

Chromatographie en phase liquide

Théorie et méthodes de séparation

par **Marcel CAUDE**

Ingénieur du Conservatoire National des Arts et Métiers (CNAM)

Docteur ès Sciences

Directeur de Recherche au Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)

et **Alain JARDY**

Ingénieur CNAM

Docteur ès Sciences

Maître de Conférences à l'École Supérieure de Physique et Chimie de Paris

1. Grandeurs fondamentales	PE 1 455 - 2
1.1 Grandeurs de rétention	— 3
1.2 Sélectivité	— 3
1.3 Efficacité d'une colonne	— 4
1.4 Résolution	— 4
1.5 Perte de charge et facteur de résistance à l'écoulement.....	— 4
1.6 Capacité disponible	— 5
2. Cinétique	— 5
2.1 Grandeurs réduites.....	— 5
2.2 Mécanismes de dispersion d'un pic d'élution.....	— 6
2.3 Équation de Knox	— 7
3. Classification et sélection des solvants	— 7
3.1 Propriétés des solvants	— 7
3.2 Sélection des solvants.....	— 10
4. Séparation de solutés moléculaires	— 10
4.1 Chromatographie d'adsorption	— 10
4.2 Chromatographie de partage sur phases stationnaires polaires	— 16
4.3 Chromatographie de partage sur phases apolaires	— 18
5. Séparation de solutés ionisés	— 25
5.1 Chromatographie d'échange d'ions.....	— 26
5.2 Chromatographie de paires d'ions.....	— 30
6. Séparation de solutés donneur ou accepteur de doublets électroniques	— 34
6.1 Chromatographie d'échange de ligands	— 34
6.2 Chromatographie par transfert de charges.....	— 36
7. Choix d'une méthode de séparation	— 38
7.1 Guide de sélection	— 38
7.2 Exemple : analyse des sucres.....	— 41
8. Optimisation	— 41
8.1 Optimisation de la résolution	— 41
8.2 Optimisation multiparamètre	— 44
9. Analyse quantitative	— 45
9.1 Mesure de l'aire d'un pic.....	— 45
9.2 Mesure des coefficients de réponse	— 45
9.3 Détermination des concentrations.....	— 46
9.4 Précautions opératoires et problèmes liés à la chromatographie en phase liquide.....	— 47
9.5 Précision des analyses en CPL	— 48
Pour en savoir plus	Doc. PE 1 458

La chromatographie en phase liquide (CPL) est une méthode de séparation mettant en œuvre différents modes représentés sur la figure 1 (les chromatographies d'exclusion stérique et chirale faisant l'objet d'articles séparés de ce traité).

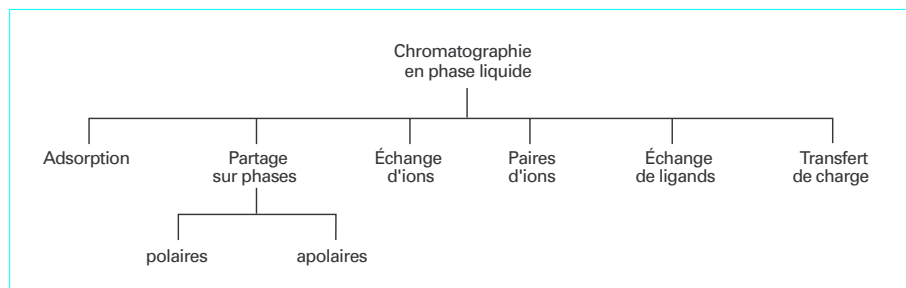


Figure A – Méthodes de séparation en chromatographie en phase liquide

La chromatographie en phase liquide sur colonnes est devenue un outil analytique performant utilisé dans des domaines variés allant de l'analyse de fluides biologiques à celui des produits pétroliers lourds. Ce développement est dû à la fois à une meilleure compréhension des mécanismes d'interaction - au demeurant de plus en plus diversifiés -, aux grandes efficacités obtenues avec des phases stationnaires de plus en plus fines (3 μm) et enfin aux progrès importants effectués dans le domaine de l'appareillage, en particulier pour la détection.

La CPL se présente ainsi comme une méthode de séparation complémentaire de la chromatographie en phase gazeuse (CPG) pour l'analyse de solutés peu volatils ou thermodégradables (cas de la majorité des molécules thérapeutiques). Elle se distingue de la CPG par la variété des phases stationnaires et par tant des interactions mises en jeu et par une température moins élevée, ce qui accroît la force de ces interactions et augmente la sélectivité.

En revanche, la CPL est une méthode de mise en œuvre plus délicate que la CPG ; de plus, malgré les progrès récents, elle souffre encore de l'absence de détecteurs aussi sensibles et universels que la détection à ionisation de flamme de la CPG.

1. Grandeurs fondamentales

Les références bibliographiques sont données dans le fascicule [Doc. P 1 458].

Concernant les chromatographies d'exclusion stérique et chirale, le lecteur se reportera aux articles [111] [112] des Techniques de l'Ingénieur, et à l'article [113] concernant la chromatographie en phase gazeuse.

En chromatographie en phase liquide [1] comme dans toute méthode chromatographique, les séparations sont fondées sur la différence de distribution des espèces entre deux phases non miscibles, l'une stationnaire (silice vierge ou greffée, polymère moléculaire ou échangeur d'ions), l'autre mobile (phase liquide constituée par un solvant pur ou plus souvent par un mélange de solvants). Pour un système chromatographique donné, on caractérise la distri-

bution de chaque soluté entre les deux phases par le coefficient de distribution (ou coefficient de partage) K défini par la relation :

$$K = \frac{C_s}{C_m} \quad (1)$$

C_s et C_m désignant respectivement les concentrations du soluté à l'équilibre dans les phases stationnaire et mobile.

Chaque soluté injecté sur la colonne est soumis à deux effets antagonistes : un effet d'entraînement par la phase mobile dans laquelle il est soluble et un effet de rétention par la phase stationnaire avec laquelle il interagit ; on conçoit que divers constituants d'un mélange présentant des caractéristiques de distribution différentes progresseront dans la colonne à des vitesses différentes, l'effet retardateur exercé par la phase stationnaire étant d'autant plus prononcé qu'ils ont plus d'affinité pour celle-ci.

Si les quantités injectées sont suffisamment faibles, on observe à la sortie du détecteur des pics symétriques, sensiblement gaussiens.

Une bonne séparation en chromatographie en phase liquide implique :

- que les divers constituants du mélange soient retenus dans la colonne, donc présentent une affinité pour la phase stationnaire suffisante pour qu'ils apparaissent dans l'effluent après un volume supérieur au volume de phase mobile contenu dans la colonne ;
- que les différents pics soient bien séparés, ce qui, pour deux pics consécutifs, implique que les bandes de solutés se séparent entre elles (sélectivité) plus vite qu'elles ne s'évalent (efficacité) ;
- que l'analyse soit aussi rapide que possible.

Nous examinerons successivement les différentes grandeurs caractéristiques correspondantes.

1.1 Grandeurs de rétention

On appelle **temps de rétention** t_R le temps d'élution au sommet du pic, mesuré à partir de l'injection (figure 2).

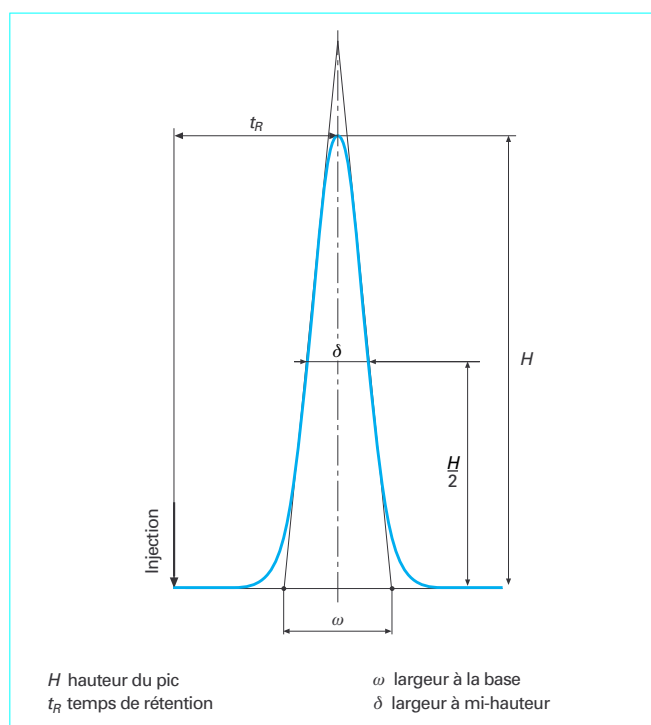


Figure 1 - Caractéristiques d'un pic chromatographique

Si \mathcal{D} est le débit, maintenu constant, de la phase mobile, on définit le **volume de rétention** V_R :

$$V_R = t_R \mathcal{D} = t_R u s \varepsilon \quad (2)$$

- avec
- s section droite de la colonne,
 - u vitesse linéaire de la phase mobile,
 - ε porosité de la colonne ($\approx 0,75$ pour les silices poreuses).

V_R représente, à l'étalement du pic près, le volume de phase mobile nécessaire pour éluer chaque composé. Le temps de rétention ou le volume de rétention sont des grandeurs caractéristiques de chaque composé, dans des conditions et pour une colonne données : ils peuvent servir à l'analyse qualitative en procédant par

identification (en dopant l'échantillon avec le composé que l'on pense avoir identifié : épreuve du mélange).

Les espèces n'ayant aucune affinité pour la phase stationnaire, donc non retenues, apparaissent dans l'effluent après le temps t_0 dit temps de rétention nulle correspondant à l'écoulement du volume de phase mobile V_m contenu dans la colonne ($V_m = V_i + V_p$, V_i volume interstitiel et V_p volume poreux).

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

$$V_R = V_m + K V_s$$

avec V_s volume de la phase stationnaire (ou masse W_s ou surface spécifique du support selon les unités dans lesquelles K est exprimé).

Remarque : cette relation ne s'applique que dans le cas de l'élution linéaire, c'est-à-dire si le coefficient de distribution est indépendant de la concentration du soluté dans la phase mobile.

Afin de s'affranchir des paramètres géométriques de la colonne, on utilise, pour caractériser la rétention d'un composé, le **facteur de capacité** k' , défini comme le rapport de la quantité de soluté dans la phase stationnaire à la quantité de soluté dans la phase mobile ; on a :

$$k' = \frac{C_s V_s}{C_m V_m} = K \frac{V_s}{V_m}$$

soit :

$$k' = \frac{V_R - V_m}{V_m} = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (3)$$

Le temps de rétention est ainsi lié au facteur de capacité par la relation :

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

ou encore, le temps de rétention t_0 d'un composé non retenu étant égal au quotient de la longueur L de la colonne par la vitesse linéaire u de la phase mobile :

$$t_0 = \frac{L}{u} (1 + k')$$

Remarque : en CPL, la mesure de t_0 (ou V_m) ne peut se faire qu'en injectant un composé dont on est sûr qu'il n'est effectivement pas retenu sur la colonne dans les conditions choisies. On injecte à cet effet une petite quantité d'un solvant de force éluante inférieure à celle de la phase mobile.

1.2 Sélectivité

Pour caractériser la distance séparant les sommets de deux pics consécutifs 1 et 2, on utilise la **sélectivité** α (ou rétention relative) définie par la relation :

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{K_2}{K_1} \quad (4)$$

La sélectivité α mesure la différence de distribution thermodynamique des deux composés ; on a :

$$\ln \alpha = \ln \frac{K_2}{K_1} = - \frac{\Delta(\Delta G^0)}{RT}$$

avec $\Delta(\Delta G^0)$ différence des enthalpies libres de distribution des deux composés : $\Delta(\Delta G^0) = \Delta G_2^0 - \Delta G_1^0$,

R constante molaire des gaz (= 8,31 J · mol⁻¹ · K⁻¹),
 T température (K).

Ces différences $\Delta(\Delta G^0)$ dans la distribution des solutés entre les deux phases résultent de l'ensemble des interactions spécifiques ioniques ou moléculaires, auxquelles ils sont soumis de la part de la phase stationnaire et de la phase mobile.

1.3 Efficacité d'une colonne

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.

En assimilant les pics d'élution à des courbes de Gauss, on établit que le nombre de plateaux théoriques d'une colonne s'exprime, pour un soluté donné, par les relations :

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

avec ω largeur du pic à la base, définie comme la distance entre les points d'intersection des tangentes d'inflexion avec la ligne de base,

δ largeur du pic à mi-hauteur.

Ce paramètre, qui rend compte de la cinétique de tous les mécanismes de partage du soluté entre les deux phases, dépend de la nature et de l'intensité de toutes les interactions mises en jeu et, par suite, des conditions expérimentales et de la *nature même du soluté*.

En pratique, on mesure directement t_R et δ (ou ω) sur le chromatogramme (figure 2), préférant en général la mesure de δ à celle de ω pour des raisons de meilleure répétabilité.

Pour pouvoir comparer entre elles des colonnes de différentes longueurs, on définit la *hauteur équivalente à un plateau théorique* (HEPT ou H) :

$$H = \frac{L}{N} \quad (6)$$

avec L longueur de la colonne.

Nota : il existe d'autres méthodes de détermination du nombre de plateaux théoriques contenus dans une colonne [2], y compris dans le cas de pics d'élution dissymétriques [3].

1.4 Résolution

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

$$R_S = 2 \frac{(t_{R_2} - t_{R_1})}{\omega_2 + \omega_1} \quad (7)$$

ω_2 et ω_1 étant les largeurs à la base, déterminées comme précédemment par l'intersection des tangentes aux points d'inflexion des pics avec la ligne de base.

Il découle directement de cette définition que la séparation entre deux pics est d'autant meilleure que R_S est plus grand. Ainsi, pour

deux composés conduisant à des pics de surface voisine, la séparation est pratiquement complète quand $R_S = 1$, puisqu'il n'y a alors que 2 % de recouvrement des deux pics. Pour des valeurs de R_S inférieures à 1, les pics se chevauchent et, pour $R_S < 0,8$, la séparation est généralement insuffisante.

De même, pour une valeur de R_S donnée, la séparation est d'autant plus mauvaise que le rapport des aires des deux pics est plus grand.

En supposant les largeurs des pics à la base égales, donc dans le cas de pics très voisins, on établit que la résolution R_S peut être exprimée par la relation :

$$R_S = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_2}{1 + k'_2} \right) (N_2)^{1/2}$$

(l'indice 2 se rapportant au composé le plus retenu).

Cette expression constitue la relation liant la résolution aux trois paramètres chromatographiques principaux :

- le premier terme (en α) exprime l'influence de la sélectivité,
- le second terme (en k') exprime l'influence du facteur de capacité,
- le dernier terme, N_2 , exprime l'influence de l'efficacité de la colonne.

On pourra améliorer une séparation en jouant sur l'un au moins de ces trois facteurs.

Une autre approximation possible en CPL consiste à supposer le nombre de plateaux identique pour chacun des deux solutés ($N_1 = N_2 = N$). La résolution est alors donnée par la relation :

$$R_S = \frac{1}{2} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha + 1} \right) \left(\frac{\bar{k}'}{1 + \bar{k}'} \right) \sqrt{N}$$

\bar{k}' étant le facteur de capacité moyen :

$$\bar{k}' = \frac{k'_1 + k'_2}{2}$$

On remarquera que, quelle que soit la relation utilisée, les conclusions demeurent inchangées quant aux rôles des paramètres chromatographiques.

1.5 Perte de charge et facteur de résistance à l'écoulement

Une autre caractéristique importante d'une colonne chromatographique est sa résistance à l'écoulement. La perte de charge d'une colonne est donnée par la **loi de Darcy** :

$$\Delta P = \frac{\Phi \eta L u}{(d_p)^2} \quad (8)$$

- avec d_p (cm) diamètre moyen des particules,
- L (cm) longueur de la colonne,
- ΔP (Pa) perte de charge (10^{-6} bar $\approx 10^{-6}$ atm $\approx 10^{-1}$ Pa),
- u (cm · s⁻¹) vitesse linéaire de la phase mobile,
- η (Pa · s) viscosité dynamique de la phase mobile,
- Φ (sans dimension) facteur de résistance à l'écoulement.

En pratique, la valeur de Φ dépend de la forme des particules, de leur répartition granulométrique autour de la valeur moyenne, de la texture de la phase stationnaire et de la qualité du remplissage. Ainsi Φ est voisin de 500 pour des particules poreuses de forme

sphérique, de 1 000 pour des particules poreuses de forme irrégulière.

1.6 Capacité disponible

La capacité disponible C_D d'une phase stationnaire est définie comme la quantité de soluté injectée qui provoque la saturation de la phase stationnaire contenue dans la colonne dans des conditions déterminées. On l'exprime en nombre de millimoles de solutés par gramme de phase stationnaire :

$$C_D = \frac{Q_S}{m} \quad (9)$$

avec Q_S quantité de soluté fixée à l'équilibre (à saturation) par la phase stationnaire,
 m masse de phase stationnaire contenue dans la colonne.

Les variations de la capacité disponible C_D en fonction de la concentration du soluté dans la phase mobile constituent l'isotherme de distribution.

2. Cinétique

2.1 Grandeurs réduites

Dans la théorie des plateaux, la HEPT déduite de la variance σ^2 du pic d'éluion :

$$H = \frac{L}{N} = \frac{L\sigma^2}{l_R^2} \quad (10)$$

n'apparaît que comme une mesure globale de l'influence de tous les paramètres expérimentaux mis en jeu, mais elle ne permet pas de préciser la part revenant à chacun de ceux-ci dans l'étalement du pic au fur et à mesure de sa progression dans la colonne. Or l'étalement dépend :

- du diamètre et de la nature des particules de la phase stationnaire,
- de la nature et de la vitesse de la phase éluante,
- de la nature du soluté,
- de l'homogénéité du remplissage de la colonne.

Afin de préciser la contribution de chaque paramètre à la HEPT globale et de permettre une optimisation aisée des conditions d'une analyse, on utilise la notion de grandeurs réduites, adimensionnelles. Ces dernières permettent alors de comparer entre elles des colonnes remplies avec des particules de phase stationnaire de dimension et de nature différentes et utilisées dans des conditions opératoires variées.

2.1.1 Longueur réduite

On définit la longueur réduite l d'une colonne par le rapport :

$$l = \frac{L}{d_p} \quad (11)$$

Elle représente le nombre de « tranches » de particules (d'épaisseur d_p) contenues dans la colonne. Pour des colonnes ayant même longueur réduite, une molécule de soluté rencontrera en moyenne

le même nombre de particules au cours de sa progression dans la colonne, et l'on montre que cela conduit à une même efficacité si elles sont mises en œuvre avec la même vitesse réduite.

Exemple : pour $l = 20\,000$, une colonne de 10 cm remplie avec des particules de 5 μm a une efficacité analogue à celle d'une colonne de 100 cm remplie avec des particules de 50 μm .

2.1.2 Hauteur de plateau réduite

La hauteur de plateau réduite h est définie par la relation :

$$h = \frac{H}{d_p} = \frac{l}{N} \quad (12)$$

Elle représente le nombre de couches de particules par plateau théorique. h permet de comparer entre elles les efficacités de colonnes remplies avec des particules de taille différente. Une colonne efficace utilisée au voisinage des conditions optimales a une hauteur de plateau réduite comprise entre 2 et 4 environ.

2.1.3 Vitesse réduite de la phase mobile

On définit la vitesse réduite de la phase mobile v par :

$$v = \frac{u d_p}{D_m} = \frac{l d_p^2}{t_0 D_m} \quad (13)$$

où D_m est le coefficient de diffusion moléculaire du soluté dans la phase éluante.

La vitesse réduite est le rapport de la vitesse linéaire de la phase éluante et de la vitesse de diffusion du soluté sur une distance égale au diamètre d'une particule. Les valeurs types que l'on peut prendre pour D_m dans le cas d'un soluté de masse molaire faible (voisine de 100 g) sont les suivantes :

- dans l'hexane : $3 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
- dans l'eau : $10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
- dans le propanol : $3 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

En effet, D_m dépend à la fois de la nature du soluté et de celle de la phase éluante. Il peut être calculé (en $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) à l'aide de l'équation [4] [5] [6] :

$$D_m = \frac{6,9 \cdot 10^{-15} T \sqrt{\psi M_S}}{\eta V^{0,6}}$$

- T température (K),
- ψ facteur d'association du solvant égal à 1 pour les solvants non donneurs de liaisons hydrogène, 1,5 pour l'éthanol, 1,9 pour le méthanol et 2,6 pour l'eau,
- M_S masse molaire du solvant (g),
- V volume molaire du soluté à température ambiante ($\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$),
- η viscosité du solvant ($\text{Pa} \cdot \text{s}$).

L'équation précédente peut également être utilisée, en première approximation, dans le cas d'un mélange de solvants A et B en prenant pour ψM_S la moyenne pondérée des valeurs pour les solvants purs :

$$(\psi M_S)_{A+B} = x_A(\psi M_S)_A + x_B(\psi M_S)_B$$

x_A et x_B désignant les fractions volumiques de A et B dans le mélange et η étant la valeur calculée au moyen de la relation :

$$\eta = (\eta_A)^{y_A} \cdot (\eta_B)^{y_B}$$

y_A et y_B désignant les fractions molaires de A et B dans le mélange.

2.2 Mécanismes de dispersion d'un pic d'élution

Pour obtenir le nombre maximal de plateaux théoriques N dans une colonne, il faut définir les conditions où la hauteur de plateau réduite h est minimale ($N = l/h$). On est ainsi conduit à étudier les différents mécanismes d'élargissement d'une bande de soluté au cours de sa progression au sein d'une colonne chromatographique et à préciser l'influence de chacun de ceux-ci sur la valeur de h .

