

lorsque la phase mobile a parcouru la distance prescrite, mesurée entre les points de dépôt et le front du solvant. Séchez-la et procédez à la visualisation des chromatogrammes comme prescrit.

Dans le cas d'une chromatographie bidimensionnelle, séchez les plaques après le premier développement et effectuez un second développement dans une direction perpendiculaire à celle du premier développement.

Procédé horizontal. Déposez le volume prescrit des solutions comme décrit ci-dessus. Lorsque le solvant des solutions déposées est évaporé, ajoutez une quantité suffisante de phase mobile dans le bac de la cuve à l'aide d'une seringue ou d'une pipette, posez la plaque dans la cuve après avoir vérifié l'horizontalité de cette dernière et raccordez le dispositif permettant de guider la phase mobile conformément aux instructions du fabricant. Si la monographie le prescrit, développez la plaque en commençant simultanément par les 2 extrémités. Fermez la cuve et maintenez la température à 20-25 °C. Retirez la plaque lorsque la phase mobile a parcouru la distance indiquée dans la monographie. Séchez et procédez à la visualisation des chromatogrammes comme prescrit.

Dans le cas d'une chromatographie bidimensionnelle, séchez les plaques après le premier développement et effectuez un second développement dans une direction perpendiculaire à celle du premier développement.

ÉVALUATION VISUELLE

Identification. Comparez visuellement la tache principale du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner et la tache correspondante du chromatogramme obtenu avec la solution témoin, en comparant la coloration, les dimensions et le facteur de retardement (R_f) respectifs des 2 taches.

Le facteur de retardement (R_f) est défini comme étant le rapport entre la distance séparant le point de dépôt du centre de la tache et la distance parcourue par le front du solvant à partir du point de dépôt.

Vérification du pouvoir de séparation aux fins d'identification. Normalement, les résultats obtenus par l'essai de performance décrit dans *Réactifs (4.1.1)* sont suffisants. Dans des cas particuliers seulement, un critère de performance supplémentaire est prescrit par la monographie.

Essai des substances apparentées. Comparez visuellement la (les) tache(s) secondaire(s) du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner soit à la (aux) tache(s) correspondante(s) du chromatogramme obtenu avec la solution témoin contenant la (les) impureté(s), soit à la tache du chromatogramme obtenu avec la solution témoin, préparée à partir d'une dilution de la solution à examiner.

Vérification du pouvoir de séparation. Les exigences relatives à la vérification du pouvoir de séparation sont prescrites dans les monographies concernées.

Vérification du pouvoir de détection. Le pouvoir de détection est considéré comme satisfaisant si la tache ou la bande du chromatogramme obtenu avec la solution témoin la plus diluée est nettement visible.

MESURES QUANTITATIVES

Les exigences relatives à la résolution et à la séparation sont prescrites dans les monographies concernées.

Les substances répondant à l'exposition aux rayons UV-Vis séparées par chromatographie sur couche mince peuvent être directement déterminées sur une plaque, à condition d'utiliser un appareillage approprié. Examinez la plaque en mesurant la réflectance du faisceau incident, tout en déplaçant la plaque ou le dispositif de mesure. De la même manière la fluorescence peut être mesurée à l'aide d'un système optique approprié. Les substances contenant des radionucléides peuvent être quantifiées de 3 manières différentes : directement, soit en déplaçant la plaque ou un compteur approprié l'un par rapport à l'autre (voir *Préparations radiopharmaceutiques (0125)*),

soit en découpant les plaques en bandes et en mesurant la radioactivité sur chacune des bandes à l'aide d'un compteur approprié, ou en grattant la phase stationnaire, en la dissolvant dans un mélange pour scintillation adéquat et en mesurant la radioactivité à l'aide d'un compteur à scintillation liquide.

