



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

Professeur Jean-Louis CUQ

LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

TABLE DES MATIERES

I. HISTORIQUE	3
II. PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE	4
III. CLASSIFICATION DES METHODES CHROMATOGRAPHIQUES	5
1. Selon la nature des phases	
2. Selon la nature des phénomènes mis en jeu	
3. Selon la technique mise en jeu	
IV. THEORIE DE BASE - GRANDEURS FONDAMENTALES	6
Coefficient de distribution	
1. Grandeurs de rétention t_R, V_R, k'	7
2. Sélectivité d'une colonne α	9
3. Efficacité d'une colonne $N, HEPT,$ Equations de Van Deemter , Knox, Giddings, N_{ef}	10
4. Résolution R_s	12
5. Temps d'analyse N_{ef} / t_R	12
6. Elution linéaire	12
7. Perte de charge ΔP	13
V. OPTIMISATION DES CONDITIONS D'UNE ANALYSE	14
1. Optimisation de la résolution	14
1) Action sur α	
2) Action sur k'	
3) Action sur l'efficacité	
1. <i>Influence de la vitesse de la phase mobile</i>	
2. <i>Influence du diamètre des particules</i>	
3. <i>Influence de la colonne (longueur et diamètre)</i>	
4. <i>Influence de l'injection (position, volume, injecteur)</i>	
2. Optimisation du temps d'analyse	20
1) Optimisation de N_{ef}/t_R	
2) Pression et temps d'analyse	
3. Optimisation de la perte de charge	22
4. Conclusion	23
5. Détermination graphique	24
VI. DIFFERENTS TYPES DE CHROMATOGRAPHIE	25
1. La chromatographie d'adsorption	26
1) Thermodynamique de l'adsorption	26
2) Adsorbants utilisés en CLS	28
1. <i>Adsorbants de type I - silice ou alumine</i>	28

2. Adsorbants de type III - Phases greffées polaires	31
3. Adsorbants de type IV - Phases greffées apolaires	32
a) mécanisme de rétention	33
b) influence de la phase mobile	35
- élution en mode isocratique	
- élution en mode gradient	
c) augmentation de k' (fixation covalente, appariement d'ions)	39
2. La chromatographie de partage	43
1) Phases stationnaires	
2) Phase mobile	
3. La chromatographie d'échange d'ions	46
1) Principaux types de groupements fonctionnels	48
2) Principaux types de matrice	48
3) Influence du pH de la phase mobile	50
4) Influence du type et de la concentration en contre ion	51
5) Effet de la température et de solvants organiques	51
6) Analyse avec supprimeur de phase	52
4. La chromatographie d'exclusion	52
5. La chromatographie chirale	58
6. La chromatographie d'affinité	60
VII. EQUIPEMENTS UTILISES EN CHROMATOGRAPHIE	62
1. Dispositifs d'obtention de gradients	63
2. Les pompes	65
3. Les injecteurs	66
4. La colonne	67
5. Les particules support de phase stationnaire	67
6. La nature des phases stationnaires	69
7. Les connexions	69
8. Les détecteurs	70
VIII. QUANTIFICATION	76
1. Mesure de l'aire par triangulation ou au moyen d'intégrateurs	76
2. Mesure des coefficients de réponse	77
3. Influence des conditions opératoires sur l'analyse quantitative	78
IX. TRANSPOSITION COLONNE - COUCHE MINCE	78
X. COMPARAISON CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE - CHROMATOGRAPHIE GAZ	79
XI. EXERCICES ET CORRIGES	80

I. HISTORIQUE

La chromatographie est une science très ancienne.

Ainsi on trouve la première référence d'un processus chromatographique dans **l'Ancien Testament** qui fait mention de propriétés adsorptives de certaine variété de bois pour adoucir de l'eau amère. Ce sont les tanins hydrophobes qui constituaient une phase stationnaire apolaire (chromatographie d'adsorption)

Aristote décrit les propriétés que possèdent certaines terres pour purifier l'eau de mer. Les phénomènes mis en jeu relèvent ici de l'échange d'ions.

Au XVIème siècle, le strasbourgeois **BRUNSWIG** purifiait de l'éthanol en faisant passer la vapeur à travers une éponge imprégnée d'huile d'olive et réalisait une expérience de chromatographie gaz-liquide 400 ans avant la "découverte" de cette technique.

Toutefois, ce n'est qu'au début du XX^{ème} siècle, plus précisément le 21 mars 1903, que naquit la chromatographie. Ce jour-là **TSWETT**, botaniste d'origine russe, présenta à Varsovie son premier article sur une nouvelle sorte de phénomène d'adsorption et son application à l'analyse biochimique. Il y décrivait la formation de zone colorées lors de l'élution par l'éther de pétrole de **pigments végétaux** dans une colonne remplie de **carbonate de calcium**.

L'origine du mot chromatographie vient peut-être de cette séparation de composés colorés puisque **CHROMA** (Χρῶμα) en grec, signifie couleur.

Puis les travaux de TSWETT tombèrent dans l'oubli pendant une vingtaine d'années et il faudra attendre 1931 la publication de **KUHN** et **LEDERER** sur la séparation des isomères du carotène et de la xanthophylle pour assister au développement de la chromatographie en tant qu'outil analytique.

A partir de cette date, la chromatographie prit son véritable essor

- **1934**, premier livre de **ZECHMEISTER** et **CHOLNOKY**, qui par son succès, contribua à vulgariser la chromatographie.

- **1938**, **KUHN** reçut le Prix Nobel.

Livre La chromatographie en phase mince par **IZMAILOV** et **SCHRAIBER**
Chromatographie d'échange d'ions sur zéolithes.

- **1941**, La chromatographie de partage, **MARTIN-SYNGE**

- **1944**, La chromatographie sur papier, **CONSDEN-GORDON, MARTIN**

- **1948**, Prix Nobel à **TISELIUS** (premier détecteur optique par mesure du changement d'indice de réfraction, premier système de gradient d'élution)

- **1952**, Prix Nobel à **MARTIN** et **SYNGE**

MOORE et **STEIN** Chromatographie d'échange ionique (Prix Nobel)

- **1959**, Chromatographie sur gel (**PORATH, FLODIN**)

- **1969**, Avènement de la chromatographie liquide moderne (HPLC, FPLC)

II. PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE

Il s'agit de la réalisation d'un tri entre les différentes espèces moléculaires d'un mélange.

On va ainsi forcer toutes les molécules à effectuer un parcours commun parsemé d'obstacles : certaines espèces le franchiront aisément d'autres auront plus de difficultés. A l'arrivée, il y aura échelonnement. Pour entraîner les molécules il faut les véhiculer dans un fluide : **la phase mobile** qui peut être soit un liquide soit un gaz.

L'obstacle à franchir, qui ne doit pas être entraîné par la phase mobile, doit être fixe et produire des effets reproductibles : il constitue la **phase stationnaire**. Cette phase stationnaire, le plus souvent emprisonnée dans une colonne, peut être un solide ou un liquide immobilisé sur un solide.

La séparation idéale est schématisée sur la Figure 1.

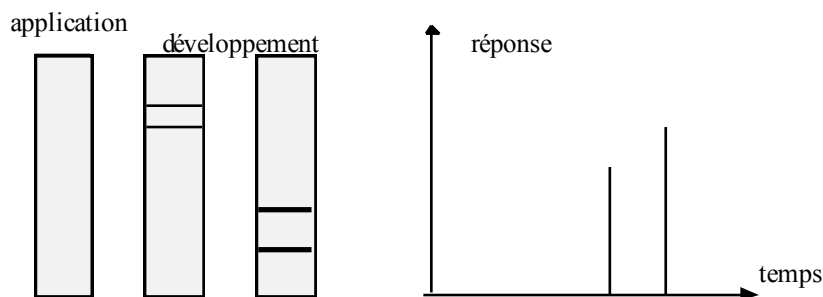


Figure 1. Séparation chromatographique idéale

Les facteurs qui contrôlent la séparation sont surtout d'ordre **thermodynamique**: la rétention de l'échantillon sur la colonne est donc contrôlée thermodynamiquement. Il est nécessaire qu'il y ait interaction entre l'analyte et la phase stationnaire. En pratique la séparation idéale n'est pas réalisable. Ainsi il se produit un élargissement des bandes en raison surtout des phénomènes de diffusion. Les facteurs qui contrôlent la diffusion sont surtout de **nature cinétique** et peuvent être considérés indépendamment des facteurs thermodynamiques qui influencent la rétention (figure 2).

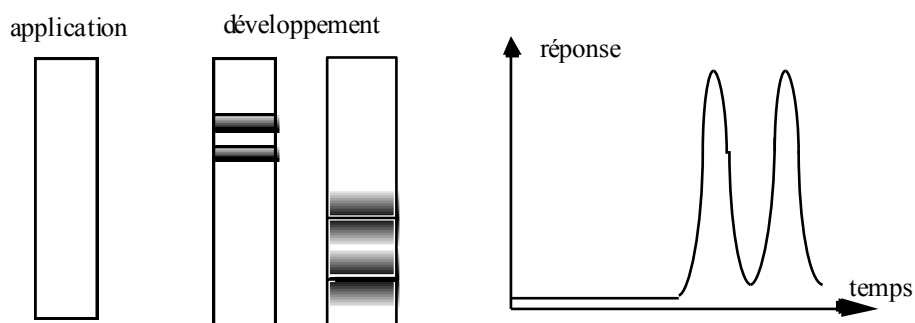


Figure 2. Séparation chromatographique réelle (non idéale)

On peut classer les méthodes chromatographiques de trois manières:

- selon la **nature des phases**
- selon la **nature des phénomènes mis en jeu dans la séparation**
- selon la **technologie mise en oeuvre**.

III. CLASSIFICATION DES METHODES CHROMATOGRAPHIQUES

III.1. Classification selon la nature des phases

Selon la nature de la phase mobile on distingue:

- | | |
|---|------------|
| - la chromatographie en phase liquide | CPL |
| - la chromatographie en phase gazeuse | CPG |
| - la chromatographie en phase supercritique | CPS |

Selon la nature de la phase stationnaire on distingue:

- | | |
|--|------------|
| - la chromatographie gaz / solide | CGS |
| - la chromatographie gaz / liquide | CGL |
| - la chromatographie liquide / solide | CLS |
| - la chromatographie liquide / liquide | CLL |

La chromatographie en phase supercritique est une chromatographie dans laquelle la phase mobile est un gaz comprimé (à sa température et à sa pression critique) ou une phase liquide / vapeur de même densité (au-delà de la température critique, le gaz ne peut être liquéfié quelle que soit sa pression). Avec cette phase mobile, le plus souvent l'anhydride carbonique, la durée de l'analyse est de 5 à 10 fois plus courte qu'avec les phases mobiles liquides. De viscosité très faible, cette phase mobile permet un couplage facile avec des détecteurs comme le spectromètre de masse ou le détecteur par mesure de la diffusion de la lumière.

III.2. Classification selon la nature des phénomènes mis en jeu

Cette classification repose sur la nature de la phase stationnaire et son interaction avec les molécules à séparer.

On distingue ainsi:

III.2.1. La chromatographie d'adsorption

C'est la méthode la plus ancienne et "encore" la mieux connue. La séparation entre les molécules est fondée sur le processus répété d'adsorption et désorption par la phase stationnaire. Dans les premières études les phases stationnaires « modèles d'études » étaient la silice et la cellulose. En conséquence, les phénomènes étudiés correspondaient essentiellement à des interactions de type liaison hydrogène. D'autres phases ont été utilisées depuis avec des mécanismes d'échange impliquant des liaisons Van der Waals, hydrogène et des interactions hydrophobes (cf chapitre VI).

Il s'agit de chromatographie liquide-solide (**CLS**)

III.2.1. La chromatographie de partage

La séparation est fondée sur les différences de solubilité des molécules à séparer entre phase mobile et phase stationnaire liquide (phase qui imprègne ou qui est greffée sur un solide).

Il s'agit alors de chromatographie liquide-liquide (**CLL**).

On multiplie ici les partages entre phases de la même façon que si l'on disposait de plusieurs milliers d'ampoules à décanter contenant deux solvants non miscibles.

III.2.3. La chromatographie d'échange d'ions

La phase stationnaire est un solide à la surface duquel se trouvent des groupements ionisés : échangeur d'ions. Un soluté ionisé de charge opposée se trouvera d'autant plus retenu que sa charge (opposée à celle

de la phase stationnaire) sera plus forte. C'est la loi de COULOMB qui régit ces échanges de forte énergie (40 à 80 kJ.mole⁻¹) :

$$F = \frac{q \cdot q'}{d^2} \cdot \frac{1}{\varepsilon \cdot \varepsilon_0}$$

La phase stationnaire solide est généralement poreuse et renferme dans ses pores une phase liquide qui peut jouer un rôle très important dans les séparations. On peut ainsi parler pour ce type de chromatographie de CLS mais aussi de CLL.

III.2.4. La chromatographie d'exclusion encore qualifiée de chromatographie de perméation ou de filtration sur gel

La phase stationnaire est un solide poreux dont la dimension des pores est voisine de celle des molécules à séparer : celles qui sont trop volumineuses pour pénétrer dans les pores sont exclues de la phase stationnaire et sont éluées les premières.

Ici encore on peut parler indifféremment de CLS ou de CLL.

III.2.5. La chromatographie d'affinité

Très utilisée par les biochimistes, elle consiste à fixer par exemple une enzyme sur la phase stationnaire de façon à complexer sélectivement les substrats correspondants (ou vice versa). Il s'agit là d'une association entre une molécule polyfonctionnelle et une phase stationnaire comportant des sites stériquement définis et de capacité d'échange multiple. Il s'agit souvent d'un système coopératif d'interactions différentes (ioniques, hydrophobe, Van der Waals, hydrogène), liaisons parfaitement positionnées dans l'espace.

Il est bon de rappeler qu'il ne peut pas exister de phase stationnaire « inerte ». Quelle que soit sa structure elle sera toujours capable de donner des interactions d'un type donné. Dans la mesure où le système requiert un niveau d'interaction le plus faible possible, c'est par les choix judicieux des phases mobiles et stationnaires qu'il sera possible d'y parvenir.

III.2. Classification selon la technique mise en jeu

Selon la technologie mise en jeu on distingue:

- la chromatographie sur colonne
- la chromatographie de surface (chromatographie sur papier ou chromatographie sur couche mince).

IV. THEORIE DE BASE - GRANDEURS FONDAMENTALES

En chromatographie en phase liquide, les séparations sont basées sur la différence de distribution des espèces entre deux phases non miscibles l'une **stationnaire** (particules solides imprégnées ou non d'un liquide), l'autre **mobile** (liquide).

Pour un système chromatographique donné, le **coefficient de distribution K** (ou coefficient de partage) est défini par:

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

C_s : concentration du soluté dans la phase stationnaire

C_m : concentration du soluté dans la phase mobile.

Si les molécules d'un mélange ont des affinités différentes pour chacune des deux phases, il apparaît des différences entre deux vitesses de migration d'où possibilité de séparation. La migration sera d'autant plus lente que l'affinité de la molécule pour la phase stationnaire sera grande.

Rappelons que la solubilité d'un analyte dans une phase mobile donnée passe d'abord par la possibilité d'établissement d'échanges (liaisons). Sans échange il n'y a pas de solubilité possible et deux phases apparaissent.

Une bonne séparation en chromatographie liquide implique :

1. que les **divers constituants du mélange soient retenus** sur la colonne, donc présentent une affinité pour la phase stationnaire suffisante pour qu'ils apparaissent dans l'effluent après un volume supérieur au volume interstitiel de la colonne
2. que les **différents pics soient bien séparés**, ce qui pour deux pics successifs dépend de la distance séparant les sommets et leur largeur.
3. que l'analyse soit aussi **rapide** que possible.

IV.1. GRANDEURS DE RETENTION

Si la quantité injectée est petite on obtient pour chaque composé élué un pic symétrique et gaussien (figure 3). On définit ainsi les paramètres suivants :

IV.1.1. Le temps de rétention (t_R)

C'est le temps d'élution au maximum du pic mesuré à partir de l'injection.

Un chromatogramme type est schématisé, avec les paramètres principaux d'évaluation, sur la figure 3.

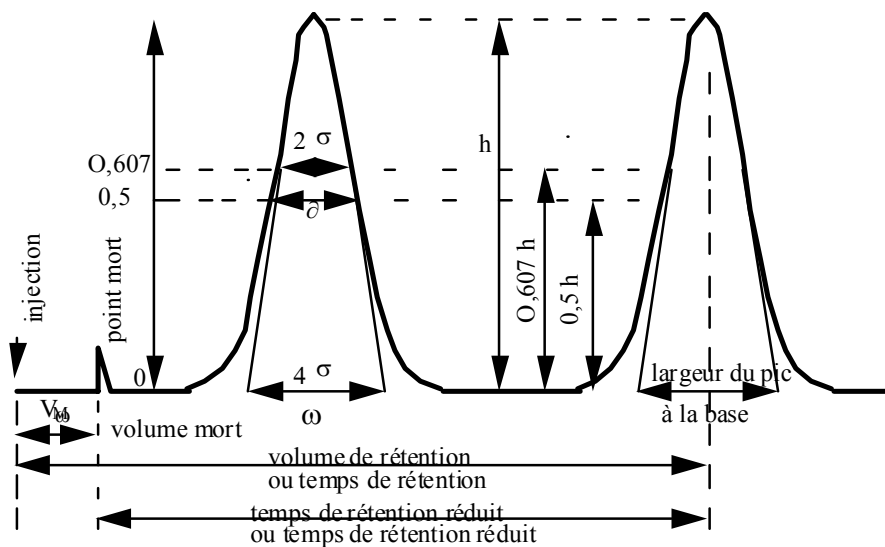


figure 3. Principaux paramètres d'un chromatogramme

IV.1.2. Le volume de rétention (V_R)

Connaissant le débit D de la phase mobile, supposé maintenu constant, on définit le volume de rétention

$$V_R = t_R \cdot D = t_R \cdot v \cdot s$$

$$V_M = t_0 \cdot D$$

v : vitesse linéaire de la phase mobile
 $s = s' \cdot \epsilon$ avec s' : section de la colonne et $\epsilon = V_M / V_T$ (porosité)

V_R représente, à l'étalement près, le volume de phase mobile nécessaire pour éluer chaque composé.

V_M est le volume de phase mobile dans la colonne.

t_R et V_R sont des grandeurs caractéristiques d'un composé (pour une colonne donnée, un éluant donné et des conditions expérimentales fixées) qui servent à l'analyse qualitative d'un mélange.

Les espèces non retenues par la phase stationnaire apparaissent dans l'effluent après le temps t_0 correspondant à l'écoulement du volume interstitiel de la colonne ou volume de phase mobile V_M contenu dans la colonne.

Le **volume de rétention V_R** est relié directement au coefficient de distribution K par la relation:

$$V_R = V_M + K V_S$$

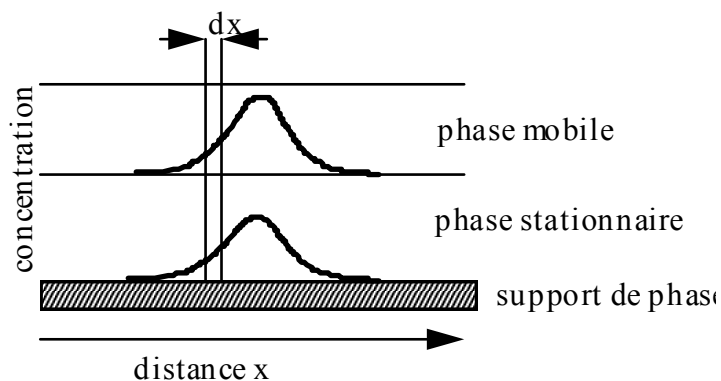
V_S : volume de la phase stationnaire (ou masse ou surface spécifique selon les unités de K)

Cette relation ne s'applique que dans le cas d'élution linéaire c'est-à-dire quand K varie linéairement avec la concentration du composé dans chaque phase.

IV.1.3. Le facteur de capacité k' (ou facteur de rétention)

Pour s'affranchir des paramètres géométriques de la colonne, on utilise, pour caractériser la rétention d'un composé le facteur de capacité. En effet si K varie non linéairement avec la concentration en composé dans chaque phase, un pic asymétrique se produit et V_R varie avec la concentration du composé.

Si on considère une petite section de bandes de longueur dx le rapport des quantités du composé dans les deux phases de cette section est le facteur de capacité de la colonne k' .



$$k' = \frac{q_s}{q_M} = \frac{C_s \cdot A_s \cdot dx}{C_M \cdot A_M \cdot dx} = \frac{C_s \cdot V_s}{C_M \cdot V_M} = K \frac{V_s}{V_M}$$

A_S et A_M surface des sections de la phase stationnaire et de la phase mobile.

k' est le paramètre le plus important en chromatographie liquide.

De l'équation $V_R = V_M + K V_S$ on tire

$$V_s = \frac{V_R - V_M}{K}$$

d'où :

$$k' = K \cdot \frac{V_R - V_M}{K \cdot V_M} = \frac{V_R - V_M}{V_M} = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Le temps et le volume de rétention sont liés au facteur de capacité par les relations :

$$t_R = t_0 (1 + k')$$

$$V_R = V_M (1 + k')$$

IV.2. SELECTIVITE D'UNE COLONNE

Pour caractériser la distance séparant les sommets de deux pics on utilise le facteur de sélectivité :

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}$$

Il s'agit du rapport des **temps de rétention réduits**

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \text{ soit } t_R - t_0 = k' \cdot t_0 \text{ et } k' = K \cdot \frac{V_s}{V_M}$$

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{K_2}{K_1}$$

t_0 et V_M ne dépendent que de la colonne

Le facteur de sélectivité mesure la différence de distribution thermodynamique des deux composés. On démontre que si $\Delta(\Delta G^\circ_0) = \Delta G^\circ_2 - \Delta G^\circ_1$ (différence des énergies libres de distribution des deux composés) on a :

$$\Delta(\Delta G^\circ) = -RT \ln \alpha$$

IV.3. EFFICACITE D'UNE COLONNE. Nombre de plateaux théoriques et de plateaux efficaces

L'efficacité d'une colonne chromatographique, dont dépend l'étalement des pics, est mesurée, pour chaque composé, par le nombre de plateaux théoriques N de la colonne.

Cette théorie est née de la recherche d'un modèle statique permettant de décrire le fonctionnement d'une colonne chromatographique comme celui d'une colonne à distiller.

Au lieu de considérer le déplacement réel, continu de la phase mobile, on admet que celle-ci progresse par sauts successifs et se met en équilibre avec la phase stationnaire entre deux transferts, ce qui permet de découper fictivement la colonne en un certain nombre de zones dans lesquelles les équilibres sont réalisés et que l'on appelle plateaux théoriques. On peut ainsi calculer le profil de répartition des espèces, de proche en proche, après chaque transfert et dans chaque plateau.

Une colonne est alors dite comporter N plateaux théoriques si, dans des conditions données, elle a la même efficacité qu'une colonne fictive de N plateaux théoriques.

La théorie des plateaux établit qu'après un certain parcours dans la colonne, les pics d'élution peuvent être assimilés à des courbes de Gauss dont l'écart type (exprimé en unité de temps) est lié au nombre de plateaux théoriques parcourus par la relation :

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2$$

Les caractéristiques géométriques de la courbe de Gauss (figure 3) permettent de calculer, pour un soluté donné, N à partir du chromatogramme.

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{\omega} \right)^2 = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{\delta} \right)^2$$

ω largeur du pic à la base: distance entre les points d'intersection des tangentes au point d'inflexion avec la ligne de base et δ largeur du pic à mi-hauteur.

Pour comparer entre elles des colonnes de différentes longueurs on définit la hauteur équivalente à un plateau théorique.

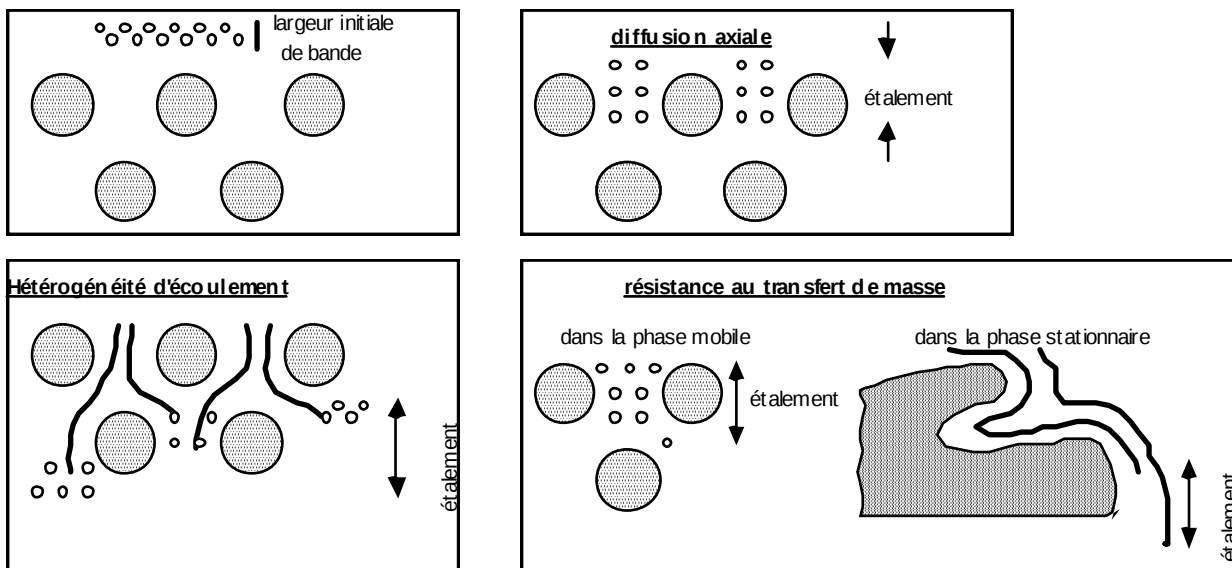
$$\text{HEPT} = \frac{L}{N} \quad L \text{ longueur de la colonne.}$$

En HPLC les HEPT sont comprises entre 0,001 et 1 mm.

Dans la théorie des plateaux, la HEPT ($= L \cdot \sigma^2 / t_R^2$) déduite de la variance n'apparaît que comme une mesure globale de l'influence de tous les paramètres expérimentaux. Divers modèles ont été élaborés pour préciser les divers paramètres intervenant dans l'élargissement des pics.

Ainsi l'étalement d'une bande de soluté a trois origines :

- la **dispersion par diffusion axiale**
- l'**existence de chemins multiples** dus au remplissage (hétérogénéité d'écoulement)
- la **résistance au transfert de masse** dans chacune des 2 phases.



Principales origines de l'étalement d'un « pic » d'analyte en CSL

Ainsi la HEPT totale est la somme de termes dans lesquels les variances seront égales à la variance totale.

$$\text{HEPT} = \sum_i \text{HEPT}_i$$

Ainsi la théorie cinétique conduit à l'équation de VAN DEEMTER

$$\text{HEPT} = X + \frac{Y}{v} + Z \cdot v$$

v vitesse réduite = vitesse linéaire de la phase mobile.

• **X** est l'influence de la diffusion turbulente due aux hétérogénéités dans l'écoulement. Il existe plusieurs chemins possibles pour la phase mobile. Cet effet sera d'autant moins prononcé que les particules seront de même forme (sphérique) et de même dimension (d'où la nécessité d'utiliser de telles phases).

• **Y / v** est l'influence de la dispersion des molécules par diffusion longitudinale; **Y / v** est proportionnel au coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile D_M .

$$Y = 2 \gamma D_M \quad \gamma \text{ facteur de tortuosité } (> 1)$$

Y / v diminue quand **v** augmente. Comme D_M est faible en milieu liquide, **Y / v** est généralement négligeable.

• **Zv** est l'influence de la résistance au transfert de masse. **Z** peut être diminué en réduisant les distances à parcourir par le soluté dans chaque phase (diminution du diamètre des particules).

Cette approche est surtout utilisée en chromatographie phase vapeur.

En chromatographie liquide on utilise souvent l'équation de KNOX

$$\text{HEPT} = X \cdot v^{1/3} + \frac{Y}{v'} + Z \cdot v'$$

v' vitesse réduite

$$v' = \frac{v \cdot d_p}{D_M}$$

D_M coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile

d_p diamètre des particules

$$\text{HEPT}' = \frac{H}{d_p}$$

L'équation de **GIDDINGS**, basée sur les théories du cheminement aléatoire conduit à une expression analogue pour la HEPT.

$$\text{HEPT} = X + \frac{Y}{v} + Z \cdot v + \sum \frac{1}{\frac{1}{X} + \frac{1}{Z_M \cdot v}}$$

Au concept du nombre de plateaux théoriques, on peut associer la notion de plateaux efficaces :

$$N_{\text{ef}} = \left(\frac{k'}{1 + k'} \right)^2 \cdot N \quad \text{soit} \quad N_{\text{ef}} = \frac{16 \cdot (t_R - t_0)^2}{\omega^2} \quad \text{soit encore} \quad N_{\text{ef}} = \frac{5,54 (t_R - t_0)^2}{\delta^2}$$

Ce nombre de plateaux efficaces permet d'apprécier de manière plus concrète la véritable efficacité de séparation de la colonne. En effet, si k' est petit, la séparation peut être impossible même avec N grand.

La **capacité de pics** d'une colonne est définie par :

$$n = 1 + \sqrt{\frac{N}{16}} \cdot \ln \left(\frac{t_\omega}{t_\alpha} \right)$$

N : nombre de plateaux théoriques

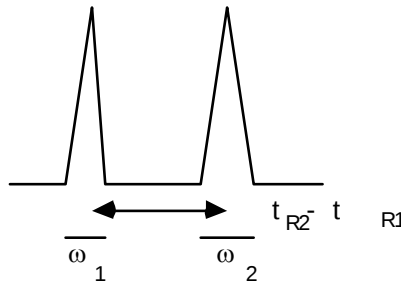
t_{α} et t_{ω} temps de rétention du premier et du dernier pic du chromatogramme.

Il est nécessaire que n soit supérieur au nombre de composés pour que la résolution soit correcte. HERMAN (1985) a montré qu'avec $n = 60$ on a 90 % de probabilité de séparer 9 composés.

IV. 4. RESOLUTION

La résolution R_S entre deux pics est définie par la relation :

$$R_S = 2 \cdot \frac{t_{R1} - t_{R2}}{\omega_1 + \omega_2}$$



Plus R_S est grand, meilleure est la séparation.

La séparation est complète quand $R_S = 1$ (2 % de recouvrement des 2 pics)

En supposant $\omega_2 = \omega_1$, on a :

$$R_S = \frac{1}{4} \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{k'_2}{1 + k'_2} \right) \cdot \sqrt{N_2}$$

IV.5. TEMPS D'ANALYSE. (Nombre de plateaux efficaces par unité de temps)

$$t_R = (1 + k') \cdot \frac{L}{v}$$

v vitesse linéaire de la phase mobile. Comme $HEPT = L / N$ et $t_0 = L / v$

$$t_R = N \cdot (1 + k') \cdot \frac{HEPT}{v}$$

$$N_{ef} = \left(\frac{k'}{1 + k'} \right)^2 \cdot N \quad \text{d'où (division)}$$

$$\frac{N_{ef}}{t_R} = \frac{v}{HEPT} \cdot \frac{k'^2}{(1 + k')^3}$$

IV.6. ELUTION LINEAIRE

Dans le cas d'une élution linéaire, le coefficient de distribution varie linéairement avec la quantité injectée. A une température donnée, la courbe C_S en fonction de C_M est l'isotherme d'adsorption. Cet isotherme peut être linéaire, concave ou convexe (figure 4).

En général en chromatographie liquide la sensibilité des détecteurs est suffisante pour permettre l'injection de faibles quantités et l'on se trouve dans la partie linéaire de l'isotherme. La pente est égale

$$C_S = K \cdot C_M$$

au coefficient de distribution K .

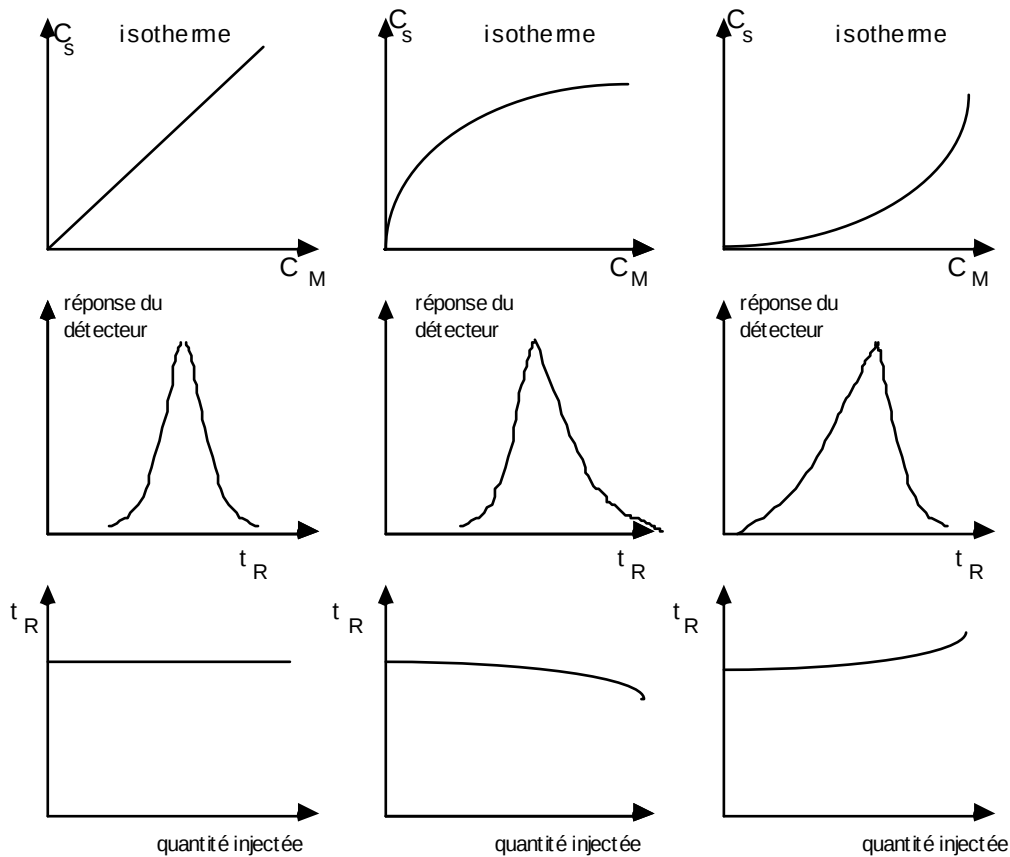


Figure 4. Influence de la forme de l'isotherme d'adsorption sur la géométrie du pic et sur le temps de rétention.

IV.7. PERTE DE CHARGE DANS UNE COLONNE (Loi de DARCY)

$$\Delta P = \frac{\eta L v}{K^0}$$

avec

$$K^0 = \frac{d_p^2}{180} \cdot \frac{\varepsilon^3}{(1 - \varepsilon)^2}$$

ΔP	perte de charge (en barye = 10^{-6} bars)
η	viscosité (poise)
L	longueur de la colonne (cm)
v	vitesse de la phase mobile (cm.s^{-1})
K^0	constante de perméabilité (cm^2)
d_p	diamètre des particules (cm)
ε	porosité interstitielle (volume interstitiel de la colonne/volume total).

VERILLON et al., International Laboratory, July 1992, 29-35 proposent la loi suivante :

$$\Delta P = 400 \cdot \frac{F \cdot L \cdot \eta}{d_p^2 \cdot d_c^2}$$

avec ΔP en MPa

F débit en ml.min⁻¹

L longueur de la colonne en cm

η viscosité en cP

d_p diamètre des particules en μm et d_c diamètre de la colonne en mm

V. OPTIMISATION DES CONDITIONS D'UNE ANALYSE

L'idéal est d'obtenir une résolution élevée en un temps très court.

- On peut envisager d'augmenter la longueur de la colonne (la vitesse d'analyse va augmenter ainsi que la perte de charge).
- On peut diminuer le diamètre des particules (HEPT diminue, mais la perte de charge augmente).
- On peut augmenter la vitesse de la phase mobile (HEPT augmente, la pression aussi).

V.1. OPTIMISATION DE LA RESOLUTION

Il faut augmenter R_s

$$R_s = \frac{1}{4} \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{k'_2}{1 + k'_2} \right) \cdot \sqrt{N_2} \quad \text{ou} \quad R_s = \frac{1}{4} \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) (N_{ef})^{1/2}$$

R_s doit être > 1

V.1.1. Action sur la sélectivité α

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}$$

La résolution augmente quand α augmente.

La séparation n'est possible que si $\alpha \neq 1$.

Le nombre de plateaux efficace (N_{ef}) nécessaires pour obtenir une résolution donnée en fonction de α diminue très vite quand $\alpha > 1$ (tableau 1).

Cette forte influence de α justifie l'utilisation de phases stationnaires ayant des groupements fonctionnels adéquats.

La sélectivité peut être modifiée :

- en changeant la nature et la composition de la phase mobile ce qui induit des effets secondaires (pH - ionisation etc...)
- en changeant la nature de la phase stationnaire
- en modifiant la température.

Tableau 1. Variation du nombre de plateaux efficaces en fonction de α pour obtenir $R_S = 1$ ou $R_S = 1,5$

α	N_{ef}	
	$R_S = 1$	$R_S = 1,5$
1,01	160 000	360 000
1,05	6 800	15 700
1,10	1940	4 360
1,15	940	2 110
1,20	575	1 300
1,25	400	900

V.1.2. Action sur le facteur de capacité k' (nature de phase stationnaire surtout)

Si $k' = 0$ les deux solutés sont élués simultanément et après écoulement du volume interstitiel.

La résolution augmente quand k' augmente, mais de moins en moins vite car $\frac{k'}{k'+1}$ tend rapidement vers 1.

Le temps d'analyse augmente beaucoup plus rapidement que k' car on a :

$$t_{R2} = (1 + k'_2) \cdot \frac{L}{v}$$

L longueur de la colonne et v vitesse linéaire réduite.

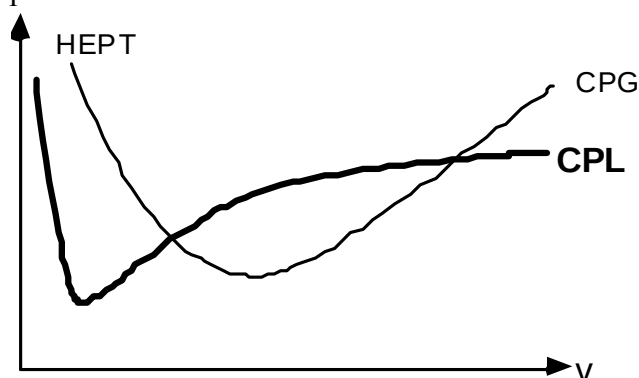
(si k' augmente de 5 à 10, R_S augmente de 9 %, le temps d'analyse de 80 %).

V.1.3. Action sur l'efficacité

Doubler N multiplie R_S par 1,41. Il n'y a pas de limite à l'accroissement de R_S avec N . Si on augmente N en doublant la longueur de la colonne, on double t_R car $t_R = L / v \cdot (1+k')$. Il faut diminuer HEPT.

V.1.3.1. Influence de la vitesse de la phase mobile sur HEPT

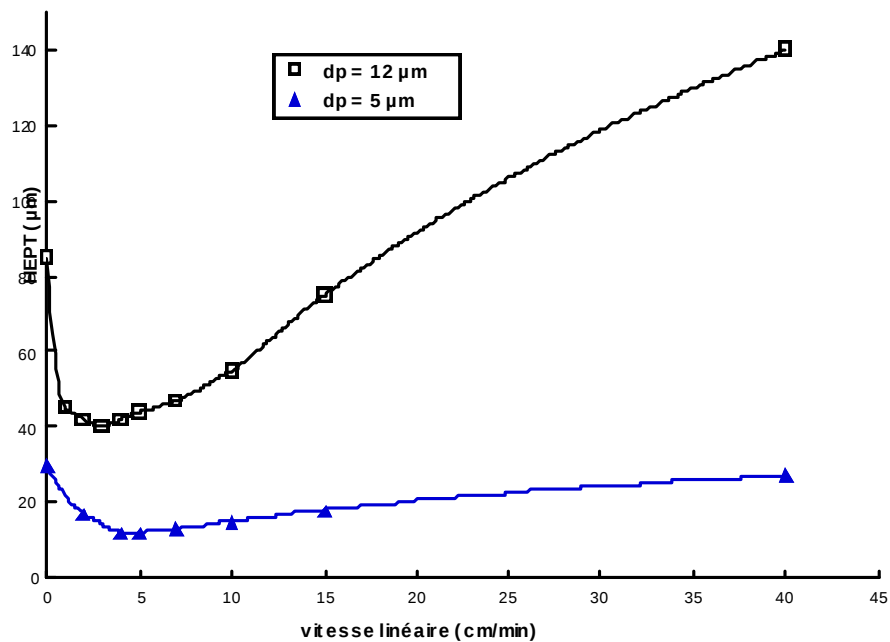
L'équation de VAN DEEMTER (ou de KNOX) permet de suivre les variations de HEPT en fonction de la vitesse linéaire de la phase mobile.



Cependant, dans un certain domaine de vitesse de la phase mobile, la HEPT déterminée expérimentalement vérifie la relation de SNYDER.

$$HEPT = A v^n$$

n généralement compris entre 0,2 et 0,7. A : constante pour une colonne donnée; v : vitesse linéaire réduite de la phase mobile; n : coefficient fonction de la séparation étudiée.



On peut accroître l'efficacité d'une colonne en diminuant v . Cependant en-dessous de 3 ml.min⁻¹ HEPT passe par un minimum puis croît en raison de la diffusion longitudinale.

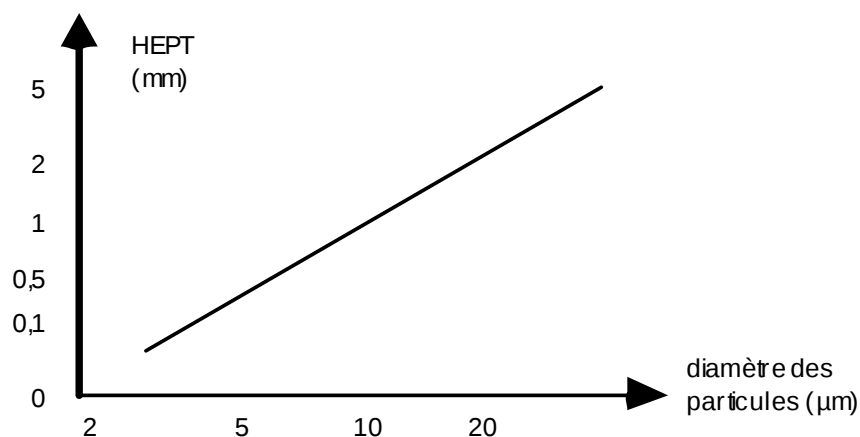
V.1.3.2. Influence du diamètre des particules sur HEPT

La résistance au transfert de masse constitue le facteur limitatif à la cinétique des échanges et pour augmenter celle-ci il faut diminuer au maximum la distance que doit parcourir le soluté entre les différents sites, ce qui est possible en diminuant la taille des particules.

Empiriquement il a été démontré que

$$\text{HEPT} = B \cdot d_p^\beta$$

d_p diamètre des particules; B et b constantes pour une colonne donnée. Les valeurs de β sont sensiblement constantes et voisines de 1,6 à 1,8.



La figure ci-dessus illustre le gain d'efficacité quand on passe d'une silice avec $d_p = 20 \mu m$ à $d_p = 3 \mu m$. Le remplissage des colonnes avec des phases stationnaires de fine granulométrie entraîne une

augmentation importante de l'efficacité, donc de la résolution . Un compromis doit cependant être réalisé car si d_p diminue, la perte de charge augmente de façon inversement proportionnelle à d_p^2

$$\Delta P = \frac{\eta \cdot L \cdot v \cdot 180 \cdot (1 - \phi)^2}{d_p^2 \cdot \varepsilon^3}$$

et des difficultés de remplissage apparaissent. L'exemple de séparation chromatographique de phénothiazines obtenu pour deux d_p est donné ci-dessous.

