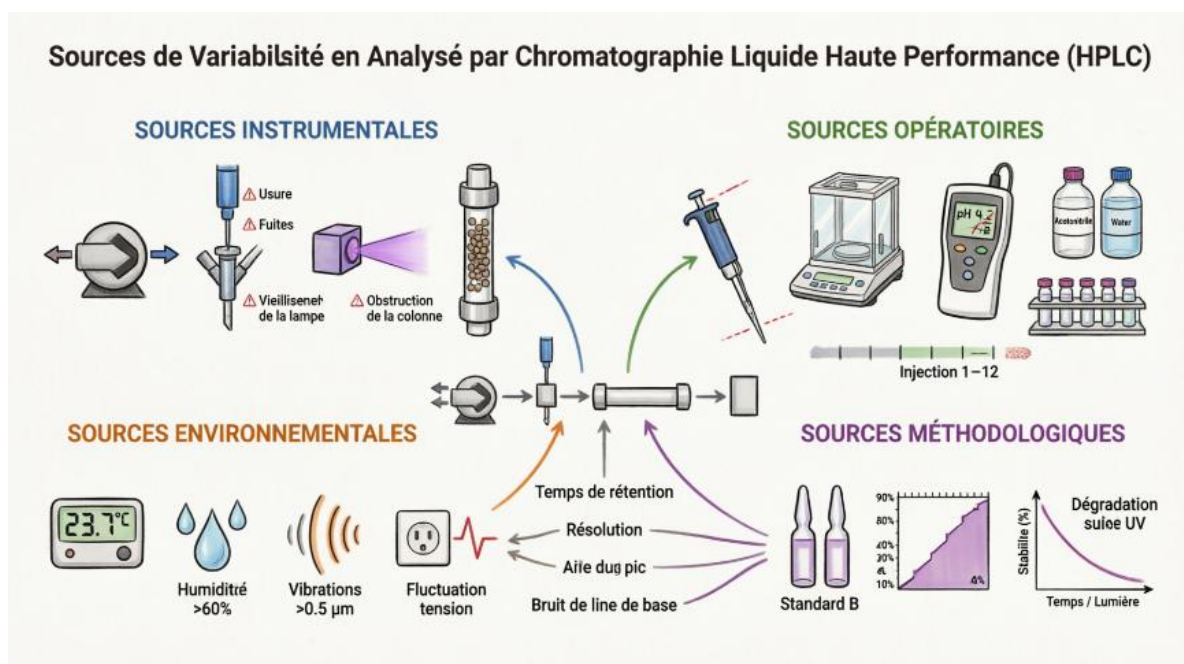


1.4. Les sources de variabilité : d'où viennent les écarts ?

Imaginez votre chromatogramme comme la photographie finale d'un orchestre complexe où chaque instrument – pompe, colonne, détecteur, opérateur – joue sa partition avec plus ou moins de justesse. Un léger décalage du débit pompe (0,02 mL/min), une dérive thermique de la colonne (+1°C), une bulle dans la cellule UV, ou simplement une dilution légèrement imprécise par l'opérateur suffisent à transformer un **RSD de 0,5% en 2,1%**, faisant passer votre méthode de **validée ICH Q2 à OOS critique**. Dans un système HPLC, la variabilité n'est jamais l'œuvre d'un coupable unique : elle résulte de l'interaction dynamique de **quatre grandes familles de causes** – **instrumentale** (35% du bruit : débit pulsé, bruit détecteur), **colonne** (28% : vieillissement silice, colmatage), **opérateur** (20% : pipetage, intégration subjective), et **méthode/environnement** (17% : robustesse pH, température lab) – toutes quantifiables par **Gage R&R Minitab** pour prioriser vos actions correctives. Comprendre cette **chaîne de causalité multifactorielle** n'est pas une curiosité technique : c'est la **clef pour passer d'une méthode "fonctionnelle" à une méthode audit-proof EMA/FDA**.

