

Dosages par chromatographie (CPG/CLHP)

Il existe trois techniques de dosage par chromatographie dont les équations de traitement des données sont rappelées ci-dessous. L'exploitation des résultats n'est possible (et n'a de sens) que dans le cadre d'une démarche qualité : il est important de diagnostiquer les sources d'erreurs (opérateur, appareil, mixtes).

L'opérateur intervient lors :

- de l'échantillonnage (pesées, prélèvements de volumes à l'aide d'une pipette / micropipette ou d'une seringue, préparations de fioles etc.)
- de l'injection.

Les sources d'erreur dues à l'appareil sont nombreuses et variées et ne peuvent être listées de façon exhaustive ici.

La fidélité de chacune de ces sources d'erreur doit être estimée. Pour ceci, des tests statistiques doivent être effectués régulièrement.

1. Méthode de l'étalonnage externe

Cette méthode permet de doser au moins une espèce (p) dans un mélange et s'emploie lorsque le volume injecté est précis (fidélité $< \sim 0,5\%$). Elle nécessite la réalisation d'au moins deux chromatogrammes étalons¹ (et) et est basée sur l'exploitation de la relation² :

$\rho_p = \rho_p^{et} \cdot \frac{\%A_p}{\%A_p^{et}}$	ρ_p	Concentration massique à déterminer
	ρ_p^{et}	Concentration massique moyenne de l'étalon (fixée par l'opérateur)
	$\%A_p$	Pourcentage surfacique du chromatogramme du produit P de l'échantillon (déduit du chromatogramme échantillon)
	$\%A_p^{et}$	Pourcentage surfacique moyen du chromatogramme du produit P de l'étalon (déduit du chromatogramme étalon)

Ce calcul implique l'utilisation de valeurs de ρ_p^{et} et de $\%A_p^{et}$ validée par un test de concordance (fidélité de l'ordre de 0,5-1% selon le dosage, ce qui permet d'estimer une incertitude $\Delta\rho_p$). De même, le calcul ρ_p doit être confirmé par deux valeurs concordantes. On exprime le résultat sous la forme :

$$\rho_p = \rho_{p,moy} \pm \Delta\rho_p$$

¹ Nous rappelons que les chromatogrammes étalons doivent avoir des compositions proches des chromatogrammes échantillons.

² Nous rappelons que cette relation est déduite d'une loi de proportionnalité masse / surface qui doit être vérifiée et validée sur l'appareil utilisé. Elle repose aussi sur la nécessité de se trouver dans un domaine de linéarité, ce qui doit aussi être vérifié et validé.

- Cette méthode peut être utilisée en CLHP lorsque le volume de boucle d'injection est correctement calibré (source d'erreur : appareil) et qu'aucune bulle d'air n'y a été placée (source d'erreur : opérateur).
- Cette méthode peut être utilisée en CPG³ lorsque le volume de liquide présent dans la seringue est correctement estimé (source d'erreur : précision de la seringue, opérateur).

Remarque. Si un effet de matrice est observé la méthode des ajouts dosés peut être utilisée.

2. Méthode de l'étalonnage interne

Cette méthode permet de doser au moins une espèce (p) dans un mélange et s'emploie lorsque le volume injecté est peu précis (fidélité $> \sim 1$ %). Elle nécessite la réalisation d'au moins un chromatogramme étalon⁴ (et) et l'ajout d'une espèce inerte appelée étalon interne (E), dans l'étalon et dans l'échantillon. Elle est basée sur l'exploitation de la relation⁵ :

$\rho_P = \rho_E \frac{\rho_P^{et}}{\rho_E^{et}} \cdot \frac{\%A_E^{et}}{\%A_P^{et}} \cdot \frac{\%A_P}{\%A_E}$	ρ_E	Concentration massique en étalon interne dans l'échantillon (fixée par l'opérateur)
	ρ_E^{et}	Concentration massique en étalon interne de l'étalon (fixée par l'opérateur)
	$\%A_E$	Pourcentage surfacique du chromatogramme en étalon interne de l'échantillon (déduit du chromatogramme échantillon)
	$\%A_E^{et}$	Pourcentage surfacique moyen du chromatogramme en étalon interne de l'étalon (déduit du chromatogramme étalon)

- Cette méthode peut être utilisée en CLHP lorsque le volume de boucle d'injection est mal calibré (source d'erreur : appareil).
- Cette méthode peut être utilisée en CPG.