On peut considérer, dans le cas du développement par élution linéaire, que l'étalement d'une bande de soluté a trois origines :

- la dispersion des molécules par diffusion longitudinale ;
- l'existence de « chemins multiples » dus au remplissage (anisotropie d'écoulement) ;
- la résistance au transfert de masse dans chacune des deux phases ;

Si on calcule la variance correspondant à chacun de ces facteurs, la variance totale étant égale à la somme des variances dans le cas de processus indépendants, la HEPT globale apparaîtra comme la somme de plusieurs termes, chacun de ceux-ci représentant la contribution d'un facteur déterminé :

$$H = \sum_i H_i = H_{\text{diff. long.}} + H_{\text{flux}} + H_{\text{transfert de masse}}$$

et par suite, pour la hauteur de plateau réduite :

$$h = \sum_i h_i = h_{\text{diff. long.}} + h_{\text{flux}} + h_{\text{transfert de masse}}$$

À la suite des travaux de Giddings [7] sur la théorie dynamique de la chromatographie, différents modèles ont été élaborés sur ce principe. Parmi ces derniers, le modèle de Knox [8] présente l'avantage d'être simple – même si des corrections lui ont été apportées – et de permettre de s'affranchir de la dimension des particules ; il permet une optimisation aisée des conditions d'une analyse et il est en bon accord avec un grand nombre de résultats expérimentaux. C'est celui que nous utiliserons ici. À l'aide de ce modèle, on peut expliciter chacun des termes des équations précédentes représentant la contribution d'un facteur d'élargissement du pic.

2.2.1 Diffusion moléculaire longitudinale

Ce terme, de la forme $h_{\text{diff. long.}} = B/v$ traduit l'influence de la dispersion des molécules du soluté par diffusion longitudinale, c'est-à-dire dans une direction parallèle à l'axe de la colonne. Dans toute bande de soluté, il apparaît un gradient de concentration, parallèle à l'axe de la colonne, lors de sa migration. Il en résulte une diffusion du soluté des régions de fortes concentrations vers celles de faibles concentrations ; cette diffusion intervient aussi bien dans la phase mobile circulant dans et autour des particules de la phase stationnaire que dans la phase liquide stationnaire tapissant les pores. La contribution de ce phénomène à l'élargissement de la bande de soluté fait intervenir :

- D_m le coefficient de diffusion du soluté dans la phase éluante,
- D_s le coefficient de diffusion du soluté dans la phase liquide stationnaire dont la composition est différente de celle de la phase mobile.

de même que le temps passé par le soluté dans chacune de ces phases, lui-même inversement proportionnel à la vitesse linéaire u de la phase éluante.

La valeur B est très souvent prise égale à 2 bien qu'il ait été montré qu'elle dépende faiblement de la rétention du soluté et de la nature de la phase stationnaire [9] [10].

2.2.2 Résistance au transfert de masse

Du fait du mouvement relatif des deux phases, l'équilibre de répartition du soluté entre les deux phases n'est pas atteint et il apparaît deux profils de concentration du soluté dont le déphasage s'accroît avec la vitesse réduite v , d'où un élargissement progressif du pic. Ce déphasage résulte de la limitation de la cinétique du processus d'adsorption-désorption, ou transfert de masse, par la diffusion du soluté, principalement dans la phase stationnaire (phase mobile intraparticulaire et phase liquide stationnaire contenue dans les pores). La figure 3d et e schématise l'étalement de la bande de soluté dû à ces deux phénomènes. Celui-ci dépend du chemin parcouru dans la phase éluante pendant le temps de séjour moyen \bar{t} d'une molécule de soluté dans la phase stationnaire. Pendant ce temps, les molécules de soluté entraînées par l'éluant ont parcouru une distance proportionnelle à sa vitesse linéaire. Le terme $h_{\text{transfert de masse}}$ est proportionnel à cette distance et, par suite, à la vitesse réduite v :

$$h_{\text{transfert de masse}} = Cv$$

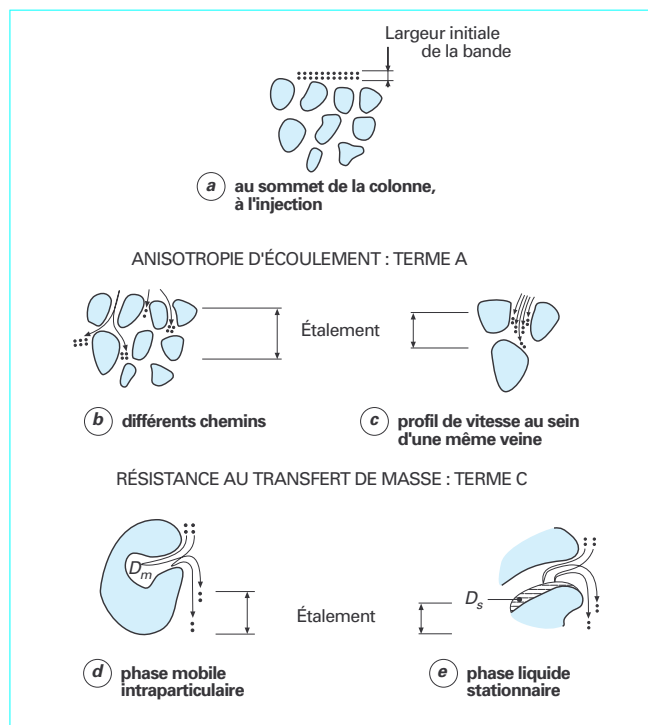


Figure 2 – Différents facteurs d'étalement des pics d'élution

Le coefficient C est souvent compris entre 0,01 et 0,2 mais peut prendre des valeurs plus élevées dans le cas des phases stationnaires polymères [11] ou encore de solutés très volumineux tels que les protéines lorsque les dimensions des pores ne sont pas nettement supérieures à celles des molécules de solutés [12].

Comme dans le cas de B , la valeur de C varie avec la rétention du soluté et la nature de la phase stationnaire [9] [10].

2.2.3 Anisotropie d'écoulement

Il existe, pour la phase mobile, plusieurs chemins possibles à travers le lit de particules de la phase stationnaire et un profil de vitesse au sein de chaque veine liquide (figure 3c). La vitesse moyenne au sein de chaque veine liquide varie et ce d'autant plus que les chemins sont plus différents (figure 3b). Alors que le temps de rétention est régi par la vitesse moyenne u , ces différences entraînent un certain étalement du profil de concentration du soluté, c'est-à-dire un étalement du pic. Cependant, ce phénomène se trouve atténué par le fait que les molécules de soluté ne sont pas prisonnières d'une veine liquide, mais au contraire peuvent changer de veine par diffusion transversale. Cela contribue à une relaxation du profil des vitesses et limite la dispersion du soluté d'autant mieux que le remplissage de la colonne est plus homogène. Cette dernière condition implique une méthode de remplissage efficace et une distribution étroite du diamètre des particules de la phase stationnaire.

Le calcul de la contribution du spectre de vitesses résultant de ce couplage à la hauteur de plateau réduite est difficile car, pour deux facteurs non indépendants, les variances ne sont plus additives [7].

Néanmoins, Knox [8] a montré que l'on pouvait prendre avec une bonne approximation :

$$h_{\text{flux}} \approx Av^{1/3}$$

La valeur de la constante A dépend beaucoup de la régularité du remplissage et de l'uniformité de la répartition granulométrique de la phase stationnaire utilisée. Pour une colonne bien remplie avec des particules homogènes, A est compris entre 0,5 et 1. En pratique, des valeurs plus élevées, par exemple supérieures à 3, sont l'indice d'un mauvais remplissage de la colonne ou d'une répartition granulométrique trop large des particules du support.

2.3 Équation de Knox

Finalement la hauteur de plateau varie avec la vitesse réduite selon l'équation :

$$h = Av^{1/3} + \frac{B}{v} + Cv \quad (14)$$

La variation de h en fonction de v , avec les valeurs moyennes $A = 1$, $B = 2$ et $C = 0,1$, est représentée en coordonnées logarithmiques et linéaires sur la figure 4. Aux faibles valeurs de v , le terme B/v prédomine (la courbe devient asymptotique à une droite de pente -1) et explique la perte d'efficacité vers les très faibles vitesses. Aux grandes vitesses réduites, le terme Cv prédomine (la courbe devient asymptotique à une droite de pente 1) et explique la perte d'efficacité aux très grandes vitesses. Dans la région intermédiaire, le terme $Av^{1/3}$ est prépondérant et h passe par un minimum $h_{\text{min}} = 2,4$, pour une vitesse réduite optimale égale à 2,7.

La valeur de h varie peu autour du minimum ; cependant, seules les valeurs de vitesse réduite supérieures à 2,7 présentent un intérêt pratique. En effet, le choix de valeurs inférieures entraîne à la fois une diminution de l'efficacité, une augmentation de la quantité minimale détectable et de la durée de la séparation. Il convient donc de considérer cette partie de la courbe $h = f(v)$ comme une zone sans intérêt. En revanche, l'augmentation de la vitesse réduite de $v_{\text{opt}} = 2,7$ à $v = 10$, par exemple, permet de diviser par quatre environ la durée d'une analyse avec une perte acceptable en efficacité et, encore plus, en résolution (h passant de 2,4 à 3,35, le nombre de plateaux théoriques contenus dans la colonne diminue de 39,6 % et la résolution de 18 %).

Le comportement chromatographique d'une colonne peut être testé à partir d'une simple détermination de la hauteur de plateau réduite pour 2 vitesses réduites différentes de la phase mobile :

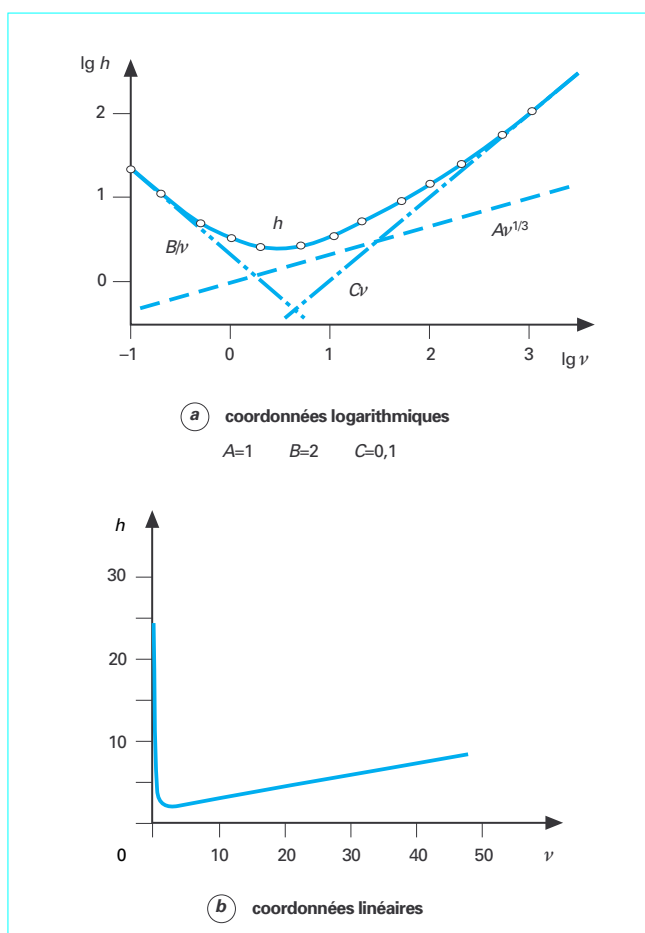


Figure 3 - Variation de la hauteur de plateau réduite h en fonction de la vitesse réduite v

l'une au voisinage de $v = 3$ (généralement proche de l'optimum), l'autre pour $v = 10$ ou 20.

3. Classification et sélection des solvants

3.1 Propriétés des solvants

La réussite d'une séparation dépend de l'adéquation soluté-phase stationnaire-phase mobile.

En principe, de très nombreux solvants (généralement en mélanges) peuvent être utilisés, mais de nombreuses limitations existent.

3.1.1 Interactions soluté-solvant

On distingue trois groupes d'interactions. Le premier comprend les forces intermoléculaires de dispersion (dipôle instantané - dipôle

instantané), d'induction (dipôle permanent - dipôle induit) et d'orientation (dipôle permanent - dipôle permanent) qui sont plus ou moins spécifiques. Au deuxième groupe appartiennent les forces de liaison hydrogène et de transfert de charge qui sont spécifiques du couple soluté-solvant. Enfin, le dernier groupe renferme les interactions électrostatiques entre les espèces ionisées en solution. Les énergies de ces différentes interactions sont rassemblées dans le tableau 1.

Nature de l'interaction	Énergie (kJ · mol ⁻¹)
Dipôle instantané - dipôle instantané	5 à 20
Dipôle permanent - dipôle induit	8 à 25
Dipôle permanent - dipôle permanent	25 à 40
Liaison hydrogène	25 à 40
Ionique	250 à 1 050

3.1.2 Force éluante, polarité et paramètre de solubilité des solvants

En chromatographie, le terme polarité d'un solvant est la résultante des différentes interactions que nous venons d'évoquer. Cette polarité s'exprime soit par la force éluante du solvant ϵ_0 , soit par sa polarité selon Rohrschneider, désignée par le symbole P' , soit enfin par son paramètre de solubilité de Hildebrand δ .

3.1.2.1 Force éluante d'un solvant ϵ_0

Elle est définie dans le cadre de la chromatographie d'adsorption. C'est l'énergie libre d'adsorption des molécules de solvant par unité de surface de solvant adsorbé dans les conditions d'activité standard et s'exprime par le rapport :

$$\epsilon_0 = \frac{\Delta G_M^0}{2,3RTA_M} \quad (15)$$

avec A_M surface occupée sur l'adsorbant par une molécule de solvant,
 R constante molaire des gaz,
 T température (K),
 ΔG_M^0 énergie d'adsorption des molécules de la phase mobile.

ϵ_0 est une énergie réduite, nombre sans dimension, divisée par une aire.

Le tableau 2 rassemble les valeurs de ϵ_0 mesurées sur alumine et sur silice pour différents solvants utilisés en CPL (colonnes n° 6 et 7).

3.1.2.2 Polarité d'un solvant

La polarité d'un solvant peut être définie de plusieurs façons ; nous avons choisi ici de développer la polarité P' calculée par Snyder [13] à partir de mesures expérimentales des coefficients de distribution de solutés tests effectuées par Rohrschneider [14] en chromatographie en phase gazeuse. Le tableau 2 rassemble les valeurs de P' (colonne n° 1) pour des solvants variés. Une caractérisation plus fine consiste à chiffrer leur aptitude à former des liaisons hydrogène (leur pouvoir accepteur ou donneur de protons est mesuré respectivement par x_e et x_d , colonnes n° 2 et 3) ou à donner

des interactions dipôle-dipôle (mesurée par x_n , colonne 4). Le caractère accepteur de protons x_e a été mesuré en prenant l'éthanol comme solvant test, le caractère donneur de protons x_d avec le dioxanne et les interactions dipôle-dipôle avec le nitrométhane.

Pour chaque solvant, on a :

$$x_e + x_d + x_n = 1$$

x_e représente la part des interactions par liaison hydrogène dans la polarité globale P' , le solvant agissant par son caractère accepteur de protons. On a : $p'_e = P' x_e$ et de même pour x_d et x_n . On peut ainsi scinder la polarité globale en polarités partielles associées à des interactions spécifiques. Par exemple, le chloroforme a une polarité globale P' de 4,1 que l'on peut scinder ainsi :

$p'_e = 4,1 \times 0,25 = 1,025$ (polarité correspondant au caractère accepteur de protons)

$p'_d = 4,1 \times 0,41 = 1,681$ (polarité correspondant au caractère donneur de protons)

$p'_n = 4,1 \times 0,33 = 1,353$ (polarité correspondant aux interactions dipôle-dipôle).

Pour une polarité globale P' donnée, on pourra choisir des solvants ayant des interactions spécifiques d'intensité différente, ce qui permettra, comme nous le verrons, de gouverner la sélectivité d'une séparation.

3.1.2.3 Paramètre de solubilité de Hildebrand

La polarité d'un solvant peut être mesurée par la valeur de son paramètre de solubilité introduit par Hildebrand et Scott [15] lors de l'étude thermodynamique des solutions régulières apolaires ou peu polaires.

Le paramètre de solubilité δ d'un solvant S (tableau 2, colonne n° 8) est défini par la relation :

$$\delta = \sqrt{\frac{E_S^v}{V_S}}$$

V_S étant le volume molaire du solvant S et E_S^v l'énergie moléculaire de cohésion représentative de toutes les interactions. C'est l'énergie nécessaire pour transformer une mole de solvant de l'état liquide à l'état gazeux idéal dans les conditions normales. Cette énergie peut être calculée à partir de l'enthalpie molaire Δh de vaporisation ; en supposant la vapeur idéale, il vient :

$$\delta = \sqrt{\frac{\Delta h - RT}{V_S}} \quad (16)$$

Δh peut être mesuré à partir des variations de la pression de vapeur saturante du solvant avec la température (relation de Clausius-Clapeyron), à partir de sa température d'ébullition (selon une équation empirique proposée par Hildebrand) ou à partir de sa pression interne. Ce paramètre de solubilité à un seul terme ou paramètre de solubilité total a été développé initialement par Hildebrand et Scott [15] pour des solvants où prédominent les interactions de dispersion, c'est-à-dire des solvants apolaires ou peu polaires ; puis il a été étendu aux solvants polaires.

Les paramètres de solubilité sont moins utilisés en chromatographie que les polarités globales et partielles proposées par Rohrschneider et développées par Snyder. Cela peut s'expliquer par le fait que les paramètres de solubilité sont issus de mesures enthalpiques, ce qui soulève un doute quant à leur validité lors d'applications chromatographiques. Pourtant, il existe une bonne corrélation [16] entre le paramètre de solubilité de Hildebrand δ , l'énergie d'adsorption ϵ_0 et la polarité P' selon Rohrschneider.

Tableau 2 – Propriétés des principaux solvants utilisés en chromatographie en phase liquide

	Solvant	Longueur d'onde minimale (nm)	Indice de réfraction à 25° C	Température d'ébullition (°C)	Viscosité à 25° C (cP)	Solubilité dans l'eau (% m/m)	Constante diélectrique à 20° C	n° 1	n° 2	n° 3	n° 4	n° 5	n° 6	n° 7	n° 8
								Polarité du solvant P'	Pouvoir accepteur de protons X _e	Pouvoir donneur de protons X _d	Interactions dipôle-dipôle X _n	Groupe de sélectivité	ε ₀ sur alumine	ε ₀ sur silice	δ (cal ^{1/2} ·cm ^{-3/2}) (2)
1	FC-78 (1)	210	1,267	50	0,4		1,88	< -2					-0,25		
	FC-75	210	1,276	102	0,8		1,86	< -2					-0,25		
	FC-43	210	1,291	174	2,6		1,9	< -2					-0,25		
2	Isooctane	197	1,389	99	0,47	0,011	1,94	0,1					0,01	0,02	
3	n-Heptane	195	1,385	98	0,40	0,010	1,92	0,2					0,01	0	7,4
4	n-Hexane	190	1,372	69	0,30	0,010	1,88	0,1					0,01	0	7,3
5	n-Pentane	195	1,355	36	0,22	0,010	1,84	0,0					0,00	0	7,0
6	Cyclohexane	200	1,423	81	0,90	0,012	2,02	-0,2					0,04		8,2
7	Cyclopentane	200	1,404	49	0,42	0,014	1,97	-0,2					0,05		
8	1-Chlorobutane	220	1,404	78	0,42		7,4	1,0				VI	0,26		
9	Tétrachlorure de carbone....	265	1,457	77	0,90	0,008	2,24	1,6					0,18	0,11	8,6
10	Éther n-butylque	220	1,397	142	0,64	0,19	2,8	2,1	0,44	0,18	0,38	I	0,25		
11	Triéthylamine		1,398	89	0,36		2,4	1,9	0,56	0,12	0,32	I	0,54		
12	Bromoéthane		1,421	38	0,38		9,4	2,0				VI	0,35		9,6
13	Éther isopropylique	220	1,365	68	0,38	0,62	3,9	2,4	0,48	0,14	0,38	I	0,28	0,32	
14	Méthyltertiobutyléther	215	1,369	55	0,27							I		0,47	
15	n-Octanol	205	1,427	195	7,3	3,9	10,3	3,4	0,56	0,18	0,25	II	0,5		10,3
16	Fluorobenzène		1,460	85	0,55		5,4	3,1	0,24	0,32	0,45	VII			
17	Chlorure de méthylène	233	1,421	40	0,41	0,17	8,9	3,1	0,29	0,18	0,53	V	0,42		9,7
18	2-Pentanol		1,405	130	3,5	9,2	14,7	3,7	0,56	0,19	0,26	II	0,61		
19	1,2-Dichloroéthane	228	1,442	83	0,78	0,16	10,4	3,5	0,30	0,21	0,49	V	0,44		9,8
20	tert-Butanol		1,385	82	3,6	miscible	12,5	4,1	0,56	0,20	0,24	II	0,7	0,51	
21	n-Butanol	210	1,397	118	2,6	20,1	17,5	3,9	0,59	0,19	0,25	II	0,7		11,4
22	n-Propanol	240	1,385	97	1,9	miscible	20,3	4,0	0,54	0,19	0,27	II	0,82		11,9
23	Tétrahydrofurane	212	1,405	66	0,46	miscible	7,6	4,0	0,38	0,20	0,42	III	0,57	0,53	9,1
24	Propylamine		1,385	48	0,35	miscible	5,3	4,2				I			
25	Acétate d'éthyle	256	1,370	77	0,43	9,8	6,0	4,4	0,34	0,23	0,43	VI	0,58	0,48	9,1
26	2-Propanol	205	1,384	82	1,9	miscible	20,3	3,9	0,55	0,19	0,27	II	0,82	0,60	11,5
27	Chloroforme	245	1,443	61	0,53	0,072	4,8	4,1	0,25	0,41	0,33	VIII	0,40	0,26	9,3
28	Méthyléthylcétone	329	1,376	80	0,38	23,4	18,5	4,7	0,35	0,22	0,43	VI	0,51		9,3
29	Dioxanne	215	1,420	101	1,2	miscible	2,2	4,8	0,36	0,24	0,40	VI	0,56		10,0
30	Méthoxyéthanol	210	1,400	125	1,60	miscible	16,9	5,5	0,38	0,24	0,38	III			
31	Carbonate de propylène.....		1,421	240				6,1	0,31	0,27	0,42	VI			13,3
32	Éthanol	210	1,359	78	1,08	miscible	24,6	4,3	0,52	0,19	0,29	II	0,88		12,7
33	Acide acétique		1,370	118	1,1	miscible	6,2	6,0	0,39	0,31	0,30	IV			10,1
34	Acétonitrile	190	1,341	82	0,34	miscible	37,5	5,8	0,31	0,27	0,42	VI	0,65	0,52	11,9
35	Diméthylsulfoxyde	268	1,477	189	2,00	miscible	4,7	7,2	0,39	0,23	0,39	III	0,75		12,0
36	Méthanol	205	1,326	65	0,54	miscible	32,7	5,1	0,48	0,22	0,31	II	0,95	0,70	14,5
37	Eau		1,333	100	0,89		78,5	10,2	0,37	0,37	0,25	VIII	>> 0,95	>> 0,70	23,4

(1) FC = alcane fluoré.

