

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOU MAMMARI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE

FILIERE: CHIMIE

MEMOIRE DE MASTER

SPECIALITE: CHIMIE PHARMACEUTIQUE

THEME

Qualification d'une chaine LC MS/MS

Présenté par: Benakli Nadia et Smaili Nawel

Soutenu publiquement le 26 /09/2017, devant le jury d'examen composé de:

Mme FERNANE	Farida	M.C.A	U.M.M.T.O	PRESIDENTE
Mme ABERBACHE	Nefissa	Directrice du centre de bioéquivalence		PROMOTRICE
Mme KICHOU	Nora	M.C.A	U.M.M.T.O	EXAMINATRICE
Mme MAZARI	Tassaadit	M.C.A	U.M.M.T.O	EXAMINATRICE

AVANT-PROPOS

Le présent mémoire qui a pour thème “qualification d’une chaîne UPLC MS/MS” rentre dans le cadre de l’obtention du master 2^{ème} année en chimie pharmaceutique dont les enseignements sont dispensés par l’Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou (BASTOS) et l’encadrement est assuré par la promotrice docteur ABERBACHE Nefissa. La pratique s’est déroulée au centre de bioéquivalence du groupe saidal (Hussein dey- Alger) où nous avons assisté à la qualification de la chaîne UPLC MS/MS suivi d’une formation réalisée par le fournisseur M.Vincent Genies, expert Waters-France. Cette expérience nous a permis d’apprendre énormément tant en terme de connaissances théoriques, ainsi, nous tenons à signifier notre reconnaissance à l’ensemble des personnes physiques ou morales qui n’ont ménagé des efforts pour faciliter nos tâches dans le cadre de cette étude et nos remerciements leurs vont particulièrement.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord nous tenons à remercier Dieu,

De nous avoir donné la santé, la volonté et la patience pour mener à terme notre formation de master et pouvoir réaliser ce travail de recherche.

Nos remerciements vont plus particulièrement à Docteur Aberbache et Docteur Fernane d'avoir proposés ce thème.

Nous tenons à exprimer nos profonds remerciements à notre encadreur Dr Aberbache Nefissa 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.

On adresse aussi nos remerciements à Dr Fernane Farida chef de département de chimie et à tous les enseignants de la filière de chimie

Nous tenons à gratifier aussi les membres de jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail.

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire de bioanalyse du centre de bioéquivalence Saidal de nous avoir ouvert leurs portes,

Et à Dr Bounab pour son aide

Un grand merci aussi à Monsieur Vincent Génies l'ingénieur compliance spécialiste en qualification des chaîne UPLC MS/MS pour les explications qui nous a fourni et la formation à laquelle on a assisté ou il nous a donné le maximum d'information.

Enfin, on adresse nos sincères sentiments de gratitude et de reconnaissances à toute les personnes qui ont participé de pré ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, que je dédie mon travail :

A mon cher père

Qui a su être à mes côtés dans les moments difficiles,

Pour son encouragement et sa générosité sans limites, pour Ses sacrifices durant toute sa vie afin de me voir devenir ce que je suis.

A ma chère mère

Pour Ses sacrifices demeurés et son amour infini,

Que dieu les garde Enchallah pour moi afin que leur prières me protègent et leur regards suivent ma destinée.

Aucun mot ne serait assez loquace pour témoigner les sentiments de reconnaissances que j'éprouve à leur égard. J'espère pouvoir réaliser aujourd'hui l'un de leurs rêves et les honorer.

A mes sœurs et mes frères

Nassima, Souhila, Rafik, Nowara, Hakim, Djegdjiga, Mestapha, Nourdine

A Samir

Qui a été toujours près à me renforcer et me donner de l'espoir

A ma chère cousine Wassila

A toute ma famille et mes amis(es)

Ania, Rima, Ouissam, Katia, Imene, Tinhinane, Malika, Kamélia, célia, Hayet, wissam, Belaid, Lynda, Nounou, Nadjwa, Youcef, Said, Mohammed et en particulier à mon binôme
Nadia

A tous ce qui m'ont supporté, encouragé et soutenu,

A tous ceux qui me sont chers.

NAWEL

Dédicace

A ma chère mère

A 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.

A mon cher père

A mon père, école 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.

A mes sœurs et mes frères

A mes précieuses sœurs Lamia et Serine et mes chères frères Mohamed et Ghiles, les mots ne peuvent résumer ma reconnaissance et mon amour à votre égard.

A ma grand-mère

Que dieu la garde et la protège

A tous mes amies

A tous mes amis avec lesquels j'ai partagé mes moments de joie et de bonheur.
En particulier : Ouissam, ma binôme Nawel, Katia, Ania, Thinhinane, imene, Samia, Nassima, Lynda, Kamélia, Nounou Merci pour votre présence, vos sourires et votre soutien.

A mes cousins et cousines

A tous Mes enseignants tout au long de mes études.

Nadia

Résumé

Le couplage UPLC-MS/MS en tandem est une méthode d'analyse de plus en plus utilisée pour détecter, identifier et quantifier les différents constituants d'un mélange complexe. Cette technique UPLC-MS/MS s'adresse en particulier à des molécules polaires, peu volatiles et thermolabiles.

L'objectif de notre travail est de qualifier une chaîne UPLC MS/MS suivant trois étapes nécessaires nommées (Qualification d'installation, Qualification opérationnelle, Qualification de Performance) et selon un protocole délivré par la société Waters – France, contenant un ensemble de tests spécifiques pour chaque étape en exploitant le logiciel Mass lynx® ayant une option de quantification de Target Lynx®. L'optimisation des paramètres opérationnels tels que la résolution de masse, la calibration, la haute résolution en masse et ceux de performance tels que la sensibilité, précision, température, gradient, la linéarité (du débit, d'injecteur et de détecteur) ont été effectués.

Les résultats de la qualification ont montré que la chaîne UPLC MS/MS est précise, très sensible et en bon état permettant le lancement des essais routine.

Mots clés : UPLC MS/MS, Mass lynx®, Target Lynx®, qualifications (QI , QO, QP).

Abstract

The UPLC-MS / MS coupling in tandem is an increasingly used analytical method for detecting, identifying and quantifying the different constituents of a complex mixture. This UPLC-MS / MS technique is particularly aimed at polar molecules, which are not very volatile and thermolabile.

The objective of our work is to qualify an UPLC MS / MS chain following three required steps named (Installation qualification, Opérationnelle Qualification, Performance Qualification) and according to a protocol issued by the company Waters - France, containing a set of specific tests for each step by exploiting the Mass lynx® software having a Target Lynx® quantification option. Optimization of operational parameters such as mass resolution, calibration, high mass resolution and performance such as sensitivity, accuracy, temperature, gradient, linearity (flow, injector and been carried out.

The results of the qualification showed that the UPLC MS / MS chain is precise, very sensitive and in good condition allowing the launch of the routine tests.
Keywords: UPLC MS / MS, Mass lynx®, Target Lynx®, Qualifications, IQ, OQ, PQ

ملخص

افتران الكروماتوغرافيا عالية الدقة مع مطياف الكتلة جنبا إلى جنب هو طريقة تحليلية تستخدم على نحو متزايد للكشف عن تحديد وقياس مكونات مختلفة من خليط معقد. هذه التقنية تستهدف الجزيئات القطبية. التبخر بالحرارة.

الهدف من عملنا هو تاهي السلسلة بعد ثلاث خطوات ضرورية اسمها (i) التثبيت. التشغيل. الاداء) وفقا لبروتوكول صادر عن شركة واترز يحتوي على مجموعة من الاختبارات المحددة لكل خطوة باستخدام برنامج ماسلينكس الذي يحتوي على برنامج تحديد الكمية تارجت لينكس. تم إجراء التحسين الامتل للمعلومات التشغيلية مثل الفرار الشامل عرض نصف الارتفاع والمعايرة ومعلومات الاداء مثل التدفق والحساسية والدقة ودرجة الحرارة والتدرج.

واظهرت نتائج التاهيل ان تلي مواصفات شركة واترز.

الكلمات الرئيسية: شركة واترز, التاهيل برنامج ماسلينكس, تارجت لينكس.

Agzul

Asegrew n UPLC.MS/MS d tarrayt n tesledt yettasqedcen deg tiffin d wakaz d usekket n yime liyen immugen s warway n isemlilen.Tafukkest agi n LC.MS/MS unfilen n ucuber asfaylu s cwit n ugdid n tezyelt n yitij.

Iswi n umahi-nney d anezgi n userbabu3 UPLC MS/ MS d umsetbe3 n krad (3) n yimecwaren (QI, QO, QP),deg tidmi uneggaf id-yefyen deg tkebbanit waless n franş a.Anegbar (yes3a) taggruma n ikayaden iyaranen i yal yiwet deg umecwar ad isseqdec aseyzan n Mass-lynx yes3an a ayar n usekket n Target Lynx asenyif n iyewwaren n umahil am ufsay n Mass, d trebbawin am uħussu d tiseddi d tezyel tte an tizirya yettwaxedmen.

Igemmad n unadis begnen-d Uplc MS/MS d usdid d aleqqaq yerna du lihala yelhan

Awal ufrir:UPLC MS/MS, Mass lynx, Target lynx, dasemmi QI, QO, QP.

LISTE DE TABLEAUX

Tableau N° 01. Produits utilisées pour la qualification de la chaîne UPLC MS-MS

Tableau N°02. Matériel d'une chaîne UPLC MS/MS

Tableau N°03. Information sur le logiciel Mass lynx

Tableau N°04. Préparation de l'échantillon pour le test gradient.

Tableau N°05. Préparation de l'échantillon de sensibilité et de précision.

Tableau N° 06. Préparation de l'échantillon pour le dosage des traces résiduelles d'injecteur (Carryover challenge).

Tableau N°07. Préparation des solutions de la phase mobile.

Tableau N°08. Résultats de la qualification d'installation de la chaîne UPLC MS-MS.

Tableau N°09. Résultats des tests de débit, températures.

Tableau N°10. Résultats des tests préliminaires d'injection.

Tableau N°11. Résultats des tests de sensibilité (en mode positif et négative).

Tableau N° 12. Résultats du test de précision.

Tableau N°13. Résultats de tests de linéarité d'injecteur.

Tableau N° 14. Résultats des tests de linéarité du débit, de détecteur et d'injecteur.

Tableau N° 15. Résultats des tests sur les deux gradients (A, B) et (C, D).

LISTE DES FIGURES

Fig 01. Schéma de l'ensemble du système ACQUITY UPLC.

Fig 02. Schéma d'un triple quadripôle.

