

CHROMATOGRAPHIE IONIQUE

I BUT DU TRAVAIL PRATIQUE

- Analyse qualitative des différents acides organiques présents dans le vin.
- Analyse quantitative de l'acide acétique contenu dans un échantillon de vin.
- Comprendre les principes de la chromatographie ionique.
- Connaitre les applications principales et particularités de la chromatographie ionique.

II INTRODUCTION

La chromatographie ionique (IC) est une technique qui s'apparente à la HPLC (chromatographie liquide à haute pression) mais qui présente cependant suffisamment de particularités, tant au niveau du principe de la séparation que des méthodes de détection, pour en faire l'objet d'une étude à part. Elle est adaptée à la séparation des ions minéraux et de toutes sortes de molécules organiques à la condition qu'elles soient ioniques ou ionisables. La phase mobile est constituée par une solution aqueuse acide ou basique et la phase stationnaire est une résine solide qui comporte des échangeurs d'ions en surface. Les modes de détection classiques par absorbance ou fluorescence étant souvent mal adaptés aux analytes séparés, on utilise alors un détecteur conductimétrique, détecteur universel, car les solutés séparés sont ioniques. Les appareils sont constitués des mêmes modules que ceux rencontrés en HPLC avec comme différence que les parties en contact avec la phase mobile doivent être en matériaux inertes compte tenu de l'agressivité des solutions acide ou basique qui servent d'éluant. Tout comme en HPLC, on peut générer des gradients de concentration d'éluant pour optimiser la séparation d'un mélange.

Le schéma du chromatographe "système modulaire dual ICS-6000 (Thermo Fisher Scientific)" que vous allez utiliser est le suivant :

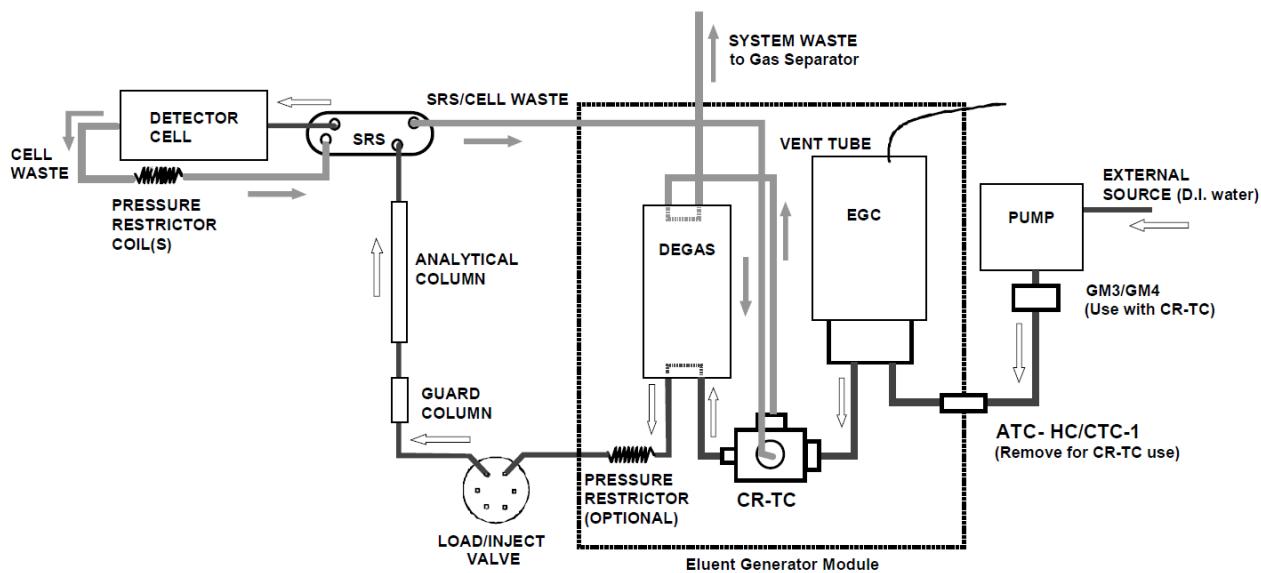


Figure 1

L'eau déminéralisée ('D.I. water' à droite sur la figure 1) est acheminée par une pompe isocratique ou à gradient vers la cartouche de génération d'éluant **EGC**.