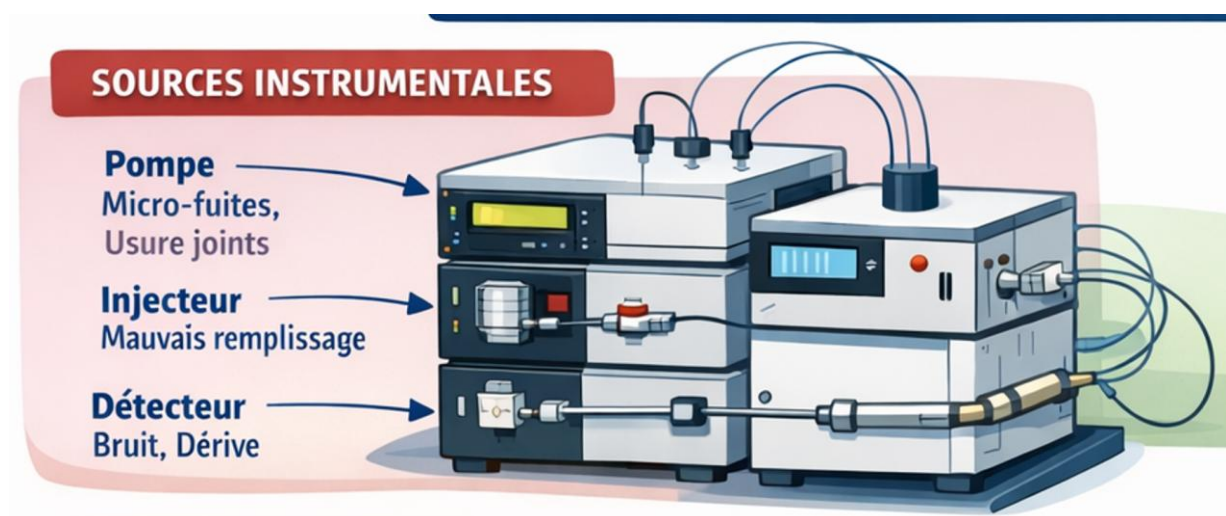
Avant de chercher à contrôler la variabilité, il faut comprendre d'où elle provient. Dans un système HPLC, les sources sont multiples et souvent imbriquées. On peut les classer en quatre grandes catégories.



Les sources instrumentales

Même le meilleur instrument HPLC, fraîchement qualifié IQ/OQ/PQ, n'est pas exempt de variabilité. Les pompes génèrent des pulsations résiduelles, les détecteurs UV fluctuent en intensité, les fours de colonne oscillent légèrement autour de la température cible, les autosamplers introduisent de petites différences dans les volumes injectés. Ces écarts sont souvent faibles, mais dans un système analytique sensible, ils deviennent mesurables. La dérive d'un détecteur, l'usure d'un joint de pompe, un injecteur dont l'étanchéité se dégrade : chacun de ces phénomènes peut, au fil des semaines, influencer la ligne de base, la hauteur des pics ou le temps de rétention. La variabilité instrumentale est donc inévitable, mais parfaitement surveillable grâce aux cartes de contrôle, aux System Suitability Tests (SST) et aux routines de maintenance préventive.