Appareillage. L'appareillage permettant la mesure directe sur la plaque comporte :

- un dispositif pour le positionnement exact et la reproduction précise du volume de substance déposée sur la plaque ;
- un dispositif mécanique permettant de déplacer la plaque ou le dispositif de mesure autour de l'axe des x ou de l'axe des y ;
- un enregistreur et un intégrateur approprié ou un ordinateur ;
- *pour les substances répondant à une exposition aux rayons UV-Vis* : un photomètre avec une source de lumière, un système optique capable de générer une lumière monochromatique et une cellule photoélectrique de sensibilité adéquate sont utilisés pour mesurer la réflectance ou la transmittance ; si la fluorescence est mesurée, un filtre est nécessaire afin d'empêcher la lumière d'excitation d'arriver au détecteur tout en laissant passer la lumière émise ou une partie spécifique de celle-ci ;
- *pour les substances contenant des radionucléides* : un compteur adéquat pour la mesure de la radioactivité. L'intervalle de linéarité du compteur doit être vérifié.

Mode opératoire. Préparez la solution de la substance à examiner (solution à examiner) selon les indications données dans la monographie et, si nécessaire, préparez les solutions témoins de la substance à déterminer en utilisant le même solvant que dans la solution à examiner. Déposez le même volume de chaque solution sur la plaque et développez.

Substances répondant à une exposition aux rayons UV-Vis. Préparez et déposez au moins 3 solutions témoins de la substance à examiner, dont les concentrations encadrent la valeur attendue dans la solution à examiner (environ 80 pour cent, 100 pour cent et 120 pour cent). Traitez par le réactif prescrit, si nécessaire, puis enregistrez la réflectance, la transmittance ou la fluorescence des chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner et les solutions témoins. À l'aide des résultats obtenus, déterminez la quantité de substance dans la solution à examiner.

Substances contenant des radionucléides. Préparez et déposez une solution à examiner contenant environ 100 pour cent de la valeur attendue. Déterminez la radioactivité en fonction de la longueur du parcours et notez la radioactivité dans chaque pic en résultant, sous forme de pourcentage de la quantité de radioactivité totale.

Des critères de conformité du système sont décrits dans le chapitre *Techniques de séparation chromatographique (2.2.46)*. Les limites dans lesquelles il est possible de faire varier les différents paramètres, pour satisfaire aux critères de conformité du système, sont également indiquées dans ce chapitre.

01/2008:20228

2.2.28. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique de séparation chromatographique reposant sur la distribution différentielle des espèces entre deux phases non miscibles, une phase stationnaire contenue dans une colonne et un gaz vecteur, comme phase mobile, qui traverse cette phase stationnaire. Elle est applicable aux substances, ou dérivés de substances, qui se volatilisent dans les conditions de température utilisées.

La CPG est fondée sur les mécanismes d'adsorption, de distribution de masse ou d'exclusion.

APPAREILLAGE

L'appareillage se compose d'un injecteur, d'une colonne chromatographique placée dans un four, d'un détecteur et d'un système d'acquisition des données (ou d'un intégrateur ou enregistreur). Le gaz vecteur circule à travers la colonne à débit ou pression contrôlés, puis passe à travers le détecteur.

La chromatographie peut se dérouler à température constante ou selon un programme de température donné.

INJECTEURS

L'*injection directe* des solutions est le mode usuel d'injection, sauf indication contraire dans la monographie. Elle peut être effectuée soit directement en tête de colonne, au moyen d'une seringue ou d'une vanne d'injection, soit dans une chambre de vaporisation qui peut être équipée d'un diviseur de flux.

L'*injection en phase vapeur* peut être effectuée au moyen de systèmes d'injection à espace de tête statique ou dynamique.

Les systèmes d'injection à *espace de tête dynamique* (« purge and trap ») comprennent un dispositif qui entraîne les substances volatiles en solution vers une colonne-piège maintenue à basse température, où elles sont adsorbées. On procède ensuite, par chauffage rapide de la colonne-piège, à une désorption des substances retenues vers la phase mobile.

Les systèmes d'injection à *espace de tête statique* comprennent une enceinte de chauffage thermostatée dans laquelle des flacons fermés contenant les échantillons solides ou liquides sont placés pendant une durée donnée, pour permettre la vaporisation des composants volatils jusqu'à équilibre entre la phase vapeur et la phase non gazeuse. Une fois l'équilibre atteint, une quantité déterminée de l'espace de tête est injectée dans le chromatographe.

