FACULTE DE MEDECINE
DEPARTEMENT DE PHARMACIE
CHIMIE ANALYTIQUE
Professeur Ph. HUBERT

QUALIFICATION DE L'EQUIPEMENT

J. MBINZE KINDENGE, R. MARINI, F. LECOMTE ET PH. HUBERT

Septembre 2008

Service de Chimie Analytique
Département des Sciences Pharmaceutiques - Faculté de Médecine
UNIVERSITE DE LIEGE

QUALIFICATION

Procédure d'analyse : « Ensemble des opérations nécessaires pour effectuer l'analyse de la substance à examiner : préparation d'échantillons, de matériaux et substances de référence, des réactifs, emploi de l'appareillage, étalonnage, formule pour le calcul des résultats, nombre de répétitions et mode opératoire pour les répétitions…. »

Méthode : Technique : spectrophotométrie, chromatographie liquide,….
Méthode : partie de la procédure.

Validation : ensemble des opérations nécessaires pour prouver que la procédure (méthode) est suffisamment exacte et fiable pour avoir confiance dans les résultats fournis et ceci pour un usage déterminé.
« Le but de la validation d'une procédure d'analyse est de démontrer qu'elle correspond à l'usage pour lequel elle est prévue »

- Application déterminée
- Niveau de validation : fonction de l'application

Qualification : opération destinée à démonter que le matériel ou l'équipement utilisé donne des résultats attendus pour l'usage auquel il est destiné.

Tout élément <u>critique</u> intervenant dans une procédure d'analyse doit être qualifié, <u>avant</u> de valider la procédure.

Les tests de qualification permettent :

* de s'assurer que :

  L'appareillage a des performances en accord avec les exigences de la procédure,

  Les résultats obtenus en appliquant la procédure seront fiables et valides,

* mais aussi de :

  Comparer différents appareils,

  Transférer des méthodes,

  Identifier le mauvais fonctionnement d'un appareil.

DEMARCHE GENERALE

I. **ETUDE DES ELEMENTS DE LA CHAINE HPLC, DE SON FONCTIONNEMENT ET DES SPECIFICATIONS DU CONSTRUCTEUR**

II. **DETERMINATION DU DOMAINE D'UTILISATION DE L'APPAREILLAGE**

III. **TESTS DE QUALIFICATION**

III.1. Conduite générale des tests

III.2. Etude des principaux tests

III.2.1. *Système d'injection*

* répétabilité des injections
* efficacité du lavage entre injections
* adéquation pour la chromatographie en phase normale

III.2.2. *Pompe*

* répétabilité du débit
* exactitude du débit et reproductibilité de l'exactitude au cours du temps
* bruit

III.2.3. *Pompes à gradient*

* exactitude de la composition du mélange délivré en gradient
* répétabilité de l'exactitude de la composition du mélange (fonctionnement isocratique)
* répétabilité du gradient
* volume du mélangeur et volume de retard du gradient

III.2.4. Détecteurs U.V.

* sensibilité à l'indice de réfraction
* exactitude de la longueur d'onde
* bruit à court terme, à long terme, dérive et sensibilité au débit
* limite de détection
* linéarité
* calibration
* constante de temps
* résolution (barrette de diodes)
* répétabilité des spectres à faible concentration (barrette de diodes)

III2.5. Contribution extra-colonne à l'élargissement des pics

IV. ETABLISSEMENT DES NORMES INTERNES

I. ETUDE DES ELEMENTS DE LA CHAINE HPLC, DE SON FONCTIONNEMENT ET DES SPECIFICATIONS DU CONSTRUCTEUR

- Système d'injection (manuel, automatique ; boucle de volume fixe ou variable)
- pompe (isocratique, gradient)
- colonne (four)
- détecteur à absorption U.V. (longueur d'onde fixe ou variable, ou barrette de diodes), fluorimétrique (à filtre, à simple ou double monochromateur), électrochimique (ampérométrique ou coulométrique, à une ou deux électrodes), réfractométrique (Fresnel ou à déviation ou interférométrique)
- connexions, colonnes de garde, pré-colonne, …
- enregistreur, intégrateur.

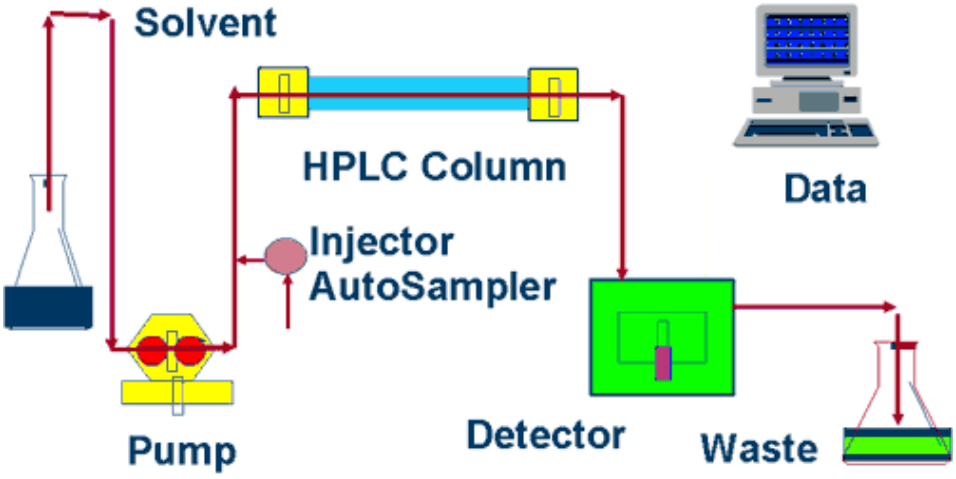


Figure 1 : Schéma d'un appareil HPLC

Spécifications du constructeur : noter les performances qui peuvent être attendues dans des conditions opératoires données (?)

II. DETERMINATION DU DOMAINE D'UTILISATION DE L'APPAREILLAGE

Déterminer les caractéristiques importantes à évaluer en fonction de l'usage prévu.
Exemples :

- Importance de la répétabilité du débit de la pompe, de l'exactitude de composition de la phase mobile et de la température du four pour l'identification par le tems de rétention (t_R)
- Importance de la mesure du bruit, de l'efficacité du rinçage entre les injections pour l'analyse de traces
- Importance de la mesure de la contribution extra-colonne à l'élargissement des pics pour la séparation critique de paires de composés

III. TESTS DE QUALIFICATION

III.1. Conduite générale des tests

- définir l'élément à qualifier (ex : pompe)
- définir la caractéristique de l'élément que l'on veut mesurer (ex : répétabilité du débit de la pompe) et l'intérêt de cette mesure (ex : la répétabilité du débit influe sur le tR en analyse qualitative et sur la mesure des surfaces en analyse quantitative)
- définir le paramètre le plus représentatif qui permet de mesurer la caractéristique (ex : tR pour la répétabilité du débit)
- définir les facteurs qui peuvent influer sur ce paramètre (ex : composition de la phase mobile et température influent sur le tR) afin de maintenir ces facteurs constants au cours du test
- établir une procédure de qualification détaillée

III.2. **Etude des principaux tests**

- Références principales :

  Tests exhaustifs (Rehman, 1987)

  Tests concernant les pompes (Sheehan, 1990)

  Tests concernant les détecteurs UV (ASTM, 1980-Wolff, 1981)

  Notices des constructeurs d'appareillage

- Tests de qualification :

  - à faire exécuter par un personnel qualifié
  - à adapter avec des composés usuels de la firme, stables en solution
  - à réaliser sans colonne, et/ou avec une colonne de caractéristique connues (N, Rs, As) pour les composés tests
  - à adapter en fonction de l'usage prévu

III.2.1. <u>Système d'injection automatique</u>

* répétabilité des injections
* efficacité du lavage entre injections
* adéquation pour l'utilisation en chromatographie en phase normale

<u>Intérêt des tests</u>

➢ Répétabilité de l'injection : importance pour la répétabilité du dosage

➢ Efficacité du rinçage (ou lavage) : importante pour la recherche et le dosage de composés à l'état de traces, et lorsqu'on injecte des solutions de concentrations très différentes

➢ Adéquation pour la chromatographie en phase normale (concentration possible des solutions à analyser, due à l'évaporation du solvant volatil dans le passeur d'échantillons) : importance pour la répétabilité et l'exactitude des dosages utilisant ce mode de chromatographie.

<u>Paramètres de mesure</u>

➢ Répétabilité de l'injection et adéquation pour la chromatographie en phase normale : mesure des surfaces de pics

➢ Efficacité du rinçage (ou lavage) entre flacons : examen du chromatogramme de rinçage à grande sensibilité du détecteur et mesure des surfaces (ou hauteurs) des pics.

<u>Facteurs influant sur le paramètre de mesure</u>

La répétabilité des surfaces dépend :

- essentiellement : de l'injecteur (type, volume injecté)
- mais aussi : de la pompe (variations de débit, pulsations),
  de la détection (bruit, dérive, signal),
  du système de données (vitesse d'échantillonnage, paramètres d'intégration)

$$\frac{\delta A}{A} = \frac{4}{\sqrt{2\pi}} \left(\frac{S}{B}\right)^{-1} \frac{\omega^{3/2}}{n}$$

A : surface du pic

S/B : rapport signal/bruit

ω : largeur du pic

n : nombre de points d'échantillonnage

- peu des variations de composition de la phase mobile (contrairement à la hauteur des pics)

<u>Tests</u>

- Tests de base : Cf. Rehman
- Adapter éventuellement les tests avec un mélange de composés tests de comportement chromatographique satisfaisant (N, As), de concentration telle que S/B soit élevé ; thermostater de préférence la colonne pour éviter la dérive ; choisir le volume d'injection, le volume et la nature du solvant de rinçage suivant l'usage ; régler les paramètres d'intégrations avec soin.
- Comparer avec la répétabilité obtenue par injection manuelle
- Exprimer la répétabilité des injections par le C.V., % de la surface des pics, l'efficacité du rinçage par le pourcentage de composé retrouvé dans le chromatogramme de rinçage, par rapport à l'injection précédente.

III.2.2. *<u>Pompe</u>*

* répétabilité du débit

* exactitude du débit et reproductibilité de l'exactitude au cours du temps

* bruit

<u>Intérêt</u>

➢ Analyse qualitative (identification des composés) : la répétabilité du t_R est liée à celle du débit de la pompe,

➢ Analyse quantitative : exactitude et reproductibilité des résultats de l'analyse sont liées à la reproductibilité du débit (avec détection UV.., la variation du débit a plus d'influence sur les surfaces que sur les hauteurs de pics). Cependant si les solutions standards et à analyser sont injectées de façon séquentielle rapprochée, peu d'influence sur les résultats de l'analyse.

➢ Analyse de traces : le bruit conditionne la limite de détection, la répétabilité de la mesure des surfaces.