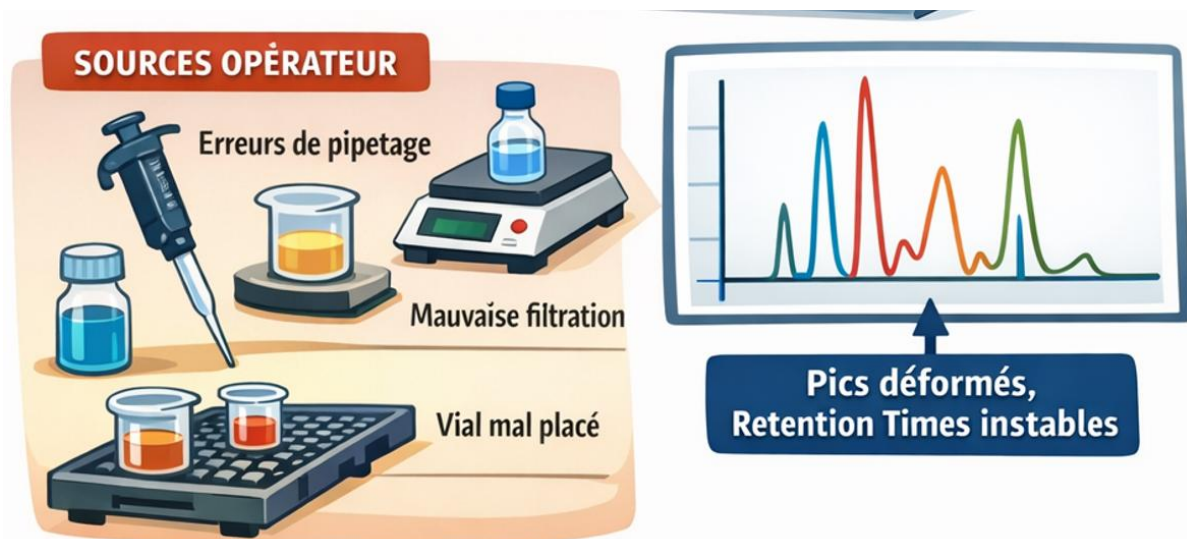
- **La pompe** : elle assure le débit constant de la phase mobile. Une variation de débit modifie les temps de rétention et peut affecter la résolution. Les pompes à pistons présentent naturellement de micro-fluctuations, mais une dérive progressive peut indiquer une usure des joints ou une fuite.
- **L'injecteur** : le volume injecté doit être reproductible. Une variation du volume injecté affecte directement l'aire des pics. Les injecteurs à boucle peuvent présenter des problèmes de remplissage partiel ou de contamination croisée.
- **Le détecteur** : qu'il soit UV, à barrette de diodes ou fluorimétrique, le détecteur est source de bruit et de dérive. Le vieillissement de la lampe diminue l'intensité et augmente le bruit de fond. Une variation de température peut décaler la longueur d'onde.
- **La colonne** : cœur de la séparation, la colonne est aussi le composant le plus sensible. Le vieillissement de la phase stationnaire modifie les temps de rétention et la résolution. Le colmatage partiel augmente la pression et déforme les pics.



Les sources opérateur

Le facteur humain, souvent sous-estimé, contribue lui aussi à la variabilité globale. Deux analystes effectuant la même manipulation peuvent obtenir des résultats légèrement différents en raison de gestes, de rythmes, de manipulations ou d'interprétations distinctes. L'expérience, l'attention et la fatigue jouent un rôle. À cela s'ajoute l'influence de l'environnement : variations de température ambiante, humidité, vibrations, qualité de l'alimentation électrique. Ces éléments sont rarement considérés en premier lieu, mais ils peuvent perturber la stabilité de la ligne de base ou modifier la pression du système.