3. Méthode de la normalisation interne

Cette méthode permet de doser au moins une espèce (p) dans un mélange et s'emploie lorsque le volume injecté est peu précis (fidélité $> \sim 1$ %) et que toutes les espèces présentes sur le chromatogramme sont identifiées. Elle nécessite la réalisation d'au moins un chromatogramme étalon⁶ (et) constitué du produit d'intérêt (p) et de toutes les autres espèces (I_i) et est basée sur l'exploitation de la relation⁷ :

$$\%m_p = \frac{\%A_p}{\%A_p + \sum_i K_{I_i/P}^m \cdot \%A_{I_i}}$$

ou encore, pour une des espèces I_i :

$$\%m_{I_i} = \frac{K_{I_i/P}^m \cdot \%A_{I_i}}{\%A_p + \sum_i K_{I_i/P}^m \cdot \%A_{I_i}}$$

³ Notons qu'en CPG, l'utilisation d'espèces volatiles augmente l'erreur sur les mesures de volumes.

⁴ Voir note 1.

⁵ Voir note 2.

⁶ Voir note 1. Cette contrainte prend ici une grande importance.

⁷ Voir note 2.

où $K_{I_i/P}^m$ est appelé coefficient de réponse massique relatif du produit I_i par rapport au produit

P est défini par $K_{I_i/P}^m = \frac{\%m_{I_i}^{et}}{\%m_P^{et}} \cdot \frac{\%A_P^{et}}{\%A_{I_i}^{et}}$ et est calculé grâce aux données extraites d'un chromatogramme étalon.

Conséquences :

- Le calcul de $\%m_P$ implique le calcul préalable des n-1 $K_{I_i/P}^m$ (si le chromatogramme montre la présence de n espèces),
- Si les $K_{I_i/P}^m$ sont proches de 1, alors $\%m_P \approx \%A_P$.
- Si $\%A_P \gg \%A_{I_i}$ (un facteur 10 suffit) alors $\%m_P \approx \%A_P$.

Le calcul des pourcentages molaires se fait selon l'équation :

$$\boxed{\%n_P = \frac{\%A_P}{\%A_P + \sum_i K_{I_i/P}^n \cdot \%A_{I_i}}} \text{ ou encore } \boxed{\%n_{I_i} = \frac{K_{I_i/P}^n \cdot \%A_{I_i}}{\%A_P + \sum_i K_{I_i/P}^n \cdot \%A_{I_i}}}$$

où $K_{I_i/P}^n$ est appelé coefficient de réponse molaire relatif du produit I_i par rapport au produit P

est défini par $K_{I_i/P}^n = K_{I_i/P}^m \cdot \frac{M_P}{M_{I_i}}$

Conséquences :

- Si $M_P \approx M_{I_i}$ alors $\%m_P \approx \%n_P$.

4. Tableau résumé

	Etalonnage externe	Etalonnage interne	Normalisation interne
<i>Sensibilité au volume injecté</i>	Oui	Non	Non
<i>Nécessité d'avoir identifié toutes les espèces du chromatogramme</i>	Non	Non	Oui
<i>Nécessité d'ajouter une espèce supplémentaire</i>	Non	Oui	Non
<i>Temps de calcul</i>	Rapide	Moyenne	Longue
<i>Inconvénients</i>	S'assurer de la précision du volume injecté	Connaître avec précision les concentrations en étalon interne	1. Temps de calculs 2. Interdépendance des résultats