Avec le système ISC-6000, il y a deux systèmes de cartouche pour produire soit de l'hydroxyde de potassium (KOH) l'analyse des anions, soit de l'acide méthanesulfonique (HMSA) pour l'analyse des cations.

L'éluant qui est généré électrochimiquement s'écoule à travers une colonne de piégeage (**CR-TC**) régénérée en continu servant à enlever les impuretés anioniques. L'éluant purifié s'achemine vers l'unité de dégazage à haute pression **DEGAS**.

L'éluant passe successivement à travers la vanne d'injection, la colonne analytique, le suppresseur à régénération électrolytique **SRS** pour enfin atteindre la cellule de détection conductimétrique **DETECTOR CELL**.

L'effluent issus de la cellule du détecteur est dévié à travers les chambres de régénération du suppresseur, la chambre de régénération du piége anionique régénéré en continu, le dégazeur pour finalement être collecté comme déchet (lignes grises).

Chaque élément important de ce schéma va être décrit en détail dans la suite de ce document pour la séparation d'anions.

III ETUDE DETAILLEE DES ELEMENTS DE L'IC

III.1 La colonne cationique pour échange d'anions

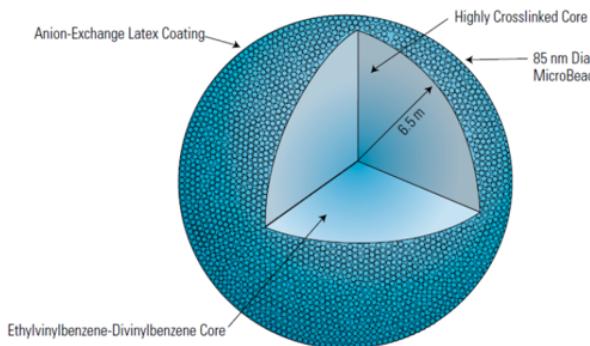
La colonne est confinée dans une enceinte thermostatée. Tout comme en HPLC, elle est munie d'une pré-colonne afin de la préserver d'une éventuelle contamination. Dans le cadre de ce TP nous allons utiliser une colonne cationique dont la phase stationnaire est une résine échangeuse d'anion.

Pour gérer des concentrations élevées d'analyte, améliorer la résolution des ions faiblement retenus, analyser des échantillons à force ionique élevée et charger un volume d'échantillon plus élevé sans saturation ni élargissement des pics, une capacité de colonne élevée est nécessaire. Pour y parvenir, les résines ont été conçues avec différentes porosités permettant d'exposer une surface d'échangeur ionique accrue qui offre une plus forte probabilité d'interaction avec les solutés à travers une augmentation de la capacité disponible de la résine (e.g. de 45 μeq à 290 μeq ($>500\%$) pour une colonne de $4 \times 250\text{ mm}$). Un exemple est donné ci-après :

Thermo Scientific™ Dionex™ IonPac™ AS11 : microporeuses (pores <10 Å, Figure 2 gauche)

Thermo Scientific™ Dionex™ IonPac™ AS11-HC : supermacroporeuses (pores de 2 000 Å, Figure 2 droite).

Dionex IonPac AS11 (pores <10 Å)
resin particle



Dionex IonPac AS11-HC (pores de 2 000 Å)
resin particle

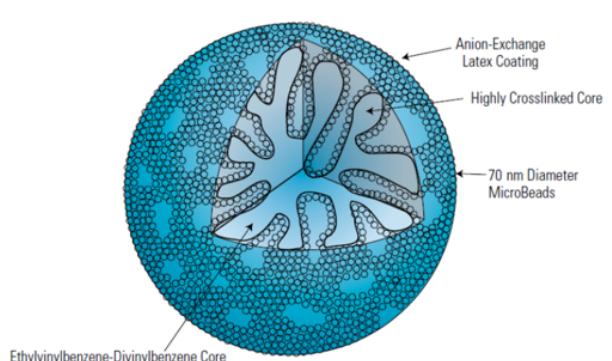


Figure 2

III.2 Le générateur d'éluant KOH

Avec ce module la phase mobile est générée automatiquement grâce au système décrit ci-dessous. Les pompes sont faites en PEEK afin de résister aux fortes concentrations de base. La pression maximale à ne pas dépasser est de 5000 Psi. Pour un fonctionnement optimal du CR-ATC (cf. III.3) il faut une pression minimum de 2000 Psi.