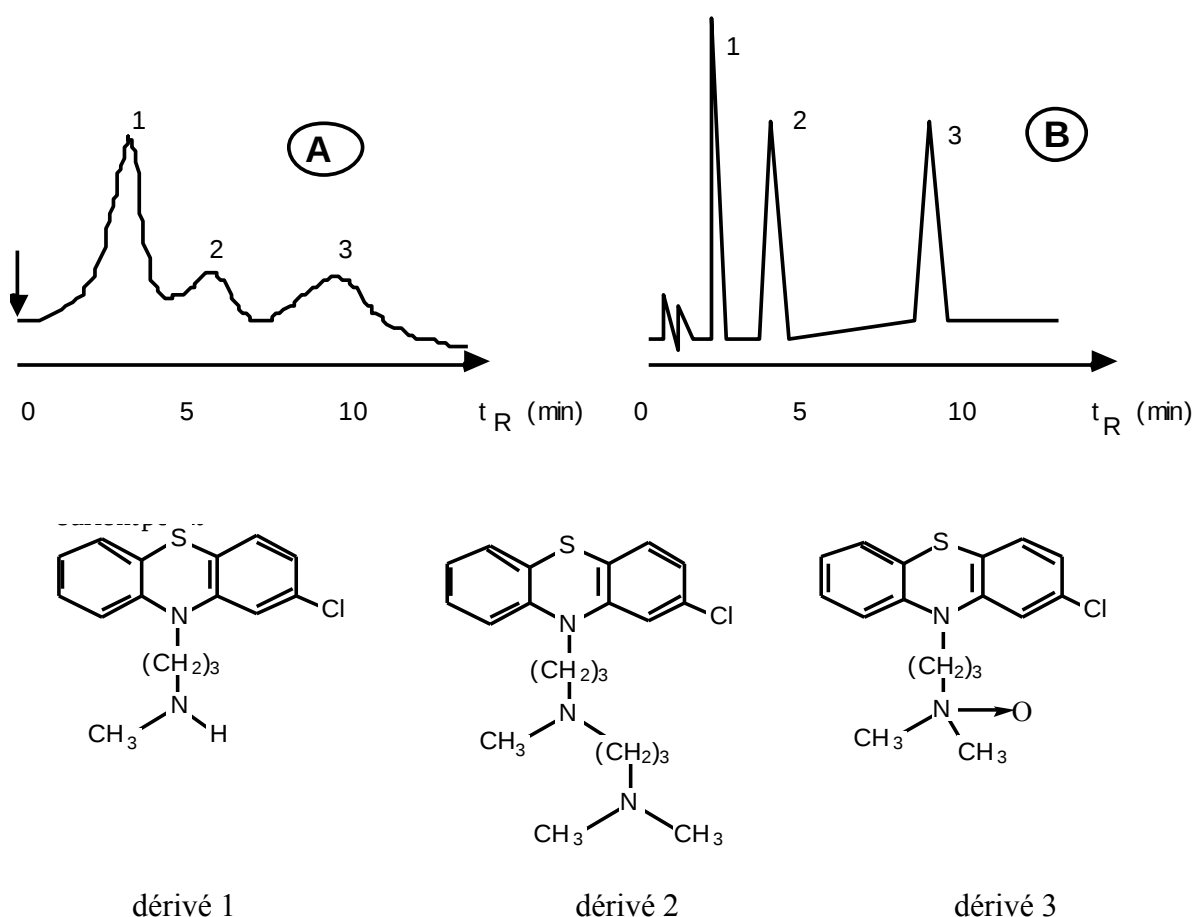


Figure 4. Comparaison des chromatogrammes de 3 phénothiazines ($k'_1 = 3$; $k'_2 = 6,5$; $k'_3 = 15$) en fonction du diamètre des particules d'un gel de silice. Colonne de 25 cm L et 2,1 mm de Ø, $v = 0,7 \text{ cm.s}^{-1}$, détection 254 nm. Phase mobile : acétate d'éthyle / méthanol / éthylamine à 33 % (80/20/0,25).

A $d_p = 40 \text{ mm}$, $P = 3 \text{ bars}$

B $d_p = 10 \text{ mm}$, $P = 35 \text{ bars}$

V.1.3.3. Influence des caractéristiques de la colonne

a) Influence de la longueur de la colonne

Dans des conditions idéales de remplissage de la colonne, la HEPT est indépendante de la longueur de la colonne et l'efficacité de la colonne est proportionnelle à sa longueur $HEPT = L / N$. En réalité, selon d_p , le remplissage de la colonne n'est pas idéal et HEPT varie (Tableau 2 pour la phénothiazine 1). Rappelons que la perte de charge est proportionnelle à la longueur de la colonne.

tableau 2. Variation de la HEPT pour la phénothiazine I en fonction de la longueur de la colonne (L) et de d_p et en fonction du diamètre de la colonne.

diamètre de la colonne 21 mm	HEPT (mm)		colonne L = 15 cm silice d_p 10 μm	
	L (cm)	silice d_p 10 μm	silice d_p 10 μm	diamètre de colonne (mm)
	15	0,33	4,1	6,36
	25	0,34	4,0	4,3
	50	0,5	3,4	2,1
	100	0,6 à 3,3	4,5	

Le modèle de colonne le plus utilisé a **25 cm de longueur et 4,6 mm de diamètre**.

Ces colonnes sont en acier inoxydable. Remplies d'une phase stationnaire avec des particules sphériques de 5 μm de diamètre, elles permettent, selon la nature de la phase stationnaire, de réaliser la plupart des séparations attendues dans les sciences des aliments. Des colonnes de 3 cm x 4,6 mm permettent des analyses de mélanges simples en routine.

Dans le plupart des analyses une **pré-colonne** qui ne diffère de la colonne « analytique » que par sa très faible longueur (par exemple 1 à 2 cm pour une colonne de 25 cm) permet de protéger la colonne et d'en augmenter la durée de fonctionnement.

b) influence du diamètre

D'une façon générale les colonnes de faible diamètre (< 5 mm) sont plus efficaces, la différence étant d'autant plus grande que d_p est petit (tableau 2). Le phénomène est dû à un remplissage plus homogène des colonnes de faible diamètre par rapport à celui des colonnes de très faible diamètre (cf IV-7).

Les colonnes Microbore ont des diamètres internes de 1 à 2,1 mm. Leur mauvais succès résulte surtout de la généralisation d'équipement adaptés aux colonnes de 4,6 mm de diamètre. Le passage d'une colonne de 4,6 mm à 1 mm se traduit par une diminution de débit d'un facteur 21. Il faut alors disposer de pompes capables de délivrer avec constance des débits de l'ordre de 30 à 50 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$. Si un système d'élution par gradient est utilisé il faut alors disposer de pompes capables de délivrer les phases mobiles avec des débits contrôlés de quelques $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ pour la pompe qui délivre les plus petits débits de phase mobile.

Il existe des **colonnes capillaires** dont le diamètre varie entre 10 et 300 μm . Elles sont remplies avec des particules de 0,2 à 0,5 μm de diamètre.

Par exemple une colonne de 192 mm x 0,3 mm permet la séparation de 5 protéines en 30 secondes avec un débit de 1,2 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ce qui représente une vitesse linéaire de phase mobile de 128 $\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$. La pression atteinte n'est que de 24 bar.

De tels systèmes qualifiés de **nano-chromatographiques**.

Dupont de Nemours propose de telles colonnes qui posent actuellement des problèmes d'utilisation du fait de la difficulté à trouver les pompes et les connexions nécessaires à leur utilisation mais aussi en raison du

manque de sensibilité de la plupart des détecteurs. En effet les quantités d'analytes sont très faibles et souvent en dessous du seuil de sensibilité des appareils actuels.

V.1.3.4. Influence de l'injection

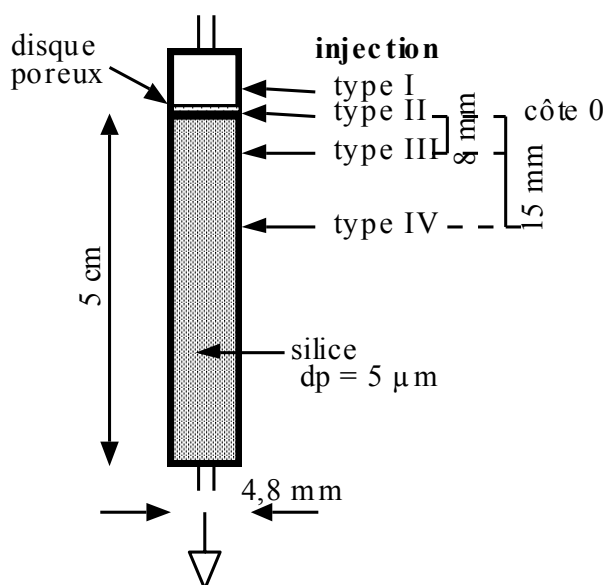
L'injection en chromatographie en phase liquide est une opération délicate actuellement automatisée .

a) Influence de la position de l'injection.

La position de l'injection par rapport au niveau de la phase stationnaire revêt une grande importance (figure 5). L'efficacité passe par un maximum quand l'injection est effectuée quelques mm en-dessous du niveau supérieur de la phase stationnaire.

b) Influence du volume injecté.

Le volume injecté doit être de quelques μl ; s'il augmente, l'efficacité de la colonne diminue (figure 5).



injection		HEPT (μm)
volume (μl)	type	
1	I	36
	II	83
	III	37
	IV	58
10	I	43
	II	95
	III	45
	IV	64

Figure 5. Influence du mode et du volume d'injection sur la HEPT (phénothiazine) $v = 0,25 \text{ cm.s}^{-1}$

De plus l'injection de grands volumes entraîne souvent des déformations des pics. Il apparaît des épaulements ou des dédoublements qui indiquent alors une injection en deux temps.

L'injection doit être rapide et continue avec ou sans interruption de l'écoulement de la phase liquide.

En résumé, il est préférable d'injecter 2 μl d'une solution 10^{-3} M plutôt que 20 μl d'une solution 10^{-4} M .

c) Influence du type d'injecteur

Il existe deux types d'injection (figure 6) :

- l'injection par seringue qui ne se rencontre pratiquement pas en HPLC.

Il est impossible d'emprisonner le volume injecté dans le disque poreux situé sur la tête de colonne, et de ce fait, il se produit une dilution importante du volume injecté dans l'éluant, ce qui entraîne une efficacité plus faible qu'avec l'injection par seringue.

- l'injection par **vanne** (boucle d'échantillonnage). Ce type d'injection qui est celui retenu dans les systèmes automatisés, ne permet pas d'atteindre l'efficacité maximale.

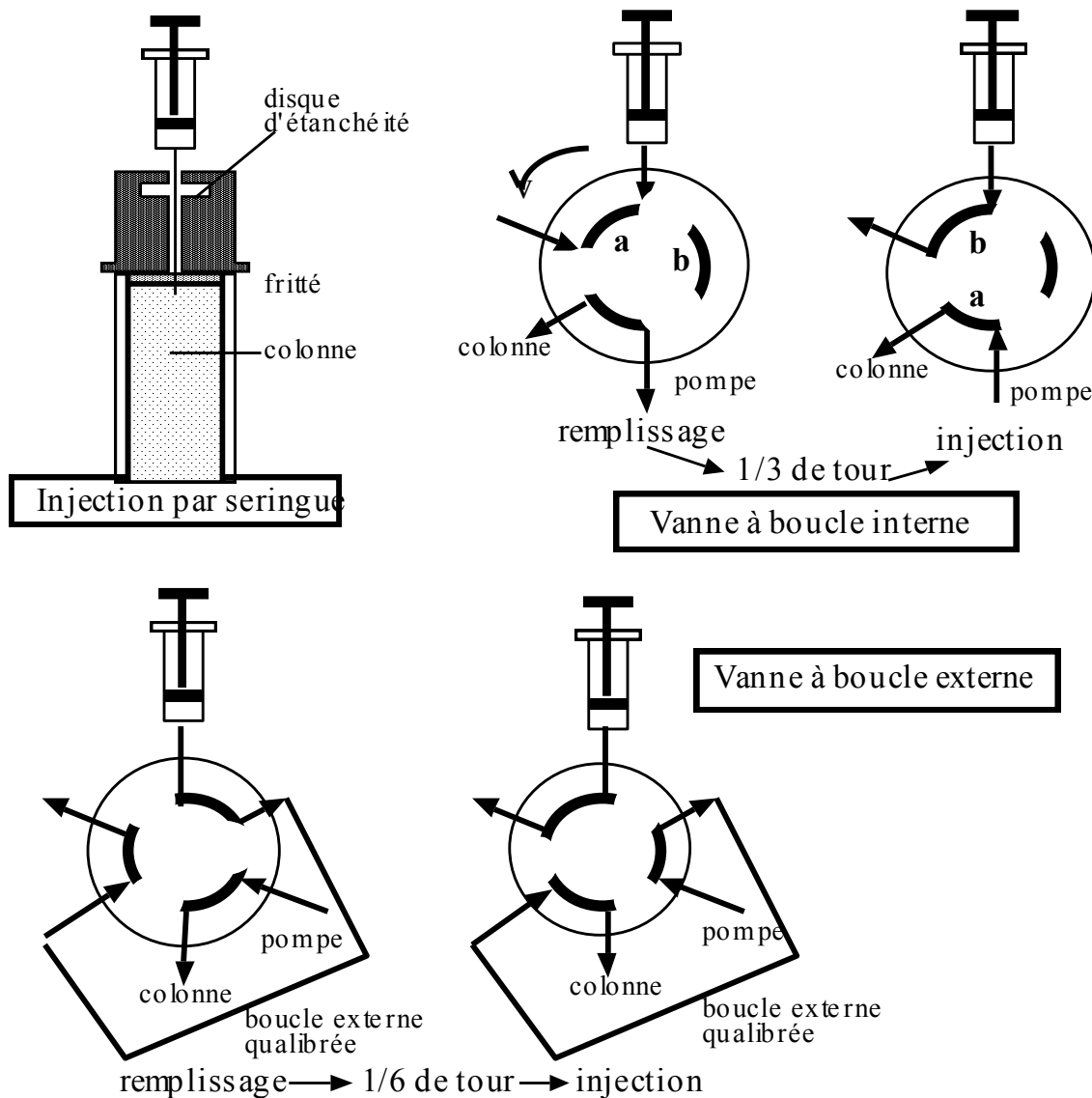


Figure 6. Systèmes d'injection de l'échantillon à analyser en CPL

V.2. OPTIMISATION DU TEMPS D'ANALYSE

Il est important, pour des raisons pratiques, que la durée de l'analyse soit la plus courte possible (environ 10 min). Pour une résolution donnée, il faut donc déterminer les conditions conduisant au temps d'analyse minimum.

V.2.1. Optimisation du nombre de plateaux efficaces par seconde

A résolution et sélectivité données, le nombre de plateaux efficaces nécessaires à la séparation est fixé et donné par :

$$R_s = \frac{1}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \sqrt{N_{ef}}$$

Dans ce cas, le temps d'analyse sera d'autant plus court que le nombre de plateaux efficaces par seconde sera plus grand.

$$\frac{N_{ef}}{t_r} = \frac{v}{HEPT} \cdot \frac{k'^2}{(1+k')^3}$$

a) *Effet du terme* en k' (figure 7)

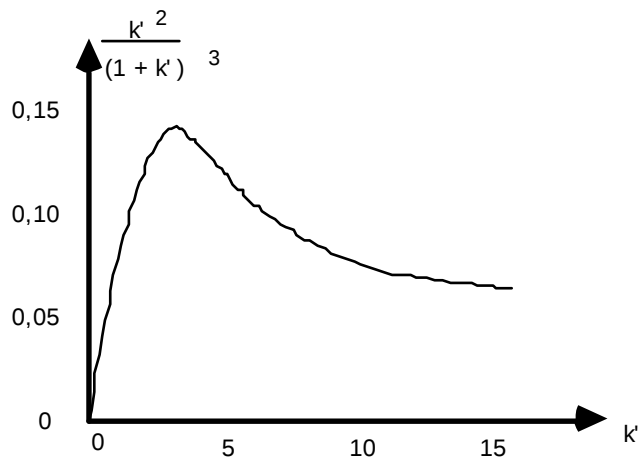


Figure 7. Variation de $\frac{k'^2}{(1+k')^3}$ en fonction de k'

Les variations de $\frac{k'^2}{(1+k')^3}$ en fonction de k' montrent que la courbe passe par un maximum pour $k' = 2$ si HEPT est indépendant de k' .

b) *Effet du terme* $v / HEPT$

Les deux variables ne sont pas indépendantes $HEPT = Av^n$ et $HEPT = B d_p^\beta$

En combinant les deux relations on peut écrire :

$$HEPT = K_H \cdot d_p^\beta \cdot v^n \quad \text{avec} \quad \beta \sim 1,8$$

$$v^n = v \cdot v^{n-1} \quad 0,3 < n < 0,7$$

$$\frac{v^n}{HEPT} = \frac{1}{K_H \cdot d_p^2} \quad \text{d'où} \quad \frac{v}{HEPT} = \frac{v^{1-n}}{K_H \cdot d_p^2}$$

On peut augmenter ce rapport :

- en augmentant v (puisque $n < 1$)
- en diminuant le diamètre des particules.

La perte de charge va cependant augmenter dans ces conditions.

V.2.2. Pression et temps d'analyse

$$* t_R = \frac{L}{v} (1+k') \quad HEPT = \frac{L}{N}$$

$$t_R = N (1 + k') \frac{HEPT}{v} \quad \text{avec } ** HEPT = K_H d_p^\beta v^n$$

La perte de charge est donnée par la loi de DARCY

$$\Delta P = \frac{\eta L v}{K^\circ} \quad K^\circ = \frac{d_p^2}{180} \cdot \frac{\varepsilon^3}{(1 - \varepsilon)^2}$$

$$\Delta P = J \frac{v \cdot \eta}{d_p^2} \quad \text{avec } J = \frac{180 (1 - \varepsilon)^2}{\varepsilon^3}$$

En combinant *, ** et *** on obtient :

$$t_R = \frac{K_H^a \cdot (\eta \cdot J)^b \cdot N^a \cdot d_p^c}{\Delta P^b} (1 + k')$$

$$a = \frac{2}{1 + n} \quad b = \frac{1 - n}{1 + n} \quad c = \beta - \left(\frac{1 - n}{1 + n} \right) (2 - \beta)$$

en prenant $n = 0,5$ et $b = 1,8$

$$t_R = \frac{K_H^{1,33} \cdot (\eta \cdot J)^{0,33} \cdot N^{1,33} \cdot d_p^{1,73}}{\Delta P^{0,33}} (1 + k')$$

A K_H , J , N et k' constants, on peut donc diminuer t_R en diminuant d_p ou en augmentant ΔP . La figure 8 montrent les variations de t_R en fonction de ΔP pour divers d_p .

Ainsi pour une pression de 70 atm, le passage de d_p 40 à 5 mm permet de réduire le temps d'analyse de 7h30 à 10 min.

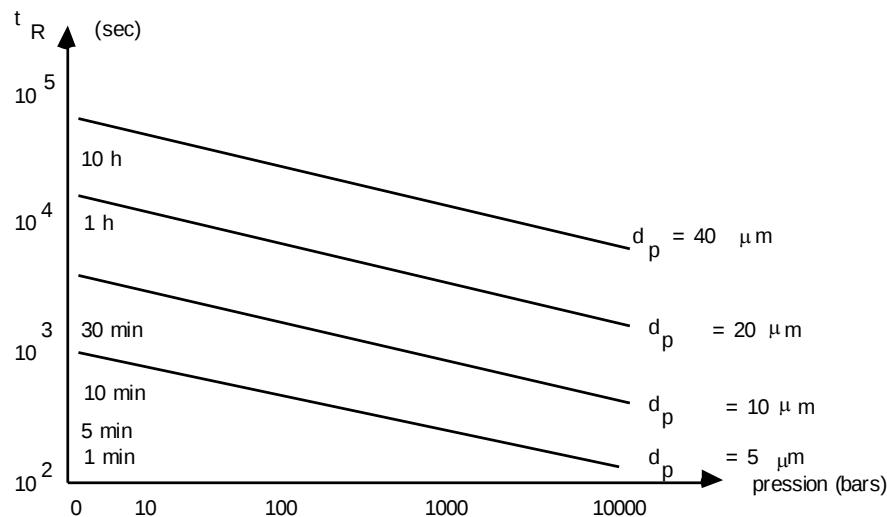


Figure 8. Variation du temps d'analyse en fonction de la pression à différentes granulométries
 $\eta = 1,8 \text{ cp}$; $\alpha = 1,05$; $R_s = 1$; $N = 28\,250$; $n = 0,6$.

V.3. OPTIMISATION DE LA PERTE DE CHARGE

Il est important de réduire les pertes de charge car travailler sous haute pression est toujours synonyme de difficultés techniques.

Pour maintenir RS et tR constants il faut que :

- 1 - le volume de la phase stationnaire reste constant
- 2 - le nombre total de plateaux théoriques reste constant quels que soient le débit ou la longueur de la colonne
- 3 - le nombre de plateaux efficaces par unité de temps soit constant.

$$HEPT = K_H \cdot d_p^\beta \cdot v^n \quad \beta = 1,8 \quad \text{et} \quad n \text{ compris entre } 0,3 \text{ et } 0,7$$

$$N = \frac{L}{HEPT} = \text{constante} \quad t_R = \frac{L}{v} \cdot (1 + k')$$

d'où

$$t_R = N (1 + k') \cdot \frac{HEPT}{v}$$

k' est constant pour un composé donné avec phases stationnaire et mobile données.

Il faut donc que $L / v = \text{constante}$

Si on divise d_p par 2, HEPT est divisé par 2^β .

Pour que t_R reste constant il faut diviser L et v par 2^β ce qui entraîne que HEPT est divisé par $2^{\beta n}$. Il faut donc à nouveau diviser L et v par $2^{\beta n}$ et ainsi de suite.

On obtient une série convergente dont la somme des termes est :

$$2^{\left(\frac{\beta}{1-n}\right)}$$

Ainsi avec $\beta = 1,8$ et $n = 0,5$ diviser d_p par 2 permet de diviser L et v par $2^{3,6}$ soit environ 12.

Si d_p est divisé par 2

$$\Delta P = \frac{\eta L v \cdot 180 (1-\varepsilon)^2}{d_p^2 \cdot \varepsilon^3}$$

$23,6 \cdot 23,6$

ΔP est divisé par $\frac{\quad}{22}$ soit par 37

En divisant par 2, on obtient une séparation identique quant à sa durée et sa résolution avec une colonne 12 fois plus courte et un débit 12 fois plus faible ce qui nécessite une ΔP 37 fois plus faible.

Plus la colonne sera courte et plus son diamètre sera grand car $V_S = C^{te}$.

Il faut signaler deux limites à ces diminutions de L, v et d_p

- 1 - il est impossible d'augmenter beaucoup le diamètre des colonnes sans entraîner des perturbations notables dans l'écoulement de la phase mobile.
- 2 - il est peu probable que l'on puisse diminuer le diamètre des particules en dessous de $1 \mu m$.

V.4 . CONCLUSION

L'optimisation d'une analyse par CPL est difficile en raison de multiples paramètres sur lesquels on peut agir. En fait, dans la pratique, on s'efforcera d'abord de choisir les conditions chimiques de la séparation

(nature et composition chimique de la phase stationnaire, nature et composition chimique de l'éluant, modification éventuelle des produits à séparer) pour que le facteur de sélectivité ne soit pas trop proche de 1 et pour les facteurs de capacité soient compris entre 1 et 10.

Le choix de la colonne (limité par les fournisseurs) se limitera à celles de faible longueur (25 cm) et de 4,8 mm de diamètre par exemple. Les particules devront avoir un d_p de l'ordre de 5-10 μm .

On veillera à ce que l'injection soit la "moins mauvaise" possible.

V.5. DETERMINATION GRAPHIQUE DES PARAMETRES_{opt}

Les principaux paramètres pour optimiser une analyse sont indiqués sur la figure 9 pour une viscosité de la phase mobile faible et égale à 0,44 cP. Il existe de tels diagrammes pour des phases mobiles de viscosités autres.

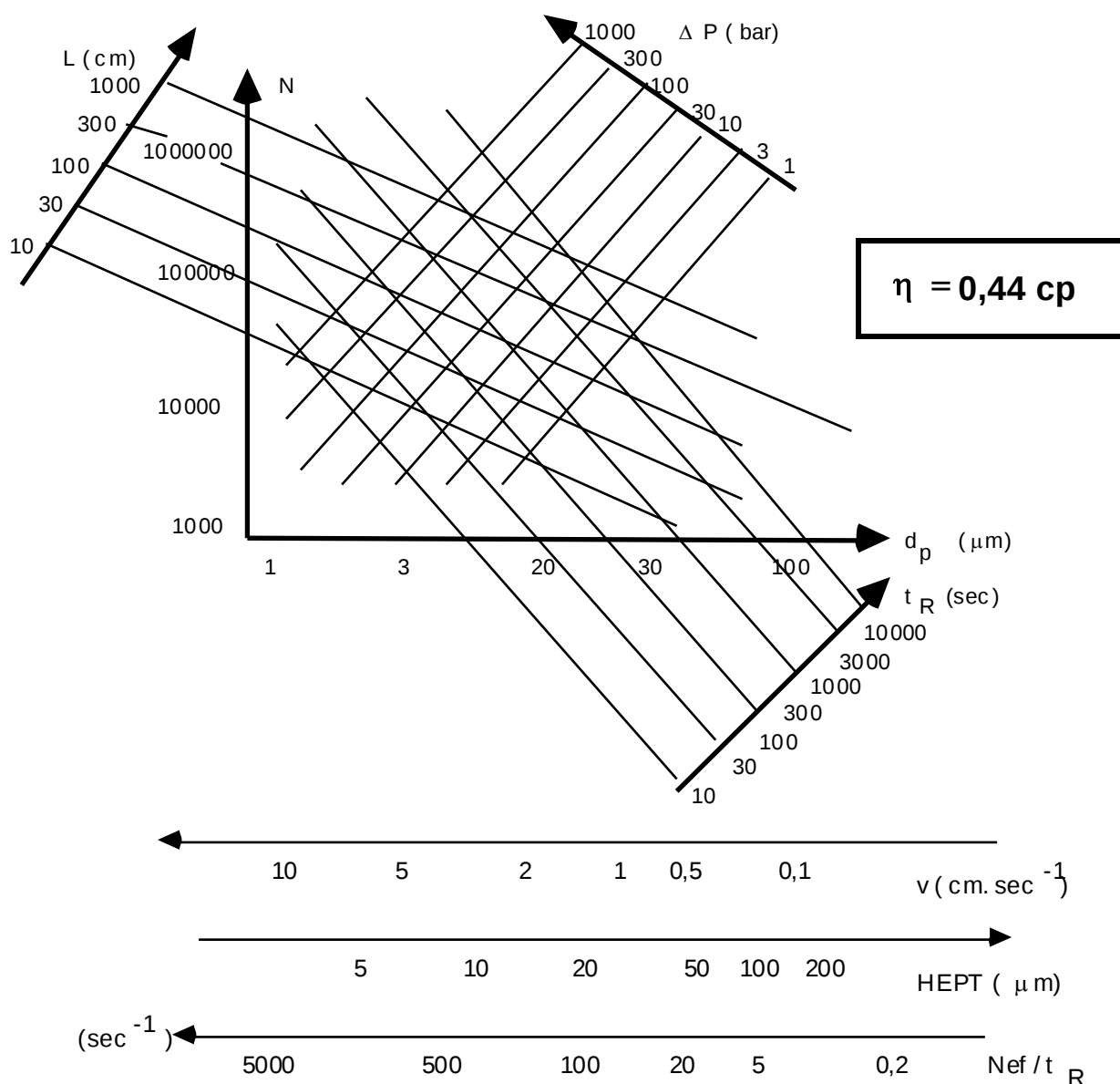


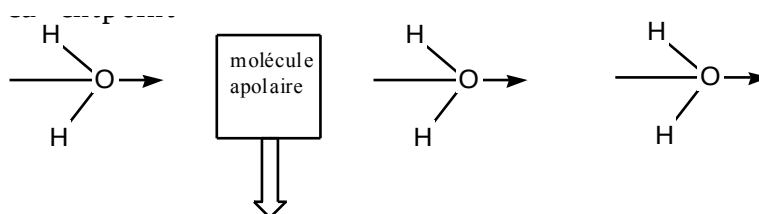
figure 9. Détermination graphique des paramètres optima en chromatographie en phase liquide

VI. DIFFERENTS TYPES DE CHROMATOGRAPHIE EN FONCTION DES PHENOMENES MIS EN JEU

En chromatographie en phase liquide les principales interactions qui régissent les mécanismes de rétention et d'élution de solutés sont, en fonction de l'énergie mise en jeu, liées à des liaisons chimiques:

- soit de **Van der Waals** (1 à 9 kJ.mole⁻¹). Il s'agit d'interactions dipolaires liées à la présence de dipôles induits et instantanés ou permanents dans la molécules. Ces interactions existent dans pratiquement tous les systèmes chromatographiques. Leur rôle est souvent négligé en raison de leur faible énergie. Ces interactions se produisent à faible distance (0,3 à 0,6 nm) et diminuent d'intensité quand la température augmente.

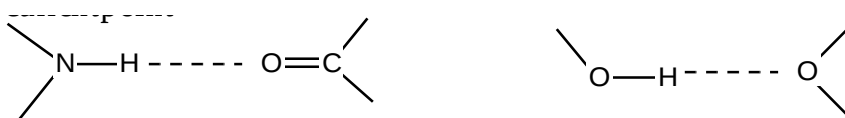
- soit **hydrophobes** (4 à 12 kJ.mole⁻¹). Dans ce cas, c'est l'attraction entre deux (ou plus) molécules d'eau séparées par une molécule ne donnant que peu ou d'interaction avec elles qui chasse cette molécule



Dans ce cas, moins la molécule est polaire (incapable de donner des interactions avec l'eau) et plus forte est la répulsion. La chaleur augmente l'agitation des molécules d'eau et augmente donc la force de répulsion.

Ces interactions se produisent entre 0,2 et 0,4 nm.

- soit **hydrogène** (8 à 40 kJ.mole⁻¹). Il s'agit d'une interaction dans laquelle deux atomes électronégatifs dont l'un est lié à un atome d'hydrogène "partagent" inégalement cet atome. La distance de ces liaisons est d'environ 0,2 nm.



Ces interactions sont données par l'eau ; elles diminuent d'intensité avec la température.

- soit **polaires ionisées** (électrostatiques ou de Coulomb, 40 à 85 kJ.mole⁻¹). Ces interactions entre ions dépendent, pour la plupart des groupes ionisables organiques, du pH. Ainsi par exemple les groupements carboxyles ne sont ionisés significativement qu'à des pH > pK_a.

L'intensité de ces liaisons de forte énergie diminue avec la température.

- soit **covalentes** (330 à 400 kJ.mole⁻¹). L'énergie de ces liaisons est très élevée et leur réversibilité nécessaire à leur implication en chromatographie en phase liquide n'est pas toujours accessible.

Les seules liaisons covalentes réversibles utilisables en chromatographie en phase liquide sont les liaisons par pont disulfure. Ces liaisons sont peu sensibles aux variations de température dans des conditions de pH ou de potentiel d'oxydoréduction données.

Les différents systèmes chromatographiques différeront les uns des autres par la nature des interactions chimiques échangées entre soluté, solvant et phase stationnaire. Pour qu'une phase stationnaire soit utilisable il est donc nécessaire qu'elle donne une (ou plusieurs) interaction avec le soluté (pour le retenir), mais il est aussi nécessaire que le solvant constituant la phase mobile donne des interactions avec le soluté (pour l'éluer) et avec la phase stationnaire.

Il n'existe pas de phase stationnaire « inerte » et il faudra toujours se préoccuper des interactions qu'elle est susceptible de donner même dans des chromatographies où elle n'intervient en principe que par un aspect « stérique ».

VI.1. LA CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION

La phase stationnaire est un adsorbant et la séparation est fondée sur les différences d'adsorption des molécules du mélange sur cette phase (CLS). Les premières séparations chromatographiques ont utilisées comme phases stationnaires « principales » soit la silice, soit la cellulose. Il en résulte que tous les modèles réalisés à partir de ces phases reposaient sur un échange analyte - phase mobile - phase stationnaire essentiellement du type liaison hydrogène. Sans indication quant à la nature de la phase stationnaire, toutes les données qui seront inhérentes à la « chromatographie d'adsorption » seront donc fondées sur ce type d'échange.

C'est cette technique, couramment utilisée qui offre les possibilités les plus vastes. Elle s'applique très bien aux composés organiques dont la masse molaire est comprise entre 200 et 1000, que ces composés soient volatils ou non. Son domaine d'élection est la séparation de composés organiques renfermant des groupements fonctionnels différents ainsi que celle de certains types d'isomères.

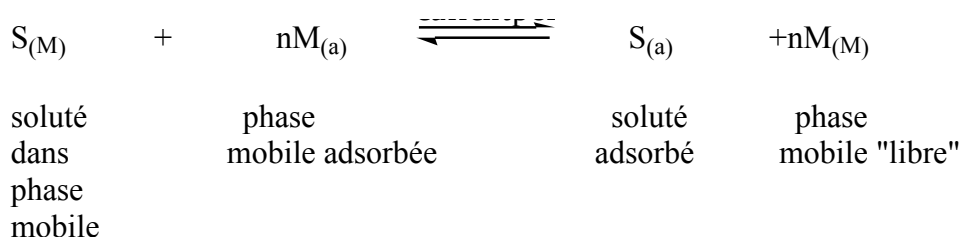
Elle s'applique mal à la séparation de solutés très peu polaires (par exemple ceux qui ne se différencient que par la longueur de leur chaîne aliphatique).

VI.1.1. Thermodynamique de l'adsorption

SNYDER (Principles of Adsorption Chromatography, M. Dekker, NY, 1968) a traité ce sujet en détail.

Le volume de rétention d'un soluté est directement lié à la compétition entre les molécules de solvant M et de soluté S à la surface de l'adsorbant a. On admet généralement que cette surface est recouverte d'une couche monomoléculaire constituée par des molécules de la phase mobile M et de soluté S.

L'équilibre d'adsorption et de désorption peut s'écrire :



L'adsorption d'une molécule de soluté $S_{(M)}$ $\xrightarrow{\text{adsorption}}$ $S_{(a)}$ se traduit par le départ de n molécules de solvants de la surface de l'adsorbant $nM_{(a)}$ $\xrightarrow{\text{désorption}}$ $nM_{(M)}$.

L'énergie d'adsorption est donnée par :

$$E_a = E_{S(a)} + n E_{M(M)} - E_{S(M)} - n E_{M(a)}$$

Les termes des énergies en solution sont faibles et on a :

$$E_a = E_{S(a)} - n E_{M(a)}$$

$E_{S(a)}$ est constante et ne dépend pas du solvant.

$E_{M(a)}$ dépend du solvant et du support mais pas de l'échantillon .

Une équation reliant le facteur de capacité k' du soluté aux propriétés de l'adsorbant a été proposée par SNYDER

$$\log k' = \log V_a + \beta (S^\circ - \varepsilon^\circ \cdot A_S) + \log \frac{V_S}{V_M}$$

- V_a : volume de phase mobile adsorbée par gramme d'adsorbant
 β : activité de l'adsorbant (en général comprise entre 0,5 et 0,9)
 $S^\circ - \varepsilon^\circ A_S$ est lié aux propriétés de l'éluant et du soluté.
 S° : énergie libre d'adsorption du soluté par unité de surface d'adsorbant dans des conditions d'activité standard ($b = 1$)
 A_S : surface occupée sur l'adsorbant par une mole de soluté
 ε° : énergie libre d'adsorption des molécules de la phase mobile par unité de surface d'adsorbant
 V_S : volume phase stationnaire
 V_M : volume phase mobile.

$$S^\circ = - \frac{\Delta G^\circ}{2,3 RT}$$

- ΔG° : variation d'énergie libre d'adsorption
 R : constante des gaz parfaits
 T : température absolue (°Kelvin)

Cette loi peut se simplifier de la façon suivante:

$$\log k' = A - \varepsilon^\circ \cdot B \quad A \text{ et } B = \text{constantes}$$

Il apparaît alors que plus la valeur de ε° augmente et plus le log de k' diminue et inversement. Il s'agit donc là d'un paramètre très important dans ce type de chromatographie : il permet de maîtriser t_R

SNYDER a décrit une série éluotrope (force éluante d'un solvant) à partir des valeurs de l'énergie libre d'adsorption ε° des molécules de solvant sur la surface de l'adsorbant (tableau 3).

Tableau 3. Série éluotrope pour l'alumine. *Pour la silice, les valeurs sont à multiplier par 0,77.*

ε°		ε°		ε°	
n-pentane	0	benzène	0,32	diméthylsulfoxyde	0,62
isooctane	0,01	bromure d'éthyle	0,37	aniline	0,62
n-heptane	0,01	éther éthylique	0,38	nitrométhane	0,64
cyclohexane	0,04	chloroforme	0,40	acétonitrile	0,65
cyclopentane	0,05	chlorure de méthylène	0,42	pyridine	0,71
sulfure de carbone	0,15	tétrahydrofurane	0,45	alcool isopropylique	0,82
CCl4	0,18	méthyl éthylcétone	0,51	alcool éthylique	0,88
chlorure d'amyle	0,26	acétone	0,56	alcool méthylique	0,95
éther isopropylique	0,28	dioxane	0,56	éthylène glycol	1,11
toluène	0,29	acétate d'éthyle	0,58	acide acétique	grand
chlorobenzène	0,30	alcool amylique	0,69		

Si ϵ_0 augmente, $\log k'$ diminue et la rétention diminue

(avec ce type de chromatographie d'adsorption à phase stationnaire polaire)

VI.1.2. Adsorbants utilisés en CLS

Le processus de l'adsorption est **complexe** et les forces mises en jeu qui dépendent du soluté, du solvant et de l'adsorbant sont nombreuses (forces de dispersion de London, forces électrostatiques, forces de liaisons hydrogène etc...). Il devient alors impossible de préciser la part relative de ces différentes forces d'adsorption car pratiquement on n'observe que leur résultante.

Par ailleurs, du fait de la **présence d'eau** (même à l'état de traces) dans les phases stationnaire et mobile il est également impossible de préciser la part de la chromatographie de partage à côté de la chromatographie d'adsorption.

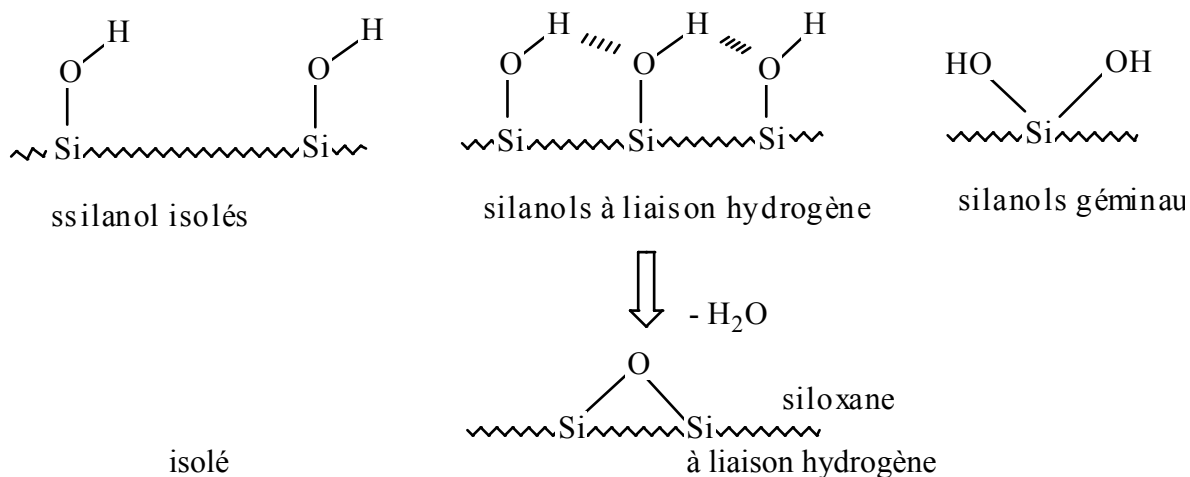
Malgré ces nombreuses interactions, les prévisions en chromatographie liquide d'adsorption sont relativement simples (particulièrement quand des adsorbants polaires où les liaisons hydrogène constituent les forces dominantes sont utilisés : silice ou alumine ou cellulose).

SNYDER distingue ainsi 4 types d'adsorbants

I	inorganiques polaires	silice, alumine
II	inorganiques apolaires	graphite, charbon
III	greffés polaires	aminopropyl (NH ₂), cyanopropyl (CN)
IV	greffés apolaires	C18 - C8

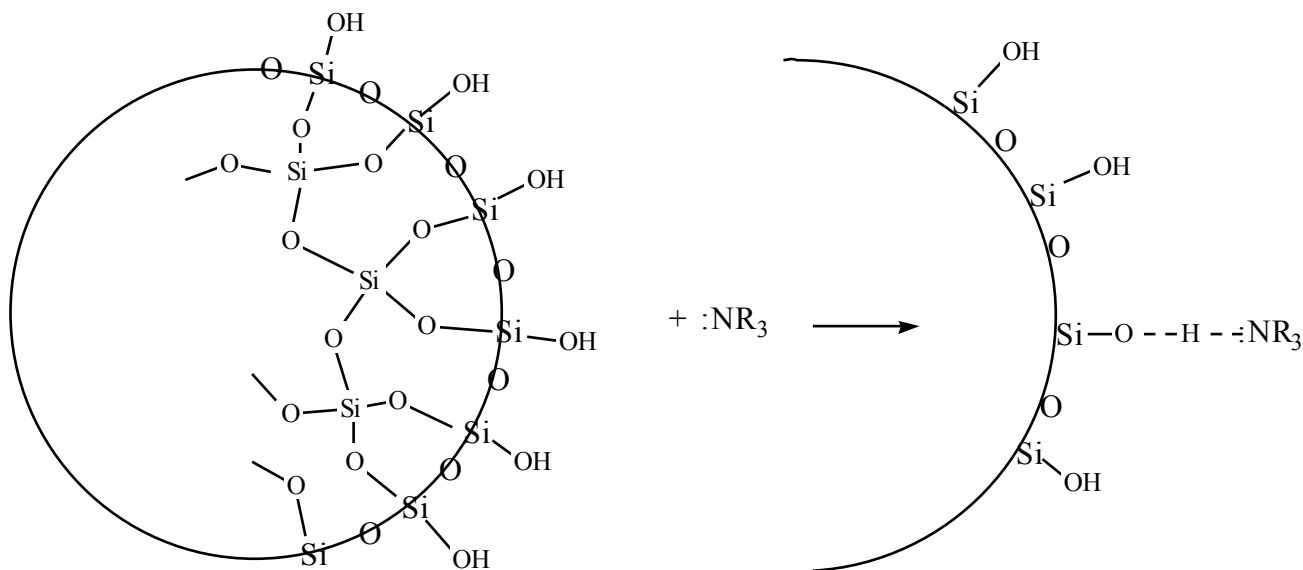
VI.1.2.1. Adsorbant de type I - Silice ou Alumine

Les sites actifs sur lesquels s'adsorbent les molécules de solutés sont, pour la silice, des groupes silanol*. Ces groupes sont de trois types :



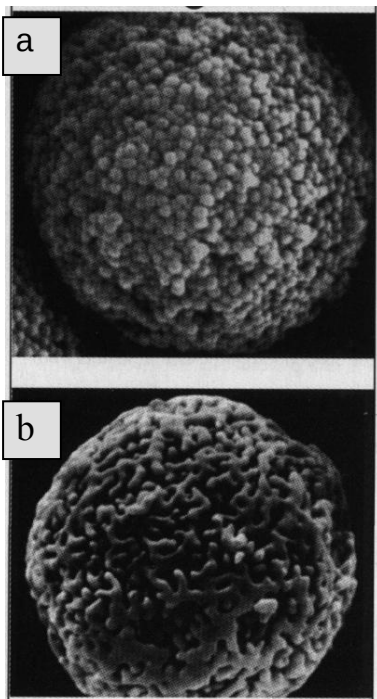
Pour des pH supérieurs à 8 la silice n'est pas stable et se dissout. Toutes les phases qui utiliseront une base silice seront donc limitées au niveau du pH de leur phase mobile à 8.

En présence d'eau, la plupart de ces groupes sont associés cette molécule. Cette eau doit être éliminée par chauffage prolongé à 150°C. Un chauffage à température supérieure à 200°C se traduit à partir des silanols à liaison hydrogène, par la formation de siloxane dont le caractère apolaire est important.