<u>Paramètres de mesures</u>

➢ répétabilité du débit : mesure de t_R ou t_0

➢ exactitude du débit : mesure du volume (ou masse) de phase mobile écoulée pendant un temps t

➢ bruit : mesure des variations aléatoires de la ligne de base sur l'enregistrement chromatographique

<u>Facteurs influant sur les paramètres</u>

➢ t_0, fonction du débit

➢ t_R, fonction : débit, température, composition de la phase mobile, peu influencé par la pression

$$\frac{\delta t_R}{t_R} = \left[\left(\frac{\delta F}{F} \right)^2 + \left(\frac{\Delta \mu \delta T}{RT^2} \right)^2 \right]^{1/2}$$

avec :

F : débit

$\Delta\mu$: Changement dans le potentiel chimique

R : constante des gaz parfaits

T : température

Variable	*Changement*	*Effet sur t_R*
Débit	+ 1 %	- 1 %
Température	+ 1°C	- (1 à 2 %)
% solvant organique	+ 1 % v	- (5 à 10 %)
pH	+ 0,01 unité	± 0 à 1 % (en fonction du composé)

Changement variable	*Effet*		
	T_0	*t_R*	*K'*
Débit	X	X	
Température		X	X
Phase mobile		X	X

➢ Bruit

Fonction :

pompe (pulsations, volume du mélangeur pour pompe à gradient)

composition de la phase mobile

détecteur (fonction de sa sensibilité à indice de réfraction, débit, t°…)

Tests

➢ Répétabilité, reproductibilité du débit : (cf Rehman, Sheeman). Injection d'une solution de composé non retenu (ex uracile ; mesure de t0) ou de composés retenus (mesure de t_R ; contrôler la température et la composition de la phase mobile) ou de composés retenus et d'un composé non retenu (mesure de t_0, t_R avec ou sans contrôle de température). Réaliser au moins 6 injections successives et les répéter à des intervalles de temps réguliers au cours de la journée.

Exprimer la répétabilité et la reproductibilité de t_0, t_R, k' par le C.V. (en %). Si t_0 et t_R varient, k' constant : problème de température et/ou de phase mobile.

➢ Exactitude du débit ; répétabilité et reproductibilité de l'exactitude en fonction du temps.

Mesure en sortie de colonne du volume (ou de la masse) de la phase mobile écoulée pendant un temps t de 5 ou 10 min.

Réaliser au moins 3 mesures successives et les répéter à des intervalles de temps réguliers au cours de la journée.

Exprimer l'exactitude du débit en calculant l'erreur :

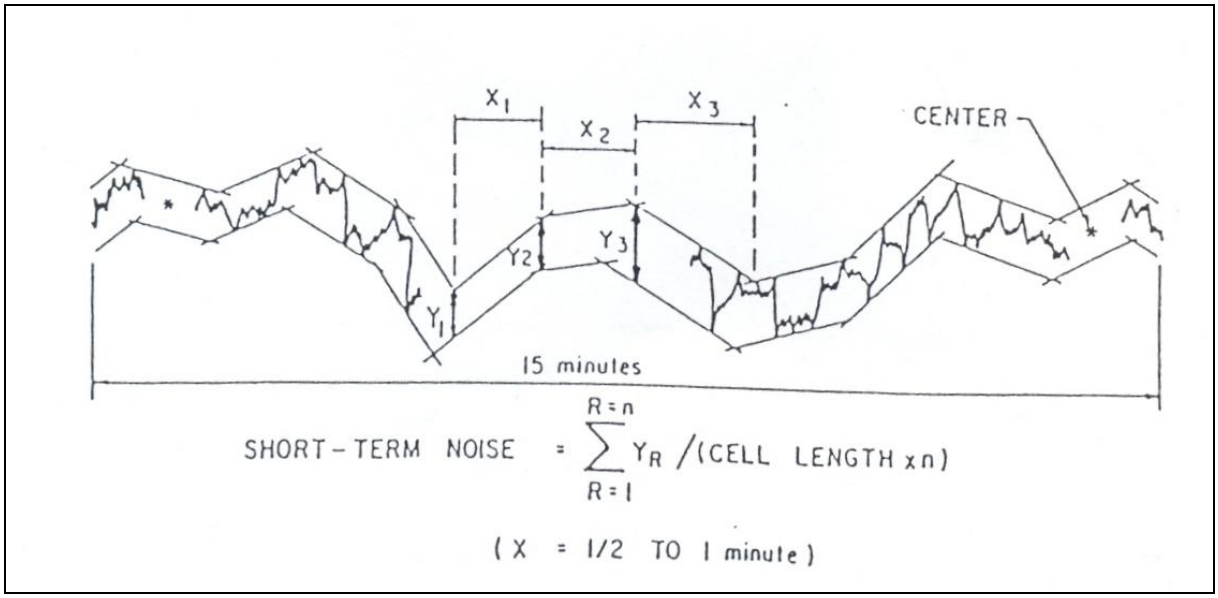
$$\text{Erreur} = \frac{\text{débit mesuré - débit affiché}}{\text{débit affiché}} \times 100$$

et sa répétabilité et reproductibilité par le C.V. (en %).

➢ Bruit

Mesure du bruit pic à pic ou selon ASTM (cf. détecteur) avec (F = 1ml/min) et sans (F = 0ml/min) débit de phase mobile, sur une période de 10 min à une longueur d'onde déterminée. La phase mobile utilisée peut ou non absorber dans l'UV. Le bruit dû à la pompe peut être estimé par la différence entre les bruits mesurés avec et sans débit de phase mobile.

Exprimer le bruit en mUA (phase mobile n'absorbant pas dans l'UV) ou en pourcentage par rapport au bruit de fond (phase mobile absorbant dans l'UV).



III.2.3. Pompes à gradient

* exactitude de la composition du mélange délivré en gradient

* répétabilité de l'exactitude de la composition du mélange (fonctionnement isocratique)

* répétabilité du gradient

* volume du mélangeur et volume de retard du gradient

Rappel du fonctionnement d'un système de gradient basse pression

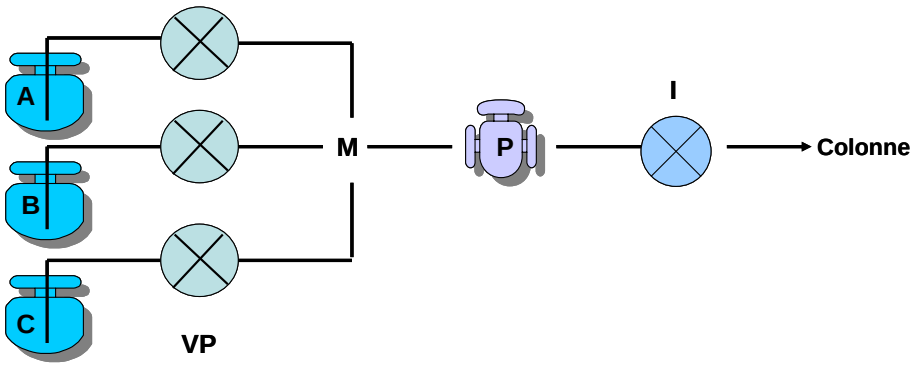


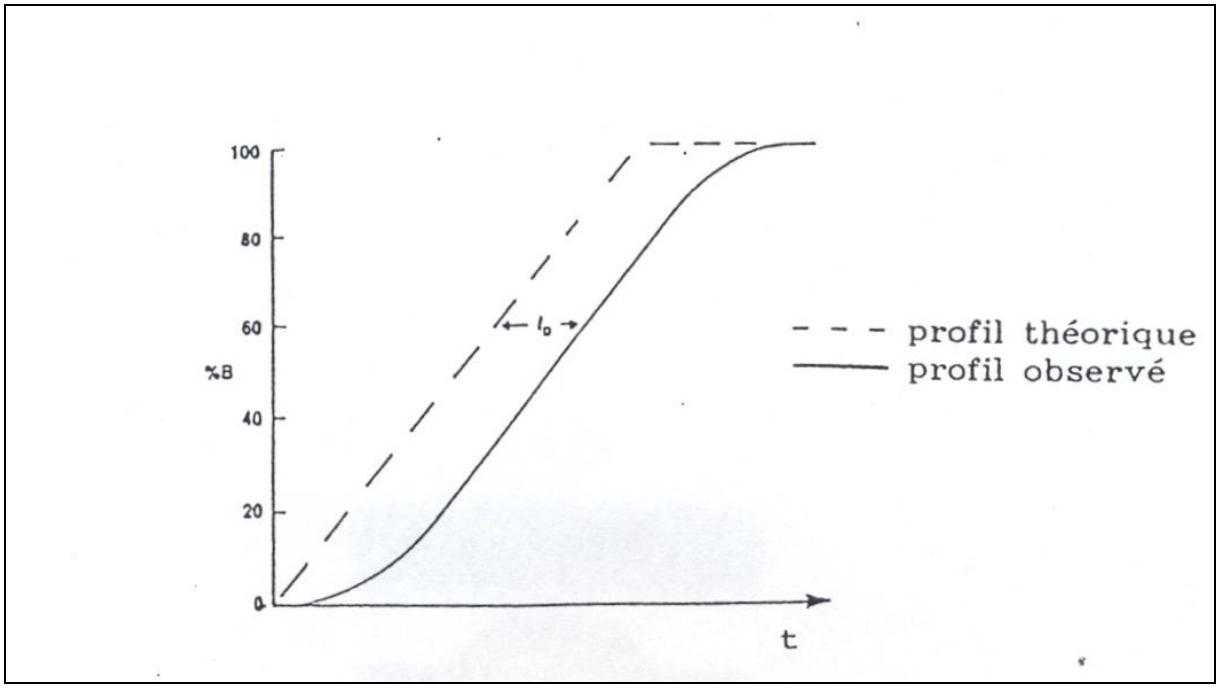
Figure 2 : Schéma d'un système à basse pression

Avec :

A, B, C	:	réservoirs de solvant
VP	:	vannes proportionnelles
M	:	mélangeur basse pression
P	:	pompe
I	:	système d'injection

- Les VP, sous contrôle du microprocesseur, s'ouvrent un temps de cycle proportionnel au pourcentage de chacun des solvants dans le mélange.
- Le temps de cycle varie avec le modèle de pompe
- L'exactitude du mélange délivré est d'autant plus grande que le temps de cycle est long
- Lorsque le cycle est long, le volume du mélangeur (Vm) doit être plus grand
- Le bruit de la pompe en gradient ou en isocratique avec 2 ou 3 solvants est lié à l'efficacité du mélange ; si Vm est grand, le mélange est plus efficace et le bruit plus faible

- Vm est responsable de l'arrondissement observé au début et à la fin du profil d'un gradient d'élution



- t_D représente le temps de retard observé par rapport au gradient théorique. Il est du au volume du mélangeur + éléments situés entre le mélangeur et la colonne.

<u>Intérêt des tests</u>

➢ Exactitude de composition de la phase mobile : importante, surtout lorsqu'un des solvants est en faible proportion, pour la sélectivité de la séparation.

➢ Répétabilité de composition de la phase mobile (pompe à gradient délivrant un mélange de solvants en fonctionnement isocratique) : affecte la répétabilité des résultats d'une analyse en isocratique.

➢ Répétabilité du gradient : affecte la répétabilité des résultats de l'analyse en gradient

➢ VD affecte le temps de rétention des composés (surtout celui des composés élués en début de chromatogramme) et la sélectivité de la séparation (Rs augmente avec VD). La mesure de VD est importante pour le transfert d'une méthode.