Fig 03. Schéma d'un gestionnaire d'échantillon (sample manager).

Fig 04. Schéma représentant les différents modules du spectromètre de masse Xévo TQ.

Fig 05. Schéma d'un système de détection par fragmentation ionique.

Fig 06. Image de l'ensemble des parties d'une chaîne UPLC MS/MS.

Fig 07. Schéma des différentes dilutions effectuées sur le sulfadiméthoxine.

Fig 08. Schéma des résultats de la vérification de l'intervalle de masse et de la résolution sur les deux quadripôles.

Fig 09. Schéma des résultats de la haute résolution de masse.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A.F : Acide formique.

A.N : Acétonitrile.

BPL : Bonne pratique de laboratoire.

CFR21 : Code des règlements fédéraux 21

CI : L'ionisation chimique.

Da : Unité de mesure (Dalton); 1/12 de la masse d'un atome de ^{12}C , soit $1.66 \cdot 10^{-27}\text{Kg}$

DDL : Bibliothèque de liens dynamiques.

EI : L'ionisation Électronique.

ESI : L'ionisation par électro nébulisation.

GPV: Soupape de proportionnellement de gradient.

HPLC : Chromatographie liquide haute performance.

ISO : Organisation internationale de normalisation.

LC : Chromatographie liquide.

MALDI : Ionisation par désorption laser assistée par matrice.

MRM : Surveillance de réaction multiple.

MS : Spectromètre de masse.

M/Z : Masse/Charge.

PDA : photodiode array détecteur.

PDG : Président Directeur Général

PMT : Tube Photomultiple.

TUV : Tunable Ultraviolet détecteur

UPLC : Chromatographie liquide ultra performance.

Bioéquivalence

La bioéquivalence ou bio-équivalence est un terme de pharmacologie. Deux principes actifs sont dits bioéquivalents lorsque, administrés à la même concentration, ils engendrent normalement les mêmes effets.

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.

Check-list

Une check-list ou liste de vérification, est un document construit dans le but de ne pas oublier les étapes nécessaires d'une procédure pour qu'elle se déroule avec le maximum de sécurité. Cette opération peut se dérouler à voix haute et/ou en cochant une liste écrite de procédure.

Carryover: Test de dosage de traces résiduelles.

Coefficient de corrélation

Le coefficient de corrélation linéaire (noté "R") entre deux variables est égal au rapport de leur covariance et du produit non nul de leurs écarts types. Le coefficient de corrélation est compris entre -1 et 1. Le fait que deux variables soit « fortement corrélées » ne démontre pas qu'il y ait une relation de causalité entre l'une et l'autre.

Détecteur à barrette de diodes (PDA)

Le détecteur à barrette de diodes (PDA) ACQUITY UPLC[®] est destiné à la détection et la quantification de faibles concentrations de composés il permet de comparer les spectres UV/visibles des produits sur une large gamme de longueurs d'onde et de concentrations, Le détecteur PDA offre un complément de détection pour les composés qui sont difficiles à détecter avec les méthodes HPLC conventionnelles et s'utilise aussi en couplage UPLC[®]/MS.

Détecteur de diffusion de lumière (ELS)

Le détecteur évaporatif à diffusion de lumière (ELS) ACQUITY UPLC® est spécialement conçu pour optimiser les performances des analyses en UPLC® demandant une détection à diffusion de lumière.

Lorsque la réponse de nos composés est faible en UV/visible, ou si nos composés ne s'ionisent pas correctement en spectrométrie de masse, le détecteur ELS ACQUITY UPLC associé au système ACQUITY UPLC permet de détecter un plus grand nombre de molécules en une seule analyse. Ce détecteur permet d'analyser de nombreux échantillons, de détecter rapidement un grand nombre de composés et peut être utilisé en libre accès il se superpose aux autres détecteurs, est facile à entretenir et est équipé de lampes à longue durée de vie.

Dynode

Les dynodes sont des composants essentiels du photomultiplicateur, Une dynode consiste en une électrode servant de substrat à un film de matériau sélectionné pour ses capacités d'émission secondaire : l'électron incident transfère son énergie à d'autres électrons du film émissif, qui est en contact avec le vide. Ces électrons secondaires sont éjectés, et, généralement, focalisés et accélérés par un champ électrique vers une autre dynode.

Gamme : Intervalle de dosage ou série de concentration.

Limite de détection

Plus petite quantité d'analyte de l'échantillon pouvant être détectée. C'est-à-dire, se distinguant du bruit de fond.

Linéarité

Capacité à obtenir un résultat directement proportionnel à la quantité en analyte de l'échantillon à l'intérieur de l'intervalle de dosage.

Masslynx®

Le logiciel MassLynx constitue une plate-forme essentielle pour l'acquisition, l'analyse, la gestion et le partage des informations de spectrométrie de masse. MassLynx a évolué pour devenir un logiciel puissant qui vous offre polyvalence et souplesse la plupart de ses nouvelles fonctionnalités résultent des remarques et suggestions d'un grand nombre d'utilisateurs.

Phase Mobile

La phase mobile en chromatographie peut être :

- soit un gaz (chromatographie en phase gazeuse), la phase mobile est alors appelée gaz vecteur ou gaz porteur ;
- soit un liquide (chromatographie sur papier, couche mince ou colonne), la phase mobile est alors appelée éluant.

Phase stationnaire

La phase fixe peut être solide ou liquide. Les solides, silice ou alumine traitées, permettent la séparation des composants des mélanges grâce à leurs propriétés adsorbantes. Ils peuvent être employés comme remplissage d'une colonne (chromatographie par gravité et chromatographie à haute performance ou HPLC)

Précision

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.

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.

Répétabilité

Fidélité obtenue 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.

Résérpine

Alcaloïde utilisé comme régulateur du système nerveux central, sédatif et tranquillisant. Produits ayant une efficacité satisfaisante, mais non spectaculaire pour lutter contre l'hypertension: dérivés de la résérpine, diurétique de synthèse, sédatif et tranquillisant.

Sensibilité

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

Et en analyse quantitative c'est la quantité minimale détectable pour un composé mesuré qui donne un signal suffisamment significatif pour être distingué du bruit de fond

- Limite de détection: 2 à 3 fois le niveau du bruit
- Limite de quantification: 5 à 10 fois le niveau du bruit

Target lynx®

Pour les analyses de quantification et de confirmation ciblées à haut débit, Le Gestionnaire d'applications TargetLynx™ automatise l'acquisition, le traitement et le reporting des données d'échantillonnage pour des résultats quantitatifs. Il intègre une gamme de contrôles de confirmation qui identifient les échantillons qui ne sont pas conformes aux seuils spécifiés par l'utilisateur ou réglementaires.

Tube photomultiplicateur ou PMT

Les tubes à photomultiplicateurs (photomultiplicateurs ou PMT à court), les membres de la classe des tubes à vide, et plus particulièrement les phototubes à vide, sont des détecteurs extrêmement sensibles de la lumière dans les plages ultraviolettes, visibles et infrarouges proches du spectre électromagnétique.

Tunable ultraviolet détecteur (TUV)

Le détecteur UV programmable (TUV) ACQUITY UPLC® est un détecteur UV/visible à double longueurs d'onde optimisé pour travailler en UPLC®. Il fournit une linéarité, une résolution et une sensibilité idéales pour les séparations UPLC/UV.

Introduction générale

Introduction générale

Le laboratoire analytique a beaucoup évolué. Pendant des années, le monde technologique progressait à grands pas et la chimie analytique était à la traîne. La technologie HPLC ne pouvait plus traiter plus d'échantillons, plus rapidement et avec de meilleurs résultats. [1]

Les fabricants d'équipements analytiques (Waters, AB Sciex, Agilent, Shimadzu, Perkin, ...) ont aperçu la nécessité d'un changement, et ont développé des modules fluidiques conjointement à des colonnes à particules hybrides de diamètre inférieur à 2 μm , pour fournir des performances supérieures, à des pressions plus élevées. Les volumes du système ont été minimisés, les circuits fluidiques optimisés, pour donner naissance à la chromatographie ultra performance, mieux connue aujourd'hui sous le nom d'UPLC, ainsi à l'invention d'une catégorie complètement nouvelle de performances chromatographiques, dite UPLC MS/MS.[2]

L'UPLC-MS/MS offre plusieurs avantages par rapport aux méthodes plus anciennes, dont une sensibilité et une précision accrues, une préparation des échantillons plus simple, une plage quantitative dynamique et, surtout, un multiplexage.

Dans notre étude nous nous sommes intéressés à la qualification (QI, QO, QP) d'une chaîne UPLC MS/MS au niveau du centre de bioéquivalence appartenant au groupe saidal.

En effet, l'objectif de notre travail porte sur deux axes :

Le premier axe porte sur l'aspect théorique relatif à la présentation de différents composants d'une chaîne LC MS/MS et sur le principe de fonctionnement de cette dernière. Le second axe consiste à la description des étapes de la qualification (IQ, OP et PQ) de la chaîne LC MS/MS et la présentation des résultats expérimentaux.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

CHAINE LC MS/MS : INSTRUMENTATION

1-Chromatographie en phase Liquide Ultra Performante UPLC

1-1- Définition

L'UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) est une marque initialement déposée de Waters qui désigne certains de ses systèmes de chromatographie en phase liquide à haute pression. C'est une technique de séparation des constituants d'un mélange simple ou complexe. Le nom de marque UPLC® est par la suite adopté par l'ensemble des fabricants de chaînes UPLC MS-MS. [4]

1-2-Appareillage de l'UPLC

La console ACQUITY UPLC contient quatre parties principales :

Gestionnaire de solvant binaire (Binary Solvent Manager), Gestionnaire d'échantillons (Sample Manager), Colonne et Détecteur (Figure 1)



Fig 01. Schéma d'ensemble du système ACQUITY UPLC

- **Détecteurs**

Le système peut être configuré avec des détecteurs optiques internes (par exemple TUV, PDA ou ELS) ou connecté à un Spectromètre de masse séparé.

- **Colonne**

Le type de colonne utilisé est une colonne de phase inversée UPLC d'ACQUITY BEH C18 (1,7 µm, 2,1 X 50 mm) qui est accompagné d'une puce placée à droite de la colonne qui est son empreinte.

1-3- Systèmes UPLC les plus adaptés dans les laboratoires de contrôle qualité

1-3-1- Système ACQUITY UPLC

Le système ACQUITY UPLC permet de réduire de manière significative la durée et les coûts nécessaires à l'analyse d'un échantillon, tout en garantissant des résultats de

meilleure qualité. Cette technologie, qui surpasse les systèmes HPLC traditionnels ou optimisés, permet aux chromatographistes de travailler avec une efficacité maximale sur une plus grande gamme de vitesses linéaires, de débits et de pressions. [5]

1-3-2- Système ACQUITY UPLC H-Class

Le système ACQUITY UPLC H-Class offre la résolution la plus élevée parmi tous les systèmes chromatographiques quaternaires disponibles sur le marché.