L'expérience montre que la **silice** convient bien à la séparation de solutés qui sont des bases au sens de Brønsted (exemple : amines qui se fixent néanmoins de façon souvent de façon irréversible) ; on dit que cet adsorbant a un caractère acide.

Le gel de silice est préparé par précipitation acide de silicate de sodium : il se produit une polymérisation de l'acide silicique formé en un réseau appelé hydrogel. En solution diluée un gel « faible » ou un précipité est obtenu tandis qu'en milieu concentré l'hydrogel est ferme. Le séchage de ce dernier conduit à un xérogel (photographie **b** obtenue par microscopie électronique à balayage).



Les gels de silice présentent une structure poreuse.

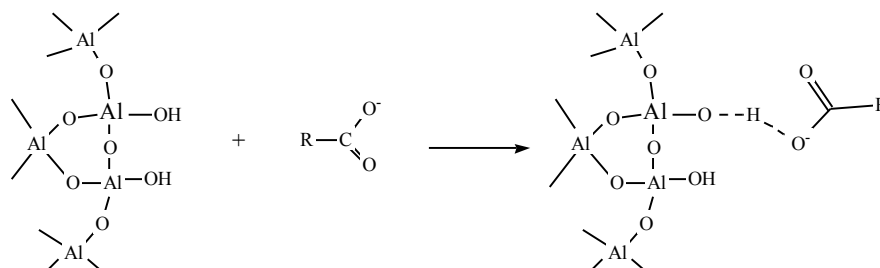
KIRKLAND J.J. (LC.GC, 1996, 14, (6), 486-500) a obtenu la gélification de silicates solubles par cohalescence avec formation de structures de type sil-gel (photographie **a** obtenue par microscopie électronique à balayage). Les subparticules de ce gel sont homogènes; la porosité est de 50%; le gel a une surface de 150 m² / g et les pores ont 10 nm de diamètre. Relativement stables aux pH élevés.

Le xérogel **b** est spongieux; sa porosité est de 70% et sa surface de 300 m² / g. Les pores ont un diamètre de 10 nm

Quand la surface est complètement hydroxylée, le gel de silice a une densité de groupements silanols de 8 μmole / m². Ces silanols sont localisés pour la plupart dans des micropores de 1 nm de diamètre ce qui ne les rend accessibles qu'à des analytes de faibles dimensions moléculaires

La silice peut être utilisée en milieux aqueux et non aqueux.

Inversement, l'**alumine** convient bien pour la séparation de solutés acides (phénols, acides carboxyliques) ; cet adsorbant est dit basique.



a) Influence des groupements fonctionnels du soluté

Avec ces adsorbants de type I, les molécules polaires sont toujours plus adsorbées que les molécules non polaires.

amides > amines > acides carboxyliques > alcools > cétones > esters > composés nitrés > éthers
> hydrocarbures aromatiques > hydrocarbures non saturés > hydrocarbures saturés.

b) Influence de la force d'élution du solvant

La force élutive d'un solvant est caractérisée par ϵ° (tableau 3). Une augmentation de 0,05 de la force élutive diminue environ de moitié la valeur du facteur de capacité k' .

En pratique, on recherche une valeur de force élutive qui donne une rétention convenable.

c) Différents types de support

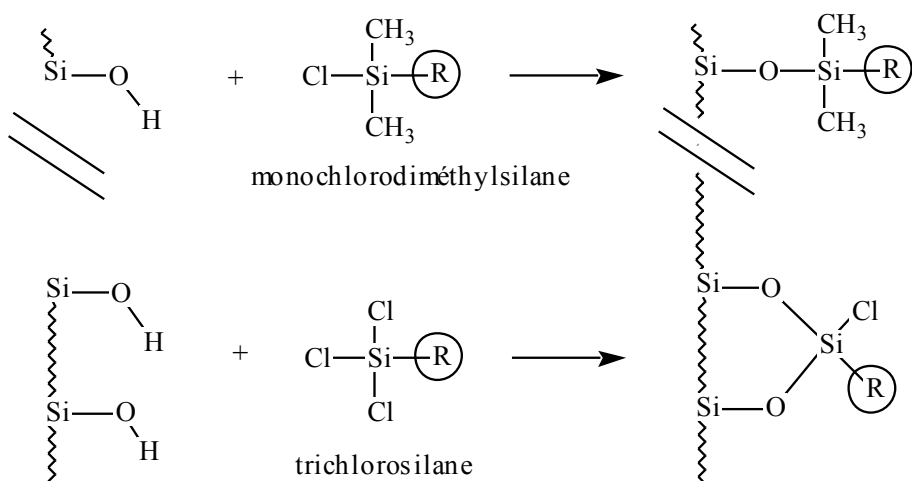
Deux paramètres caractérisent ce type de phase stationnaire :

- la **granulométrie**. Ainsi de 60 μm pour d_p pour la chromatographie liquide/solide classique, on est passé à des valeurs de d_p comprises entre 1 et 10 μm .
- la **forme**. Les grains de silice avaient à l'origine une structure irrégulière. Actuellement ces grains sont le plus souvent sphériques.

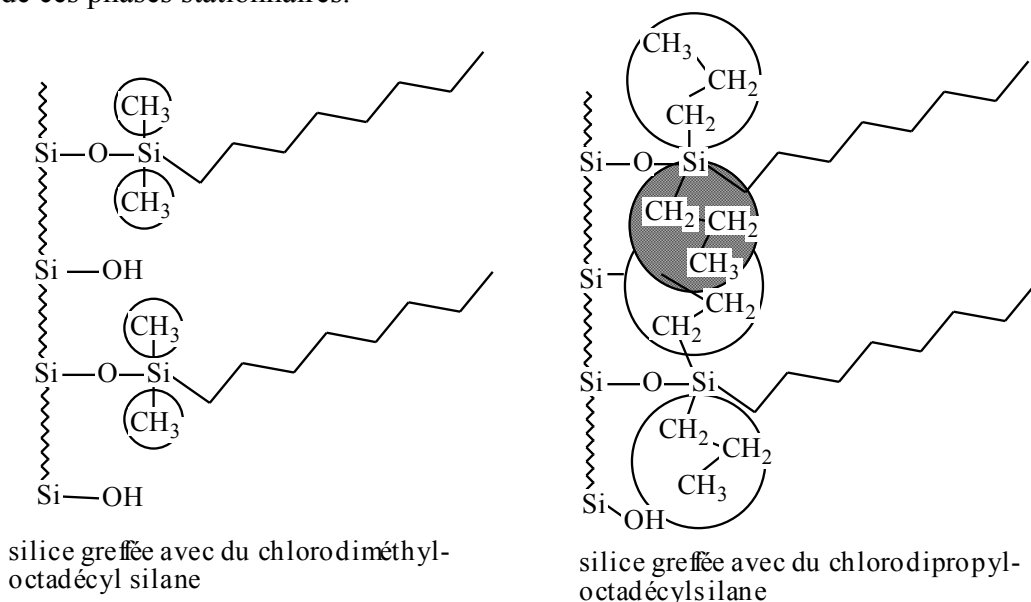
Il existe des grains constitués par un noyau compact ($\varnothing$ 30 μm) recouverts d'une fine pellicule poreuse (1 μm) : ce sont les supports pelliculaires.

Généralités sur les phases greffées sur les particules de silice.

Ces phases reposent sur l'établissement d'une liaison silyléther. Elle est obtenue par réaction de la silice avec des dérivés du type monochlorodiméthylsilane ou trichlorosilane pour les plus importants.



La liaison Si - O - Si n'est pas stable pour des pH inférieurs à 2. **La plage d'utilisation des phases greffées s'étend donc de pH 2 à pH 8.** Néanmoins de nombreux travaux ont été réalisés pour élargir cette gamme. Par exemple la substitution des groupements méthyls par des groupes plus volumineux (propyls par exemple) minimise les possibilités d'hydrolyse et permet donc d'élargir la gamme d'utilisation possible de ces phases stationnaires.



IV.1.2.2. Adsorbant de type III. Phases greffées polaires

Les principaux groupes fonctionnels des phases greffées polaires sont indiqués dans le tableau 4. Ces phases sont classées en fonction de leur polarité.

		analyse de :
- faiblement polaires (glycophase ou diolphase diméthylamino)		composés carbonylés
- moyennement polaires (cyano)		phénols , amines , esters
- fortement polaires (amino, diamino)		oses, osides, peptides, nucléotides

Un exemple de chromatogramme d'oses obtenu sur une silice greffée NH_2 est donné sur la figure 10.

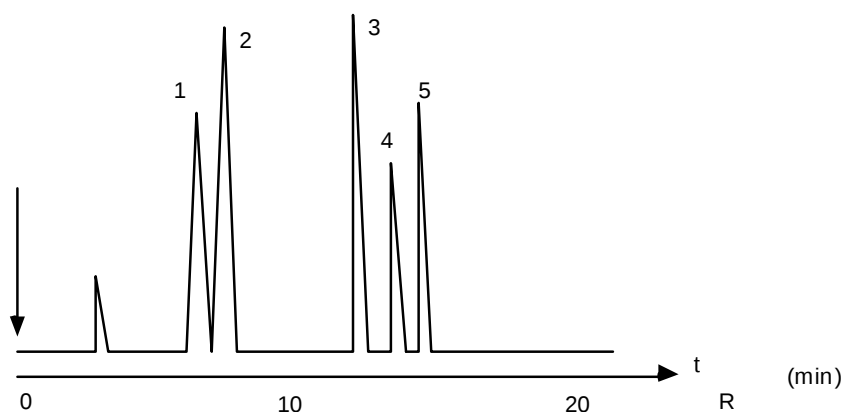


Figure 10. Séparation fructose (1), glucose (2), saccharose (3), maltose (4) et lactose (5) sur Si greffée NH_2 . $d_p = 10$ mm. Colonne $L = 30$ cm, $\varnothing = 3,9$ mm. Eluant acétonitrile/eau (80/20). Débit 2 ml/min. Détection réfractométrique.

Tableau 4. Groupes fonctionnels de phases polaires greffées et applications principales

Type de phase	Structure du greffon	Applications
glycophase (Diol)	$\begin{array}{c} \text{Si} \text{---} \text{O} \text{---} \text{Si} \text{---} (\text{CH}_2)_3 \text{---} \text{O} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH} \\ \text{OH} \end{array}$	quinones, flavones, amines, peptides, protéines, etc...
amino	$\begin{array}{c} \text{Si} \text{---} \text{O} \text{---} \text{Si} \text{---} (\text{CH}_2)_3 \text{---} \text{NH}_2 \\ \text{OH} \end{array}$	glucides (oses), vitamines, isomères D-L, peptides, alcools, nucléosides, etc...
diméthylamino	$\begin{array}{c} \text{Si} \text{---} \text{O} \text{---} \text{Si} \text{---} (\text{CH}_2)_3 \text{---} \text{N} \\ \text{CH}_3 \text{CH}_3 \end{array}$	cf diol
diamino	$\text{Si} \text{---} \text{O} \text{---} \text{Si} \text{---} (\text{CH}_2)_3 \text{---} \text{NH} \text{---} (\text{CH}_2)_2 \text{---} \text{NH}_2$	cf amino
cyano	$\text{Si} \text{---} \text{O} \text{---} \text{Si} \text{---} (\text{CH}_2)_2 \text{---} \text{C} \equiv \text{N}$	lipides, stéroïdes, pesticide, phénols, amines, esters, etc...

VI.1.2.3. Adsorbant de type IV. Phases greffées apolaires

Les phases greffées apolaires représentent les phases stationnaires les plus utilisées en HPLC. Ces phases (qualifiées de **réverses** ou d'**inverses**) sont préparées à partir de silice par formation d'une liaison éthersilyl (cf généralités sur les phases greffées)

La longueur du greffon alkyle **R** s'il s'agit d'une chaîne aliphatique ou la nature même de cette chaîne (groupements phényl, etc) sert à caractériser la phase.

RP 8 implique $\text{R} = (\text{CH}_2)_7 - \text{CH}_3$ (octyl)
RP18 implique $\text{R} = (\text{CH}_2)_{17} - \text{CH}_3$ (octadécyl)

Les phases RP 8 et RP 18 sont les plus répandues et les plus utilisées.

Les applications possibles de ce type de phases stationnaires sont très nombreuses:

- RP 8 substances lipophiles ou moyennement polaires
 Bien adaptable à la chromatographie par appariement d'ions
 Substances polyaromatiques, antibiotiques, vitamines hydrosolubles, acides et esters organiques, hydrocarbures, corticostéroïdes, barbituriques, phospholipides, etc...
- RP 18 Substances lipophiles, acides aminés, etc..

En réalisant une surface hydrophobe on inverse totalement la nature des interactions fournies par la silice. L'eau n'a pas d'affinité pour le greffon hydrophobe et la force éluante des solvants est exactement l'inverse de celle qui est observée sur supports polaires d'où le terme **reversed phase (RP)** appliqué à ce genre de support.

Les solutés les plus polaires seront les moins retenus, les solutés apolaires seront retenus d'autant plus fortement que leur hydrophobicité est élevée.

La rétention des composés apolaires croît avec la longueur du greffon et avec le taux de greffage de la surface (surface coverage). La taille des particules n'a pas d'effet sur la rétention exprimée par le facteur de capacité k' , les effets de la taille ne concernant que la pression et la HEPT.

a) mécanisme de rétention

Malgré tous les travaux qui lui sont consacrés, il existe encore beaucoup de flou dans son interprétation. Dans la théorie solvophobique, ce sont les interactions apolaires dans un solvant polaire qui sont décrites. On peut schématiser les forces mises en jeu, forces dont la résultante est la force de liaison entre le soluté et la phase greffée (figure 11).

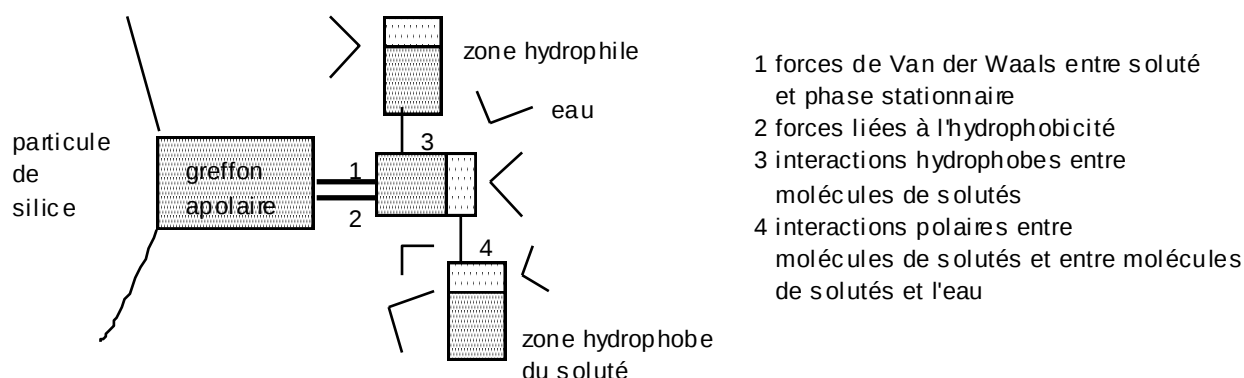


Figure 11. Représentation schématique des interactions mises en jeu dans la chromatographie en phase inverse.

Le coefficient de distribution (ou coefficient de partage) est : $K = C_S / C_M$

La variation d'énergie libre ΔG° de la liaison du soluté à la phase greffée est égale à :

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K$$

Le facteur de capacité k' est égal : $k' = K \cdot V_S / V_M$

$$\ln k' = \ln \frac{V_S}{V_M} - \frac{\Delta G^\circ}{RT}$$

Avec V_S volume du soluté dans la phase stationnaire et V_M volume du soluté dans la phase mobile.

Pour un éluant donné et une phase stationnaire greffée donnée, on constate que le facteur de capacité k' augmente avec l'hydrophobicité du soluté. Ainsi les variations de $\log k'$ en fonction du nombre de groupements méthylène (CH_2) d'une famille de composés organiques donnés sont linéaires (figure 12, a).

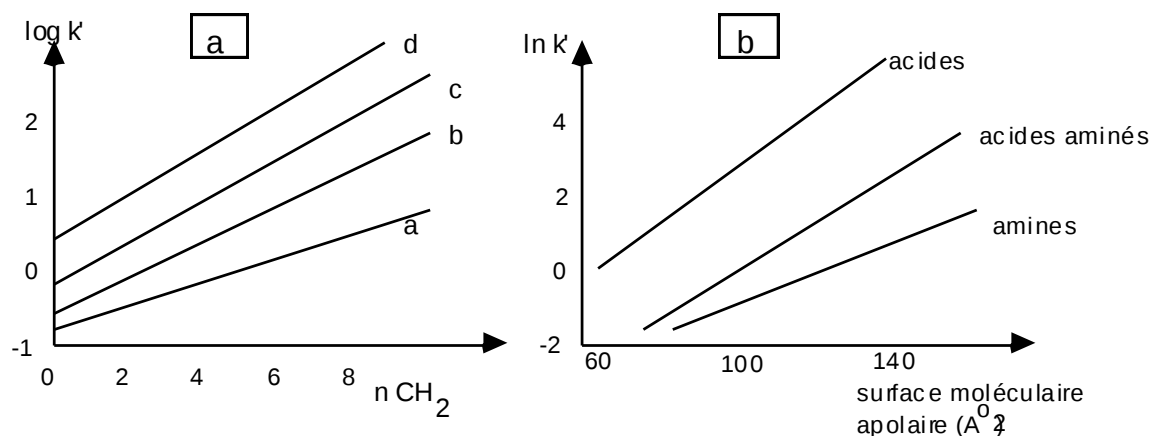


figure12. Variations du logarithme du facteur de capacité en fonction

a. du nombre de CH_2 d'alkyl benzènes ($n = 0 = \text{benzène}$). Phase stationnaire greffée en C8. méthanol / eau : $a = 1/0$, $b = 9/1$, $c = 8/2$, $d = 6/4$

b. de la surface moléculaire apolaire

Pour des composés biologiques (amines, acides carboxyliques, acides aminés), on observe également une **relation linéaire** entre $\ln k'$ et la **surface apolaire** de la molécule (figure 12,b). Plus l'ionisation augmente et plus le facteur de capacité diminue. Pour les acides monoprotonés, le facteur de capacité est égal à :

$$k' = \frac{k'_0 + k'_{-1} \left(\frac{K_a}{[\text{H}^+]} \right)}{1 + \left(\frac{K_a}{[\text{H}^+]} \right)} \quad \text{avec} \quad K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{COO}^-]}{[\text{COOH}]}$$

pour l'équilibre $\text{COOH} \rightleftharpoons \text{COO}^- + \text{H}^+$

k'_0 facteur de capacité de la forme non protonée (COOH), k'_{-1} facteur de capacité pour la forme déprotonée (COO^-), K_a constante de dissociation de l'acide et H^+ concentration en proton.

Le facteur de capacité sera donc le plus élevé pour ces acides carboxyliques quand les conditions de pH empêcheront l'ionisation de la fonction acide c'est à dire pour des valeurs de pH inférieures au pK_a de l'acide. Généralement on ajoute à la phase mobile un acide fort dilué (acide phosphorique par exemple) pour atteindre ces valeurs de pH qui doivent néanmoins rester supérieures à 2 pour éviter l'hydrolyse de la liaisons silyléther.

Pour les **bases faibles**, on a une expression similaire (amine par ex.). Il faut remarquer ici que les valeurs des pK_a de ces bases sont souvent supérieures à la limite de stabilité pH des silices. De fait il n'est pas d'exemple d'analyse à des pH supérieur à 12.



$$k' = \frac{k'_0 + k'_1 \left(\frac{K_a}{[\text{H}^+]} \right)}{1 + \left(\frac{K_a}{[\text{H}^+]} \right)} \quad \text{avec} \quad K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{NH}_2]}{[\text{NH}_3^+]}$$

avec K_a constante de dissociation de la forme protonée, k'_1 facteur de capacité pour la forme protonée (NH_3^+).

Les variations de k' pour quelques acides carboxyliques sont indiquées sur la figure 13.

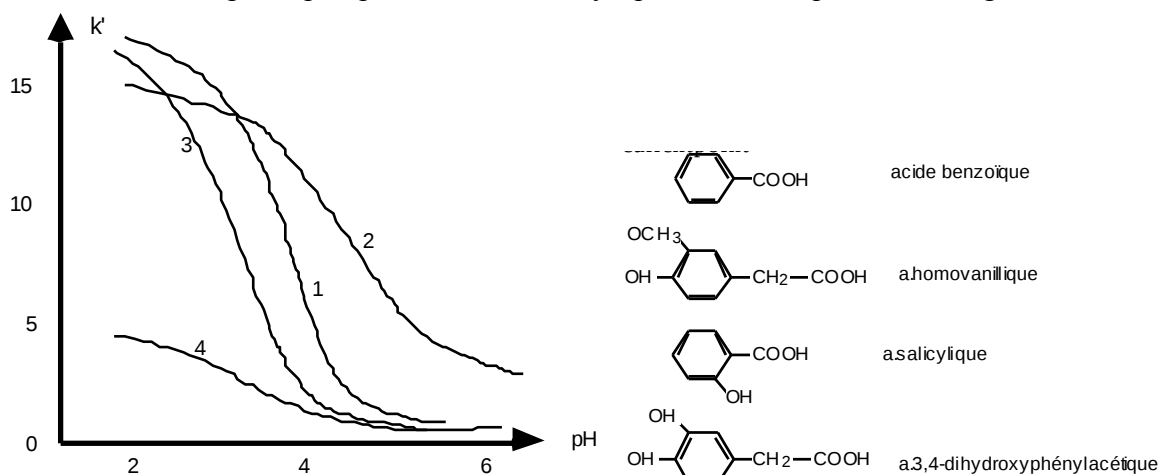


Figure 13. Variations du facteur de capacité pour quelques acides mono protonés en fonction du pH (chromatographie en phase inverse C8) 1 acide benzoïque; 2 acide homovanillique; 3 acide salicylique; 4 acide 3,4 - dihydroxyphénylacétique.

L'effet de la température sur le facteur de capacité peut être étudié à partir de la loi de VAN'T HOFF (effet de la température sur la constante d'équilibre)

$$\frac{d \ln K}{dt} = \frac{\Delta H^0}{RT^2} \quad \text{soit} \quad \ln K = \frac{\Delta H^0}{RT} + \text{cte}$$

Ici on aura:

$$\ln k' = \frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \frac{V_S}{V_M}$$

ΔH^0 variation d'enthalpie et ΔS^0 variation d'entropie.

Si on porte $\ln k'$ en fonction $1/T$, ΔH^0 correspondra à la pente de la droite.

Ce type de représentation est indiqué sur la figure 14 pour quelques acides aromatiques. On constate que quand la température augmente k' diminue.

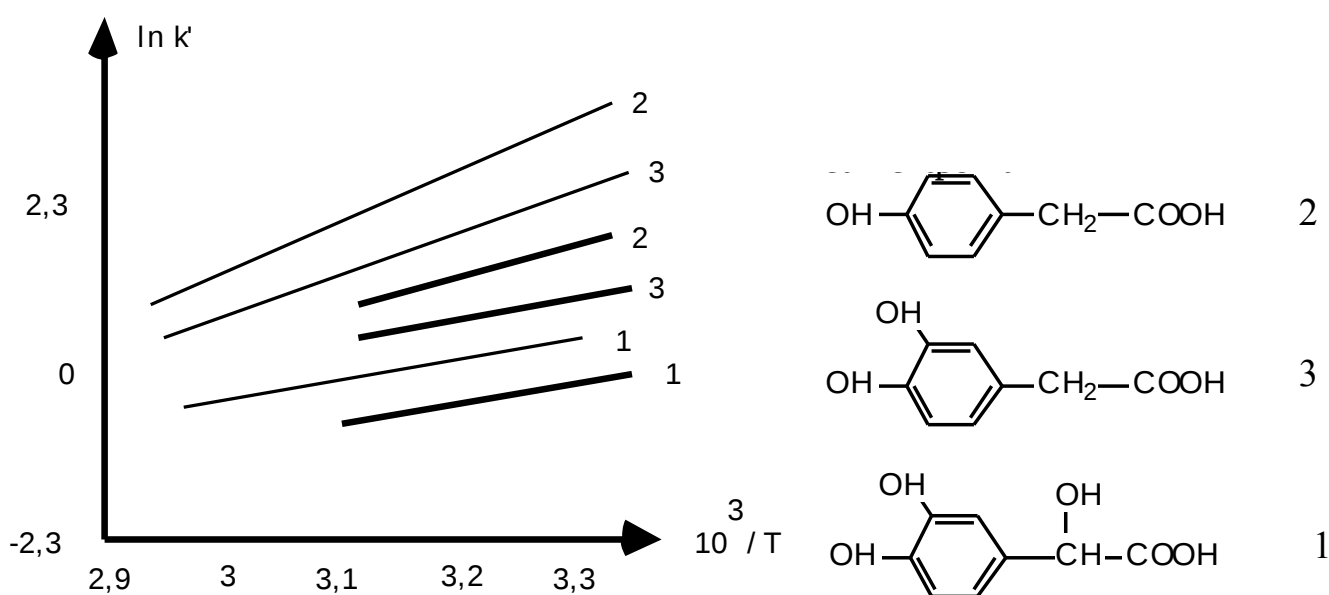


Figure 15. Variations en $\ln k'$ en fonction de $10^3/T$ (Van't Hoff) pour quelques acides aromatiques en chromatographie en phase inverse (C8). Eluant tampon phosphate 50 mM pH2 (1, 2, 3), et même tampon additionné de 5 % d'acétonitrile (1, 2, 3)

- 1 = acide dihydroxymandélique
- 2 = acide hydroxyphénylacétique
- 3 = acide dihydroxyphénylacétique.

b) influence de la phase mobile

L'eau constitue la base de toute phase mobile en chromatographie liquide sur phases greffées apolaires.

• Elution en mode isocratique

Dans ce type d'élution, la composition de la phase mobile reste constante tout au long de l'analyse chromatographique. On utilise généralement soit un mélange binaire type eau / méthanol, eau / acétonitrile ou eau / tétrahydrofurane, soit un mélange ternaire eau / acétonitrile / méthanol. Ce type d'élution est applicable à des analytes dont les valeurs de k' ne sont pas trop différentes.

On constate généralement une variation linéaire du $\log k'$ en fonction du pourcentage d'eau dans la phase mobile (figure 15) (voir aussi figure 12).

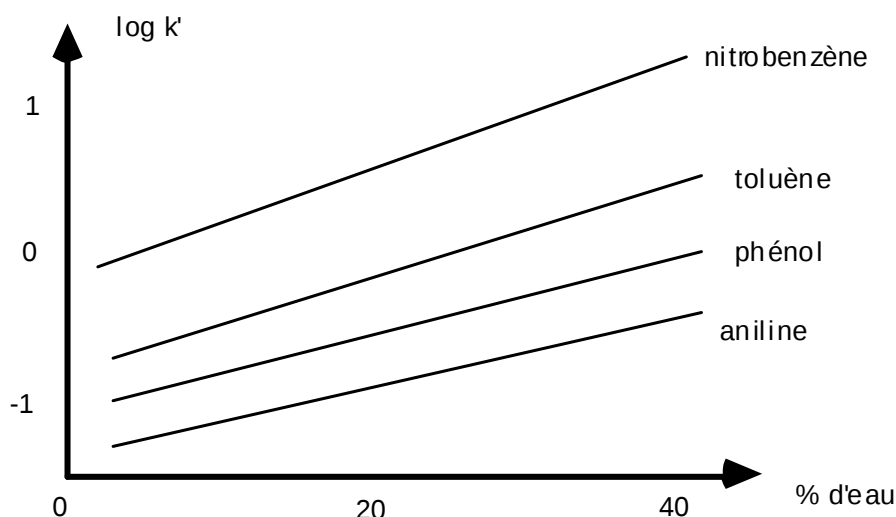


Figure 15. Variations du $\log k'$ en fonction de la teneur en eau du mélange méthanol / eau en chromatographie en phase inverse.

La phase stationnaire subit des changements de structure selon la nature de la phase mobile. Il n'est pas actuellement possible de prévoir de tels changements et seule l'expérimentation permet d'en déterminer les effets. Ainsi l'ordre d'élution de composés benzéniques varie avec l'éluant (Tableau 5 et figure 16).

Tableau 5. Ordre d'élution de dérivés benzéniques en fonction de la nature de l'éluant. Chromatographie en phase inverse (C18).

MeOH/eau 50/50	ACN/eau 30/70	THF/eau 25/75
- CONH₂ - CH₂OH - OH - CHO - CH₂-CH₂ OH	- CONH₂ - CH₂OH - OH - CH₂-CH₂OH - CHO	- CONH₂ - CH₂OH - CH₂-CH₂OH - CHO - COCH₃

- CN
- COCH₃
- NO₂
- H
- OCH₃
- COOCH₃
- CH₃
- Cl
- COOCH₂CH₃

- COCH₃
- CN
- NO₂
- COOCH₃
- H
- OCH₃
- COOCH₂CH₃
- CH₃
- Cl

- OH
- CN
- COOCH₃
- NO₂
- OCH₃
- H
- COOCH₂CH₃
- CH₃
- Cl

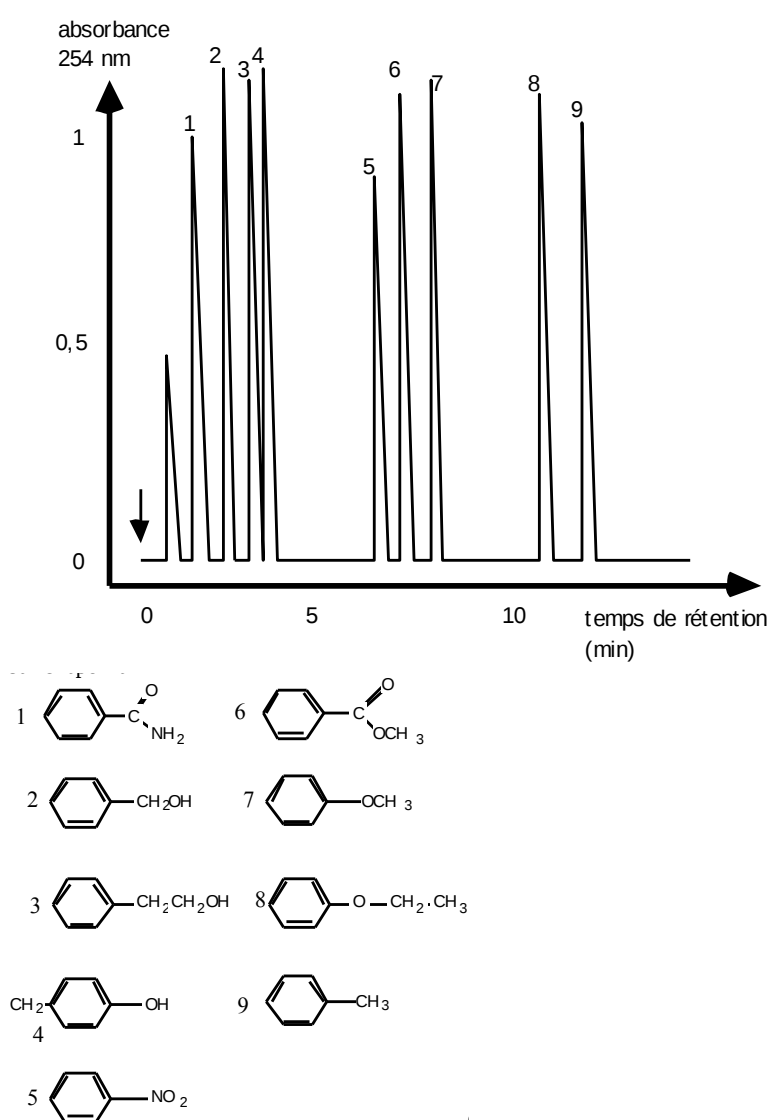


Figure 16. Chromatogramme en phase inverse C18 ($d_p = 10 \mu\text{m}$), colonne 250 x 4 mm. Solvant CH₃CN/eau 49/5, (v/v). Débit 1,2 ml.min⁻¹, ΔP 60 bars.

Par ailleurs, SHOEMAKERS et al. (1978, J. Chromatography) ont montré que le facteur de capacité était relié à la concentration en solvant organique par la relation:

$$\ln k' = A \Phi^2 + B \Phi + C$$

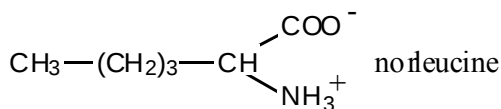
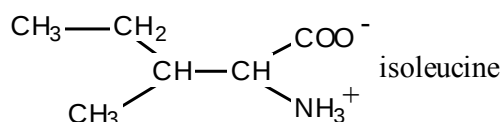
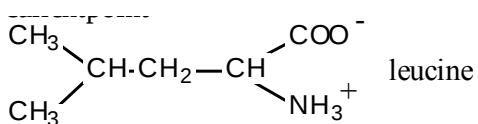
avec Φ fraction de solvant organique dans la phase mobile.

Mais c'est **SNYDER et al.** (1979, J. Chromatography) puis **CSOKAN P. et al.** (LC-GC, 1993, 6, n° 6, 361-369) qui ont montré que la valeur du facteur de capacité dans une phase mobile composée d'eau et de solvant B était égale à :

$$\log k' = \log k'_{\text{eau}} + S \cdot \Phi$$

avec k facteur de capacité, k'_{eau} facteur de capacité avec 100 % d'eau, S constante pour chaque analyte avec des valeurs typiques de 4 pour les petites molécules (poids moléculaire inférieur à 1000) et Φ le pourcentage de solvant B. Cette équation peut être validée par deux ou trois chromatogrammes.

L'interaction de Van der Waals varie avec la surface de contact entre la partie apolaire du soluté et la phase stationnaire greffée. Ainsi, les phases greffées possèdent une capacité de reconnaissance suivant la forme de la molécule. Il sera ainsi possible de séparer certains isomères de position, par contre la séparation des isomères géométriques (cis/trans) ou optiques (D/L) est plus difficile (cf phases greffées chirales.)



Les rétentions sont liées aux solubilités dans la phase mobile. Si l'on ajoute un sel neutre, l'activité de l'eau diminue et $\log k' = f([\text{sel}])$ est linéairement décroissant.

En conclusion on peut dire que plus le soluté sera soluble dans la phase mobile, moins il sera retenu.

• Elution en mode gradient

En mode gradient, le facteur de capacité moyen k^* est analogue au k' en mode isocratique. Les mêmes modifications du chromatogramme apparaissent pour k^* comme pour k' . Par exemple la rétention reste toujours plus grande avec des valeurs élevées de ces deux paramètres.

Le mode gradient permet l'élution de composés dont les k^* sont très différents (pente de variation du solvant élevée) ou au contraire de composés dont les k^* sont très voisins (pente de variation nulle : isocratique). Si tous ces composés sont présents dans l'échantillon à analyser, il est clair qu'il faudra faire varier dans le temps la concentration en solvant de façon différente, d'où la nécessité d'utiliser un système d'élution à gradient. Dans ce dernier cas, les meilleurs résultats sont obtenus pour des valeurs de k^* comprises entre 2 et 10. Il faut donc adopter une phase mobile dont la composition permettra d'obtenir la valeur désirée de k^* .

En mode isocratique k' n'est pas affecté par des variations de longueur, de diamètre, de débit, et par la taille des particules, ce qui permet des changements d'échelle relativement simples.

En mode gradient, k^* est modifié par de tels changements et le changement d'échelle reste toujours délicat.

C'est SNYDER et al. (Practical HPLC Method development, 2nd Edition, Wiley Interscience, New York, USA, 1997) qui décrit le plus en détail les paramètres à prendre en considération dans ces systèmes d'élution.

Le facteur de capacité moyen en mode gradient est égal à :

$$k^* = \frac{t_G \cdot D \cdot 100}{V_M \cdot S \cdot \Delta\Phi} \quad \text{avec} \quad S = \frac{d(\log k)}{d\Phi}$$

avec t_G le temps dans le système à gradient, D le débit, V_M le volume de phase mobile dans la colonne, S constante pour chaque analyte avec des valeurs typiques de 4 pour les petites molécules (poids moléculaire inférieur à 1000), $\Delta\Phi$ est la modification de la fraction volumique de B (0 à 100).

En mode gradient on a donc :

$$t_G = \frac{k^* \cdot V_M \cdot S \cdot \Delta\Phi}{D \cdot 100}$$

Pour k^* désiré de 5 et une valeur moyenne de S égale à 4, cette équation devient :

$$t_G = \frac{20 \cdot V_M \cdot \Delta\Phi}{D \cdot 100}$$

V_M est égal à $V_M = \varepsilon \cdot V_T$. Avec ε voisin de 0,5 on a alors :

$$V_M = \frac{L \cdot \xi \cdot d_C^2 \cdot \varepsilon}{4} \approx 0,5 \cdot L \cdot d_C^2$$

(L longueur de la colonne, d_C diamètre interne, ε porosité interstitielle, V_M volume de phase mobile).

Ainsi avec une colonne de 15 cm x 0,46 cm : V_M est environ de 1,6 mL.

Avec un gradient de 5 à 100 % de solvant B ($\Delta\Phi = 95$) et $D = 1,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ t_G est égal à 20 min.

Dans le système considéré, l'analyste obtiendra donc un chromatogramme satisfaisant en réalisant un gradient en 20 minutes, la fraction de B passant alors linéairement de 5 à 100 % dans la phase mobile.

Les appareils modernes proposent des systèmes gérés par microordinateurs qui permettent de réaliser des gradients par mélange de deux solvants. Le plus souvent les gradients réalisés sont linéaires, c'est à dire que les variations de B dans la phase mobile en fonction du temps sont linéaires. Certaines appareils permettent des gradients curvilignes ou complexes et il existe même des systèmes qui autorisent la mise en place de gradients par mélange ternaire (3 solvants) voire quaternaire. Dans ces cas seule l'expérimentation et le « savoir » faire de l'analyste peuvent répondre à un besoin analytique : les paramètres à prendre en considération restent cependant très nombreux et il devient souvent illusoire de maîtriser toutes les inconnues introduites dans ces conditions.

c) Augmentation de k' par modification du soluté

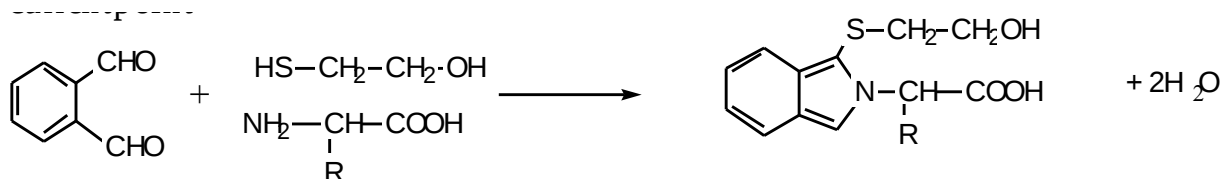
a) fixation sur un soluté polaire d'un composé apolaire par liaison covalente

Cette méthode est de plus en plus largement utilisée pour séparer les acides aminés par chromatographie en phase greffée apolaire.

Il existe aujourd'hui de nombreuses réactions chimiques de modification/détection des acides aminés. La plupart de ces réactions ont les particularités suivantes: elles sont rapides, stoechiométriques, et donnent des dérivés dont certains sont très stables et de détection facile. La sensibilité de détection a été multipliée par un facteur 1000 en comparaison avec la détection "ninhydrine," par l'utilisation de produits donnant avec les acides aminés des dérivés fluorescents.

1) Réaction avec l' O-phthaldialdéhyde (OPA)

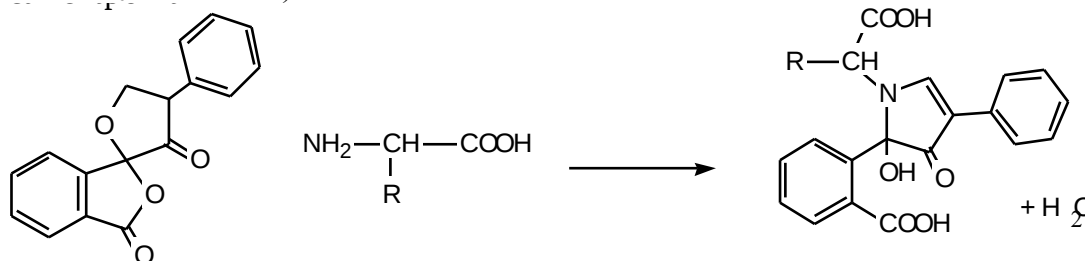
L'OPA réagit à froid, en présence de β mercaptoéthanol et en milieu alcalin avec les acides aminés pour donner des dérivés isoindoliques fluorescents ($\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ém}} = 455 \text{ nm}$).



La proline et l'hydroxyproline ne donnant pas directement la réaction, il est nécessaire, pour pouvoir les détecter, de traiter au préalable les hydrolysats par de l'hypochlorite de sodium. La stabilité de certains dérivés isoindoliques formés n'est pas très grande, ce qui implique donc une analyse extemporanée.

2) Réaction avec la fluorescamine (4-phénylspiro (furan-2(3H),1'-phthal)-3,34 dione).

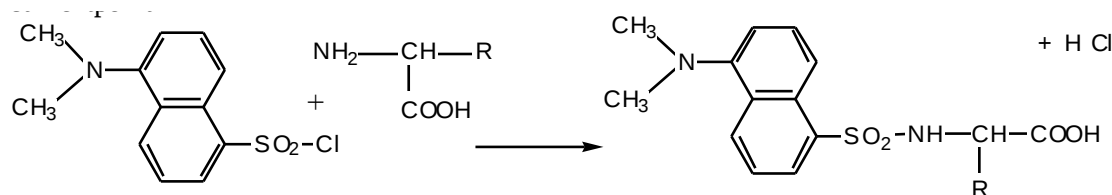
La réaction se fait à température ambiante et est complète entre pH 7 et 9 en environ 1 seconde ($\lambda_{\text{ex}} = 390 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{ém}} = 475 \text{ nm}$).



Il s'agit d'une réaction très sensible (seuil de détection voisin de la pmole) qui permet des dosages de quantités d'acides aminés de l'ordre de 0,1 nmole. La fluorescamine ne réagit pas non plus avec les amines secondaires comme la proline ou ses dérivé. Pour réaliser le dosage de ces acides aminés il faut donc les transformer en amines primaires par traitement à l'hypochlorite ou à la N-chlorosuccinimide.

3) Réaction avec le chlorure de dansyle

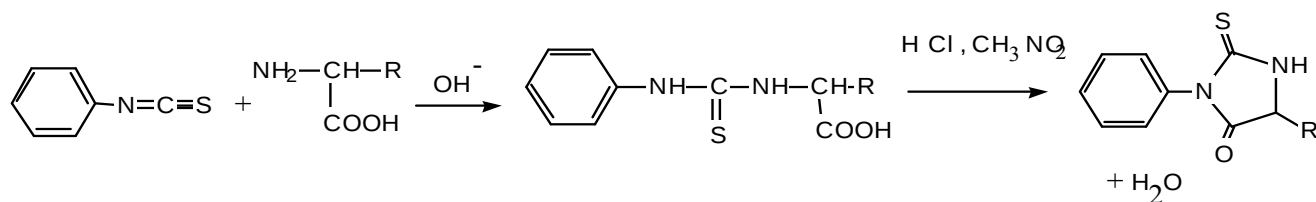
Ce réactif permet d'obtenir des dérivés sulfamides très fluorescent.



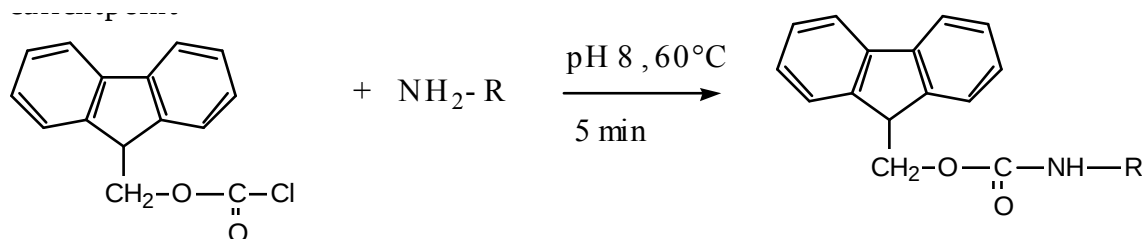
Il existe actuellement beaucoup d'autres méthodes de détection fluorimétrique des acides aminés (FMOC etc.). Il s'agit toujours de méthodes très performantes dont le choix est fonction de paramètres comme la stabilité des dérivés formés, la simplicité de mise en oeuvre, le coût etc. Il faut signaler que tous les dérivés décrits (OPA, fluorescamine, dansyl) absorbent dans l'UV, ce qui permet leur détection et leur dosage avec une sensibilité moindre que par la méthode fluorimétrique.