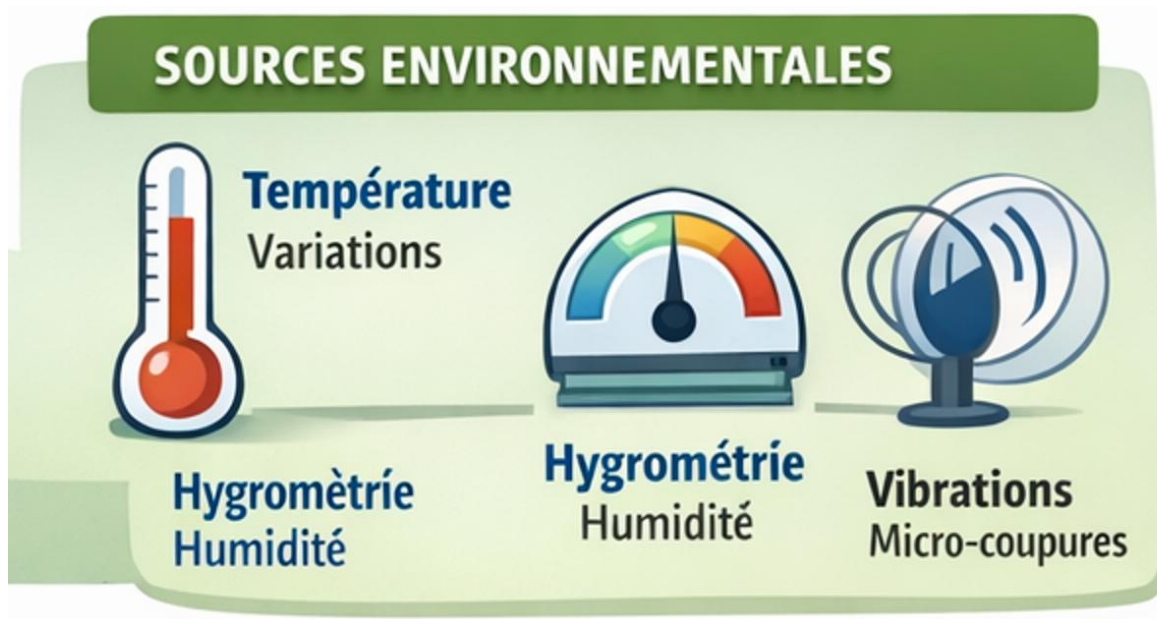
- **Préparation des échantillons** : pesée, dilution, filtration. Une erreur de pipetage, une balance mal tarée, un filtre qui relargue des impuretés : autant de sources de variation.
- **Préparation de la phase mobile** : composition, pH, dégazage. Une variation de pH de 0,1 unité peut modifier drastiquement la séparation de composés ionisables.
- **Placement des vials** : un vial mal positionné peut être mal prélevé par l'autosampler.
- **Séquence d'injection** : l'ordre des échantillons et des standards peut influencer les résultats (effet mémoire, dérive temporelle).
- **Choix des standards** : pureté, stabilité, adéquation à la matrice.
- **Concentrations** : trop faibles, on est proche de la limite de quantification ; trop élevées, on sature le détecteur.
- **Stabilité des solutions** : certains analytes se dégradent dans le solvant ou à la lumière.



Les sources environnementales

- **Température ambiante** : elle affecte la viscosité des solvants, donc les pressions et les temps de rétention. Une variation de quelques degrés peut décaler les pics.
- **Hygrométrie** : pour les phases mobiles aqueuses, l'évaporation peut modifier la composition.

- **Vibrations** : elles peuvent perturber la détection, surtout à haute sensibilité.
- **Alimentation électrique** : des microcoupures ou des variations de tension peuvent affecter l'électronique.



Les sources méthodologiques

- **Choix des standards** : pureté, stabilité, adéquation à la matrice.
- **Concentrations** : trop faibles, on est proche de la limite de quantification ; trop élevées, on sature le détecteur.
- **Stabilité des solutions** : certains analytes se dégradent dans le solvant ou à la lumière.