Débit de la pompe : 0,02 – 3,00 mL/min.

Concentration KOH : 0,1 – 100 mM

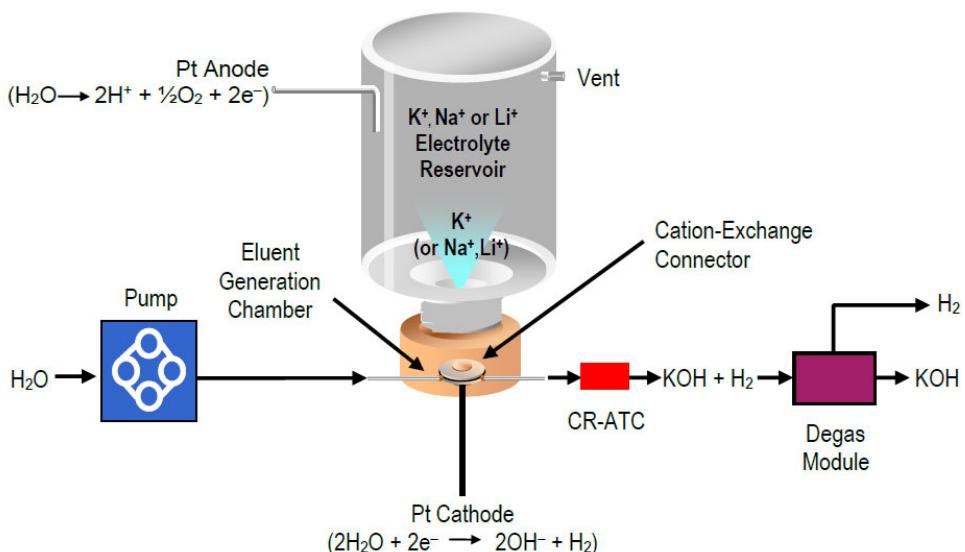


Figure 3

La cartouche se compose d'une chambre de génération d'éluant à haute pression et d'un réservoir à basse pression contenant un électrolyte alcalin, K⁺ notre cas. La chambre de génération d'éluant contient une cathode en platine perforée où se forment les ions hydroxyles. Le réservoir d'ions K⁺ contient une anode en platine. La chambre de génération d'éluant est reliée au réservoir d'électrolyte au moyen d'un connecteur échangeur de cations qui permet le passage des ions du réservoir vers la chambre de génération à haute pression tout en empêchant le passage des anions du réservoir vers la chambre de génération. Le connecteur d'échange de cations joue également le rôle de barrière physique entre le réservoir d'électrolyte à basse pression et la chambre de génération à haute pression.

III.3 Continuously Regenerated anionic Trap Column (CR-ATC)

Il s'agit d'une colonne de piégeage anionique régénérée en continu qui permet d'éliminer les impuretés anioniques de l'éluant généré électrochimiquement.