4) Réaction au phénylisothiocyanate (PITC)

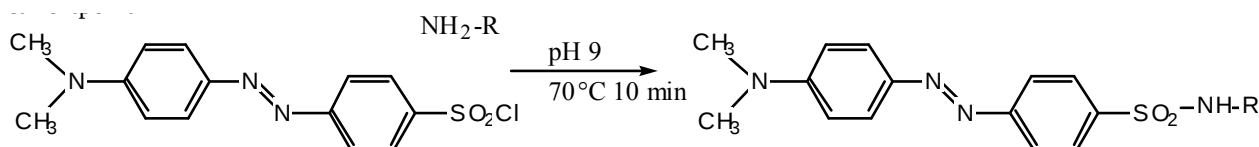
Le phényl isothiocyanate réagit avec les acides aminés pour former des dérivés facilement détectables dans l'UV. Les phénylthiocarbamyl (PTC) sont transformables en dérivés phénylthiohydantoïne (PTH) en milieu chlorhydrique en présence de méthylnitrosamine.



5) Réaction avec le 9,fluorénylméthyl-chloroformate (Fmoc-HCl)



6) Réaction avec le chlorure de Dabsyl



Les dérivés obtenus ont des facteurs de capacité beaucoup plus importants que l'acide aminé de départ. Il est ainsi possible de réaliser leur séparation par HPLC en phase inverse (figure 17).

De plus ces dérivés sont détectables par fluorescence ou par absorption UV, ce qui facilite le dosage. La limite de détection atteint respectivement 10^{-13} et $5 \cdot 10^{-12}$ g.

Les avantages et inconvénients des principales méthodes de dérivation des acides aminés sont indiquées dans le **Tableau** de synthèse ci-dessous

	mode de dérivation			
	dabsyl	PITC	OPA	FMOC
amines 2aires	oui	oui	non	oui
sensibilité	5 pmoles UV	5 pmoles UV	150 fmoles Fluo	100fmoles Fluo
stabilité	bonne	moyenne	mauvaise	bonne
interférence du réactif	oui	oui	non	oui
automatisable	moyen	mauvais	oui	moyen

Il existe des possibilités de combinaisons de certaines de ces méthodes. Ainsi la combinaison OPA - FMOC permet d'obtenir après chromatographie en phase inverse et par mesure de l'absorbance à 338 nm tous les acides aminés avec des NH₂ primaires jusqu'à l'élution de la lysine puis, par lecture à 262 nm l'élution et la détection de la proline et de l'OH-proline (GODEL H. et al, 1992, **5**, LC-GC, 44-49).

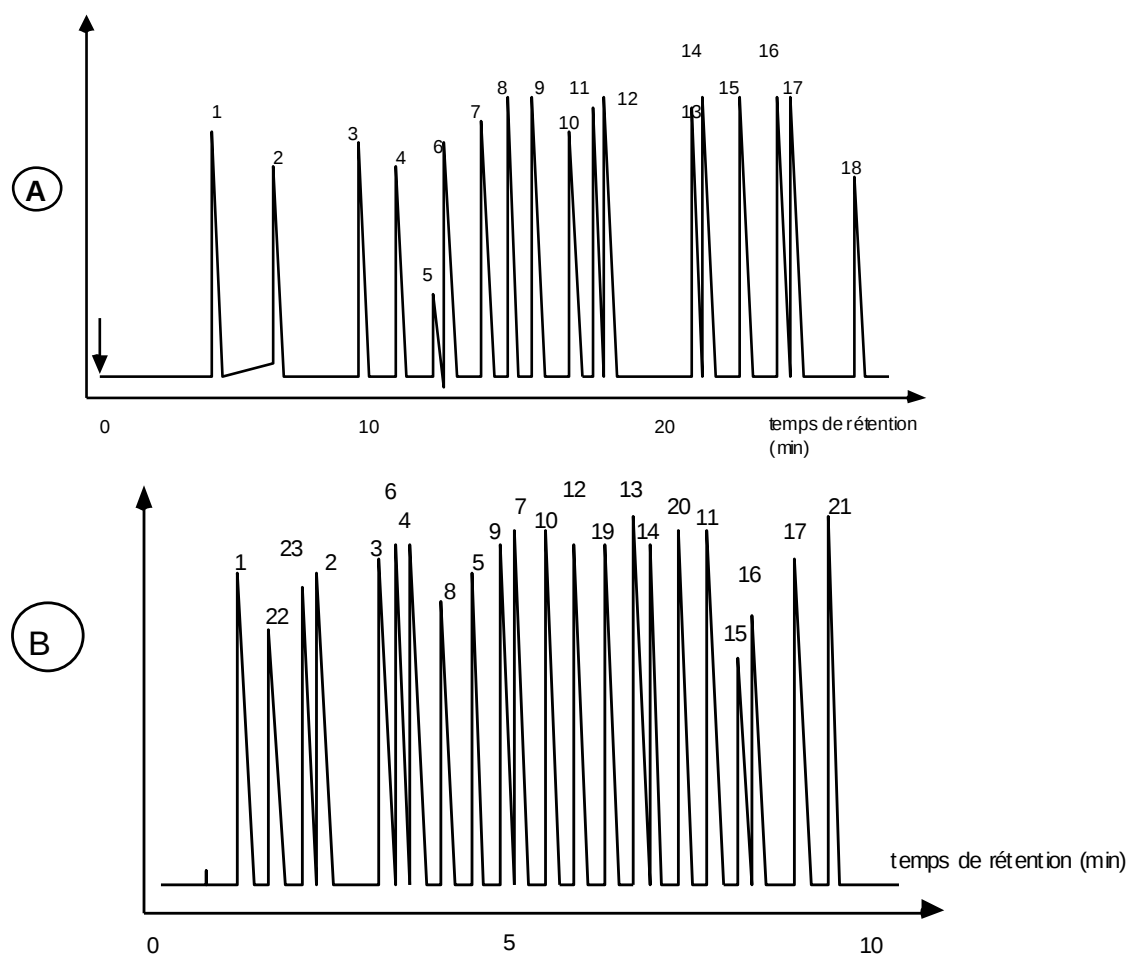


Figure 17 : Chromatogramme en phase inverse (C18) des dérivés d'acides aminés

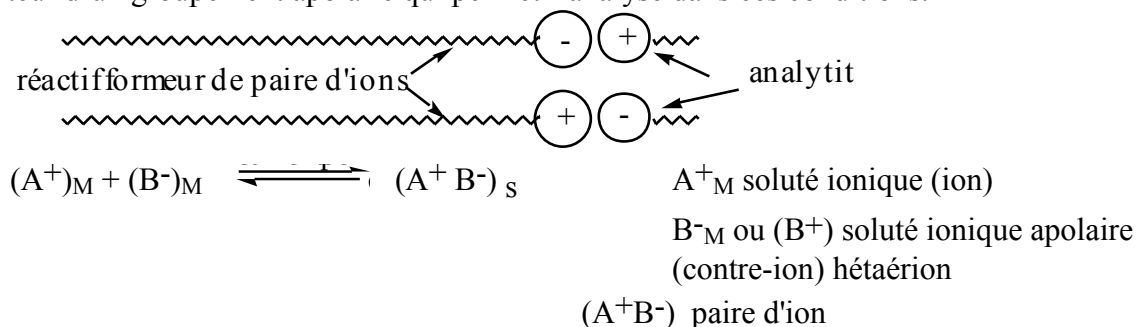
A réactif OPA - dérivés isoindoliques ; détecteur fluorimétrique

B dérivés PTH

1.Asp, 2.Glu, 3.Asn, 4.Ser, 5.Gln, 6.His, 7.Gly, 8.Thr, 9.Arg, 10.Ala, 11.acide γ -butyrique, 12.Tyr, 13.Met, 14.Val, 15.Phe, 16.Ile, 17.Leu, 18.Lys, 19.Pro, 20.Trp, 21.NorLeu, 22.acide cystéique, 23.CH₃Cys

b) Fixation sur un soluté ionique d'un composé apolaire par liaison ionique : **Appariement d'ions**

Le but de cette méthode est de lier, par formation d'une paire d'ion, une molécule polaire ionisée (acide, base par exemple) qui n'est donc pas directement analysable en HPLC-RP, à un ion de charge opposée mais porteur d'un groupement apolaire qui permet l'analyse dans ces conditions.



$$K_{AB} = \frac{[A^+ B^-]_{\text{S}}}{[A^+]_{\text{M}} [B^-]_{\text{M}}}$$

La paire d'ion formée peut posséder un facteur de capacité autorisant une bonne séparation chromatographique sur phase stationnaire greffée apolaire. k' sera d'autant plus grand, que l'hydrophobicité du contre ion sera grande. Les principaux réactifs formeurs de "paire d'ions" sont indiqués dans le tableau 6.

Tableau 6. Principaux réactifs formeurs de paires d'ions

(B ⁺)	(B ⁻)	
bromure d'hexadécyltriméthyl-ammonium	1 heptane sulfonate	(Na ⁺)
bromure de tétrabutylammonium	1 hexane sulfonate	(Na ⁺)
bromure de tétradécyltriméthyl ammonium	1 octane sulfonate	(Na ⁺)
bromure de tétraméthyl ammonium	1 pentane sulfonate	(Na ⁺)
bromure de tétrapropyl ammonium	Dodécyl sulfate de sodium	
	Naphtalène sulfonate	(Na ⁺)

On peut par exemple obtenir des séparations d'acides organiques (figure 18) ou d'amines (figure 19).

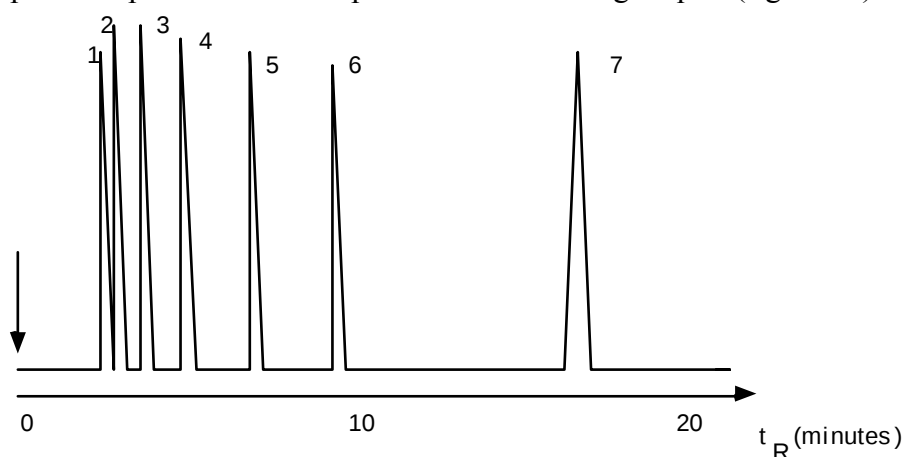


Figure 18. Chromatographie par appariement d'ions en phase inverse d'acides organiques (RP2) Phase mobile 0,03 M tétrabutylammonium pH 7,4.

1 = acide 4-aminobenzoïque ; 2 = acide 3-aminobenzoïque ; 3 = acide 4-hydroxybenzoïque ; 4 = acide 3-hydroxybenzoïque ; 5 = acide benzène sulfonique ; 6 = acide benzoïque ; 7 = acide toluène 4-sulfonique.

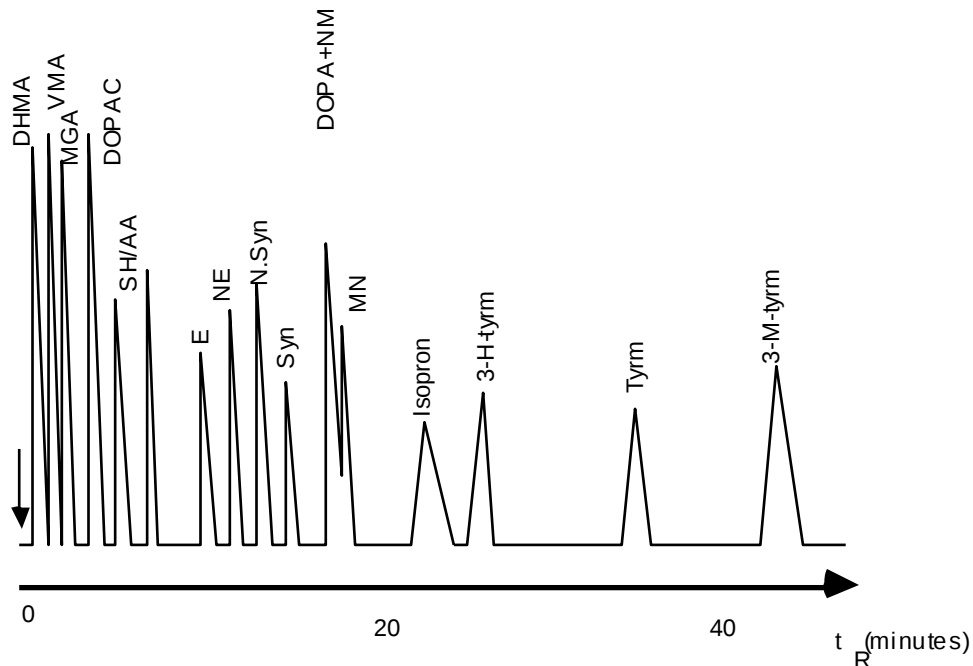


Figure 19. Séparation isochratique de catécholamines par chromatographie par appariement d'ions en phase inverse. Le contre-ion est le SDS.

L'ion d'appariement (hetærien : ion compagnon) se trouve dans la phase aqueuse à une concentration beaucoup plus élevée que celle du soluté A^+ . Le coefficient de distribution du soluté est :

$$K_S = \frac{[A^+B^-]_S}{[A^+]_M} = K_{AB} [B^-]_M$$

Le facteur de capacité est proportionnel à K_S en chromatographie de phases inversées et à $1/K_S$ en chromatographie dite normale, k' sera proportionnel à la concentration de l'agent d'appariement dans le premier cas, et à son inverse dans le second.

VI.2. LA CHROMATOGRAPHE DE PARTAGE

Dans cette technologie la phase stationnaire est un liquide qui imprègne un support en principe inerte ou est greffée par liaison chimique covalente sur ce support. La séparation des solutés est fondée sur leur partage entre cette phase stationnaire et la phase mobile liquide.

Le coefficient de distribution est appelé coefficient de partage :

$$K = \frac{C_S}{C_M} \quad \text{et} \quad k' = \frac{V_S}{V_M}$$

k' facteur de capacité

V_S volume de phase stationnaire contenue dans la colonne

V_M volume de phase mobile contenue dans la colonne

C_M C_S : concentrations respectives du soluté dans la phase mobile et dans la phase stationnaire.

Cette technique s'apparente à l'extraction liquide/liquide basée sur les différences de solubilités dans deux phases non miscibles, mais ici une des deux phases est immobilisée sur un solide dont les particules ont des diamètres très petits (d_p) ; l'augmentation considérable de la surface de contact entre les deux phases fait que l'on obtient des efficacités très supérieures à celles obtenues en extraction liquide/liquide classique à contre-courant.

Comme en extraction, il faut que la solubilité de l'une des deux phases dans l'autre soit aussi faible que possible.

Dans la chromatographie de partage classique, on choisit une phase stationnaire polaire et une phase mobile apolaire.

Dans la chromatographie de partage à polarité de phases inversée, on choisit une phase stationnaire apolaire et une phase mobile polaire.

La chromatographie de partage donne de très bons résultats pour la séparation de composés à groupements fonctionnels différents, de composés d'une série homologue.

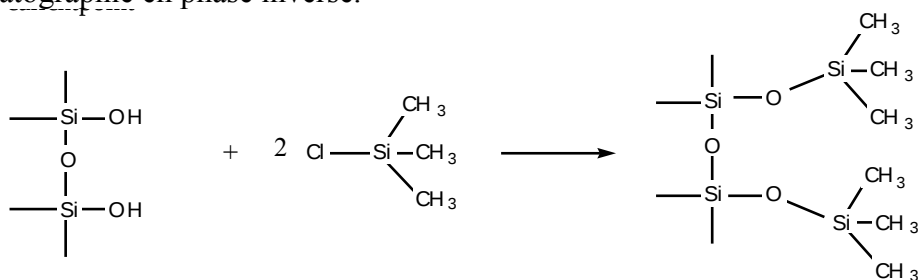
La chromatographie liquide-liquide classique (phase stationnaire polaire) est surtout utilisée pour la séparation de composés polaires, tandis que la chromatographie à polarité de phase inversée est utilisée pour la séparation de composés apolaires (hydrocarbures à longue chaîne).

VI.2.1. Phases stationnaires utilisées en chromatographie liquide / liquide

a) Tous les supports utilisés en chromatographie solide-liquide peuvent être utilisés à condition qu'ils soient rendus inertes.

On utilise soit :

- des supports poreux tels que la silice sur laquelle la phase stationnaire liquide est une multicouche liée au support par des liaisons hydrogène ou polaire aux groupements silanols. Il existe des supports pelliculaires (poreux en surface).
- des supports poreux apolaires tels que la silice dans laquelle les groupements silanol ont été transformés en groupements triméthyl apolaires (ou hexaméthyl) par réaction avec le triméthylchlorosilane. Il s'agit ici d'une chromatographie en phase inverse.



La phase stationnaire sera liée au support par des interactions hydrophobes.

b) La phase stationnaire

Elle doit tapisser de façon aussi uniforme que possible les parois des pores du support.

Cette phase doit être très peu miscible avec la phase mobile et sa viscosité doit être la plus faible possible pour que les phénomènes de transfert de masse et de diffusion soient facilités.

L'imprégnation peut être réalisée de plusieurs façons :

- par évaporation du solvant : la phase stationnaire est dissoute dans un solvant approprié puis mélangée avec le support. Le solvant est ensuite éliminé par évaporation.
- par filtration du solvant : dans ce cas le solvant de la phase stationnaire est éliminé par filtration.

• par percolation : la phase stationnaire est "dissoute" dans un solvant volatil, puis on la fait percoler à travers la colonne ; on chasse le liquide interstitiel puis on évapore le solvant par un courant gazeux. En faisant varier la concentration des solutions de phases stationnaires, on peut faire ainsi varier l'épaisseur du film sur le support.

VI.2.2. La phase mobile

Le choix de la phase mobile est empirique ; on se laisse guider par la notion de polarité que l'on peut estimer par le paramètre de solubilité d'Hildebrand (tableau 7). Ce paramètre δ résulte de la combinaison de trois principales interactions entre le soluté et le solvant

Tableau 7. Classement des solvants selon le paramètre de solubilité d'Hildebrand ($G = \text{grand}$).

SOLVANT	δ	δ_p	δ_o	δ_a	δ_d	SOLVANT	δ	δ_p	δ_o	δ_a	δ_d
Perfluoroalcanes	6	6	0	1	0	Pyridine	10,4	9	4	5	0
isooctane	7	7	0	0	0	Ethanol	11,2	6,8	4	5	5
n-Pentane	7,1	7,1	0	0	0	Acétonitrile	11,8	6,5	8	2,5	0
n-Hexane	7,3	7,3	0	0	0	Acide acétique	12,4	7			
n-Heptane	7,4	7,4	0	0	0	Diméthylsulfox.	12,8	8,4	7,5	5	0
Ether diéthylique	7,4	6,7	2	2	0	Méthanol	12,9	6,2	5	7,5	7,5
Cyclohexane	8,2	8,2	0	0	0	Ethanolamine	13,5	8,5	G	G	G
Tétrachlorure carb.	8,6	8,6	0	0,5	0	Ethylène glycol	14,7	8	G	G	G
Toluène	8,9	8,9	0	0,5	0	Formamide	17,9	8,3	G	G	G
Chloroforme	9,1	8,1	3	0,5	3	Eau	21	6,3	G	G	G
Tétrahydrofurane	9,1	7,6	4	3	0						
Benzène	9,2	9,2	0	0,5	0						
Acétone	9,4	6,8	5	2,5	0						
Propanol	10,2	7,2	2,5	4	4						

- interactions de dispersion (forces de London) mesurées par δ_p . Les solvants avec des δ_p élevées donneront des interactions fortes avec des dérivés polarisables (composés aromatiques, composés halogénés ou soufrés de masse molaire élevée).

- interactions dipôles-dipôles mesurées par δ_o . Les solvants avec des δ_o élevées donneront des interactions fortes avec des solutés à fort moment dipolaire (nitriles, sulfoxydes, amides, dérivés nitrés).

- interactions hydrogène résultant soit d'un pouvoir accepteur de proton mesuré par δ_p soit d'un pouvoir donneur mesuré par δ_a . Les solvants de δ_a élevé donneront des liaisons hydrogène avec des solutés donneurs (phénols, acides carboxyliques etc...) et les solvants de δ_p élevé avec les solutés accepteurs (amines, sulfoxydes etc...).

Chacun des 4 paramètres (δ_a , δ_p , δ_o , δ_d) pris isolément ne peut rendre compte de la polarité de tel ou tel solvant envers un soluté donné: c'est la combinaison (δ) qui permet d'apprécier le mieux cette propriété.

On commence en général par choisir un solvant de telle sorte que les facteurs de capacité des divers solutés soient compris entre 1,5 et 10. En CLL classique (phase stationnaire polaire) la force d'un solvant augmente avec sa polarité et il suffit de diminuer δ pour que les facteurs de capacité diminuent. C'est l'inverse en CLL à polarité de phase inversée.

Les couples phases stationnaire-phase mobile les plus employés en chromatographie liquide-liquide sont indiqués dans le tableau 8.

Tableau 8. Quelques systèmes utilisés en CLL

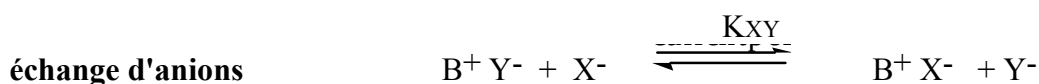
phases stationnaires	phases mobiles
<i>Chromatographie liquide classique</i>	
β β'propionitrile carbowax triéthylène glycol éthylène glycol diméthylsulfoxyde éthylène diamine eau polyamide	pentane, hexane, isooctane idem + 20 % de chloroforme, THF acétonitrile éther di n-butylique isooctane hexane n-butanol hexane/méthanol
<i>Chromatographie liquide à polarité de phases inversée</i>	
cyanoéthylsilicone diméthylpolysiloxane heptane polymère hydrocarboné squalane	méthanol/eau acétonitrile/eau méthanol/eau méthanol/eau acétonitrile/eau

VI.3. LA CHROMATOGRAPHIE D'ÉCHANGE D'IONS

La phase stationnaire est un support insoluble contenant des groupements chargés. Ceux d'un certain signe sont fixes car liés chimiquement, les autres de signe opposé sont mobiles. Ces derniers peuvent être échangés réversiblement avec d'autres ions de même charge sans aucun changement de la partie insoluble.

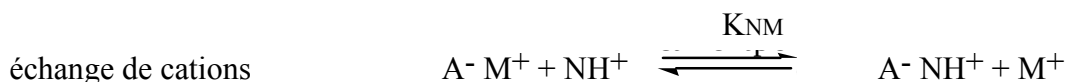
Les groupes ioniques fixes déterminent le type et la force de l'échangeur. Le nombre et l'accessibilité déterminent la capacité.

Pour des composés monovalents (ion du soluté et contre-ion) le processus d'échange peut être simplement décrit par les équilibres suivants :



avec

$$K_{XY} = \frac{[B^+ X^-][Y^-]}{[B^+ Y^-][X^-]} \quad \text{on tire } [B^+ X^-] \text{ que l'on porte dans } D_X$$

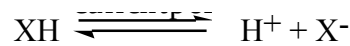


K_{XY} et K_{NM} sont les constantes d'équilibre de la réaction d'échange. X^- et NH^+ sont les solutés Y^- et M^+ sont les contre-ions. B^+ et A^- sont les groupements ionisés fixés sur la phase stationnaire.

$$K_a$$

Pour des acides on a

avec



$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{X}^-]}{[\text{XH}]}$$

on tire $[\text{XH}]$ que l'on porte dans D_X

et pour les bases



Le **coefficient de distribution D** (rapport des concentrations du soluté chargé dans la phase stationnaire sur la somme des concentrations du soluté chargé et non chargé dans la phase mobile) sera égal à :

échange d'anions

$$D_X = \frac{[\text{B}^+\text{X}^-]}{[\text{X}^-] + [\text{XH}]} = K_{XY} \cdot \frac{[\text{B}^+\text{Y}^-]}{[\text{Y}^-]} \cdot \frac{1}{1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_a}}$$

échange de cations

$$D_N = \frac{[\text{NH}^+\text{A}^-]}{[\text{N}] + [\text{NH}^+]} = K_{NM} \cdot \frac{[\text{M}^+\text{A}^-]}{[\text{M}^+]} \cdot \frac{1}{1 + \frac{K_a}{[\text{H}^+]}}$$

D est proportionnel à la constante d'équilibre de l'échange (K_{XY} , K_{NM}) et au nombre de groupes ionisés de la matrice ($[\text{B}^+\text{Y}^-]$, $[\text{A}^-\text{M}^+]$).

D est inversement proportionnel à la concentration en contre-ion ($[\text{Y}^-]$, $[\text{M}^+]$) dans la phase mobile.

D est fonction du pH et du pK_a .

Le mécanisme d'élution est schématisé sur la figure 20.

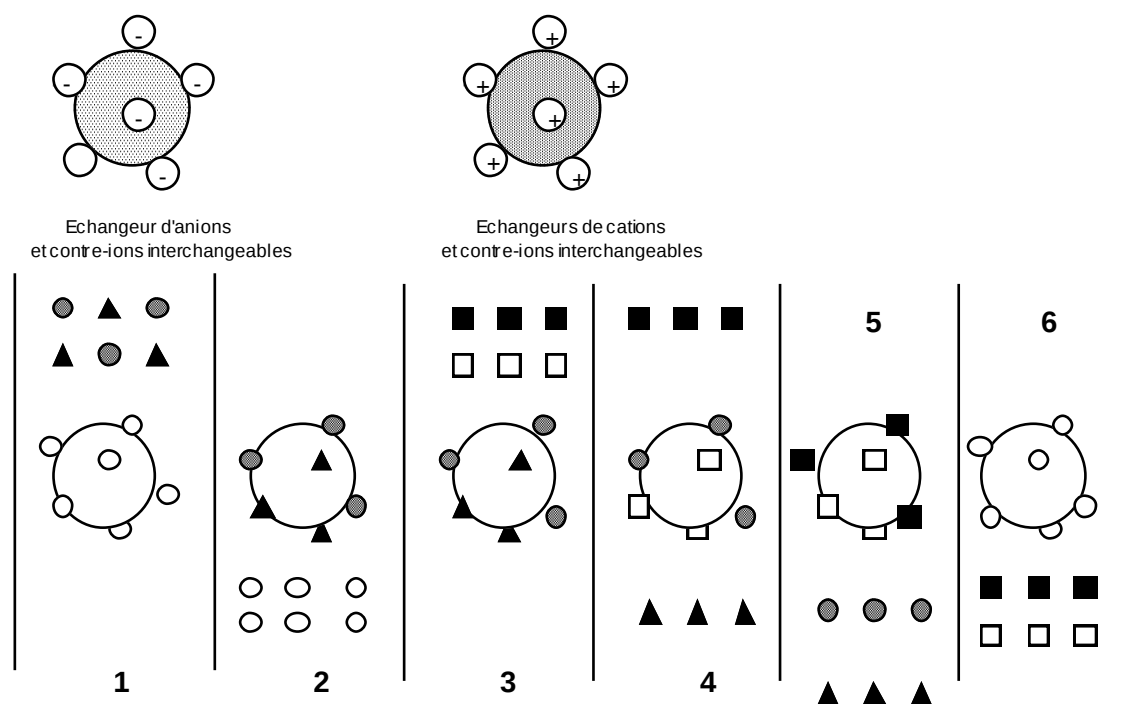


Figure 20 . Chromatographie d'échange d'ions. Types d'échangeurs et mécanisme de l'élution.

1. l'échangeur d'ions est en équilibre avec les contre-ions (O). Les ions à échanger et à séparer   pénètrent dans l'échangeur

2. les contre-ions ont été échangés avec les ions à séparer

3. on applique un gradient d'élution  

4. la désorption d'un des constituants intervient , il est élué



5. les ions restants sont échangés et élués

6. l'échangeur est régénéré.

VI.3.1. Principaux types de groupements fonctionnels

Les groupements les plus utilisés sont de type sulfonate ($-\text{SO}_3^-$), phosphonate

($-\text{PO}_2^-$) et carboxylate ($-\text{COO}^-$) pour les échangeurs de cations et de type ammonium quaternaire ($-\text{N}^+\text{R}_3$), tertiaire ($-\text{N}^+\text{HR}_2$) ou secondaire ($-\text{N}^+\text{H}_2\text{R}$).

Les groupements de type sulfonate ou ammonium quaternaire sont des échangeurs d'ions forts, les autres des échangeurs faibles. Ainsi la fraction chargée d'échangeurs de type sulfonate ou ammonium quaternaire n'est pas influencée dans une zone large de pH (figure 21) tandis que les échangeurs faibles présentent des variations importantes de leurs ionisations entre pH 4 et 8.

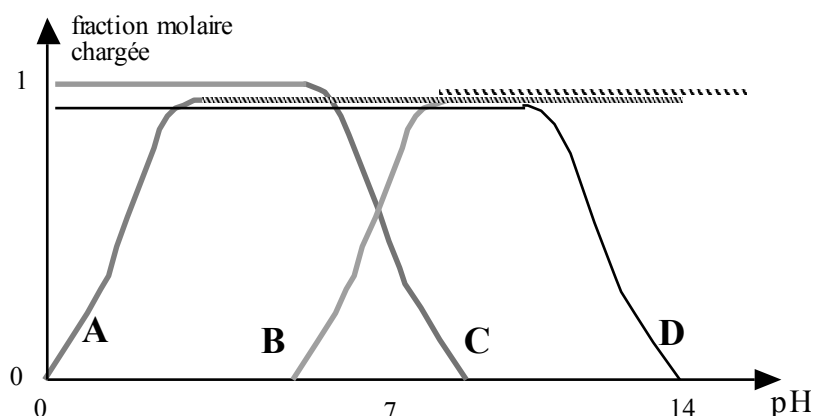


Figure 21. Variation de la charge de groupements fonctionnels utilisés en chromatographie d'échange ionique en fonction du pH

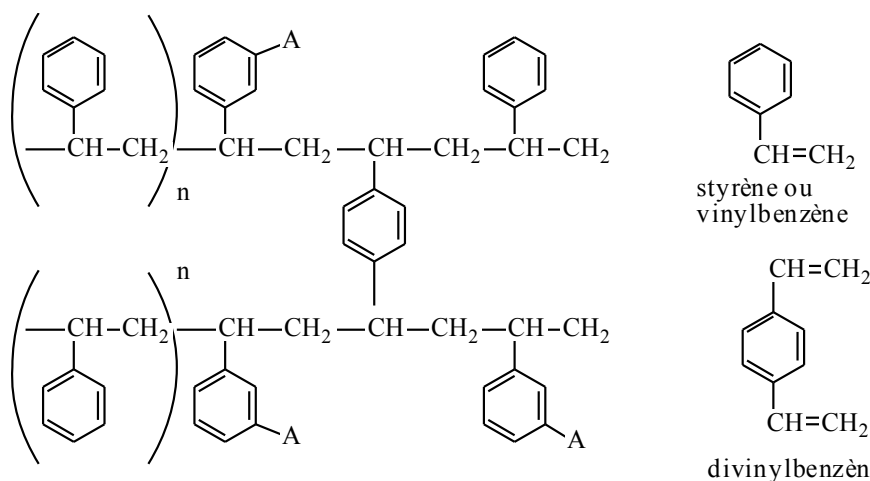
A échangeur de cations fort B échangeur de cations faible C échangeur d'anions faible D échangeur d'anions fort

Certains groupements possèdent des propriétés complexantes vis-à-vis de certains cations métalliques (phosphonate, aminodiacétate).

VI.3.2. Principaux types de matrice

Il existe des matrices de type organique (polystyrène, méthacrylate, dextrane) cellulosique ou silice.

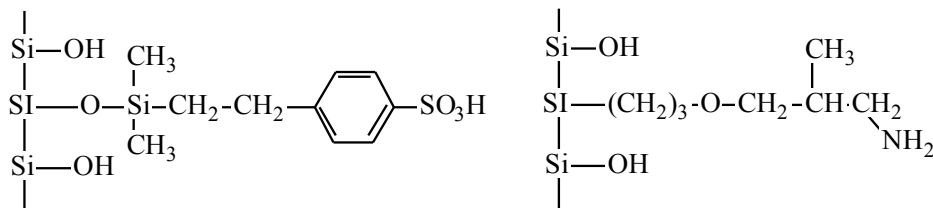
Les résines de type polystyrène (BARNES N., Internat. Lab., oct 1993, **16**, P4-P8) résultent de la polymérisation de vinylbenzène avec comme agent de pontage du divinylbenzène (4 à 8 %). Ces matrices sont synthétisées dans une phase apolaire solvante des monomères dispersée sous forme d'émulsion dont la taille des particules dispersées est parfaitement contrôlée.



Structure d'une matrice de phase stationnaire de type polystyrène.

A = groupement fonctionnel ionisable (souvent SO_3H).

Les matrices dont le support est la silice ont par exemple les structures suivantes :



Il existe des échangeurs d'ions à “**bras mobiles**” (J.Chromatogr., 1988, **443**, 73-83) qui permettent une séparation non dénaturante de macromolécules (protéines, acides nucléiques, particules virales etc) et qui confèrent à la phase stationnaire une propriété exclusive d'échangeur d'ions, les interactions hydrophobes, hydrogène, $\pi - \pi$ étant pratiquement négligeables.

Les interactions entre une protéine globulaire et cette phase ou une phase “classique” sont schématisées sur la figure 22.

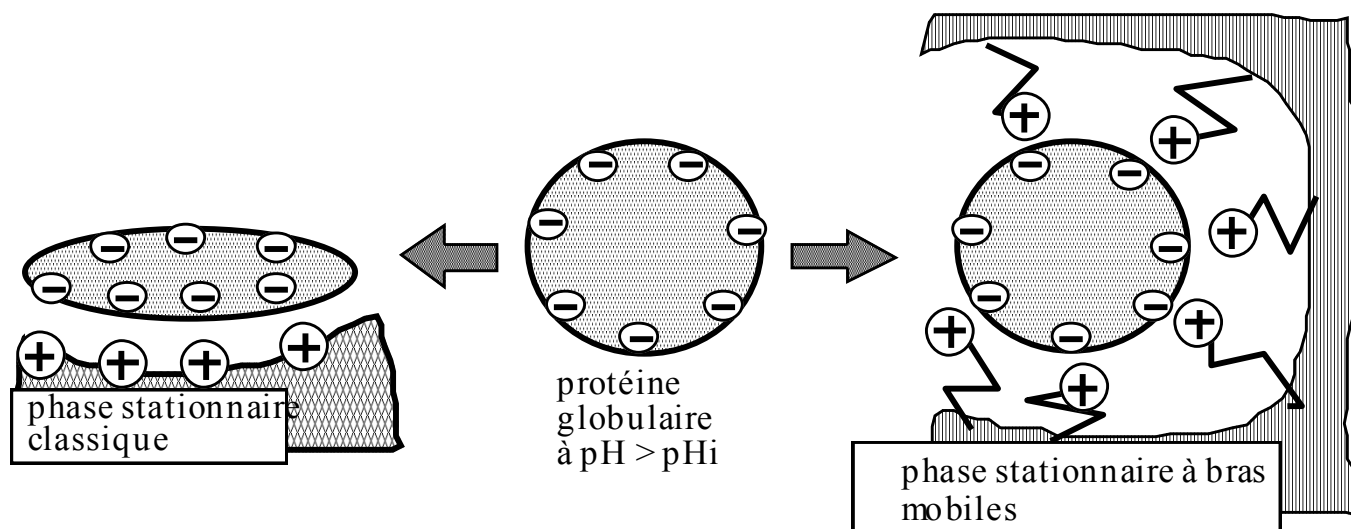


figure 22 . Effets d'une échangeur d'anions classique et “tentaculaire” sur la conformation d'une protéine globulaire .

Ces phases stationnaires sont obtenues en utilisant des supports sphériques de silice ou polymériques comportant de très larges pores et de diamètre voisin de $5\ \mu\text{m}$, particules à la surface inactivée. Les échangeurs d'anions de type diméthylaminoéthyle, faiblement basiques, ou les échangeurs de cations de type carboxyle ou sulfonate ont été liés au support par l'intermédiaire de polymères linéaires greffés. La configuration flexible des groupes d'échangeurs contribue alors à diminuer le trajet et donc la diffusion du soluté mais aussi d'atteindre plus de groupements acides sur la molécule protéique ou d'acide nucléique ce qui contribue à augmenter la sélectivité.

Un exemple de chromatogramme de protéines sur échangeurs de cations et d'anions à bras mobiles ou classique est schématisé sur la figure 24 .

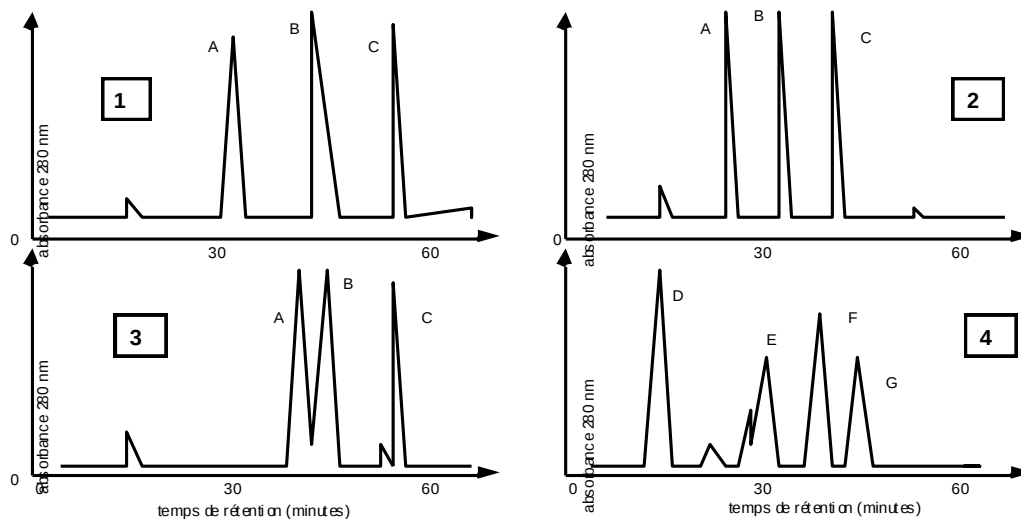


figure 24 . Séparations de protéines par échange de cations.

A = chymotrypsinogène A, B = cytochrome C, C = lysozyme.

1 : échangeur à bras mobiles sur une phase de type gel porteuse de groupements carboxyles (colonne de 15 cm x 0,5 cm).

2 : échangeur sulfoné tentaculaire $d_p = 5 \mu\text{m}$, colonne de 5 cm x 0,5 cm, élution par gradient (dihydrogénophosphate de sodium 20 mM pH 6 avec Na Cl de 0 à 1 M en 60 min).

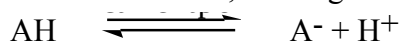
3 : échangeur traditionnel de type TSK-CM. Pour 1 et 2 élution par gradient (tampon acétate pH 5; 10 mM avec Na Cl de 0 à 1 M en 100 min, débit 1ml.min⁻¹).

4 : séparation de conalbumine (D), ovalbumine (E), β -lactoglobuline A (F) et β -lactoglobuline B (G) sur échangeur d'anions TMAE, colonne de 15 cm x 1 cm, élution par gradient (pipérazine 20 mM pH 6 et Na Cl de 0 à 0,3 M entre 10 et 45 min), débit 1,2 ml.min⁻¹.

VI.3.3. Influence du pH de la phase mobile

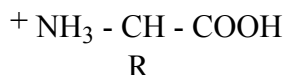
Il s'agit du paramètre principal de rétention .

Ainsi pour un acide faible, une augmentation de pH se traduit

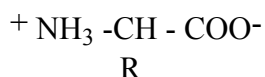


par un déplacement de l'équilibre vers la gauche, l'acide AH étant peu (ou pas) retenu.

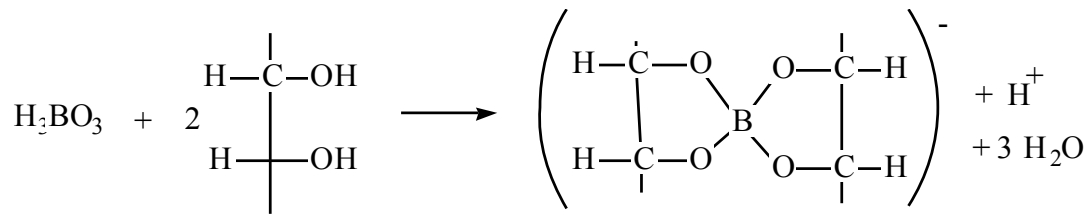
Avec les **acides aminés**, on utilise une colonne échangeuse de cations (polystyrène sulfoné). On se place initialement dans des conditions de pH (≈ 2) pour lesquelles tous les acides aminés sont sous la forme



Si on injecte sur la colonne des solutions tampon de pH croissant, les acides aminés seront élués en fonction de leur pH_i . En effet, quand le pH de la phase mobile est égal au pH_i l'acide aminé se trouve sous forme de switterion non chargé, donc non retenu.



Avec les **composés polyhydroxylés** (oses, diholosides etc...) on réalise un complexe avec l'acide borique, complexe chargé négativement.



Ces complexes peuvent être séparés sur résines échangeuses d'anions (tampon borate avec gradient de pH de 7 à 10).

VI.3.4. Influence du type et de la concentration en contre-ion

La constante d'équilibre de l'échange reflète l'affinité du soluté ionique ou du contre-ion pour l'échangeur. En général les échangeurs d'ions ont une grande affinité pour :

- les ions possédant une forte charge
- les ions avec un petit volume d'hydratation.

Il est possible de classer les ions en fonctions de leur affinité pour l'échangeur, donc de leur "force d'élution".

Ainsi avec un **échangeur d'anions** du type ammonium quaternaire on a :

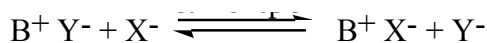
citrate > ClO₄⁻ > SO₄²⁻ > oxalate > I⁻ > NO₃⁻ > Br⁻ > SCN⁻ > Cl⁻ > formiate > acétate > OH⁻ > F⁻

Avec les **résines échangeuses de cations de type sulfonate** on a :

Ce³⁺ > Ba²⁺ > Pb²⁺ > Sr²⁺ > Ca²⁺ > Ni²⁺ > Ca²⁺ > Cu²⁺ > Co²⁺ > Zn²⁺ > Mn²⁺ > Ti⁺ > Ag⁺ > Cs⁺ > Rb⁺ > K⁺ > NH₄⁺ > Na⁺ > H⁺ > Li⁺.

Quand le soluté et le contre ion sont complètement chargés, la pente de la droite log D(N ou X) en fonction de la concentration en contre-ion est en général égale à a/b, avec a valence du soluté, b valence du contre ion.

Quand la concentration en contre-ion augmente (X⁻)



on déplace l'équilibre vers la droite.

