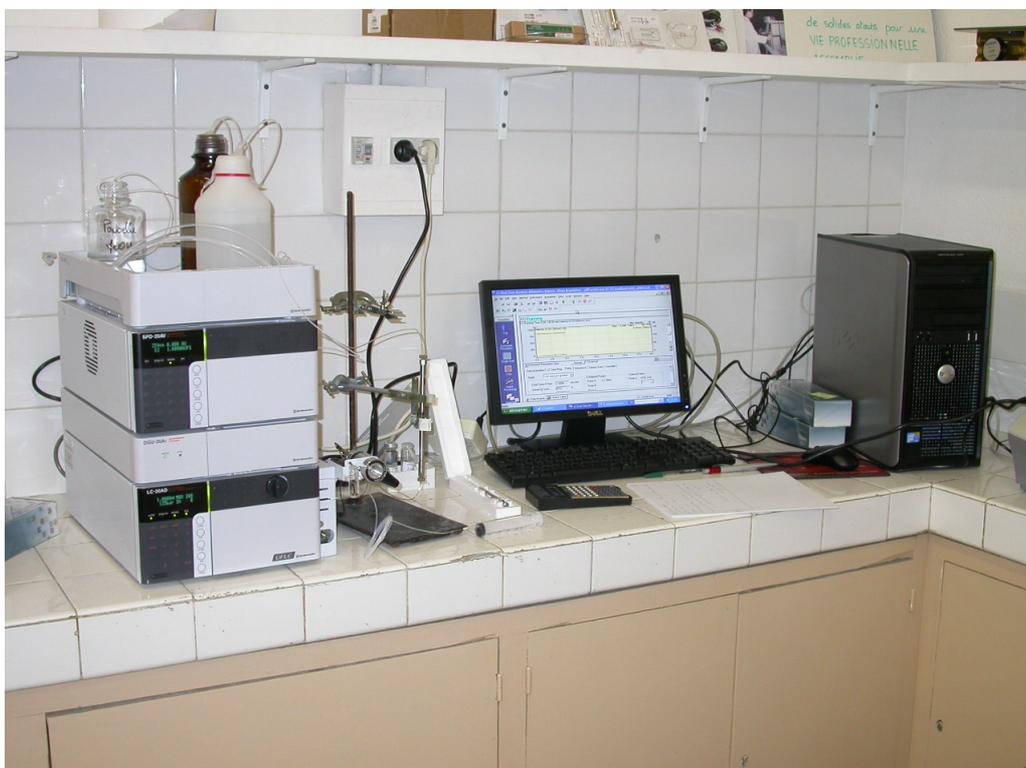


Année 2025 - 2026

2^{ème} année BTS Bioanalyses
en laboratoire de Contrôle

Activité technologique en gestion opérationnelle et documentaire du laboratoire

Activité pratique N°8



L. GODIN
<http://ligodin.free.fr>

l.godin@etsl.fr

TP n°8 : QUALIFICATION OPÉRATIONNELLE D'UNE CHAÎNE H.P.L.C Shimadzu

1. TRAVAUX PRATIQUES	2
1.1. But	2
1.2. Matériels et réactifs	2
1.2.1. Les solvants utilisés de qualité HPLC	2
1.2.2. Les colonnes utilisées	2
1.2.3. Liste du matériel	2
2. QUALIFICATION DE LA POMPE	3
2.1. Test de stabilité de la pompe	3
2.2. Vérification de l'Exactitude du débit	3
3. QUALIFICATION DU DÉTECTEUR	4
3.1. Vérification de la durée d'utilisation des sources de lumière	4
3.2. Vérification de l'exactitude en longueur d'onde	4
3.3. Étude de la dérive et du bruit de fond	4
3.4. Etude de la répétabilité d'injection en mélange de solvants	5
3.4.1. Réalisation de la solution mère de caféine	5
3.4.2. Réalisation de la solution fille de caféine	5
3.4.3. Analyse de la solution fille, six fois	6
3.5. Etude de la linéarité par courbe d'étalonnage	6
3.5.1. Réalisation des fioles de la gamme d'étalonnage	6
3.5.2. Analyse de la gamme	7
4. CONCLUSION GENERALE	7
5. RAPPORT D'ACTIVITE	8
5.1. Qualification pompe	8
5.1.1. Test de stabilité	8
5.1.2. Vérification de l'exactitude du débit	8
5.2. Qualification Détecteur	9
5.2.1. Vérification de la durée d'utilisation des sources lumineuses	9
5.2.2. Vérification de l'exactitude en longueur d'onde	9
5.2.3. Étude de la dérive et du bruit de fond	10
5.2.4. Étude de la répétabilité d'injection en mélange solvant	12
5.2.4.1. Réalisation des solutions mère et fille de caféine	12
5.2.4.2. Analyse des résultats	14
5.2.5. Étude de la linéarité par courbe d'étalonnage	14
5.2.5.1. Réalisation des fioles de la gamme d'étalonnage	14
5.2.5.2. Analyse des résultats	15
5.3. Conclusion générale	17

1. TRAVAUX PRATIQUES

1.1. But

Le but est d'effectuer une qualification opérationnelle d'une chaîne HPLC.

