

# HPLC : CRITERES DE CONFORMITE

## Substances apparentées

**Facteur de symétrie du pic principal** compris entre 0,8 et 1,5 si monographie pharmacopée  
(voir document "HPLC : FACTEUR DE SYMETRIE")

**Taux de recouvrement**  $T1 d / T1 f$   $90 \leq F T1d / T1f \leq 110$

**Limite de détection < Limite d'Exclusion** (voir document "Minimum d'intégration")

**Limite de quantification  $\leq$  Limite d'Exclusion** (voir document "Minimum d'intégration")

## Dosages

**Facteur de symétrie du pic principal** compris entre 0,8 et 1,5 si monographie pharmacopée  
(voir document MEMO HPLC "FACTEUR DE SYMETRIE")

**Taux de recouvrement**  $T1 d / T2 (d)$   $98 \leq F T1d / T2 (d) \leq 102$   
 $T1 d / T1 f$   $98 \leq F T1d / T1f \leq 102$   
 2 inj. d'une même solution  $97 \leq F inj 1 / inj 2 \leq 103$   
 2 teneurs\*  $95 \leq F résultat 1 / rés. 2 \leq 105$

(\* mesurées sur un mélange homogène, voir Mémo "CALCUL DES MOYENNES")

**+, dans le cas des dosages de MP selon Pharmacopée :**

**Ecart-type relatif (C.V.) entre les 3 témoins  $\leq$  limite** (voir tableau ci-dessous)

<b>B</b>	<b>C.V.</b>
2,0	0,41
2,5	0,52
3,0	0,62

**B = norme supérieure du dosage - 100**

## Temps de rétention

$\pm 10,0\%$  par rapport à la valeur indiquée dans l'historique  
(Sauf indication contraire. Spécification à l'étude)

## Variations autorisées :

Les variations indiquées ci-dessous sont autorisées pour obtenir un temps de rétention équivalent à celui indiqué dans la monographie (il n'est pas autorisé de faire ces variations "d'office")

**Phase mobile** \* solvant minoritaire :  $\pm 30\%$  en relatif  
ou  $\pm 2\%$  absolu (prendre la valeur la plus élevée)

\* autres solvants :  $\pm 10\%$  absolu

**pH**  $\pm 0,2$

**Concentration des sels du tampon**  $\pm 10\%$

**Phase stationnaire**

Longueur colonne	$\pm 70\%$	
Diamètre interne	$\pm 25\%$	
Granulométrie	50%	(réduction possible uniquement)
Débit	$\pm 50\%$	
Température	$\pm 10^\circ\text{C}$	Maximum $60^\circ\text{C}$
Volume injecté	réduction possible, à condition répétabilité correcte	

# HPLC : MINIMUM D'INTEGRATION (LE/LQ/LD/SE)

## DEFINITIONS :

### **LE = Limite d'Exclusion**

Limite en dessous de laquelle on ne tient pas compte des pics pour le calcul  
Elle est fournie par la monographie, sinon elle est fixée à 0,05%  
Il faut vérifier que  $LE \geq LQ > LD$