(2) Unité la plus couramment utilisée, parfois appelée le « Hildebrand » [1 cal^{1/2}·cm^{-3/2} = (4,18)²·(MPa)^{1/2}].

Remarques : on considère, en première approximation, que le facteur de capacité d'un soluté varie d'un facteur 10 lorsque la polarité globale P' varie de deux unités ; c'est dire l'intérêt d'une variation continue de P' accessible seulement par la mise en œuvre de mélanges de solvants.

Les paramètres P' et δ d'un mélange binaire se calculent par la règle des mélanges. En revanche, l'évaluation est plus délicate pour ϵ_0 , dans la mesure où le solvant « fort » se concentre à la surface de l'adsorbant. Il existe cependant des relations permettant un calcul approché [1].

3.2 Sélection des solvants

Le tableau 2 rassemble les propriétés des solvants les plus fréquemment utilisés en CPL (au nombre de 37 ici). Pourtant, en pratique, la plupart des séparations effectuées en chromatographie d'adsorption et de partage sont réalisées avec une dizaine de solvants.

De grandes variations de la sélectivité sont généralement observées lorsque l'on modifie la nature et l'intensité des interactions soluté-solvant. Par exemple, le remplacement dans une phase éluante du méthanol (solvant polaire) par l'éthanol n'entraîne pas de modification notable de la sélectivité car ces deux solvants sont essentiellement accepteurs de protons, alors que l'addition de chlorure de méthylène (fortes interactions dipôle-dipôle) ou de chloroforme (donneur de protons) provoque d'importantes modifications de la sélectivité. On conçoit ainsi tout l'intérêt de classer les solvants en huit groupes selon leurs aptitudes à donner des types différents d'interactions (tableau 2 colonne n° 5). Les solvants les plus couramment utilisés en chromatographie d'adsorption et de partage normal appartiennent aux groupes I, V et VIII ; en chromatographie de partage à polarité de phases inversée, on choisira les solvants des groupes II, III et VI (figure 5a).

Les facteurs de capacité sont ajustés en choisissant, dans le premier cas, un solvant de base de type alcane ou cycloalcane n'entraînant aucune sélectivité particulière et, dans le second cas, l'eau qui n'a aucune affinité pour les chaînes alkyle des silices greffées. On peut ensuite, pour une polarité globale fixée, faire varier la sélectivité en sélectionnant un solvant (ou des solvants) appartenant à un (ou aux trois) groupe(s) de sélectivité (figure 5b).

4. Séparation de solutés moléculaires

4.1 Chromatographie d'adsorption

La chromatographie d'adsorption encore appelée chromatographie liquide-solide (CLS) utilise comme phases stationnaires des gels de silice et d'alumine.

Elle s'applique bien à la **séparation de composés présentant des groupements fonctionnels polaires différents** (cas de nombreuses molécules thérapeutiques) et des **isomères de position**.

4.1.1 Phases stationnaires

Nous ne décrivons ici que les gels de silice qui sont les phases stationnaires les plus utilisées en CLS.

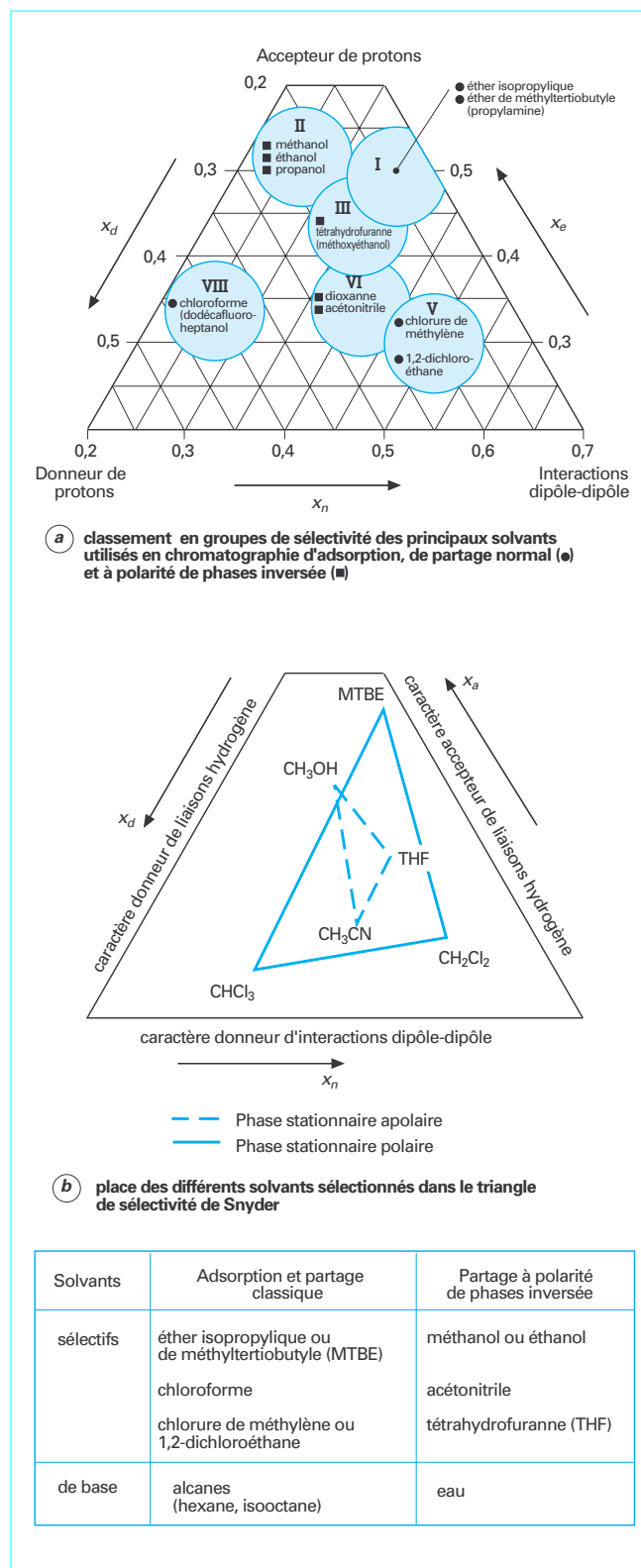
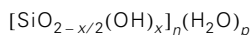


Figure 4 - Sélection des solvants

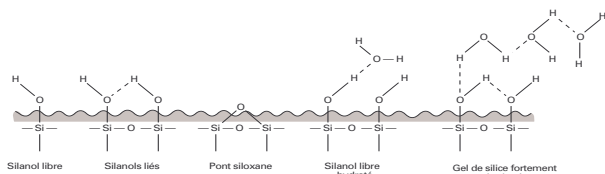
Un gel de silice peut être représenté schématiquement par :



Ce sont les groupements OH ou groupements silanol, présents à raison de 4,6 par nm², qui confèrent à la silice ses propriétés adsorbantes.

D'un point de vue chromatographique, trois types de sites participent, à des degrés divers, au mécanisme de rétention : les groupements silanol libres ≡ SiOH, les groupements silanol liés par liaison hydrogène et les silanols libres recouverts par une molécule d'eau (celle-ci est toujours présente dans les solvants constituant la phase mobile en équilibre avec la silice). Il existe également des groupements siloxane ≡ Si-O-Si ≡.

Un schéma simplifié de la surface d'un gel de silice est donné ci-après :



(les traits pleins représentent des liaisons covalentes, les lignes en tireté les liaisons hydrogène).

Les molécules d'eau se lient fortement aux groupements silanol et, entre elles, par liaison hydrogène, on peut avoir recouvrement complet des silanols libres et liés par une couche mono ou plurimoléculaire. Il ne s'agit plus, alors, d'adsorption et de tels gels de silice fortement hydratés procèdent selon les phénomènes du partage.

Les gels de silice ont une structure très poreuse qui leur confère des surfaces spécifiques très élevées, souvent comprises entre 200 et 600 m² · g⁻¹.

Nota : l'appellation surface spécifique correspond ici à la surface massique mais a été conservée compte tenu de son usage très fréquent dans la profession.

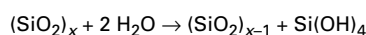
Une augmentation de la surface spécifique entraîne une diminution du diamètre des pores et partant un accroissement du nombre de groupements silanol liés aux dépens des silanols libres (sites d'adsorption qualifiés de « forts ») (tableau 3).

Tableau 3 – Variation du nombre de sites OH libres en fonction de la surface spécifique du support [19]

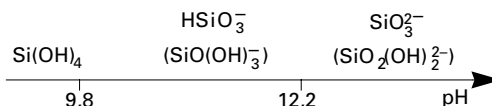
Nature du support	Surface spécifique (m ² · g ⁻¹)	Nombre total de sites OH par nm ²	Nombre de sites libres par nm ² (OH libres)
Lichrosorb Si 100..	309	4,6	2,95
Partisil 5.....	412	4,6	2,80
Lichrosorb Si 60....	482	4,6	2,20

Nota : les gels d'alumine présentent un nombre de groupements actifs par unité de surface plus élevé que la silice et d'énergie distribuée. Ils sont peu utilisés, si ce n'est dans le cas de la séparation des hydrocarbures polycycliques aromatiques.

La dissolution de la silice dans l'eau est une hydrolyse que l'on peut schématiser par :



La solubilité de la silice dépend peu du pH entre 2 et 8, mais elle augmente rapidement en milieu basique. Cela est en relation avec les constantes d'acidité de l'acide silicique Si(OH)₄, diacide faible dont les pK_A sont pK₂ = 9,8, pK₁ = 12,2. Cependant, compte tenu des grands volumes d'éluant percolant sur les colonnes chromatographiques, il est recommandé de ne pas dépasser une valeur de pH égale à 7,5.

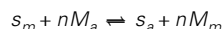


Il existe un très grand nombre de phases stationnaires commercialisées de granulométrie comprise entre 3 et 10 μm, de surfaces spécifiques variables et de forme irrégulière ou sphérique.

4.1.2 Mécanismes

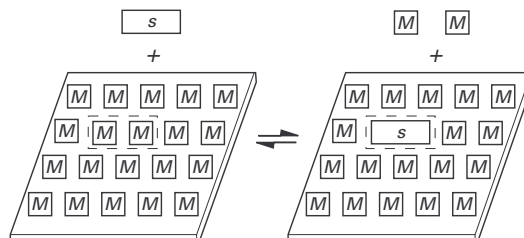
Les énergies d'adsorption varient avec la nature des silanols (selon qu'ils sont libres ou liés) et selon qu'ils sont ou non recouverts par une molécule d'eau. Pour des solvants de polarité moyenne, les énergies d'adsorption des solutés avec les silanols liés et avec les silanols libres recouverts d'une molécule d'eau sont sensiblement identiques mais nettement plus faibles qu'avec les silanols libres (recouverts par des molécules de solvant autre que l'eau). Autrement dit, d'un point de vue énergétique, la silice est un solide hétérogène, ce qui complique beaucoup les modèles théoriques. Une approche simplifiée peut être faite si le taux de recouvrement en eau des silanols libres est maintenu constant : on définit une constante de distribution moyenne du soluté qui prend en compte, selon leurs poids respectifs, l'adsorption et la désorption du soluté sur les deux types de site (silanols liés ou silanols libres recouverts d'une molécule d'eau, silanols libres recouverts d'une molécule de solvant). L'eau (qui est toujours présente dans le ou les solvants constituant la phase mobile) joue, en chromatographie d'adsorption, un rôle privilégié dans la mesure où elle s'adsorbe préférentiellement sur les silanols libres et modifie ainsi la constante de distribution des solutés.

Cette approche est à la base des théories simplifiées de Snyder [17] et de Soczewinski [18]. Si *s* désigne le soluté et *M* la phase mobile adsorbée, on a le processus d'adsorption-désorption schématisé par :

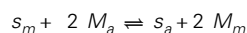


les indices *a* et *m* représentant les phases adsorbée et mobile.

La valeur de *n* dépend, entre autres, de la taille relative des molécules de soluté et de solvant à la surface de l'adsorbant et de la façon dont elles sont adsorbées.



Sur le schéma ci-dessus, une molécule de soluté déplace, en s'adsorbant, deux molécules de phase mobile de la surface du support :



4.1.2.1 Modèle de Snyder-Soczewinski

La rétention résulte de la compétition entre les molécules de soluté et de solvant pour occuper les sites actifs de l'adsorbant.

Le facteur de capacité s'exprime par la relation suivante :

$$\lg k' = \lg V_a + \beta (E_0 - A_s \varepsilon_0) + \lg \frac{W_a}{V_m} \quad (17)$$

qui présente l'intérêt de scinder, de façon claire, le rôle des différents facteurs propres au soluté (E_0, A_s), à la phase éluante ($\beta, \varepsilon_0, V_a$) et à la géométrie de la colonne chromatographique (W_a, V_m).

Ces différents paramètres sont définis comme suit :

E_0 énergie libre réduite (*) d'adsorption des molécules de soluté dans les conditions d'activité standard ($\beta = 1$, voir § 4.1.2.2.2) :

$$E_0 = - \frac{\Delta G_s^0}{2,3RT}$$

ΔG_s^0 étant la variation d'énergie libre d'adsorption d'une mole de soluté (E_0 est une énergie réduite, nombre sans dimension),

A_s surface occupée sur l'adsorbant par une mole de soluté,

β mesure de l'activité de l'adsorbant permettant de prendre en compte le nombre de groupements silanol libres, non recouverts par une molécule d'eau ; c'est un nombre sans dimension compris entre 0 et 1 ($\beta = 0$, silice fortement hydratée, « désactivée », n'exerçant pas de rétention sur les solutés moyennement polaires ; $\beta = 1$, grand nombre de groupements silanol libres, silice fortement activée, teneur en eau de l'adsorbant très faible),

ε_0 énergie libre réduite d'adsorption (voir nota ci-dessous) des molécules de phase mobile par unité de surface de solvant adsorbé dans les conditions d'activité standard ($\beta = 1$) (voir relation (15)),

V_a volume de phase mobile adsorbé par unité de masse,

W_a masse de silice contenue dans la colonne,

V_m volume total de phase mobile contenu dans la colonne.

Nota : les énergies d'adsorption sont mesurées par rapport au pentane pour lequel on a fixé arbitrairement une énergie d'adsorption nulle sur silice. Les alcanes fluorés (FC) moins éluants que le pentane ont, en conséquence, une énergie d'adsorption réduite négative.

4.1.2.2 Influence des différents facteurs

4.1.2.2.1 Surface spécifique

Plus la surface spécifique d'un adsorbant est grande, plus le soluté est retenu. On peut dire, en première approximation, que le volume de phase mobile adsorbé V_a est proportionnel à la surface spécifique du support. Augmenter la surface spécifique d'un support augmente V_a , donc le facteur de capacité k' , toutes choses égales par ailleurs.

Toutefois, une augmentation de la surface spécifique entraînant une diminution du diamètre des pores, il peut en résulter, avec des silices de grandes surfaces spécifiques, un phénomène d'exclusion pour les grosses molécules.

On utilise généralement des surfaces spécifiques comprises entre 200 et 600 m² · g⁻¹. Une faible surface spécifique est préférable pour les solutés ayant une forte énergie d'adsorption et une grande surface spécifique convient mieux pour ceux de faible énergie d'adsorption.

4.1.2.2.2 Activité - Teneur en eau - Solvants isoactifs

L'activité β d'un adsorbant dépend de sa teneur en eau. L'activité standard correspond à $\beta = 1$, ce qui est le cas des supports activés par séchage prolongé à 200 °C sous vide. Dans la pratique, il n'est pas conseillé d'utiliser des phases stationnaires trop activées car des adsorptions irréversibles ou des réactions catalytiques peuvent se produire. Généralement, on désactive les phases stationnaires par addition d'un peu d'eau ou d'un solvant polaire, ce qui a pour effet de diminuer la valeur de β et d'entraîner un nivellement de l'activité des sites du support.

Il a été montré que les groupements silanol libres recouverts par une molécule d'eau se trouvent ramenés dans un état énergétique comparable à celui des groupements silanol liés.

On peut admettre que le phénomène d'adsorption est prépondérant jusqu'à des teneurs en eau de la silice relativement importantes, par exemple voisines de 5 % pour une silice ayant une surface spécifique de 550 m² · g⁻¹ [19].

L'obtention de séparations reproductibles exige la constance de l'activité de l'adsorbant, c'est-à-dire l'obligation d'ajuster la teneur en eau de chaque solvant de façon qu'elle soit en équilibre avec celle de l'adsorbant. Nous appellerons **solvants isoactifs** ou **iso-hydriques** des solvants qui conduisent à un même état d'activation de l'adsorbant. La teneur en eau isoactif d'un solvant est fonction de sa force éluante et de l'activité de l'adsorbant. Plus l'activité de l'adsorbant est grande, plus la teneur en eau des solvants est faible ; par ailleurs la teneur isoactif en eau d'un solvant sera d'autant plus élevée que sa force éluante sera grande. On peut déterminer des séries de solvants isoactifs, soit en traçant avec précision l'isotherme d'adsorption de l'eau entre l'adsorbant et la phase mobile, soit en réalisant une analyse frontale sur une colonne d'adsorbant de grand volume [20] [21] [22].

À titre d'exemple, le tableau 4 rassemble une série de solvants isoactifs déterminée par analyse frontale sur une silice de type Sphérosil de 550 m² · g⁻¹ de surface spécifique.

En utilisant successivement comme phase mobile des solvants isoactifs, on maintient constante l'activité d'un adsorbant quel que soit le solvant utilisé comme phase mobile. On obtient ainsi des résultats reproductibles lorsque l'on effectue plusieurs fois la même séparation entrecoupée de séparations variées.

Enfin, la mise en œuvre de solvants isoactifs rend plus aisée la réalisation de gradients d'élution en diminuant la durée de l'étape de régénération de la colonne chromatographique qui se limite alors au temps nécessaire à la désorption des molécules du solvant de plus grande force éluante. La teneur en eau isoactif de mélanges de solvants est calculée, en première approximation, en appliquant la loi des mélanges.

Tableau 4 – Série de solvants isoactifs

Solvant isoactif	Teneur en eau (% v/v)
Méthanol	5,2
Diméthylformamide	4,7
Isopropanol.....	0,7
Acétonitrile.....	0,22
Dioxanne	0,14
Tétrahydrofurane	0,13
Acétate d'éthyle (1)	0,06
Éther isopropylique.....	0,008
1,2-Dichloroéthane.....	0,007
Cyclohexane	0,000 4

(1) Solvant de référence.

4.1.2.2.3 Force éluante de la phase mobile

■ Solvant pur

L'énergie libre d'adsorption des molécules de phase mobile ϵ_0 , communément appelée force éluante, permet de contrôler la rétention des solutés : plus la force éluante est élevée, plus les facteurs de capacité sont faibles (une variation de 0,05 unité de ϵ_0 entraîne une variation de k' d'un facteur de l'ordre de 2 à 4). Il est donc important de classer les solvants les plus couramment utilisés en chromatographie d'adsorption par ordre croissant de leurs forces éluantes. C'est ce qu'on appelle une **série éluotropique**. Le tableau 2 (colonnes n° 6 et 7) rassemble les forces éluantes déterminées sur alumine et sur silice des solvants courants.

■ Mélanges de solvants

Il est très rare qu'un solvant unique permette d'aboutir à des valeurs des facteurs de capacité convenables et surtout à une résolution optimale (on ne peut observer qu'une variation discontinue des facteurs de capacité et de la résolution lorsqu'on passe d'un solvant à un autre). C'est pourquoi on utilise très souvent des mélanges de solvants.

Étant donné que, dans le cas de l'adsorption d'un mélange de solvants, il y a compétition sur les sites actifs du support (l'adsorption d'une molécule d'un solvant *B* exigeant la désorption d'une molécule de solvant *A* si les molécules des deux solvants *A* et *B* ont des dimensions voisines), le « solvant fort » tendra à se concentrer dans le volume V_a de la phase mobile adsorbée

La figure 6 permet d'évaluer la force éluante de mélanges binaires de solvants sur silice.