La Qualification Opérationnelle est la preuve documentée de l'ensemble des tests opérationnels permettant de vérifier que *l'instrument atteint les spécifications définies dans l'environnement de l'utilisateur*.

Afin de réaliser cet objectif, vous vous appuierez sur l'étude de plusieurs thèmes :

- Le test de stabilité de la pompe utilisée ;
- La vérification de l'exactitude du débit délivré par la pompe ;
- La durée d'utilisation des sources lumineuses et l'exactitude en longueur d'onde ;
- L'étude du bruit et de la dérive de la ligne de base ;
- L'étude de la répétabilité d'injection ;
- L'étude de la linéarité du détecteur.

1.2. Matériels et réactifs

1.2.1. Les solvants utilisés de qualité HPLC

- Du méthanol MeOH qualité HPLC.
- De l'acétonitrile ou méthane nitrile ACN qualité HPLC.
- De l'eau UP.

1.2.2. Liste du matériel

Une seringue SGE d'injection de 100 μ L ;

Une seringue de purge de 25 mL ;

Des bouteilles de solvants de 1000 mL pour l'eau UP, le méthanol (spécial HPLC), l'acétonitrile (spécial HPLC) et le solvant de repos (80-20 Eau-MeOH) ;

Une colonne Phénomène Gemini 2025, C18 (150 x 4,6 mm – 5 μ m) ;

Un tube de résistance (I.D 0,13 mm (tubing rouge) x 2 m) ou une union ;

Une fiole de 5 mL pour l'étude de l'exactitude du débit de la pompe ;

Un pôt de poudre de caféine (CAS (Chemical Abstracts Service) n° 58-08-2) pour la qualification du détecteur ;
1 fiole de 100 mL, et 5 fioles de 20 mL ;

Une chaîne HPLC **Prominence de Shimadzu** : pompe **LC-20AD**, contrôleur **CBM-20ALite**, dégazeur en ligne **DGU-20A5**, détecteur spectrophotométrique bi-longueur d'onde UV/visible **SPD-20AV**, pilotée via ethernet sous Windows 10 équipée du logiciel LAB Solution 5.1.

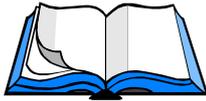
2. QUALIFICATION DE LA POMPE

2.1. Test de stabilité

☞ **Objectif** : Vérifier que les fluctuations de pression n'excèdent pas la valeur assignée.

☞ **Préparation** : Vérifier que le tube de résistance (I.D 0,13 mm (tubing rouge) x 2 m) remplace la colonne, ou qu'une union soit en place. Utiliser de l'eau UP comme phase mobile, canalisation en voie A.