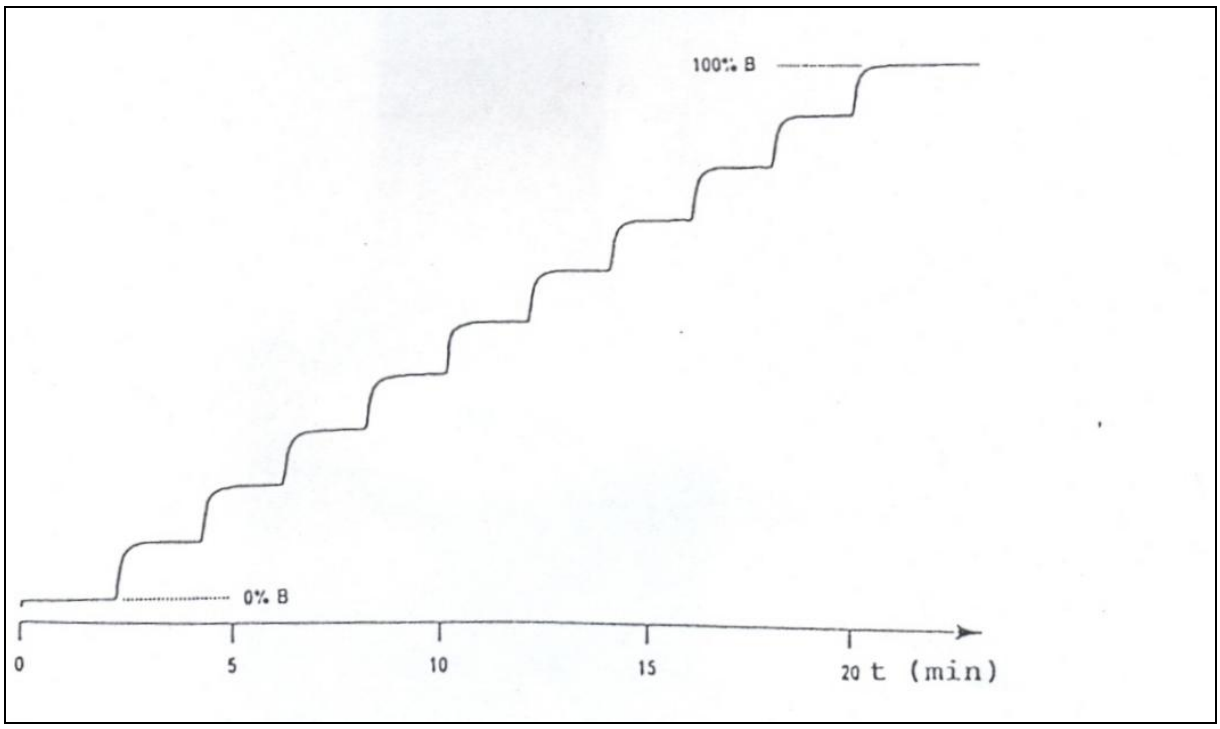
➢ Vm affecte l'arrondissement de début et de fin du profil du gradient et ceci d'autant plus que le temps du gradient ou le débit sont élevés ; l'effet est observé surtout sur les pics élués en début de chromatogramme, mais il est moins important que celui de VD.

Tests

Divers tests peuvent être appliqués ; exemples de tests détaillés : Cf Rehman, Sheehan, et les notices des constructeurs

➢ Exactitude de la composition du mélange délivré en gradient

- Remplacer la colonne par un tube
- Remplir les réservoirs A et B de mélanges de solvants identiques et ajouter à B un composé absorbant dans l'UV ; avec 100 % de B, ajuster la sensibilité du détecteur de façon à obtenir un signal à 90 % de la pleine échelle ; vérifier la linéarité par dilution de B
- Programmer un gradient de 0 à 100 % de B avec des incréments de 10 %, programmés à des intervalles de temps réguliers ; faire de même avec un gradient de 0 à 10 % de B, avec des incréments de 1 %.
- Déterminer le pourcentage de B délivré par la pompe par mesure graphique de la hauteur des paliers



- Comparer ce résultat au pourcentage de B théorique. Calculer l'erreur relative (en %) pour chacun des paliers, et le C.V. (en %), pour l'ensemble des paliers, pour les deux types de gradients programmés.

➢ Répétabilité de l'exactitude de la composition du mélange (isocratique). Pour une composition donnée de phase mobile (A%, B% solvant organique) préparée à partir des deux flacons A et B, évaluer la répétabilité de la composition délivrée par injection de composés de comportement chromatographique régulier. Calculer le k'.

La relation suivante : $\log k' = \log k_0 \quad S\phi$

Avec :

ϕ = % de solvant organique

K_0= coefficient de distribution du composé dans l'eau

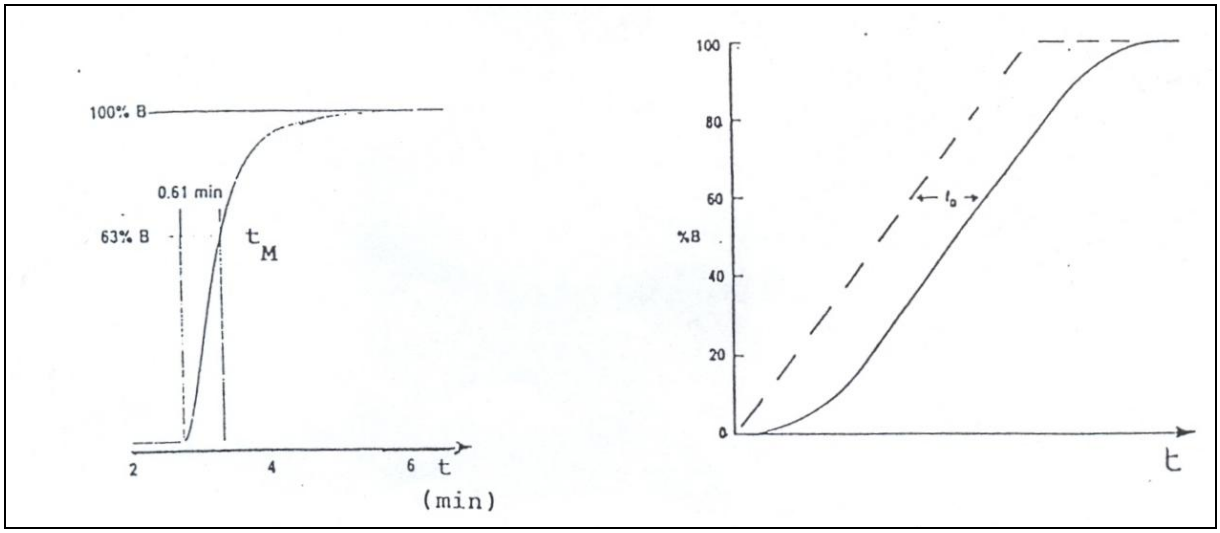
S ≈ 5 pour les petites molécules.

Permet de calculer le C.V. de ϕ qui est égal à 1/5 du C.V. de log k'.

➢ Répétabilité du gradient

- injecter une solution mixte de composés
- répéter le gradient n fois
- mesurer le tR et la surface pour chaque composé et exprimer la répétabilité par le C.V.(en %).

➢ Volume du mélangeur et volume de retard du gradient. Mêmes solvants A et B que pour le test exactitude de composition de la phase mobile.



Mesure graphiquement de t_D et tm : calculer $V_D = t_D.F$ et $Vm = t_m.F$

III.2.4. <u>Détecteurs U.V.</u>

* sensibilité à l'indice de réfraction,
* exactitude de la longueur d'onde,
* bruit à court terme, à long terme,
* dérive et sensibilité au débit,
* limite de détection,
* linéarité,
* calibration,
* constante de temps,
* résolution.

➢ Sensibilité à l'indice de réfraction

<u>Intérêt du test</u>

Important pour l'analyse en gradient : dérive de la ligne de base liée à la sensibilité du détecteur au changement de l'indice de réfraction de la phase mobile.

Paramètre de mesure

Déviation de la ligne de base.

Facteur influant sur le paramètre

Température

Test (cf. Rehman)

Cellule du détecteur remplie avec du méthanol puis du cyclohexane

Mesure de la différence de déviation en mUA

➢ Exactitude de la longueur d'onde

Intérêt du test

Important pour la sélectivité de la détection.

Paramètre de mesure

Enregistrement du spectre : $A = f(\lambda)$

Facteur influant sur le paramètre

Composition de la phase mobile

Test

Remplir la cellule de solvant ; faire le zéro, puis remplir la cellule avec une solution de perchlorate d'holmium (ou autre composé test). Balayer en longueur d'onde et comparer le spectre à celui obtenu à un spectrophotomètre dans les mêmes conditions.

➢ Bruit à court terme, à long terme, dérive, sensibilité au débit

Intérêt du test

- bruit à court terme : affecte la limite de détection (augmente avec le vieillissement de la lampe ou la contamination de la cellule)
- bruit à long terme : peut être confondu avec un pic chromatographique
- dérive : gênante si les analyses sont effectuées sur une longue période de temps ; affecte la limite de détection
- sensibilité au débit : importante pour les débits programmés

Paramètre de mesure

Déviation de la ligne de base (mUA)

Facteur influant sur le paramètre

- température
- composition de la phase mobile
- pulsations de la pompe (dynamique)

- constante de temps du détecteur
- largeur de bande du spectrographe (barrette de diodes)

Test

Cf. ASTM et bruit de la pompe

➢ Limite de détection, intervalle de linéarité, calibration

Intérêt des tests

Analyse de traces, analyse quantitative avec une large gamme de concentration

Paramètre de mesure

Absorbance

Facteur influant sur le paramètre

- limite de détection
- longueur d'onde de détection
- température
- composition de la phase mobile
- pulsations de la pompe
- constante de temps
- largeur de la bande du spectrographe (barrette de diodes)
- intervalle de linéarité
- facteurs influant sur le bruit

Tests

• limite de détection du détecteur proprement dit (Cf. ASTM).

• linéarité et intervalle de linéarité : mesure de la linéarité et de l'intervalle de linéaire de réponse du détecteur proprement dit (Cf. ASTM) ou bien en mode dynamique, mesure de la linéarité de la réponse du système chromatographique entier (Cf. Rehman).

• calibration : faire parcourir la colonne par la phase mobile (mode dynamique). Mesurer la déviation du signal (mm) sur le papier aux différents calibres. Tracer la droite de régression du signal en fonction du calibre.

➢ Résolution spectrale et répétabilité des spectres à faible concentration

Intérêt du test

• résolution spectrale : différenciation de composés par leurs détails spectraux

• répétabilité des spectres à faible concentration : identification de composés à l'état de traces.

Paramètre de mesure

Spectre d'absorbance

Facteur influant sur le paramètre

- composition de la phase mobile
- largeur de bande du spectrographe
- constante de temps du détecteur

Test (cf. Rehman)

III.2.5. Contribution extra-colonne à l'élargissement des pics

Intérêt du test

Ce test est important pour la résolution des pics chromatographiques ; la contribution extra-colonne à l'élargissement des pics affecte surtout la largeur des pics dont le nombre de plateaux théoriques est important, c'est-à-dire les pics élués en début de chromatogramme.

Rappel

L'élargissement des pics implique la contribution des facteurs indépendants dont les variances sont additionnelles.