### **LQ = Limite de Quantification**

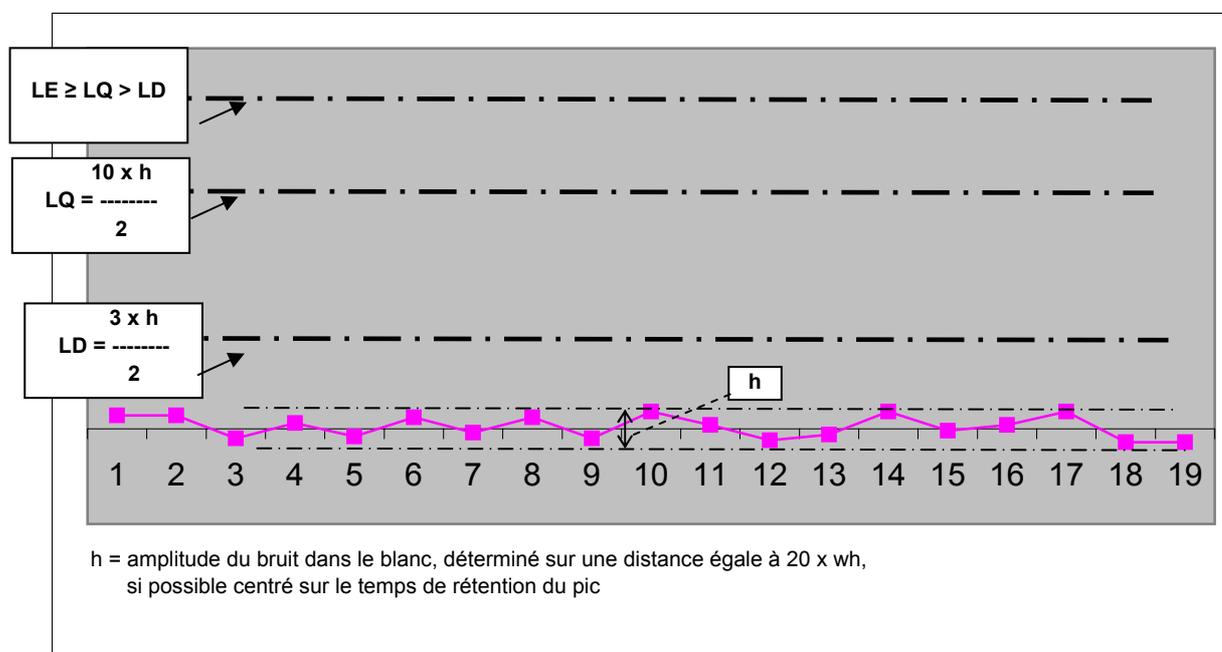
Limite en dessous de laquelle on ne peut faire de dosage  
Correspond à un rapport Signal/Bruit de 10.  $LQ \Rightarrow S/B = 10 = 2 \times H / h$  d'où  $H(LQ) = 10/2 \times h$

### **LD = Limite Détection**

Limite en dessous de laquelle le produit recherché est réputé "Non détectable"  
En pratique, on ne met pas "Non détectable" (cf. MEMO Report sur les Bulletins d'Analyse)  
Correspond à un rapport Signal/Bruit de 3.  $LD \Rightarrow S/B = 3 = 2 \times H / h$  d'où  $H(LD) = 3/2 \times h$

### **SE = Seuil d'Enregistrement des chromatogrammes**

Limite entrée dans le spectro HPLC en dessous de laquelle les pics ne sont pas détectés.  
Ce seuil doit être réglé sur la moitié au moins de la limite d'exclusion.  
En pratique, on utilisera  $SE = LE$