PHASES STATIONNAIRES

Les colonnes contenant la phase stationnaire peuvent être de différents types :

- colonne capillaire de silice fondue à paroi recouverte par la phase stationnaire,
- colonne remplie de particules inertes imprégnées avec la phase stationnaire,
- colonne remplie d'une phase stationnaire solide.

Les colonnes capillaires ont un diamètre intérieur (\emptyset) de 0,1 mm à 0,53 mm et une longueur de 5 m à 60 m. La phase liquide ou stationnaire est déposée sur la paroi interne de la colonne, à laquelle elle peut être chimiquement liée, sous la forme d'un film d'une épaisseur de 0,1 μ m à 5,0 μ m.

Les colonnes remplies, en verre ou métal, ont généralement une longueur de 1 m à 3 m et un diamètre intérieur (\emptyset) de 2 mm à 4 mm. Les phases stationnaires se composent généralement de polymères poreux ou supports solides imprégnés d'une phase liquide.

Les supports servant à l'analyse des composés polaires sur colonnes remplies à phase stationnaire faiblement polaire de faible capacité doivent être inertes, pour éviter le phénomène de traînée des pics. La réactivité du matériau constituant le support peut être réduite par silanisation, préalablement au dépôt de la phase liquide. On utilise fréquemment de la terre d'infusoire calcinée et lavée à l'acide. Les matériaux existent dans différentes granulométries, les plus couramment utilisées se situant dans les intervalles 150-180 μ m et 125-150 μ m.

PHASES MOBILES

Le temps de rétention et l'efficacité sont fonction du débit du gaz vecteur. Le temps de rétention est par ailleurs directement proportionnel à la longueur de la colonne, alors que la résolution est proportionnelle à la racine carrée de la longueur de la colonne. Dans le cas des colonnes remplies, le débit du gaz vecteur est généralement exprimé en millilitres par minute, sous pression atmosphérique et à température ambiante. Il est mesuré à la sortie du détecteur, à l'aide d'un dispositif mécanique étalonné ou d'un compte-bulles, lorsque la colonne a atteint sa température de service. A débit volumique donné,

la vitesse linéaire de déplacement du gaz à travers une colonne remplie est inversement proportionnelle à la racine carrée du diamètre intérieur de la colonne : un débit de 60 mL/min dans une colonne de 4 mm de diamètre intérieur et un débit de 15 mL/min dans une colonne de 2 mm de diamètre intérieur donneront la même vitesse linéaire de déplacement, et par conséquent des temps de rétention semblables.

Les gaz vecteurs les plus couramment utilisés sont l'hélium ou l'azote pour les colonnes remplies, l'azote, l'hélium et l'hydrogène pour les colonnes capillaires.

DÉTECTEURS

Les détecteurs à ionisation de flamme sont les plus utilisés, mais, selon l'objectif de l'analyse, il est également possible de recourir à la capture d'électrons, à des détecteurs azote-phosphore, à la spectrométrie de masse, à la conductivité thermique ou à la spectrophotométrie infrarouge avec transformée de Fourier et d'autres méthodes.

MODE OPÉRATOIRE

Équilibrez la colonne, l'injecteur et le détecteur aux températures et débits indiqués dans la monographie, jusqu'à obtention d'une ligne de base stable. Préparez la (les) solution(s) à examiner et la (les) solution(s) témoin(s) prescrites. Les solutions doivent être exemptes de particules solides.

Des critères de conformité du système sont décrits dans le chapitre *Techniques de séparation chromatographique* (2.2.46). Les limites dans lesquelles il est possible de faire varier les différents paramètres, pour satisfaire aux critères de conformité du système, sont également indiquées dans ce chapitre.

Chromatographie en phase gazeuse à espace de tête statique

La chromatographie en phase gazeuse à espace de tête statique est une technique spécialement adaptée à la séparation et au dosage des composés volatils présents dans des échantillons solides ou liquides. Elle est fondée sur l'analyse d'une phase vapeur à l'équilibre avec la phase solide ou liquide.