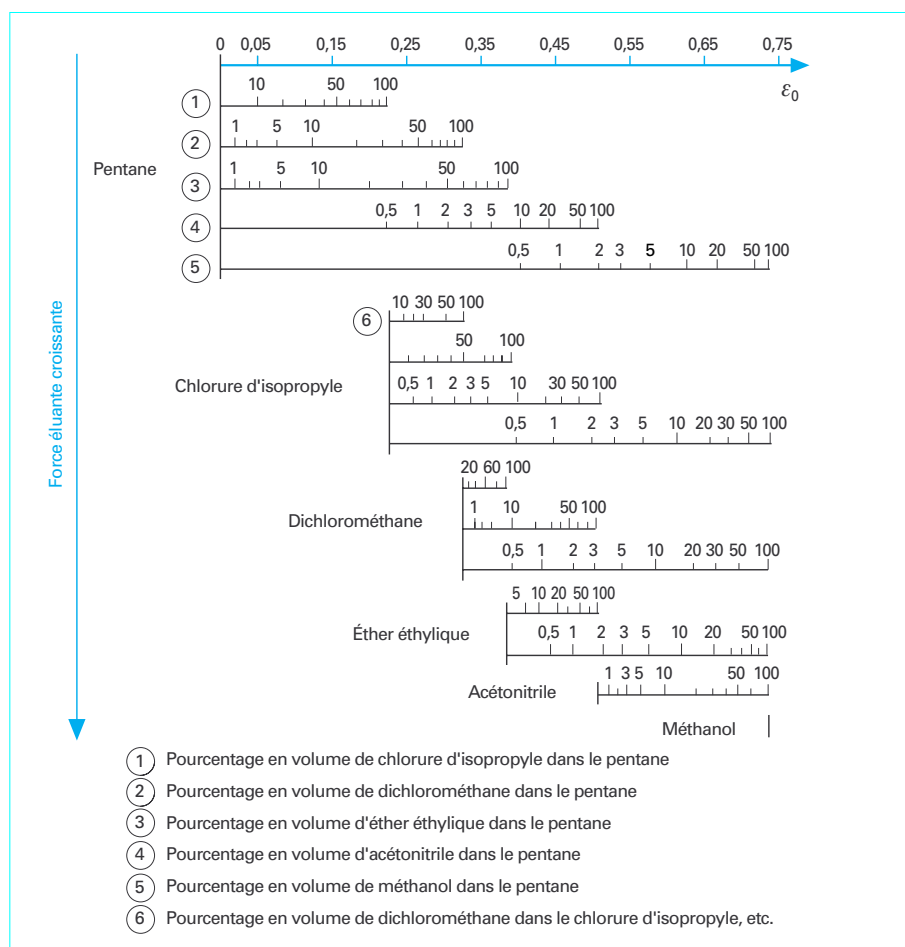


Figure 5 – Force éluante ϵ_0 de différents mélanges de solvants sur silice

■ Effets secondaires du solvant

Si la formule de Snyder régit, de manière à peu près satisfaisante, le phénomène d'adsorption dans les milieux peu polaires, elle s'applique mal dans le cas des solvants de force éluante assez grande, ce qui est fréquent en CLS. Il faut lui adjoindre un terme correctif ΔE_S qui rassemble ce que l'on appelle les « effets secondaires », effets qui sont très variés mais dont les plus impor-

tants sont liés à l'existence d'interactions spécifiques entre le soluté et le solvant, par exemple par liaison hydrogène, conduisant à la formation de composés d'association. La formule de Snyder s'écrit alors :

$$\lg k' = \lg V_a + \beta(E_0 - A_s \epsilon_0) + \lg \frac{W_a}{V_m} + \Delta E_S$$

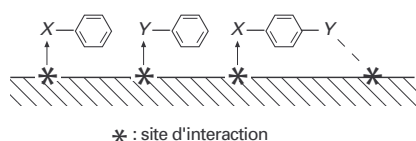
Ces effets peuvent conduire à des gains spectaculaires en sélectivité.

4.1.2.2.4 Énergie d'adsorption du soluté

Un soluté comportant un groupement unique ayant une grande énergie d'adsorption (très supérieure à celle des autres parties de la molécule) conduit à une adsorption localisée : l'interaction ne fait intervenir qu'un seul site de l'adsorbant et l'énergie d'interaction mise en jeu est très voisine de celle de ce seul groupement.

Lorsque plusieurs groupements sont présents dans la molécule, le soluté va interagir avec plusieurs sites simultanément : le groupement d'énergie la plus forte sera en interaction localisée avec un site tandis que tous les autres groupements de la molécule seront en interaction délocalisée. Pour ces derniers, l'énergie mise en jeu est inférieure à ce qu'elle serait si chacun était seul dans la molécule et donc en interaction localisée.

Exemple d'interactions localisées et délocalisées :



X : groupement de forte énergie d'adsorption

Y : groupement d'énergie d'adsorption inférieure à celle de X.

Pour calculer l'énergie d'adsorption d'une molécule, on scinde celle-ci en différents motifs moléculaires et groupements fonctionnels.

L'énergie d'adsorption est calculée par la relation :

$$E^0 = Q_k^0 + (1 - f) \sum_{i \neq k} Q_i^0$$

Le terme Q_k^0 représente l'énergie d'adsorption du groupement k en interaction localisée avec l'adsorbant ; tous les autres groupements de la molécule, sans exception, sont en interaction délocalisée, leur énergie d'adsorption est plus faible et n'intervient que pour la fraction $(1 - f)$ de l'énergie Q_i^0 qu'ils présenteraient s'ils étaient eux-mêmes en interaction localisée. La valeur de f est fonction de l'énergie d'adsorption du groupement k et de la structure de la molécule (nombre de noyaux aromatiques, longueur des chaînes hydrocarbonées, etc.).

Le tableau 5 rassemble les énergies d'adsorption des différents motifs moléculaires et groupements fonctionnels [17].

Tableau 5 – Énergies réduites d'adsorption de différents groupements déterminées sur de l'alumine ou sur de la silice à faible diamètre de pore

Groupement	Q_i^0						Groupement	Q_i^0					
	Alumine			Silice				Alumine			Silice		
	X, Y = ar	X = al, Y = ar	X, Y = al	X, Y = ar	X = al, Y = ar	X, Y = al		X, Y = ar	X = al, Y = ar	X, Y = al	X, Y = ar	X = al, Y = ar	X, Y = al
X - CH ₃	0,06		-0,03	0,11		0,07	X ₂ - N - Y.....		2,48	4,40		2,52	≈ 5,8
X - CH ₂ - Y.....	0,12	0,07	0,02	0,07	0,01	-0,05	X - CHO	3,35		4,73	3,48		4,97
- C = aromatique ou carbone éthylénique	0,31	0,31	0,31	0,25	0,25	0,25	X - NO ₂	2,75		5,40	2,77		5,71
X - F.....	0,11		1,64	-0,15		1,54	X - C ≡ N.....	3,25		5,00	3,33		5,27
X - Cl.....	0,20		1,82	0,20		1,74	X - CO ₂ - Y.....	4,02	3,40	5,00	4,18	3,45	5,27
X - Br.....	0,33		2,00	0,17		1,94	X - CO - Y.....	4,36	3,74	5,00	4,56	4,69	5,27
X - I.....	0,51		2,00	-0,15		1,94	X - OH.....	7,40		6,50	4,20		5,60
Y - SH.....	8,70		2,80	0,67		1,70	X - CH = N - Y....	4,14	4,46	6,00			
X - S - S - Y.....		≈ 1,1	2,70		0,94	1,90	X - NH ₂	4,41		6,24	5,10		8,00
X - S - Y.....	0,76	1,32	2,65	0,48	1,29	2,94	X - SO - Y.....		4,0	6,70		4,2	7,2
X - O - Y.....	1,04	1,77	3,50	0,87	1,83	3,61	X - COOH.....	19		21	6,1		7,6
							X - CONH ₂	6,2		8,9	6,6		9,6

ar = radical aromatique al = radical aliphatique

L'énergie d'adsorption d'un groupement varie selon qu'il est substituant dans un composé aromatique ou aliphatique : elle est toujours plus faible dans le premier cas. Cela s'explique par le fait que la perte d'énergie d'adsorption due à la délocalisation du cycle benzénique a déjà été prise en compte dans la valeur de Q_i^0 . Il en

résulte que, pour les dérivés monosubstitués benzéniques, l'énergie d'adsorption est donnée par la relation :

$$E^0 = Q_k^0 + \sum_{i \neq k} Q_i^0$$

Pour tous les autres types de molécules, il faut faire intervenir un facteur correctif f afin de tenir compte de la délocalisation de l'adsorption des groupements i .

Les valeurs de f sont données dans les tables que l'on trouvera dans [1] [17].

Pour des molécules aromatiques polyfonctionnelles, lorsque, l'énergie d'adsorption du groupement k devient importante ($Q_k^0 > 4$), f tend vers la valeur constante 0,45. Par contre, si le groupement k a une énergie d'adsorption faible ($Q_k^0 < 1$), il n'y a aucun groupement dont l'adsorption est prépondérante et le terme correctif devient négligeable $f \rightarrow 0$.

4.1.2.2.5 Surface moléculaire du soluté

L'équation (17) montre que si l'on diminue la force éluante ϵ_0 d'une phase mobile, le facteur de capacité de molécules de grande surface (c'est-à-dire celles qui ont des valeurs de A_s élevées) augmente plus rapidement que celui des molécules plus petites.

Il en résulte qu'une variation de la force éluante de la phase mobile entraîne une variation de la sélectivité pour les molécules qui ont des surfaces très différentes.

4.1.3 Choix de la phase mobile

Pour couvrir une large gamme de force éluante et s'affranchir des problèmes d'immiscibilité des solvants, on met souvent en œuvre, comme phase mobile, des mélanges ternaires : solvant polaire - solvant de polarité moyenne - solvant apolaire.

À titre d'exemple, la figure 7 montre la préparation de mélanges ternaires contenant 50 % (v/v) du solvant de polarité moyenne.

Ces mélanges sont préparés avec des solutés purs isoactifs (cf. tableau 4). On remarquera que la fabrication de mélanges de solvants isoactifs est simple. En effet, supposons que le méthanol soit le solvant polaire choisi et que sa proportion dans le mélange ternaire final soit supérieure à 5 % (mélange primaire $B > 10\%$), il suffira alors, compte tenu des teneurs en eau habituelles des solvants commercialisés, d'ajuster uniquement celle du mélange primaire B par simple ajout d'eau. La teneur en eau du mélange primaire de solvants A est, en effet, négligeable devant celle du mélange ternaire (il conviendra, à cet égard, de conserver, sur tamis moléculaire 8 Å, les solvants A du mélange primaire).

Afin de supprimer les traînées de pics qui peuvent apparaître sur les chromatogrammes, on ajoute, en faibles quantités (quelques %), un acide tel l'acide acétique ou une base telle la triéthylamine dans la phase éluante. Ces composés agissent de deux manières, d'une part, en « neutralisant » les sites les plus actifs du support, d'autre part, en provoquant un recul d'ionisation des solutés respectivement acides ou basiques.

4.1.4 Exemple de choix raisonné de la composition de la phase mobile

L'optimisation de la composition de la phase mobile exploite les relations linéaires existant entre le temps de rétention des solutés (ou leur facteur de capacité) et l'inverse de la fraction molaire en eau des mélanges de solvants isoactifs $1/N_{H_2O}^{iso}$. La méthode la plus rigoureuse consiste à calculer la résolution entre tous les couples de solutés contenus dans le mélange à l'aide de la relation :

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{2} \cdot \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{t_{R_2} + t_{R_1}}$$

Cela conduit à rechercher la composition de la phase mobile pour laquelle l'écart relatif des temps de rétention sera le plus grand pour le couple de pics le plus difficile à séparer.

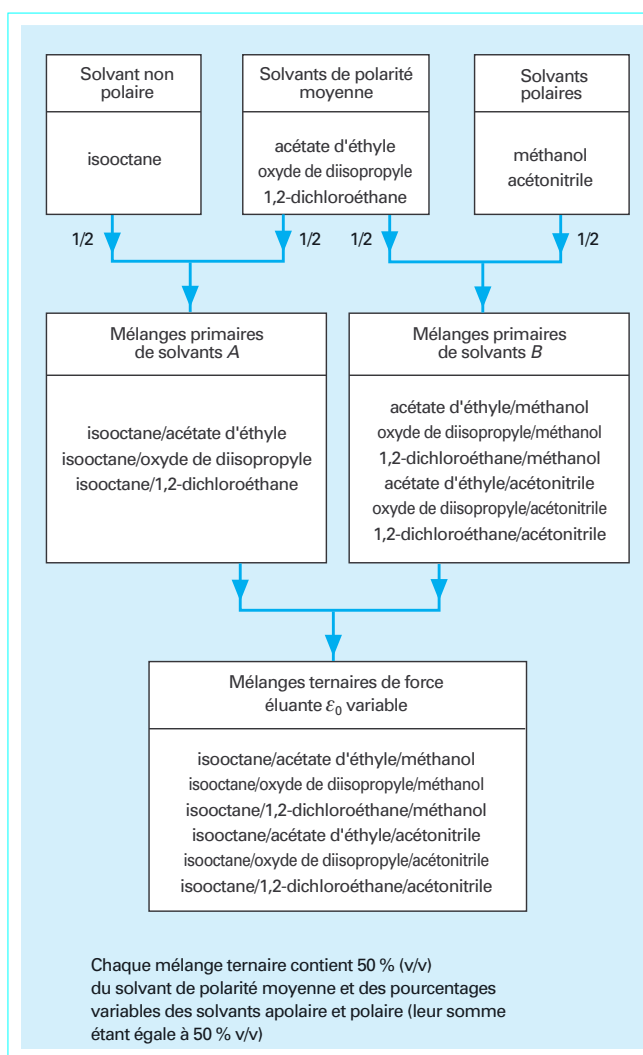


Figure 6 – Mélange de solvants sélectionnés, d'après [23]

À titre d'exemple, la figure 8a montre l'optimisation de la phase éluante pour la séparation d'un mélange de sept phénothiazines et la figure 8b la séparation obtenue [23].

Des deux possibilités offertes pour séparer l'ensemble des pics ($1/N_{H_2O}^{iso} = 38$ soit 15% de B environ et $1/N_{H_2O}^{iso} = 20$ soit 35% de B), la seconde est retenue car elle conduit à une durée d'analyse beaucoup plus faible.

4.2 Chromatographie de partage sur phases stationnaires polaires

La chromatographie de partage de ce type utilise comme phase stationnaire des silices greffées de motifs organiques polaires. Ce type de chromatographie est aussi appelé chromatographie de partage classique (*normal phase chromatography*).

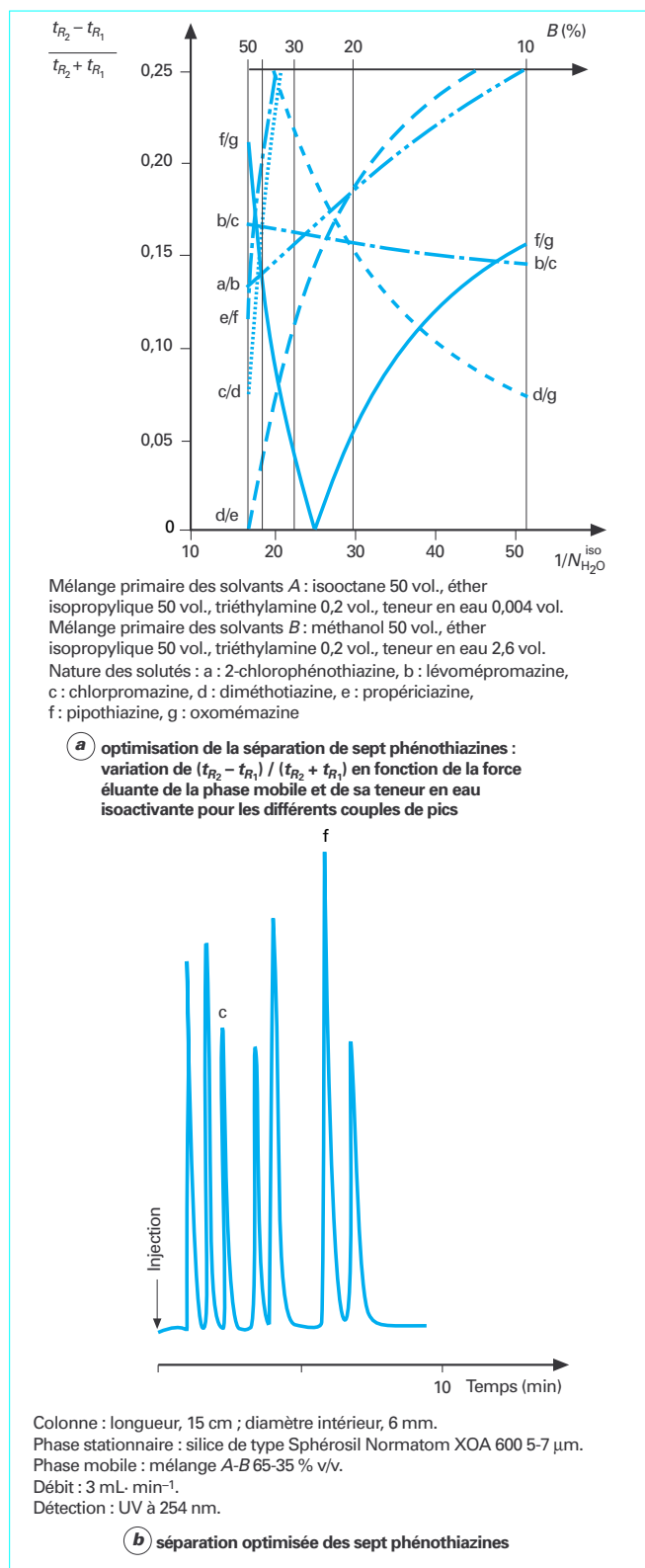


Figure 7 – Séparation d'un mélange de sept phénothiazines

4.2.1 Phases stationnaires

Les propriétés remarquables de gels de silice (grande surface spécifique, résistance à la pression, disponibilité dans des diamètres très petits) jointes au fait que les groupements silanol $\equiv \text{SiOH}$ sont réactifs, font qu'ils constituent le matériau de base pour la synthèse des phases stationnaires greffées. La méthode de greffage la plus utilisée, car conduisant à des liaisons $\equiv \text{Si-O-Si-C}$ stables, consiste à faire réagir avec la silice un silane mono-, di- ou trifonctionnel, chloro- ou alkoxysilane. La figure 9 montre les différentes réactions de silanisation possibles. On remarque qu'avec un silane trifonctionnel on ne peut obtenir plus de deux liaisons Si-O-Si pour des raisons stériques.

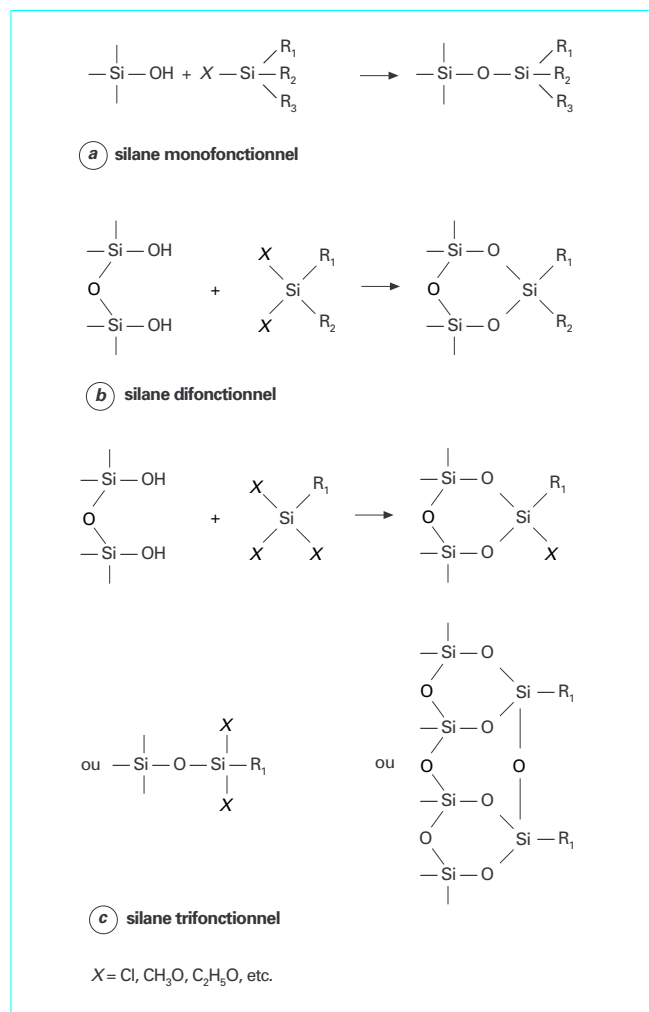


Figure 8 – Réactions de silanisation de la silice avec un silane mono-, di- ou trifonctionnel (chloro- ou alkoxysilane)

Aussi le groupement fonctionnel X résiduel (chloro ou alkoxy) peut-il conduire par hydrolyse à la formation de groupements $\equiv \text{SiOH}$ qui de nouveau pourront réagir avec l'excès de silane contenu dans le milieu réactionnel (figure 10). Dans ce cas, on aboutit à des phases stationnaires dites polymérisées qui ont en général une grande capacité mais une faible efficacité (l'épaisseur de la couche

greffée devient importante et, partant, conduit à un accroissement de la résistance au transfert de masse).