La dispersion du système est adaptée à la largeur des pics issus des colonnes de faible diamètre et de granulométrie inférieure à 2 μm . Si d'autres systèmes semblent avoir été spécifiquement conçus pour une utilisation à haute pression, ils ne parviennent pas pour autant à générer les pics étroits que produisent la technologie UPLC et le système ACQUITY UPLC H-Class. [6]

2- Différents Principes chromatographiques d'une UPLC

On dispose d'un grand nombre de modes de chromatographie. Certains ont un champ d'application très large, d'autres au contraire correspondent à des applications très spécialisées. [7]

On distingue dans ce qui suit :

- chromatographie d'exclusion (séparation selon la taille)
 - chromatographie d'échange d'ions (+ chromatographie ionique)
 - chromatographie d'affinité
 - chromatographie d'adsorption
 - chromatographie par fragmentations des ions
- Le choix de tel ou tel mode obéit à des règles logiques directement liées à la nature des composés à séparer.

2-1- Chromatographie d'exclusion

2-1-1- Définition

Ce type de chromatographie, également appelé tamisage moléculaire ou gel-filtration, vise à séparer les molécules en fonction de leur masse moléculaire bien que la forme intervienne également. [7]

2-1-2-Applications de la chromatographie d'exclusion

Cette technique est très utilisée pour la séparation ou l'élimination de sels ou de petites molécules dans les solutions protéiques : dessalage, échange de tampons...etc

Cette technique est également appliquée au fractionnement de mélanges de macromolécules et à la détermination (approximative) de la masse molaire des protéines. [7]

2-2- Chromatographie d'échange d'ions

2-2-1-Définitions

Dans la chromatographie d'échange d'ions, la phase stationnaire comporte des groupements ionisés (+ ou -) fixes; des ions mobiles de charge opposée assurent l'électroneutralité. Les ions retenus au voisinage des charges fixes sont échangeables avec les ions présents dans la phase mobile.

La séparation est basée sur cette propriété d'échange d'ions et ne peut donc s'appliquer qu'à des solutés ionisables. [7]

2-2-2- Applications

La chromatographie d'échange d'ions est utilisée pour séparer des molécules ionisables, quelle que soit leur taille : ions minéraux, acides aminés, peptides, protéines, nucléotides, acides nucléiques, glucides ionisés et lipides ionisés. [7]

2-3- Chromatographie d'affinité

2-3-1-Définition

C'est le type de chromatographie le plus sélectif, une protéine pouvant être purifiée d'un facteur 10^3 à 10^4 en une seule fois.

La chromatographie d'affinité est donc très puissante par sa sélectivité importante, mais souvent plus lourde et plus onéreuse à mettre en œuvre que d'autres types de chromatographie. Par ailleurs, elle n'est pas adaptée à la purification de grandes quantités de molécules. En effet, la capacité est fonction du nombre de sites disponibles sur la résine : lorsque ceux-ci sont saturés, les molécules en surnombre ne seront pas purifiées. [7]

2-3-2-Domaine d'application

L'une des principales applications de la chromatographie d'affinité est l'isolement de protéines ou d'acides nucléiques. [7]

2-4- Chromatographie d'adsorption

2-4-1-Définition

Ce mode de chromatographie met en jeu un mécanisme d'adsorption du soluté sur la phase stationnaire solide et un mécanisme d'élution (désorption) par la phase mobile liquide ou gazeuse (éluant). [7]

2-4-2-Applications :

La chromatographie d'adsorption est utilisée pour séparer des molécules organiques de masse molaire 100 à 1000 g/mol et de polarité moyenne. [7]

Remarque :

Les principes de chromatographie cités ci-dessus utilisent un détecteur optique (détecteurs spectroscopiques, détecteurs électrochimiques...etc)

2-5- Principe par fragmentations des ions

2-5-1- Définition

Il existe un autre principe chromatographique plus développé et plus performant par rapport aux autres, appelé « **principe de fragmentations des ions** », dans ce cas le système ACQUITY H- Class UPLC est couplé aux technologies de spectrométrie de masse Xevo TQD de Waters.

2-5-2- Spectromètre de masse en tandem MS/MS

La spectrométrie de masse en tandem est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique. Elle est utilisée dans pratiquement tous les domaines scientifiques : physique, astrophysique, chimie en phase gazeuse, chimie organique, dosages, biologie, médecine...

2-5-3- Appareillage d'un spectromètre de masse en tandem

Le spectromètre de masse en tandem est constitué d'une source d'ionisation, un triple quadripôle qui est constitué à son tour de deux quadripôles séparés par une source de collision et d'un détecteur. [7]

2-5-3-1- Sources d'ionisation :

Les sources d'ions les plus courantes sont :

- L'ionisation chimique a pression atmosphérique (APCI)
- L'ionisation par électronébulisation (electrospray ionisation) (ESI). [7]

2-5-3-2-Analyseur

L'analyseur TQD se trouve après la source d'ionisation et avant le détecteur de spectromètre de masse, Il sépare les ions en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).

Dans notre cas il s'agit d'un analyseur triple quadripole constitué de deux quadripoles séparés par une cellule de collision.[7]

❖ Le triple quadripôle

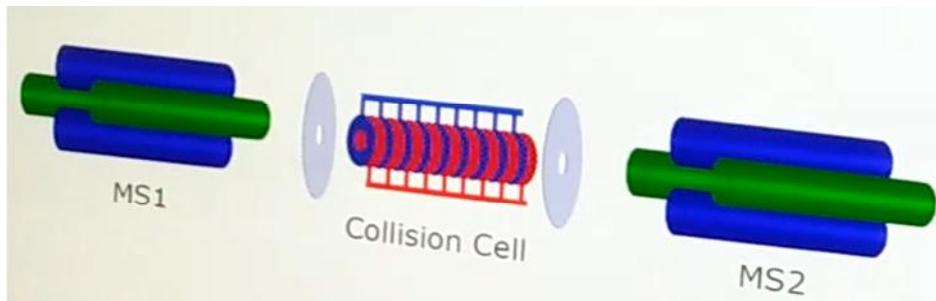


Fig 02.Schéma d'un triple quadripôle

2-5-3-3-Détecteurs

Il existe différents types de détecteurs. Ils sont tous basés sur des principes physiques différents, mais leur rôle reste le même, compter les ions. C'est une partie placée sous vide (10^{-5} - 10^{-7} Torr). [7]

Chapitre II
CHAINE LC MS/MS : Principe de
fonctionnement

CHAPITRE II: CHAINE UPLC MS/MS : Principe de fonctionnement

1- Couplage UPLC MS/MS

1-1- Définition

Le couplage UPLC-MS/MS en tandem est une méthode d'analyse de plus en plus utilisée pour détecter, identifier et quantifier les différents constituants endogènes et exogènes d'un mélange complexe (aliment, extrait végétal, eau, sang, salive, urine...) . [8]

1-2- Principe de fonctionnement d'une chaîne UPLC-MS/MS

1-2-1- Partie UPLC

- **Gestionnaire de solvant binaire**

Il y'a deux chambres de dégazage auxquelles les câbles qui transportent les solvants A, B, C et D sont reliées, dans ces chambre les solvant sont dégazés et passent directement dans les deux gradients qu'on appelle Vanne de proportionnement de gradient (GVP) qui sont reliés à la vanne de mélange ou la quantité des composants des solvants (par exemple 90% de A et 10% de B) sera mélangé puis aspirer par la pompe quaternaire c'est-à-dire qu'il y'a possibilité d'injecter quatre solvants au même temps , la pression maximale de cette pompe est 15000 psi. Puis, le mélange est envoyé vers l'accumulateur, ce dernier maintien la pression dans le système.

Le mélange de solvant arrive dans une vanne qui l'envoie vers un filtre puis directement il rentre dans la partie gestionnaire d'échantillons pour transporter les molécules contenues dans les échantillons. [9]

- **Gestionnaire d'échantillons**

Le plateau à échantillons est constitué de 48 puits rond (dans la chambre, on peut placer deux plateaux) ;

- les échantillons sont placés à l'intérieure des puits.
- la température à l'intérieur de la chambre des échantillons est réglée à 10°C
- l'aiguille de prélèvement pique les puits pour aspirer le contenu et passe directement à la seringue d'injection.
- le système va se mettre en connexion pour transporter le flux vers la colonne en passant par une vanne d'injection. [9]

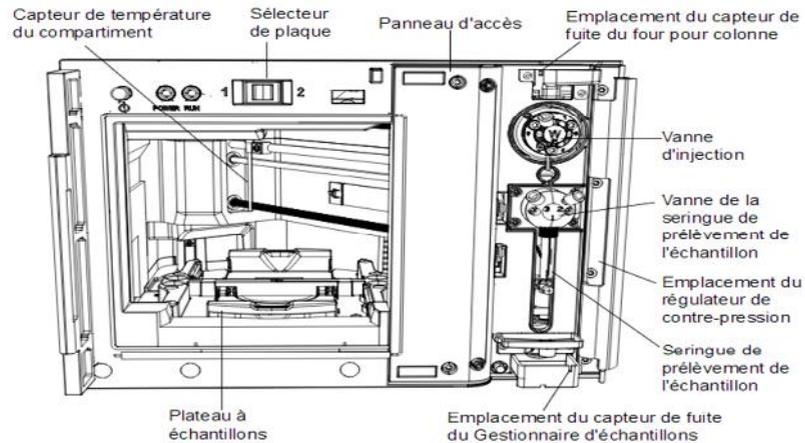


Fig 03. Schéma de Gestionnaire d'échantillons

- **Colonne**

La colonne contient un gel de silice utilisé pour le greffage appelé phase stationnaire, qui retiendra plus les solutés apolaires et les polaires sortiront de la colonne, on utilise des solvants polaires souvent l'eau, acétonitrile, méthanol ... etc.

En ce qui concerne le greffage les colonne C18 sont des "billes" de silicium sur lesquelles on a greffé des fonctions avec 18 carbones, il existe d'autres phases stationnaires pour la phase inverse de C2 à C18 (C8 est également beaucoup utilisé), cyano (-CN), amino (-NH₂) et phényle (-C₆H₅).