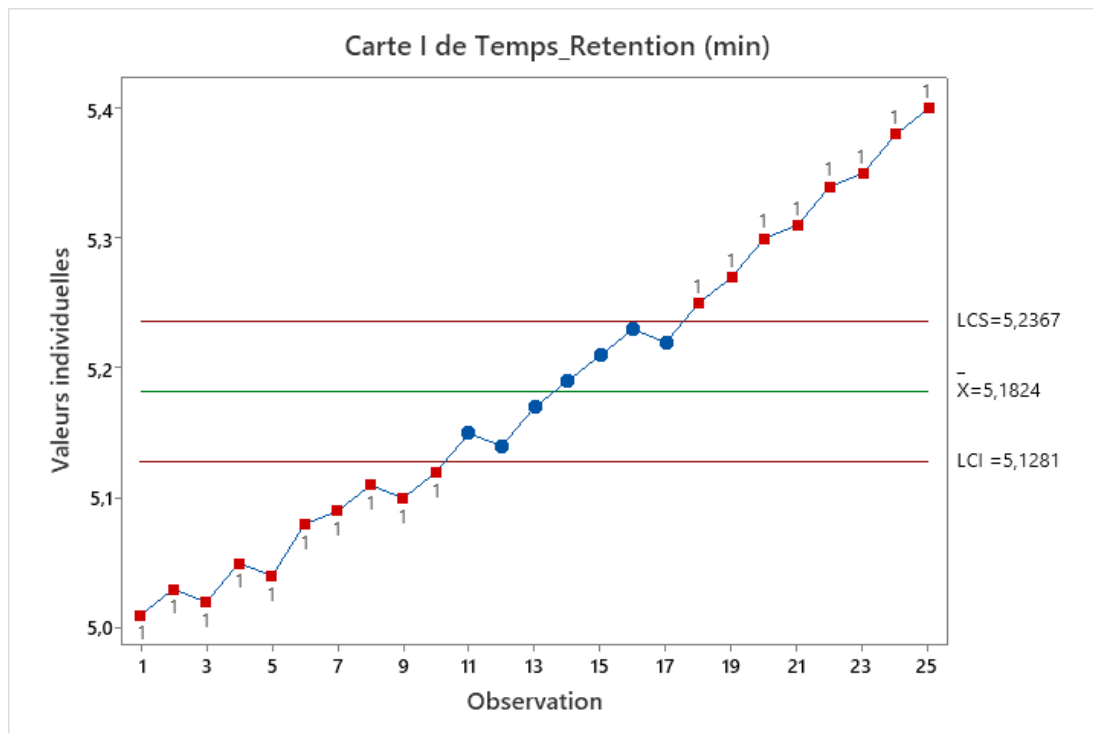


Exemples

Variabilité Instrumentation (Temps de rétention)

Idéal pour : **I-MR Chart**, **Test de dérive**, **Détection de tendance**, **CPV analytique**

Contexte : Analyse du temps de rétention d'un standard injecté 25 fois consécutivement.



Montre une dérive instrumentale graduelle (ex : pompe vieillissante).

1.5. Premiers pas avec Minitab : visualiser pour comprendre

Avant de se lancer dans des calculs complexes, il est essentiel de regarder ses données. Minitab propose des outils graphiques simples mais extrêmement parlants.

Prenons un exemple concret. Un laboratoire suit quotidiennement l'aire du pic d'un standard de contrôle, injecté en début de chaque séquence. Sur 20 jours, les aires relevées (en unités arbitraires) sont :

1542, 1551, 1538, 1545, 1549, 1535, 1547, 1553, 1540, 1544, 1548, 1539, 1546, 1550, 1537, 1543, 1552, 1541, 1547, 1545.

Que nous disent ces chiffres ? La première étape consiste à calculer des statistiques descriptives. Avec Minitab, on utilise le menu **Stat > Statistiques élémentaires > Afficher les statistiques descriptives**.