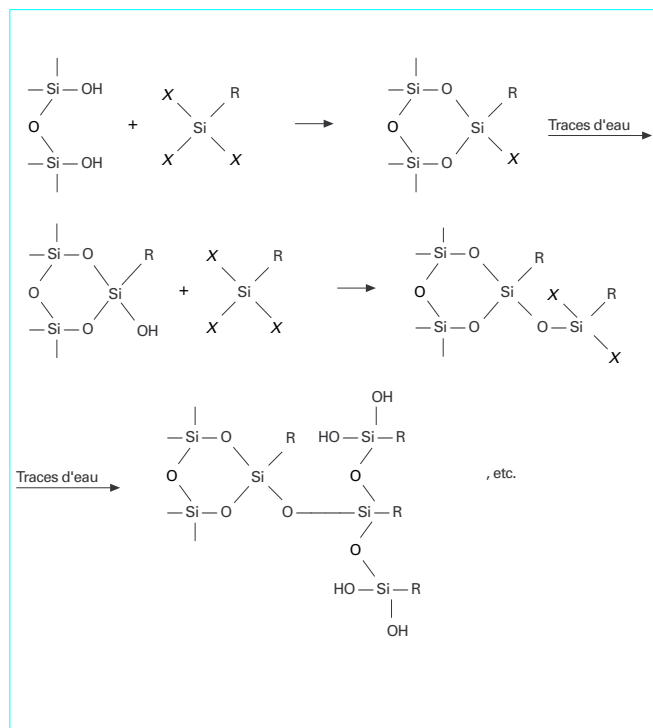
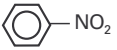


Figure 9 – Réaction de polymérisation à la surface de la silice d'un silane di- ou trifonctionnel en présence de traces d'eau

Les principales phases greffées polaires sont les suivantes :

- aminopropyle : $-(CH_2)_3-NH_2$
- paranitrobenzyle (nitro) : $-CH_2-$  $-NO_2$
- alkylnitrile : $-(CH_2)_n-C \equiv N$
- glycéropropyle (diol) : $-(CH_2)_3-O-CH_2-CH(OH)-CH_2(OH)$

Les phases aminopropyle et alkylnitrile sont les plus utilisées.

4.2.2 Mécanisme

Le mécanisme de cette séparation fait intervenir une solvation des greffons polaires par le solvant le plus polaire contenu en faible quantité dans la phase mobile. Les molécules de solutés vont soit interagir avec la phase liquide polaire stationnaire, soit déplacer des molécules de celle-ci et de façon d'autant plus intense que leur polarité est plus élevée. Du fait du déplacement de l'équilibre de distribution, la rétention des solutés diminue lorsque la teneur en solvant polaire dans la phase mobile augmente, ce qui justifie le terme modificateur polaire *P* (*polar modifier P*) souvent utilisé en pratique.

À titre d'exemple, la figure 11 montre qu'un greffon aminopropyle peut fixer jusqu'à 3 molécules d'éthanol pour des mélanges *n*-

hexane-éthanol [24]. Il en résulte que la rétention du soluté *S* met en jeu les deux équilibres suivants :

$$\overline{NH_2 P_i} + s \rightleftharpoons \overline{NH_2 P_{i-1} s} + P$$

$$s + P \rightleftharpoons sP$$

$$i = 1, 2, 3$$

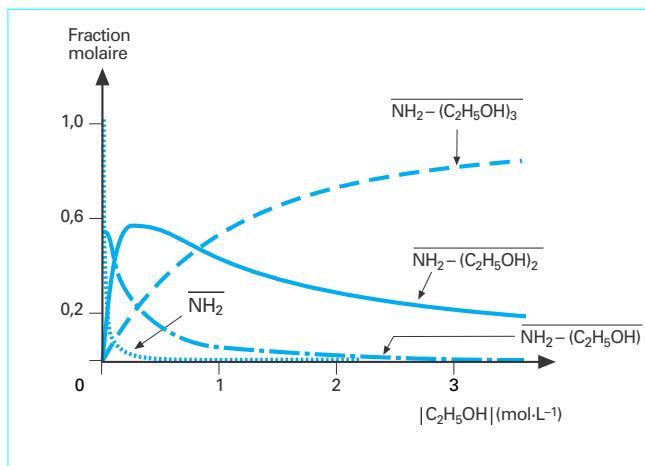


Figure 10 – Variation de la fraction molaire des groupements amino libres ou solvatés en fonction de la concentration en éthanol de la phase mobile

Les espèces surlignées sont présentes en phase stationnaire.

L'ordre d'éluion des solutés par polarité croissante justifie l'analyse, souvent effectuée, avec la chromatographie d'adsorption en dépit de l'absence d'interactions localisées ou semi-localisées en chromatographie de partage.

Cette différence est mise en lumière pour le rôle joué par la teneur en eau de la phase mobile, déterminante en chromatographie d'adsorption (recouvrement des groupements silanol libres d'abord puis ceux liés entre eux par liaison hydrogène) et pratiquement sans influence en chromatographie de partage (les groupements silanol les plus énergétiques sont engagés lors du greffage des phases).

4.2.3 Choix de la phase mobile

La démarche mise en œuvre pour le choix raisonné de la composition de la phase mobile est décrite dans le paragraphe 3.2. Elle est souvent constituée d'un alcane comme solvant de base (pas de sélectivité particulière) et d'un solvant polaire en faible teneur.

4.2.4 Applications

À titre d'exemple, nous montrons la séparation d'un antalgique (bénorilate) et de ses impuretés éventuelles.

Le bénorilate est l'ester de l'aspirine et du *p*-acétylaminophénol (paracétamol). Il peut être accompagné de diverses impuretés dont la liste et les formules chimiques sont données sur la figure 12a.

■ Choix du type de chromatographie

Les produits considérés sont polaires (présence de fonctions phénol, acide carboxylique, amine ou amide), ce qui oriente vers la

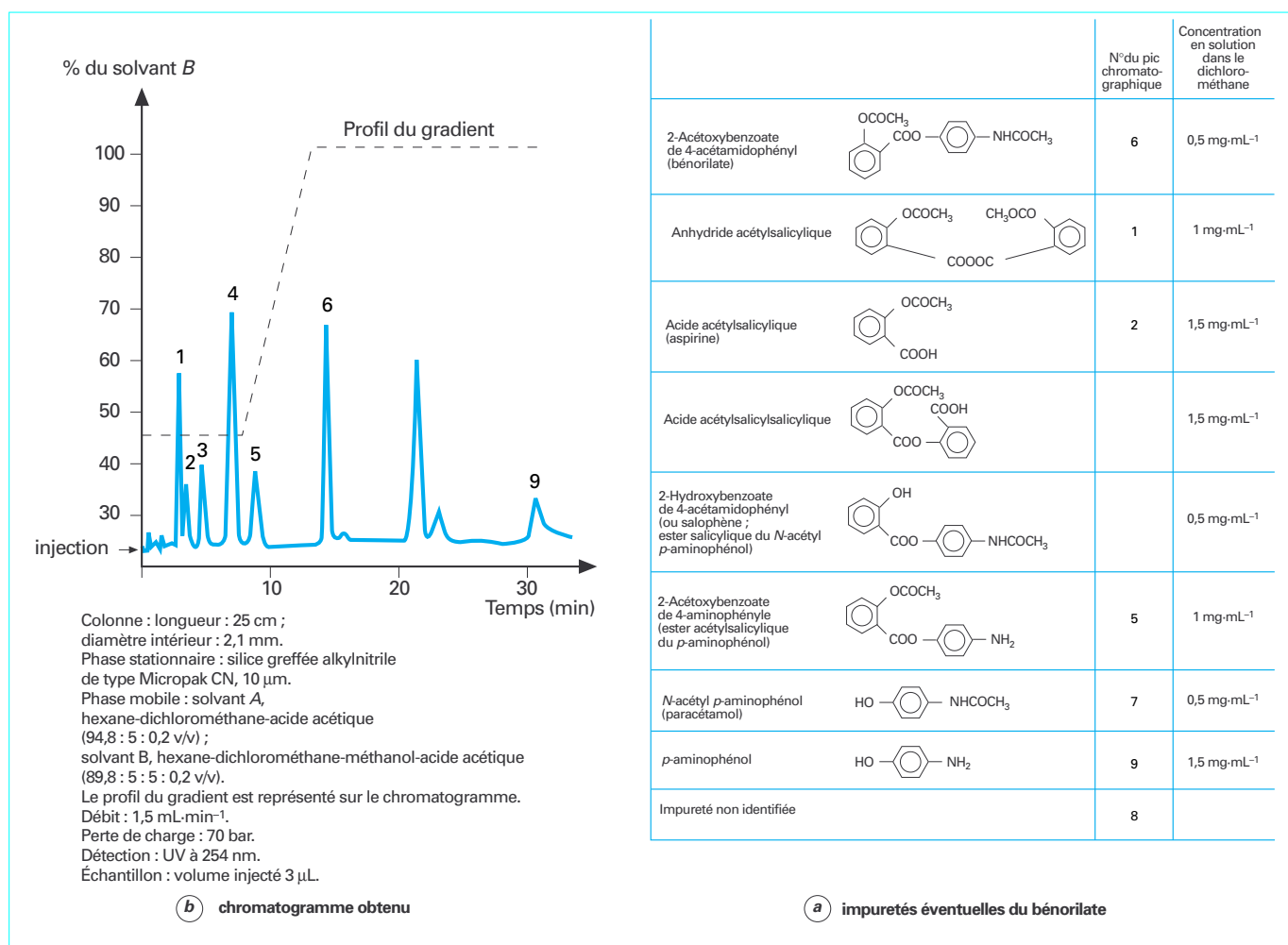


Figure 11 – Séparation des impuretés éventuelles contenues dans le bénomilate par chromatographie de partage classique [25]

chromatographie sur silice greffée polaire ; une silice greffée alkylnitrile a été utilisée. Par ailleurs, ce type de chromatographie met en œuvre une phase mobile de nature purement organique, ne contenant pas d'eau, ce qui évite l'hydrolyse de l'anhydride acétylsalicylique.

■ Choix de la phase mobile

Plusieurs des produits à séparer sont ionisables par leur fonction acide carboxylique : on a intérêt à provoquer un recul d'ionisation en opérant en milieu acide. La phase mobile sera un mélange hexane-dichlorométhane-acide acétique. Toutefois, le mélange à séparer est trop complexe pour parvenir à une résolution suffisante en élution **isocratique** (à composition de phase mobile constante). On opérera par élution graduée en augmentant la force éluante par addition progressive de méthanol.

La séparation obtenue est représentée figure 12b.

4.3 Chromatographie de partage sur phases apolaires

Cette méthode aussi appelée chromatographie de partage à polarité de phases inversée (*reversed phase chromatography*) utilise une phase stationnaire apolaire [silices greffées alkyle, copolymère styrène - divinylbenzène, pyrocarbone (graphite traité thermiquement)...] et une phase mobile polaire (on utilise principalement des mélanges eau-méthanol ou eau-acétonitrile).

On considère que 80 % des séparations sont actuellement réalisées avec des phases stationnaires apolaires.

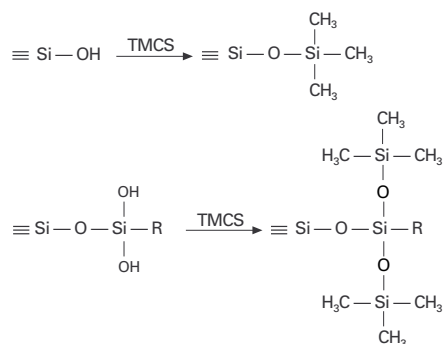
4.3.1 Phases stationnaires

Les phases stationnaires les plus utilisées sont les silices greffées alkyle. Elles sont obtenues avec la méthode de greffage décrite pour les phases polaires mais ici les silanols résiduels provenant soit de la silice (cf. encadré), soit de l'hydrolyse des groupements réactifs du silane n'ayant pas réagi au cours de la synthèse, jouent un rôle important. Ils peuvent entraîner un mécanisme de rétention

supplémentaire : interaction des solutés avec ces groupements silanol résiduels recouverts par des molécules d'eau apportées par la phase éluante selon le mode du partage sur phase stationnaire polaire. L'activité des groupements silanol résiduels (seuls sont importants ceux effectivement accessibles aux molécules de solutés) peut être estimée par des tests chromatographiques simples [26] [27] comme, par exemple, la mesure du facteur de capacité de la pyridine avec comme phase mobile un mélange *n*-heptane-chloroforme 3-1 v/v [26].

Les gels de silice renfermant environ 5 groupements silanol par nm², en les supposant uniformément répartis, l'aire moyenne entourant chaque groupement silanol est de 0,2 nm². Une molécule de *n*-alkylsilane, du fait de la présence de deux groupements méthyle sur l'atome de silicium, a une section droite de 0,4 nm² ; il en résulte la possibilité de greffer au plus 50 % des groupements silanol de la silice, soit 4 μmoles par m² : $[(4,8 \times 10^{18}) / (6 \times 10^{23})] \times 1/2 \times 10^6$.
 Ce calcul suppose une pénétration totale du silane dans tous les pores de la silice, ce qui requiert un diamètre de pore souvent supérieur à 10 nm. Les phases commerciales non polymérisées ont des taux de greffage n'excédant pas 3,5 à 3,7 μmoles par m².

On peut éliminer les groupements silanol résiduels accessibles par un traitement au triméthylchlorosilane (TMCS) qui est le plus petit silane ; c'est ce que l'on désigne sous le qualificatif *end capping*.



Les greffons les plus courants sont les chaînes octyle et octadécyle généralement commercialisées sous les qualificatifs C₈ ou RP₈ pour les premières, C₁₈ ou RP₁₈ pour les secondes.

Comme nous le verrons dans ce qui suit, l'obtention de résultats reproductibles exige l'utilisation de phases stationnaires ayant des surfaces hydrocarbonées greffées identiques (produit de l'aire d'un greffon par le nombre de greffons par unité d'aire).

Or, de très nombreux paramètres (nature du silane, surface spécifique de la silice de départ, milieu réactionnel, température, durée de la réaction, accessibilité des pores de la silice...) interviennent lors du greffage. Par suite, les produits commerciaux présentent, à cet égard, des caractéristiques variables. À titre d'exemple, la figure 13 montre les variations de la rétention, exprimée sous la forme du facteur de capacité, de l'antracène sur des phases stationnaires commerciales variées, dans des conditions expérimentales identiques.

On note que les phases stationnaires extrêmes (Partisil ODS et Ultrasphère ODS), qui sont des silices greffées octadécyle, conduisent néanmoins à une variation d'un facteur 10 du facteur de capacité de l'antracène. On ne peut donc que conseiller la mise en œuvre de colonnes remplies avec des phases stationnaires provenant du même lot de fabrication.

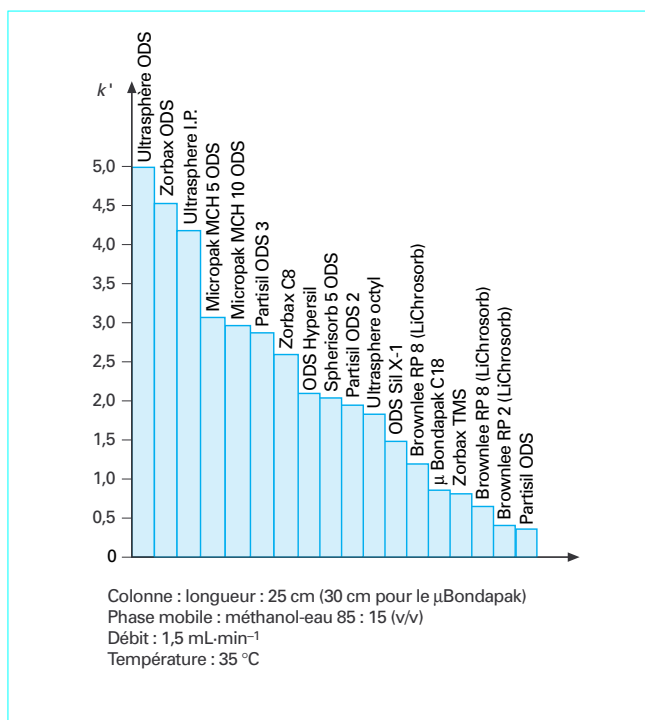


Figure 12 – Facteur de capacité de l'antracène sur différentes silices greffées commerciales

De nombreux tests chromatographiques ont été décrits pour la caractérisation et l'évaluation des silices greffées alkyle [28].

Toutefois, les phases stationnaires à base de silice ne peuvent être mises en œuvre avec des phases éluantes hydro-organiques de pH supérieur à 7,5 (attaque du réseau siliceux par les ions OH⁻). C'est la raison pour laquelle des polymères organiques ont été introduits comme alternative.

Les plus utilisés sont des copolymères styrène-divinylbenzène ; ils présentent l'avantage, indépendamment d'une grande stabilité sur toute la gamme de pH (de pH 0 à pH 14), d'avoir une structure homogène.

Leurs inconvénients principaux sont une moindre résistance à la pression et une cinétique d'échange plus lente même si leurs caractéristiques à cet égard ont été améliorées grâce au développement des structures macroporeuses. Ces copolymères sont commercialisés soit non fonctionnalisés (colonnes PRP 1, PLRP...), soit greffés octadécyle (ACT 1).

Si le changement de matrice permet de s'affranchir du rôle néfaste joué par les silanols résiduels, la présence de cycles aromatiques peut entraîner, selon la nature des solutés, un mode de rétention supplémentaire par interactions π-π (complexe accepteur-donneur d'électrons) (§ 6.2).

D'autres polymères sont également commercialisés parmi lesquels on peut citer ceux à base d'alcool vinylique (ASAHIPAK), de polyméthacrylate...

Afin de pallier les défauts des silices greffées alkyle et des polymères non ioniques, de nouvelles phases ont été récemment développées. Ainsi, pour protéger et masquer le squelette siliceux (utilisation sur une gamme de pH plus étendue et élimination de l'influence des silanols résiduels), la surface des pores est recouverte d'un polymère siliconé, lequel reçoit ensuite le greffage (Capcell Pak). Une autre solution consiste à substituer de l'oxyde de

zirconium poreux au traditionnel gel de silice, conférant ainsi aux phases obtenues (colonne Z-18) une grande résistance mécanique (700 bar) associée à une grande inertie chimique (pH 1 à 14). Enfin, la mise en œuvre récente de carbone graphite poreux (*porous graphite carbon*, PGC) ouvre des perspectives intéressantes (grande inertie chimique, fabrication reproductible, structure poreuse analogue à celle de la silice...).

En effet, cette phase présente une grande hydrophobie permettant aussi bien des séparations de composés aromatiques peu polaires en chromatographie de partage à polarité de phases inversée que l'extraction de composés polaires aromatiques dans des milieux aqueux (extraction liquide-solide). À titre d'exemple, le tableau 6 compare les valeurs des facteurs de capacité (mesurées ou extrapolées à l'eau pure) de composés phénoliques polaires sur PRP 1 et sur PGC [29].

Tableau 6 – Facteurs de capacité k' et volumes de rétention V_R mesurés ou extrapolés dans l'eau pour divers solutés phénoliques polaires, d'après [29]				
Solutés	PRP1		PGC	
	k'_{eau}	V_R (mL)	k'_{eau}	V_R (mL)
Phénol	400	92	81	21
1,2-Dihydroxybenzène (pyrocatechol)	46	11	120	31
1,3-Dihydroxybenzène (résorcinol)	21	5	331	86
1,4-Dihydroxybenzène (hydroquinone)	7	1,8	288	75
1,2,3-Trihydroxybenzène (pyrogallol)	5,6	1,5	172	45
1,3,5-Trihydroxybenzène (phloroglucinol)	3	0,9	1 050	273
4-Aminophénol	12	3,1	112	30
Acide 3-aminobenzoïque ...	37	9	151	40

Colonne de 2,2 cm de long et de 0,46 cm de diamètre intérieur

Le mécanisme de rétention et la sélectivité de cette phase envers les isomères de position ont été interprétés comme résultant d'une grande délocalisation des électrons π due à sa structure lamellaire (superposition de plans d'atomes de carbone disposés en maille élémentaire hexagonale).

4.3.2 Mécanismes

Deux mécanismes de rétention macroscopiques ont été proposés dans le cas des silices greffées alkyle :

— le solvant organique de la phase mobile (on utilise principalement des mélanges eau-méthanol ou eau-acétonitrile) se fixe préférentiellement à la surface des greffons apolaires : il y a alors partage des solutés entre la phase mobile et la phase liquide adsorbée [24] [30] (figure 14a) ;

— une autre approche décrit la rétention comme une conséquence de l'effet hydrophobe (cf. note) : il y a association réversible du soluté avec les greffons (figure 14b) ;

Nota : lorsqu'ils sont dissous dans un solvant organique apolaire, l'hexane par exemple, les solutés apolaires ne manifestent pas de tendance à l'auto-association. Les phénomènes sont différents lorsque le solvant est l'eau. Les molécules des solutés apolaires adhèrent les unes aux autres et s'associent en agrégats. On dit qu'il y a interaction hydrophobe et ce phénomène est lié à la structure de l'eau. En effet les molécules d'eau ne sont pas libres mais associées par des liaisons hydrogène (*Clusters*). Ces complexes sont labiles, c'est-à-

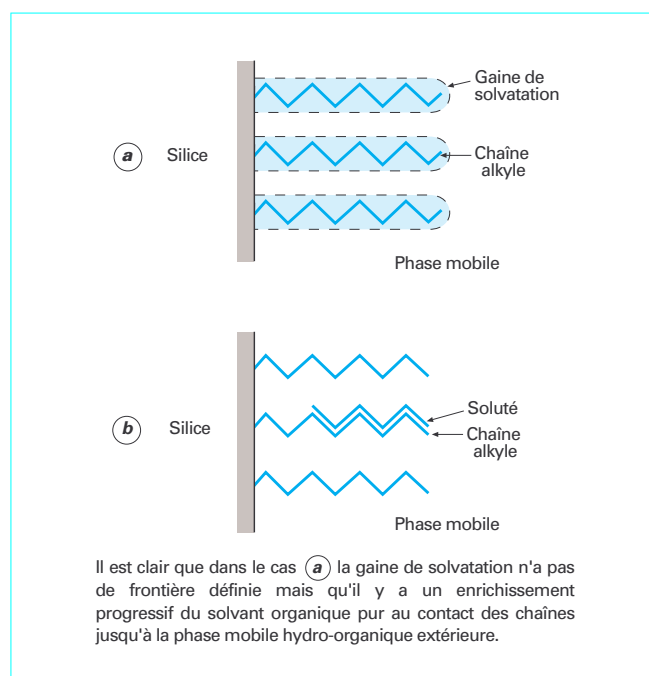


Figure 13 – Représentation des deux modèles de rétention en chromatographie de partage à polarité de phases inversée

dire qu'ils se brisent et se reforment constamment. Lorsqu'un soluté apolaire est ajouté à l'eau, sa dissolution est décrite comme suit : le composé doit créer une cavité dans la phase aqueuse, ce qui implique que des liaisons hydrogène se soient brisées. Les molécules d'eau libérées se réarrangent à la surface de la molécule du soluté. L'interaction hydrophobe dépend de la nature des solutés. Elle augmente avec la force ionique de la solution, mais elle diminue lorsqu'un solvant organique (moins associé que l'eau) est ajouté à l'eau, par exemple du méthanol ou de l'acétonitrile. En effet, l'eau est alors déstructurée et l'association est moins forte.