## OPERATIONS A EFFECTUER :

### **Cas où la LE est précisée dans la monographie (sinon ne rien exclure)**

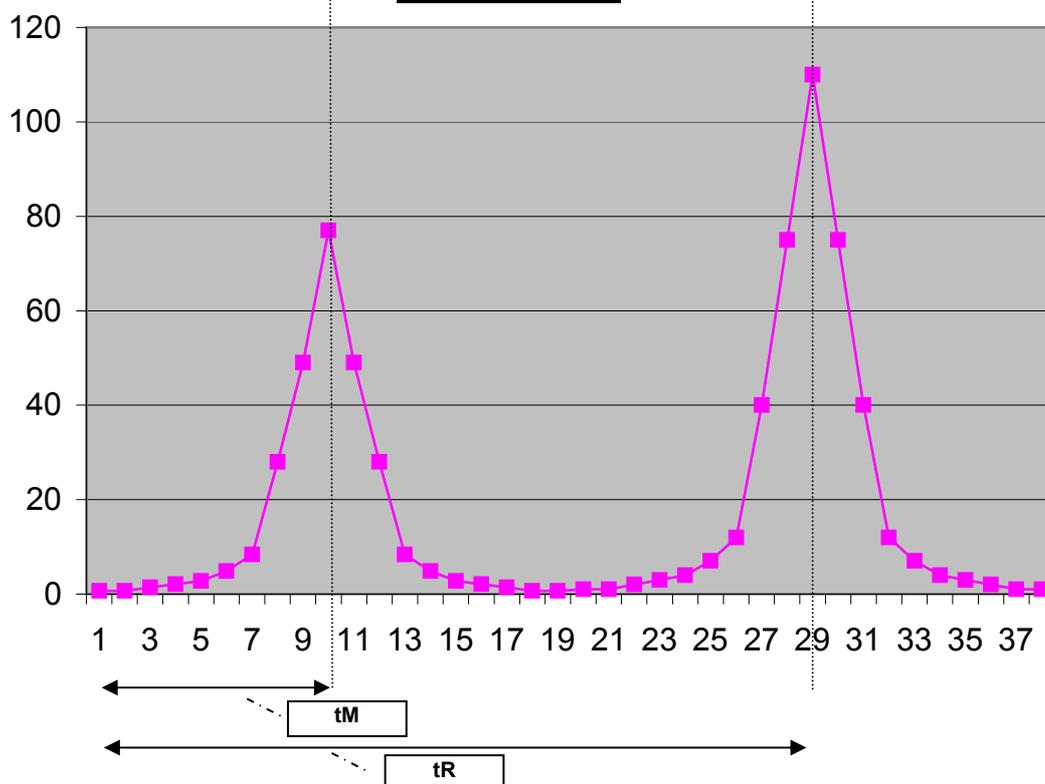
Exemple 1 : la moitié du pic témoin

Exemple 2 : 0,1 x la surface du pic témoin

- Injecter le témoin dilué correspondant
  - Exemple 1 : témoin dilué au 1/2
  - Exemple 2 : diluer le témoin à (0,1 x 100) mL / 100 mL, soit 10 / 100 mL
- Déterminer la hauteur H de ce témoin
- Injecter le blanc
- Déterminer la hauteur h du bruit sur le blanc, dans une zone de 20 x la largeur à mi-hauteur du pic, zone centrée sur le tr du pic considéré
- Calculer  $LQ = 10 \times h / 2$
- Calculer  $LD = 3 \times h / 2$
- Vérifier que  $H \geq LQ > LD$

**IMPORTANT :** la LE utilisée pour exclure les pics est le résultat du calcul (ex 1 : la moitié du pic témoin, ex 2 : 0,1 x la surface du pic témoin) et non la surface obtenue avec le témoin dilué.