VI.3.5. Effet de la température et de solvants organiques

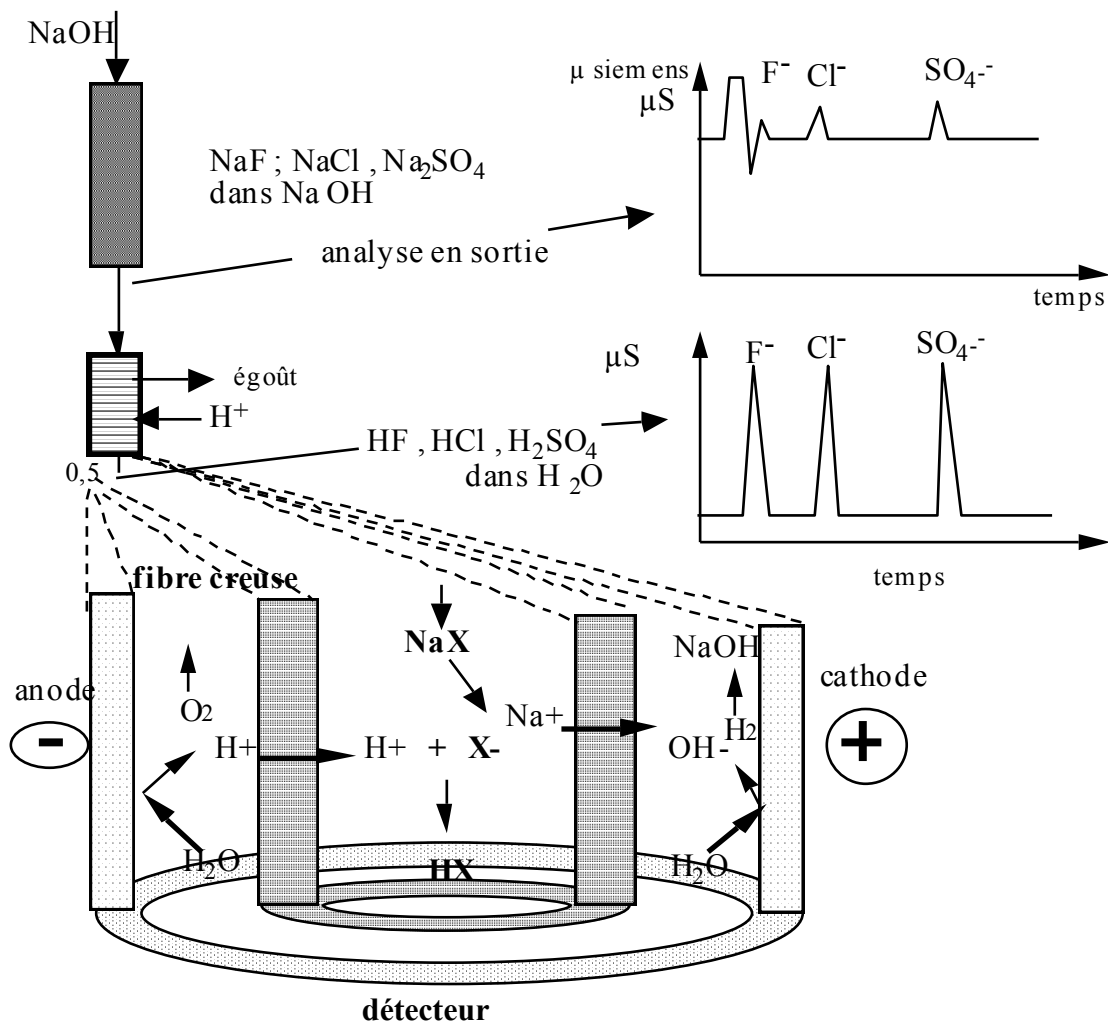
Si on augmente la température de la colonne, la rétention du soluté diminue. De plus la viscosité de la phase mobile diminue ce qui permet d'augmenter le débit.

L'addition de solvants organiques à la phase aqueuse mobile affecte la rétention. En effet, les effets secondaires de la matrice (adsorption hydrophobe dans le cas de polystyrène et perméation) jouent un rôle prépondérant dans la distribution des ions et plus particulièrement des ions organiques.

VI.3.6. Analyse par chromatographie d'échange d'ion avec supprimeur de phase (SAARI-NORDHAUS R., ANDERSON J.M., Intern. Lab., 1994, 18, P4)

Cette méthode est utilisée pour supprimer la conductance apportée par l'éluant sous forme de contre-ion. Les phases supprimeurs sont des matrices de type polystyrène et sont souvent présentées sous forme de fibres creuses.

Ces phases permettent le dosage d'anions avec une résolution remarquable.



Cette méthode est utilisable pour analyser des anions ou des cations .

VI.4. LA CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

VI.4.1. Principe

La chromatographie d'exclusion, ou gel filtration ou gel perméation est fondée sur la "rétention" des molécules de soluté en fonction de leur taille en raison de leur pénétration dans les pores, remplis de solvant, d'une phase stationnaire appropriée. Si on suppose que les molécules de soluté ne présentent aucune affinité pour les parois de la phase stationnaire particulière, les grosses molécules ne pourront pas

pénétrer dans les pores ; elles migreront plus rapidement que les petites molécules qui peuvent, quant à elles, pénétrer dans un plus grand nombre de pores (figure 25)

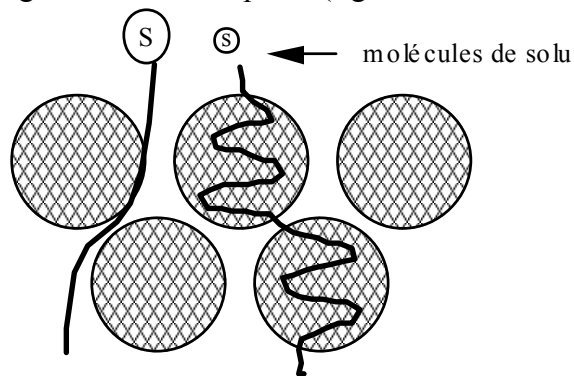


Figure 25. Chromatographie d'exclusion. Schéma de "trajet " d'un soluté de masse molaire élevée (S) et d'un soluté de masse molaire faible (s).

Les grosses molécules sont éluées par un volume V_o de solvant qui correspond au volume entre les "grains" de la phases stationnaire. Les petites molécules pénètrent dans le réseau du gel et sont éluées par un volume V_t égal au volume total de solvant contenu dans la colonne.

La séparation est donc fondée ici, non sur des interactions physicochimiques avec la phase stationnaire, mais sur la dimension des molécules en solution. Le volume de rétention V_R des molécules X est égal à:

$$V_R = V_o + K \cdot F \cdot V_i$$

V_o = volume total de la phase mobile ou volume mort , $V_i = V_t - V_o - V_{\text{matrice du gel}}$

V_i = volume total de la phase stationnaire

F est la fraction du volume poreux de la phase stationnaire accessible aux molécules X.

F est compris entre 0 et 1.

K coefficient de distribution des molécules X $K = C_S / C_M$, C_S et C_M étant les concentrations respectives de X dans la phase stationnaire et dans la phase mobile.

Les représentations de V_o , V_t et $V_t - V_o$ sont schématisées sur la figure 26.

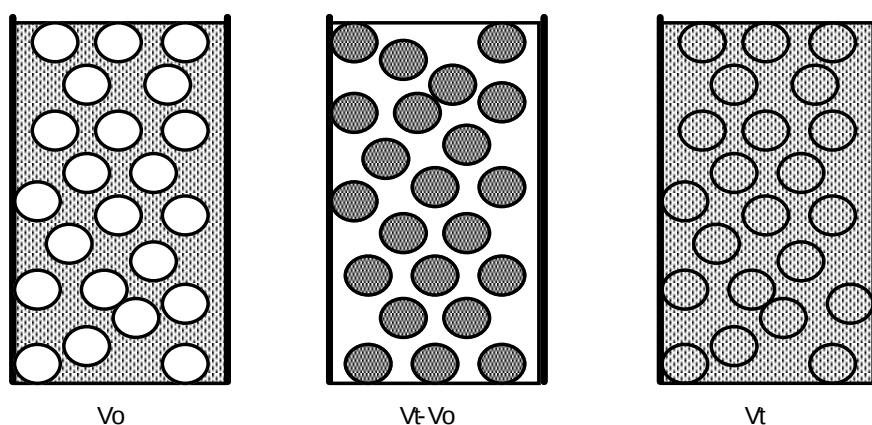


Figure 26. Diagramme représentatif de V_t et V_o

En chromatographie d'exclusion pure K est égal à 1 et on a :

$$V_R = V_o + F \cdot V_i$$

Il y a 2 cas limites importants :

1) $F = 0$. Les molécules sont totalement exclues de la phase stationnaire et on a $V_R = V_o$. Toutes ces molécules émergent ensemble de la colonne après le passage d'un volume de phase mobile égal au volume interstitiel de la colonne.

2) $F = 1$. Tous les pores de la phase stationnaire sont accessibles aux molécules considérées et on a $V_R = V_o + V_i$.

Entre les deux limites, V_R varie linéairement en fonction de la fraction du volume poreux accessible. Ainsi, à chaque valeur de V_R correspond théoriquement une taille de molécule elle-même proportionnelle à la masse molaire (figure 27).

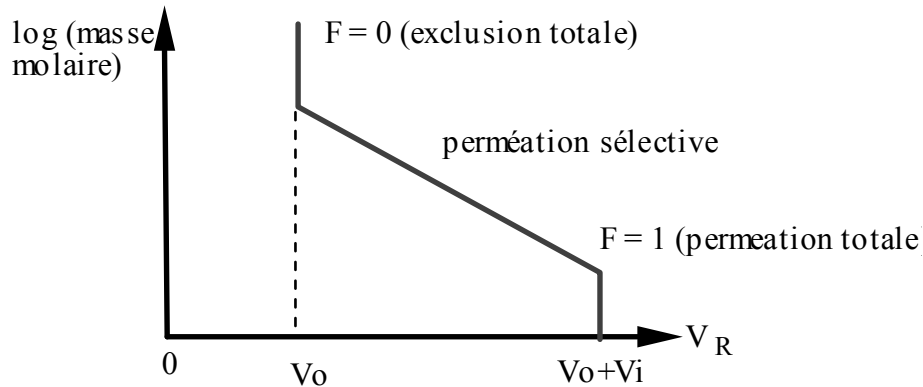


Figure 27 : Relation entre la taille ou la masse molaire et le volume de rétention.

Si $V_R > V_t$ cela implique $K > 1$: il se superpose alors un autre mécanisme de rétention (adsorption - échange d'ions). Quand $K = 1$, les isothermes sont des droites et les pics sont des courbes de Gauss parfaites. Tous les constituants du mélange chromatographié sont élués dans un volume inférieur à V_t .

$$V_R = V_o + F V_i$$

$$F = \frac{V_R - V_o}{V_i} \quad \text{avec } V_i = V_t - V_o - V_{\text{matrice du gel}}$$

En pratique on remplace V_i par $V_t - V_o$; on obtient alors :

$$K_{av} = \frac{V_R - V_o}{V_t - V_o}$$

K_{av} est la fraction du volume du gel stationnaire où diffuse une molécule donnée.

Pour des composés de densité et de forme moléculaire identiques, il existe une relation sigmoïdale entre les valeurs de leur K_{av} et le logarithme de leur masse molaire. Ces courbes présentent dans une partie importante, une relation linéaire entre K_{av} et $\log MM$ (figure 28); cette relation est du type :

$$K_{av} = A \log (\eta \cdot M) + B$$

A et B sont des constantes, η viscosité intrinsèque (ml.g⁻¹)

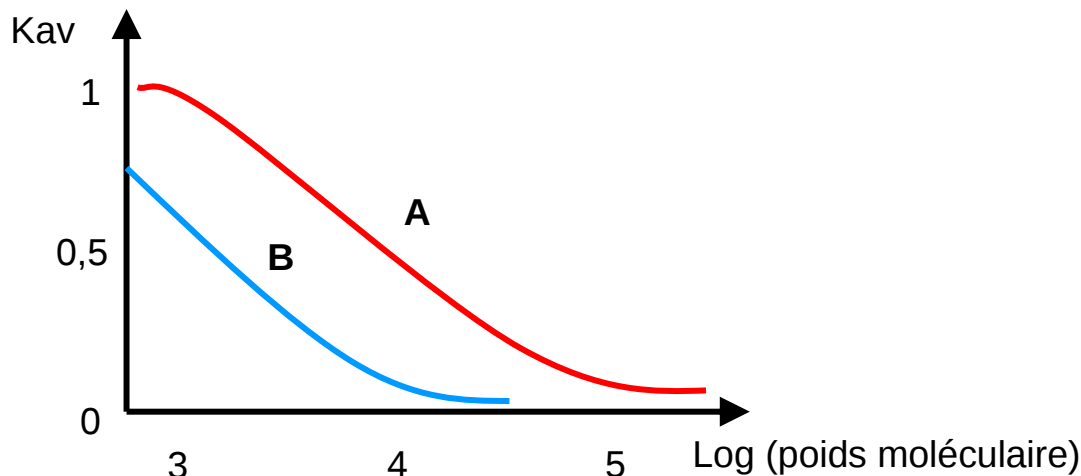


Figure 28. Variation du K_{av} en fonction du logarithme de la masse molaire

A gel à "grande" taille de pores, faible réticulation **B** gel à "moyenne" taille de pores, réticulation plus élevée.

Un exemple de courbe de calibration pour la chromatographie d'exclusion est donné sur la figure 29.

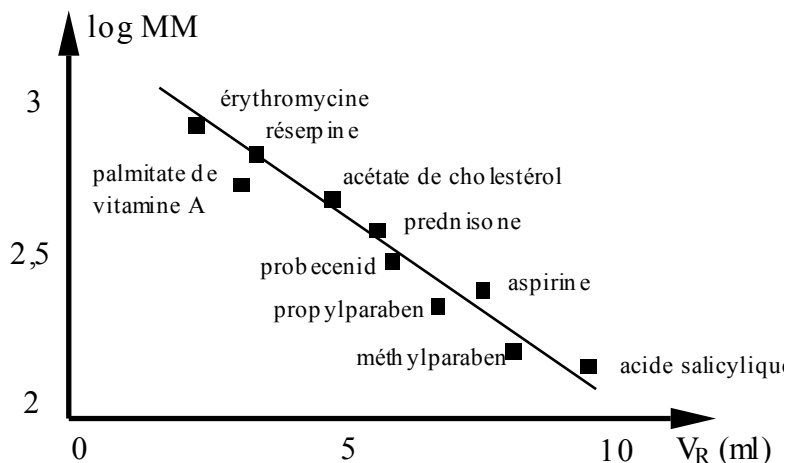


Figure 29. Courbe d'étalonnage pour la chromatographie d'exclusion Colonne Styragel 100 A, 30 cm x 0,7 cm ; solvant THF 2 ml / min⁻¹.

VI.4.2. Différents types de gel existent actuellement

On distingue les gels mous, semi-rigides et rigides. Seul ce dernier peut être utilisé avec des vitesses de phase mobile élevées (FPLC par ex.).

Certains gels sont rendus apolaires par modification des fonctions hydroxyliques. L'alcoylation des polymères de dextrane conduit à des gels stables en présence de solvants organiques ce qui permet le fractionnement des substances insolubles dans l'eau (LH). Ces gels sont vendus sous forme de grains secs et doivent être mis à gonfler avant utilisation dans une colonne dans la phase mobile appropriée en doivent être dégazés avant utilisation pour chasser les bulles d'air qui pourraient rester prisonnières de la matrice.

a) Gels mous :

Ce sont des polymères à faible taux de pontage pour lesquels le gonflement est important. Il s'agit le plus souvent de dextrane rendu insoluble dans l'eau par réaction à l'épichlorhydrine (figure 30).

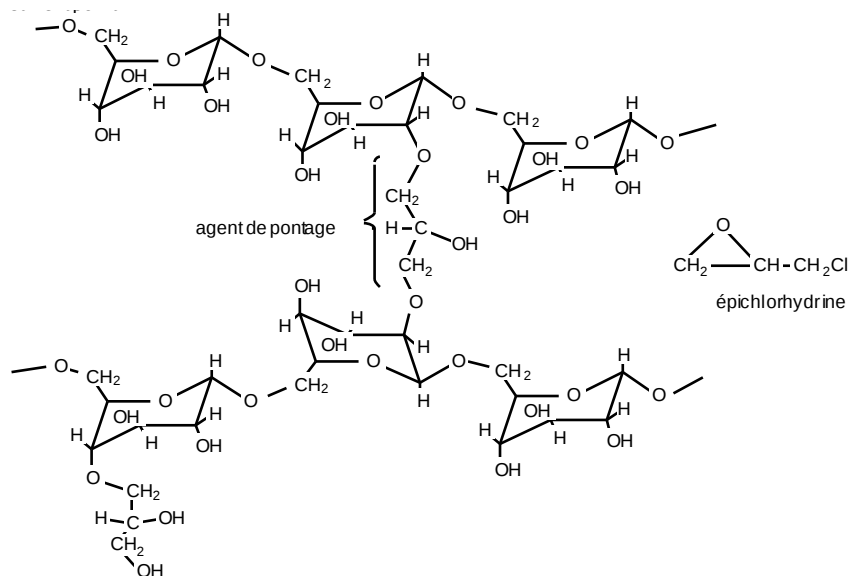


Figure 30. Structure partielle d'un gel de dextrane.

La résistance mécanique augmente avec le taux de réticulation tandis que le diamètre des pores diminue. Il existe des gels dont le polymère est du polyacrylamide et des gels mixtes composés d'acrylamide et de dextrans. L'agent de pontage est le N-N'-méthylène bisacrylamide (figure 31).

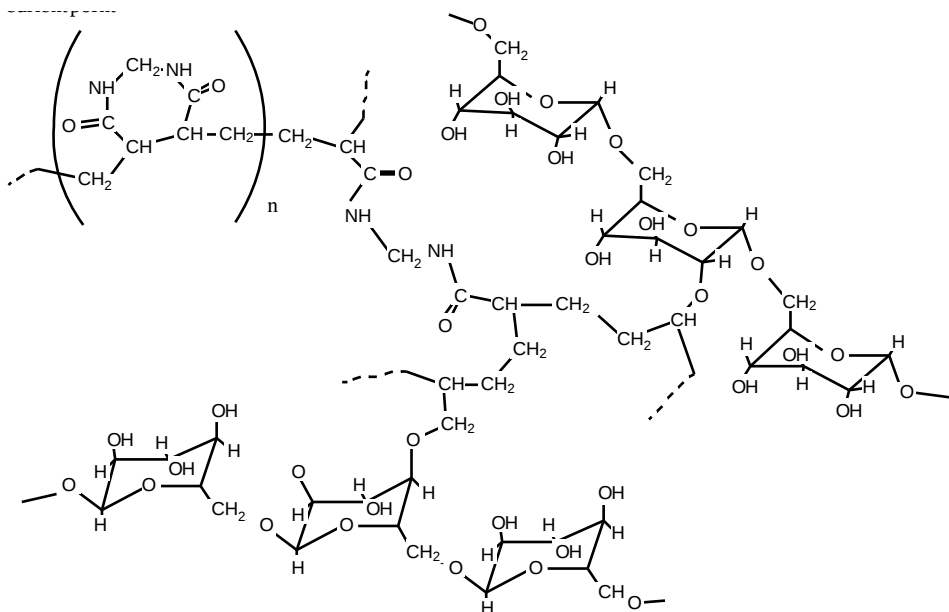


Figure 31. Gel mixte dextrane-acrylamide

b) *Gels semi-rigides*

- Gels de polystyrène. Ce type de gel possède des propriétés remarquables et ne gonfle pratiquement pas. Il peut être utilisé dans la plupart des solvants sauf : l'eau, les alcools, l'acétone, l'acide formique. Il est utilisable en haute pression.
- Gel d'acétate de polyvinyle.
- Gels mixtes (dextrane-acrylamide) à taux de réticulation élevé. Plus le taux de réticulation augmente et plus la résistance aux contraintes mécaniques augmentent : ces gels supportent des ΔP relativement élevées.

c) Gels rigides

Ils sont constitués par des silices poreuses ou des verres poreux. Les colonnes HPLC du type TSK correspondent à des phases stationnaires de ce type (poreuses, mais résistantes aux déformations mécaniques et donc utilisables sous des débits et pression élevés).

Un chromatogramme de protéines solubles de haricot est indiqué sur la figure 32. Ce type de chromatographie (associé ou non à des phénomènes d'échanges d'ions) est qualifié de **FPLC** (Fast Protein Liquid Chromatography).

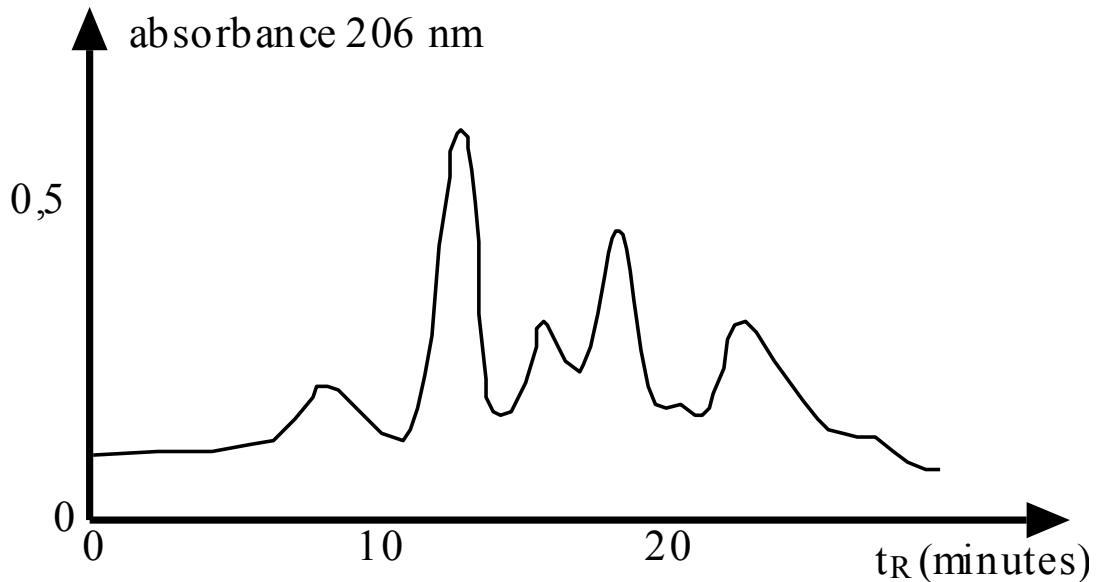


figure 32 . FPL Chromatogramme par exclusion des protéines de pois

VI.4.3 Principales applications de ce type de chromatographie :

a) *La séparation de groupes de molécules de masses molaires très différentes*

Le gel est choisi pour que les plus grosses molécules aient un K_{av} voisin de 1

- dessalage : les protéines et les polypeptides peuvent être dessalés ou séparés de substances de faibles masses molaires avant concentration.
- extraction du phénol dans la préparation d'acides nucléiques.
- interruption de réactions entre macromolécules et réactifs de faible masse molaire.
- extraction de produits, cofacteurs ou inhibiteurs d'enzymes

b) *Détermination de la masse molaire*

c) *Détermination des constantes d'équilibre*

Pour le dessalage ou la séparation de protéines / petites molécules, la comparaison de diverses méthodes est indiquée dans le tableau 9.

Tableau 9. Comparaison de méthodes de séparation protéines / petites molécules

Critère	Filtration sur gel	Dialyse conventionnelle en sacs de cellulose	Méthode des fibres creuses
Simplicité	Facile	Facile	Facile
Efficacité du dessalage	Approche habituellement 100 %	Peut atteindre 100 % si le procédé est conduit à son terme	Environ 95 %
Sécurité	Absolument sûr	Sacs de dialyse susceptibles de se fissurer ou de casser	Les fibres peuvent fuir ou se casser
Coût	Faible	Faible	Cher
Durée	100 % de dessalage obtenu en 15 minutes	Très longue, le procédé peut prendre plusieurs jours	95 % de dessalage en 20 minutes au mieux
Rendement des protéines	Habituellement proche de 100 %	Adsorption gênante pour de faibles concentrations	Peut atteindre 70 % au moins pour de faibles concentrations
Récupération des petites molécules	Habituellement proche de 100 %	Habituellement impossible	Habituellement impossible
Dilution	Dépend du volume et de la concentration de l'échantillon	Faible	Faible
Durée d'utilisation	Habituellement 1.000 utilisations au minimum. Les colonnes peuvent être fréquemment être utilisées 1 à 2 ans sans qu'il soit nécessaire de les refaire.	Une seule utilisation	Jusqu'à 50 utilisations ou 4 mois.

VI.5. LA CHROMATOGRAPHIE CHIRALE

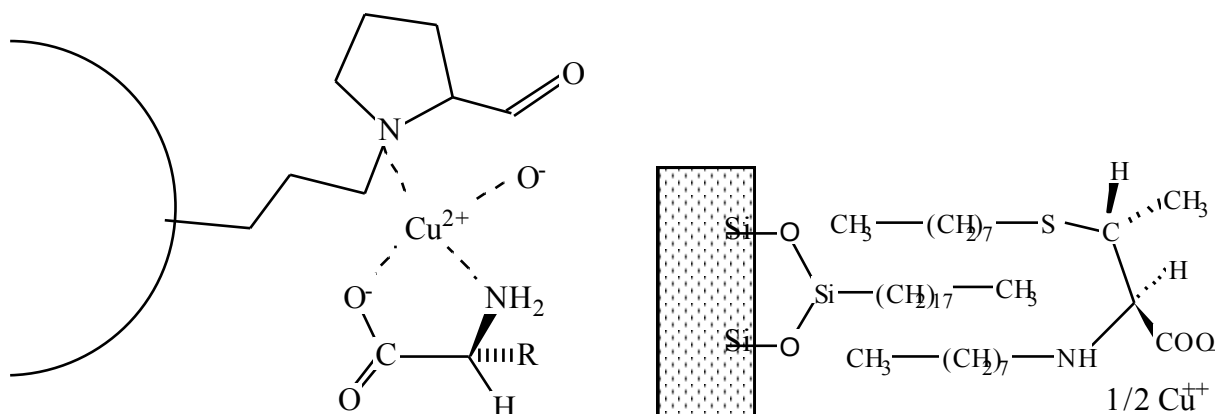
(ARMSTRONG D.W., Current issues in HPLC Technology, LC.GC International, avril 1998, 22-31).

C'est W. PIRKLE (PIRKLE W.H. and HYUN M.H., J. Chromatography, 1985, **322**, 309) qui est un des principaux initiateurs des ces méthodes analytiques.

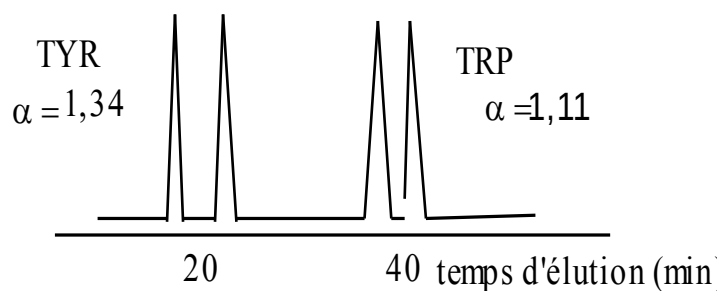
Traditionnellement c'est la séparation des énantiomères qui est considérée comme le problème le plus difficile à résoudre en chromatographie. Avant 1980 aucune solution n'était disponible. Entre 1980 et 1990 de nombreuses méthodes ont été mises au point pour atteindre de tels objectifs.

Ce sont surtout les séparations des acides aminés D et L qui ont suscité le plus de travaux. DAVANKOV et al. (Advances in Chromatography, Giddings et al. Eds, M. Dekker, New York, 1983, vol 22, p 71) ont ainsi proposé une phase stationnaire avec de la L-proline greffée. En présence de Cu^{2+} dans la phase

mobile, les interactions qui s'établissent varient en fonction de l'énantiomère. Il en est de même avec des phases stationnaires silice greffée C8 en présence de composé amphipolaire à C asymétrique.

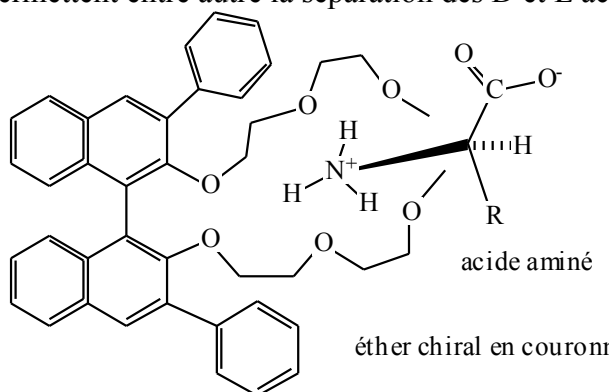


Un exemple de séparation de D et L tyrosine et de D et L tryptophane est présenté ci-dessous.



La phase mobile est constituée d'un mélange eau/méthanol (85/15) contenant 2 mM de CuSO_4 . Le débit est de 1 ml/ min. La colonne de 15 x 0,4 cm est remplie de particules de 5 μm de diamètre. La détection est réalisée à 254 nm.

En dehors de cette méthode de séparation par échange de ligand, des phases stationnaires chirales ont été développées comme par exemple les phases polyéthers (formule indiquée ci-dessous) ou encore les phases qui contiennent des molécules complexes comme certains antibiotiques glycopeptidiques (técoplanine par exemple). Elles permettent entre autre la séparation des D et L acides aminés.

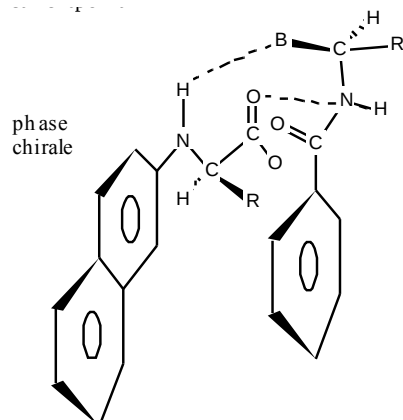


LIPKOWITZ K.B. (Intern. Lab., 1993, **15**, 8-12) a proposé une modélisation moléculaire en chromatographie chirale qui aboutit à :

$$k' = A + \sum_i b_i \cdot k' \text{ avec } A = \text{constante, } b_i \text{ moindre carré des coefficients de régression multiple.}$$

Dans cette équation tous les échanges phase stationnaire - analyte sont pris en considération. Selon les conformation relatives des deux structures, la somme de ces échanges sera variable en fonction des possibilités stériques d'établissement de liaisons et k' sera différent selon la structure spatiale des analytes.

Avec des phases comportant des carbones asymétriques, il sera alors possible de séparer des analytes qui sont des diastéréoisomères.

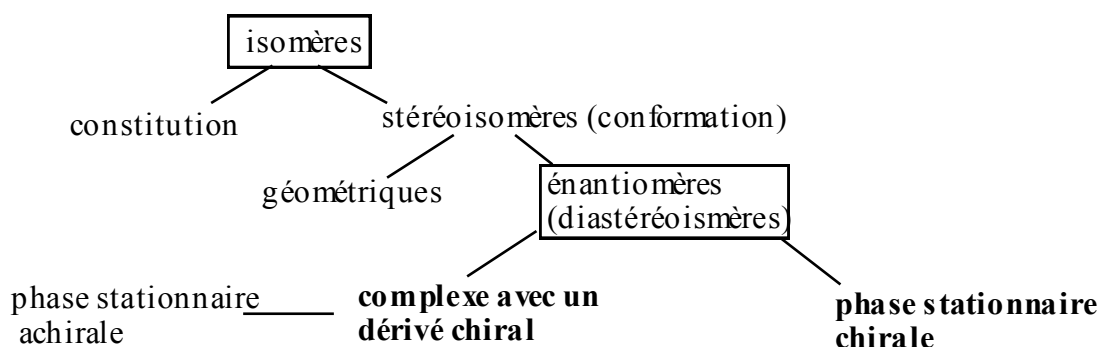


Les échanges sont qualifiés par PIRKLE de :

π donneur d'électron : analyse de sulfoxydes, lactames etc

π accepteur d'électron : analyse d'amines, alcools, acides aminés thiols etc.

Le schéma d'analyse des composés isomères est le suivant :



Il existe une classification des phases chirales basée sur les mécanismes impliqués dans la séparation des énantiomères qui est la suivante :

type	description	chimie	mécanisme
1	Pirkle	sélecteurs chiraux variés liaisons ioniques	liaisons H interactions δ - δ dipôle - dipôle
2	polymères hélicoïdaux	celluloses et dérivés	liaisons H complexes d'inclusion
3	cavité	cyclodextrines polymétacrylates polyacrylamides	complexes d'inclusion
4	échange de ligand		
5	protéines	SAH , SAB glycoprotéine	interactions multiples hydrophobes

VI.5. LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

C'est en 1910 qu'a été observée l'adsorption sélective de l'amylase sur un amidon insoluble.

Cette technique, encore qualifiée de **bio-chromatographie** ou encore de **bio-reconnaissance**, permet de purifier presque toutes les molécules biologiques selon leur fonction ou leur structure chimique individuelle. Il s'agit d'une chromatographie d'adsorption dans laquelle la molécule à purifier est adsorbée spécifiquement de façon réversible sur un ligand immobilisé sur la phase stationnaire. Le facteur de purification est très élevé car l'énergie échangée est très élevée et résulte de l'établissement de nombreuses liaisons souvent de nature différente et coopératives.

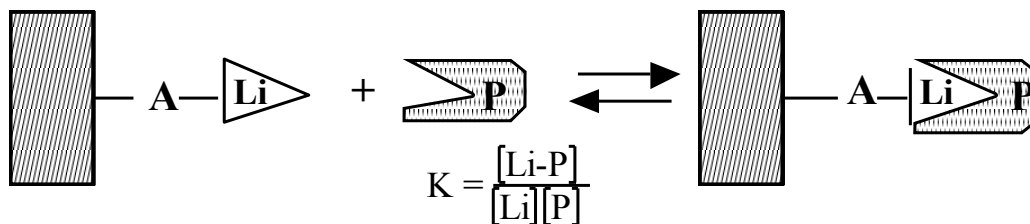
De nombreuses séparations ont pu être accomplies en une seule étape.

Elle est utilisée pour :

- purifier des produits présents dans ses mélanges biologiques
- purifier la forme active d'un produit de son dérivé inactif
- séparer des traces de molécules biologiques de grandes quantités d'impuretés.

VI.5.1. Principe

Un ligand biospécifique est fixé par liaison covalente à une matrice (dextrane, agarose) sans perdre son affinité pour le produit à purifier.



A agent de pontage
 Li ligand
 P produit à purifier
 K_D constante de dissociation

Tout composé peut servir de ligand pour purifier les produits qui sont à même de se fixer sur lui :

enzyme : analogue de substrat, inhibiteur, cofacteur

anticorps : antigène, virus, bactérie, cellule

lectine : polyside, glycoprotéine, récepteur de surface cellulaire

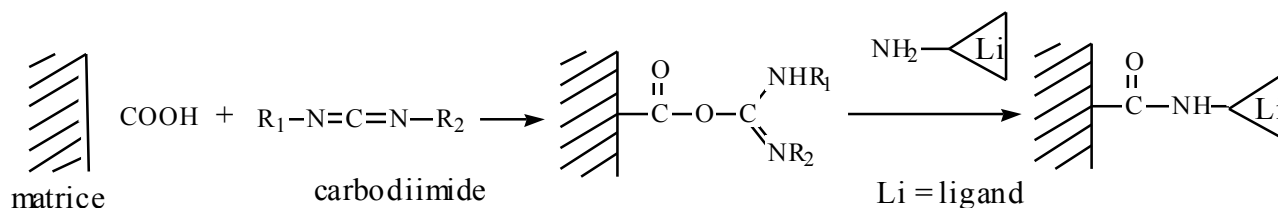
acide nucléique : séquence complémentaire de bases, histone, acide nucléique, polymérase

hormone, vitamine : récepteur, protéine porteuse

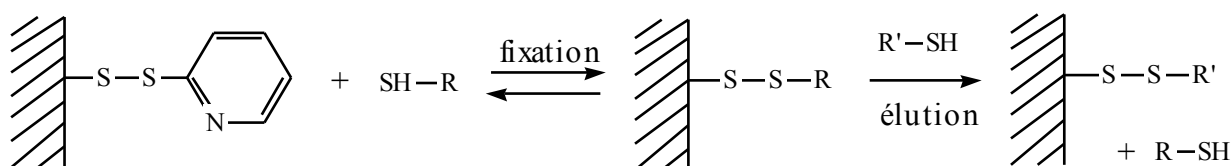
cellule : protéine de surface.

VI.5.2. Couplage et ligand

Il existe plusieurs méthodes de couplage. La plus utilisée fait appel à la carbodiimide



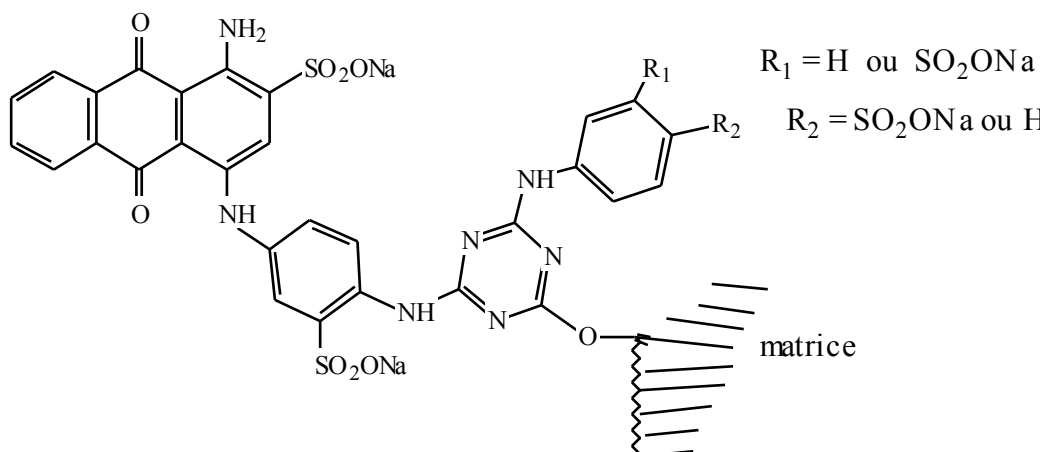
Il est possible de fixer sur la matrice des thiols (type glutathion -2-pyridyl disulfure)



RSH peut être une protéine, un peptide etc.

Par cette méthode chromatographique, on peut par exemple purifier les immunoglobulines en utilisant la protéine A comme ligand.

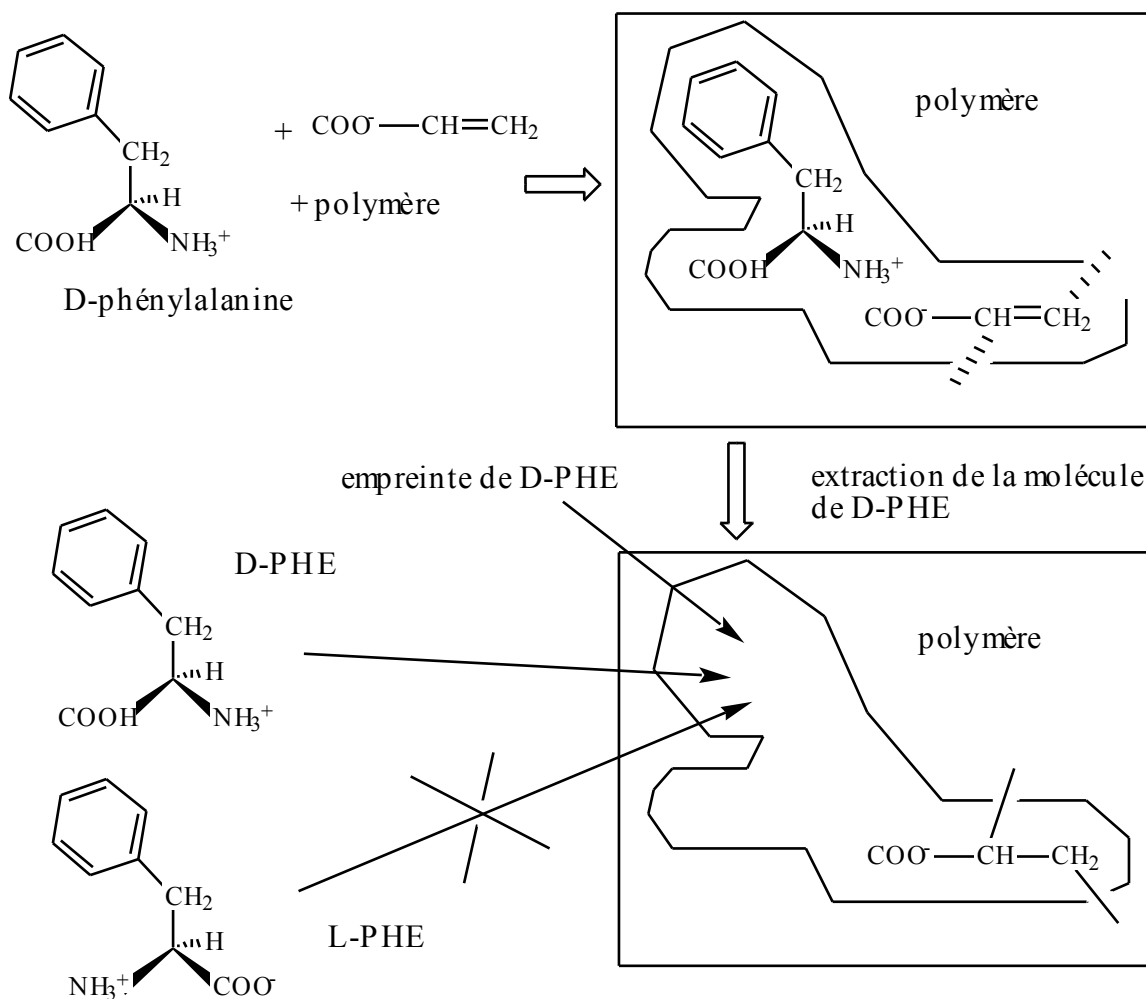
Quelques enzymes et protéines possèdent une affinité pour un colorant bleu (**bleu Cibacron F3GA**) et plus particulièrement les kinases, les déshydrogénases et les enzymes contenant des groupements adényl (620 sur 2000 enzymes).



Dans ce type de chromatographie, il y a reconnaissance et interactions souvent multiples (hydrogène, hydrophobe, ionique, transferts de charge π - π) entre deux molécules : le soluté et la phase stationnaire.

Des essais de préparation de phase stationnaire par **empreinte moléculaire** sont souvent couronnés de succès. Pour ce faire, la molécule à séparer est “complexée” avec des monomères réactifs et le complexe molécule-monomères est placé dans un milieu contenant un polymère que l’on réticule alors. On débarrasse ensuite le polymère phase stationnaire de la molécule empreinte. Les monomères sont souvent des composés vinyliques ou acryliques, des styrènes ou des silices tandis que l’acrylate diméthylque de

l'éthylène glycol constitue la phase réticulante. Cette méthode permet par exemple la séparation des racémiques d'acides aminés.



VII. EQUIPEMENTS UTILISES EN CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

Le schéma général d'un système chromatographique en phase liquide est indiqué sur la figure 33. Ce système comprend :

- l'éluant qui peut constituer une **phase mobile** de composition constante (*système isocratique*) ou variable en fonction du temps (*système à gradient*)
- le système de pompage à pompe unique (*système isocratique* ou à *gradient basse pression*) ou multiple (amortissement ou système à *gradient haute pression*)
- un système d'injection
- une colonne (thermostatée ou non) précédée ou non d'une pré-colonne
- éventuellement un réacteur post-colonne
- un ou plusieurs détecteurs avec enregistreur et intégrateur

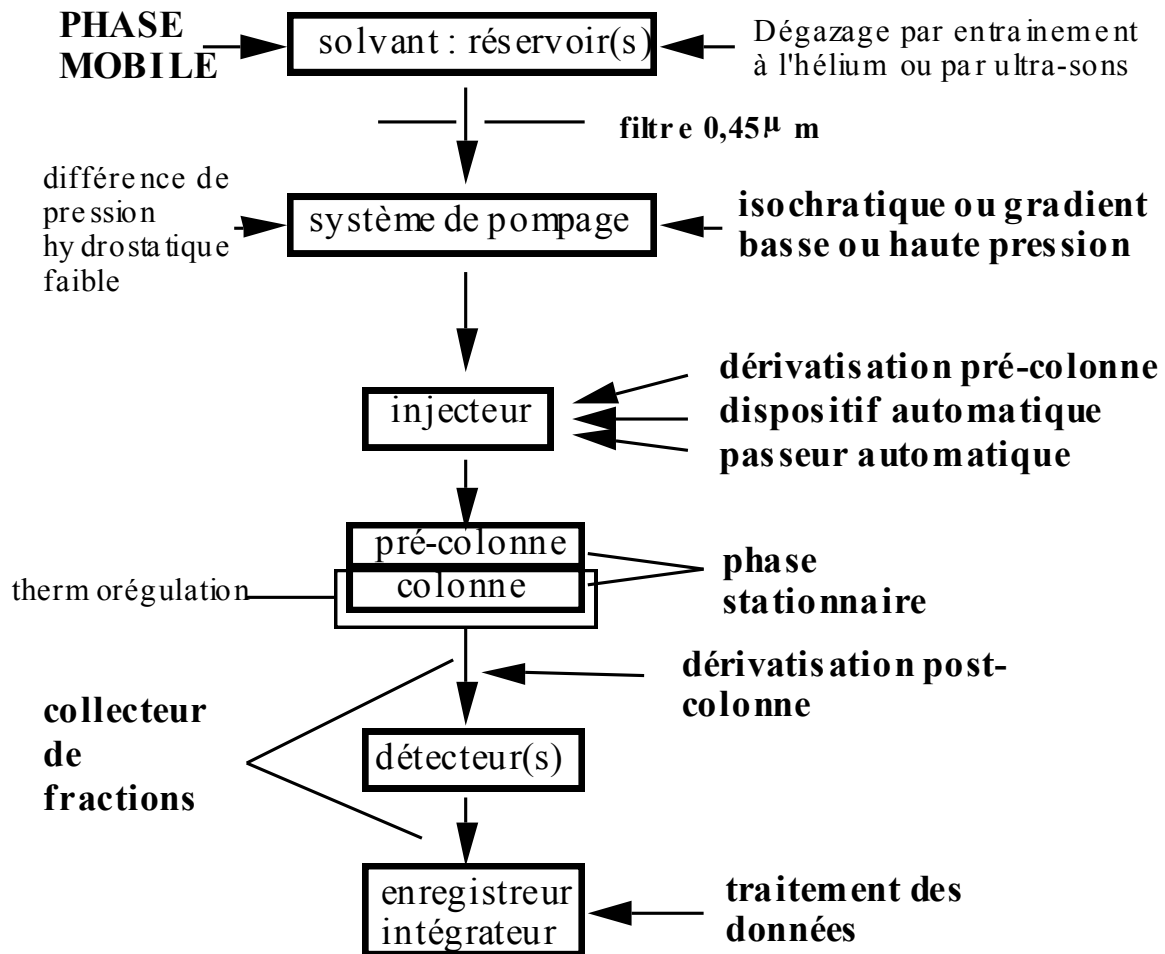


figure 33. Schéma d'un système de chromatographie en phase liquide.