Utiliser la notice technique fournie pour la chaîne HPLC de Shimadzu.



Rapport

- Noter la valeur indiquée devant COMP au début du test.
- Noter la valeur indiquée devant COMP à la fin du test.

2.2. Vérification de l'exactitude du débit

☞ **Objectif** : Vérifier que le débit fourni par la pompe est bien celui indiqué.

☞ **Préparation** : Vérifier que le tube de résistance (I.D 0,13 mm (tubing rouge) x 2 m) remplace la colonne, ou qu'une union soit en place. Utiliser de l'eau UP comme phase mobile, canalisation en voie A.

Sortir la canalisation qui se trouve dans la bouteille « poubelle » et la placer dans la fiole de 5 mL fournie.

Utiliser la notice technique fournie pour la chaîne HPLC de Shimadzu.



Rapport

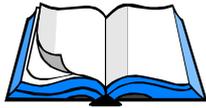
- Noter la durée fournie par le chronomètre. Convertir la durée dans le système décimal, et en déduire le débit mesuré.
- **La déviation ne doit pas dépasser $\pm 5\%$.** Conclure.

3. QUALIFICATION DU DÉTECTEUR

3.1. Vérification de la durée d'utilisation des sources lumineuses

☞ **Objectif** : Vérifier pendant quelle durée ont été utilisées les lampes.

Utiliser la notice technique fournie pour la chaîne HPLC de Shimadzu.



Rapport

- Noter les durées mesurées pour les lampes D₂ et W.
- **Les deux lampes doivent avoir une durée d'utilisation maximale de 2000 heures.**

3.2. Vérification de l'exactitude en longueur d'onde

☞ **Objectif** : Vérifier que la différence en longueur d'onde actuelle et celle que l'on indique est à l'intérieur des spécifications constructeurs.

Utiliser la notice technique fournie pour la chaîne HPLC de Shimadzu.



Rapport

- Noter les différences de longueurs d'onde mesurées à 656 nm et 254 nm.
- **On doit obtenir des longueurs d'onde à ± 1 nm.**

3.3. Étude de la dérive et du bruit de fond

☞ **Objectif** : Vérifier que la dérive et le bruit n'excède pas les niveaux de tolérance spécifiés.

☞ **Préparation** : Vérifier que le tube de résistance (I.D 0,13 mm (tubing rouge) x 2 m) remplace la colonne, ou qu'une union soit en place. Faire circuler du MeOH dans le système chromatographique à un débit de 1 mL/min.

Utiliser la notice technique fournie pour la chaîne HPLC de Shimadzu.



Rapport

- Imprimer le chromatogramme de la ligne de base sur 30 min.
- Faire un zoom de cette ligne de base sur 10 min et imprimer.



Rapport

- Mesurer la dérive de ligne de base sur 30 min, et conclure.

La dérive ne doit pas excéder 600 $\mu\text{Au/h}$ (avec une fluctuation de température maximale de 2 °C dans le laboratoire).

- Mesurer le niveau de bruit moyen, et conclure.

Le niveau de bruit ne doit pas excéder 20 μAu (avec un temps de réponse constant de 2 secondes).

3.4. Étude de la répétabilité d'injection en mélange de solvants

☞ **Objectif** : Une analyse est réalisée et les temps de rétention et aires sont obtenus pour chaque pic. Les données sont alors examinées pour vérifier la répétabilité et ainsi valider le système LC.

3.4.1. Réalisation de la solution mère de caféine

☞ Réaliser une solution mère de caféine de concentration massique $C_m = 1000 \text{ mg/L}$, pour cela, peser dans un bécher de 100 mL, environ exactement 100 mg de caféine pure en poudre. Noter la valeur exacte pesée dans le CL.

☞ Dissoudre, sous agitation, dans l'eau UP, la caféine avec un volume d'eau d'environ 80 mL. Transvaser dans une fiole de 100 mL, et compléter au trait de jauge. Cette fiole sera notée F_m .