APPAREILLAGE

L'appareillage se compose d'un chromatographe en phase gazeuse sur lequel est adapté un dispositif d'introduction de l'échantillon, éventuellement relié à un module de programmation contrôlant automatiquement la température et la pression ; il peut également comprendre, si nécessaire, un dispositif d'élimination des solvants.

L'échantillon à analyser est introduit dans un récipient comportant un obturateur approprié, ainsi qu'un système de vannes permettant le passage du gaz vecteur. L'ensemble est placé dans une enceinte thermostatée à la température prescrite pour l'échantillon examiné.

L'échantillon est maintenu à cette température pendant le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre entre la phase gazeuse et la phase solide ou liquide.

Le gaz vecteur est introduit dans le récipient, puis, après le temps prescrit, l'ouverture d'une vanne appropriée permet au gaz de passer, en se détendant, sur la colonne, entraînant avec lui les composés volatilés.

Au lieu d'un chromatographe spécialement équipé pour l'introduction des échantillons, il est également possible d'utiliser des seringues étanches et un chromatographe usuel. Dans ce cas, l'équilibrage est réalisé dans une enceinte séparée et il convient de prendre les précautions nécessaires pour éviter toute modification de l'équilibre lors du transfert de la phase vapeur sur la colonne.

MODE OPÉRATOIRE

A l'aide des préparations témoins, procédez aux réglages requis pour obtenir une réponse satisfaisante.

ÉTALONNAGE DIRECT

Dans des récipients identiques, introduisez séparément la préparation à examiner et chacune des préparations témoins, selon les prescriptions de la monographie, de façon que le dispositif de prélèvement n'entre pas en contact avec les échantillons.

Fermez hermétiquement les récipients et placez-les dans l'enceinte thermostatée, réglée sur la température et la pression indiquées dans la monographie ; après équilibrage, procédez à la chromatographie dans les conditions prescrites.

AJOUTS DOSÉS

Dans une série de récipients appropriés identiques, introduisez des volumes égaux de la préparation à examiner. Ajoutez à tous les récipients, sauf un, des quantités appropriées d'une préparation témoin contenant le composé à doser à concentration connue, de façon à obtenir une série de préparations de concentration progressivement croissante.

Fermez hermétiquement les récipients et placez-les dans l'enceinte thermostatée, réglée sur la température et la pression indiquées dans la monographie ; après équilibrage, procédez à la chromatographie dans les conditions prescrites.

Calculez l'équation de la droite par la méthode des moindres carrés. À l'aide de cette équation, calculez la concentration du composé à doser dans la préparation à examiner.

Il est également possible de procéder comme suit : portez sur un graphique la moyenne des valeurs lues, en fonction de la quantité ajoutée du composé à doser. Extrapolez la droite joignant les points du graphique jusqu'à l'axe des concentrations. La distance entre le point d'intersection et l'origine représente la concentration du composé à doser dans la préparation à examiner.

ÉPUISEMENTS SUCCESSIFS (EXTRACTION À ESPACE DE TÊTE MULTIPLE)

Lorsque la méthode des épuisements successifs est prescrite, le procédé est entièrement décrit dans la monographie.

01/2008:20229

2.2.29. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

La chromatographie liquide (CL) est une technique de séparation chromatographique reposant sur la distribution différentielle des espèces entre deux phases non miscibles, une phase stationnaire contenue dans une colonne et une phase mobile liquide qui traverse, par percolation, cette phase stationnaire.

La CL est principalement fondée sur les mécanismes d'adsorption, de distribution de masse, d'échange d'ions, d'exclusion ou d'interaction stéréochimique.

APPAREILLAGE

L'appareillage se compose d'un système de pompage, d'un injecteur, d'une colonne chromatographique (éventuellement thermostatée), d'un détecteur et d'un système d'acquisition des données (ou d'un intégrateur ou enregistreur). La phase mobile, délivrée à partir d'un ou plusieurs réservoirs, circule à travers la colonne, généralement à débit constant, puis passe à travers le détecteur.