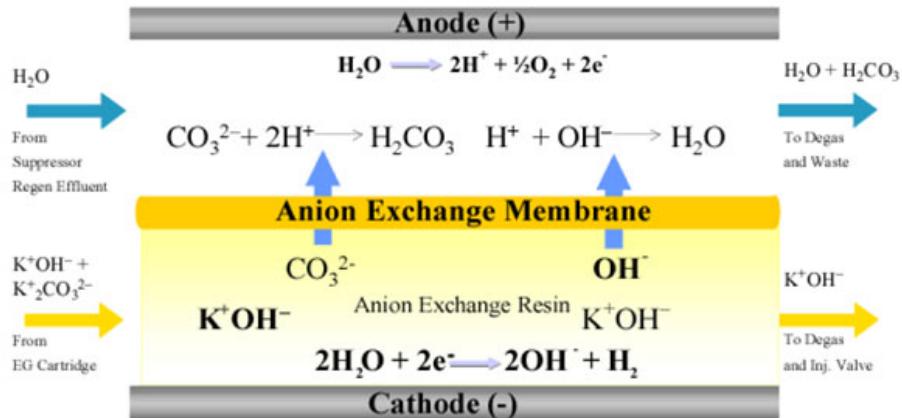


Figure 4

Il s'agit d'un échangeur d'anions avec une cathode en sortie d'éluant comme illustré sur la figure 4. L'hydroxyde généré à la cathode se régénère en continu après avoir passé à travers la membrane échangeuse d'anions tandis que les ions hydroniums générés à l'anode se combinent avec les impuretés anioniques pour former des acides. La solution d'éluant hydroxyde sortant du dispositif CR-ATC est exempte d'impuretés anioniques. L'hydrogène formée à la cathode sera éliminé dans le dégazeur.

II.4 Injecteur manuel

Le type d'injecteur le plus couramment utilisé comporte une vanne à boucle d'injection remplie de l'échantillon à étudier. C'est le même système que sur une HPLC (cf. TP-HPLC). Dans notre cas, le volume d'injection est de 25 μL .

III. 5 Supresseur à régénération électrolytique

Cette unité sert à réduire la conductivité de l'éluant afin qu'il ne soit pas détecté en continu par le détecteur comme un de bruit de fond important qui diminuerait considérablement la sensibilité de la détection des solutés analysés.

Le modèle à électrodéionisation (EDI) fait appel à un suppresseur à membrane cationique utilisé en aval d'une colonne anionique. Il est régénéré par électrolyse de l'eau. Il est à noter que la circulation de la solution de suppression s'effectue à contre-courant de celle de l'éluant sortant de la colonne chromatographique.

Dionex ADRS 600 in AutoSuppression Mode

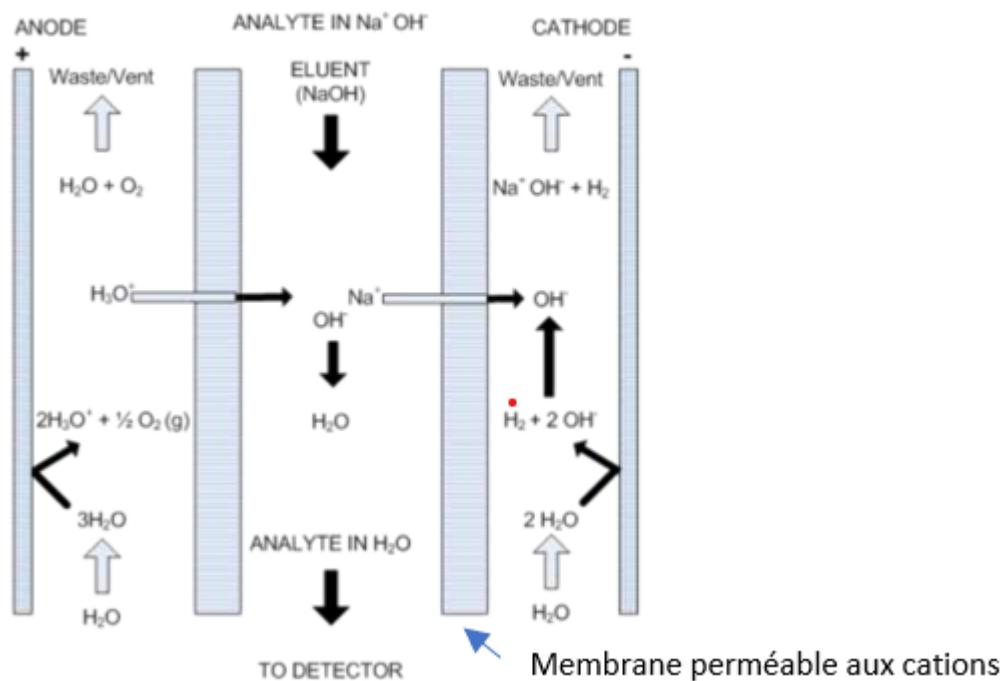


Figure 5

III.6 Détecteur conductométrique

Le détecteur conductométrique gère une gamme de concentrations très variée avec une sensibilité élevée (faible bruit électronique) et sans distorsions lors de changement de plage de mesure. Ces caractéristiques sont les suivantes :