**HPLC : FACTEUR DE CAPACITE**  
**ou COEFFICIENT DE DISTRIBUTION**  
**MASSIQUE**

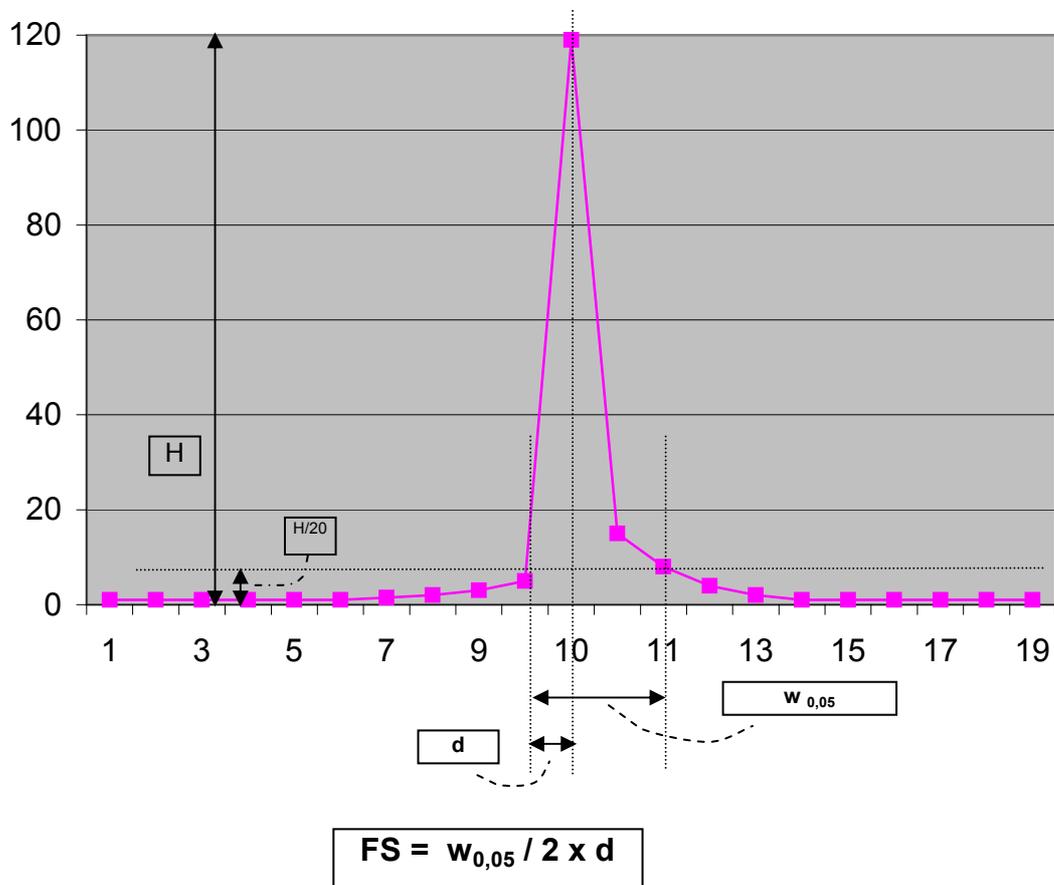


$$FC = (tR - tM) / tM$$

FC = Facteur de capacité ou coefficient de distribution massique  
 $t_M$  = temps de rétention d'un composant non retenu  
 $t_R$  = temps de rétention du pic considéré  
 $t_M$  et  $t_R$  doivent être exprimés dans la même unité (minutes, ou centimètres mesurés sur le graphe)

## HPLC : FACTEUR DE SYMETRIE

(= Facteur de traînée 5% = "Tailing factor")