On obtient : Nombre d'observations : 20

Moyenne : 1544,5

Écart-type : 5,2

Coefficient de variation (RSD) : 0,34 %

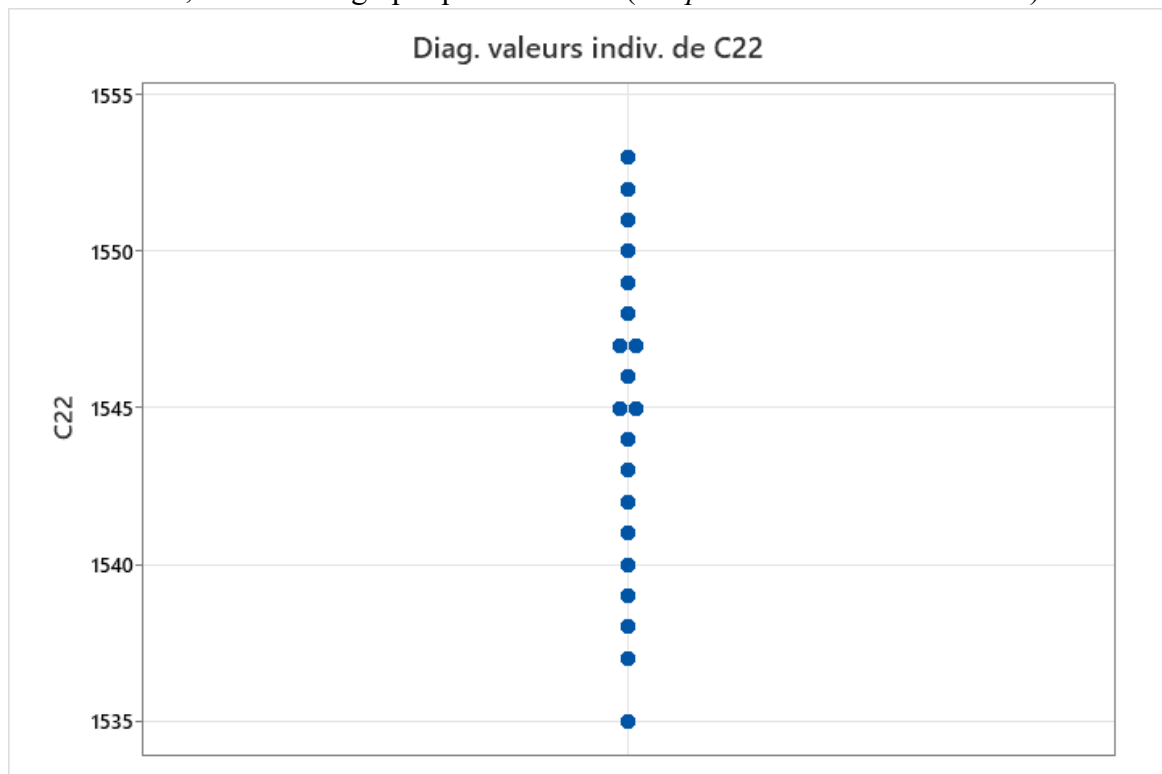
Un RSD inférieur à 1 % est généralement considéré comme excellent pour un standard. Mais la moyenne et l'écart-type ne disent rien de la distribution des données. Sont-elles symétriques ? Y a-t-il des valeurs aberrantes ?

Statistiques

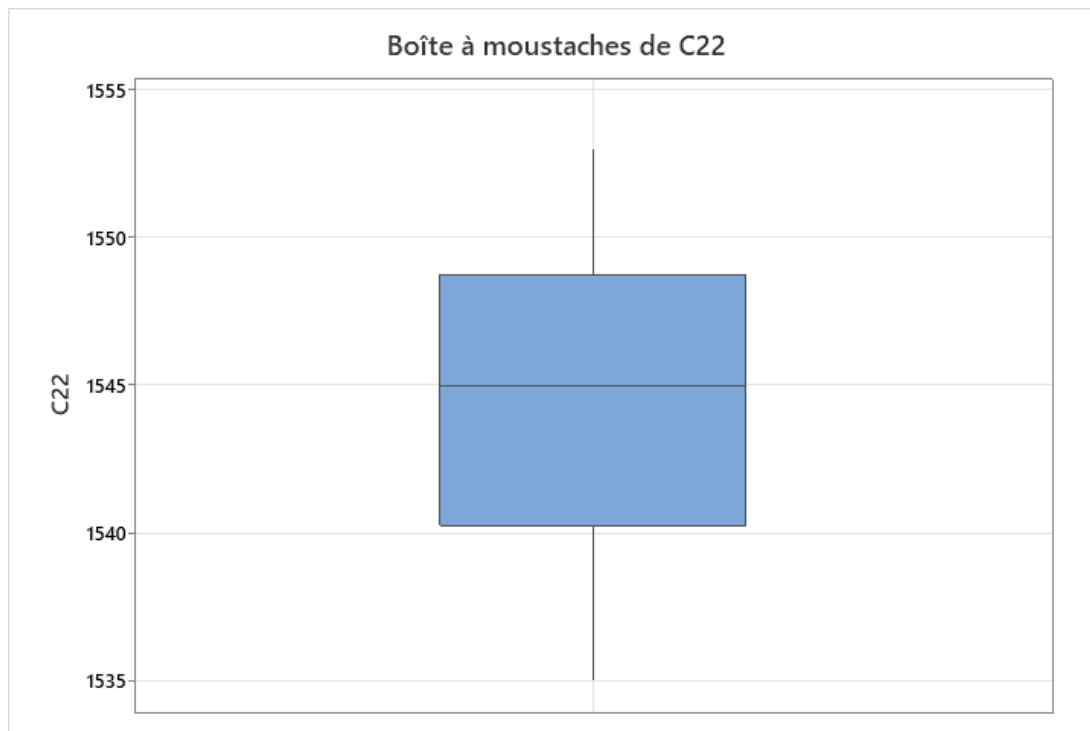
Variable	N	N*	Moyenne	ErT	moyenne	EcTyp	VarCoeff	Minimum	Q1	Médiane	Q3
C22	20	0	1544,6	1,15713	5,17484		0,34	1535	1540,25	1545	1548,75