La réalité est probablement intermédiaire entre ces deux mécanismes. Il y a effectivement solvation des chaînes alkyle par le solvant organique de la phase mobile ; les chaînes solvatées ressemblent à un liquide, assez visqueux, dans lequel les solutés peuvent diffuser (on a montré que chaque greffon octadécyle est solvâté en moyenne par 8 molécules de méthanol).

L'importance relative de ces deux mécanismes dépend de la nature des solutés et en particulier de leur caractère hydrophobe.

Un soluté très apolaire est surtout en interaction avec les chaînes alkyle. Un soluté plus polaire sera en interaction à la fois avec les molécules du solvant organique adsorbé et avec les chaînes alkyle.

Les deux mécanismes sont indiscernables car ils conduisent aux mêmes conclusions quant à l'influence des paramètres gouvernant la rétention.

4.3.2.1 Rôle de la phase stationnaire

Il a été montré que la longueur de la chaîne greffée n'a pas un rôle spécifique (au moins tant que la longueur de la chaîne alkyle du soluté est inférieure à celle du greffon) et que seule la surface hydrocarbonée totale (produit du nombre N de greffons par unité d'aire par l'aire d'un greffon) gouvernait les grandeurs de rétention.

Ainsi, comme le montre la figure 15, pour un greffon donné, le logarithme du facteur de capacité des solutés augmente linéairement avec le nombre N de greffons par unité d'aire (taux de greffage). Lorsque ce dernier est constant, $\lg k'$ varie linéairement avec la longueur de la chaîne alkyle greffée et partant l'aire S de celle-ci (figure 16). Il en résulte que $\lg k'$ varie linéairement avec le produit $N \cdot S$ (surface hydrocarbonée greffée par unité d'aire) (figure 17).

La figure 18 montre que, de même, la sélectivité varie linéairement avec ce même paramètre.

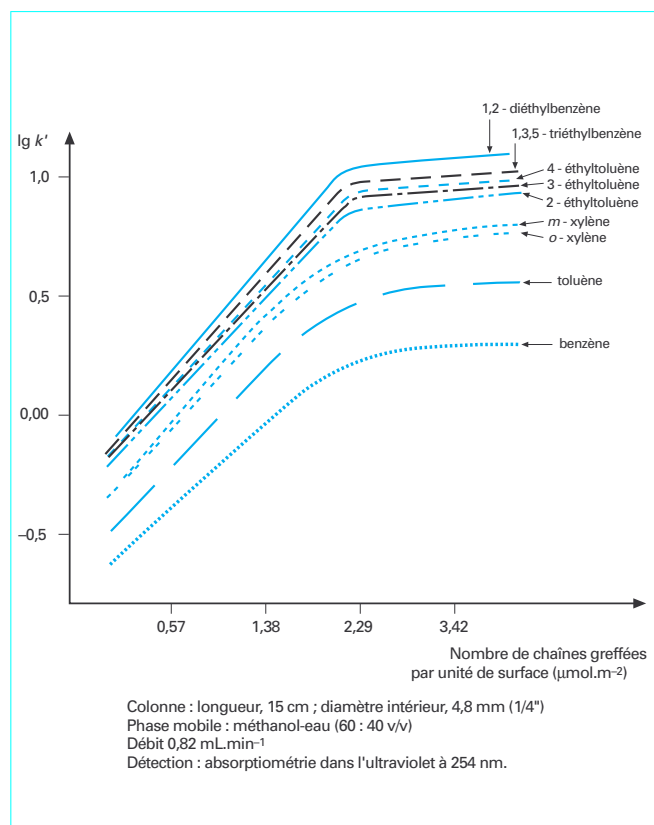


Figure 14 - Variation du logarithme du facteur de capacité k' d'hydrocarbures monoaromatiques substitués en fonction du nombre de greffons par unité de surface (taux de carbone de la phase, Partisil 5 µm greffé C₁₈)

Ces résultats montrent que, comme nous l'avons déjà mentionné au début de cet article, il est indispensable pour assurer la reproductibilité d'une séparation de maintenir la surface hydrocarbonée constante lors d'un changement de colonne (à une variation linéaire de $\lg k'$ avec le produit $N \cdot S$ correspond une variation exponentielle de k' avec ce même paramètre).

4.3.2.2 Rôle de la phase mobile

D'une manière générale, on utilise comme phases mobiles des mélanges eau-méthanol, eau-acétonitrile, eau-éthanol, eau-tétrahydrofurane ou encore des mélanges ternaires, et la rétention est d'autant plus importante que la polarité de l'éluant est plus grande, c'est-à-dire que la teneur en solvant organique de la phase mobile est plus faible.

De nombreux auteurs ont cherché une relation entre le facteur de capacité k' et la teneur en solvant organique de la phase mobile pour les mélanges binaires. Des relations quadratiques de type $\lg k' = ax^2 + bx + c$ sont observées pour des teneurs x en méthanol et en acétonitrile. Dans un large domaine eau-méthanol, $\lg k'$ varie linéairement avec le pourcentage de solvant organique. Toutefois, cette relation n'est pas vérifiée dans tout le domaine de variation de la teneur x en solvant organique [24].

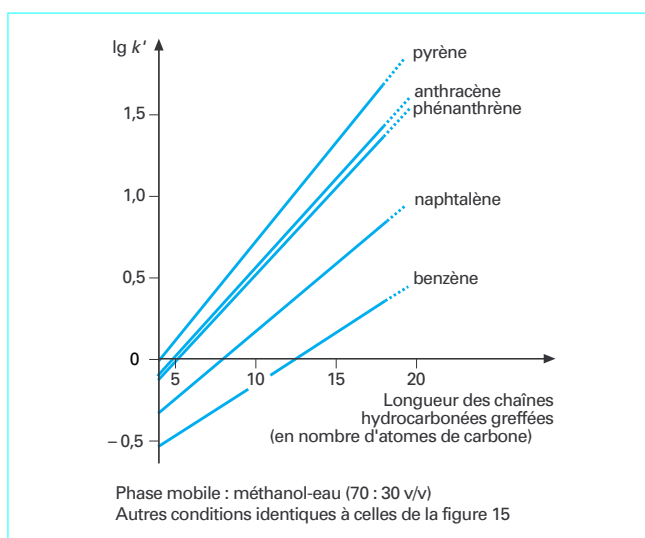


Figure 15 - Variation du logarithme du facteur de capacité k' d'hydrocarbures polyaromatiques en fonction de la longueur de la chaîne greffée dans le cas d'une silice (Partisil 5 µm) ayant 2,1 µmol.m⁻² de greffons

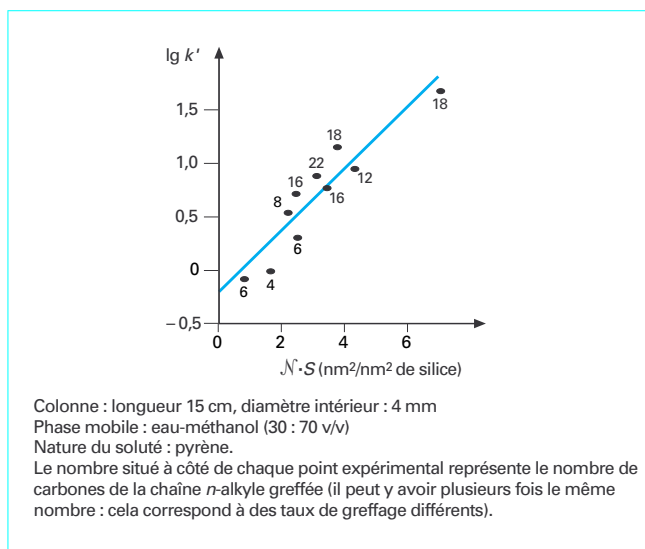


Figure 16 - Variation du logarithme du facteur de capacité k' en fonction de la surface hydrocarbonée greffée par nm² de silice (Sphérosil expérimental 5 µm, 520 m².g⁻¹ avant greffage)

4.3.2.3 Influence de la température

Une augmentation de la température provoque, en général, une diminution de la valeur du facteur de capacité et de la sélectivité. De plus, une transition de phase ou un changement conformationnel de la chaîne est observé quand la température augmente ; cela entraîne une discontinuité dans la variation de la rétention en fonction de la température, qui se produit, pour les silices greffées octadécyle, entre 10 et 33 °C [31] et qui dépend de la polarité du soluté et de la composition de la phase éluante. Aussi est-il toujours parti-

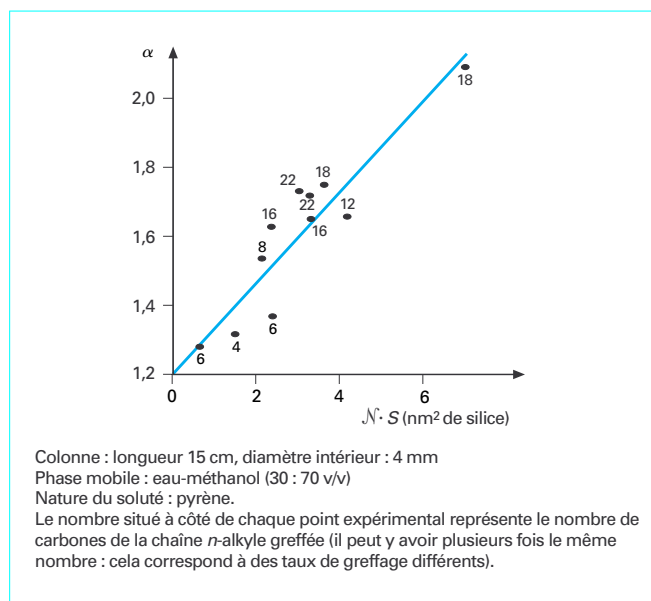


Figure 17 - Variation de la sélectivité α du couple pyrène-anthracène en fonction de la surface hydrocarbonée greffée par nm^2 de silice (Sphérosil expérimental 5 μm , 520 $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ avant greffage)

culièrement recommandé de thermoréguler la colonne chromatographique.

4.3.2.4 Rôle du soluté

En chromatographie de partage à polarité de phases inversée, la rétention est liée à l'interaction hydrophobe et, par suite, il est important de pouvoir classer les solutés en fonction de leur affinité pour l'eau (hydrophilie) ou pour les chaînes alkyle des silices greffées (lipophilie ou hydrophobie).

Une démarche analogue a été envisagée par Rekker [32] pour tenter de prévoir le transfert de molécules variées à travers les membranes biologiques. Cet auteur est arrivé à la conclusion que le coefficient de partage P d'un soluté X entre l'eau et le *n*-octanol défini à partir de l'équilibre :

$$X_{\text{eau}} \rightleftharpoons X_{\text{octanol}}$$

par :

$$P = \frac{C_{\text{octanol}}}{C_{\text{eau}}}$$

(C_{octanol} et C_{eau} étant les concentrations du soluté à l'équilibre dans les deux phases) constituait une mesure valable de l'hydrophobie du soluté (plus P est grand, plus le soluté est hydrophobe).

L'interprétation de très nombreuses mesures expérimentales de P a conduit Rekker à proposer une méthode permettant de calculer a priori la lipophilie d'un soluté quelconque.

■ Évaluation du pouvoir hydrophobe

Selon Rekker, une molécule peut être divisée en fragments élémentaires i ($i = -\text{CH}_3, -\text{CH}_2-, -\text{CH}-, -\overset{\text{I}}{\text{C}}-, -\text{NH}_2, -\text{COO}, \text{C}_6\text{H}_5$, etc.) possédant chacun une constante partielle de pouvoir hydrophobe f_i . Le logarithme du coefficient de partage P s'obtient en additionnant les constantes f_i de tous les fragments de la molécule et en tenant

compte de quelques effets intramoléculaires (proximité de groupements polaires, atome d'hydrogène lié à un site négatif, conjugaison, etc.) qui conduisent à ajouter, pour chacun d'eux, une contribution supplémentaire f'_j à la somme des f_i . On a ainsi :

$$\lg P = \sum_i f_i + \sum_j f'_j$$

Chaque terme f'_j est le produit d'une constante C_M dite « constante magique » par un facteur variable k_j appelé « nombre clé ». La valeur de k_j est fixée par des règles empiriques simples :

— effet de proximité : $k_j = 3$ (1 atome de carbone) ou $k_j = 2$ (2 atomes de carbone),

— effet de conjugaison : $k_j = 1$.

L'expression de $\lg P$ est finalement :

$$\lg P = \sum_i f_i + C_M \sum_j k_j$$

Les valeurs de f_i ont été tabulées pour différents systèmes eau-solvants organiques et sont rassemblées, pour le système eau-octanol, dans le tableau 7. De très nombreux auteurs (on trouvera une mise au point sur le sujet dans [33]) ont montré qu'il existait une corrélation entre le facteur de capacité k' et P de la forme :

$$\lg k' = a \lg P + b$$

a et b étant des constantes pour un système chromatographique donné (phase stationnaire-phase mobile) et, également, pour une famille de composés déterminée.

4.3.3 Choix de la phase mobile

La démarche mise en œuvre pour le choix raisonné de la phase mobile est décrite dans le paragraphe 3. Le solvant de base est l'eau (on s'assurera de sa grande pureté, en particulier en ce qui concerne sa teneur en matières organiques) et la rétention des solutés est régie par la nature et la teneur du solvant organique associé (méthanol, acétonitrile, tétrahydrofurane). Dans le cas de mélanges complexes ou de séparations difficiles, on est souvent amené à mettre en œuvre des gradients d'éluant et/ou des mélanges ternaires de type eau-méthanol-acétonitrile (exploitation d'interactions spécifiques).

Le tableau 8 rassemble les valeurs du pouvoir éluant des principaux solvants utilisés en chromatographie de partage à polarité de phases inversée.

Le pouvoir éluant d'un mélange de i solvants est obtenu en lui appliquant la règle des mélanges :

$$S^* = \sum_i S_i^* \varphi_i$$

où φ_i représente la fraction volumique du solvant i dans le mélange.

Tableau 7 – Valeurs des constantes partielles de pouvoirs hydrophobes, pour le système eau-*n*-octanol, selon Rekker [32]

Fragment	f_i	Fragment	f_i
C ₆ H ₅	1,886	C ₅ H ₄ N(1)	0,526
C ₆ H ₄	1,688	C ₃ H ₃ N ₂ (2)	- 0,119
C ₆ H ₃	1,431	(al)NH ₂	- 1,428
CH ₃	0,702	(ar)NH ₂	- 0,854
CH ₂	0,530	(al)NH	- 1,825
CH	0,235	(ar)NH	- 0,964
C(quaternaire)	0,15	(al)N	- 2,160
CH ₂ = CH	0,935	(ar)N	- 1,012
CH ≡ C	0,73	(ar)SO ₂ NH ₂	- 1,530
H	0,175	(ar)SO ₂ NH	- 1,992
(al)COOH	- 0,954	(ar)SO ₂ N	- 2,454
(ar)COOH	- 0,093	(al)CONH ₂	- 1,970
(al)COO	- 1,292	(ar)CONH ₂	- 1,109
(ar)COO	- 0,431	(al)CON	- 2,894
(al)CO	- 1,703	(al)NHCOO	- 1,943
(ar)CO	- 0,842	(ar)NHCOO	- 0,795
(al)O	- 1,581	(al)OOCNH ₂	- 1,481
(ar)O	- 0,433	(al)NO ₂	- 0,939
(al)OH	- 1,491	(ar)NO ₂	- 0,078
(ar)OH	- 0,343	(al)C ≡ N	- 1,066
(ar)COH	- 0,38	(ar)C ≡ N	- 0,205
(al)CF ₃	- 1,155	(ar)C = N	- 1,88
(ar)CF ₃	- 0,581	(ar)CH = CH - NO ₂	0,395
(al)OCH ₂ COOH	0,757	(ar)CH = C - NO ₂	0,220
(ar)OCH ₂ COOH	1,331	(ar)CH = CH - COO	0,042
(al)CCl ₃	1,79	(ar)CH = CH - CONH	- 1,100
(al)F	- 0,462	(al)SH	0,00
(ar)F	0,399	(ar)SH	0,62
(al)Cl	0,061	(al)S	- 0,51
(ar)Cl	0,922	(ar)S	0,11
(al)Br	0,270	(al)S-S	0,37
(ar)Br	1,131	(al)SO	- 2,75
(al)I	0,587	(ar)SO	- 2,05
(ar)I	1,448	(ar)SO ₂	- 1,87
(1) Groupement pyridile		Effet de proximité (1C) : 0,861	
(2) Groupement imidazole		Effet de proximité (2C) : 0,574	
Constante magique : 0,268		al aliphatique	
		ar aromatique	

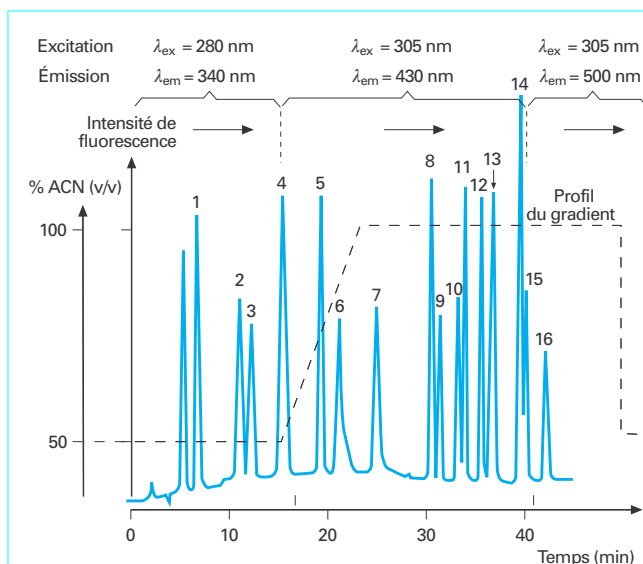
Tableau 8 – Pouvoir éluant des principaux solvants utilisés en chromatographie de partage à polarité de phases inversée [1]

Solvant	Pouvoir éluant S*
Acétonitrile	3,1
Méthanol	3,0
Eau	0

4.3.4 Applications

Les applications sont très nombreuses et couvrent un domaine très vaste qui s'étend de la séparation des produits pétroliers à l'analyse de fluides biologiques (près de 80 % des séparations publiées sont réalisées avec cette méthode).

À titre d'exemples, la figure 19 montre la séparation d'un mélange d'hydrocarbures polyaromatiques considérés comme polluants prioritaires et la figure 20 d'un mélange d'acides aminés essentiels après dérivation précolonne avec un réactif fluorescent (9-fluorényl méthylchloroformiate). Dans le dernier cas, on peut atteindre, avec une détection par spectrofluorescence, une limite de détection de quelques dizaines de femtomoles.



Colonne : longueur : 25 cm ; diamètre intérieur : 0,26 cm.
 Phase stationnaire, silice greffée octadécyle HC-ODS, 10 µm.
 Phase mobile : acétonitrile-eau avec élution graduée (le profil du gradient est représenté en tireté sur la figure).
 Débit : 0,5 mL·min⁻¹.
 Détection : spectrofluorimétrie avec programmation des longueurs d'onde d'excitation et d'émission.
 Solutés :
 1) Naphtalène ; 2) Acénaphène ; 3) Fluorène ; 4) Phénanthrène ;
 5) Anthracène ; 6) Fluoranthène ; 7) Pyrène ; 8) Benz[a]anthracène ;
 9) Chrysène ; 10) Benzo[e]pyrène ; 11) Benzo[b]fluoranthène ;
 12) Benzo[k]fluoranthène ; 13) Benzo[a]pyrène ; 14) Dibenz[a,h]anthracène ;
 15) Benzo[ghi]pérylène ; 16) Indéno[1,2,3-cd]pyrène.