Cell Electrodes	Passivated 316 Stainless Steel
Cell Temperature	5°C
Cell Temperature Stability	<0.001°C
Detector Type	Conductivity
Flow Cell Max. Pressure	1500 psi
Flow Cell Volume	0.7 µL
Output Range	0 to 15000 µS/cm

IV PARTIE PRATIQUE

IV.1 Généralités

- Laissez l'appareil se stabiliser au moins ½ heure avec la solution KOH = 1mM avant les mesures et effectuer une injection avec de l'eau milliQ avant de commencer.
- Pour l'injection, utiliser la seringue de 2 mL et injecter 0,5 mL minimum de solution. Rincer avec 1 mL d'eau MQ après chaque injection d'un échantillon afin d'éviter des contaminations.
- Il ne faut pas oublier que l'analyse est réalisée avec KOH comme éluant et que les acides organiques sont sous forme anionique.
- Les standards utilisés sont sous forme anionique.

IV.2 Analyse qualitative

IV.2.1 Préparation des solutions

- A partir des solutions d'acides organiques (sous forme anionique) à 1000 ppm déjà préparées (Cette liste est donnée dans l'ordre d'élution attendue), fabriquer une **solution standard à 25 ppm** avec tous les acides organiques dans un ballon jaugé de 20 mL, on la nommera solution **mix_AO**. Dans notre cas, 1 ppm = 1 mg/L.

#	pKa
Acide quinique	N/A
Acide lactique	3.86
Acide acétique	4.76
Acide malique	3.46 et 5.10
Acide succinique	4.16 et 5.61
Acide tartrique	3.04 et 4.37
Acide maléique	1.83 et 6.59
Acide fumarique	3,03 et 4,44
Acide citrique	3,13 et 4,76 et 6,40
Acide iso-citrique	N/A

- Préparer la **solution test** en diluant 100 fois le vin à disposition dans un ballon jaugé de 100 mL, on la nommera **JP Chenet**
- Préparer une **solution test avec ajout dosé** :
Dans un ballon jaugé de 100 mL, ajouter 1 mL de vin à disposition et 0,5 mL de chaque solution 1000 ppm d'acide organique, on nommera cette solution **JP Chenet spiked**.

IV.2.2 Analyse

- Injecter un blanc (eau MQ) ainsi que les trois solutions (*i.e.* mix_AO, JP Chenet, JP Chenet spiked) dans les conditions d'analyse données ci-après :

Débit : 1 mL /min

Colonne : Thermo Scientific™ Dionex™ IonPac™ AS11-HC

Température colonne : 30°C

Volume d'injection : 25 µL

Générateur d'éluant EGC 500 KOH avec le gradient de concentration suivant :