Un système de chromatographie liquide doit satisfaire un certain nombre de contraintes dont deux sont primordiales :

- l'élution à travers des colonnes contenant des phases stationnaires de fine granulométrie qui nécessite des pressions élevées
- l'obtention d'une bonne reproductibilité des temps de rétention qui nécessite un débit de la phase mobile constant.

VII.1. DISPOSITIFS D'OBTENTION DE GRADIENTS

Les plus anciens sont des réservoirs communicants. Actuellement les plus répandus sont obtenus par des systèmes gérés par microordinateurs et programmation.

L'**élution** peut être obtenue au moyen de dispositifs permettant de réaliser des gradients basse pression de "polarité", de pH, de force ionique, de concentrations en divers composés (dispositifs à chambres communicantes, figure 34)

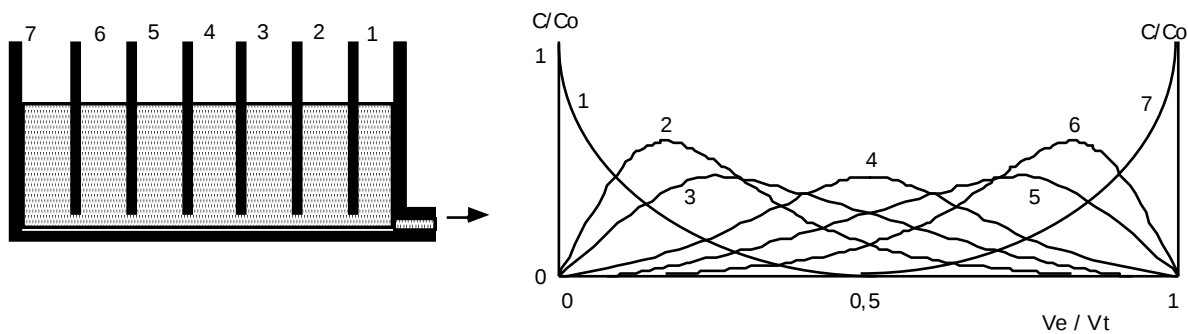


figure 34 . Schéma d'un dispositif d'élution "par gradient" à chambres communicantes

Dans ces dispositifs, les variations de concentration C (par rapport à la concentration initiale C_0) d'un composé donné placé dans un des compartiments en fonction du volume élué (pompé) sont indiquées sur la figure 34.

A un volume d'élution donné (ou à un temps d'élution donné) on peut, avec ces systèmes, évaluer la "chambre" dont l'incidence est dominante et celles intervenant à un degré moindre dans l'élution. Ainsi, au début de l'analyse c'est la composition de la chambre n°1 qui est déterminante tandis qu'à mi-analyse, ce sont dans l'ordre les chambres n°4, puis n°3 et 5 et enfin n°3 et 6 qui par leur composition influenceront le plus l'élution.

En choisissant judicieusement la composition de ces chambres pour obtenir des variations de pH, force ionique, concentration en méthanol et en thiodiglycol permettant la séparation (figure 35), il est possible de réaliser en quelques heures ou moins (avec des colonnes de particules de résines échangeuses de cations de type polystyrène sulfoné de 5 à 15 mm de diamètre et 5 à 50 cm de longueur, le plus souvent à 50°C et avec des débits de tampons citrates voisins de 1 ml.min⁻¹) la *séparation complète de tous les acides aminés*.

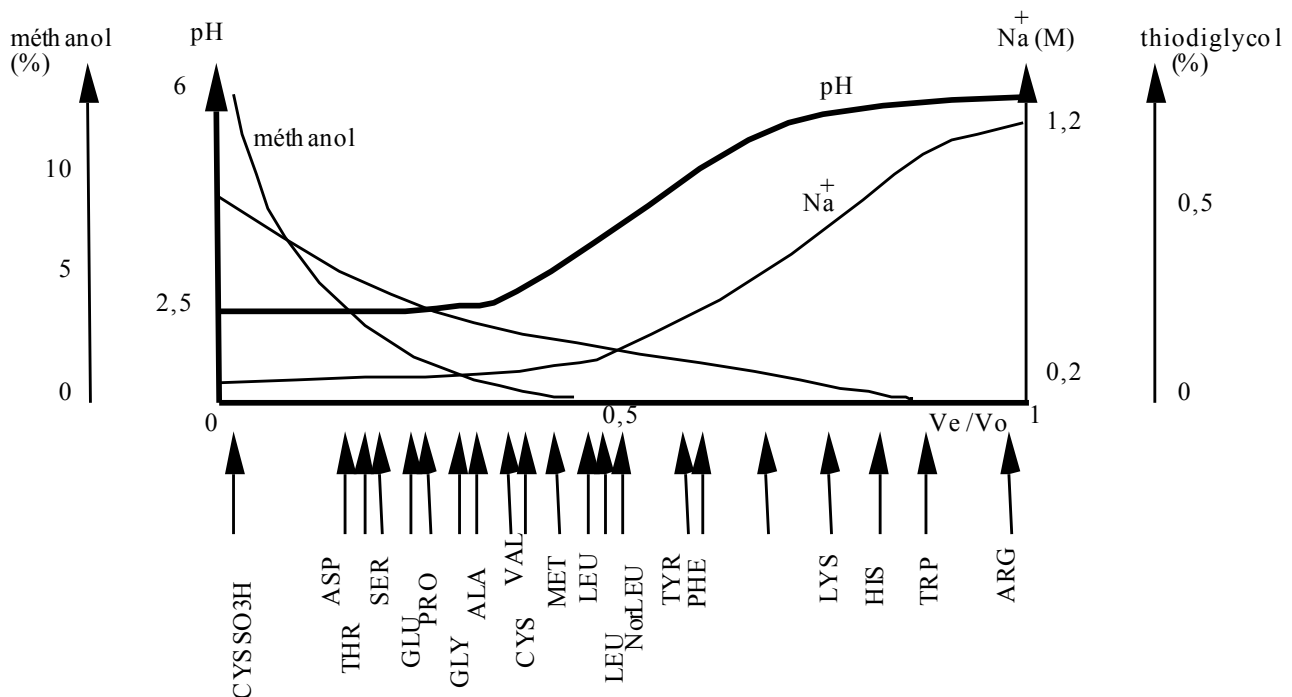
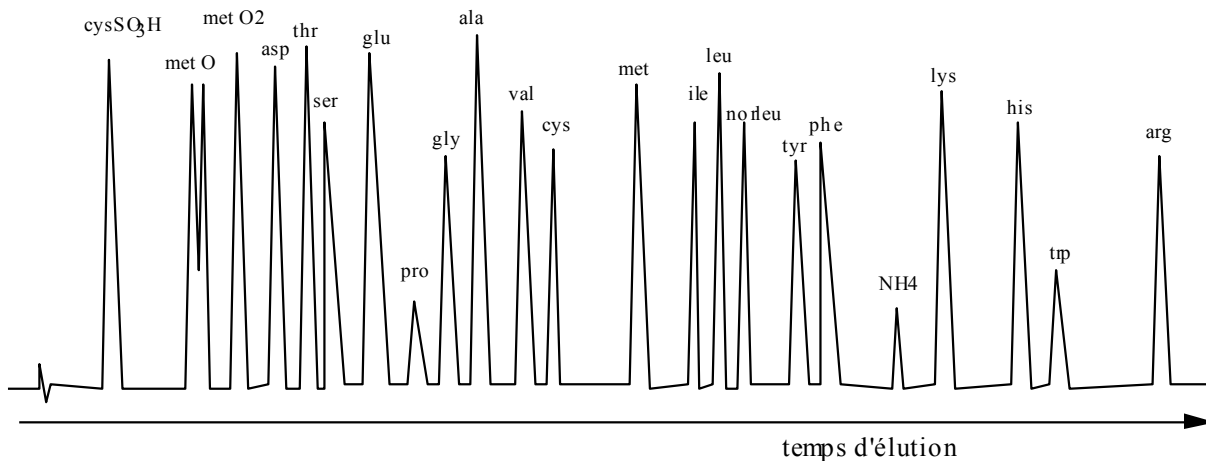


figure 32. Variations des paramètres de séparation des acides aminés par chromatographie d'échange ionique (gradient).

Le chromatogramme obtenu est schématisé ci-après.



- L'**élution** peut également être obtenue par des **systèmes à trois éluants** (ou plus) dont les mélanges, gérés en fonction du temps par ordinateur, conduisent à des gradients d'élutions qui permettent des variations des paramètres de l'élution tels que le pH, la force ionique, la polarité (valeur de ϵ_0 , nature des éluants etc.) (figure 36).

Si le mélange est réalisé avant le système de pompage, le système est qualifié de **système à gradient basse pression**. Une seule pompe suffit alors à l'élution, mais il est nécessaire de bien mélanger les différents éluants "primaires" dans des systèmes dont le volume mort peut constituer un handicap.

Si le "gradient" d'élution est réalisé par autant de pompes qu'il y a d'éluants primaires (au maximum 3 actuellement), le système est qualifié de **gradient à haute pression**. Les débits des différentes pompes sont réglés électroniquement de telle sorte que la somme de leurs débits respectifs soit égale au débit d'élution choisi.

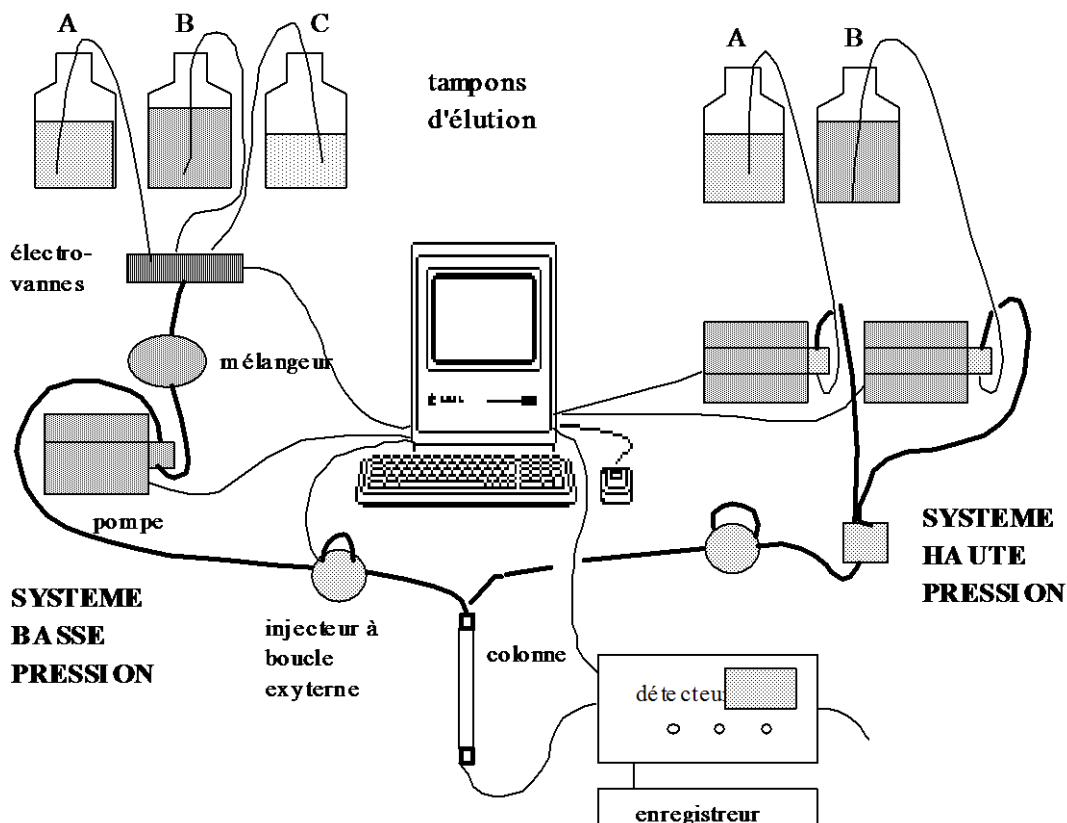


figure 36 . Schéma des systèmes basse et haute pression d'analyse en "HPLC"

VII.1. LES POMPES

Il existe des pompes à pression de gaz, mais les plus utilisées sont les pompes électriques de type seringue (jusqu'à 20-50 bars) et surtout les pompes de type piston (figure 34). C'est avec ce dernier type de pompe que des débits constants très faibles ($0,1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) ou très grands (plusieurs $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$) sont accessibles à des pressions qui peuvent atteindre environ 500 bars.

Les pistons de ces pompes sont en saphir, en tantale ou en matériau résistant et inaltérable, les pistons en acier inoxydable étant relativement sensibles à la corrosion. Il faut rappeler ici que les solutions salines sont particulièrement corrosives et qu'il est bon de rincer l'ensemble du système pour éviter ces phénomènes. Par ailleurs si des sels sont présents dans la ou les phases mobiles, l'évaporation de ces dernières conduit à leur cristallisation ce qui est particulièrement gênant quand ce phénomène se produit dans des zones sensibles (cellules de détection, vannes d'injection, etc) difficilement accessibles au nettoyage.

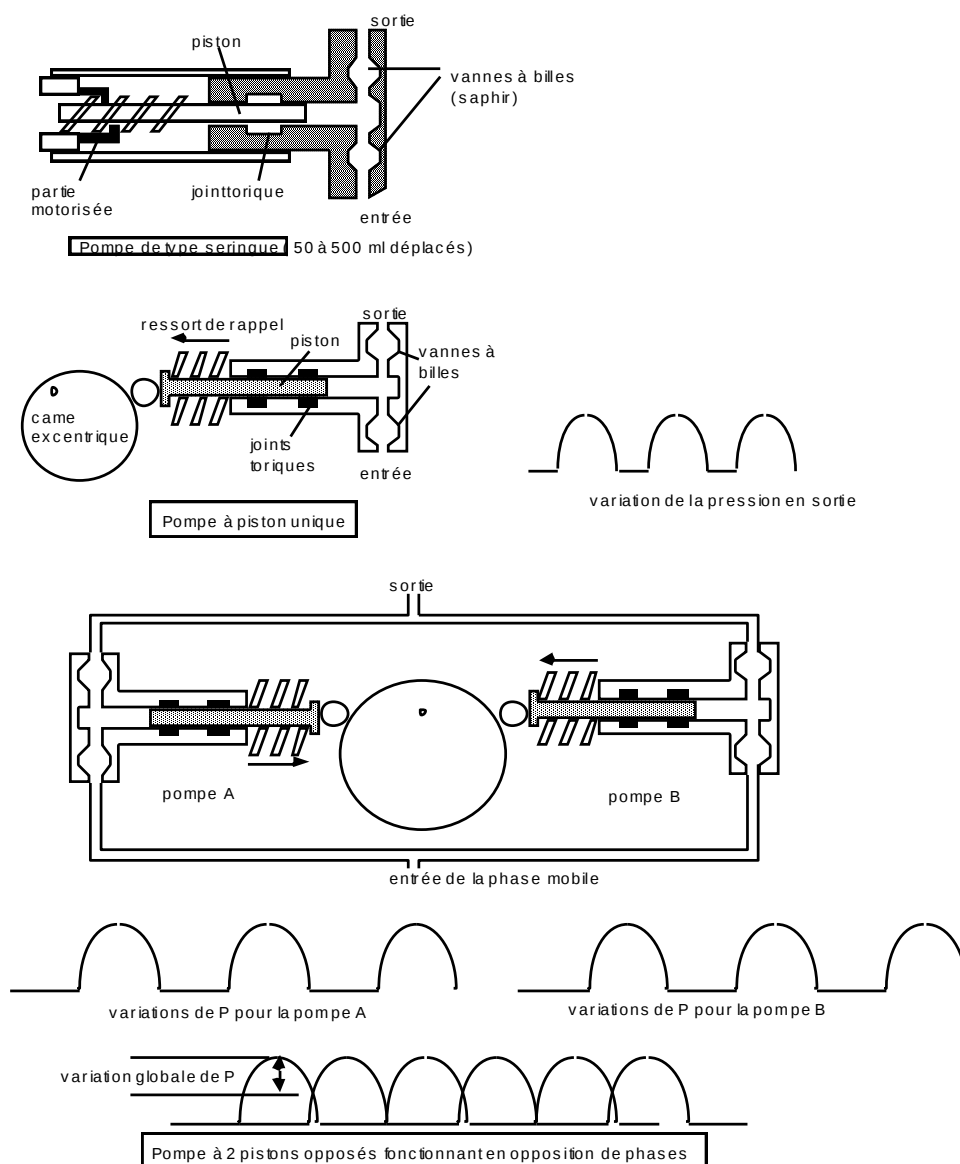


figure 37 . Schéma de quelques pompes utilisées en chromatographie en phase liquide

Il est important aujourd'hui de choisir des pompes pouvant assurer des débits de l'ordre de quelques $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ afin de pouvoir les utiliser avec les nouvelles colonnes (capillaires de moins de 0,5 mm de diamètre et contenant des particules de phase stationnaire de $1 \mu\text{m}$ de diamètre).

VII.3. LES INJECTEURS

Il faut absolument éviter de dissoudre les solutés dans un solvant plus éluant que la phase mobile. Il est souhaitable de dissoudre les solutés dans le liquide vecteur.

Il existe deux types d'injection :

- par seringue
- par vanne (boucle d'échantillonnage). Ce type d'injection automatisable ne permet pas d'atteindre l'efficacité maximale. Il existe des vannes à boucles internes et des vannes à boucles externes (cf V.1.3.4 figure 6).

Dans l'analyse des acides aminés, il faut que la phase solvante de l'hydrolysate contenant les acides aminés à analyser ait un pH et une force ionique équivalents à ceux du tampons d'élution au temps 0 pour une séparation par chromatographie d'échange ionique mais aussi possède une polarité égale à celle de la phase mobile au temps 0 de l'analyse dans le cas d'une séparation par chromatographie en phase inverse.

VII.4. LA COLONNE (cf chapitre V.1.3.2.)

Les frités limitant la colonne ont des porosités comprises entre 0,5 et 5 μm . L'inconvénient majeur des frités de faible porosité est le colmatage qui se traduit par des augmentations importantes de pression. L'utilisation de particules de 5 μm requiert la présence de frités de 0,5 μm .

VII.5. LES PARTICULES SUPPORT DE PHASE STATIONNAIRE

Comme indiqué dans le tableau ci-après, la **silice** reste le matériau de base le plus utilisé en HPLC. Ses caractéristiques sont largement développées dans le chapitre VI.1.2.1.

matériau	utilisation estimée (%)
gel de silice	75
polymère organique	20
polymétacrylates	
polystyrène-DVB	
polyéthylène	
glycol	
alumine	1
autres	4
graphite, carbone	
zirconium	
hydroxyapatite	

Le plus utilisé des polymères organiques reste le **polystyrène** réticulé avec du divinyl benzène. De porosités variables, ils sont en général stables dans une gamme de pH comprise entre 1 et 14. Leurs caractéristiques principales sont indiquées dans le chapitre VI.3.2.

Parmi les polymères commercialisés comme phase stationnaire on peut citer : les polystyrènes - divinylbenzène, le polydivinylbenzène, les polymétacrylates, le polybutadiène, le polyvinylpyrrolidone, le polydextrane, la cellulose, le polyhydroxymétacrylate, l'éthylvinylbenzène, alcools polyvinyliques

alkylés, polyosides, polyhydroxyéthyl aspartamide, chlorure de polyvinyle, triacétate de cellulose, méthylène bis acrylamide, polyéthylène glycol, agarose réticulé, etc..

Les matrices organiques sont moins utilisées que la silice comme support de phase inverse. Néanmoins elles permettent des séparations chromatographiques dans des conditions de pH pour lesquelles la silice n'est pas utilisable.

La figure 22 schématise des résines de type polystyrène ou silice qui peuvent être :

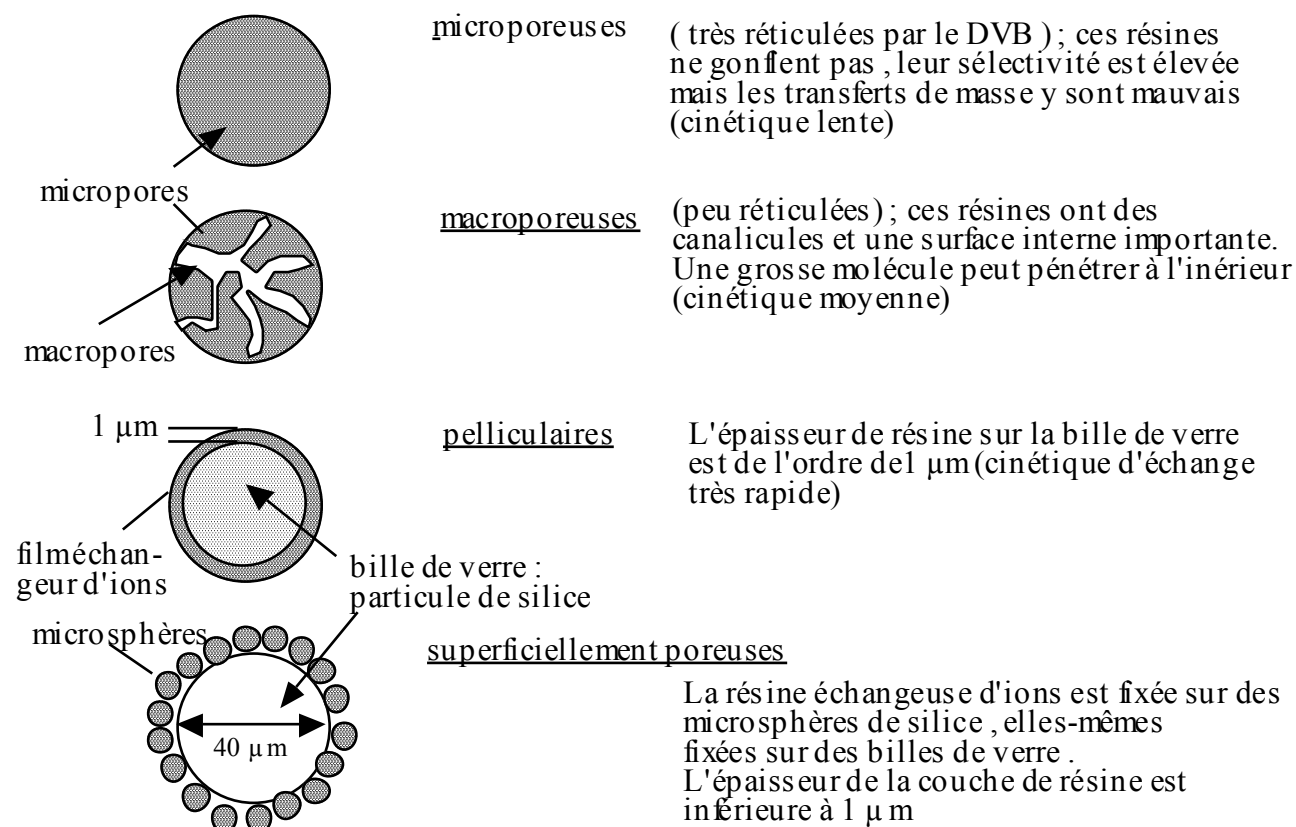


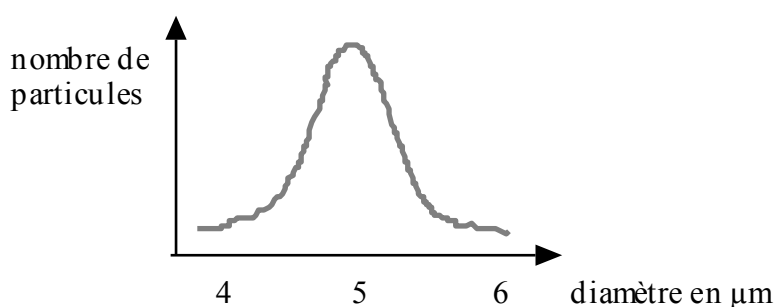
figure 22. Différents type de particules de phase stationnaire en chromatographie liquide.

Les résines **pelliculaires** ont une capacité d'échange de 260 à 1000 fois plus faible que celle des résines poreuses. Par contre leurs HEPT sont environ 10 fois plus faibles.

La **taille des pores** des particules varie entre 4 et 300 nm. La plupart des colonnes proposées sont replies de particules pour lesquelles la porosité est d'environ 8-12 nm.

Les particules **macroporeuses** (perfusives) permettent des chromatographie préparatives nécessitant des débits élevés avec peu de perte de charge. Leur efficacité est en général inférieure à celle des particules « normales ».

Actuellement la tendance est à l'utilisation de particules dont le diamètre est compris entre 3,5 et 5 μm . Ces supports permettent un bon compromis entre la facilité d'usage et l'optimisation de l'analyse (temps, résolution etc.). Il s'agit le plus souvent de particules aux dimensions polydisperses. La distribution gaussienne des diamètres présente des écarts-types relativement faibles comme schématisé sur la figure ci-après :



Distribution de diamètre de particules de silice avec une valeur moyenne de 5 µm

VII.6. LA NATURE DE LA PHASE STATIONNAIRE (cf chapitre VI.1)

Le gel de silice a été substitué, à partir des années 1975, par des gels greffés et depuis 1984 ce sont les phases inverses qui dominent les applications de l'HPLC. Plus de 95 % des analystes utilisent en HPLC, au moins de temps en temps, des phases inverses.

L'utilisation relative en 1998 des différentes phases disponibles en HPLC est indiquée dans le tableau ci-après :

méthode chromatographique	Utilisateurs relatifs (%)	méthode chromatographique	Utilisateurs relatifs (%)
phase inverse	50,4	exclusion	6,7
C18	24	phase aqueuse	3,5
C8	15,9	non aqueuse	3,2
phényl	7,1	chirale	2,8
C4	2,3	interaction hydrophobe	1,1
C1-C2	1,1	affinité	0,6
phase normale	24,1	partage	0,2
cyano	8,9	autres	0,3
silice	8,5		
amino	4,7		
diol	2,0		
échange d'ions	14		
anion	7,4		
cation	6,6		

L'influence de la méthode de préparation des particules de silice influence de façon très significative les performances de la séparation

Le grains de silice greffés avec des C8 à C18 possèdent encore des silanols libres qui sont « neutralisés » par réaction avec du triméthylmonochlorosilane.

La longueur des chaînes greffées aliphatiques (phase inverse) influence la stabilité : plus le nombre de CH₂ du greffon est élevé et plus la stabilité aux pH inférieurs à 2 et supérieurs à 8 augmente (C30 > C22 > C18 > C12 > C8 > C6 > C4 > C2 > C1).

Le dopage de la silice par de l'aluminium qui réagit avec les silanols géminaux conduit à une structure pseudo-zéolithique stable jusqu'à pH 10.

VII.7. LES CONNEXIONS

Les connexions injecteur-colonne-détecteur constituent un volume mort qui en diluant les solutés dans la phase mobile entraînent une perte d'efficacité non négligeable.

Pour ne pas perdre plus d'une fraction

$$\frac{\alpha^2}{(1 + \alpha)^2} \quad \text{de l'efficacité il faut que :} \quad r^4 \cdot l \leq \frac{24 \cdot \alpha^2 \cdot D_M \cdot V_R^2}{\pi \cdot N \cdot D}$$

r et l : rayon intérieur et longueur du tube

D_M : coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile de débit de l'éluant.

Ainsi pour $r = 0,2 \text{ mm}$ l doit être inférieur ou égal à 320 mm et pour $r = 0,5 \text{ mm}$ $l \leq 8 \text{ mm}$.

Rappelons que la dispersion dans la colonne est égale à :

$$\sigma^2 = \frac{t_r^2}{N} \quad \text{et que la largeur à la base des pics } \omega \text{ est égale à } 4 \sigma.$$

TAYLOR a montré que la dispersion liée aux tubes de liaisons entre l'injecteur, la pré-colonne, la colonne et le détecteur était égale à :

$$\sigma^2 = A \cdot \frac{d_t^4 \cdot l \cdot D}{D_M}$$

A est une constante, d_t le diamètre intérieur des tubes de liaison, l leur longueur, D le débit de la phase mobile et D_M le coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile.

La présence de cavités ou de volumes morts divers contribue aussi à la dispersion.

VII.8. LES DETECTEURS (tableau 10)

Il existe actuellement 3 types principaux de détection :

- mise en évidence d'une propriété du soluté directement ou après réaction pré ou post-colonne avec un composé révélateur (spectrophotomètre UV/visible, fluorimètres),
- mise en évidence d'une modification de l'éluant (conductimètre, réfractomètre),
- séparation du soluté de l'éluant (couplage chromatographie - spectrométrie).

VII.5.1. Critères de choix

Les paramètres les plus importants à considérer sont :

1. le bruit donné en unités de la mesure du détecteur.
2. la sensibilité : concentration pour laquelle le rapport signal/bruit est égal à 2.

3. la dérive exprimée en unités de la mesure par unité de temps.

4. le domaine de linéarité : domaine de concentration de réponse linéaire du détecteur.

5. le volume de la cellule qui peut être considérée comme une chambre de mélange.

6. la possibilité d'utiliser un gradient d'élution.

Depuis 1971 l'évolution de l'emploi des divers dans les laboratoires a beaucoup évolué comme le montre le tableau 10a ci-après :

Tableau 10a. Evolution de l'utilisation (en %) des détecteurs en CLS

année	type de détecteur							
	UV-visible		fluor.	Indice réfract.	Electrochim.	Conduc-timét.	Spectro masse	Diffusion
		fixe var. Baret.						
1991	63	10 43 10	12	4	7	4	8	4
1986	69	21 43 5	10	5	8	3	1,5	2
1981	66	25 41 -	12	9	6	2	1	-
1976	73	48 24 -	7	13	3	1,5	0,3	-
1971	61	46 15 -	1	34	-	2	-	-

Les principales caractéristiques des détecteurs sont indiquées dans le tableau 10b.

Tableau 10b. Principaux détecteurs utilisés en chromatographie liquide.

type	Universalité	Limite de détection	Destructeur	Identification de composés	facilité d'utilisation	Remarques et coût
Détecteur UV-visible	+++	0,3 ng/ml	-	+	+++++	Le plus utilisé peu coûteux
UV-visible barettes diodes	+++	1 ng/ml	-	++	+++++	bande passante assez coûteux
Fluorimètre	+	5 pg/ ml	+/-	++	++++ souvent une	nécessite
Réfractomètre	+++++	0,7 mg/ml	-	-	++	peu coûteux cellule lecture
Détecteur électrochimique	++++	pg/ml	+	-	+	détecteur d'avenir
Détecteur par conductivité	sélective d'ions	0,1 ng/ml	-	+	++	limité aux ions
Spectromètre de masse	+++++	ng /ml	+++++	+++++	+/-	très cher
Diffusion de lumière	+++++	1 ng glucose	+++	-	+	détecteur d'avenir

VII.5.2. Détecteurs par absorption UV/visible

C'est le détecteur le plus utilisé. Le faisceau de longueur d'onde λ donnée traverse une cuve dans laquelle circule l'effluent. Suivant la loi de BEER l'absorbance est définie par :

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

I_0 intensité incidente

I intensité émergente

ε coefficient d'extinction molaire du soluté

c concentration

l longueur du trajet optique

Le bruit est de l'ordre de 10^{-5} unités d'absorbance, le domaine de linéarité voisin de 10^4 et le temps de réponse est de l'ordre de 0,5 seconde.

Il existe des **détecteurs à barrettes de diodes** (35 à 100 diodes par barrettes, 1 barrette référence et 1 barrette dosage), diodes sensibles à des longueurs d'onde définies, en général de 2 nm en 2 nm (parfois 10); ces détecteurs permettent de réaliser des spectres d'absorption en des temps très courts donc en cours de chromatographie (BERTOLIN M., Intern. Labor., oct 1991, 44-50). Les résultats sont présentées sur des chromatogrammes en trois dimensions.

VII.5.3. Les fluorimètres

I

Certains solutés qui absorbent des photons $h \cdot C / \lambda_{ex}$, peuvent réémettre des photons d'énergie $h \cdot C / \lambda_{ém}$

La longueur d'onde d'excitation λ_{ex} est inférieure à celle d'émission.

L'intensité de fluorescence F émise par une solution de concentration C irradiée par une radiation d'intensité I_0 est donnée par :

$$F = Q K I_0 (1 - 10^{-\varepsilon c l})$$

K est le rendement de collecte de la fluorescence

Q fraction de radiation réémise.

La détection très sélective et très sensible nécessite parfois une dérivation préalable.

VII.5.4 Détecteur à diffusion de lumière

(WYATT P.J., Intern. Labor., 1993 ; STOCKWELL P.B. et KING B.W., 1991)

Le solvant est nébulisé par un courant de gaz inerte (azote) et vaporisé à une température inférieure ou égale à 180°C . Le soluté dont la tension de vapeur est supérieure à celle de l'éluant reste à l'état de brouillard et est amené par le gaz vecteur jusqu'à la chambre de détection. La quantité de lumière diffusée mesurée par un photomultiplicateur placé à 120° par rapport à la lumière incidente est proportionnelle à la masse éluee.

Il s'agit d'un excellent moyen de détection quand la masse moléculaire est supérieure à 200 Da.

VII.5.5. Détecteurs électrochimiques

Un potentiostat impose à l'électrode de travail un potentiel fixe par rapport à celui de l'électrode de référence tel que le soluté à détecter soit oxydé ou réduit. Au cours du passage du soluté dans la cellule, un

courant d'électrode proportionnel à sa concentration circule entre l'électrode de travail et sa contre électrode.

VII.5.6. Détecteurs réfractométriques

On mesure en continu la différence d'indice de réfraction entre le solvant pur et l'effluent de la colonne. Ces détecteurs surtout utilisés pour les glucides sont de loin les moins sensibles. Il faut veiller à ce que leur cellule de mesure soit rincée à l'eau ou avec un solvant organique comme le méthanol après chaque série de mesures car si la phase mobile contient des sels, ceux-ci risquent de cristalliser dans le système et leur solubilisation est extrêmement difficile.

VII.5.7. Couplage chromatographie liquide / spectrométrie de masse

Le couplage CL- SM permet d'obtenir un système analytique très performant. Par chromatographie liquide il est possible de séparer n'importe quelles molécules en choisissant judicieusement le système et les composés séparés peuvent être injectés dans un spectromètre de masse qui donne des informations immédiates sur la masse molaire et la structure .

a) Principe

Le composé à analyser est d'abord vaporisé à basse pression. Ce transfert en phase gazeuse empêche les molécules de l'échantillon de réagir avec les autres et facilite l'ionisation qui est l'étape analytique suivante. Le spectromètre détermine la masse moléculaire des composés en mesurant leurs rapports masse / charge (m/z). L'ionisation de la molécule génère des formes chargées du composé qui sont dirigées vers une série de champs magnétiques ou électrostatiques. Plusieurs méthodes ont été développées pour ioniser le composé séparé par chromatographie liquide .

b) Méthodes d'ionisation

L'ionisation des molécules peut être obtenue par un *faisceau d'électrons* dirigé dans la phase gazeuse. L'énergie cinétique de ces électrons permet de rompre des liaisons covalentes intramoléculaires. Les fragments obtenus donnent des informations permettant de "structurer" la molécule. Un des désavantages de cette ionisation est que de nombreuses molécules ont des liaisons covalentes de faible énergie qui sont rompues sans donner d'ions détectables correspondants, ce qui empêche alors de déterminer la masse moléculaire.

L'*ionisation chimique* est employée pour minimiser la fragmentation tout en produisant l'ion détectable . Le produit est ionisé par transfert de proton à partir de gaz (méthane) ionisé par des électrons accélérés , ce gaz étant injecté automatiquement à l'interface .

c) L'interface chromatographie liquide / spectrométrie de masse

Elle permet de transformer le liquide correspondant à la phase mobile en un gaz dans un milieu à pression très faible. De nombreuses interfaces ont été imaginées (ceinture mobile, thermovaporisateur, injecteur direct de liquide, transport par un faisceau de particules, bombardement atomique rapide et continu etc.). Dans un thermovaporisateur la phase mobile contenant le soluté à analyser est chauffée dans le liquide "vaporisateur" et ensuite vaporisée dans la zone sous vide; il se forme un fin brouillard. Si la phase mobile contient des ions NH_4^+ , acétate) , quelques microgouttes peuvent porter des charges. Sous vide solvant s'évapore rapidement et les molécules de soluté sont désolvatées et associées à la charge. Le résultat est une molécule chargée "isolée" de la phase mobile.

Pour des solutés non ionisés le système de vaporisation est associé à un filament source d'électrons qui décharge des ions pour faciliter la formation d'ions ou encore à une électrode de fragmentation qui génère des fragments en augmentant la vitesse des collisions intermoléculaires.

d) Différents types d'analyseurs de masse

Ainsi ionisées, les molécules sont dirigées vers des zones à champs électrique et magnétique. Il existe à ce niveau quatre types d'analyseurs de masse:

- à secteur magnétique. Dans ce système, pour un champ magnétique donné et une vitesse donnée de la particule, seuls les ions moléculaires d'une masse et d'une charge données peuvent passer dans le détecteur. Pour évaluer la gamme de masses moléculaires présentes, l'intensité du champ est modifiée plusieurs fois afin de détecter tous les ions présents. Ce détecteur a une résolution de 0,001 U de masse moléculaire.
- l'analyseur quadrupole est basé sur l'interaction de la molécule ionisée avec un champ électrique oscillant. En faisant varier le potentiel appliqué aux électrodes, seuls les ions d'une masse donnée oscillent dans une direction stable et atteignent le détecteur. Les autres molécules entrent en collision avec les électrodes et ne sont pas détectées. L'analyse des masses présentes est obtenue en faisant varier le potentiel appliqué aux électrodes et en déterminant pour un potentiel donné les ions présents. Avec ce système le balayage des masses est rapide (1 seconde) et ce système est utilisable en couplage CPV ou CPL.
- l'ion trap analyseur utilise aussi des interactions dans un champ électrique. Alors que dans l'analyseur quadrupole l'ion avec une trajectoire stable est dirigé vers le détecteur, dans ce système, ce sont les ions stabilisés dans la cellule qui sont analysés.
- l'analyseur de temps de transfert mesure le temps nécessaire à un ion pour atteindre le détecteur (50 à 100 μ sec).

Un exemple de couplage chromatographie liquide / spectrométrie de masse est donné sur la figure 39.

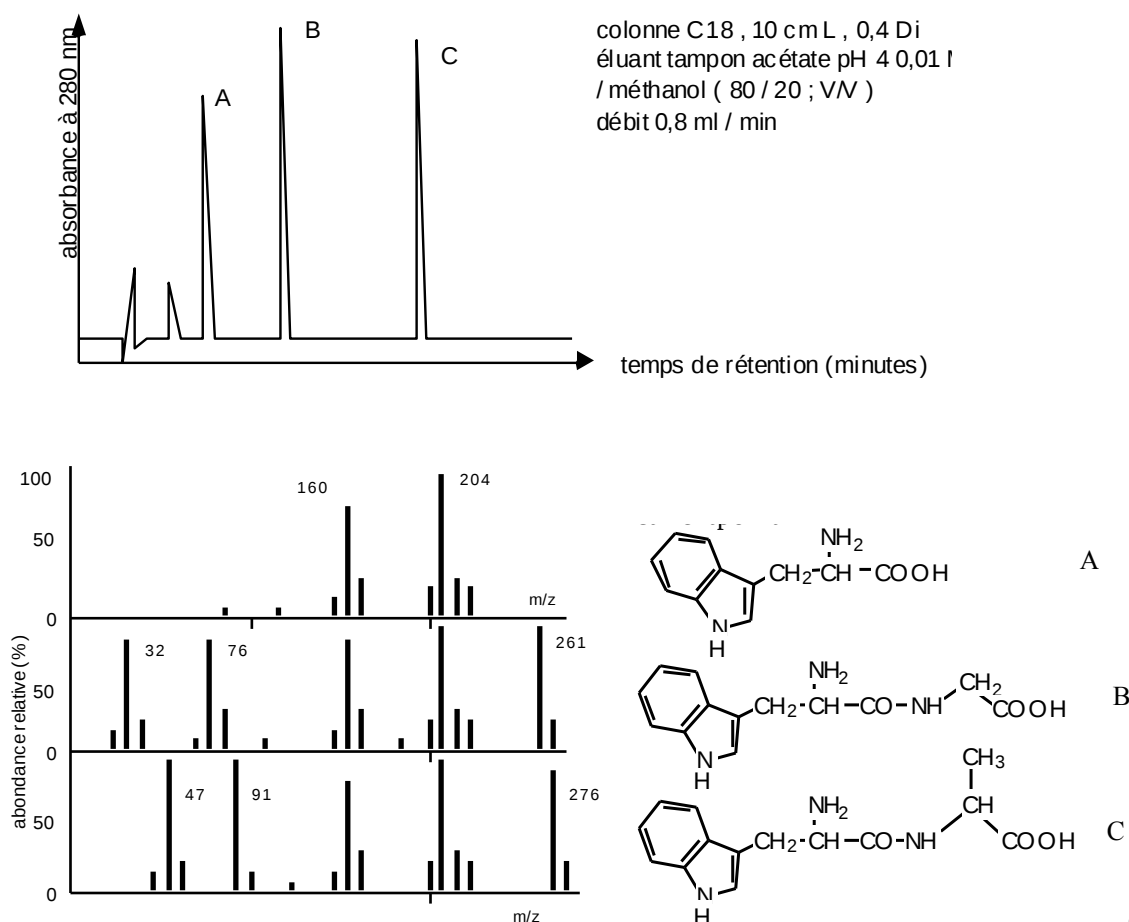
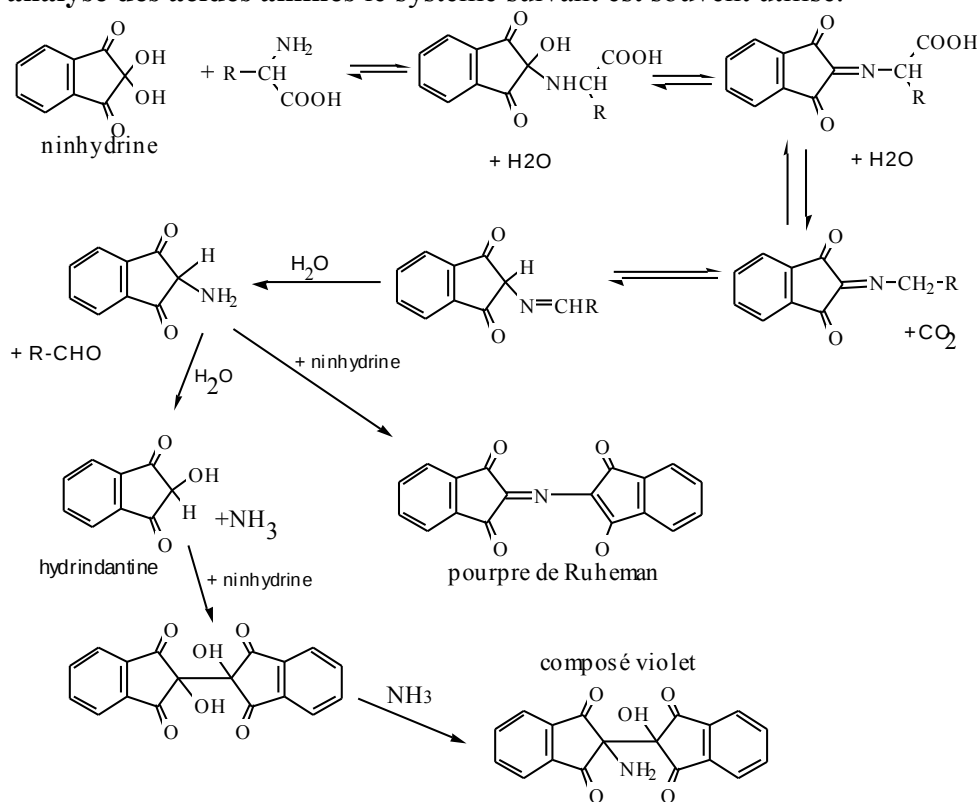


figure 39 . Couplage chromatographie liquide - spectrométrie de masse

VII.5.8. Les réacteurs post-colonne

Une réaction chimique peut être réalisée entre un chromophore et les solutés à détecter. Plusieurs types de réacteurs sont utilisés : capillaire, segmentation de flux

Pour l'analyse des acides aminés le système suivant est souvent utilisé.