Rapport

- Calculer la concentration exacte en caféine.

3.4.2. Réalisation de la solution fille de caféine

☞ Réaliser une solution fille de caféine de concentration massique $C_m = 20 \text{ mg/L}$, toujours avec le même solvant.

Pour cela, vous utiliserez une fiole de 20 mL.



Rapport

- Expliquer concrètement la façon dont vous avez réalisé votre dilution, et calculer le facteur de dilution.

3.4.3. Analyse de la solution fille, six fois

☞ **Préparation** : Nettoyer le système LC en faisant passer de l'eau UP. Faire passer le solvant pendant 5 min à 1 mL/min, dans la voie B.

Lorsque le nettoyage est terminé, vérifier que la voie A est connectée à une bouteille d'eau UP, la voie B à du MeOH.

Mettre en place la colonne Phenomenex Gemini C18

Utiliser la notice technique fournie pour la chaîne HPLC de Shimadzu.



Rapport

- Rendre les 6 chromatogrammes.
- Remplir un tableau récapitulatif des temps de rétention et des aires correspondants aux 6 pics de caféine.
- À l'aide d'une calculatrice, calculer le temps de rétention moyen et l'écart-type expérimental correspondant. Faire de même pour les aires.
- En déduire les CV% (ou RSD Relative Standard Deviation en anglais) en temps de rétention et en aire.
- Conclure connaissant les spécificités suivantes à respecter :
 - CV% en temps de rétention < 0,5 %.
 - CV% en aire < 5,0 %.

3.5. Étude de la linéarité par courbe d'étalonnage

3.5.1. Réalisation des fioles de la gamme d'étalonnage

☞ **Préparation de la gamme** : Préparer différentes fioles filles de 20 mL, suivant le tableau ci-dessous :

Fioles	V(F _m) (μL)	C _{fille} (mg.L ⁻¹)
1	200	
2	300	
3	400	Déjà réalisée
4	500	
5	600	



Rapport

Indiquer la méthode suivie pour calculer le volume de prélèvement V(F_m) de solution mère de caféine.

Compléter le tableau.

3.5.2. Analyse de la gamme d'étalonnage

☛ Pour l'analyse chromatographique de la gamme :

Utiliser la notice technique de la chaîne HPLC



Rapport

- Imprimer la droite d'étalonnage avec tous les paramètres utiles.
- Relever le coefficient de détermination R^2 .
- **La valeur de R^2 doit être supérieure à 0,98.**
- Calculer les déviations pour chaque concentration.
- **La déviation ne doit pas dépasser $\pm 5\%$ pour chaque concentration.**

4. CONCLUSION GENERALE



Rapport

Conclure sur l'ensemble des manipulations réalisées, et donc sur la **qualification opérationnelle** de l'appareil.

5. TP N° 8 : RAPPORT D'ACTIVITÉ : SUR LA QUALIFICATION OPÉRATIONNELLE DE LA CHAÎNE HPLC

5.1. Qualification de la pompe

5.1.1. Test de stabilité

- Noter la valeur indiquée devant COMP au début du test.
 - Noter la valeur indiquée devant COMP à la fin du test.
- Conclure sachant que **La mesure de fluctuation de pression ne doit pas excéder 0,20 MPa**

5.1.2. Vérification de l'exactitude du débit

- Noter la durée fournie par le chronomètre. Convertir la durée dans le système décimal, et en déduire le débit mesuré.
- **La déviation ne doit pas dépasser $\pm 5\%$. Conclure.**

5.2. Qualification du détecteur

5.2.1. Vérification de la durée d'utilisation des sources lumineuses

- Noter les durées mesurées pour les lampes D₂ et W.

- Les deux lampes doivent avoir une durée d'utilisation maximale de 2000 heures. Conclure.

5.2.2. Étude de l'exactitude en longueur d'onde

- Noter les différences de longueurs d'onde mesurées à 656 nm et 254 nm.