Temps [min.]	KOH [mM]	
0	1	Start run
8	1	
28	30	
38	60	
38.1	1	
40	1	Stop run

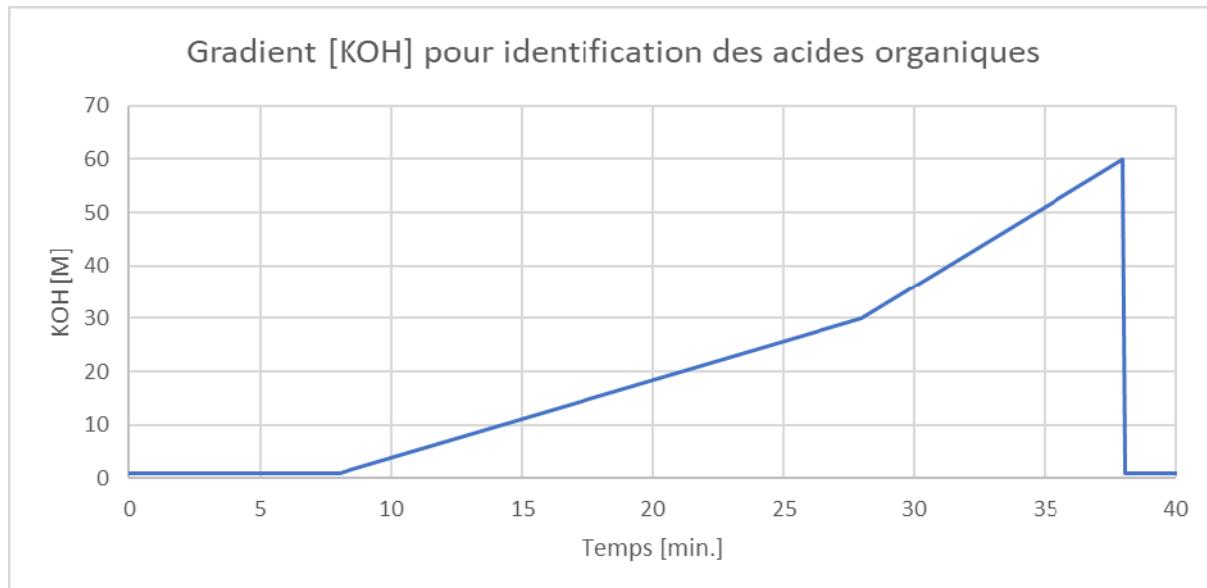


Figure 6

- Il faudra ensuite soustraire le blanc (chromatogramme de la solution d'eau MQ) de la solution standard mix_AO, de la solution test JP Chenet ainsi que la solution avec ajout dosé JP Chenet spiked.

IV.2 Analyse quantitative

IV.2.1 analyses qualité

Nous allons mesurer la concentration d'acide acétique dans l'échantillon de vin en utilisant une solution standard de 6 mg/L (6 ppm) en acétate. Cette solution (QC standard 3) sera injectée et la surface du pic obtenue sera comparée à celle d'une mesure qui a déjà été réalisée (voir standard 3 résultats_IC). Si les surfaces sont similaires (test de Student demandé dans la partie compte-rendu), nous pourrons construire la courbe d'étalonnage à partir des données fournies (résultats_IC) pour déterminer la concentration en acide acétique de l'échantillon de vin.

IV.2.2 Préparation des solutions

- Préparer 20 mL de solution d'acétate à 6 mg/L (6 ppm) à partir de la solution d'acétate à 1000 mg/L (1000 ppm) et injecter 3 fois cette solution.
- Sachant que la concentration en acide acétique dans cet échantillon est d'environ 230 mg/L, préparer une solution dans un ballon jaugé de 20 mL en diluant l'échantillon de vin afin que la concentration en acide acétique soit aux alentours de 6 mg/L.

IV.2.2 Analyses

- Injecter trois fois les deux solutions préparées dans les conditions d'analyse suivantes :

Débit : 1 mL /min
Colonne : Thermo Scientific™ Dionex™ IonPac™ AS11-HC
Température colonne : 30°C
Volume d'injection : 25 µL

Générateur d'éluant EGC 500 KOH avec le gradient de concentration suivant :

Temps [min.]	KOH [mM]	
0	1	Start run
15.5	1	
15.6	100	
17	100	
18	1	
22	1	Stop run

