

**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	= $\text{Si}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3$	$\text{C}_8$
octadécyl	= $\text{Si}-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$	$\text{C}_{18}$
phényle	= $\text{Si}-(\text{CH}_2)_n-\text{C}_6\text{H}_5$	$\text{C}_6\text{H}_5$
cyanopropyl	= $\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{CN}$	CN
aminopropyl	= $\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$	$\text{NH}_2$
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.

En chromatographie analytique, la taille des particules constituant les phases stationnaires les plus souvent utilisées est comprise entre 3 µm et 10 µm. Les particules peuvent être de forme sphérique ou irrégulière, et de porosité et surface spécifique variables. Ces paramètres ont une influence sur le comportement chromatographique de la phase stationnaire. Dans le cas des phases inversées, la nature de la phase stationnaire, le taux de greffage (exprimé par exemple en taux de carbone) et le fait que la phase stationnaire soit ou non postgreffée (« end-capping » : silylation des groupes silanol résiduels) sont aussi des facteurs déterminants. La présence de groupes silanol résiduels peut entraîner une trainée des pics, notamment des substances basiques.

Les colonnes utilisées en chromatographie analytique sont en acier inoxydable, sauf indication contraire dans la monographie, et sont de longueur et de diamètre intérieur (Ø) variables. Les colonnes de diamètre intérieur inférieur à 2 mm sont souvent appelées microcolonnes. La température de la phase mobile et de la colonne doit être maintenue constante pendant toute la durée de l'analyse. La plupart des séparations sont effectuées à température ambiante, mais il est possible de chauffer les colonnes pour obtenir une efficacité supérieure. Il est toutefois recommandé de ne pas dépasser 60 °C, sous peine de dégradation de la phase stationnaire ou d'altération de la composition de la phase mobile.

#### PHASES MOBILES

Pour la chromatographie en phase normale, les solvants utilisés sont de faible polarité. Un strict contrôle de la présence d'eau dans la phase mobile est nécessaire pour obtenir des résultats reproductibles. Pour la CL en phase inversée, on utilise des phases mobiles aqueuses, avec ou sans modifiants organiques.

Les composants de la phase mobile sont généralement filtrés pour éliminer les particules de taille supérieure à 0,45 µm. Les phases mobiles à plusieurs composants sont préparées par mesure des volumes requis (à moins que les proportions ne soient spécifiées en masse) pour chaque composant, puis mélange des différents composants. Une autre méthode possible consiste à délivrer les solvants au moyen de pompes individuelles commandées par des vannes à débit proportionnant, le mélange étant ainsi effectué dans les proportions souhaitées. Les solvants sont normalement dégazés avant le pompage, par passage d'un courant d'hélium, sonication ou traitement en ligne par des modules membrane/vide, pour éviter la formation de bulles de gaz dans la cellule de détection.

Les solvants utilisés pour préparer la phase mobile sont normalement exempts d'agents stabilisants, et transparents à la longueur d'onde de détection si l'on utilise un détecteur UV. Les solvants et autres composants utilisés doivent être de qualité appropriée. L'ajustement du pH, s'il y a lieu, doit être exclusivement effectué sur le composant aqueux de la phase mobile et non sur le mélange. Si des solutions tampons sont utilisées, il convient de rincer soigneusement le système avec un mélange d'eau et du modifiant organique de la phase mobile (5 pour cent V/V) une fois la chromatographie terminée, afin d'éviter la cristallisation des sels.

Les phases mobiles peuvent contenir des additifs comme, par exemple, un contre-ion dans le cas d'une chromatographie à appariement d'ions, ou un sélecteur chirale dans le cas d'une chromatographie avec phase stationnaire achirale.

#### DÉTECTEURS

Les détecteurs les plus utilisés sont les spectrophotomètres dans l'ultraviolet/visible (UV/Vis), dont les détecteurs à barrette de diodes. La détection peut également reposer sur la fluorimétrie, la réfractométrie différentielle, des méthodes électrochimiques, la spectrométrie de masse, la dispersion de la lumière, la radioactivité et d'autres méthodes particulières.

#### MODE OPÉRATOIRE

Équilibrez la colonne avec la phase mobile et le débit indiqués, à température ambiante ou à la température spécifiée 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.

01/2008:20230

## 2.2.30. CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

La chromatographie d'exclusion est un procédé de séparation des molécules en solution en fonction de leur taille. Dans le cas de phases mobiles organiques, cette méthode de séparation est appelée *chromatographie de perméation sur gel*, et dans le cas de phases mobiles aqueuses, *chromatographie de filtration sur gel*. L'échantillon à examiner est introduit dans une colonne qui contient un support constitué par un gel ou par des particules d'un solide poreux et est élué par la phase mobile à travers la colonne. La séparation des molécules, en fonction de leur taille, se fait par des échanges répétés des molécules du soluté entre le solvant de la phase mobile et le même solvant immobilisé à l'intérieur du support (phase stationnaire). La porosité moyenne définit l'intervalle de la grandeur moléculaire à l'intérieur duquel une séparation peut avoir lieu.

Les molécules dont la taille est telle qu'elle permet la pénétration à l'intérieur de tous les pores du support sont éluées de la colonne au *volume de perméation total* ( $V_t$ ). D'autre part, les molécules, dont la taille est apparemment supérieure à la taille maximale des pores du support, migrent le long de la colonne en passant seulement à travers les espaces interparticulaires du support sans être retenues et sont éluées de la colonne au *volume d'exclusion* ( $V_0$  volume interstitiel). La séparation selon la taille moléculaire se fait entre le volume d'exclusion et le volume de perméation total ; en fait, elle s'effectue généralement dans les deux premiers tiers de cet intervalle.

**Appareillage.** Il est constitué essentiellement par une colonne chromatographique, thermostatée si nécessaire, de longueur et de diamètre intérieur (Ø) variables, remplie par un support apte à séparer les substances dans un intervalle approprié de grandeurs moléculaires. L'éluant passe à travers la colonne à débit constant. L'entrée de la colonne est généralement reliée à un dispositif approprié permettant l'introduction des échantillons, tel qu'un régulateur de débit, une seringue à travers un septum ou une valve à injection. Elle peut être également reliée à un système de pompage adéquat qui contrôle le débit de l'éluant. Par ailleurs, l'échantillon peut être directement introduit sur la surface du support drainé ou, lorsque sa densité est supérieure à celle de l'éluant, il peut être réparti sur l'interface du support et de l'éluant. La sortie de la colonne est généralement reliée à un détecteur approprié, couplé à un enregistreur automatique permettant la mesure des concentrations relatives des composés séparés. Les détecteurs sont basés le plus souvent sur la photométrie, la réfractométrie ou la luminescence. Un collecteur de fractions automatique peut, si nécessaire, être relié au système.

Le support peut être un support mou tel qu'un gel imprégné ou un support rigide constitué par un matériau tel que du verre, de la silice ou un polymère organique réticulé compatible avec des solvants. Les supports rigides requièrent généralement des systèmes pressurisés permettant des séparations plus rapides. Le choix de la phase mobile dépend de la nature de l'échantillon, du support de séparation et de la méthode de détection. Avant d'effectuer la séparation, le support doit être traité et la colonne remplie selon les indications de la monographie ou les instructions du fabricant.