Les acides aminés élués individuellement sont soumis en continu à une réaction colorée permettant leur dosage. Il s'agit le plus souvent dans la chromatographie d'échange ionique de la réaction à la ninhydrine qui est réalisée à pH 5,5 en présence de méthylcellosolve, sous azote et à chaud.

Parmi les nombreux dérivés qui se forment certains sont violets, d'autres jaunes ou encore rouges, leur formation dépendant entre autre de la nature de l'acide aminé. La mesure de l'absorbance à plusieurs longueurs d'onde (570 et 440 nm) aide à l' "identification" des acides aminés élués.

Le schéma du réacteur est indiqué sur la figure 40. Pour éviter que des phénomènes de diffusion "n'élargissent les pics", le flux est segmenté par de l'azote.

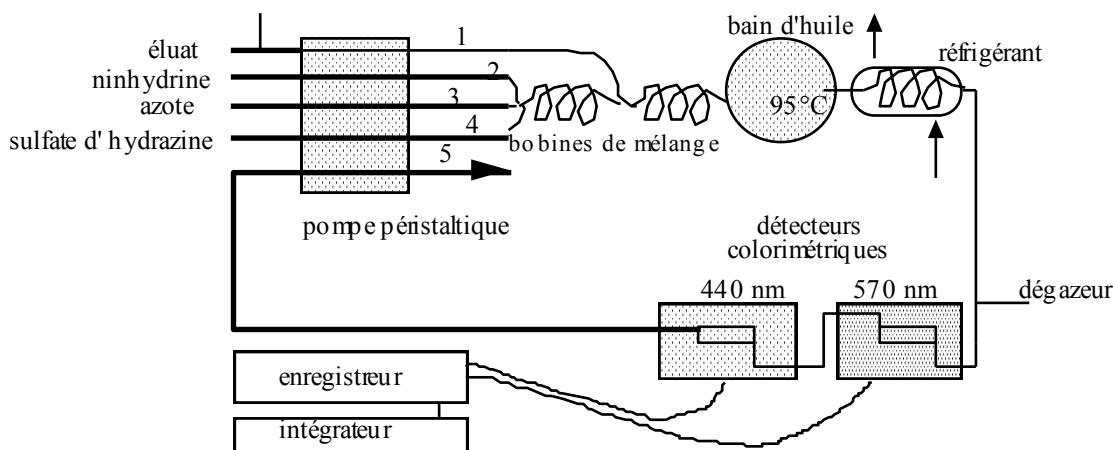
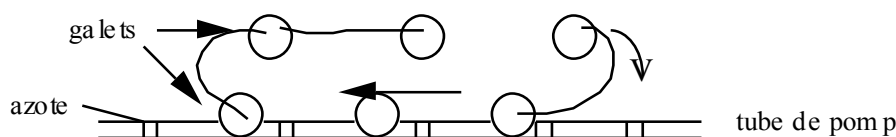


figure 40 . Dosage continu des acides aminés par réaction à la ninhydrine

La pompe péristaltique est une pompe à galets animée d'un mouvement de rotation très précis. Les tubes de pompe ont des diamètres internes parfaitement calibrés donc des débits parfaitement contrôlés



La réalisation de réactions chimiques en continu avec ce type de réacteur repose sur le principe suivant : si la réaction en "batch" nécessite 3 réactifs A , B , C en quantités x , y et z, la réaction en tube se fera avec des tubes de pompes permettant des débits de x' , y' et z' ml.min⁻¹ , avec $x/x' = y/y' = z/z'$. Si la réaction nécessite un chauffage, une bobine est immergée dans un bain d'huile, sa longueur permettant de contrôler le temps de passage.

Après réaction, le flux segmenté est dégazé par différence de débits et un évent vertical, le dégazage étant nécessaire à la mesure de l'absorbance. Les cuves des spectrophotomètres de mesure en continu ont des trajets optiques compris entre 1 cm et 0,2 cm, leur volume étant compris entre 500 µl et 5 µl .

VIII. QUANTIFICATION

Après avoir obtenu des pics bien résolus, il faut relier, pour chaque composé, le signal obtenu sur le détecteur à sa concentration dans l'échantillon analysé.

Sur le papier enregistreur on observe un pic gaussien (ou plus ou moins gaussien).

L'aire du pic est proportionnelle à la quantité injectée.

$$A = \int_{-\infty}^{+\infty} R \cdot dt$$

A aire du pic

R réponse du détecteur

$$m_i = K_i A_i$$

m_i masse de soluté détecté

A_i aire de son pic

K_i coefficient de réponse.

VIII.1. LA MESURE DE L'AIRE d'un pic peut s'effectuer :

1) par intégration électronique

2) par pesée du pic découpé

3) par triangulation (figure 3, p 6)

$$A = h \times \delta \times 1,066 \quad \text{avec } h \text{ hauteur du pic} \quad \delta \text{ hauteur à mi-hauteur}$$

4) par mesure de la hauteur des pics

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{\delta} \right)^2$$

$$(m_i = K_i A_i \quad m_i = K_i \cdot h_i \cdot \delta_i \cdot 1,066)$$

$$m = K \cdot h \cdot \left(\frac{2,35 \cdot t_R}{\sqrt{N}} \right) \cdot 1,066$$

Cette méthode n'est utilisable qu'avec t_R et N^{-2} constants (débit parfaitement constant). Cette méthode est valable en chromatographie en phase gazeuse pour les pics étroits.

VIII.2. MESURE DES COEFFICIENTS DE REPONSE K_i et de m_i

Elle peut être effectuée

- par étalonnage direct
- par mesure relative en rapportant la surface du pic du soluté à un composé de référence.

K_i n'est pas le coefficient de réponse du détecteur mais celui de l'appareillage tout entier, colonne comprise.

La détermination des concentrations peut se faire :

a) par normalisation interne

On mesure la proportion relative des aires en admettant que l'on connaît K_i .

La teneur d'un composé est

$$m_i (\%) = \left(\frac{A_i \cdot K_i}{\sum_i A_i \cdot K_i} \right) \cdot 100$$

b) par étalonnage externe

Cette technique n'est valable qu'avec une excellente qualité d'injection

$$m_{\text{ref}} = K A_{\text{ref}}$$

On injecte une masse m_{ref} de composé étalon en solution (V_{ref} injecté).

$$m_{\text{ref}} = \frac{m_{\text{ref}}}{A_{\text{ref}}}$$

On injecte un même volume de solution contenant le composé (m_e) et on mesure m_e .

$$m_i = K \cdot A_i$$

soit

$$m_i = \frac{m_{\text{ref}}}{A_{\text{ref}}} \cdot A_i$$

c) par étalonnage interne

On introduit dans le mélange à analyser un composé (étalon interne) qui n'interfère pas avec les constituants du mélange et qui possède un k' voisin du ou de solutés à doser. Avec cet étalon interne on connaît

$$K_{ei} = \frac{m_{ei}}{A_{ei}}$$

Si on a introduit m'_{ei} dans le mélange à analyser on doit trouver à l'analyse une aire égale à $A'_{ei} = K_{ei}/m'_{ei}$.

Si on trouve une aire différente (A''_{ei}) c'est qu'il y a eu une perte (le plus souvent) de produit (par exemple au cours de la préparation de la solution).

Cette "perte" est alors compensée et on a :

$$m_i = \frac{m_{\text{ref}}}{A_{\text{ref}}} \cdot A_i \cdot \frac{A''_{ei}}{A'_{ei}}$$

La **répétabilité** est la mesure de l'intervalle dans lequel sont trouvés des résultats obtenus par un même opérateur sur un même appareil en opérant de façon identique.

La **reproductibilité** est la mesure de l'intervalle dans lequel sont trouvés des résultats obtenus par des opérateurs différents sur des appareils différents mais avec un mode opératoire identique.

La **précision** caractérisée par l'écart-type représente les écarts par rapport à la moyenne connue ou inconnue.

La **justesse** est la valeur des écarts entre la moyenne des mesures et la valeur réelle.

VIII.3. INFLUENCE DES CONDITIONS OPERATOIRES SUR L'ANALYSE QUANTITATIVE

L'aire du pic A est égale à

$$A = \int_{-\infty}^{+\infty} R \cdot dt \quad (R \text{ réponse du détecteur})$$

$A = K \cdot C \cdot dt$. La réponse du détecteur est fonction de la concentration C du soluté.

Si Q est le débit de la phase mobile

$$m = C \cdot dV = C \cdot Q \cdot dt$$

Si le débit de la phase mobile est constant on a :

$$m = Q \cdot C \cdot dt \quad \text{or} \quad C \cdot dt = \frac{A}{K} \quad \text{et} \quad m = Q \cdot \frac{A}{K}$$

Toute variation du débit entraînera une variation de l'aire d'où la nécessité de posséder de très bonnes pompes.

IX. TRANSPOSITION CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE EN COLONNE SUR COUCHE MINCE

La chromatographie d'adsorption en colonne présente certains avantages par rapport à la chromatographie d'adsorption sur couche mince :

- durée de séparation plus courte
- analyse quantitative précise
- utilisable à des fins préparatives
- automatisation aisée.

La CCM est beaucoup plus facile à mettre en oeuvre et peu coûteuse. De plus, avec un mélange inconnu, il est possible de pratiquer une séparation sur CCM avec révélation universelle (carbonisation par chauffage après pulvérisation d'acide sulfurique). Les données bibliographiques sont très nombreuses.

En CCM on caractérise la migration d'un soluté par son **R_F**

$$R_F = \frac{\text{distance parcourue par le soluté}}{\text{distance parcourue par le front du solvant}}$$

Le facteur de capacité k' est

$$k' = K \frac{W_S}{V_M}$$

W_S masse de phase stationnaire

V_M volume de phase mobile

K coefficient de distribution

On a par ailleurs

$$v' = \frac{v}{1 + k'}$$

v' vitesse linéaire du soluté

v vitesse linéaire du front du solvant

Les distances parcourues sont proportionnelles à leurs vitesses linéaires d'où :

$$R_F = \frac{v'}{v} = \frac{1}{1 + k'} = \frac{1}{1 + K \frac{W_S}{V_M}}$$

Si les phases mobiles et stationnaires en colonne et sur couche sont identiques K sera le même dans les deux cas.

Soit K_{tr} le coefficient de transposition

$$K_{tr} = \frac{\left(\frac{W_S}{V_M}\right)_{\text{colonne}}}{\left(\frac{W_S}{V_M}\right)_{\text{CCM}}} \quad k'_{cc} = k_{tr} \left(\frac{1}{R_F} - 1 \right)$$

Pour des substances données il est alors possible, en connaissant leur R_F sur couche mince de déterminer leur temps de rétention sur colonne :

$$T_R = t_0 (1 + k'_{cc})$$

X. COMPARAISON AVEC LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

20 % environ des substances organiques connues sont justiciables de la CPG sans modification préalable de l'échantillon. La CPG présente des limitations dans trois cas :

- substances peu volatiles ($mM > 300$)
- substances sensibles à une élévation même modérée de la température (la plupart des substances d'intérêt biologique)
- substances ionisées.

La CPL est souvent plus efficace que la CPG pour 3 raisons :

- en CPG il n'existe que des interactions soluté-phase stationnaire alors qu'en CPL il y a des interactions additionnelles avec la phase mobile.
- les phases stationnaires sont plus variées en CPL (échange d'ions, exclusion).
- la température est moins élevée en CPL qu'en CPG. Or les interactions moléculaires diminuent quand la température augmente.

La CPL manque par contre de détecteurs aussi universels que les détecteurs à catharomètre ou à ionisation de flamme. D'autre part l'appareillage est plus complexe donc plus onéreux.

La CPG est une méthode simple, souvent plus rapide et plus sensible que la CPL. De ce fait, les deux méthodes ne sont pas concurrentes mais complémentaires.

XI - EXERCICES - ANNALES D'EXAMENS

Sujet n° 1.

La séparation d'acides gras est effectuée sur une colonne de 15 cm de longueur et 4,6 cm de diamètre interne dont la phase stationnaire est constituée de particules sphériques d'octyl- silice de 4 μm de diamètre. La phase mobile a la composition suivante :

$\text{CH}_3\text{-CN}$		$\text{H}_3\text{-PO}_4$ à 1 %
V/V = 50	22	28

La colonne est réglée à 35°C et le débit est de 1 ml.min⁻¹. Le schéma d'un chromatogramme étalon est donné sur la figure 1 .

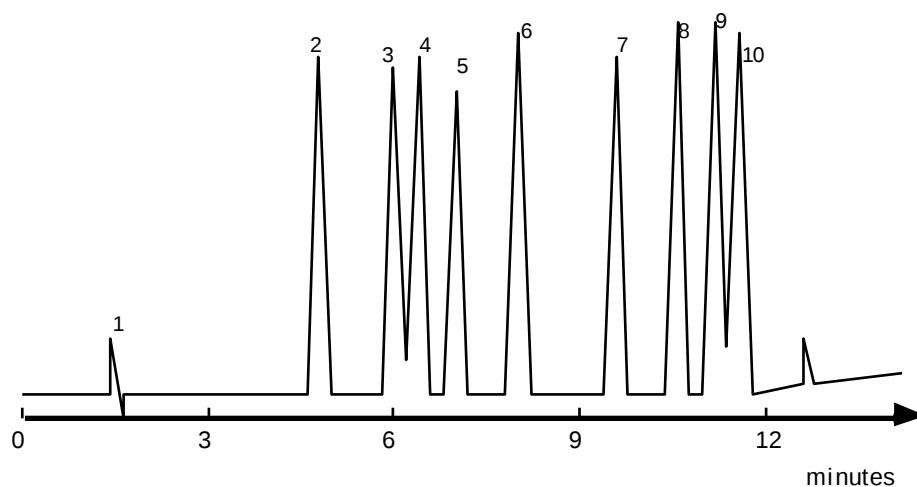


figure 1 . Schéma du chromatogramme étalon obtenu par injection de 10 μl d'une solution 0,1 mM d'acides gras dans la phase mobile

2 : acide linoléique (C18:3,cis)	7 : acide palmitique (C16:O)
3 : acide palmitoléique (C16:1,cis)	8 : acide oléique (C18:1,cis)
4 : acide trans-héxadécénoïque (C16:1,trans)	9 : acide élaïdique (C18:1,trans)
5 : acide linoléique (C18:2,cis)	10 : acide stéarique (C18:O)
6 : acide trans-linoléique (C18:2,trans)	

1 - Quel sont le type et le principe de cette séparation ? Quel est le rôle de l'acide phosphorique dans la phase mobile ? Pourquoi la séparation est-elle réalisée à 35°C ? Expliquez l'ordre d'élution des différents acides gras ? Quel est le système de détection le mieux adapté ?

2 - La porosité interstitielle est égale à 0,5 . Quel est le facteur de capacité de ces composés ?

3 - A quoi correspond le pic n° 1 ?

4 - Comment diminuerez-vous la durée de l'analyse ? ($\epsilon_0 = 0,45$ et 0,65 respectivement pour le tétrahydrofurane et pour l'acétonitrile). Quelles sont les limites à vos propositions ?

5 - Quelle est la surface moléculaire apolaire des acides gras de la série C18 sachant que :

$$\ln k' = 0,04 S_{\text{apolaire}} - 2 \quad \text{avec } S_{\text{apolaire}} \text{ en } 10^{-20} \text{ m}^2 .$$

Interprétez les résultats obtenus .

6 - Dans quelles conditions peut-on écrire :

$$R_s = \frac{\sqrt{N} (t_2 - t_1)}{2 (t_2 + t_1)}$$

7 - Quelle est la perte de charge , la viscosité de phase mobile étant égale à 1 cP

On donne

$$K^0 = \frac{d_p^2}{180} \cdot \frac{\epsilon_0^3}{(1 - \epsilon_0)^2}$$

Corrigé n° 1

1 - Il s'agit d'une chromatographie solide-liquide en mode isochratique dont la phase stationnaire est greffée apolaire (C8) .

L'acide phosphorique permet d'atteindre un pH inférieur au pKa des acides gras à séparer ; les groupements carboxyliques sont alors sous la forme COOH ce qui permet la séparation sur la phase greffée apolaire en fonction du caractère hydrophobe de ces acides gras .

La séparation est effectuée à 35° C d'une part pour diminuer la viscosité apparente de la phase mobile et donc diminuer la perte de charge et d'autre part pour favoriser la solubilité de certains des acides gras étudiés et agir sur leur k'.

Les acides gras saturés (C:16 et C:18) sont séparés en fonction du nombre de leur CH₂ . Plus celui-ci est élevé et plus leur hydrophobicité est élevée et donc leur k' aussi . Pour un même nombre de CH₂ et une même conformation (cis par exemple) , le facteur de capacité est d'autant plus grand que le degré d'insaturation est faible . Pour un même nombre de CH₂ et un même degré d'insaturation , k' est plus élevé pour la forme trans qui donne une molécule avec une surface apolaire plus grande que l'isomère cis .

Le système le plus simple est la mesure de l'absorbance à 210 - 215 nm . La mesure de la diffusion de la lumière est également possible .

$$2 - \text{Volume de la colonne } V_t = L \cdot \text{section} = 15 \cdot 3,141 \cdot (0,46)^2 / 4 = 2,49 \text{ cm}^3$$

$$V_M = \epsilon \cdot V_t = 0,5 \cdot 2,49 = 1,25 \text{ cm}^3$$

$$t_0 = V_M / D = 1,25 \text{ min}$$

$$k' = (t_R - t_0) / t_0$$

$$\text{acide linoléique } (4,82 - 1,25) / 1,25 = 2,86$$

$$\text{acide trans-héxa } (6,35 - 1,25) / 1,25 = 4,08$$

$$\text{acide trans-linol. } (8 - 1,25) / 1,25 = 5,4$$

$$\text{acide oléique } (10,47 - 1,25) / 1,25 = 7,38$$

$$\text{acide stéarique } (11,53 - 1,25) / 1,25 = 8,22$$

$$\text{acide palmitoléique } (6 - 1,25) / 1,25 = 3,8$$

$$\text{acide linoléique } (6,94 - 1,25) / 1,25 = 4,55$$

$$\text{acide palmitique } (9,53 - 1,25) / 1,25 = 6,62$$

$$\text{acide élaïdique } (11,18 - 1,25) / 1,25 = 7,94$$

3 - Le pic 1 correspond au pic d'injection

4 - Une diminution de la durée d'analyse est possible en diminuant ϵ_0 (donc k') ; ceci est réalisable en augmentant les proportions d'acétonitrile et surtout de tétrahydrofurane dans la phase mobile : risque de perte de résolution. La durée d'analyse peut être réduite en augmentant v : risque de voir ΔP augmenter

5 - Calcul de la surface moléculaire apolaire (en 10⁻²⁰ m²) des acides gras en C18 :

$$\text{acide stéarique } \ln k' = 2,106 \quad S_{\text{apol}} = 102,7$$

$$\text{acide élaïdique } \ln k' = 2,072 \quad S_{\text{apol}} = 101,8$$

$$\text{acide oléique } \ln k' = 1,998 \quad S_{\text{apol}} = 100$$

$$\text{acide trans-linoléique } \ln k' = 1,686 \quad S_{\text{apol}} = 92,2$$

$$\text{acide linoléique } \ln k' = 1,515 \quad S_{\text{apol}} = 87,9$$

$$\text{acide linoléique } \ln k' = 1,05 \quad S_{\text{apol}} = 76,3$$

Les acides cis , cis-cis ou cis-cis-cis ont une structure "repliée" qui leur confère une surface apolaire d'autant plus petite (en donc un k' bas) que le nombre de doubles liaisons est grand . Les isomères trans occupent un volume plus grand que les isomères cis (voir *Structures des acides gras* p2).L'hydrophobicité d'une double liaison est inférieure à celle de la liaison σ .

6 - La résolution est donnée par :

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{(\omega_2 + \omega_1)}$$

On a :

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{\omega} \right)^2$$

Si les pics sont gaussiens et si on suppose que le nombre de plateaux théoriques est voisin pour les divers composés analysés , on a alors :

$$\omega = \frac{4}{\sqrt{N}} \cdot t_R$$

ce qui permet d'obtenir la relation proposée .

7 - La perte de charge est égale à :

$$\Delta P = \frac{\eta \cdot L \cdot v}{K^0} \quad \text{avec} \quad K^0 = \frac{d_p^2}{180} \cdot \frac{\epsilon_0^3}{(1 - \epsilon_0)^2}$$

On a :

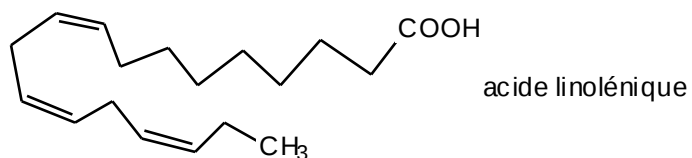
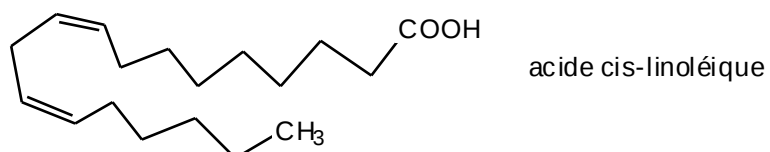
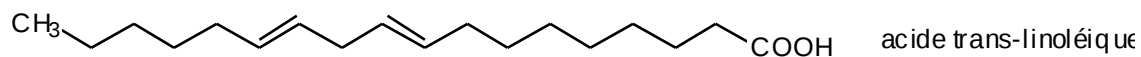
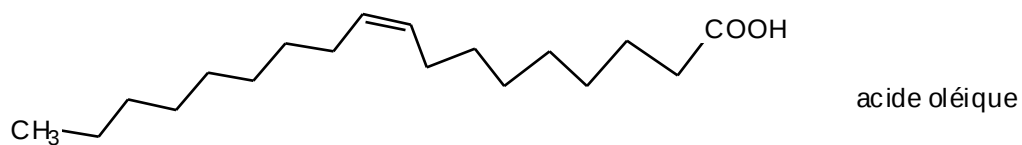
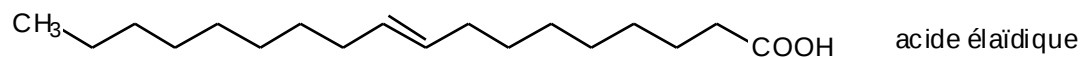
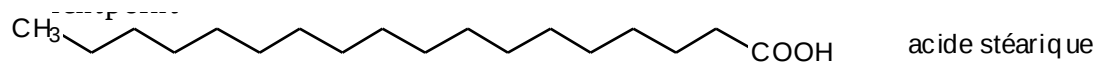
$$v = \frac{D}{\varepsilon \cdot S} \quad \text{soit} \quad v = (1/60) / 0,5 \cdot \pi \cdot (0,23)^2.$$

$$v = 12 \text{ cm.min}^{-1} \text{ soit } 0,2 \text{ cm.sec}^{-1}.$$

$$K_o = (16 \cdot 10^{-8} / 180) \cdot 0,5 = 4,44 \cdot 10^{-10}$$

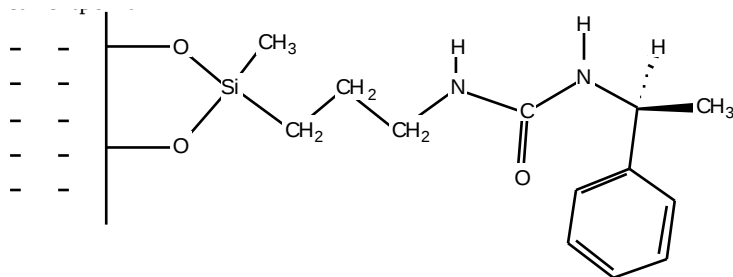
$$\Delta P = 10^{-2} \cdot 15 \cdot 0,2 / (4,44 \cdot 10^{-10}) = 3 \cdot 10^{-2} / (4,44 \cdot 10^{-10}) = 0,675 \cdot 10^{-8} \text{ baryes} = 67,5 \text{ bars}$$

Structures des acides gras analysés :

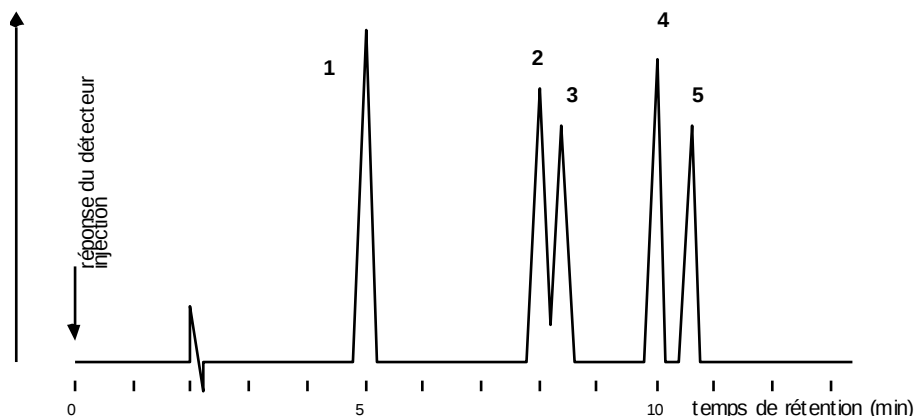


Sujet n° 2.

La structure chimique d'une phase stationnaire qualifiée de "phényl-urée" et utilisée en chromatographie LS est la suivante :



Le diamètre des particules qui constituent cette phase est de 3 μm . La colonne qui les contient a une longueur et un diamètre respectivement égaux à 15 cm et 0,4 cm. Cette colonne est utilisée dans un système chromatographique complet pour analyser des acides aminés et dipeptides de synthèse (MET, GLY et GLY-MET). Un chromatogramme type obtenu est schématisé ci-dessous :



- 1) Expliquez le résultat obtenu .
- 2) Proposez , en les justifiant , une éventuelle préparation de l'échantillon et une composition satisfaisante de phase mobile permettant d'obtenir un tel chromatogramme.
- 3) Quel est le système de détection le mieux adapté ?
- 4) Sachant que la porosité interstitielle est égale à 0,5 quel est le débit de la phase mobile ?
Le volume de phase mobile compris entre l'injecteur et la colonne d'une part et la colonne et le détecteur d'autre part est égal à $5,75 \cdot 10^{-2} \text{ cm}^3$.
- 5) Quelle est la perte de charge avec une phase mobile de $\eta = 1,24 \text{ cP}$? On donne :

$$K^0 = \frac{d_p^2}{180} \cdot \frac{\varepsilon}{(1 - \delta)^2}$$

- 6) Quel est le facteur de capacité des acides aminés et dipeptides analysés ?
- 7) Quelle est la résolution entre les composés 2 et 3 et entre les composés 4 et 5 ? Discuter.

Corrigé n° 2

1) La phase stationnaire est une phase chirale (par la présence d'un C asymétrique) greffée en phase inverse. La glycine ne possède pas de C asymétrique et est éluée sous forme d'un pic unique n°1. La méthionine se présente sous forme de deux isomères L-MET et D-MET (ou S et R ; énantiomères) et le dipeptide GLY-MET sous forme de deux isomères : GLY-L-MET et GLY-D-MET (pics n° 4 et 5 ou 5 et 4)

2) La présence de deux fonctions (COO^- et NH_3^+) ionisables nuit à la séparation dans un système en phase inverse.

• 2-1. Il est possible de s'affranchir de l'éventuel effet de ces groupements en formant par exemple des dérivés hydrophobes par condensation au niveau du NH_3 (réaction avec par exemple l' OPA ou la fluorescamine ou le PITC etc.)

Dans ce système de dérivation pré-colonne, la phase mobile sera tamponnée ou acidifiée à un pH inférieur au pKa des composés analysés soit aux environs de 2 par exemple. Le temps de rétention des composés sera dans ces conditions d'autant plus élevé que leur hydrophobicité sera grande et que le ϵ_0 de la phase mobile sera élevé. La proportion de méthanol ou de THF ou d'acétonitrile dans la phase mobile est corrélée au ϵ_0 .

• 2-2. Il est possible d'envisager le "blocage" des fonctions COOH par estérification par exemple.

• 2-3. Il est aussi possible de proposer de tamponner la phase mobile à pH = 5,90, pH correspondants sensiblement aux pHi des acides aminés et peptides analysés. Dans ce cas il n'est pas nécessaire de procéder à une dérivation préalable. La composition de la phase mobile est à envisager comme décrit en 2-1.

3) Si une dérivation pré-colonne par des dérivés "fluorescents" comme l'OPA a été réalisée, la détection fluorimétrique s'impose. En absence de dérivation pré-colonne, une mesure de l'absorbance à 210 - 220 nm est possible. La dérivation post-colonne est aussi possible.

4) Le volume de la colonne est égal à $(\pi D^2 / 4) \cdot 15 = 1,885 \text{ cm}^3$.

Le volume mort de la colonne est égal à :

$$V_M = V_T \cdot \epsilon \text{ soit } 0,9425 \text{ cm}^3.$$

Le volume mort total du système est égal à :

$$V_M = 0,9425 + 0,0575 = 1 \text{ cm}^3.$$

A partir du chromatogramme on mesure t_0 à 2 min.

Comme $V_M = t_0 \cdot D$, on a : $D = 1 / 2 = 0,5 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$.

5) La loi de Darcy donne :

$$\Delta P = \frac{\eta \cdot L \cdot v}{K^0}$$

$$K_0 = 4,445 \cdot 10^{-10}$$

$$v = D / \epsilon \cdot s \text{ soit } v = 0,5 / 0,5 = 0,125 \quad v = 8 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1} \text{ soit } v = 0,133 \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-1}$$

$$\Delta P = 55,6 \text{ bars}$$

6) Valeurs de k' :

$$k' = t_R - t_0 / t_0$$

$$t_R \text{ pic n}^\circ 1 = 5 \text{ min (GLY) soit } k' = 3/2 = 1,5$$

$$t_R \text{ pic n}^\circ 2 (\text{L ou D-MET}) = 8 \text{ min soit } k' = 6/2 = 3$$

$$t_R \text{ pic n}^\circ 2 (\text{D ou L-MET}) = 8,3 \text{ min soit } k' = 6,3/2 = 3,15$$

$$t_R \text{ pic n}^\circ 2 (\text{L ou D-GLY-MET}) = 10 \text{ min soit } k' = 8/2 = 4$$

$$t_R \text{ pic n}^\circ 2 (\text{Dou L-GLY-MET}) = 10,6 \text{ min soit } k' = 8,6/2 = 4,3$$

7) La résolution est égale à :

$$R_s = 2 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\omega_2 + \omega_1}$$

$$\text{Entre 4 et 5 : } R_s = 2 (0,6) / 0,8 = 1,5 : \text{ la résolution est complète car } > 1$$

$$\text{Entre 3 et 2 : } R_s = 2 (0,3) / 0,8 = 0,75 : \text{ la résolution n'est pas excellente comme le montre le schéma}$$

Sujet n°3

1°)- En CLS, quelles sont les phases stationnaire et mobile utilisables pour séparer la diméthylamine, la gramine et l'hordénine. Donner, en fonction du système choisi, l'ordre d'élution de ces trois composés.

2°)- Quel est le type de détecteur le mieux adapté aux systèmes de phases choisis ?

3°)- Si pour analyser ces composés on utilise, en système isocratique, une phase mobile qui contient du naphthalène sulfonate de sodium 0,03M, quelle phase stationnaire et quel détecteur sont alors nécessaires ? Quel doit être le pH de la phase mobile ?

Avec ce système $V_T = 2 \text{ mL}$, la porosité $e = 0,5$, le débit de la phase mobile = $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

4°) Quel est le facteur de capacité des composés analysés pour lesquels les t_R sont respectivement de 3, 6 et 9 min ? Quelle est la sélectivité de la colonne ?

Corrigé n°3

1) Il s'agit d'amines R - NH₂ séparables par :

- échange d'ions à des pH < pK_a : élution avec un gradient de pH , échangeurs d'ions de type sulfonate : élution du composé de pK_a le plus faible vers celui du pK_a le plus élevé : gramine , hordénine , triméthylamine
- chromatographie hydrophobe sur C18 ou C8 : élution en fonction de l'hydrophobicité (méthylamine , hordénine , gramine) avec une phase mobile d' ϵ_0 adapté à pH voisin ou supérieur au pK_a
- chromatographie par appariement d'ions (avec un réactif paire d'ions du type sulfonate par exemple naphtalène sulfonate) : élution idem qu'avec C18 mais avec une phase mobile contenant le réactif paire d'ions à pH < pK_a

2) Sans paire d'ions le détecteur le mieux adapté est le spectrophotomètre à $\lambda = 200$ nm , deux des composés cycliques absorbent aux environs de 260 - 280 nm

Avec la paire d'ions sulfonate naphtalène une détection fluorimétrique est possible (sensibilité accrue)

Diffusion de la lumière

Détecteur électrochimique

3) Voir réponse en 1 et 2

4) $\epsilon = V_M / V_T$ d'où $V_M = 1$ ml

$V_M = t_0 \cdot D$ d'où $t_0 = 1$ min

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

k' méthylamine = $3 - 1 / 1 = 2$

k' hordénine = $6 - 1 / 1 = 5$

k' gramine = $9 - 1 / 1 = 8$

Sélectivité entre méthylamine et hordénine :

$$\alpha = k'_2 / k'_1 = 2,5$$

Sélectivité entre gramine et hordénine :

$$\alpha = k'_2 / k'_1 = 1,6$$

Sélectivité entre méthylamine et gramine :

$$\alpha = k'_2 / k'_1 = 4$$

Sujet n°4

Des colonnes chromatographiques récentes sont proposées avec 0,1 cm de diamètre interne et 5 cm de longueur . Ces colonnes sont garnies de particules sphériques de 0,8 μ m de diamètre et de porosité interstitielle égale à 0,45 . Ces particules sont constituées de propyl silice et la phase mobile contenant du 1-hexane sulfonate a une viscosité égale à 0,5 centipoise .

- 1) Quels sont les classes ou catégories de composés susceptibles d'être analysés au moyen de ce système ?
- 2) Quels avantages et inconvénients présente l'utilisation de telles colonnes ?
- 3) Quel débit de phase mobile doit-on fixer pour que la perte de charge soit égale à 300 bars ?
- 4) Avec ce ΔP , quel sera le t_0 ?
- 5) Quel est la facteur de capacité d'un composé élué à 5 min ?
- 6) Quelle est la nombre de plateaux théoriques ?

On donne :

$$K_o = \frac{d_p^2}{180} \cdot \frac{\epsilon^3}{(1 - \epsilon)^2}$$

$$\Delta P = \frac{\eta L v}{k_o}$$

$$HEPT = B \cdot d_p^\beta \quad \text{avec } \beta = 1,6 \text{ et } B = 1$$

Corrigé n°4

1) Appariement d'ions . Phase mobile B^- , donc formation de paires d'ions avec les composés chargés + : il s'agit en sciences des aliments surtout d'amines qui à $pH < pK_a$ sont chargées -

2) **Avantages** : temps d'analyse très court , HEPT très petit , N très grand , volume d'échantillon faible , utilisation d'un faible volume de phase mobile

Inconvénients : système à débit très faible (nécessité de pompes de technologie avancée) , connexions , volumes morts , détection très difficile pour une masse très faible de soluté

3) $d_p = 0,8 \cdot 10^{-4}$ cm , $L = 5$ cm , $\eta = 0,5 \cdot 10^{-2}$ cP

$$k_o = \frac{0,64 \cdot 10^{-8}}{180} \cdot \frac{0,091}{0,303} = 1,065 \cdot 10^{-11}$$

$$v = \frac{\Delta P \cdot k_o}{\eta \cdot L} = \frac{3 \cdot 10^8 \cdot 1,065 \cdot 10^{-11}}{0,5 \cdot 10^{-2} \cdot 5}$$

$$v = 0,128 \text{ cm/sec}$$

$$D = v \cdot s \text{ avec } s = 0,785 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$$

$$D = 10^{-4} \text{ ml/sec} = 6 \mu\text{l/min}$$

$$4) t_0 = L / v = 5 / 0,128 = 39 \text{ sec}$$

$$5) t_R = t_0 (1 + k') = 39 (1 + k') \text{ d'où } k' = 6,7$$

$$6) \text{HEPT} = 1 (0,8 \cdot 10^{-4})^{1,6} = 9 \cdot 10^{-8} \text{ cm d'où } N = L / \text{HEPT} = 5 / 9 \cdot 10^{-8} = 5 \cdot 10^7$$

Sujet n°5

1) Des colonnes chromatographiques de 0,1 cm de diamètre interne et 10 cm de longueur sont actuellement proposées garnies de particules sphériques de 1 μm de diamètre et de porosité interstitielle égale à 0,5. Ces particules sont constituées de butyl silice et la phase mobile contenant du 1-hexane sulfonate a une viscosité égale à 0,5 centipoise .Quels sont les classes ou catégories de composés susceptibles d'être analysés au moyen de ce système ?

2) Justifier le rôle du pH .

3) Quels avantages et inconvénients présente l'utilisation de telles colonnes ?

4) Quel débit de phase mobile doit-on fixer pour que la perte de charge soit égale à 200 bars ?

5) Avec ce ΔP , quel sera le t_0 ?

6) Quel est la facteur de capacité d'un composé élué à 7 min ?

7) Quelle est la nombre de plateaux théoriques ?

On donne :

$$K_o = \frac{d_p^2}{180} \cdot \frac{\varepsilon^3}{(1 - \varepsilon)^2}$$

$$\text{HEPT} = B \cdot d_p^\beta \text{ avec } \beta = 1,6 \text{ et } B = 1$$

Corrigé n°5

1) Appariement d'ions . Phase mobile B^- , donc formation de paires d'ions avec les composés chargés + : il s'agit en sciences des aliments surtout d'amines qui à $pH < pK_a$ sont chargées +

2) Se placer dans des conditions de pH pour lesquelles l'appariement d'ion est possible , par ex à un pH pour lequel les amines sont chargées + donc à $pH < pK_a$ mais à un $pH >$ au pK_a du sulfonate (voisin de 1,5)

3) **Avantages** : temps d'analyse très court , HEPT très petit , N très grand , volume d'échantillon faible , utilisation d'un faible volume de phase mobile

Inconvénients : système à débit très faible (nécessité de pompes de technologie avancée) , connexions , volumes morts , détection très difficile pour une masse très faible de soluté

4) $d_p = 10^{-4}$ cm , $L = 10$ cm , $\eta = 0,5 \cdot 10^{-2}$ cP

$$k_o = \frac{10^{-8}}{180} \cdot \frac{0,125}{0,25} = 2,78 \cdot 10^{-11}$$

$$v = \frac{{}^2P \cdot K_o}{\eta \cdot L} \quad \text{d'où :}$$

$$v = \frac{2 \cdot 10^8}{0,5 \cdot 10^{-2}} \cdot \frac{2,78 \cdot 10^{-11}}{10}$$

$$v = 0,111 \text{ cm / sec}$$

$$D = v \cdot s \quad \text{avec } s = (0,785 \cdot 10^{-3}) \cdot 0,5 \text{ cm}^2$$

$$D = 4,36 \cdot 10^{-4} \text{ ml/sec} = 26 \text{ } \mu\text{l / min}$$

$$5) t_0 = L / v = 10 / 0,111 = 90 \text{ sec}$$

$$6) t_R = t_0 (1 + k') \quad 420 = 90 (1 + k') \quad \text{d'où } k' = 3,67$$

$$7) \text{HEPT} = 1 (10^{-4})^{1,6} = 4 \cdot 10^{-7} \text{ cm} \quad \text{d'où } N = L / \text{HEPT} = 10 / 4 \cdot 10^{-7} = 2,5 \cdot 10^7$$

Sujet n° 6

De très nombreux travaux de recherche ont été réalisés pour prédire le temps de rétention de solutés au cours de leur analyse par chromatographie liquide. Quels sont les principaux paramètres à prendre en considération dans le cas d'une chromatographie dont la phase stationnaire est constituée de: 1) silice, 2) n-octadécyl silice.

Une des définitions de l'hydrophobicité des solutés a été proposée par De Waterbeemd :

$$\log_{10} P = \frac{S_{1\text{-octanol}}}{S_{\text{eau}}}$$

(S_i solubilité du soluté dans le 1-octanol et l'eau) ; les valeurs de $\log P$ sont disponibles pour de très nombreux composés. En chromatographie en phase inverse on a :

$$\log_{10} P = a \log_{10} K + b \quad \text{équation 1}$$

(K coefficient de distribution), a et b étant des constantes. Quelles relations peut-on écrire entre $\log P$ et k' d'une part (k' facteur de capacité) et $\log P$ et t_R d'autre part ?

Deux composés A et B ont des solubilités respectivement égales à 4 et 3,5 moles.l⁻¹ dans le 1-octanol et de 0,4 et 0,5 mole.l⁻¹ dans l'eau. Dans l'équation 1 les valeurs de a et b sont pour les deux composés respectivement de 15 et 2,5. Avec une colonne de 4 mm de diamètre et de 10 cm de longueur dont la phase stationnaire à une porosité interstitielle de 0,5, un débit de phase mobile de 1 ml.min⁻¹, quels sont les temps de rétention de A et B et quelle est la sélectivité de cette colonne.

Dans un système isocratique à phase mobile binaire (eau : solvant organique) avec une phase stationnaire du type octyl-silice, on démontre expérimentalement que :

$\log k' = -S \Phi + \log k'_{\text{eau}}$, équation dans laquelle k' est le facteur de capacité, Φ la fraction volumique du solvant organique, S la variation de pente liée à un changement de 1 % de la concentration du solvant organique considéré dans la phase mobile. Comment exploiteriez-vous cette équation ?