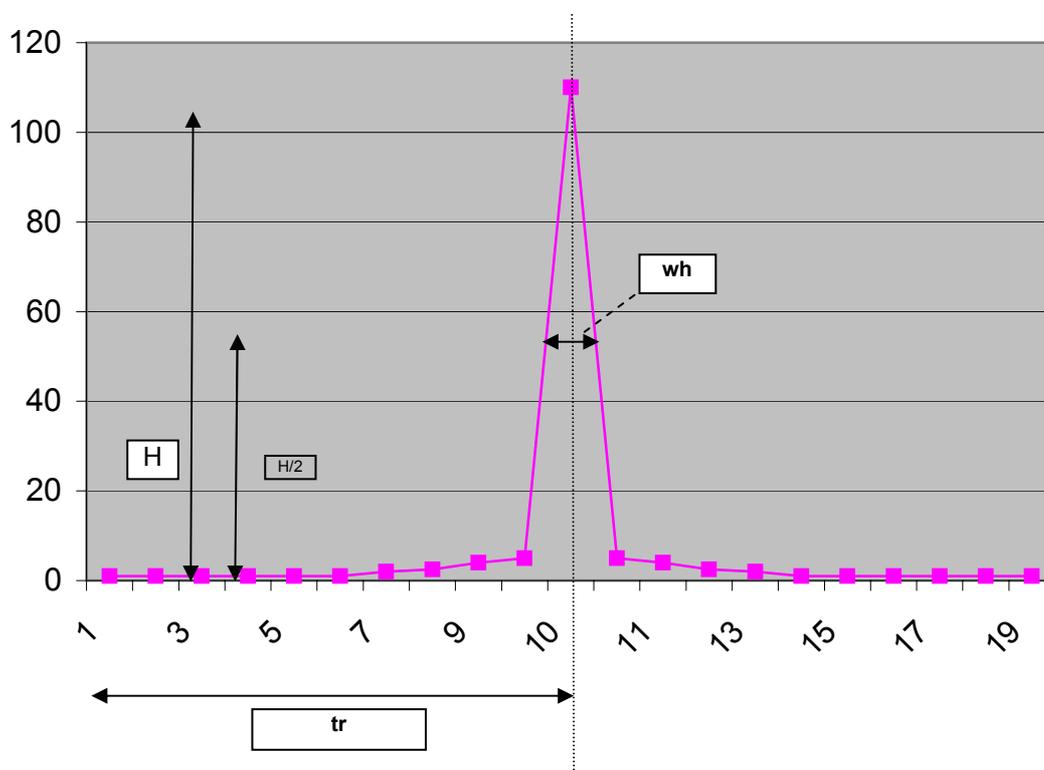
FS = Facteur de symétrie

$w_{0,05}$  = largeur du pic au 1/20<sup>ème</sup> de sa hauteur

d = distance entre l'entrée du pic au 1/20<sup>ème</sup> de sa hauteur et la perpendiculaire abaissée au maximum du pic

Une valeur de 1,0 indique une symétrie totale (idéale)

## HPLC : PLATEAUX THEORIQUES



$$PTh = 5,54 \times (tr / wh)^2$$

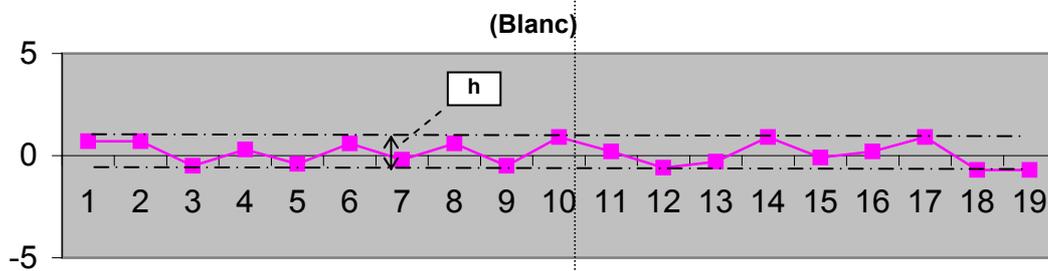
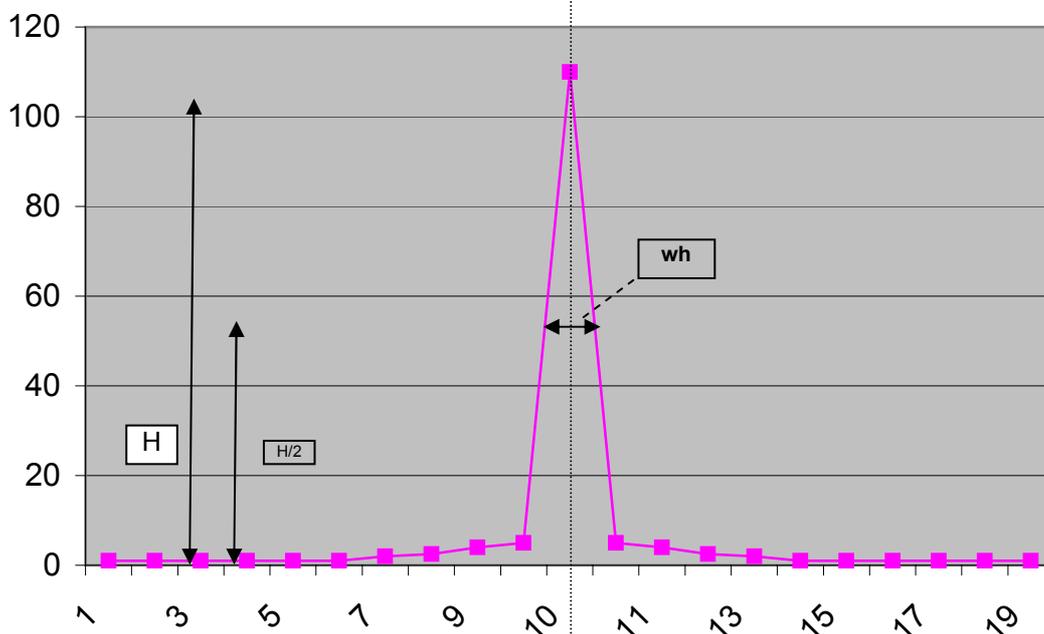
PTh = Nombre apparent de plateaux théoriques

tr = temps de rétention du pic

wh = largeur du pic à mi-hauteur

wh et tr doivent être exprimés dans la même unité (minutes, ou centimètres mesurés sur le graphe)