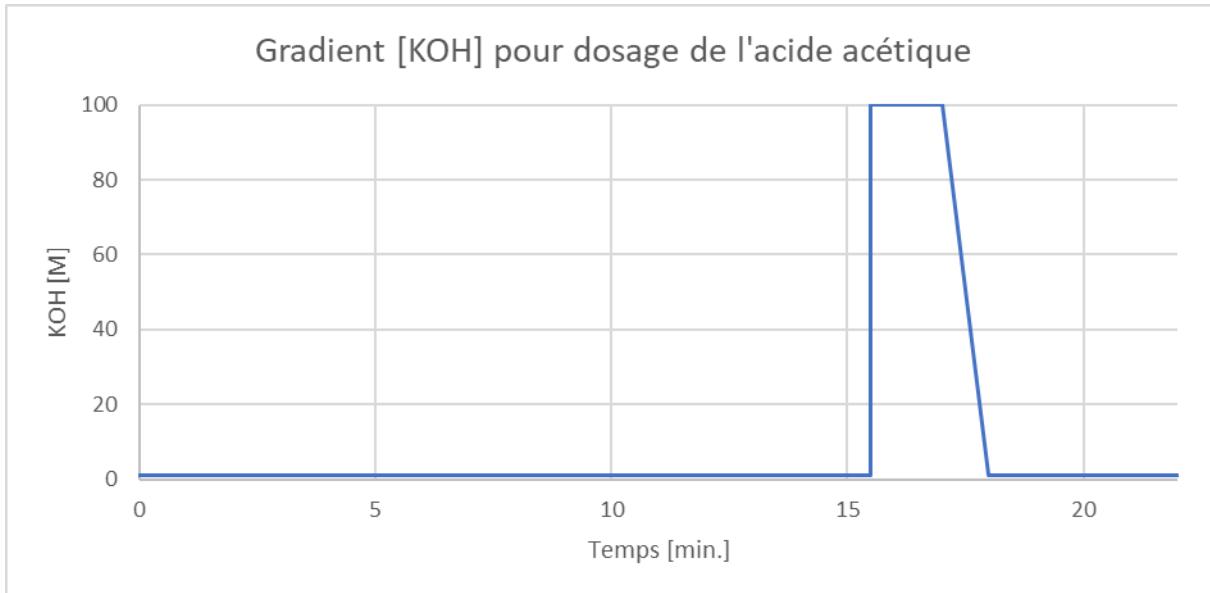


Figure 7

- Estimer l'erreur sur le volume d'échantillon pipeté en pesant 10 fois le même volume d'eau (on admet que la masse volumique de l'eau est égale à 1 g/mL), cela vous permettra de déterminer la moyenne et l'écart-type du volume d'échantillon pipeté. Vous utiliserez ces données pour déterminer l'erreur aléatoire sur la concentration préparée ($S_{C_{\text{prép}}}$).

V Compte-rendu

V.1 Analyse qualitative

- A partir des chromatogrammes obtenus, identifier quels acides organiques sont présents et absents dans l'échantillon de vin en vous basant sur la comparaison des valeurs de k' obtenues avec le mélange standard et l'échantillon de vin. L'ordre d'élution est celui de la liste des solutions standards. Pour information une co-élution est observée pour l'acide malique et l'acide succinique. Consigner les valeurs de k' dans un tableau. Pour être sûr de cette identification, superposer les chromatogrammes obtenus pour JP Chenet et JP Chenet spike.
- Quel marqueur de temps mort avez-vous utilisé pour calculer aux différents k' ?

V.2 Analyse quantitative

- A l'aide d'un test de Student, vérifier que le QC standard 3 que vous avez préparé est conforme au standard 3 donné dans le fichier résultats_IC. Dans l'affirmative, cela vous permettra d'utiliser les données du fichier résultats_IC pour construire votre courbe d'étalonnage (étalonnage externe) en effectuant une régression linéaire.

- A partir de la droite d'étalonnage réalisée, on déterminera la concentration en acide acétique de l'échantillon de vin. Pour ce faire, donner l'équation de la droite de régression ainsi que les écarts-types sur la pente et sur l'ordonnée à l'origine.
- Déterminer la concentration en acide acétique de l'échantillon de vin en utilisant les aires moyennes obtenues à partir des 3 injections.
- A partir de la droite de régression, estimer l'écart-type sur concentration mesurée en acide acétique dans l'échantillon de vin.
- Estimer l'écart-type total sur la concentration déterminée en prenant en compte l'écart-type lié à préparation de l'échantillon analysé.

VI. Bibliographie

F. Li, Y. Bao, Y. Yu, H. Cui, Y. Fa, and H. Liu, "Simultaneous Determination of Organic Acids, Inorganic Anions, and Alditols in Wine with Valve-Switching Ion Chromatography" *Chromatographia*, vol. 81, no. 7, pp. 1103-1108, 2018.

F.&A. Rouessac "Analyse chimique Méthode et techniques instrumentales modernes" 3^{ème} édition, MASSON, pp 61–70, 1996