σ^2 tot = σ^2 col + σ^2 dét + σ^2 conn + σ^2 inj + σ^2 autres

σ^2 tot = variance totale du pic

σ^2 col, dét, conn, inj, autres = variances dues à la colonne, au détecteur, aux connexions, à l'injecteur

= variance extra-colonne

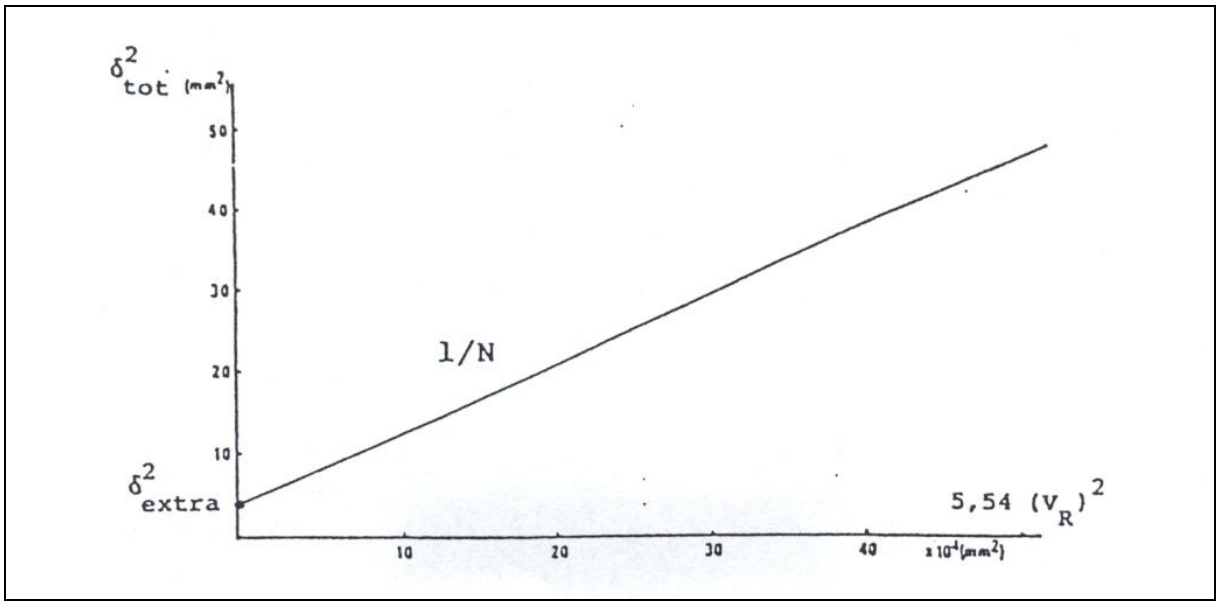
$$\delta^2_{Tot} = \delta^2_{Col} + \delta^2_{Extra}$$

$$N = 5{,}54 \frac{V_R^2}{\delta^2_{Col}}$$

$$\delta^2_{Col} = 5{,}54 \frac{V_R^2}{N}$$

$$\delta^2_{Tot} = \delta^2_{Extra} + 5{,}54 \frac{V_R^2}{N}$$

$$\delta^2_{Tot} = \frac{1}{N}(5{,}54)\, V_R^2 + \delta^2_{Extra}$$



Test (cf Rehman)

Injection de composes élués à des tR différents, ayant le même nombre de plateaux théoriques. Les composés doivent donner des pics gaussiens sinon calcul de N est erroné.

Ex :	As : 1,23 → erreur	+ 30 % avec la mesure de δ
		+ 15 % avec la mesure de ω
	As = 1,62 → erreur	+ 70 % avec la mesure de δ
		+ 60 % avec la mesure de ω
	As = 2,03 → erreur	+ 100 % avec la mesure de δ et ω

IV. ETABLISSEMENT DES NORMES INTERNES

1) comparer les spécifications du constructeur et les résultats obtenus
2) interpréter les différences éventuelles :
   - Pièces défectueuses ?
   - Tests appliqués différents ? par ex, composés tests, mode de mesure du bruit, longueur d'onde de mesure…. différents
   - Environnement mal contrôlé lors de la réalisation des tests ?
3) établir les normes internes

Injecteur

Système HPLC Merck LaChrom – Vérification de l'injecteur automatique L-7200
N° de série : CA 023
Date d'intervention : 15/05/2008
Nom des intervenants: MBINZE KINDENGE Jérémie et HABYALIMANA Vedaste

Qualification autosampler

	Aires				
	10 µl	20 µl	50 µl	100 µl	120 µl
1	515944,0	1048654	2699905	4975217	5387437
2	517308,0	1063323	2697006	4979345	5402300
3	513883,0	1059290	2695258	4964929	5388480
4	513559,0	1049758	2699118	4986361	5396454
5	511738,0	1051893	2694467	4976125	5405592
6	505516,0	1061228	2709621	4961880	5392309
Moyenne	512991,3	1055691	2699229	4973976	5395428
Ecart - Type	4145,37	6340,39	5510,90	9127,25	7395,17
CV (%)	0,81	0,60	0,20	0,18	0,14

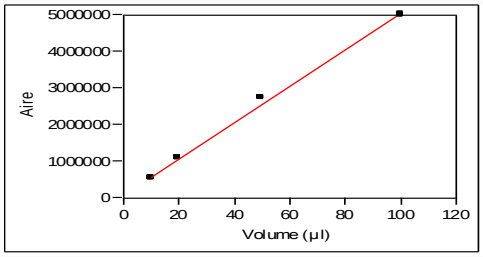
Spécification : C.V. < 1,0 %
Décision : **Conforme**

Date de la prochaine qualification : 15/08/2008

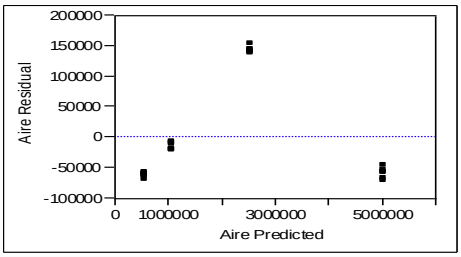
Laboratoire de Chimie Analytique, ULg

Injecteur

Modèle linéaire
Response Aire
Whole Model
Regression Plot



Residual by Predicted Plot



Summary of Fit

RSquare	0,997669
RSquare Adj	0,997563
Root Mean Square Error	87529,76
Mean of Response	2310472
Observations (or Sum Wgts)	24

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	1	7,2137e+13	7,214e+13	9415,582
Error	22	1,6855e+11	7,6615e+9	Prob > F
C. Total	23	7,2306e+13		<,0001

Lack Of Fit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Lack Of Fit	2	1,677e+11	8,385e+10	1960,659
Pure Error	20	855308143	42765407	Prob > F
Total Error	22	1,6855e+11		<,0001
				Max RSq
				1,0000

Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob>|t|
Intercept	81430,315	29102,06	2,80	0,0105
Volume (µl)	49534,258	510,4839	97,03	<,0001

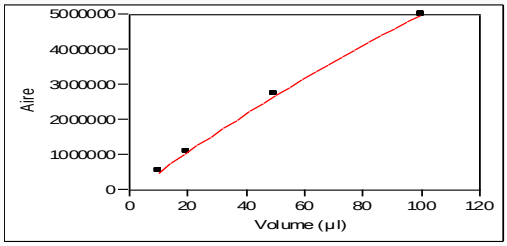
Laboratoire de Chimie Analytique, ULg

41

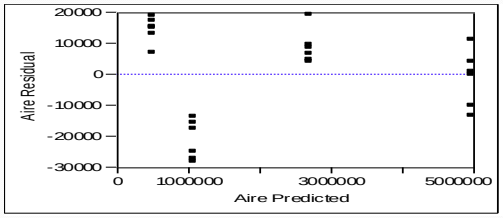
Injecteur

Modèle quadratic

Response Aire
Whole Model
Regression Plot



Residual by Predicted Plot



Summary of Fit

RSquare	0,999927
RSquare Adj	0,99992
Root Mean Square Error	15837,7
Mean of Response	2310472
Observations (or Sum Wgts)	24

Lack Of Fit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Lack Of Fit	1	4412179207	4,4122e+9	103,1717
Pure Error	20	855308143	42765407	Prob > F
Total Error	21	5267487350		<,0001
				Max RSq
				1,0000

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	2	7,23e+13	3,615e+13	144120,7
Error	21	5267487350	250832731	Prob > F
C. Total	23	7,2306e+13		<,0001

Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob>|t|
Intercept	105016,06	5346,275	19,64	<,0001
Volume (µl)	51763,808	127,1529	407,10	<,0001
(Volume (µl)-45)*(Volume (µl)-45)	-101,1555	3,964688	-25,51	<,0001

Laboratoire de Chimie Analytique, ULg

42

Pompe

Système HPLC Merck LaChrom – Vérification de la pompe L – 7100

N° de série : CA 023

Date d'intervention : 06/05/2008

Nom des intervenants : MBINZE KINDENGE Jérémie et HABYALIMANA Vedaste

QUALIFICATION DES FONCTIONS

FONCTIONS	CONDITIONS DE TESTS	SPECIFICATIONS	RESULTATS
Fonction moteur	Commuter de la fonction purge à un débit de 1 ml/min.	Le débit doit considérablement diminuer. Le moteur de la pompe tourne plus lentement	ok
	Commuter d'un débit de 1 ml/min à un débit de 5 ml/min.	Le débit doit considérablement augmenter. Le moteur de la pompe tourne plus rapidement.	ok
Zéro de pression	Ouvrir la vanne de purge pendant que la pompe fonctionne	L'écran affiche : 0 ± 1 bars	1 bar

Laboratoire de Chimie Analytique, ULg

Pompe

Système HPLC Merck LaChrom – Vérification de la pompe L – 7100

N° de série : CA 023
Date d'intervention : 06/05/2008
Nom des intervenants : MBINZE KINDENGE Jérémie et HABYALIMANA Vedaste

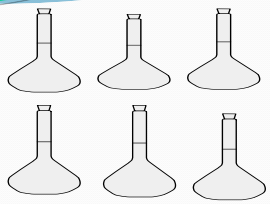
QUALIFICATION DES FONCTIONS

FONCTIONS	CONDITIONS DE TESTS	SPECIFICATIONS	RESULTATS
Limite de pression MIN	Pression min : 3 bars Connecter le capillaire Téflon Fermer la vanne de purge, démarrer la pompe, attendre que la pression se stabilise, ouvrir la vanne de purge.	La pression revient à 0 bar. La pompe s'arrête au bout de 10 secondes.	ok
Limite de pression Max	Pression max : 400 bars Débit : 0.2 ml/min Connecter l'écrou bouchon. Démarrer la pompe.	La pression monte Progressivement à 400 bars. La pompe s'arrête.	Non effectuée *
Etanchéité du circuit hydraulique	Appuyer sur la touche Cl. Observer l'affichage de la pression.	Après 5 minutes, l'écran affiche une pression > 300 bars	Non effectuée**

(*) et (**) : Opération délicate, car une fois l'écrou bouchon fixé, il n'est pas facile de le deviser.

Laboratoire de Chimie Analytique, ULg

Pompe



Système HPLC Merck LaChrom – Vérification de la pompe L – 7100
N° de série : CA 023
Date d'intervention : 06/05/2008
Nom des intervenants : MBINZE KINDENGE Jérémie et HABYALIMANA Vedaste

QUALIFICATION DES SPECIFICATION

A . DEBIT

Mesures brutes

Pesées du solvant récolté pendant 5 min à 2,0 ml/min :

Mesure 1	Mesure 2	Mesure 3	Moyenne	Ecart type
9,997	10,007	9,920	9,975	0,048

Pesées du solvant récolté pendant 10 min à 1.0 ml/min :

Mesure 1	Mesure 2	Mesure 3	Moyenne	Ecart type
9,983	10,992	10,041	10,006	1,031

Résultats

PARAMETRE	CRITERE (unité)	NORME	RESULTAT	CONFORMITE	ANNEXES
		Max			
Débit : 1 ml/min	Justesse (%)	2	0,06	Conforme	
Débit : 1 ml/min	Répétabilité C.V. (%)	0,5	0,31	Conforme	
Débit : 2 ml/min	Justesse (%)	2	0,03	Conforme	
Débit : 2 ml/min	Répétabilité C.V. (%)	0,5	0,48	Conforme	

Laboratoire de Chimie Analytique, ULg

Pompe

Système HPLC Merck LaChrom – Vérification de la pompe L – 7100
N° de série : CA 023
Date d'intervention : 06/05/2008
Nom des intervenants : MBINZE KINDENGE Jérémie et HABYALIMANA Vedaste
QUALIFICATION DES SPECIFICATION