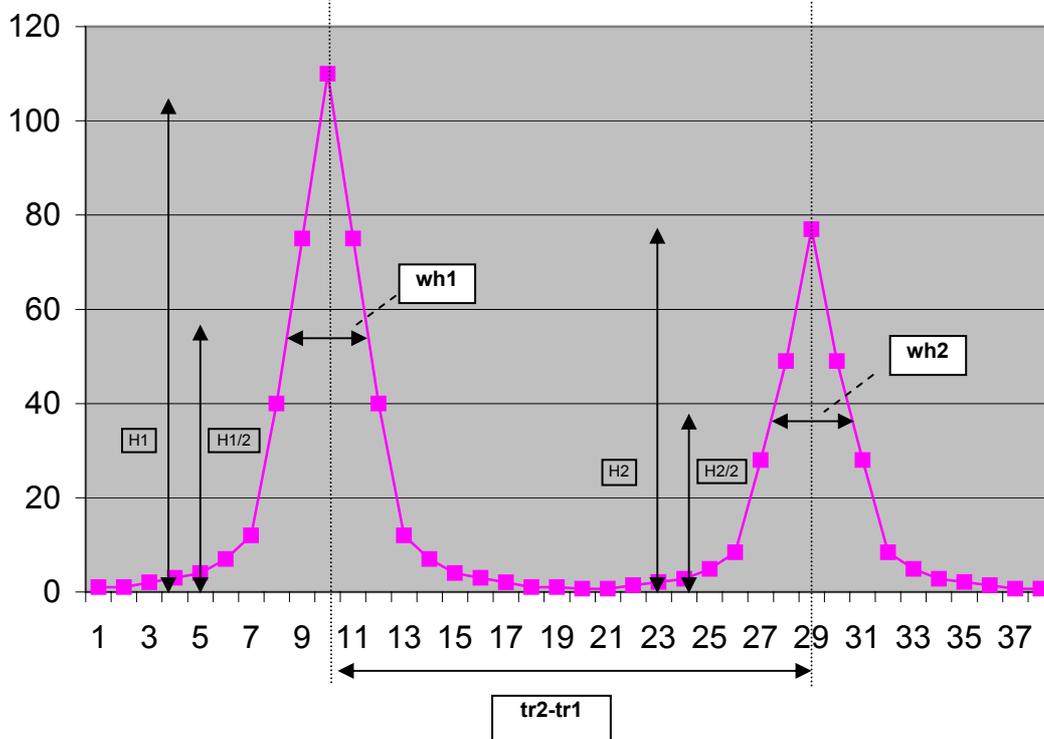
### HPLC : RAPPORT S/B (Signal/Bruit) (=S/N Signal/Noise)



$$S/N = \frac{2 \times H}{h}$$

S/B = S/N = Rapport signal/Bruit  
 H = hauteur du pic considéré  
 wh = largeur du pic à mi-hauteur  
 h = amplitude du bruit dans le blanc, déterminé sur une distance égale à 20 x wh, si possible centré sur le temps de rétention du pic