SYSTÈMES DE POMPAGE

Les systèmes de pompage pour CL doivent fournir la phase mobile à un débit constant. Il convient de limiter autant que possible les fluctuations de pression, par exemple en faisant passer le solvant sous pression à travers un dispositif amortissant les pulsations. Les tubes et raccords doivent pouvoir résister aux pressions développées par la pompe. Les pompes pour CL peuvent être équipées d'un dispositif de purge qui permet de chasser les bulles d'air emprisonnées.

Les systèmes pilotés par microprocesseur sont capables de délivrer avec précision une phase mobile de composition constante (élution isocratique) ou variable (gradient d'élution),

selon un programme défini. Pour les chromatographies à gradient d'élution, il existe des systèmes de pompage qui délivrent le(s) solvant(s) à partir de plusieurs réservoirs, le mélange pouvant être effectué soit en amont (basse-pression) soit en aval (haute-pression) de la (des) pompe(s).

INJECTEURS

La solution à examiner est introduite dans la phase mobile circulante en tête de colonne, ou à proximité de celle-ci, à l'aide d'un système d'injection conçu pour fonctionner à pression élevée. Les injecteurs peuvent être à boucle fixe ou à volume variable, à fonctionnement manuel ou pilotés par un échantillonneur automatique. Le remplissage partiel des boucles, manuellement, peut entraîner une moindre fidélité du volume injecté.

PHASES STATIONNAIRES

De nombreux types de phases stationnaires sont utilisés en CL, notamment :

- de la silice, de l'alumine ou du graphite poreux, utilisés en chromatographie en polarité de phase normale, où la séparation repose sur une adsorption différentielle et/ou une distribution de masse,
- des résines ou polymères à groupements acides ou basiques, utilisés en chromatographie à échange d'ions, où la séparation repose sur la compétition entre les ions à séparer et ceux de la phase mobile,
- de la silice ou des polymères poreux, utilisés en chromatographie d'exclusion, où la séparation repose sur les différences de volume entre molécules, ce qui correspond à une exclusion stérique,
- divers supports chimiquement modifiés, préparés à partir de polymères, de silice ou de graphite poreux, utilisés en CL en polarité de phase inversée, où la séparation repose principalement sur le partage des molécules entre la phase mobile et la phase stationnaire,
- des phases stationnaires chimiquement modifiées spéciales, telles que des dérivés de la cellulose ou de l'amylose, des protéines ou des peptides, des cyclodextrines, etc., pour la séparation des énantiomères (chromatographie chirale).

La plupart des séparations reposent sur des mécanismes de partage utilisant de la silice chimiquement modifiée comme phase stationnaire et des solvants polaires comme phase mobile. La surface du support (par exemple les groupes silanol de la silice) est mise en présence de différents réactifs de la famille des silanes, avec lesquels elle réagit en formant, par liaison covalente, des dérivés silylés qui occupent un nombre variable des sites actifs de la surface du support. La nature de la phase greffée est un paramètre déterminant pour les propriétés de séparation du système chromatographique.

Les phases greffées les plus couramment utilisées sont les suivantes :

octyl	= $\text{Si}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3$	C_8
octadécyl	= $\text{Si}-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$	C_{18}
phényle	= $\text{Si}-(\text{CH}_2)_n-\text{C}_6\text{H}_5$	C_6H_5
cyanopropyl	= $\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{CN}$	CN
aminopropyl	= $\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$	NH_2
diol	= $\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{OH}$	

Sauf indication contraire du fabricant, les colonnes en phase inversée à base de silice sont considérées comme stables pour les phases mobiles de pH apparent compris entre 2,0 et 8,0. Les phases à base de graphite poreux ou de particules de polymères tels que le copolymère styrène-divinylbenzène sont stables sur un intervalle de pH plus étendu.

Il est possible dans certains cas de procéder par chromatographie en phase normale en utilisant comme phase stationnaire de la silice non modifiée, du graphite poreux ou de la silice chimiquement modifiée polaire (cyanopropyl ou diol par exemple), avec une phase mobile non polaire.