B. GRADIENT

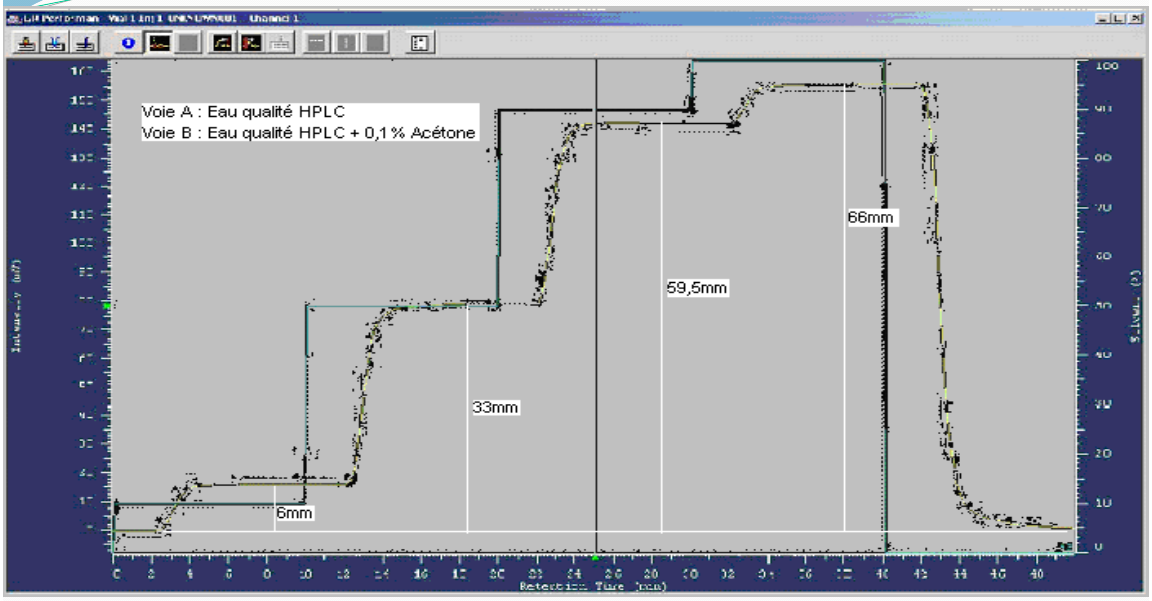
CONDITIONS DE TESTS	SPECIFICATIONS	RESULTATS
A/B Voie A : eau qualité HPLC Voie B : eau qualité HPLC + 0.1 % d'acétone.	Pas correspondant : 10, 50, 90 %	V10 = 9.09 % V50 = 50,00 % V90 = 90.15%
C/D Voie C : eau qualité HPLC Voie D : eau qualité HPLC + 0.1 % d'acétone	Gradient basse pression : ± 1 %	V10 = 9.16 % V50 = 49.31 % V90 = 89,31%

Décision : Conforme

Date de la prochaine qualification : 06/08/2008 pour le débit et le 06/05/2009 pour le gradient

Laboratoire de Chimie Analytique, ULg

Pompe



Laboratoire de Chimie Analytique, ULg

Détecteur

Système HPLC Merck Lachrom – Vérification du détecteur UV L – 7400

N° de série : CA 023

Date d'intervention : 06/05/2008

Nom des intervenants : MBINZE KINDENGE Jérémie et HABYALIMANA Vedaste

QUALIFICATION DES SPECIFICATIONS

FONCTIONS	CONDITIONS DE TESTS	SPECIFICATIONS	RESULTATS
Calibrage de la longueur d'onde	Ajustement de la longueur	656,1 ± 1 nm	± 0 nm
	Un ajustement est – il nécessaire ?	Oui/ Non	Nom
Energie de la lampe D2	Si la lampe est neuve : Après 15 heures de chauffe Longueur d'onde = 250 nm Appuyer sur (walve puis sur enter)	Valeur initiale >250	556
	Si la lampe est déjà utilisée : Après 15 min de chauffe Longueur d'onde = 250 nm Appuyer sur (walve puis sur enter)	>50 % De sa valeur initiale	345

Décision : Conforme

Date de la prochaine qualification : 06/08/2008

Laboratoire de Chimie Analytique, ULg

Four

Système HPLC Merck LaChrom – Vérification du four L- 7360

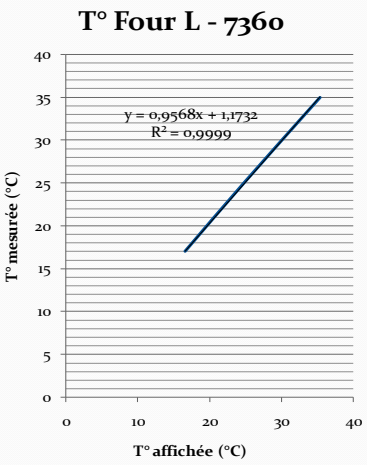
N° de série : CA 023

Date d'intervention : 01/02/2008

Nom de l'intervenant : C. KOTTGEN

Mesures brutes

T° Souhaitée	Mesures à 17°C	Mesures à 25 °C	Mesures à 35°C
Mesure 1	16,7	24,8	35,3
Mesure 2	16,6	24,8	35,4
Mesure 3	16,6	24,8	35,4
Mesure 4	16,6	24,8	35,4
Mesure 5	16,6	24,8	35,5
Mesure 6	16,6	24,8	35,5
Moyenne	16,6	24,8	35,4
Ecart - type	0,04	0,0	0,1



Résultats

PARAMETRE	CRITERE (unité)	NORME	RESULTATS	CONFORMITE
		Max		
T° 17°C	Justesse (°C)	0,5	0,4	Conforme
T° 25°C	Justesse (°C)	0,5	0,2	Conforme
T° 35°C	Justesse (°C)	0,5	0,4	Conforme

Décision : Conforme

Date de la prochaine qualification : début mai

Laboratoire de Chimie Analytique, ULg

CONCLUSION

Tests de qualification exhaustifs : longs mais indispensables

* à effectuer sur les appareillages nouveaux
* à comparer aux spécifications du constructeur
* important pour la validation des méthodes analytiques

Sélection de tests : fonction de l'usage

Fréquence d'application des tests, fonction de l'usage

* Contrôle fréquent

  Injecteur : répétabilité des injections

  Détecteur : bruit, linéarité

* Contrôle tous les deux mois

  Contrôle global de la chaine HPLC par un test de reproductibilité intra-jour et inter-jours des tR et des surfaces

REFERENCES

CANNING M.B.
Validation as applied to laboratory information management systems.
Int. Lab., 28-30, November-December 1992.

CLARK S.
Computer systems validation : an investigator's view.
Pharm. Technol. 11 (12), 24-35, 1988.

DOLAN J.W.
Mobile phase proportioning problems.
LC-GC Int., 1, 16-21, 1988.

DOLAN J.W. and SNYDER L.R.
Troubleshooting LC systems.
Humana, Clifton, New Jersey, 1989.

DYSON N.
The validation of integrators and computers for chromatographic measurements.
Int. Lab., 38-46, June 1992.

GRUSHKA E. and ZAMIR I.
"Precision in HPLC"
in Chemical Analysis, 98, P. Brown and R. Hartwich ed., Wiley interscience, New York, 1989.

PFEIFFER C.D., LARSON J.R. and RYDER J.F.
Linearity testing of ultraviolet detectors in liquid chromatography.
Anal. Chem., 55, 1622-1624, 1983.

Rapport d'une commission SFSTP. Qualification d'un ensemble de chromatographie liquide à détection UV.
S.T.P. Pharma Pratiques, 2, 526-530, 1992.

REHMAN M.J., EVANS K.P., HANDLEY A. and MASSEY P.R.
Test for liquid chromatographs.
Chromatographia, 24, 492-500, 1987.

SHEEHAN T. and SCHACHTERLE S.
Benchmarking high performance liquid chromatographic system performance.
LC-GC Int., 3, 50-55, 1990.

SNYDER L.R. and DOLAN J.W.
Reproducibility problems in gradient elution caused by differing equipment.
LC-GC Int., 3, 28-39, 1990.

Standard practice for testing fixed-wavelength photometric detectors used in liquid chromatography; ASTM E 685. Annual book of ASTM Standard. Part 42.
American society for Testing and Materials, Philadelphia Pensylvania, 1980.

WOLF T., FRITZ G.T. and PALMER L.R.
An ASTM standard practice for testing fixed-wavelength photometric detectors used in liquid chromatography.

J. Chromatogr. Sci., 19, 387-391, 1981.

2.2.25. **SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION DANS L'ULTRAVIOLET ET LE VISIBLE (cf. Pharmacopée Européenne)**

Détermination de l'absorbance.
L'absorbance A d'une solution est le logarithme décimal de l'inverse de la transmittance *T* pour une radiation monochromatique. Elle s'exprime par l'équation :

$$A = \log_{10}\left(\frac{l}{T}\right) = \log_{10}\left(\frac{I_0}{I}\right)$$

T : I/I_0
I_0 : intensité de la lumière monochromatique incidente
I : intensité de la lumière monochromatique transmise

En l'absence d'autres facteurs physico-chimiques, l'absorbance mesurée (*A*) est proportionnelle à l'épaisseur (*b*) de la couche traversée et à la concentration (*c*) du corps dissous, en accord avec l'équation :

$$A = \varepsilon\, c\, b$$

ε : absorbance molaire si *b* est exprimé en centimètres et *c* en moles par litre.

L'expression de $A_{1cm}^{1pourcent}$ représentant l'absorbance spécifique d'un corps dissous, se rapporte à l'absorbance d'une solution à 10 g/l sous une épaisseur de 1 centimètre à une longueur d'onde déterminée d'où :

$$A_{1cm}^{1pourcent} = \frac{10\varepsilon}{M_r}$$

Sauf indication contraire, mesurez l'absorbance à la longueur d'onde prescrite sous une épaisseur de 1 cm à 20 ± 1°C. Sauf indication contraire, effectuez les mesures par rapport au même solvant ou au même mélange de solvants. L'absorbance du solvant mesurée par rapport à l'air et à la longueur d'onde prescrite ne doit dépasser en aucun cas 0,4 et doit être de préférence inférieure à 0,2. Tracez le spectre d'absorption en portant en ordonnée les valeurs d'absorbance ou toute fonction de celle-ci et en abscisse la longueur d'onde ou toute fonction de celle-ci.

Lorsque la monographie donne une seule valeur pour la position d'un maximum d'absorption, il est admis que la valeur obtenue peut s'en écarter de 2 nm.

Appareil.
Les spectrophotomètres utilisés pour l'étude des régions ultraviolettes et visibles du spectre sont constitués par un système optique susceptible de fournir de la lumière monochromatique dans la région de 200 nm à 800 nm et par un dispositif approprié à la mesure de l'absorbance.

Contrôle des longueurs d'onde.
Vérifiez l'échelle des longueurs d'onde en utilisant les maximums d'absorption de la solution de *perchlorate d'holmium R*, la raie de la lampe à hydrogène ou au deutérium ou les raies de l'arc à vapeur de mercure indiqués dans le tableau 2.2.25 ;-1. La tolérance admise est de ± 1 nm pour la région de l'ultraviolet et de ± 3 nm pour la région du visible.

Tableau 2.2.25.-1. *Maximums d'absorption de la solution de perchlorate d'holmium R*

241,15 nm (Ho)	404,66 nm (Hg)
253,7 nm (Hg)	435, 83 nm (Hg)
287,15 nm (Ho)	486,0 nm (Dβ)
302,25 nm (Hg)	486,1 nm (Hβ)
313,16 nm (Hg)	536,3 nm (Ho)
334,15 nm(Hg)	546,07 nm (Hg)
361,5 nm (Ho)	576,96 nm (Hg)
365,48 nm (Hg)	679,07 nm (Hg)

Contrôle de l'absorbance.
Contrôlez l'absorbance au moyen de la solution de *dichromate de potassium R* aux longueurs d'onde indiquées dans le tableau 2.2.25.-2. Pour chaque longueur d'onde, la valeur précise et les valeurs limites de l'absorbance spécifique y figurent. La tolérance admise pour l'absorbance est de ± 0,01.