- la température de la colonne est réglée à 40°C. [9]

✚ **Remarque** : L'UPLC possède aussi une pré-colonne ou colonne de garde VanGuard 1.7 μm, 2.1 mm × 5 mm; connecté directement à l'entrée de la colonne ACQUITY UPLC qui permet de protéger la colonne et d'éviter toute endommagement de cette dernière.

Lorsque la séparation est terminée les molécules passent au spectromètre de masse. [9]

1-2-2- Partie spectromètre de masse Xévo TQD

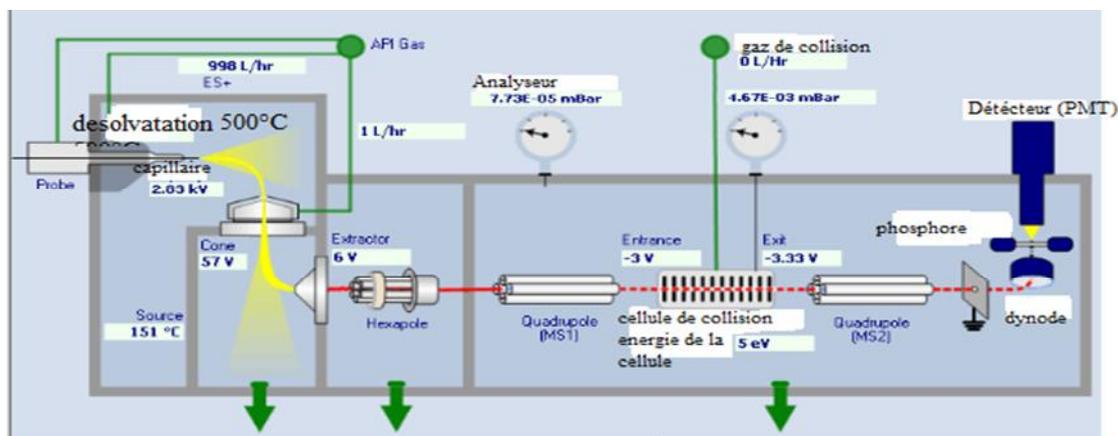


Fig04. Schéma représentant les différents modules du spectromètre de masse Xévo TQD

La spectrométrie de masse vise à déterminer la masse des molécules présentes dans un échantillon donné.

La mesure de la masse repose sur la déviation de molécules préalablement ionisées par un champ électrique ou magnétique pour lesquelles les trajectoires sont proportionnelles à leur masse et à leur charge.

Le spectromètre de masse est composé:

- D'une source d'ionisation où se crée des ions positifs ou négatifs selon la tension qui a piquet sur le cône ;
 - ✓ Si le cône est mis à un potentiel négatifs il faut faire entrer des ions positifs ;
 - ✓ Si le cône est mis à un potentiel positif il faut faire entrer des ions négatifs.

Lors d'une ionisation par électrospray (ESI), les molécules qui ont été déjà séparées passent à travers une aiguille de nébulisation dont l'objectif est de former des gouttelettes, formant le spray dans un gaz. L'éluant acquiert une forte charge électrique à sa sortie du nébuliseur. La taille des gouttelettes qui composent l'aérosol généré diminue en raison de l'évaporation du solvant et disparition de la phase mobile en utilisant un gaz inerte qui est l'azote. Le solvant continue de s'évaporer et la densité de charge augmente jusqu'à ce que la surface des gouttelettes émette des ions, l'évaporation ionique. Les ions peuvent porter au moins une charge. Les ions portant plusieurs charges sont particulièrement intéressants car le détecteur les sépare en fonction de leurs rapports masse/charge, m/z . Ce phénomène permet la détection de composés de masses moléculaires élevées. [9]

L'instrument accepte des débits d'éluant pouvant atteindre 1mL/min.

Il y'a un gaz rideau (azote) entre la source d'ionisation et le premier quadripôle dont le rôle est d'éliminer toute trace restante de la phase mobile et de laisser passer que les ions parents cela minimise le bruit de fond et juste après le gaz rideau il y'a le vide qui attire les molécules.

- d'un analyseur qui permet de séparer les ions en fonction du rapport de la masse sur la charge (m/z).

Les analyseurs peuvent être couplés de façon séquentielle. Il s'agit de la spectrométrie de masse à plusieurs dimensions (dans le cas présent, en tandem donc MS/MS). Un premier analyseur sélectionne les ions parents issus de la source d'ionisation selon un rapport m/z (purification). L'ion purifié est ensuite fragmenté dans une chambre de collision par l'aide d'un autre gaz inerte qui est l'argon réglé à 0.5 bars en appliquant un potentiel électrique ou une énergie de collision .[9]

- ✓ Un deuxième analyseur détecte les ions fils issus de la source de collision selon le rapport m/z des fragments
 - Les ions doivent traverser tous le système pour être détecter.
- les ions tapent sur la dynode positivement pour créer des électrons ;
- les électrons passent dans une dynode circulaire puis ils tapent la bassine de phosphore pour créer des photons;
- les photons vont être détectés par un tube photomultiple PMT.

La figure N° 05 montre le schéma explicite du principe de détection par fragmentation ionique

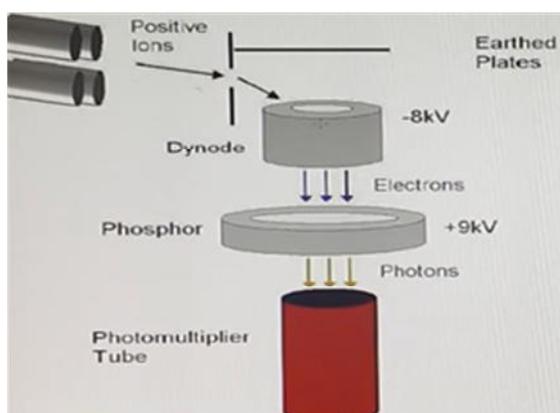


Fig 05. Schéma d'un système de détection par fragmentation ionique.

1-3- Domaine d'application d'une chaîne UPLC MS/MS

- Analyse structurale et quantitative
- Chimie organique et inorganique: applications en chimie analytique (industrie des parfums, pétrochimie, chimie des polymères, ...)
- Applications biomédicales : pharmacologie, toxicologie ...etc
- Contrôle de l'environnement : analyse élémentaire et bactériologique de l'air et de l'eau ; suivi de la pollution par des pesticides ou des processus industriels
- En agroalimentaire, contrôle de fraudes alimentaires...etc
- Caractérisation des drogues, contrôle anti-dopage, La détection des β bloquants dans le sang, le screening de certaines classes de médicament (ex : benzodiazépines) dans l'urine et le sang,...etc

❖ Applications principales

- Détermination de masses moléculaires (nominales) par MS et caractérisation structurale par MS/MS (exp : métabolites primaires ou secondaires)
- Elaboration de profils métaboliques
- Dosage proprement dit des composés analysés (dilution isotopique et suivi de transitions spécifiques par MS/MS mode MRM), de résidus de contaminants (étalonnage interne ou externe). [10]

2- Qualifications: QI, QO, QP**2-1- Définition**

La qualification s'applique, selon les BPF, principalement aux équipements et aux installations. C'est une (opération destinée à démontrer que tout matériel ou équipement utilisé pour la fabrication, le conditionnement ou le contrôle fonctionne correctement et donne des résultats attendus pour l'usage auquel il est destiné). [11]

2-2- Principe général de la qualification

- L'opération de qualification permet de vérifier et garantir la fiabilité des équipements
- prévoir la maintenance, l'entretien, le changement des éléments défectueux afin d'assurer la conformité aux normes ou aux spécifications définies et nécessaires à la qualité des produits fabriqués
- Etablir les procédures de fonctionnement. [11]

2-3- Etapes de la qualification

La qualification se déroule en 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)

2-3-1- Qualification de la Conception « QC »

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

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

2-3-2- Qualification à l'Installation « QI »

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. [13]

2-3-3- Qualification Opérationnelle « QO »

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 informatique et de sécurité fonctionnent correctement. [13]

2-3-4- Qualification des Performances QP

Elle couvre le processus servant à démontrer que l'appareil continu 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'est 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.
[20]

Chapitre III

Partie expérimentale I

Chaine UPLC MS/MS

Qualification

Objectif

Dans le cadre de l'acquisition, installation de l'UPLC MS/MS dans le centre de bioéquivalence appartenant au groupe Sidal, l'objectif étant d'établir une instruction opérationnelle d'utilisation de l'équipement en se basant sur une série de qualifications (QI, QO, QP) réalisées par le fournisseur de l'équipement. Cette instruction d'utilisation servira comme protocole à suivre en routine par les opérateurs (les bioanalystes).

1-Produits et Réactifs

1-1- Produits

La composition de mélange d'échantillons utilisés dans la qualification d'une chaîne UPLC MS/MS est présentée dans le tableau suivant :

Tableau N° 01. Produits utilisées pour la qualification de la chaîne LC MS-MS

Produit	Concentration
4-acetomidophenol	200 pg/μl
Caffeine	200 pg /μl
Sulphadiméthoxine	100 pg / μl
Verapamil	50 pg / μl
Chloramphenicol	50 Pg / μl
Résérpine	50 ng / μl

1-2- Réactifs

Les réactifs utilisés dans la préparation des solutions introduites dans la phase mobile d'une chaîne UPLC MS/MS sont :

- Acétonitrile LCMS-grade (NH_3CN)
- L'eau ultra pure LCMS-grade (H_2O)
- Méthanol LCMS-grade (CH_3OH)
- Isopropan-2-ol LCMS-grade ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$)
- Acide formique (CH_2O_2) >99 %

- L'ammoniaque (NH₄OH)
- ✚ Les articles de laboratoires du centre de bioéquivalence, à savoir ; les réactifs, la verrerie et les micropipettes utilisés sont de très haute qualité chimique (décontaminés et de classe A).

2- Matériels

2-1- Matériel constituant la chaîne UPLC MS/MS

La figure N°06 représente l'emplacement des différentes parties de la chaîne UPLC MS/MS au niveau du centre de bioéquivalence.



Fig N°06 : Image de l'ensemble des parties d'une chaîne UPLC MS/MS

Le tableau N°2 illustre les noms et les images de chaque module de la chaîne.

Nom d'équipement	Image
Aquity waters UPLC H- Class	
Spectromètre de masse Xevo TQD waters	
Système informatique (PC + imprimante)	

Générateur d'azote	
Pompes à palette turbo avec ventilateur	
Onduleur	
Bouteille d'argon	
Cuve de stockage azote	

Tableau N°02. Matériel d'une chaîne UPLC MS/MS

2-2- Matériels utilisés dans la préparation des échantillons

- Micropipettes de haute précision de marque Eppendorf
- Hotte pour solvants organiques
- Bain ultrason
- Thermomètre
- Chronomètre

2-3- Verrerie

- Flacons volumétriques (10ml, 50ml, 100ml)
- Bêchers
- Fioles graduées
- Entonnoir
- Flacons de waters utilisés pour la conservation des solvants

3- Logiciel

Le logiciel proposé et accompagnant l'équipement est le MassLynx® spécifique à la marque Waters. Le tableau N°03 illustre les composantes de ce logiciel.