Figure 18 – Séparation par chromatographie de partage à polarité de phases inversée d'un mélange de 16 hydrocarbures polyaromatiques (considérés comme polluants prioritaires) (d'après [34])

Tableau 8 – Pouvoir éluant des principaux solvants utilisés en chromatographie de partage à polarité de phases inversée [1]

Solvant	Pouvoir éluant S*
Tétrahydrofurane	4,4
Isopropanol	4,2
Éthanol	3,6

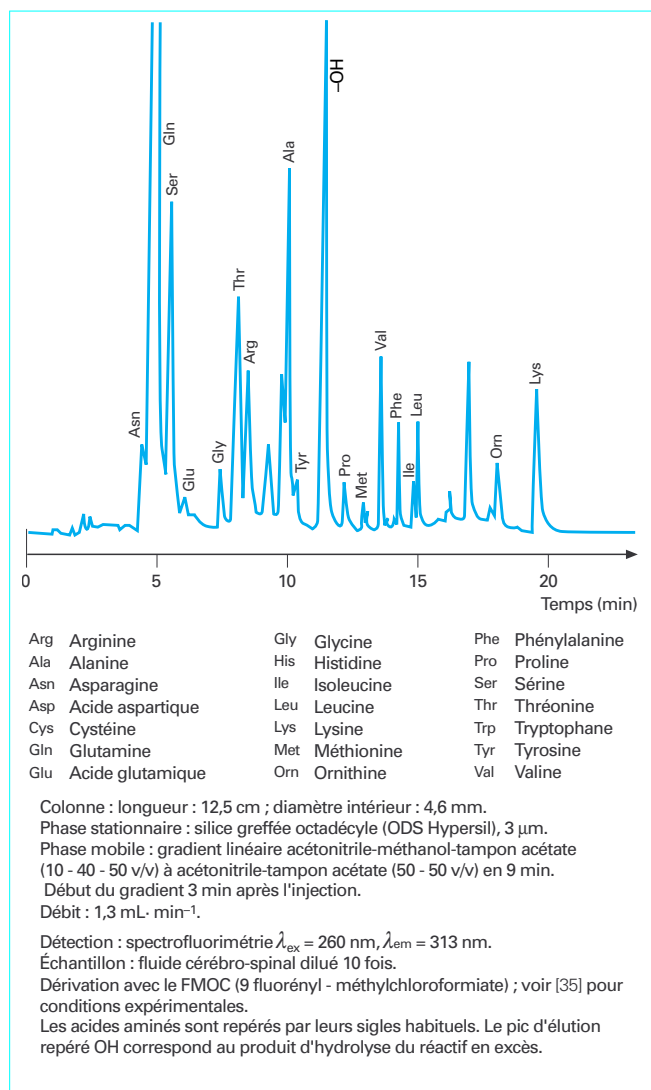


Figure 19 – Analyse par chromatographie de partage à polarité de phases inversée des acides aminés contenus dans un fluide cérébrospinal [35]

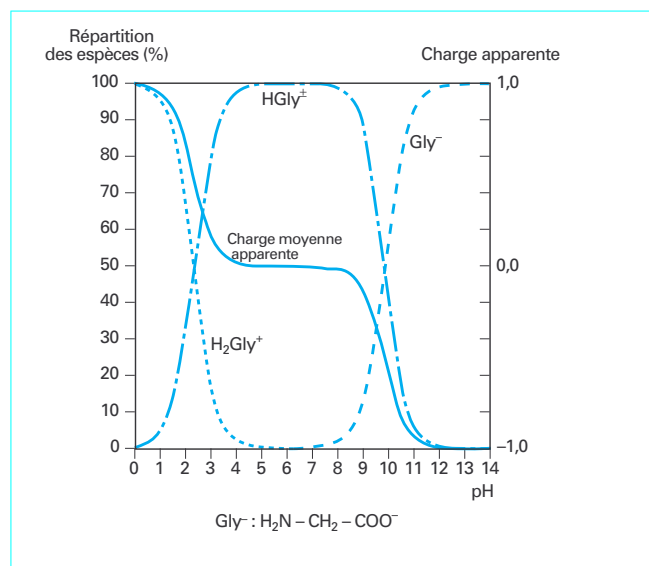


Figure 20 – Courbes de répartition des espèces et variation de la charge moyenne apparente en fonction du pH pour la glycine

En guise de conclusion, le tableau 9 donne un schéma simplifié d'utilisation des phases stationnaires de la chromatographie de partage en fonction de la polarité des solutés.

Tableau 9 – Schéma simplifié d'utilisation des silices greffées					
Polarité des solutés	Polaires		Moyennement polaires		Non polaires
Polarité de l'éluant	Moyennement polaire	Très faiblement polaire	Fortement polaire	Moyennement polaire	
Composition type de l'éluant	Mélange d'hexane et de dichlorométhane (+ éventuellement de l'isopropanol) Ex. : C ₆ H ₁₄ /CH ₂ Cl ₂ 20 : 80 v/v	Hexane pur ou mélange avec très peu de dichlorométhane Ex. : C ₆ H ₁₄ /CH ₂ Cl ₂ 95 : 5 v/v	Mélange de méthanol (ou d'acétonitrile) et d'eau Ex. : CH ₃ OH/H ₂ O 40 : 60 v/v	Méthanol pur (ou acétonitrile) ou mélange avec peu d'eau Ex. : CH ₃ OH/H ₂ O 90 : 10 v/v	
Type de chromatographie	Chromatographie sur silice greffée polaire : CN, NH ₂ , etc.		Chromatographie à polarité de phases inversée sur silice greffée apolaire		

5. Séparation de solutés ionisés

Les mécanismes de séparation de ces solutés sont fondés essentiellement sur des interactions électrostatiques entre espèces chargées présentes simultanément dans chacune des deux phases. Rappelons que de nombreux composés organiques sont susceptibles de donner des ions en solution par un contrôle adéquat du pH.

Ainsi les acides aminés, en fonction du pH, peuvent être présents en solution sous forme moléculaire ou sous la forme d'anions ou de cations.

Considérons, par exemple, le cas de la glycine $\text{HOOC-CH}_2\text{-NH}_2$ dont les pK_A sont respectivement 2,3 et 9,8 (le premier correspond à la constante d'acidité du couple -COOH/-COO^- , le second à la constante du couple $\text{-NH}_3^+/\text{-NH}_2$). La figure 21 montre l'évolution de la charge moyenne et la répartition des espèces de la glycine en fonction du pH de la phase aqueuse.

On observe que la glycine se comporte comme un cation pour des valeurs de pH inférieures à 3, comme un anion pour des valeurs de pH supérieures à 9 et comme une espèce non chargée dans la zone de pH intermédiaire où la forme zwitterionique prédomine. Plus généralement, pour un couple HA^+/A , la forme ionique prédomine pour des valeurs de pH inférieures pK_A du couple ; on a en effet :

$$\text{pH} = pK_A + \lg \frac{|\text{A}|}{|\text{HA}^+|}$$

(Si $\text{pH} = pK_A - 1$, alors $|\text{HA}^+| = 10 |\text{A}|$,

si $\text{pH} = pK_A - 2$, $|\text{HA}^+| = 100 |\text{A}|$, etc.).

Cet exemple montre que la séparation des acides aminés peut être envisagée soit sous forme non chargée entre pH 4 et 8 (on parle alors de « recul d'ionisation » et on met en œuvre, par exemple, la chromatographie de partage à polarité de phases inversée), soit sous la forme d'espèces ionisées :

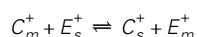
- anioniques ($\text{pH} > 9$),
- cationiques ($\text{pH} < 3$).

5.1 Chromatographie d'échange d'ions

Les séparations par échange d'ions s'adressent plus particulièrement aux espèces ionisées ou ionisables, encore que de nombreuses séparations de solutés non ioniques puissent également être obtenues par le partage entre les deux phases.

La phase stationnaire est un échangeur d'ions, c'est-à-dire un solide comportant des groupements fonctionnels ionisés, fixes, porteurs de charges positives ou négatives, et des ions mobiles de signe contraire assurant l'électroneutralité. Les ions, retenus au voisinage des groupements fonctionnels par des forces d'attraction électrostatique, sont interchangeableables, en nombre équivalent, avec ceux de la solution mise en contact avec l'échangeur.

La figure 22 montre, à titre d'exemple, qu'une phase stationnaire comportant des groupements sulfonate -SO_3^- agit comme échangeur de cations selon l'équilibre :



(les indices m et s désignent respectivement les phases mobile et stationnaire).

Dans le même temps, les anions, du fait du champ répulsif créé par la forte densité des groupements fonctionnels au sein des particules, se voient interdire l'accès à l'intérieur de celles-ci : c'est le phénomène d'exclusion d'ions, ici d'anions.

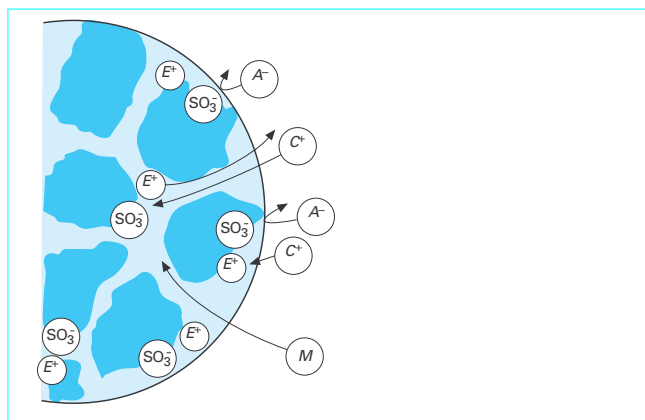


Figure 21 – Représentation des différentes interactions possibles entre un échangeur de cations initialement sous la forme E^+ et des espèces en solution : A^- (anion), C^+ (cation), M (espèce non chargée)

Enfin, les molécules non soumises à des interactions électrostatiques peuvent pénétrer dans les pores des particules et donner lieu ainsi à un mécanisme de partage connu sous le nom d'équilibre de Donnan.

5.1.1 Phases stationnaires

Tout échangeur d'ions comporte deux parties, les groupements fonctionnels qui lui confèrent ses propriétés et la matrice (ou le support) sur laquelle ces derniers sont greffés.


5.1.1.1 Groupements fonctionnels

On distingue les échangeurs de cations dont les groupements sont chargés négativement et les échangeurs d'anions dont les groupements sont chargés positivement.

Les groupements les plus utilisés sont de type sulfonate -SO_3^- pour les échangeurs de cations et de type ammonium quaternaire -NR_3^+ pour les échangeurs d'anions (triméthylammonium $\text{-N(CH}_3)_3^+$ par exemple).

Les échangeurs sulfonate sont dits acides forts (SCX, *Strong Cation Exchanger*) car ils ont les propriétés de ces acides lorsqu'ils sont sous forme H^+ , les échangeurs ammonium quaternaire sont dits bases fortes (SAX, *Strong Anion Exchanger*) car ils ont les propriétés de ces bases lorsqu'ils sont sous forme OH^- . Leurs sels sont totalement dissociés en solution aqueuse et, par suite, ils sont échangeurs d'ions quel que soit le pH des solutions avec lesquelles ils sont mis en contact. Leur capacité d'échange (nombre de groupements fonctionnels accessibles à l'échange d'ions par unité de masse ou de volume d'échangeur) est constante et indépendante du pH.

Il existe également des échangeurs dont les groupements fonctionnels ont le caractère d'acides ou de bases faibles. Ainsi, un échangeur à groupements carboxylate -CO_2^- n'est échangeur de cations qu'en milieu de pH suffisamment élevé : en milieu acide, les groupements sont sous la forme $\text{-CO}_2\text{H}$ non ionisée. De même, un échangeur à groupements amine tertiaire -NR_2 n'est échangeur d'anions qu'en milieu acide, les groupements étant alors porteurs d'une charge positive par fixation d'un ion H^+ sur l'atome d'azote $\text{-NR}_2\text{H}^+$. Cette propriété explique l'utilisation, comme

échangeur d'anions du type base faible, de silices à greffons amino $-NH_2$ ou d'alumine à greffons pyridile  phases stationnaires utilisées par ailleurs, en chromatographie de partage. Les phases éluantes sont alors des tampons de pH acides (tampons phosphate à pH voisin de 3 par exemple) préparés en solution aqueuse ou hydroalcoolique.

La capacité d'échange des échangeurs d'ions acides ou bases faibles dépend du degré d'ionisation des groupements fonctionnels, donc du pH de la phase éluante.

La figure 23 montre la classification des groupements fonctionnels selon leur signe et leurs propriétés acido-basiques.

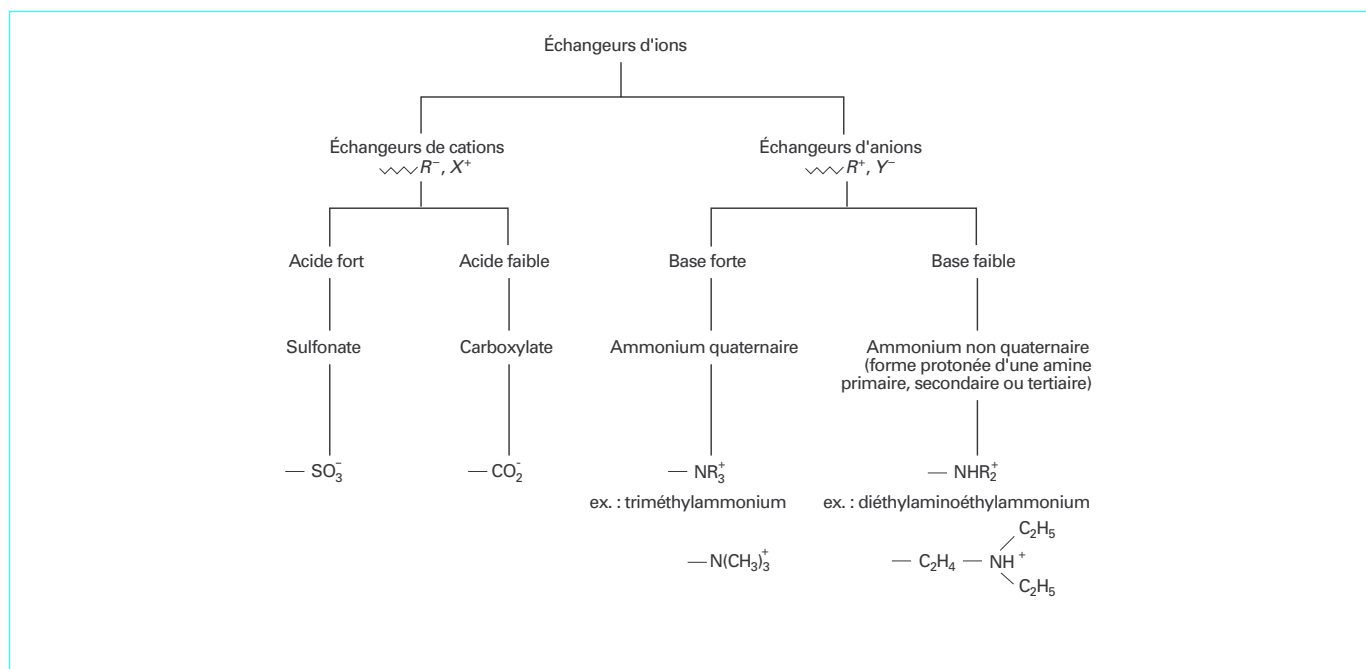


Figure 22 - Classification des groupements fonctionnels des échangeurs d'ions

Le choix du type de groupement fonctionnel est régi par la nature du problème de séparation : on fera appel à un échangeur de cations dans le cas de la séparation d'amines ou de bases azotées sous forme protonée, à un échangeur d'anions pour des acides carboxyliques, sulfoniques ou des nucléotides.

5.1.1.2 Structure de la matrice

Le greffage des groupements échangeurs d'ions est effectué soit sur des microparticules de silice poreuse, soit sur des copolymères organiques de structure macroporeuse. Le support siliceux présente l'avantage d'une grande résistance mécanique, d'une bonne accessibilité mais aussi l'inconvénient majeur de ne pouvoir être mis en œuvre à des valeurs de pH supérieures à 7,5, ce qui limite beaucoup son utilisation pour la séparation des anions, bases conjuguées d'acides faibles.

Les polymères organiques généralement de type poly(styrène/divinylbenzène) (PS/DVB), plus rarement polyacrylate, existent sous la forme de microparticules ou macroporeuses.

Dans le premier cas, les pores sont répartis de manière uniforme dans le polymère ; la porosité est déterminée par le pourcentage massique de divinylbenzène dans le copolymère (taux de pontage : il est désigné par la lettre X suivi du pourcentage en divinylbenzène ; ainsi, X8 désigne un taux de pontage de 8 %). La principale difficulté réside dans le fait que, pour obtenir une résistance mécanique satisfaisante, il faut un taux de pontage relativement élevé alors que pour avoir une bonne accessibilité il faut un

taux de pontage faible. Le compromis généralement adopté correspond à un taux de pontage de 8 % mais les propriétés mécaniques demeurent médiocres.

Dans le second cas, les pores ne sont pas répartis de manière uniforme dans le polymère, lequel comporte des régions fortement réticulées inaccessibles aux solutés mais lui conférant sa rigidité et des régions peu réticulées où se produisent les échanges ioniques (figure 24).

Les capacités d'échange d'ions dépendent, bien sûr, de la nature de la matrice et des groupements fonctionnels. Elles varient dans le cas des échangeurs de cations de 1 meq · g⁻¹ (milliéquivalent par gramme) pour les silices à 5 meq · g⁻¹ pour les résines macroporeuses (1 équivalent correspond à une mole de charge).

5.1.2 Mécanismes

On rencontre, souvent simultanément, plusieurs types de mécanismes de rétention, se superposant aux interactions ioniques entre les solutés et les groupements fonctionnels. Dans certains cas, la séparation obtenue est uniquement fondée sur ces interactions secondaires, de caractère non ionique, tel que le partage d'espèces non ionisées entre la solution interne des particules d'échangeur et la phase éluante.

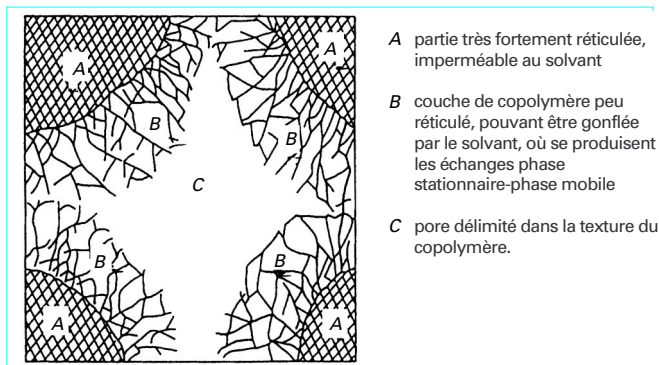
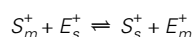


Figure 23 – Représentation d'un copolymère de styrène et de divinylbenzène macroporeux

5.1.2.1 Échange simple

Dans le cas d'un échangeur de cations, initialement sous la forme d'un ion E^+ (ion éluant ou ion développeur), placé au contact d'une solution totalement ionisée contenant des ions S^+ , il s'établit un équilibre d'échange d'ions :

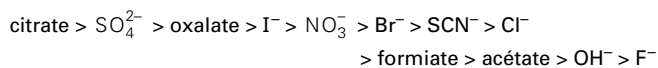


les indices m et s représentant respectivement les phases mobiles et stationnaire.

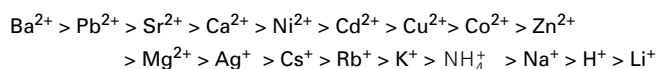
La rétention du soluté S^+ est régie par :

- la différence d'affinité entre S^+ et E^+ pour l'échangeur d'ions considéré,
- la concentration de E^+ dans la phase éluante.

Les différences d'affinité dépendent essentiellement des caractéristiques physiques des ions solvatés. En règle générale, l'échangeur d'ions marque une préférence pour les ions porteurs de la charge la plus grande, les ions de plus petites dimensions (ions solvatés) et les ions de plus forte polarisabilité. Ainsi, avec un échangeur d'anions du type ammonium quaternaire, l'ordre d'affinité est le suivant :



Avec un échangeur de cations du type sulfonate, on a :



Cet ordre d'affinité des ions inorganiques simples est important car il régit en partie la force éluante des phases mobiles utilisées. Par exemple, dans le cas d'une séparation sur échangeur d'anions, l'utilisation de l'ion nitrate comme ion développeur conduit, toutes choses égales par ailleurs, à une élution beaucoup plus rapide que l'utilisation de l'ion chlorure. De même, avec un échangeur de cations, une solution d'un tampon de pH préparée avec des sels de potassium a une force éluante plus élevée que la même solution préparée avec des sels de sodium ou, a fortiori, de lithium.

D'autres facteurs que la charge, la dimension et la polarisabilité des ions peuvent influencer sur la sélectivité : ce sont toutes les interactions, de nature autre qu'électrostatique, entre les ions échangés, les groupements fonctionnels et la matrice. Ainsi, certains ions organiques, s'ils renferment des noyaux aromatiques, sont soumis, en plus des forces d'attraction électrostatique de la part des groupements fonctionnels, à des interactions par électrons π de la part d'une matrice PS/DVB ou de silices porteuses d'un bras comportant un noyau aromatique.

Outre la nature de l'ion développeur, la force éluante d'une phase mobile dépend de sa concentration (déplacement de l'équilibre précédent par action de masse).

5.1.2.2 Réactions chimiques couplées à l'échange simple

Dans le cas de composés très voisins, les différences de caractéristiques physiques des ions solvatés sont souvent insuffisantes pour permettre leur séparation avec une résolution convenable. Il faut associer des réactions chimiques dans la phase mobile à l'échange d'ions simple, ces réactions modifiant l'état d'ionisation des solutés à séparer. On conçoit ainsi que l'on puisse modifier la sélectivité d'une séparation en associant à l'échange simple une réaction chimique dans la phase éluante (réaction acide - base ou de formation de complexes).

5.1.2.2.1 Séparation des lanthanides

La séparation des lanthanides par chromatographie d'échange d'ions peut être obtenue sur échangeur de cations en superposant à la réaction d'échange simple, pour laquelle les différences d'affinité sont quasi nulles, une réaction de formation de complexes en solution, avec l'acide 2-méthyllactique.

On voit que le lanthane, qui forme le complexe le moins stable, est le plus fortement retenu par l'échangeur de cations tandis que les couples les plus difficiles à séparer (Lu/Yb, Gd/Eu, Nd/Pr) correspondent aux constantes de stabilité de complexes les plus voisines (figure 25).