Pour le contrôle de l'absorbance, utilisez une solution de dichromate de potassium préparée comme suit : desséchez au préalable le *dichromate de potassium R* à 130°C jusqu'à masse constante. Dissolvez une prise d'essai de 57,0 mg à 63,0 mg de substance desséchée dans de *l'acide sulfurique 0,005 M* et complétez à 1 000,0 ml avec le même acide.

Tableau 2.2.25.-2

Longueur d'onde (nanomètre)	$A_{1cm}^{1pourcent}$	Tolérance maximale
235	124,5	122,9 à 126,2
257	144,0	142,4 à 145,7
313	48,6	47,0 à 50,3
350	106,6	104,9 à 108,2

Les absorbances d'une solution de dichromate de potassium contenant exactement 60,06 mg de $K_2Cr_2O_7$ dans 1000,0 ml d'acide sulfurique 0,005 M ont été utilisées comme base pour l'élaboration du tableau 2.2.25.-2. Ces valeurs, mesurées sous une épaisseur de 1 cm sont comme dans le tableau 2.2.25.-3 :

Tableau 2.2.25.-3

235 nm	0,748
257 nm	0,865
313 nm	0,292

350 nm	0,640

Limite de lumière parasite.
La lumière parasite peut être décelée à une longueur d'onde donnée à l'aide de solutions ou de filtres appropriés ; par exemple, l'absorbance d'une solution de *chlorure de potassium R* à 12 g/l mesurée à 200 nm sous une épaisseur de 1 cm, en utilisant de l'*eau R* comme liquide de compensation, doit être supérieure à 2.

Pouvoir de résolution (analyse qualitative).
Lorsque la monographie l'exige, effectuez comme suit la mesure du pouvoir rotatoire de résolution de l'appareil : enregistrez le spectre d'une solution de *toluène R* à 0,02 pour cent V/V dans l'*hexane R*. Le rapport minimal entre l'absorbance au maximum à 269 nm et l'absorbance au minimum à 266 nm est indiqué dans la monographie.

Largeur de la fente spectrale (analyse quantitative).
Pour éviter des lectures erronées dues à la largeur de la fente spectrale, lors de l'utilisation d'un instrument à largeur de fente variable à la longueur d'onde choisie, la largeur de la fente doit être faible par rapport à la demi-largeur de la bande d'absorption mais, en même temps, elle doit être aussi large que possible pour obtenir une valeur élevée de I_0. Toutefois, la largeur de fente est telle que toute nouvelle diminution de largeur ne modifie pas la lecture de l'absorbance.

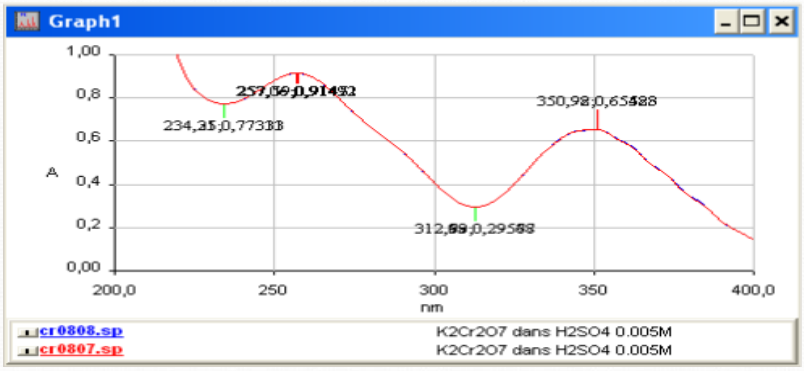
Cuves.
La tolérance d'épaisseur des cuves utilisées est de ± 0,005 cm. Remplies du même solvant, les cuves destinées à contenir la solution à examiner et le liquide de compensation doivent présenter la même transmittance. Si tel n'est pas le cas, une correction appropriée doit être apportée.

Veillez soigneusement à l'entretien et au nettoyage des cuves.

Qualification de spectrophotomètre U.V - Vis

A. Contrôle de l'absorbance

- Après 2 heures de séchage de $K_2Cr_2O_7$ à 130 °C



Spectre UV du $K_2Cr_2O_7$ (Cellule Mithra)
(longueur d'onde et absorbance correspondante)

Qualification de spectrophotomètre U.V - Vis

$$A_{1cm}^{1\%} = \frac{A^* \times 10}{m}$$

Exemple **m** = 0,0616 g de K2Cr2O7

Concentration = 0,0616 g/L

A* = 0,77333 (235 nm); 0,91493 (257 nm), 0,29558 (313 nm); 0,65488 (350 nm)

Contrôle de l'absorbance

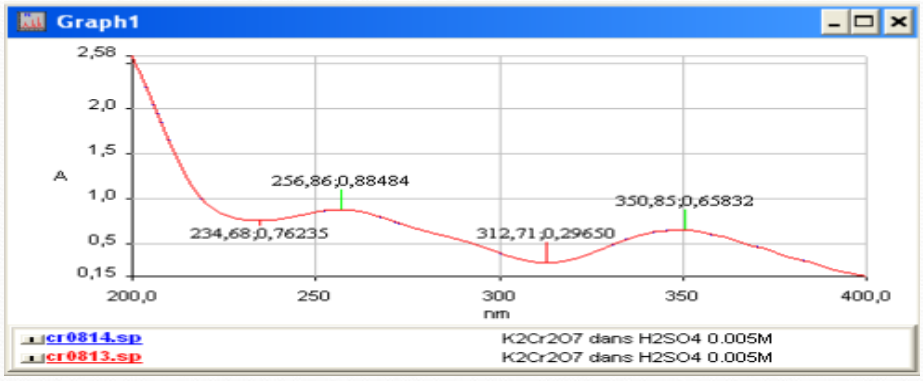
Le 16/06/2008

λ (nm)	Absorbance spécifique	Tolérance max.	Absorbance Spécifique calculée							
			Cellules Mithra	Cellule 1pt	Cellules 2pts	Cellules 3pts	Cellules service	Cellules TP Bac2	Cellules usage unique1	Cellules usage unique2
235	124,5	122,9 à 126,2	125,5	125,4	126,9	124,6	125,5	125,0	-	-
257	144,5	142,8 à 146,2	148,5	148,8	150,4	147,6	149,2	148,4	-	-
313	48,6	47,0 à 50,3	48,0	48,1	49,4	47,6	48,6	48,0	47,2	47,4
350	107,3	105,6 à 109,0	106,3	107,0	108,7	104,2	108,6	107,0	106,0	105,4

Décision : L'absorbance n'est pas CONFORME à 257nm pour toutes les cellules

Qualification de spectrophotomètre U.V- Vis

- Après min. de 12 heures de séchage de $K_2Cr_2O_7$ à 130 °C



Laboratoire de Chimie Analytique, ULg

57

Qualification de spectrophotomètre U.V- Vis

- Après min. de 12 heures de séchage de $K_2Cr_2O_7$ à 130 °C

Contrôle de l'absorbance

Le 17/06/2008

λ (nm)	Absorbance Spécifique	Tolérance max.	Absorbance Spécifique calculée					
			Cellules Mitra	Cellule 1pt	Cellules 2pts	Cellules 3pts	Cellules service	Cellules TP Bac2
235	124,5	122,9 à 126,2	123,8	123,5	125,0	123,7	124,2	123,7
257	144,5	142,8 à 146,2	143,6	143,5	145,0	143,3	144,2	143,8
313	48,6	47,0 à 50,3	48,1	47,9	48,7	47,9	48,3	47,6
350	107,3	105,6 à 109,0	106,9	106,5	107,9	105,2	106,5	107,0

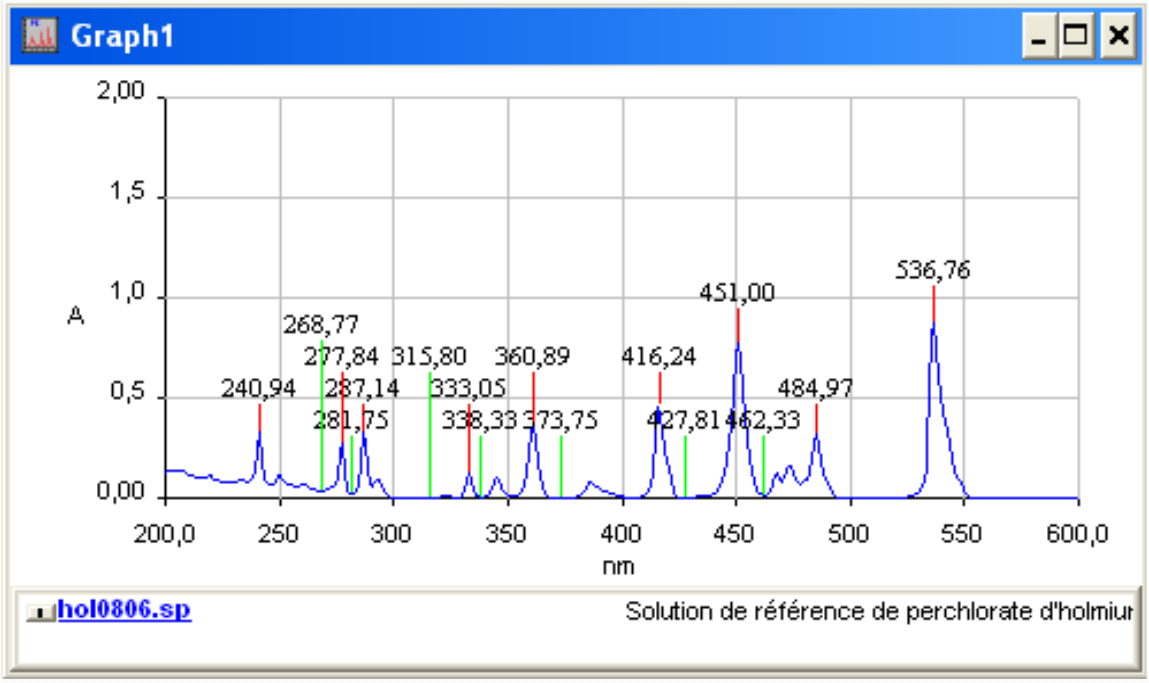
Décision : CONFORME

N.B.: Il y a une paire de cellules qui ne donnent pas de bons résultats à 350 nm

Laboratoire de Chimie Analytique, ULg

58

B. Contrôle des longueurs d'onde



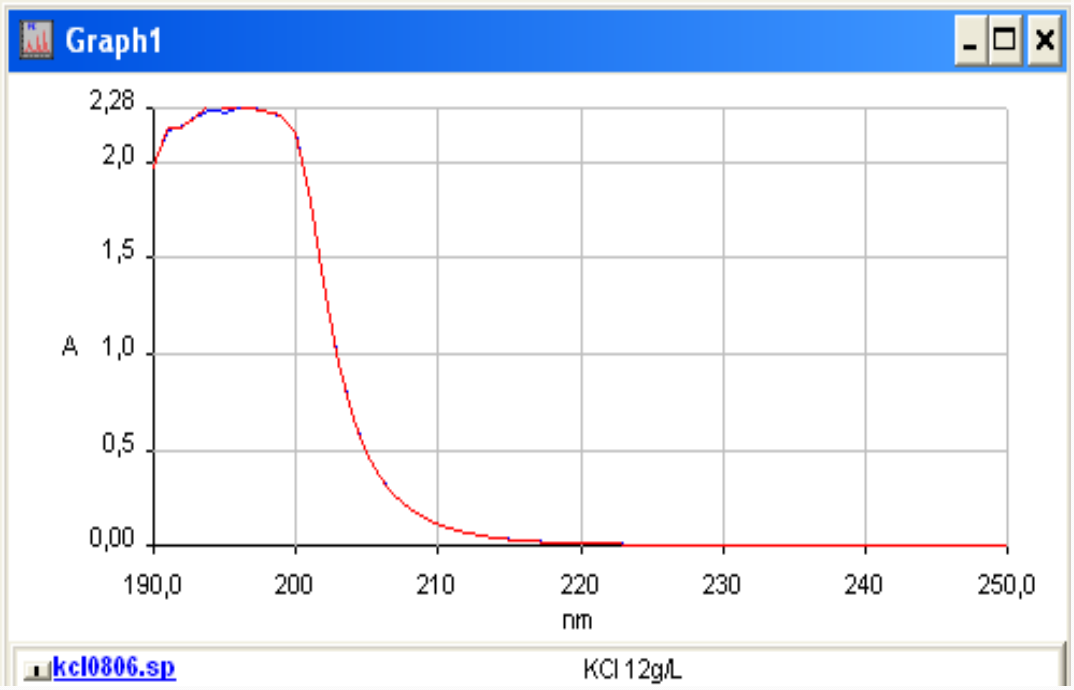
Laboratoire de Chimie Analytique, ULg

Normes	Maximums mesurés
241,15 nm ± 1 nm	240,94 nm
287,15 ± 1nm	287,14 nm
361,5 ± 1 nm	360,9 nm
536,3 ± 3 nm	536,8 nm