Tableau N°03. Information sur le logiciel Mass lynx

Software	Version	Gestionnaire d'application Mass lynx	Service pack ou SCN _s
Mass lynx	4.1	Target lynx	918

4- Documents

- Masslynx4.1 Guide de démarrage. [15]
- Waters Xevo TQD MS carte de référence rapide. [16]
- Documentation Cd de Waters Xevo TQD. [17]
- Préparation des échantillons de test XevoTQD. [18]
- Préparation de l'échantillon de 17-a-hydroxyprogestérone. [19]
- Ensemble d'échantillons Waters Xévo TQD. [20]
- Kit de solutions d'essai OQ / PQ de Waters ACQUITY UPLC:
 - pour les cellules d'écoulement de 10 mm. [21]
 - pour les cellules d'écoulement de 25 mm. [22]

5- Méthodes

5-1- Etapes de Pré-qualification de la chaîne UPLC MS/MS

Avant d'entamer la qualification de la chaîne UPLC MS/MS, il faut :

- Avoir un certificat de qualification de la personne compliance spécialiste responsable de cette action. qualification, délivré par la société waters ;
- procéder à l'installation de l'équipement en vérifiant les connexions électriques ;
- procéder au rinçage de l'équipement de la chaîne UPLC MS/MS pour éliminer toute sorte d'impuretés. Le nettoyage se fait avec des solvants acidifiés afin de diluer les impuretés. Obtention d'un seul pic signifie que tous les compartiments de l'équipement sont bien propres. Le solvant de rinçage est constitué de :
 - ✓ 25ml d'eau ;
 - ✓ 25ml de méthanol ;
 - ✓ 25ml d'acétonitrile ;
 - ✓ 25ml d'isopropan-2-ol ;
 - ✓ 10ml d'acide formique ;
- Pour avoir de bons résultats lors du nettoyage, il faut :
 - ✓ Utiliser de bons solvants à pouvoir solubilisant rapide ;

- ✓ Utiliser des solvants de bonne qualité de grade LC/MS ;
- ✓ Ne pas utiliser de tensioactif ;
- ✓ Ne pas utiliser de para film, il faut utiliser du papier aluminium ;
- ✓ Bien nettoyer la verrerie, il faut que le dernier rinçage soit avec le solvant de dilution, après le séchage elle doit être couverte avec du papier aluminium ;
- ✓ Utiliser une bonne qualité d'eau « eau ultra pure » et ne pas la stocker trop longtemps.

5-2- Qualification de la chaîne UPLC MS/MS

Le but de la qualification est de vérifier que l'équipement est conforme aux spécifications arrêtées dans le cahier des charges. Une qualification conforme signifie que l'équipement peut être exploité pour des essais routines avec sécurité.

Le protocole de la qualification a été réalisé par le fournisseur selon une procédure standard décrite dans la documentation présentée ci-dessus.

Ces protocoles ont été préalablement validés par le service contrôle qualité du fournisseur suivant des normes internationales (CFR21, norme ISO...etc.)

5-2-1- Qualification d'installation QI

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

- Qualification du logiciel Masslynx et Qualification de spectromètre de masse Xévo TQD.

5-2-1-1- Qualification du logiciel Masslynx

- identification des différents composants du PC (micro-ordinateur reliant la partie informatique à l'UPLC et au spectromètre de masse Xévo TQD),
- vérification de l'installation des logiciels (Masslynx, Targetlynx, SCN918), C'est-à-dire la connexion du logiciel avec les différents modules de la chaîne UPLC MS/MS,
- configuration de l'ensemble des modules du PC et les périphériques, lors de l'installation du logiciel.

5-2-1-2- Qualification de spectromètre de masse Xévo TQD

Pour effectuer les procédures de qualification d'installation sur l'instrument, une check-list doit être renseignée, la check-list est présentée dans la partie résultats.

- Une fois la check liste est renseignée et que tous les conditions seront conformes aux normes, cette étape sera validée, le responsable de la qualification passe à la qualification opérationnelle.

5-2-2- Qualification opérationnelle

La qualification opérationnelle consiste aussi à la qualification des deux parties nommées : qualification du logiciel Masslynx® et la qualification de spectromètre de masse Xevo TQD.

5-2-2-1- Qualification du logiciel Masslynx®

- vérifier que le logiciel fonctionne toujours de façon satisfaisante et correcte,
- s'assurer aussi qu'il est connecté à la chaîne et donne de bons résultats (peut faire l'impression; faire des rapports ; lire des résultats ; ouvrir des fichiers...etc).

5-2-2-2- Qualification de spectromètre de masse Xevo TQD

- rétablir les paramètres par défaut de Targetlynx® pour établir un point de départ connu pour la qualification opérationnelle.
- pour réaliser la qualification opérationnelle de spectromètre de masse Xevo TQD, on injecte une solution Set Up prête à l'utilisation (à infuser dans le Xevo TQD) pour faire le test de résolution FWHH qui est la largeur à mi-hauteur (width at half height).
- la solution Set up vérifie trois points essentiels de la QO:

a- Vérification de l'intervalle de masse et résolution Set up-MS1 : on a un intervalle de masse de [50-2500] m/z.

La résolution se base sur la vérification de la largeur à mi-hauteur de cinq molécules de différents rapports masse /charge : 59.05 /175.13 /455.29 /1080.80 /2034.63. Cette largeur à mi-hauteur doit être entre 0.4 Da et 0.6 Da.

b- Vérification de la masse nominale (masse scale): elle se fait sur les cinq molécules précédentes dont le rapport m/z ne doit pas dépassé l'intervalle de ± 0.5 par rapport à la masse théorique.

- Ces tests de résolution et de la masse scale se font sur les deux quadripôles (MS1 et MS2).

c- Vérification de l'intervalle de masse et résolution set up-MS2

- on refait les mêmes tests de résolution et de la masse scale sur le deuxième quadripôle MS2.

d- Vérification de haute résolution de masse

- Cette vérification s'effectue sur les deux quadripôles MS1 et MS2 en mode d'ionisation positif en vérifiant la haute résolution de masse entre les pics dont la valeur du rapport m/z est de 2034.63 et 2035.63 (deux premiers pics) et les comparer aux normes (il doit être $\leq 12\%$).
- Une fois la résolution est vérifiée (résolution check), on entame la calibration en mode positif du spectromètre de masse Xevo TQD

e- Test de calibration

Le test de la calibration du spectromètre de masse Xevo TQD se fait à l'aide d'une solution d'iodure de césium par infusion directe au niveau du spectromètre de masse.

- après avoir infusé la solution, on règle les paramètres de la calibration automatiquement à l'aide du logiciel Masslynx® en cochant sur :
 - le type de la résolution (selon le choix : résolution à mi-hauteur),
 - la vitesse de calibration (par default : de 100 à 1000)
 - le nom du fichier de référence de mode
 - Ion positif → Naics
 - Ion négatif → Naing
- Les résultats du test de la calibration s'affichent automatiquement sous forme de deux représentations graphiques de pics de masses de la solution test et de pics des références théoriques.
- ✚ Après calibration du spectromètre de masse Xévo TQD, on passe à la dernière étape de qualification qui est la vérification des performances de la chaîne UPLC MS/MS.

5-2-3- Qualification de performance de la chaîne UPLC MS-MS

La qualification des performances permet de statuer sur l'état de la machine: sensible, précise, linéaire, si les gradients, les débits sont bons...etc.

Pour vérifier les points cités, ci-dessus, nous avons besoin de préparer des solutions tests.

5-2-3-1- Préparation des solutions**a- Préparation du diluant :**

Le diluant est composé d'acétonitrile / eau (10 % / 90%) + 0.01 % d'acide formique

b- Préparation des échantillons « solutions tests »

1. Préparation de la Solution de réglage (tuning solution)

- S1- Solution de stock : composé de
 - 20 ng/μl d'acétaminophen,
 - 20 ng/μl de cafeine,
 - 10 ng/μl de sulfadiméthoxine,
 - 5 ng/μl vérapamil,
 - 5 ng/μl chloramphenicol,
 - 500 ng /μl 17-α-Hydroxy-progesterone.
- S2 - Solution de réglage : Dilution 1/100 de la solution stock Xévo TQD

2. Préparation de la solution analytique de sulfadiméthoxine

La série de préparation des solutions tests (Xévo TQD stock solution sulfadiméthoxine dilué en eau ultra pure) est présentée dans la figure suivante (Fig 07)