## HPLC : RESOLUTION



$$R_s = \frac{1,18 \times (tr_2 - tr_1)}{wh_1 + wh_2}$$

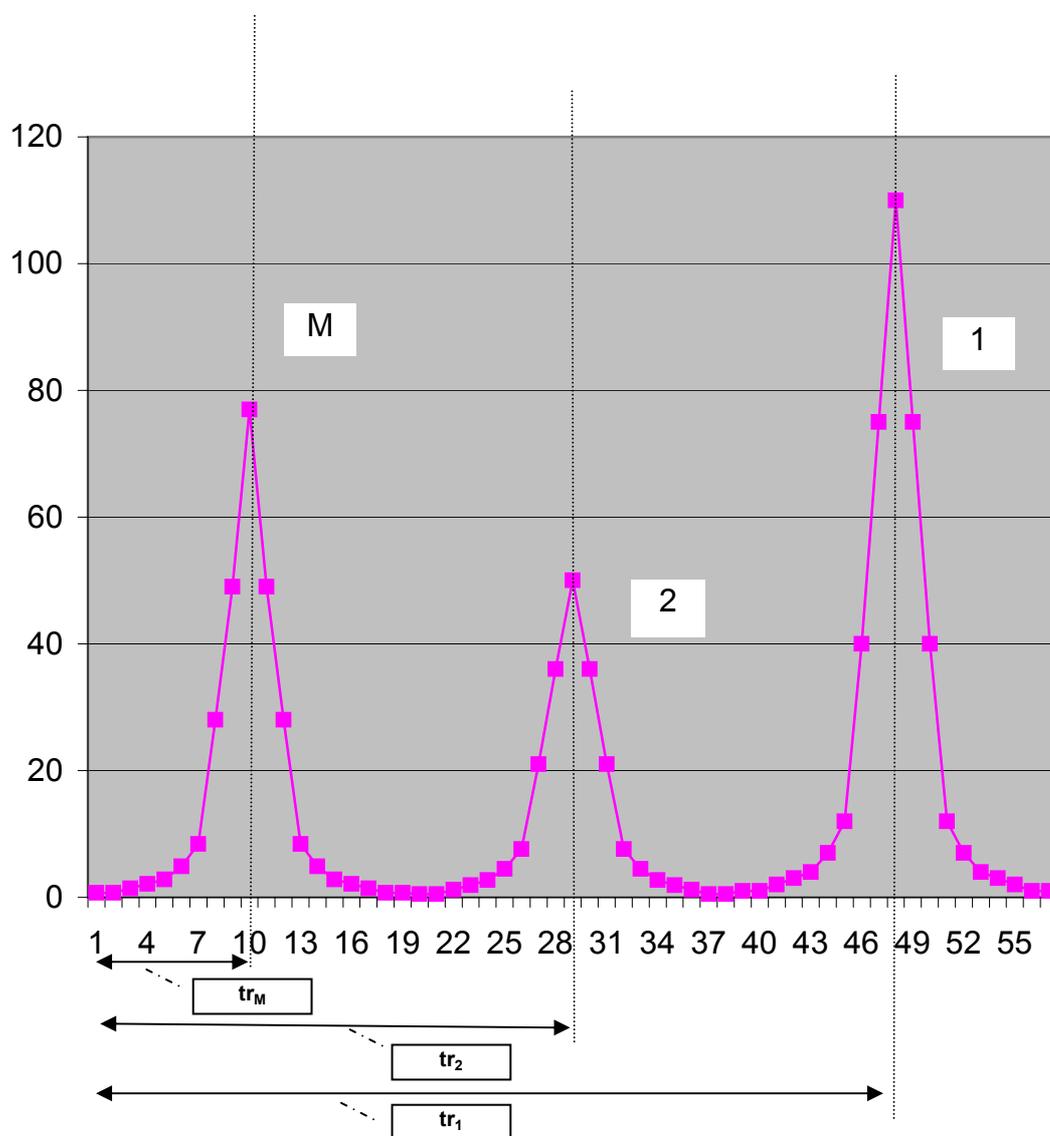
$R_s$  = Résolution entre pic 1 et 2

$wh_1$  = largeur du pic 1 à mi-hauteur ;  $wh_2$  = largeur du pic 2 à mi-hauteur

$tr_1$  = temps de rétention du pic 1 ;  $tr_2$  = temps de rétention du pic 2

$wh_1$ ,  $wh_2$ ,  $tr_1$  et  $tr_2$  doivent être exprimés dans la même unité (minutes, ou centimètres mesurés sur le graphe)

## HPLC : Temps de rétention relatif



$$Trr_2 = (tr_2 - tr_M) / (tr_1 - tr_M)$$

$Trr_2$  = Temps de rétention relatif du composé considéré 2  
(par rapport au pic principal)

$tr_M$  = temps de rétention du pic n, composant non retenu (0 si le composant non retenu n'est pas précisé dans la monographie)

$tr_2$  = temps de rétention du pic 2

$tr_1$  = temps de rétention du pic de référence

$tr_1$  et  $tr_2$  doivent être exprimés dans la même unité (minutes, ou centimètres mesurés sur le graphe)