Décision : Conforme

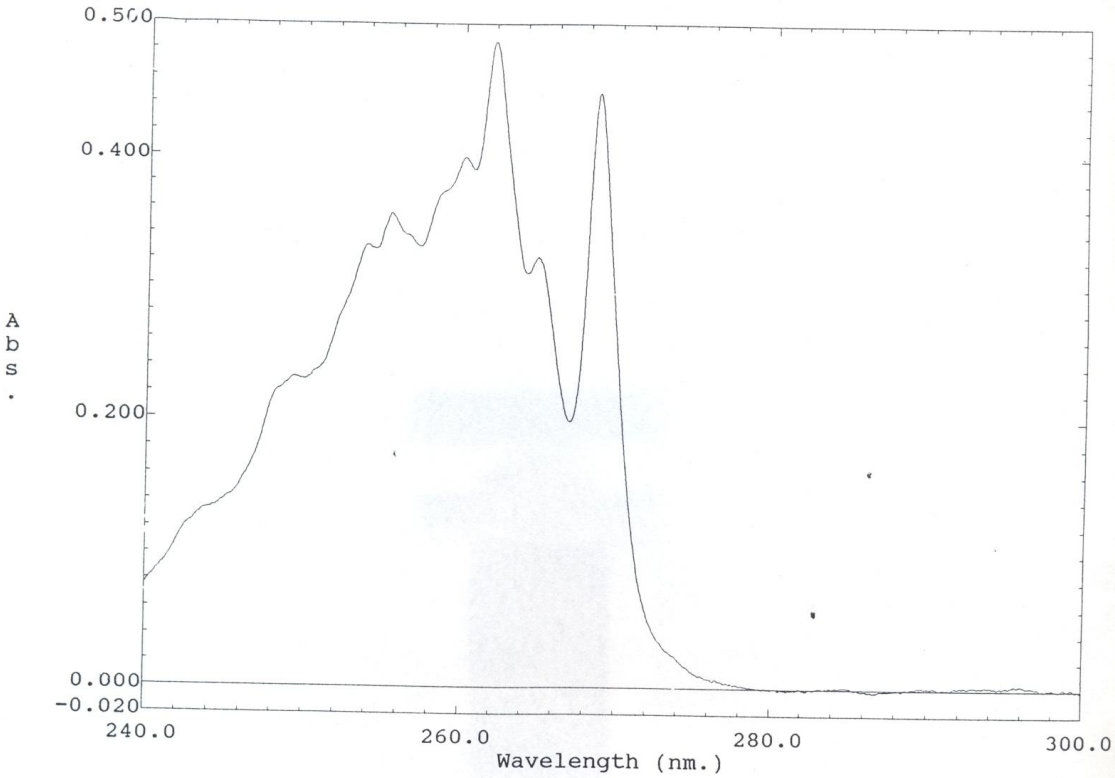
Laboratoire de Chimie Analytique, ULg

C. Contrôle de la lumière parasite



Décision : Conforme

Laboratoire de Chimie Analytique, ULg

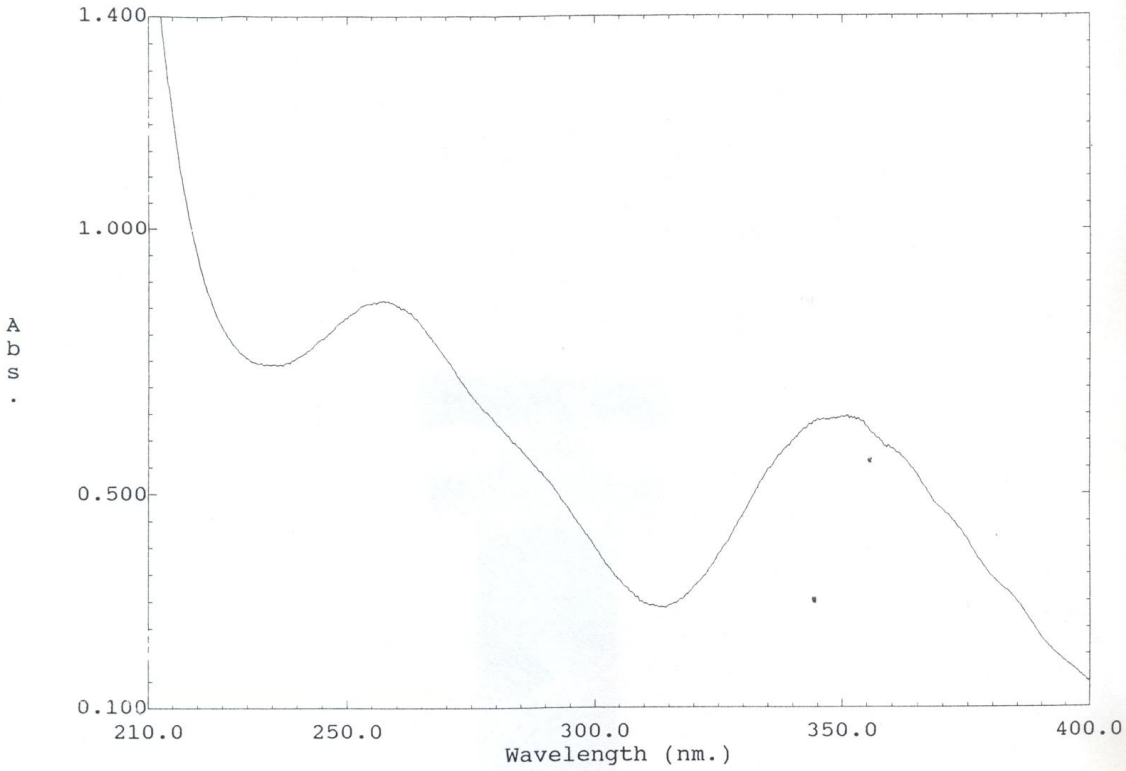


File Name: TESTOLU

Etude du pouvoir de resolution

Created: 15:54 10/14/94
Data: Original

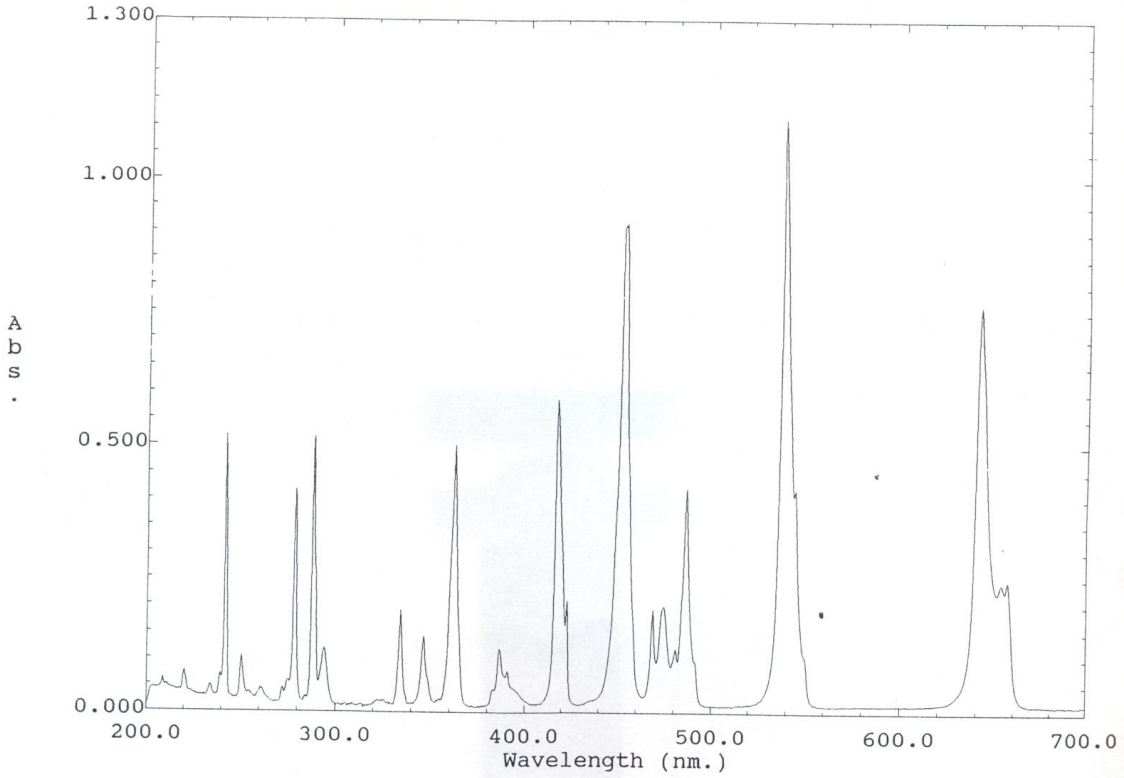
Measuring Mode: Abs.
Scan Speed: Medium
Slit Width: 0.5
Sampling Interval: 0.05



File Name: DICHR2

Controle des absorbances ;
essai 2
Created: 17:12 10/14/94
Data: Original

Measuring Mode: Abs.
Scan Speed: Medium
Slit Width: 0.5
Sampling Interval: 0.2



File Name: HOLMIU1E

Spectre du perchlorate
d'holmium ; 1
Created: 18:43 10/18/94
Data: Original

Measuring Mode: Abs.
Scan Speed: Medium
Slit Width: 0.5
Sampling Interval: 0.5

Annexe 1

Monographie Ph. Européenne

01/2008:20225

2.2.25. SPECTROPHOTOMÉTRIE D'ABSORPTION DANS L'ULTRAVIOLET ET LE VISIBLE

Détermination de l'absorbance. L'absorbance (*A*) d'une solution est le logarithme décimal de l'inverse de la transmittance (*T*) pour un rayonnement monochromatique. Elle s'exprime par l'équation :

$$A = \log_{10}\left(\frac{1}{T}\right) = \log_{10}\left(\frac{I_0}{I}\right)$$

T = I/I_0,
I_0 = intensité du rayonnement monochromatique incident,
I = intensité du rayonnement monochromatique transmis.

En l'absence d'autres facteurs physico-chimiques, l'absorbance (*A*) est proportionnelle à l'épaisseur (*b*) de la couche traversée et à la concentration (*c*) de la substance dissoute, en accord avec l'équation :

$$A = \varepsilon c b$$

ε = absorbance molaire, si *b* est exprimé en centimètres et *c* en moles par litre.