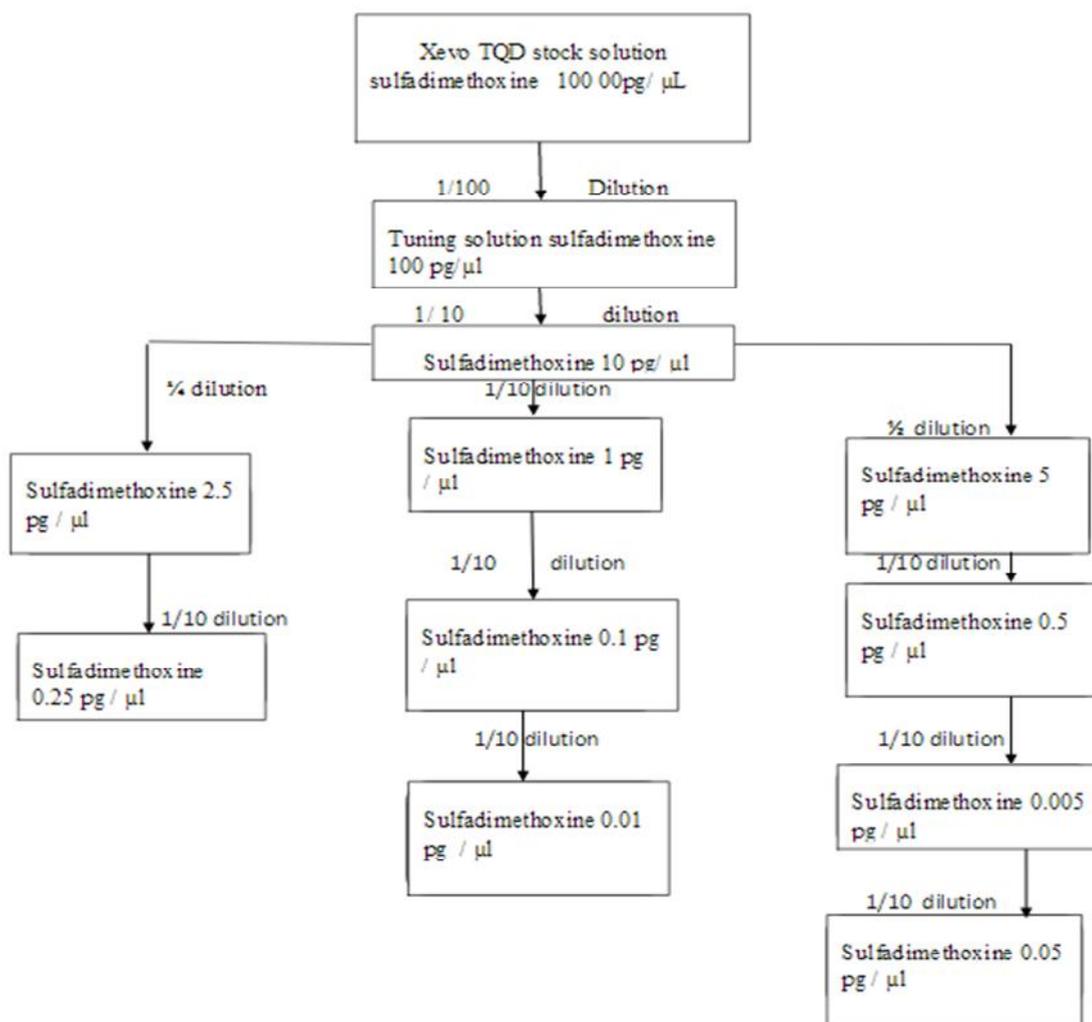


Fig 07. Schéma des différentes dilutions effectuées sur le sulfadiméthoxine (solutions tests)

3. Préparation de l'échantillon de mélange de test gradient

La préparation de l'échantillon de mélange utilisé pour le test de gradient est donnée dans le tableau suivant :

Tableau N° 04. Préparation de l'échantillon pour le test gradient.

Solution	Description	Étiquette du flacon
Solution stock de gradient	Mélange de 900µl de diluant avec 100µl de tuning solution	G1
Echantillon pour test gradient	Mélange de 900µl de diluant Avec 100µl de la solution G1	Gradient

4. Préparation de l'échantillon de sensibilité et de précision

La préparation des échantillons utilisés pour les tests de sensibilité et précision est introduite dans le tableau suivant :

Tableau N° 05. Préparation de l'échantillon de sensibilité et de précision

Solution	Description	Étiquette du flacon
Solution stock de sensibilité et de précision	Mélange de 900µl de diluant Avec 100µl de tuning solution	S1
Solution d'échantillon de sensibilité et de précision	Mélange de 900µl de diluant Avec 100µl de la solution S1	Sensibilité

5. Préparation de l'échantillon de dosage des traces résiduelles d'injecteur

(Carryover challenge)

La préparation de l'échantillon utilisé pour le dosage des traces résiduelles d'injecteur sont introduit dans le tableau suivant :

Tableau N° 06.Préparation de l'échantillon pour le dosage des traces résiduelles d'injecteur

Solution	Description
Carryover challenge	Mélange de 5mg de sulfadiméthoxine avec 50 µl de méthanol dans un flacon de 2 ml.
Echantillon de Carryover challenge d'injecteur	Ajout de 1000µl de l'acétonitrile à la solution de carryover challenge.

6- Préparation des solutions de la phase mobile

La préparation des solutions placées dans la phase mobile sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau N°07.Préparation des solutions de la phase mobile

Solution	Description	Etiquetage
Phase mobile et solvant de nettoyage	Mélange de 1000ml d'eau ultra pure + 100 µl d'acide formique+500 µl d'ammoniac	H ₂ O+0.01% AF+0.05% NH ₄
Phase mobile organique	Mélange de 500 ml d'acétonitrile + 50 µl d'acide formique	Acétonitrile +0.01% AF

5-2-3-2- Tests de qualification de performance

a) Test de débit

Injecter 10 ml d'acétonitrile pour tester le débit.les calculs se fait automatiquement à l'aide du logiciel Masslynx®; La valeur doit être comprise entre 0.494 et 0.506 ml/min

b) Vérification de la température de la chambre d'échantillon : la température de la chambre d'échantillon lors de la qualification est arrêtée selon la consigne entre 6°C et 14 °C

c) Vérification de la température de la colonne : la température de la colonne lors de la qualification est arrêtée selon la consigne entre 38°C et 42 °C

d) Test préliminaire d'injection MS : ce test consiste à :

- injecter une solution concentrée d'un inconnu ;
- spécifications de test :
 - la différence entre les valeurs des temps de rétentions (TR) du pic de plus grande et de plus petite largeur doit être ≤ 0.070 min
 - la répétabilité en surface de pic doit être $\leq 3\%$
 - la valeur de répétabilité en hauteur du pic le plus grand doit être $\leq 4.5\%$
 - **La répétabilité = $SD \times 100 / M$, dont :**

✓ SD : standard déviation déterminé automatiquement

✓ M : Moyenne des valeurs trouvées dans les différents tests

e) Test de sensibilité de la source d'ionisation ESI

La machine travail selon deux modes d'ionisation positif et négatif

➤ **Test de sensibilité en mode positif**

La molécule utilisée est le sulfadiméthoxine, il faut faire six injections de 10pg de cette solution dans le système UPLC, on doit obtenir la moyenne des rapports signal/bruit des 6 injections supérieure ou égale à 2500 points.

➤ **Test de sensibilité en mode négatif**

La molécule utilisée est le chloramphénicol, il faut faire six injections de 5pg dans le système LC, on doit obtenir la moyenne des rapports signal/bruit supérieure ou égale à 200 points.

Dans notre cas, le test de répétabilité a été effectué sur le mode positif donnant de bons résultats et il sera automatiquement conforme en mode négatif

f) Test de précision

- La molécule utilisée est le sulfadiméthoxine, il s'agit de faire six injections de 10pg dans le système UPLC,
- différence entre la plus grande et la plus petite valeur de temps de rétention (TR) des pics doit être ≤ 0.047 min,
- répétabilité en surface à 3 % sur 6 injections,
- répétabilité en hauteur < à 4.5% sur les 6 injections.

g) Test de précision et de linéarité de l'injecteur

- prendre une solution concentrée puis injecter des volumes différents (2 μ l, 3 μ l, 5 μ l,) pour dire si l'injecteur injecte des volumes bien précis, cela est vérifié avec l'obtention d'une courbe linéaire avec un $R^2 \geq 0.990$.

h) Test de la linéarité de détecteur MS

- faire des dilutions successives de la solution concentrée de l'inconnue puis injecter des volumes qui varient entre 0.05 pg à 100 pg,
- vérifier sur le logiciel les valeurs de la linéarité de surface/ et de hauteur du détecteur MS, le (R^2) doit être ≥ 0.990 .

i) Test de la linéarité du débit

- injecter une solution de sulfadiméthoxine à des différents débits 0.2; 0.3; 0.4; 0.5ml/min,
- vérifier la valeur de la répétabilité des quatre volumes de la solution ; la valeur doit être $\leq 60 \mu$ l.

j) Test de dosage des traces résiduelles (carryover)

- injecter une solution très concentrée de sulfadiméthoxine,
- rinçage du système d'injection,
- injection d'un blanc,
- lorsqu'on injecte le blanc il ne faut pas que les traces de la solution concentrée dépassent les 0.005%,

k) Test de gradient

- le test a été effectué sur les deux gradients (A, B) et (C, D),
- le Principe est de calculer la différence des temps de rétention entre le pic de plus grande et de plus petite largeur pour chaque composé de la solution gradient,
- la différence entre les deux valeurs RT doit être ≤ 0.047 min.

Chapitre IV

Partie expérimentale 2

Interprétation des résultats

1- Résultats de la qualification d'installation

1.1. Résultats des conditions d'installation, sont donnés dans le tableau N°07.

Tableau N°08. Résultat de la qualification d'installation de la chaîne UPLC MS-MS.

✓ Confirmer que tous les matériaux requis pour l'installation sont présents	oui
✓ Vérifier que l'emplacement final du spectromètre de masse Xevo TQD répond aux conditions environnementales spécifique : <ul style="list-style-type: none"> - Température de la salle entre 18°C et 22°C - Humidité doit être supérieure à 80% - Absence de toute sorte de vibrations 	oui
✓ Vérifier le raccordement des fils, des câbles et des tuyaux.	oui
✓ S'assurer que tous les échantillons de test sont disponibles.	
✓ S'assurer que les solvants appropriés pour la préparation et l'installation des échantillons sont disponibles.	oui
✓ Confirmer que l'instrument et la pompe rotative / scroll sont connectés à l'alimentation du laboratoire.	oui
✓ Assembler la bouteille d'échappement, puis la connecter à la ligne d'échappement source.	oui
✓ relier la conduite de déchets liquides à un conteneur de déchets appropriés.	oui
✓ placer le tube de ligne de lavage fluide dans une bouteille de réservoir qui contient 70:30 d'acétonitrile / eau	oui
✓ s'assurer que le générateur d'azote est installé et fonctionne	oui
✓ compléter et renvoyer les formulaires requis au fabricant du générateur d'azote.	
✓ Raccorder la ligne d'alimentation en azote et filtrer à l'installation.	oui
✓ Régler le régulateur de pression de l'alimentation en argon à 50 Kpa (0,5 bar, 7 psi), en veillant à ce qu'il n'y ait pas de fuite. Vérifier la pression de l'argon.	oui
✓ Pression d'argon = 0.5 psi dont la pureté de l'argon doit être supérieure à 99,997%	
✓ Régler le régulateur de pression de l'alimentation en azote à 100 Kpa (6 à 7 bar, 90 à 100 psi).	oui
Remarque : Lors de l'utilisation d'une source APGC, l'azote purifié doit être supérieur à 99.999%. Pression d'azote = 7 bar	
✓ Vérifier que la pression de la cellule de collision avec l'alimentation en gaz allumée soit comprise entre 3,5 e ⁻³ 4,0 e ⁻³ , Pression de la cellule de collision (mbar)= 3.90 e ⁻³	oui

1.2. Résultats de Qualification du Logiciel

Les opérations relative à la vérification de la connexion du PC (Masslynx®) à tous les modules de la chaîne UPLC MS-MS est complète et l'équipement dit bien installées selon les conditions d'installation.