Corrigé n° 6

Le temps de rétention d'un soluté en CLS est essentiellement fonction de la "colonne" (L , nature et propriétés et nature de la phase stationnaire), de la phase mobile (vitesse linéaire, nature, température), de la nature du soluté.

$$t_R = (1 + k') L / v, \quad \text{équation de Snyder} \quad \log k' = -a \cdot \epsilon_0 + b$$

Silice : chromato d'adsorption de solutés

polaires (k' augmente avec la polarité du soluté), t_R d'autant plus court que ϵ_0 est élevé.

n-octadécyl silice : chromato en phase inverse : adsorption de composés apolaires (k' augmente avec l'hydrophobicité du soluté), t_R d'autant plus court que ϵ_0 est faible.

$$\log_{10} P = a \log_{10} K + b \quad \text{équation 1}$$

$$\log_{10} K = \log_{10} k' - \log_{10} (V_s / V_M)$$

$$k' = t_R - t_0 / t_0$$

Pour répondre remplacer les symboles par leur développement
A partir de l'équation de De Waterbeemd :

$$\log_{10} P = \frac{S_{1\text{-octanol}}}{S_{\text{eau}}}$$

pour A $\log_{10} P = 4 / 0,4 = 10$

pour B $\log_{10} P = 3,5 / 0,5 = 7$

pour A $10 = 15 \cdot \log_{10} K + 2,5$ soit $\log_{10} K = 0,5$

pour B $7 = 15 \cdot \log_{10} K + 2,5$ soit $\log_{10} K = 0,3$

V_T de la colonne $\pi D^2 / 4 \cdot L = 1,26 \text{ cm}^3$ $\varepsilon = V_M / V_T = 0,5$ donc $V_M = 0,5 V_T = V_S$

$k' = K \cdot V_M / V_S = K$

pour A $\log_{10} K = 0,5 = \log k'$ soit $k' = 3,16$

pour B $\log_{10} K = 0,3 = \log k'$ soit $k' = 2$

$\alpha = k'_2 / k'_1 = 3,16 / 2 = 1,58$

$V_M = t_0 \cdot D$ d'où $t_0 = 0,63 \cdot 1 = 0,63 \text{ min}$

$t_{RA} = t_0 (1 + k') = 0,63 (1 + 3,16) = 2,62 \text{ min}$

$t_{RB} = t_0 (1 + k') = 0,63 (1 + 2) = 1,89 \text{ min}$

Avec un système isocratique à phase mobile binaire (eau : solvant organique) et avec une phase stationnaire du type octyl-silice, on peut "choisir" k' en fonction du pourcentage de solvant organique dans la phase mobile.

$\log k' = -S \Phi + \log k'_{\text{eau}}$, équation dans laquelle k' est le facteur de capacité, Φ la fraction volumique du solvant organique, S la variation de pente liée à un changement de 1 % de la concentration du solvant organique considéré dans la phase mobile. Comment exploiteriez-vous cette équation ?

Sujet n° 7

1 - De très nombreux travaux de recherche sont réalisés pour prédire le temps de rétention de solutés au cours de leur analyse par chromatographie liquide. Quels sont les principaux paramètres à prendre en considération dans le cas d'une chromatographie dont la phase stationnaire est constituée de: 1) silice, 2) n-octadécyl silice, 3) polystyrène sulfoné, 4) silice-sérum albumine humaine.

2 - Une des définitions de l'hydrophobicité des solutés proposée par De Waterbeemd est :

$$\log_{10} P = \frac{S_{1\text{-octanol}}}{S_{\text{eau}}}$$

(S_i solubilité du soluté dans le 1-octanol et l'eau); les valeurs de $\log P$ sont disponibles pour de très nombreux composés. En chromatographie en phase inverse on a :

$$\log_{10} P = a \log_{10} K + b \quad \text{équation 1}$$

(K coefficient de distribution), a et b étant des constantes. Quelles relations existe-t-il entre $\log P$ et k' d'une part (k' facteur de capacité) et $\log P$ et t_R d'autre part ?

3 - Deux composés A et B ont des solubilités respectivement égales à 4 et 3,5 moles.l⁻¹ dans le 1-octanol et de 0,4 et 0,5 mole.l⁻¹ dans l'eau. Dans l'équation 1 les valeurs de a et b sont pour les deux composés respectivement de 15 et 2,5. Avec une colonne de 4 mm de diamètre et de 10 cm de longueur dont la phase stationnaire à une porosité interstitielle de 0,5, un débit de phase mobile de 1 ml.min⁻¹, quels sont les temps de rétention de A et B et quelle est la sélectivité de cette colonne.

4 - La largeur à la base du pic A est de 10 secondes. Quelle est la HEPT ?

Corrigé n°7

1) Le temps de rétention d'un soluté en CLS est essentiellement fonction de la "colonne" (L , nature et propriétés et nature de la phase stationnaire), de la phase mobile (vitesse linéaire, nature, température), de la nature du soluté.

$$t_R = (1 + k') L / v, \quad \text{équation de Snyder} \quad \log k' = -a \cdot \varepsilon_0 + b$$

Silice : chromatographie d'adsorption de solutés polaires (k' diminue avec la polarité du soluté), t_R d'autant plus court que ε_0 est élevé. Si t° augmente k' diminue.

n-octadécyl silice : chromatographie en phase inverse : adsorption de composés apolaires (k' augmente avec l'hydrophobicité du soluté), t_R d'autant plus court que ε_0 est faible.

Polystyrènesulfoné : échange de cations. Deux paramètres importants : pH et μ .

Silice-SAB : chromatographie chirale.

$$2) \log_{10} P = a \log_{10} K + b \quad \text{équation 1}$$

$$\log_{10} K = \log_{10} k' - \log_{10} (V_S / V_M)$$

$$k' = t_R - t_0 / t_0$$

Pour répondre remplacer les symboles par leur développement

$$\log_{10} P = a \log_{10} \left(\left(\frac{t_R}{t_0} - 1 \right) \cdot \frac{V_M}{V_S} \right) + b$$

3) A partir de l'équation de De Waterbeemd :

$$\log_{10} P = \frac{S_{1\text{-octanol}}}{S_{\text{eau}}}$$

$$\text{pour A } \log_{10} P = 4 / 0,4 = 10 \quad \text{et pour B } \log_{10} P = 3,5 / 0,5 = 7$$

$$\text{pour A } 10 = 15 \cdot \log_{10} K + 2,5 \quad \text{soit } \log_{10} K = 0,5$$

$$\text{pour B } 7 = 15 \cdot \log_{10} K + 2,5 \quad \text{soit } \log_{10} K = 0,3$$

$$V_T \text{ de la colonne } \pi D^2 / 4 \cdot L = 1,26 \text{ cm}^3 \quad \varepsilon = V_M / V_T = 0,5 \quad \text{donc } V_M = 0,5 V_T = V_S$$

$$k' = K \cdot V_S / V_M = K$$

$$\text{pour A } \log_{10} K = 0,5 = \log k' \quad \text{soit } k' = 3,16$$

$$\text{pour B } \log_{10} K = 0,3 = \log k' \quad \text{soit } k' = 2$$

$$\alpha = k'_2 / k'_1 = 3,16 / 2 = 1,58$$

$$V_M = t_0 \cdot D \quad \text{d'où } t_0 = 0,63 \cdot 1 = 0,63 \text{ min}$$

$$t_{RA} = t_0 (1 + k') = 0,63 (1 + 3,16) = 2,62 \text{ min}$$

$$t_{RB} = t_0 (1 + k') = 0,63 (1 + 2) = 1,89 \text{ min}$$

$$4) N = 16 (t_R / \omega)^2 \quad \text{et} \quad \text{HEPT} = L / N$$

$$\text{HEPT} = \frac{10}{16 \cdot \left(\frac{t_R}{\omega}\right)^2} = \frac{10}{16 \cdot \left(\frac{157}{10}\right)^2} = 25 \text{ } \mu\text{m}$$

Sujet n° 8

Des composés dérivés du benzène sont analysés au moyen d'un chromatographe haute performance équipé d'une colonne C8 (porosité = 0,5, $d_p = 5 \text{ } \mu\text{m}$, 15 cm de longueur et 3,9 mm de diamètre interne); le débit de la phase mobile composée d'eau et d'isopropanol est de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Ces dérivés sont le nitrobenzène (NB), le 1,3-dinitrobenzène (DNB), le 1,3,5-trinitrobenzène (TNB), le 3-nitrotoluène (NT), le 2,4-dinitrotoluène (DNT) et le 2,4,6-trinitrotoluène (TNT). Le chromatogramme obtenu est schématisé sur la figure 1.

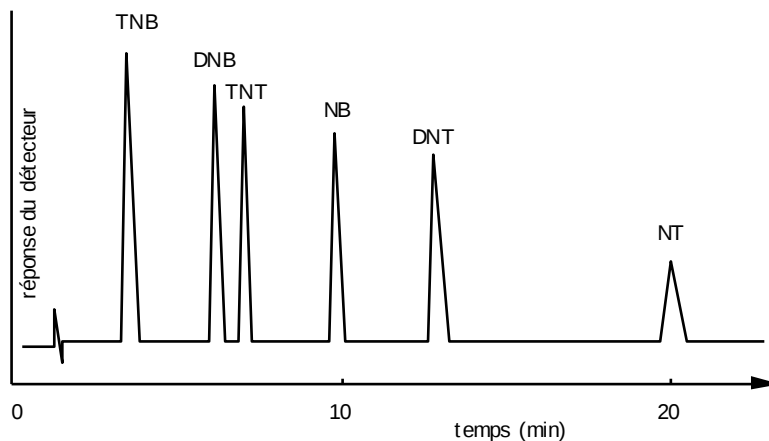


figure 1 : chromatogramme de dérivés de benzène (C8)

Expliquez le mécanisme de rétention et interprétez l'ordre d'élution de ces divers composés. Quel type de détecteur est bien adapté à ce système ?

Si on représente le $\ln k'$ en fonction du pourcentage d'isopropanol de la phase mobile on obtient pour le NB la droite schématisée sur la figure 2.

Comment interprétez-vous cette droite ?

Quel est le pourcentage d'isopropanol de la phase mobile utilisée ?

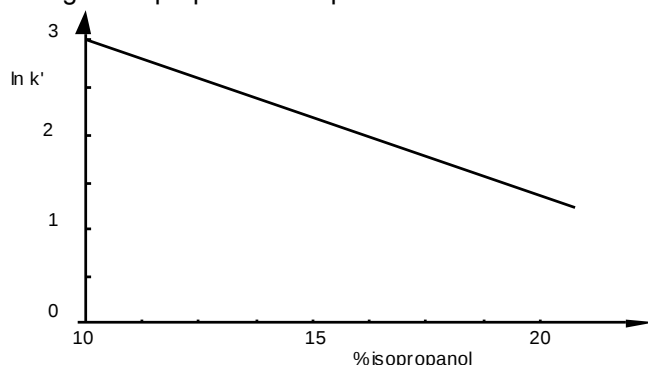


figure 2. Variation du $\ln k'$ en fonction du pourcentage d'isopropanol de la phase mobile pour NB

La loi

$$\ln k' = \ln k'_{\text{eau}} - S\Phi$$

dans laquelle k' est le facteur de capacité dans la phase mobile considérée, k'_{eau} est le facteur de capacité avec l'eau, S un paramètre de force du solvant et Φ la fraction de ce solvant dans la phase mobile binaire, vous permet-elle de contrôler les temps de rétention des composés analysés.

Avec un pourcentage d'isopropanol de 18 % dans la phase mobile, les variations du $\ln k'$ en fonction de $10^3 / T$ (T : température absolue) sont indiquées sur la figure 3.

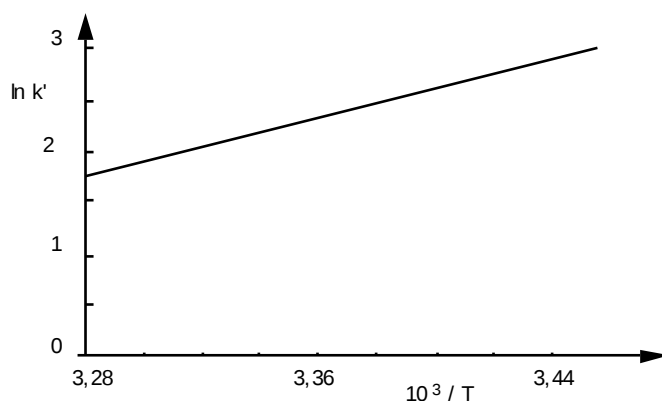


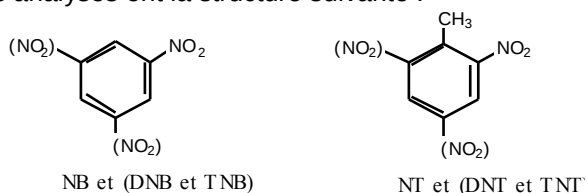
figure 3. Variations du $\ln k'$ en fonction de $10^3 / T$ pour le NB

Discutez ce résultat. A quelle température est réalisée la chromatographie ?

Quelle est la perte de charge en sachant que la viscosité de la phase mobile est de 1 cpoise ?

Corrigé n°8

Les dérivés benzéniques analysés ont la structure suivante :



Il s'agit d'une chromatographie en phase inverse. Plus le nombre de NO_2 est élevé, plus la polarité du composé augmente et plus son temps de rétention est faible. Par la présence du groupe méthyl, les dérivés du toluène ont une hydrophobicité plus élevée que les dérivés du benzène; leur temps de rétention, toutes conditions étant égales par ailleurs, sont donc plus élevés.

Le noyau benzénique absorbe dans l'UV à 254 nm : détection par spectrophotomètre UV.

Si le pourcentage d'isopropanol de la phase mobile augmente, ϵ_0 et l'apolarité diminuent et donc le temps de rétention diminue.

t_R est lié au facteur de capacité par

$t_R = t_0 (1 + k')$. Si k' diminue, $\ln k'$ diminue et t_R également.

$V_M = t_0 \cdot D = \varepsilon \cdot V_T$ d'où

$$t_0 = \frac{\varepsilon \cdot V_T}{D} = \frac{0,5 \cdot 15 \cdot (0,39)^2 \cdot \pi}{4 \cdot 1} = 0,9 \text{ min}$$

Pour NB on a :

$$k' = \frac{10 - 0,9}{0,9} = 10,1$$

Par analyse graphique $\ln 10,1 = 2,32$ soit % isopropanol $\neq 17,5$ %

C'est la loi de Van't Hoff qui montre que la température affecte l'enthalpie de liaison des analytes sur la phase stationnaire :

$$\ln k' = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \Phi \quad \text{avec } \Phi = \frac{V_S}{V_M}$$

Pur 18 % d'isopropanol on a $\ln k' = 2,3$ soit $10^3/T = 3,38$

La température est de 23 °C.

La perte de charge est :

$$\Delta P = \frac{\eta \cdot L \cdot v}{K_0}$$

$\eta = 0,01$ poise , $L = 15$ cm, $v = D / s$ et $s = s' \cdot \varepsilon$

$v = 0,28$ cm.sec⁻¹

$K_0 = 0,07 \cdot 10^{-8}$

$\Delta P = 60$ bars

Sujet n° 9

L'analyse des oses présents dans du jus d'orange est réalisée au moyen d'un chromatographe haute performance équipé d'une colonne de 15 cm de longueur , 0,39 cm de diamètre dont la phase stationnaire a une porosité de 0,5 et un d_p de 5 μm . Le débit de la phase mobile composée d'un mélange acétonitrile / eau est de 1 mL.min⁻¹ . La viscosité de cette phase mobile est de 1 cpoise.

Le chromatogramme obtenu après injection de 100 μL de jus est schématisé sur la figure 5 A.

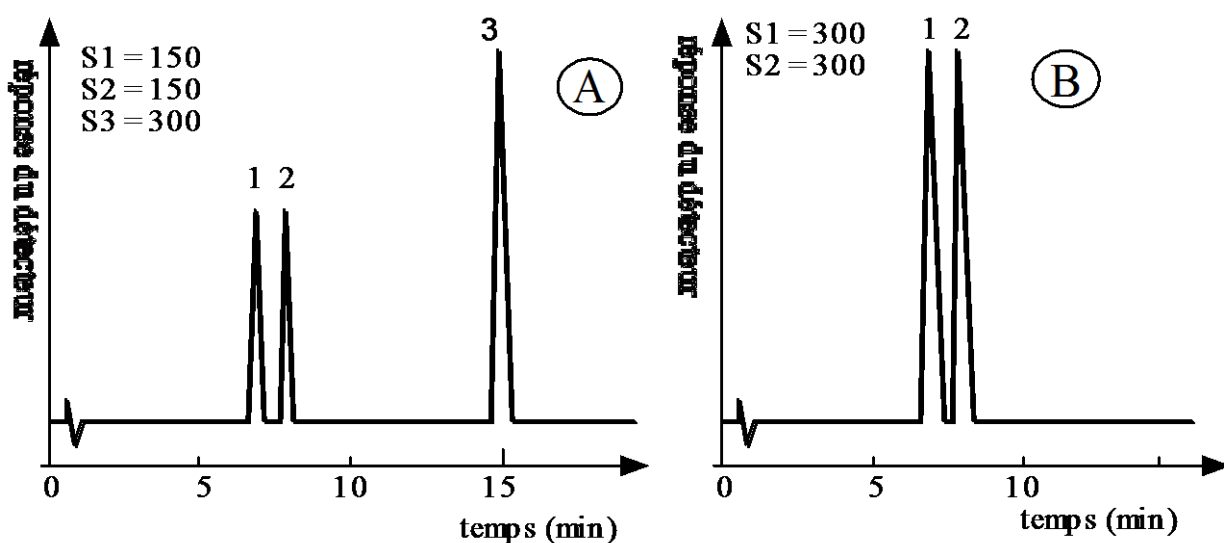


Figure 5 . Chromatogrammes de jus d'orange (A) et de jus d'orange traité à l'invertase (B). S est la surface relative des pics. Les coefficients de réponse des composés 1 , 2 et 3 sont identiques.

Après action de l'invertase sur le jus, le chromatogramme obtenu dans les mêmes conditions analytiques est représenté sur la figure 5B. Interprétez le résultat.

Quel est le mécanisme de rétention et quelle pourrait être la nature de la phase stationnaire ?

Interprétez l'ordre d'élution des composés 1, 2 et 3.

Quel est le facteur de capacité du composé 3 ?

Les variations du $\ln k'$ du composé 3 en fonction du pourcentage d'acétonitrile sont schématisées sur la figure 6.

Comment interprétez-vous cette droite ? Quel est le pourcentage d'acétonitrile de la phase mobile utilisée ?

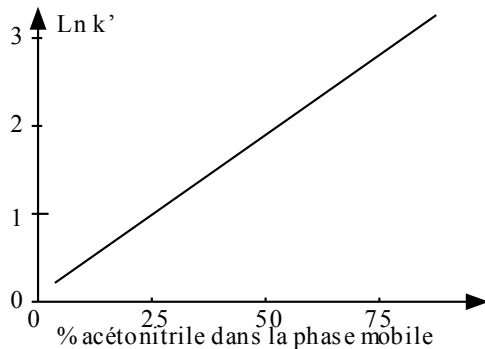


Figure 6. Variations du $\ln k'$ en fonction du % d'acétonitrile dans la phase mobile pour le composé 3

Comment procéderiez-vous pour obtenir un temps de rétention de 10 min pour le composé 3 ?

Quelle est la perte de charge ?

Corrigé n°9

L'invertase hydrolyse le saccharose en glucose et fructose. Le pic 3 qui disparaît correspond donc au saccharose et les pics 2 et 3 qui augmentent au glucose et au fructose. Le jus d'orange contient donc du glucose et du fructose en quantités identiques et du saccharose en quantité double comme le montrent les surfaces des pics et leurs variations (avec un coefficient de réponse identique pour les 3 oses).

La rétention se fait par liaison hydrogène : chromatographie d'adsorption. En effet t_R diminue avec la masse molaire de l'ose et donc avec le nombre d'OH susceptibles de donner une interaction hydrogène avec la phase stationnaire. Il est donc normal que les hexoses soient élués avec des t_R inférieurs au diholoside qu'est la saccharose. Il pourrait s'agir d'une phase greffée polaire type NH_2 .

Calcul du k' pour le composé 3 qui est le saccharose :

$$V_M = t_0 \cdot D = \varepsilon \cdot V_T \text{ d'où}$$

$$t_0 = \frac{\varepsilon \cdot V_T}{D} = \frac{0,5 \cdot 15 \cdot (0,39)^2 \cdot \pi}{4 \cdot 1} = 0,9 \text{ min}$$

t_R est lié au facteur de capacité par

$$t_R = t_0 (1 + k')$$

Avec $t_R = 15 \text{ min}$ pour le composé 3,

$$k' = 15,7$$

En chromatographie d'adsorption, k' diminue avec l'augmentation de ε_0 , c'est à dire avec la polarité de la phase mobile. Donc si le % d'acétonitrile diminue, le % d'eau augmente et la polarité aussi.

Si k' diminue, $\ln k'$ diminue et t_R également.

Si $k' = 15,7$, $\ln k' = 2,75$ et le graphe donne un % d'acétonitrile voisin de 75 %.

Un t_R de 10 min correspond à un k' de : $10 = 0,9 (1 + k')$ soit $k' = 10,1$

et $\ln k' = 2,3$. Par le graphe de la figure 6 il apparaît alors qu'un pourcentage d'acétonitrile de 55 % dans la phase mobile permet d'obtenir ce temps de rétention.

La perte de charge est :

$$\Delta P = \frac{\eta \cdot L \cdot v}{K_0}$$

$$h = 0,01 \text{ poise}, L = 15 \text{ cm}, v = D / s \text{ et } s = s' \cdot \varepsilon$$

$$v = 0,28 \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-1}$$

$$K_0 = 0,07 \cdot 10^{-8}$$

$$\Delta P = 60 \text{ bars}$$

Sujet n°10

Un broyat de graines de soja préalablement délipidé par pression est traité par de l'hexane au moyen d'un soxhlet. Le solvant est récupéré et soumis à une évaporation à sec sous vide partiel. Le résidu est repris par un mélange composé d'acétonitrile, de méthanol et d'acide sulfurique à 0,5 % (50/25/25, V/V/V). Une partie aliquote est injectée sur une colonne de 25 cm de longueur et 4,6 cm de diamètre interne dont la phase stationnaire est constituée de particules sphériques de dodécyl- silice de 5 μm de diamètre. La phase mobile, dont le débit est de 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, a la même composition que celle du mélange ternaire déjà décrit.

Les schémas des chromatogrammes étalon et dosage sont donnés sur la figure 1.

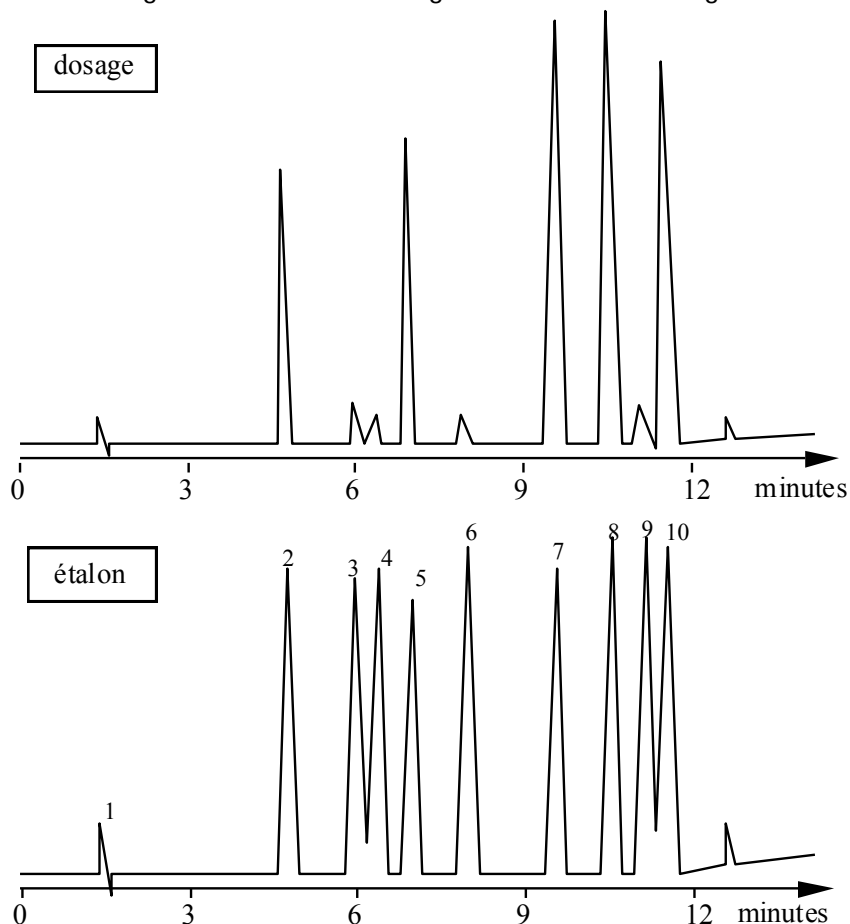


figure 1 . Schémas des chromatogrammes de l'extrait et de l'étalon obtenu par injection de 10 μl d'une solution 10 μM d'acidesgras dans la phase mobile

2 : acide linoléique	(C18:3,cis)	7 : acide palmitique	(C16:0)
3 : acide palmitoléique	(C16:1,cis)	8 : acide oléique	(C18:1,cis)
4 : acide trans-héxadécénoïque	(C16:1,trans)	9 : acide élaïdique	(C18:1,trans)
5 : acide linoléique	(C18:2,cis)	10 : acide stéarique	(C18:0)
6 : acide trans-linoléique	(C18:2,trans)		

- 1 - Expliquer la démarche analytique. L'ajout d'un étalon interne serait-il judicieux ; quelle molécule choisiriez-vous, comment procéderiez-vous et comment en tiendriez-vous compte dans la quantification.
- 2 - Quel est le principe de cette séparation ? Quel est le rôle de l'acide sulfurique dans la phase mobile ?
- 3 - Quel est le système de détection le mieux adapté ?
- 4 - La porosité interstitielle est égale à 0,5. Quel est le facteur de capacité des composés majeurs séparés à partir de l'extrait ?
- 5 - Comment peut-on agir sur les temps de rétention ?
- 6 - Quelle est la perte de charge, la viscosité de phase mobile est égale à 1,2 cP
- 7 - Quelle est la résolution entre les acides palmitique et oléique ?
- 8 - Quelle est la sélectivité de la colonne pour ces deux composés ?

Sujet n° 11

Le dosage de l'acide ascorbique et de quelques uns de ses dérivés présents dans une préparation à base d'orange est réalisé de la façon suivante : 10 g de préparation sont mélangés à 80 ml d'eau préalablement additionnés avec précision de 2,5 mg d'acide propionique ; le broyat est alors complété à 100 ml. Après centrifugation à 5000 g pendant 10 min, le surnageant est passé sur une colonne de 5 cm de long et 1 cm de diamètre contenant des

particules sphériques ($dp = 10 \mu\text{m}$) de silice greffée C18. L'éluat est récupéré et 100 μl sont injectés sur une colonne de 20 cm de longueur et 4,5 mm de diamètre contenant une phase stationnaire de type octadécyl silice dont les particules sphériques ont un diamètre moyen de 5 μm . La phase mobile, d'un débit égal à 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ est composée d'une solution aqueuse de bromure de tétrabutyl ammonium (0,2 %) et d'un tampon phosphate 10 mM pH 6,5. L'absorbance de l'éluat est mesurée à 210 nm.

Le chromatogramme étalon obtenu à partir de solutions étalons à 0,025 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ et celui résultant de l'analyse sont schématisés sur la figure 1 (avec dans tous les cas une boucle externe de 100 μl).

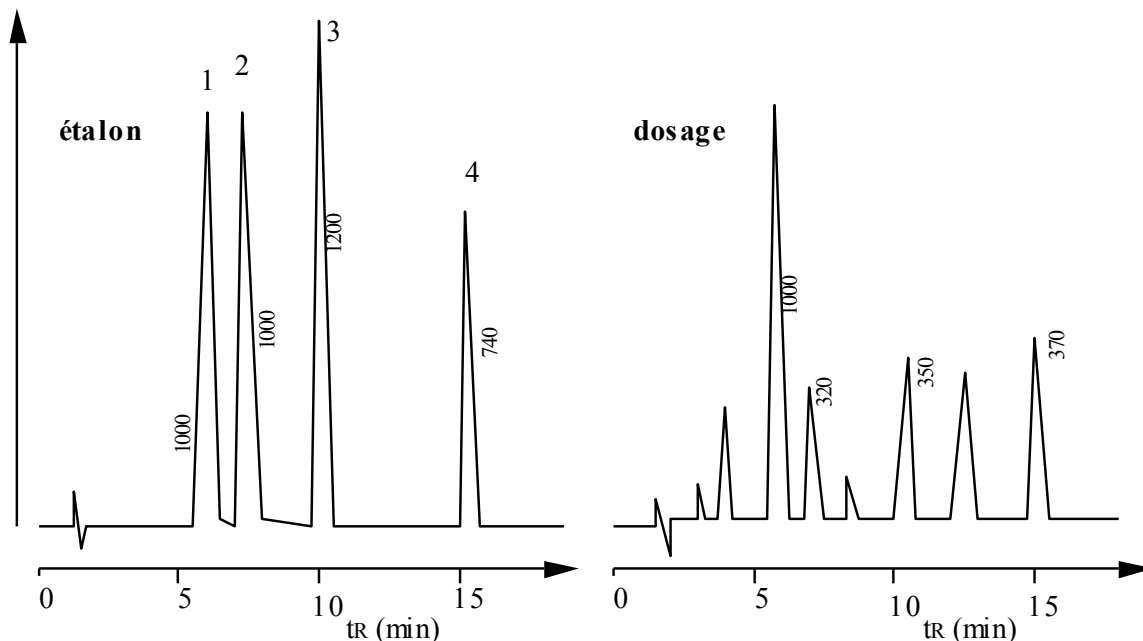


figure 1 : chromatogrammes étalon et dosage. (1 : acide ascorbique, 2 : acide déhydroascorbique, 3 : acide dicétogulonique , 4 : acide propionique). Les surfaces des pics sont indiquées en valeurs relatives.

- 1) Expliquez le principe de cette séparation chromatographique.
- 2) Pourquoi passer le surnageant sur la colonne de 5 cm de longueur (C18) avant analyse ?
- 3) Sachant que la porosité de la colonne analytique de 20 cm de longueur est de 0,5, quelle est la valeur de t_0 .
- 4) Dans ce système, quels sont le facteur de capacité et la HEPT de l'acide ascorbique.
- 5) La capacité de pics de la colonne définie par HERMAN est égale à :

$$n = 1 + \sqrt{\frac{N}{16}} \cdot \ln \left(\frac{t_w}{t_\alpha} \right)$$

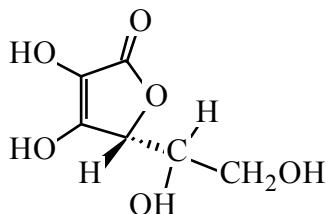
avec N nombre de plateaux théoriques, t_α et t_w les temps de rétention du premier et dernier pic du chromatogramme.

Comment exploiter cette donnée ?

- 6) Comment diminuerez-vous les temps de rétention pour accélérer l'analyse ?
- 7) Quelles sont les concentrations en acides ascorbique, déhydroascorbique et dicétogulonique de la préparation à base d'orange. Quel est le rôle joué par l'acide propionique ?

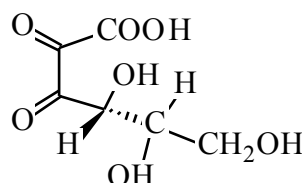
Corrigé n° 11

1) Séparation des acides organiques après appariement d'ions avec un ammonium "apolaire". La paire d'ions formée apolaire est séparée par chromatographie en phase inverse. Le pH est ajusté à une valeur supérieure au pK_a de l'acide et inférieure à celui de l'ion d'appariement.

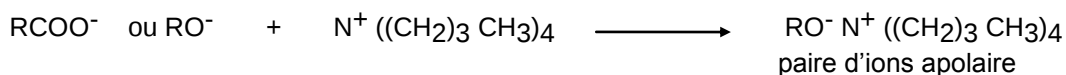


Acide ascorbique

Le pK_1 de l'hydroxyle en C3 est égal à 4,04 à 25°C



acide dicétogulonique



2) Le passage du surnageant sur C18 permet de retenir les composés apolaires qui pourraient gêner dans la suite du dosage.

3) Graphiquement **to est voisin de 1,5 min**

Le volume de la colonne est égal à $V_t = L \cdot \pi r^2$ soit $20 \cdot 3,14 \cdot (0,45 / 2)^2 = 3,18 \text{ cm}^3$

$VM = t_o \cdot D = \varepsilon \cdot V_t$

d'où

$t_o = \varepsilon \cdot V_t / D = 0,5 \cdot (3,18 / 1) = \mathbf{1,6 \text{ min}}$

4) $t_R = t_o (1 + k')$

Pour l'acide ascorbique $t_R = 6 \text{ min}$

d'où **$k' = 2,75$**

Graphiquement on a $\omega = 1 \text{ min}$

$N = 16 (t_R / \omega)^2$ soit $N = 16 (6 / 1)^2$ soit **$N = 576$**

HEPT = L / N d'où **HEPT** = $20 / 576 = \mathbf{0,035 \text{ cm}}$

5) $n = 96$ et les pics sont bien séparés. Cet indice permet d'estimer la capacité d'une colonne en terme de nombre de pics séparables avec une bonne résolution.

6) La diminution des temps de rétention peut être obtenue par une augmentation du débit ou en diminuant le facteur de capacité en choisissant un réactif paire d'ions moins apolaire (par exemple un sel d'ammonium de type tétrapropyl ou tétraméthyl).

7) L'acide propionique est un étalon interne. Sa concentration initiale dans la préparation de fruit est de $2,5 \text{ mg} / 100 \text{ ml}$. L'étalon analysé directement a une concentration de $0,025 \text{ g.l}^{-1}$ soit de $2,5 \text{ mg} / 100 \text{ ml}$.

On devrait donc obtenir sur les chromatogrammes étalons et dosage la même surface pour l'acide propionique. Or pour l'étalon on obtient une surface relative de 740 et pour le dosage de 370. Il faut donc corriger les résultats par un facteur de $740 / 370 = 2$.

Pour l'acide ascorbique : $0,025 \cdot 2 = 0,050 \text{ g.l}^{-1}$ de surnageant soit $5 \text{ mg} / 100 \text{ ml}$ ou 10 g de fruit

Pour l'acide déhydroascorbique : $(0,025 \cdot 2) \cdot 320 / 1000 = 1,6 \text{ mg} / 100 \text{ ml}$ ou 10 g de fruit

Pour l'acide dicétogulonique : $(0,025 \cdot 2) \cdot 370 / 1200 = 1,54 \text{ mg} / 100 \text{ ml}$ ou 10 g de fruit

Sujet n° 12

Une colonne chromatographique de 30 cm de longueur et 7,8 mm de diamètre interne contient une phase stationnaire constituée de sphères de polystyrène réticulée avec du divinylbenzène; leur diamètre est de $5 \mu\text{m}$ et leur porosité de 0,5. Elle est utilisée avec une phase mobile composée d'une solution aqueuse d'acide phosphorique à 0,05 N dont le débit est de $0,5 \text{ ml.min}^{-1}$. La température est de 30°C .

Les analyses de $10 \mu\text{l}$ d'un mélange d'acides organiques en solution à $0,5 \text{ g}$ pour 100 ml , ou d'un extrait de pommes (20 g de pommes broyés dans 80 ml d'eau et filtrés; on suppose que le volume final est de 100 ml) sont schématisées sur la figure 1.

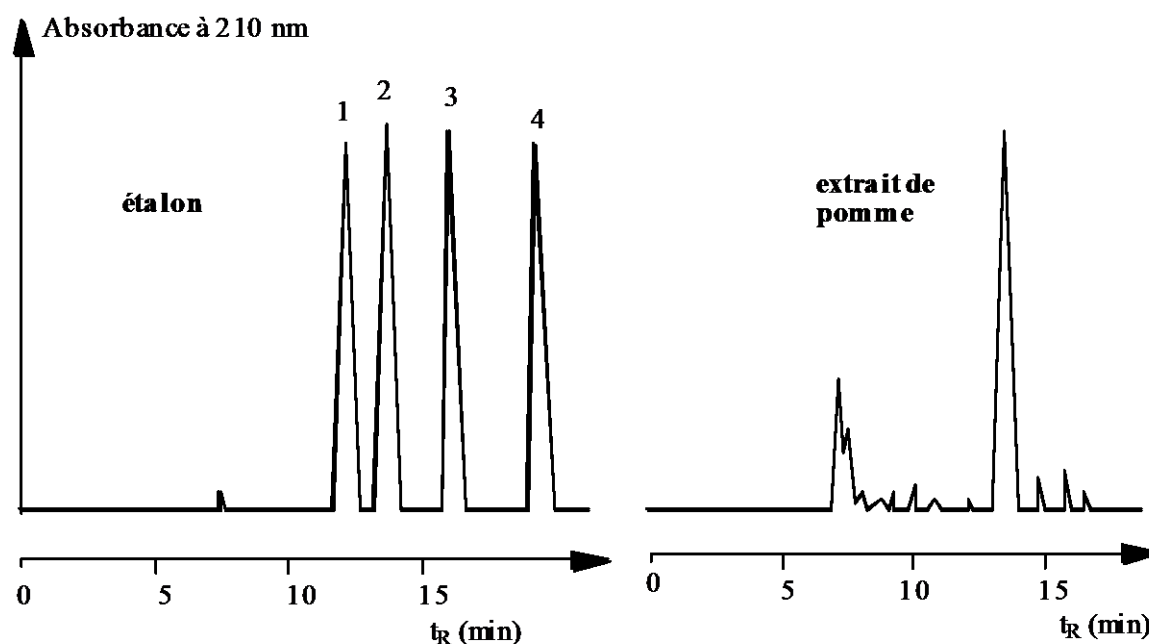


Figure 1 : chromatogrammes étalon et dosage. (1 : acide tartrique, 2 : acide malique, 3 : acide succinique , 4 : acide fumarique).

acide tartrique : $\text{COOH-CHOH-CHOH-COOH}$

acide malique : $\text{COOH-CH}_2\text{-CHOH-COOH}$

acide succinique : $\text{COOH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$

acide fumarique : COOH-CH=CH-COOH

- 1) Expliquez le principe de cette séparation chromatographique.
- 2) Quelle est la valeur de t_0 .
- 3) Quels sont le facteur de capacité et la HEPT de l'acide malique.
- 4) Quel serait l'effet d'une augmentation de la température de la colonne ?
- 5) Comment diminuerez-vous les temps de rétention pour accélérer l'analyse ?
- 6) Quelle est la concentration en acide malique de la pomme ?
- 7) Quelles autres méthodes de dosage chromatographique sont-elles utilisables pour ce dosage ?

Sujet n° 13

Pour analyser les acides organiques contenus dans du jus de raisin muscat on utilise une colonne chromatographique de 10 cm de longueur et 1 mm de diamètre interne. Elle contient une phase stationnaire constituée de sphères de polystyrène réticulée avec du divinylbenzène; leur diamètre est de 1 μm et leur porosité de 0,64. Elle est utilisée avec une phase mobile composée d'une solution aqueuse d'acide phosphorique à 0,06 N dont le débit est de 25 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. La température est de 35°C.

Les analyses de 5 μL d'un mélange d'acides organiques en solution à 0,4 g pour 100 mL, ou d'un jus de raisin filtré sur membrane 0,2 μm et préalablement additionné de 0,4 g d'acide fumarique pour 100 mL sont schématisées sur la figure 1 (l'acide fumarique est considéré comme absent du jus de raisin).

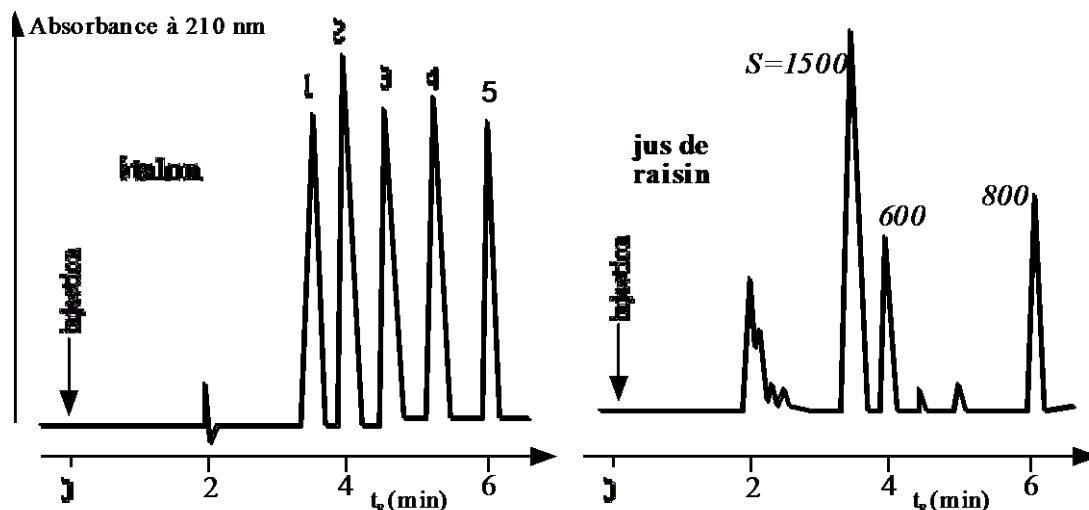


Figure 1 : chromatogrammes étalon et dosage (1 : acide tartrique; 2 : acide ascorbique; 3 : acide malique ; 4 acide succinique ; 5 : acide fumarique).

acide tartrique : COOH-CHOH-CHOH-COOH

$S = 1000$ (exprimée en unité arbitraire)

acide ascorbique : CO-COH=COH-CH-CHOH-CH2OH

$S = 1200$

acide malique : COOH-CH2-CHOH-COOH

$S = 1050$

acide succinique : COOH-CH2-CH2-COOH

$S = 1125$

acide fumarique : COOH-CH=CH-COOH

$S = 975$

- 1) Expliquez le principe de cette séparation chromatographique.
- 2) Quelle est la valeur de t_0 .
- 3) Quels sont le facteur de capacité et la HEPT des acides tartrique et ascorbique.
- 4) Quel serait l'effet d'une augmentation de la température de la colonne ?
- 5) Comment diminuerez-vous les temps de rétention pour accélérer l'analyse ?
- 6) Quelle est la concentration en acide tartrique du jus ? Quel est le rôle de l'acide fumarique ?
- 7) Quelles autres méthodes de dosage chromatographique sont-elles utilisables pour ce dosage ?

Corrigé n° 13

1) Séparation des acides organiques par chromatographie en phase inverse. Le pH est ajusté à une valeur inférieure aux pKa des acides organiques pour éviter leur ionisation et donc une trop forte polarité. Les acides sont séparés en fonction de leur polarité : pour un même nombre de carbone total (quatre par exemple) plus le nombre de fonctions OH est élevé et plus le facteur de capacité est faible.

2) Graphiquement **to est voisin de 2 min**

Le volume de la colonne est égal à $V_t = L \cdot \pi r^2$ soit $10 \cdot 3,14 \cdot (0,1 / 2)^2 = 0,0785 \text{ cm}^3$

$V_M = t_0 \cdot D = \varepsilon \cdot V_t$

d'où

$t_0 = \varepsilon \cdot V_t / D = 0,64 \cdot (0,0785 / 0,025) = 2 \text{ min}$

3) $t_R = t_0 (1 + k')$

Pour l'acide tartrique $t_R = 3,5 \text{ min}$

d'où **$k' = 0,75$**

Pour l'acide ascorbique $t_R = 4 \text{ min}$

d'où **$k' = 1$**

Graphiquement on a $\omega \approx 0,35 \text{ min}$ pour les deux acides

Pour l'acide tartrique $N = 16 (t_R / \omega)^2$ soit $N = 16 (3,5 / 0,35)^2$ soit **$N = 1600$**

HEPT = L / N d'où HEPT = $10 / 1600 = 62,5 \mu\text{m}$

Pour l'acide ascorbique $N = 16 (t_R / \omega)^2$ soit $N = 16 (4 / 0,35)^2$ soit **$N = 2090$**

HEPT = L / N d'où HEPT = $10 / 2090 = 48 \mu\text{m}$

4) Une augmentation de la température augmentera k' donc le temps de rétention.

5) La diminution des temps de rétention peut être obtenue par une augmentation du débit ou en diminuant le facteur de capacité (en abaissant la température ou en choisissant une phase mobile moins polaire (acétonitrile ou méthanol en proportion adaptée avec l'eau acidulée).

6) L'acide fumarique constitue un étalon interne.

La concentration non corrigée par cet étalon interne est de :

$$\text{concentration} = \frac{0,4 \cdot S_{\text{dosage}}}{S_{\text{étalon}}} = \frac{0,4 \cdot 1500}{1000} = 0,6 \text{ g.L}^{-1}$$

L'acide fumarique est à la même concentration dans l'étalon et l'échantillon dosé. Or la surface du pic dosage montre qu'une perte est intervenue. La compensation de cette perte donne la concentration réelle du jus de raisin :

$$\text{concentration corrigée} = \frac{0,4 \cdot S_{\text{dosage}}}{S_{\text{étalon}}} \cdot \frac{S_{\text{A fumarique étalon}}}{S_{\text{ac fumarique dosage}}} = \frac{0,4 \cdot 1500}{1000} \cdot \frac{975}{800} = 0,73 \text{ g.L}^{-1}$$

7) Chromatographie d'échange d'ions, par appariement d'ions ou encore CPG après dérivatisation.