L'expression $A_{1\,\mathrm{cm}}^{1\,\mathrm{pour\,cent}}$ représentant l'absorbance spécifique d'une substance dissoute, se rapporte à l'absorbance d'une solution à 10 g/l sous une épaisseur de 1 cm à une longueur d'onde déterminée d'où :

$$A_{1\,\mathrm{cm}}^{1\,\mathrm{pour\,cent}} = \frac{10\varepsilon}{M_r}$$

Sauf indication contraire, mesurez l'absorbance à la longueur d'onde prescrite sous une épaisseur de 1 cm. Sauf indication contraire, effectuez les mesures par rapport au même solvant ou au même mélange de solvants. L'absorbance du solvant, mesurée par rapport à l'air et à la longueur d'onde prescrite, ne doit en aucun cas dépasser 0,4 et doit être de préférence inférieure à 0,2. Tracez le spectre d'absorption en portant en ordonnée les valeurs d'absorbance ou toute fonction de celle-ci et en abscisse la longueur d'onde ou toute fonction de celle-ci.
Lorsque la monographie donne une seule valeur pour la position d'un maximum d'absorption, il est admis que la valeur obtenue peut s'en écarter de 2 nm.

Appareil. Les spectrophotomètres utilisés pour l'étude des régions ultraviolette et visible du spectre sont constitués par un système optique, susceptible de fournir un rayonnement monochromatique dans la région 200-800 nm, et par un dispositif approprié à la mesure de l'absorbance.

Contrôle des longueurs d'onde. Vérifiez l'échelle des longueurs d'onde en utilisant les maximums d'absorption de la *solution de perchlorate d'holmium R*, la raie de la lampe à hydrogène ou au deutérium ou les raies de l'arc à vapeur de mercure indiqués dans le tableau 2.2.25.-1. La tolérance admise est de ± 1 nm pour la région de l'ultraviolet et de ± 3 nm pour la région du visible. Des matériaux de référence certifiés appropriés peuvent également être utilisés.

Tableau 2.2.25.-1. – *Maximums d'absorption pour le contrôle de l'échelle des longueurs d'onde*

241,15 nm (Ho)	404,66 nm (Hg)
253,7 nm (Hg)	435,83 nm (Hg)
287,15 nm (Ho)	486,0 nm (Dβ)
302,25 nm (Hg)	486,1 nm (Hβ)
313,16 nm (Hg)	536,3 nm (Ho)
334,15 nm (Hg)	546,07 nm (Hg)
361,5 nm (Ho)	576,96 nm (Hg)
365,48 nm (Hg)	579,07 nm (Hg)

Contrôle de l'absorbance. Contrôlez l'absorbance au moyen de filtres appropriés ou de solution de *dichromate de potassium R* aux longueurs d'onde indiquées dans le tableau 2.2.25.-2. Pour chaque longueur d'onde, la valeur précise et les valeurs limites de l'absorbance spécifique y figurent. Le tableau est basé sur une tolérance admise pour l'absorbance de ± 0,01.
Pour le contrôle de l'absorbance, utilisez des solutions de *dichromate de potassium R* préalablement desséché à 130 °C jusqu'à masse constante. Pour le contrôle de l'absorbance à 235 nm, 257 nm, 313 nm et 350 nm, dissolvez une prise d'essai de 57,0-63,0 mg de *dichromate de potassium R* dans de l'*acide sulfurique 0,005 M* et complétez à 1000,0 ml avec le même acide. Pour le contrôle de l'absorbance à 430 nm, dissolvez une prise d'essai de 57,0-63,0 mg de substance desséchée dans de l'*acide sulfurique 0,005 M* et complétez à 100,0 ml avec le même acide. Des matériaux de référence certifiés appropriés peuvent également être utilisés.

Limite de lumière parasite. La lumière parasite peut être décelée à une longueur d'onde donnée à l'aide de filtres ou de solutions appropriés ; par exemple, l'absorbance d'une solution de *chlorure de potassium R* à 12 g/l mesurée sous une épaisseur de 1 cm augmente de façon abrupte entre 220 nm et 200 nm et est supérieure à 2,0 à 198 nm, lorsqu'elle est comparée à l'eau comme liquide de compensation. Des matériaux de référence certifiés appropriés peuvent également être utilisés.

Tableau 2.2.25.-2

Longueur d'onde (nm)	Absorbance spécifique $A_{1\,cm}^{1\,pour\,cent}$	Tolérance maximale
235	124,5	122,9 à 126,2
257	144,5	142,8 à 146,2
313	48,6	47,0 à 50,3
350	107,3	105,6 à 109,0
430	15,9	15,7 à 16,1

Pouvoir de résolution (analyse qualitative). Lorsque la monographie l'exige, effectuez comme suit la mesure du pouvoir de résolution de l'appareil : enregistrez le spectre d'une solution de *toluène R* à 0,02 pour cent *V/V* dans l'*hexane R*. Le rapport minimal entre l'absorbance au maximum à 269 nm et l'absorbance au minimum à 266 nm est indiqué dans la monographie. Des matériaux de référence certifiés appropriés peuvent également être utilisés.

Largeur de la fente spectrale (analyse quantitative). Pour éviter des lectures erronées dues à la largeur de la fente spectrale, lors de l'utilisation d'un instrument à largeur de fente variable à la longueur d'onde choisie, la largeur de la fente doit être faible par rapport à la demi-largeur de la bande d'absorption mais, en même temps, elle doit être aussi large que possible pour obtenir une valeur élevée de I_0. Toutefois, la largeur de fente est choisie de telle façon que toute nouvelle diminution de largeur ne modifie pas la lecture de l'absorbance.

Cuves. La tolérance d'épaisseur des cuves utilisées est de ± 0,005 cm. Remplies du même solvant, les cuves destinées à contenir la solution à examiner et le liquide de compensation doivent présenter la même transmittance. Si tel n'est pas le cas, une correction appropriée doit être apportée.
Veillez soigneusement à l'entretien et au nettoyage des cuves.

SPECTROPHOTOMÉTRIE DÉRIVÉE
La spectrophotométrie dérivée consiste en la transformation d'un spectre d'absorption (ordre zéro) en spectres de dérivée première, de dérivée seconde ou de dérivée d'ordres supérieurs.
Un *spectre de dérivée première* représente le tracé du gradient de la courbe d'absorption (c'est à dire du taux du changement de l'absorbance dA/dλ) en fonction de la longueur d'onde.
Un *spectre de dérivée seconde* représente la courbe du spectre d'absorption en fonction de la longueur d'onde ($d^2A/d\lambda^2$). La dérivée seconde à la longueur d'onde λ est liée à la concentration selon l'équation suivante :

$$\frac{d^2A}{d\lambda^2} = \frac{d^2A_{1\,\mathrm{cm}}^{1\,\mathrm{pour\,cent}}}{d\lambda^2} \times \frac{c'b}{10} = \frac{d^2A\varepsilon}{d\lambda^2} \times \frac{cb}{10}$$

c' = concentration de la substance absorbante, en grammes par litre.

Appareillage. Utilisez un spectrophotomètre satisfaisant aux exigences ci-dessus et équipé d'un module analogique de différenciation à capacitance-résistance ou d'un module numérique ou de tout autre dispositif permettant de produire des spectres dérivés. Certains dispositifs permettant d'obtenir un spectre de dérivée seconde produisent un décalage des longueurs d'onde par rapport au spectre d'ordre zéro, dont il convient de tenir compte si nécessaire.

Pouvoir de résolution. Lorsque la monographie le prescrit, enregistrez la dérivée seconde du spectre d'une solution de *toluène R* à 0,02 pour cent *V/V* dans le *méthanol R*, en utilisant du *méthanol R* comme liquide de compensation. Le spectre présente un petit extremum négatif situé entre 2 extremums négatifs plus importants, respectivement, à 261 nm et 268 nm, comme le montre la figure 2.2.25.-1. Sauf indication contraire dans la monographie, le rapport *A*/*B* (voir figure 2.2.25.-1) n'est pas inférieur à 0,2.

Procédé. Préparez la solution de la substance à examiner, réglez l'appareil conformément aux instructions du fabricant et calculez la teneur de la substance à déterminer selon les instructions de la monographie.

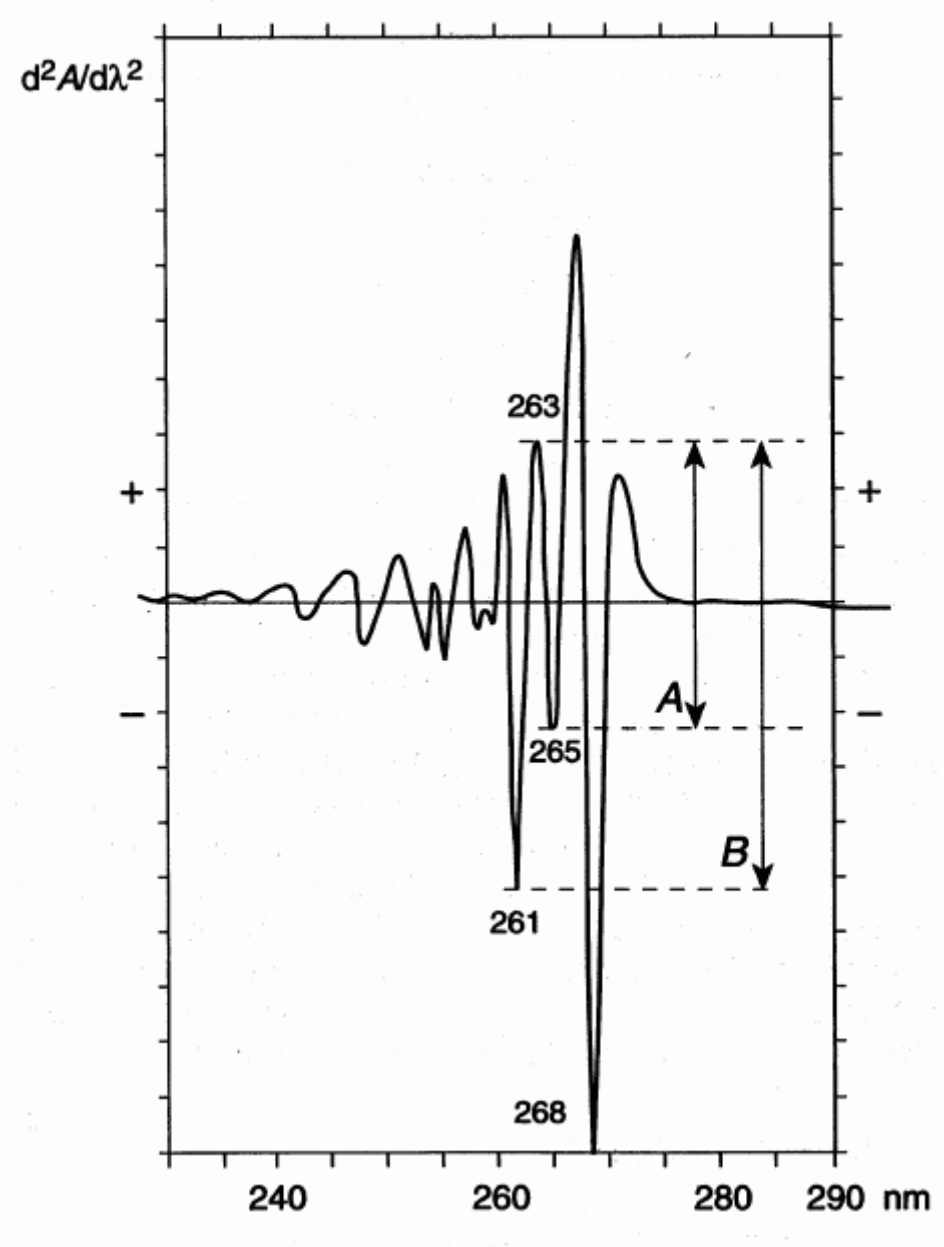


Figure 2.2.25.-1

Annexe 2 : Diapositives

Cf. Fichier en annexe