Les conditions d'installation de la chaîne UPLC MS/MS ont été bien respectées par le centre de bioéquivalence, y compris la pression d'azote et d'argon et la cellule de collision sont conformes aux normes. La qualification d'installation de la chaîne UPLC MS-MS est exacte et complète, d'où le recours à l'étape suivante : QO.

2- Résultats de la qualification opérationnelle

2.1. Résultats de vérification de l'intervalle de masse et la résolution set up- MS1 et MS2

- Les résultats obtenus lors de la Vérification de l'intervalle de masse et la résolution set up- MS1 et MS2 sont :

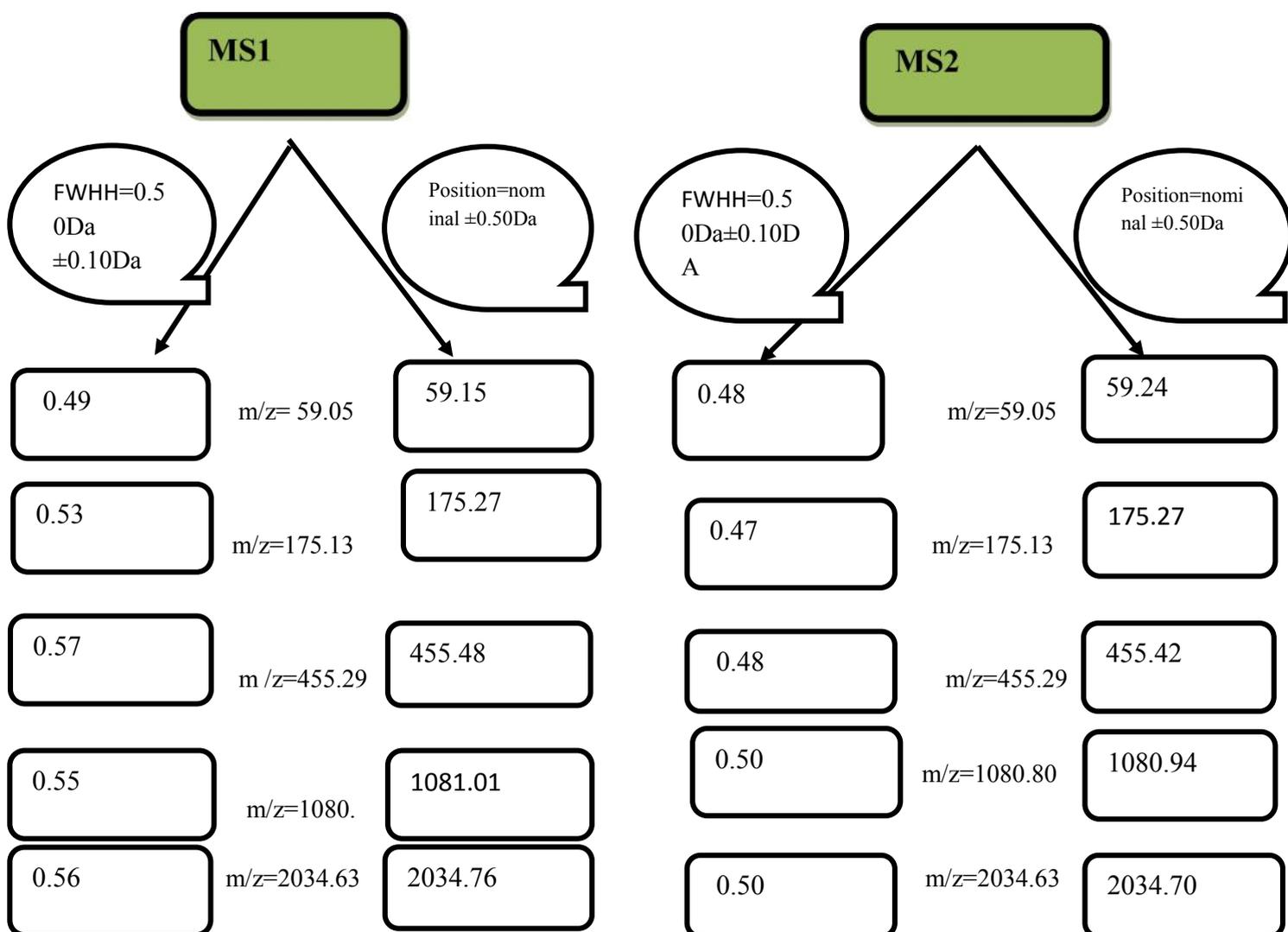


Fig 08. Schéma des résultats de la vérification de l'intervalle de masse et de la résolution sur les deux quadripôles

Les valeurs de résolution et de position pour chaque molécule des cinq masses choisies de la solution Set up infusée ; comparant aux normes sont conformes : masse nominale ± 0.05 Da, résolution 0.5 ± 0.1 Da.

2.2. Résultats de vérification de la haute résolution de masse

Les résultats de la haute résolution de masse sur les deux quadripôles est présentés dans le schéma ci-dessous :

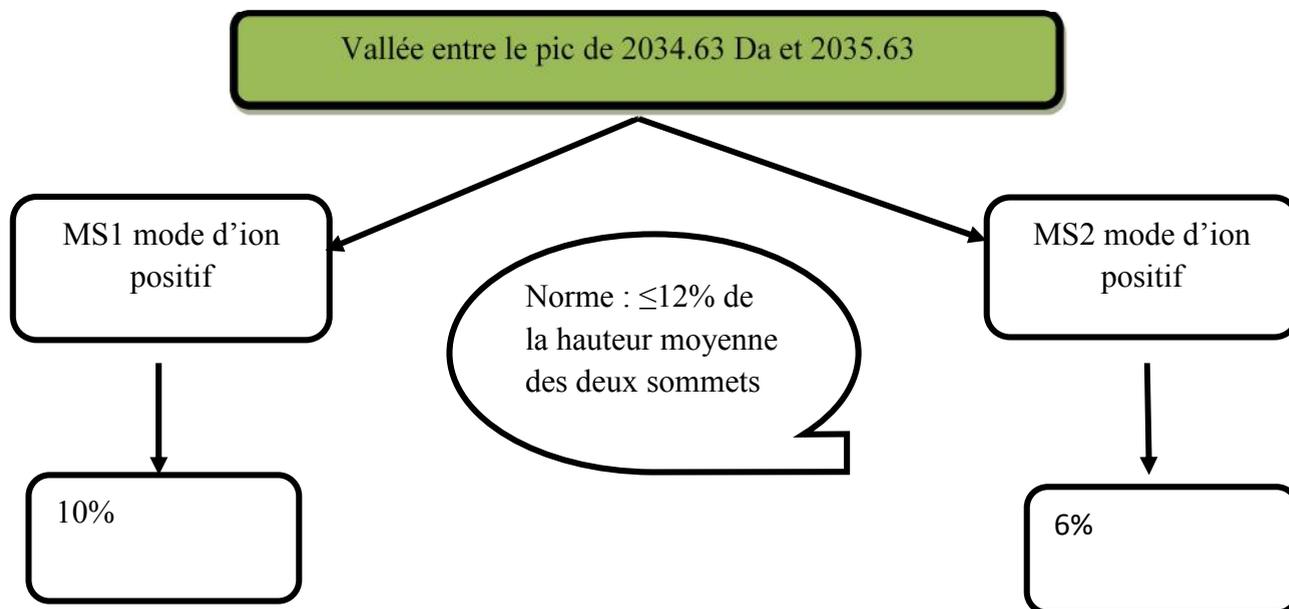


Fig 09. Schéma des résultats de la haute résolution de masse.

La hauteur moyenne des deux sommets entre le pic 2034.63 et 2035.63 sur les deux quadripôles MS1 et MS2 répond à la norme $\leq 12\%$.

De se fait les paramètres opérationnels de la chaine UPLC MS-MS sont conformes et l'équipement est dit qualifié sur plan QO.

Un passage à la qualification des performances est autorisé.

3- Résultats de la qualification de performance

3.1. Test de débit, température de la chambre d'échantillons et température de la colonne

Les résultats des tests de débit et de température sont introduit dans le tableau N°09 :

Chapitre IV : Partie expérimentale 2 : Interprétation des résultats

Tableau N°09. Résultats des tests de débit, températures.

Test de débit	Température de la chambre d'échantillons	Température de la colonne
-Durée écoulée de la pompe(s) = 19 48 -Pression du système de pompage (Kpa, bar, psi) = 3500 -Débit calculé de la pompe = 0.505	Température de la consigne = 10°C Température observé= 10.35°C	Température de la consigne = 40°C Température observé=39.5°C
Norme : [0.494 et 0.506] ml/min	10°C ± 4°C	40°C ± 2°C

- La valeur de débit de la pompe calculé est dans l'intervalle de la norme arrêtée [0.494 et 0.506] ml/min.
- Les températures de la chambre d'échantillon (10.35°C) et de la colonne (39.5°C) répondent aux normes de température fixées au préalable [10°C ± 4°C] et [40°C ± 2°C] respectivement

3.2. Test préliminaire d'injection MS

Les résultats obtenus lors du test préliminaire (RT, Surface des pics, Hauteur des pics) sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau N°10. Résultats des tests préliminaires d'injection.

Temps de rétention (min) RT	Surface des pics	Hauteur des pics
- Injection de test 1 -RT : 1.244 - Injection de test 2- RT : 1.244 - Injection de test 3- RT : 1.244	-injection de test 1, surface : 25137 - injection de test 2, surface : 25968 -injection de test 3, surface : 26283	injection de test 1, hauteur : 1062200 - injection de test 2, hauteur : 1091193 -injection de test 3, hauteur : 1099890
Norme : différence entre TR max et TR min ≤ 0.070min	Norme : répétabilité en surface ≤ 3 %	Norme : répétabilité en hauteur ≤ 4.5 %

- la différence des RT = 0, donc la RT des pics est dans les normes ≤ 0.070 min,
- la répétabilité en surface du pic calculé sur Mass lynx = 1.8 % ; donc elle est dans les normes car la répétabilité en surface doit être $\leq 3\%$,
- La répétabilité en hauteur de pic calculé sur Mass lynx =1.5 % ; donc elle est dans les normes car la répétabilité en hauteur doit être $\leq 4.5\%$.

3.3. Test de sensibilité en mode positif et négative

Les résultats obtenus lors de tests de sensibilité en mode ESI positif et négatif sont données dans tableau N°11

Tableau N°11. Résultats des tests de sensibilité (en mode positif et négative).