- On doit obtenir des longueurs d'onde à ± 1 nm. Conclure.

5.2.3. Étude de la dérive et du bruit de fond

- Mesurer la dérive de ligne de base sur 30 min (Cf annexe métrologique), et conclure.

La dérive ne doit pas excéder 600 $\mu\text{Au/h}$ (avec une fluctuation de température maximale de 2 °C dans le laboratoire).

- Imprimer la ligne de base sur 30 minutes :

Ligne de base sur 30 min
à coller ici

- Mesurer le niveau de bruit moyen (Cf annexe métrologique), et conclure.

Le niveau de bruit ne doit pas excéder 20 μ Au (avec un temps de réponse constant de 2 secondes).

- Imprimer la ligne de base zoomée sur 10 minutes :

Ligne de base zoomée
à coller ici

5.2.4. Étude de la répétabilité d'injection en mélange solvant

5.2.4.1. Réalisation des solutions mère et fille de caféine

- Calculer la concentration exacte en caféine.

- Expliquer concrètement la façon dont vous avez réalisé votre dilution, et calculer le facteur de dilution.

- Imprimer les chromatogrammes correspondants aux solutions filles n° 01 à 06 :

Chromatogrammes
répétabilité
à coller ici

Résultats répétabilité
à coller ici

5.2.4.2. Analyse des résultats

- Remplir un tableau récapitulatif des données chromatographiques :

Solutions filles	1	2	3	4	5	6
t_R (min)						
Aire (mAu.min)						

- Calculer, à l'aide d'une calculatrice en mode statistique, la moyenne des temps de rétention $t_{R_{moyen}}$ et son écart-type expérimental associé $s(t_R)$. Faire de même pour les aires.
- Calculer le CV%.
- Conclure sur la répétabilité des mesures.
 - CV% en temps de rétention < 0,5 %.
 - CV% en aire < 5,0 %.

5.2.5. Étude de la linéarité par courbe d'étalonnage

5.2.5.1. Réalisation des fioles de la gamme d'étalonnage

- Préparation de la gamme : Remplir le tableau ci-dessous :

Fioles	V(F _m) (μL)	C _{filie} (mg.L ⁻¹)
1	200	
2	300	
3	400	Déjà réalisée
4	500	
5	600	

- Indiquer la méthode suivie pour calculer le volume de prélèvement $V(F_m)$ de solution mère de caféine.

5.2.5.2. Analyse des résultats

Imprimer la droite d'étalonnage avec tous les paramètres utiles :

droite d'étalonnage à coller ici

- Relever la valeur du coefficient de détermination R^2 .
- La valeur de R^2 doit être supérieure à 0,98. Conclure.

☛ Calculer les déviations pour chaque concentration

Nom de la solution	C_{cafeine} (mg/L)	Absorbance (mAu)	Sensibilité relative ($\text{mg}^{-1} \cdot \text{L}$)	Deviation (%)
Cafeine 1	10	$A_1 =$	① = $A_1/10$	
Cafeine 2	15	$A_2 =$	② = $A_2/15$	
Cafeine 3	20	$A_3 =$	③ = $A_3/20$	
Cafeine 4	25	$A_4 =$	④ = $A_4/25$	
Cafeine 5	30	$A_5 =$	⑤ = $A_5/30$	

$$\text{Déviation (\%)} = \frac{\text{sensibilité relative} - \text{sensibilité relative standard}}{\text{sensibilité relative standard}} \times 100$$

$$\text{Avec sensibilité relative standard} = \frac{\textcircled{1} + \textcircled{2} + \textcircled{3} + \textcircled{4} + \textcircled{5}}{5}$$

- La déviation ne doit pas dépasser $\pm 5\%$ pour chaque concentration. Conclure.

5.3. Conclusion générale

Conclure sur l'ensemble des manipulations réalisées, et donc sur la **qualification opérationnelle** de l'appareil.