Variable	Maximum
C22	1553

Pour le savoir, on trace un graphique individuel (*Graph > Individual Value Plot*) :



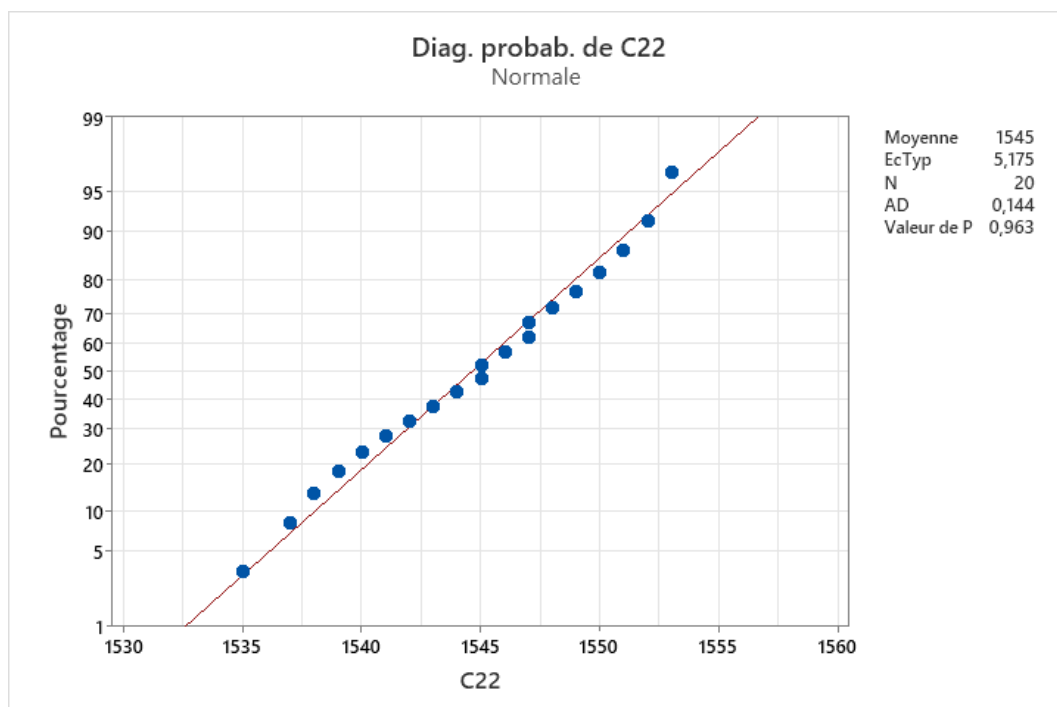
Les points semblent bien répartis autour de la moyenne, sans valeur extrême. Complétons par une boîte à moustaches (*Graphique > Boîte à moustaches*) :



La boîte à moustaches est un outil graphique qui permet de comparer visuellement la distribution, la tendance centrale, la variabilité et les valeurs aberrantes de plusieurs groupes. La boîte est symétrique, les moustaches sont équilibrées, aucune valeur aberrante (points en dehors des moustaches). La distribution semble normale.

Pour le vérifier formellement, on effectue un test de normalité (*Stat > Statistiques élémentaires > Test de normalité*) :

- Test d'Anderson-Darling : p-value ($> 0,05$) ici la valeur de $p=0.964$
- On ne rejette pas l'hypothèse de normalité.



Ces premiers graphiques, réalisés en quelques clics, donnent déjà une image fidèle de la performance du système. Ils constituent la base de toute analyse ultérieure.