Sensibilité en mode ESI négative	Sensibilité en mode ESI positif
Pic 1 : rapport Signal/bruit de fond = 260	Pic 1 : rapport Signal/bruit de fond = 16133
Pic 2 : rapport Signal/bruit de fond = 224	Pic 2 : rapport Signal/bruit de fond = 18261
Pic 3 : rapport Signal/bruit de fond =300	Pic 3 : rapport Signal/bruit de fond =17988
Pic 4 : rapport Signal/bruit de fond =285	Pic 4 : rapport Signal/bruit de fond =17431
Pic 5 : rapport Signal/bruit de fond =302	Pic 5 : rapport Signal/bruit de fond =20980
Pic 6 : rapport Signal/bruit de fond =257	Pic 6 : rapport Signal/bruit de fond = 17626
Moyenne =271	Moyenne = 18063
Norme : Moyenne ≥ 200	Norme : Moyenne ≥ 2500

- Pour la sensibilité en mode ESI négatif la valeur moyenne du rapport signal / bruit de fond des six injections est > 200 , donc les résultats sont dans les normes.
- Pour la sensibilité en mode ESI positif la valeur moyenne du rapport signal / bruit de fond des six injections est > 2500 , donc les résultats sont dans les normes.

3.4. Test de precision

Les résultats de test de précision (RT, Surface des pics, Hauteur des pics) sont introduits dans le tableau ci-dessous:

Tableau N°12.Résultats du test de précision.

Temps de rétention RT	Surface des pics	Hauteur des pics
- Injection de test 1 RT : 1,246	-injection de test 1, surface : 18490	-injection de test 1, hauteur : 1089915
- Injection de test 2 RT : 1,246	- injection de test 2, surface : 18348	- injection de test 2, hauteur : 1082730
- Injection de test 3 RT : 1,246	-injection de test 3, surface : 18539	-injection de test 3, hauteur : 1112106
- Injection de test 4 RT : 1,246	-injection de test 4, surface : 14110	-injection de test 4, hauteur : 112047
- Injection de test 5 RT : 1,246	- injection de test 5, surface : 18875	- injection de test 5, hauteur : 1111191
- Injection de test 6 RT : 1,246	-injection de test 6, surface : 17967	-injection de test 6, hauteur : 1057552
-Valeur RT de pic de plus grande largeur : 1,246		
-Valeur RT de pic de plus petite largeur : 1,246		
Norme : ≤ 0.047 min	Norme : répétabilité en surface $\leq 3\%$	Norme : répétabilité en hauteur $\leq 4.5\%$

- La différence entre la valeur RT de pic de plus grande et de plus petite largeur est < 0.047 min,
- La valeur de répétabilité calculée à l'aide de logiciel Mass lynx pour la surface et la hauteur des pics est égale à 2.2 % dont les normes sont respectivement 3% et 4.5 %, ce qui revient à dire que les résultats sont bons.

3.5. Tests de linéarité

3.5.1. Test de linéarité de l'injecteur

Les résultats des tests effectués sur la linéarité de l'injecteur sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau N°13.Résultats de tests de linéarité d'injecteur

	Nom	Exemple de texte	RT	Surface	Hauteur
1	Linéarité d'injecteur _01	Sulfadiméthoxine 2.0pg en colonne	1.25	5151	271176
2	Linéarité d'injecteur _02	Sulfadiméthoxine 3.0pg en colonne	1.24	8150	447787
3	Linéarité d'injecteur _03	Sulfadiméthoxine 5.0pg en colonne	1.24	12981	732999
4	Linéarité d'injecteur _04	Sulfadiméthoxine 8.0pg en colonne	1.24	15165	859455

Chapitre IV : Partie expérimentale 2 : Interprétation des résultats

3.5.2. Test de linéarité de débit, linéarité de détecteur MS, linéarité et précision de l'injecteur.

Les résultats obtenus lors de test de linéarité du débit, linéarité de détecteur, linéarité de précision de l'injecteur sont données dans le tableau suivant :

Tableau N°14. Résultats des tests de linéarité du débit, de détecteur et d'injecteur.

Linéarité et précision de l'injecteur	Linéarité de détecteur MS	Linéarité de débit
-Valeur linéarité de l'injecteur en surface $R^2=0.998$	-Valeur de linéarité du détecteur MS en surface $R^2=0.999$ -Valeur de linéarité du détecteur MS en hauteur $R^2=0.999$	-Linéarité de débit de 1 pic RT = 1.80 - Linéarité de débit de 2 pic RT=1.20 -Linéarité de débit de 3 pic RT=0.90 -Linéarité de débit de 4 pic RT=0.72 -Linéarité de débit 1 RT $\times 200 = 360$ -Linéarité de débit 2 RT $\times 300 = 360$ -Linéarité de débit de 3 RT $\times 400 = 360$ -Linéarité de débit 4 RT $\times 500 = 360$
Norme : ≥ 0.990	Norme : ≥ 0.990	Norme : Répétabilité $\leq 60 \mu\text{l}$

La performance de la chaîne UPLC MS/MS en linéarité (de l'injection, de détection et de débit) a été vérifiée et les résultats sont conformes par rapport aux normes déclarées.

3.6. Test de dosage des traces résiduelles (carryover)

Le % de la solution concentré après l'injection du blanc = 0.000%, dont la Norme : $\leq 0.005\%$.

La chaîne UPLC MS/MS assure un bon rinçage après les injections, donc aucunes traces des résidus ne sont détectables après une nouvelle injection. De ce fait, l'UPLC MS-MS est très sensible assurant un recouvrement des résultats.

3.7. Test de gradient

Les résultats de tests effectués sur les deux gradients AB, et CD sont présentées dans le tableau N°15

Chapitre IV : Partie expérimentale 2 : Interprétation des résultats

Tableau 15. Résultats des tests sur les deux gradients (A,B) et (C,D).

Pics des solutions	Gradient A, B	Gradient C, D
-le RT du pic le plus large de l'acetaminophen.	0.310	0.316
-le RT du pic de plus petite largeur de l'acetaminophen.	0.310	0.310
-différence entre les deux valeurs	0.000	0.006
-le RT du pic le plus large de la cafeine	0.497	0.519
-le RT du pic de plus petite largeur de la cafeine	0.495	0.495
-différence entre les deux valeurs	0.002	0.009
-le RT du pic le plus large de sulfadiméthoxine	1.156	1.163
-le RT du pic de plus petite largeur de sulfadiméthoxine	1.156	1.57
-différence entre les deux valeurs	0.000	0.006
-le RT du pic le plus large de la reserpine	1.423	1.429
-le RT du pic de plus petite largeur de la reserpine	1.423	1.425
-différence entre les deux valeurs	0.000	0.004
Norme	≤ 0.047 min	≤ 0.047 min

Les résultats obtenus lors de la vérification des deux system binaires A, B et C, D (en mode gradient) sont déclarées conformes par rapport aux normes délivrées par le fournisseur.

Conclusion générale

Conclusion générale

Aujourd'hui, la technologie UPLC créant de nouvelles opportunités de rentabilité et apportant un nouveau sens au mot « qualité » dans les laboratoires analytiques.

Au cours de cette étude consacrée à la qualification d'une chaîne UPLC MS/MS au niveau du centre de bioéquivalence du groupe saidal situé à l'Hussein Dey d'Alger, les résultats de cette dernière nous ont permis de tirer les conclusions suivantes :

- la chaîne UPLC MS/MS a été bien installée selon des conditions environnementales convenables,
- Le logiciel Masslynx® 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 Mass lynx® a donné des résultats satisfaisants (corrects et bien précis).

Compte tenu des résultats des tests de résolution, calibration, et positionnement des pics, précision, sensibilité, bon rinçage après les injections, linéarité du débit, linéarité de l'injecteur et linéarité de détecteur,...etc obtenus lors de la qualification de la chaîne UPLC MS/MS, ce dernier est déclaré conforme et qualifié en QI QO QP pendant une 1 année (périodicité de requalification).

De plus, nous tirons une conclusion importante que l'ensemble des articles de laboratoire du centre de bioéquivalence à savoir ; les réactifs, la verrerie, les micropipettes sont de très haute qualité.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] waters corporation avril 2011, numéro d'article 720003267 FR A4 LB-CP, Aquity UPLC family of chromatographie instruments.
- [2] file:///C:/Users/Tristar/Desktop/UPLC%20%E2%80%94%20Wikip%C3%A9dia.htm..
- [3]file:///C:/Users/Tristar/Desktop/Syst%C3%A8me%20ACQUITY%20UPLC%20%20%20 Waters.htm.
- [4]file:///C:/Users/Tristar/Desktop/Syst%C3%A8me%20ACQUITY%20UPLC%20H-Class%20%20%20Waters.htm..
- [5] Ali Ladram, Gilles Camus, Planet-Vie, Mardi 15 mai 2012, <https://planetvie.ens.fr/content/la-chromatographie>.
- [6] Lawson, G.; Todd, J.F.J ; Bonner R.F., Dyn. Mass Spectrom. 1975.
- [7] Dr. CHANE MING Jimmy /Dr. CESARI Maya / Mr. MERIAU Christian.25 Juin 2009. La Liquide Chromatographie couplée à la Spectrométrie de Masse (LC-MS/MS), un outil idéal pour l'accompagnement au développement économique. Plateforme de l'unité analytique. G.I.P. CYROI.
- [8] Mounia Alian, controle des conditions expérimentales ;qualité des résultats polyvalence des instruments, octobre 2010
- [9] Pdf, cours de masse : la spectrométrie de masse appliqué a l'étude de biomolécules.
- [10]Nicolas Fourrier Application of LC-MS/MS for the Analysis of Biomolecular Drugs and Biomarkers in Pharmaceutical Development, 14 mars 2016
- [11] CLAIRE EMAILLE thèse ; Qualification d'une ligne de conditionnement, soutenue publiquement le 28mars 2003.
- [12] Docteur touzouirt, cours de master 1, module d'équipement, 2016
- [13] Qualification des instruments de laboratoire Journées Qualité et Chimie 2010
- [14] Waters corporation, Masslynx 4.1 Guide de démarrage, numéro d'article 71500113203
- [15] Waters corporation, Carte de référence rapide Waters Xevo TQD MS, numéro d'article, 715002946

Références bibliographiques

[16] Waters corporation, Waters Xevo TQD Documentation Cd, numéro d'article, 715002944

[17] Waters corporation, Préparation des échantillons d'essai XevoTQD, numéro d'article, 715003204

[18] Waters corporation, Préparation de l'échantillon de 17- α -hydroxyprogestérone, numéro d'article, 715001233

[19] Waters corporation, Waters Xévo TQD Sample kit, numéro d'article, 700006006

[20] 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.