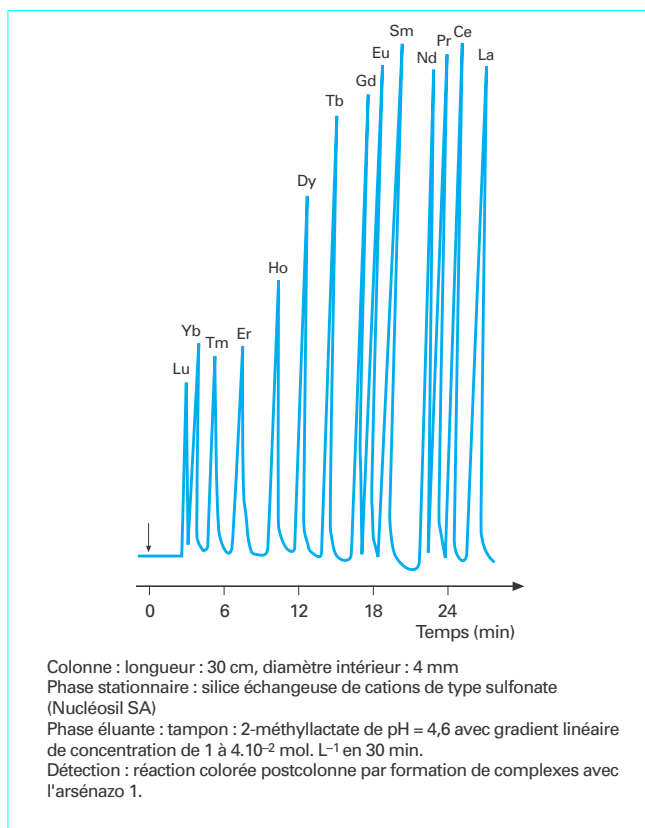


Figure 24 – Séparation des lanthanides par chromatographie d'échange de cations, d'après [37]

5.1.2.2 Séparation des acides aminés

La séparation des acides aminés $H_2N-R-COOH$ est fondée sur ce principe. En milieu acide, l'espèce $^+H_3N-R-CO_2H$ prédomine, et peut être fixée sur un échangeur de cations.

Si l'on élué avec des solutions tampons de pH croissant, on doit observer l'élution des différents acides aminés dans l'ordre de leur pK_A puisque, lorsque $pH > pK_A$, c'est la forme $^+H_3N-R-CO_2^-$, globalement non chargée, donc non retenue, qui prédomine. En réalité,

l'ordre d'élution ne dépend pas seulement des propriétés acide-base des composés mis en jeu, mais aussi des dimensions des ions présents, en vertu des lois de l'échange simple, de même que du partage des formes dipolaires.

Dans les méthodes modernes d'analyse des acides aminés, on fait souvent varier le pH de façon continue en utilisant un gradient de pH (figure 26). On notera l'influence de la forme du gradient sur la séparation obtenue (séparation du triplet leucine, isoleucine, norleucine et séparation des acides aminés « basiques »).

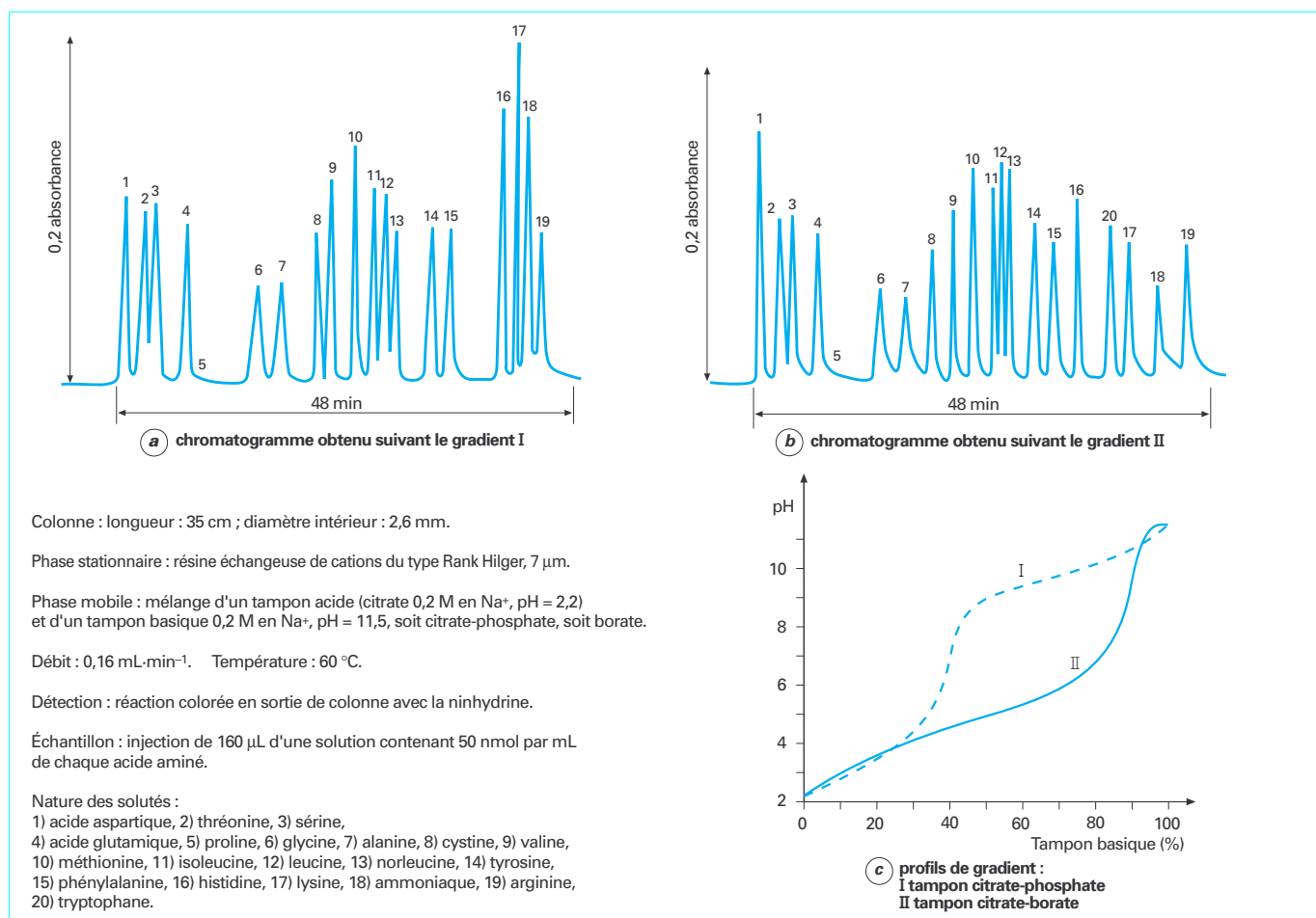


Figure 25 – Séparation des acides aminés par chromatographie d'échange d'ions, d'après [36]

5.1.2.3 Exclusion d'ions

L'exclusion d'ions est fondée sur la répulsion électrostatique : les ions de même signe que les groupements fonctionnels de la phase stationnaire sont exclus de celle-ci. Il est clair que, pour une espèce ionisable, l'exclusion croît avec le degré d'ionisation. Ce phénomène peut être mis à profit, par exemple, pour la séparation d'un mélange d'acides faibles de pK_A différents. La figure 27b illustre l'influence du pH de la phase éluante sur la séparation, au moyen d'un échangeur de cations sous la forme H^+ , des acides mono-, di- et trichloroacétiques dont les pK_A sont respectivement 2,8 ; 1,48 et 0,7.

En solution très diluée dans l'eau désionisée, seul l'acide le plus faible n'est pas totalement ionisé et se partage par équilibre de Donnan, alors que les deux autres acides, pratiquement totalement à l'état d'anions, sont exclus de la résine et apparaissent très mal séparés au temps de rétention nul. À pH 3, les deux acides les plus forts restent pratiquement exclus, alors que l'acide monochloroacétique n'est que faiblement ionisé : son temps de rétention augmente. À pH 2, l'ionisation de l'acide dichloroacétique diminue ($pK_A = 1,4$) d'où une exclusion décroissante et l'augmentation du temps de rétention, permettant la séparation des trois acides (figure 27a).

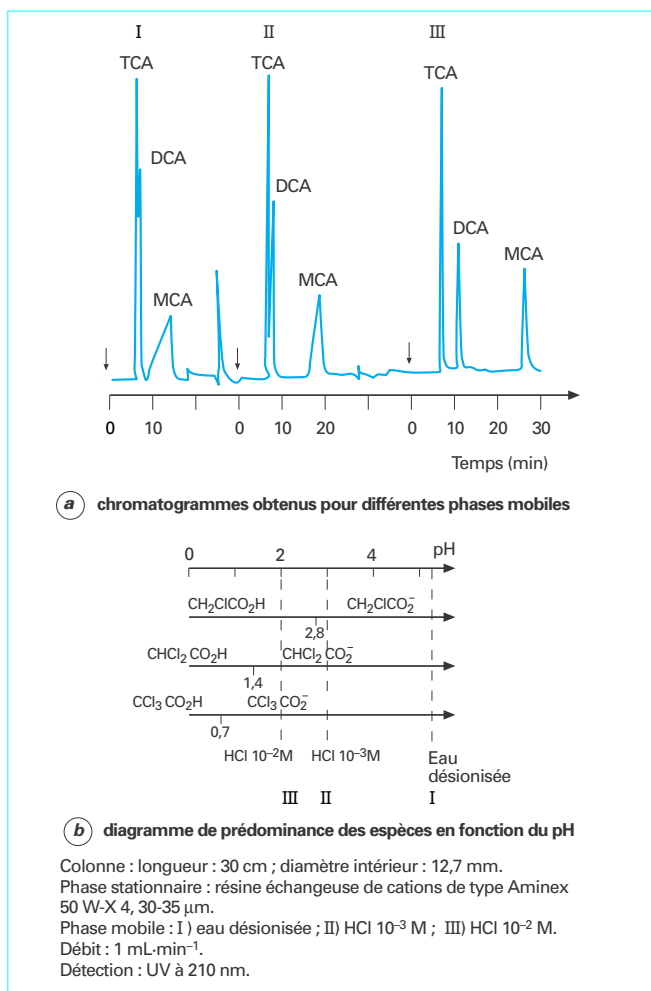


Figure 26 – Séparation des acides mono-, di- et trichloroacétiques (MCA, DCA et TCA) par chromatographie d'exclusion d'ions, d'après [38]

5.1.2.4 Partage par équilibre de Donnan

Les solutés non ioniques ne sont pas sujets aux interactions électrostatiques et peuvent donc pénétrer dans le réseau macroporeux de l'échangeur. Le partage d'un soluté *M* entre les deux phases est caractérisé par le coefficient de distribution :

$$K_M = \frac{|M|_s}{|M|_m}$$

et est gouverné par l'ensemble des interactions non ioniques, en particulier hydrophobes et par transfert de charges, auxquelles sont soumises les molécules de *M*.

Un exemple classique de mise en œuvre de ce mécanisme est la séparation des sucres (figure 28) sur des résines échangeuses de cations sous les formes Ca²⁺ ou Pb²⁺.

La sélectivité des séparations dépend de la forme ionique de la résine ; la phase éluante est souvent constituée d'eau pure, ce qui facilite la détection à très faible longueur d'onde ou encore par réfractométrie différentielle.

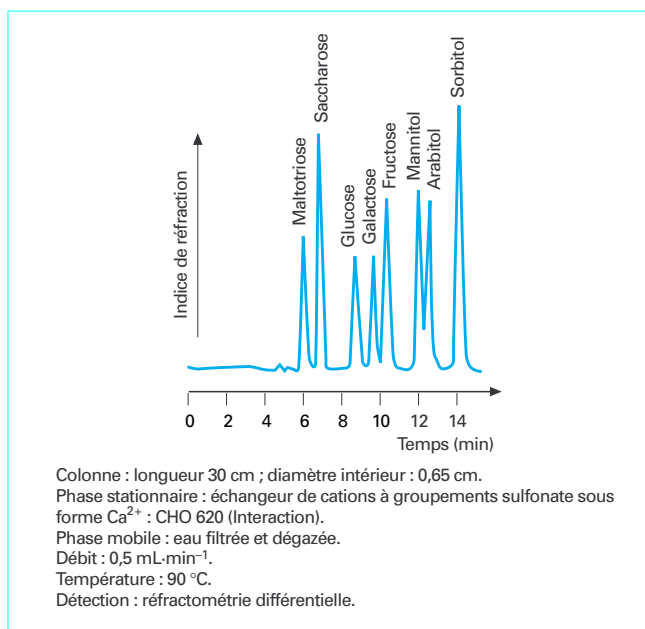


Figure 27 – Séparation de monosaccharides par partage sur un échangeur de cations à matrice PS-DVB sous forme calcium, d'après [39]

5.1.3 Choix de la phase mobile

On utilise le plus souvent une solution aqueuse en raison du caractère ionisant et dissociant de l'eau. Dans la mesure où l'on opère souvent à ionisation partielle des solutés organiques, on est fréquemment conduit à ajouter un alcool (méthanol ou éthanol) à la phase aqueuse afin d'accroître la solubilité des formes non ioniques.

Cette addition, en modifiant les caractéristiques du partage par équilibre de Donnan, peut entraîner une variation de la sélectivité.

Trois paramètres interviennent dans le choix de la phase mobile : le pH, la nature et la concentration de l'ion développeur.

5.1.3.1 Choix du pH

C'est le facteur le plus important qu'il faut optimiser en premier puisqu'il régit grandement la sélectivité. Étant donné qu'un accroissement du taux d'ionisation entraîne une augmentation de la rétention, il est judicieux d'effectuer les essais préliminaires, en régime isocratique, à un pH où la fraction ionisée du soluté est faible (3 à 10 %), ce qui correspond à un écart au pK_A de plus ou moins 1 à 1,5 unité de pH. Le rôle du pH de la phase éluante demeure toujours déterminant dans le cas de la mise en œuvre de réactions de formation de complexes car celles-ci sont sensibles au pH (les anions complexants sont des bases faibles).

5.1.3.2 Nature de l'ion développeur

La rétention des espèces dépend de la nature de l'ion développeur (§ 5.1.2.1) : plus la résine a d'affinité pour celui-ci, plus faible est la rétention. Ce peut être un des ions du tampon ou, si celui-ci est trop faiblement ou au contraire trop fortement retenu, un ion introduit par addition d'un électrolyte convenable en concentration supérieure à celle du tampon.

Les composés les plus souvent utilisés pour préparer des solutions tampons en chromatographie d'échange d'ions sont les phos-

phate, acétate, borate et formiate de sodium, potassium et ammonium dans le cas des échangeurs de cations et l'ammoniaque, la pyridine, etc., dans le cas des échangeurs d'anions.

5.1.3.3 Concentration de l'ion développeur

Une augmentation de la concentration de l'ion développeur entraîne toujours une diminution de la rétention : le facteur de capacité d'une espèce est inversement proportionnel à la concentration de l'ion développeur dans l'éluant.

5.1.4 Applications

Outre les séparations présentées lors de l'étude des mécanismes de séparation, la chromatographie d'échange d'ions est principalement mise en œuvre pour l'analyse des fluides biologiques (métabolisme de molécules médicamenteuses, enchaînement peptidique [40], etc.). On trouvera dans [41] de nombreux exemples d'applications.

5.2 Chromatographie de paires d'ions

La chromatographie de paires d'ions encore appelée chromatographie d'interactions d'ions constitue une alternative à la chromatographie d'échange d'ions pour l'analyse de composés ionisés ou ionisables. Son principal avantage tient à ce qu'elle ne nécessite pas la mise en œuvre de phases stationnaires échangeuses d'ions, utilisant les phases stationnaires apolaires de la chromatographie de partage à polarité de phases inversée.

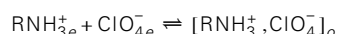
On appelle « paire d'ions » l'entité formée par l'association de deux ions de charge opposée. Cette association peut être due :

- soit à des interactions électrostatiques : de telles paires d'ions s'observent dans les solvants de faible constante diélectrique ;
- soit à des effets hydrophobes : les ions organiques de grande taille comportant une partie apolaire et un groupement ionique s'associent en paires d'ions en solution aqueuse, formant des cavités telles que la structure de l'eau soit perturbée le moins possible.

La propriété fondamentale des paires d'ions est leur aptitude à passer des solutions aqueuses aux milieux de faible constante diélectrique.

Exemples

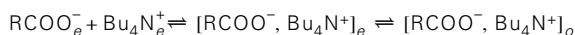
■ Considérons, en phase aqueuse, la forme protonée d'une amine à courte chaîne RNH_3^+ . En présence d'anions perchlorate ClO_4^- , on peut observer l'extraction du perchlorate d'amine dans un solvant légèrement polaire de faible constante diélectrique, par exemple un mélange butanol-chlorure de méthylène-hexane :



les indices e et o désignant, respectivement, les phases aqueuse et organique.

La formation de la paire d'ions est due ici principalement à des interactions électrostatiques (association coulombienne).

■ Soit, en phase aqueuse à pH 7-8, l'anion d'un acide carboxylique $\text{R}-\text{COO}^-$ en présence d'un cation ammonium quaternaire comportant des chaînes alkyle hydrophobes, par exemple le cation tétrabutylammonium Bu_4N^+ . Il y a formation de la paire d'ions en phase aqueuse en raison du caractère hydrophobe du cation ammonium quaternaire. Cette paire d'ions peut être extraite par un solvant organique de faible constante diélectrique, comme dans l'exemple précédent :



De façon pratique, la chromatographie de paires d'ions met en œuvre une phase stationnaire apolaire, souvent une silice greffée alkyle (octyle ou octadécyle) et une phase mobile hydro-organique contenant un **contre-ion**, ion de charge opposée à celle des solutés et comportant une partie hydrophobe.

5.2.1 Phases stationnaires

Comme nous venons de le mentionner, les silices greffées octyle et octadécyle sont majoritairement utilisées en chromatographie de paires d'ions. Toutefois, le contre-ion, présent de façon permanente dans la phase éluante, se fixe sur les chaînes alkyle de sorte que la phase stationnaire effective comporte des greffons recouverts par le contre-ion.

■ Étude de la fixation du contre-ion en l'absence de solutés

La quantité de contre-ion fixée par la phase stationnaire est déterminée à partir du volume de phase éluante nécessaire à l'atteinte de l'équilibre : l'effluent de la colonne chromatographique a alors la même concentration en contre-ion que l'influent.

En répétant cette détermination pour différentes concentrations de contre-ion en phase éluante et pour différents teneurs en solvant organique de celle-ci, on peut établir des isothermes de fixation du contre-ion.

À titre d'exemple, la figure 29 montre les isothermes de distribution du dodécansulfonate de sodium entre une silice greffée octyle et des phases éluantes contenant de l'eau, de l'acétonitrile et du dodécansulfonate de sodium à des teneurs variables.

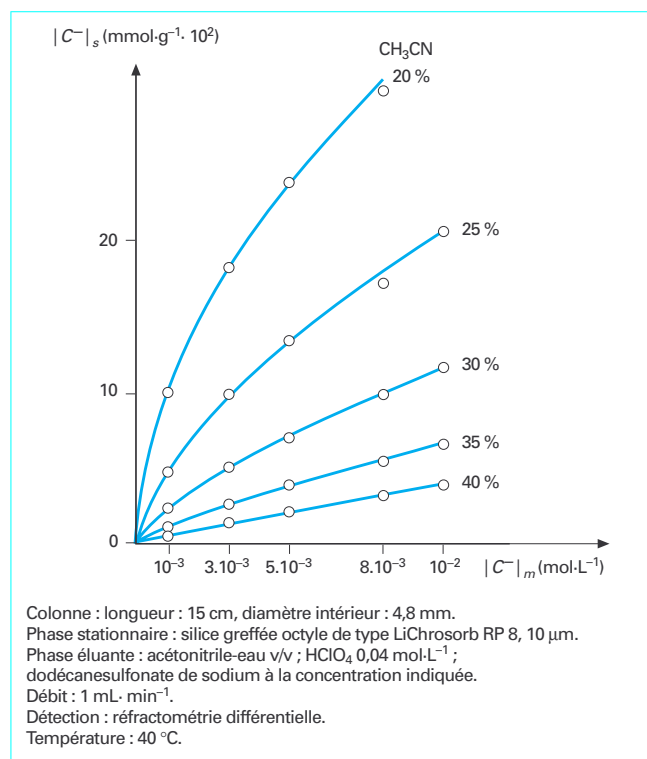
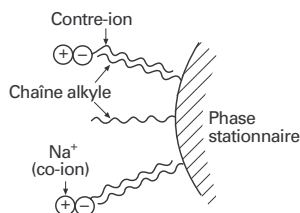


Figure 28 – Isothermes de distribution du dodécansulfonate de sodium, d'après [42]

On observe que la concentration du contre-ion dans la phase stationnaire augmente avec sa concentration dans la phase éluante et la teneur en eau de celle-ci. Cette dernière observation jointe au fait que la fixation du contre-ion est d'autant plus importante que sa chaîne hydrocarbonée est plus longue conduit à interpréter son mécanisme de fixation comme résultant d'un effet hydrophobe. Par ailleurs, on montre que le taux de recouvrement des chaînes alkyle par le contre-ion n'excède jamais 30 à 40 %. Le schéma ci-après donne une représentation de la phase stationnaire réelle, comportant à la fois des chaînes alkyle recouvertes par le contre-ion et des chaînes alkyle libres :



Le recouvrement partiel des chaînes par le contre-ion peut s'interpréter comme le résultat de la répulsion coulombienne entre groupements ionisés de même signe lorsque des contre-ions occupent des chaînes alkyle trop proches.

5.2.2 Mécanismes

Compte tenu de la structure de la phase stationnaire après équilibre avec la phase éluante, deux mécanismes de rétention coexistent :

- échange d'ions avec le co-ion assurant l'électroneutralité vis-à-vis du contre-ion fixé par effet hydrophobe à la surface des chaînes alkyle (la partie ionisée est dirigée vers la phase mobile polaire) ; on génère ainsi *in situ* un échangeur d'ions dont la capacité dépend de la concentration du contre-ion dans la phase éluante (on parle « d'échangeur d'ions dynamique ») ;
- partage hydrophobe, à la surface des chaînes demeurées libres, de paires d'ions formées entre les solutés qui doivent être alors suffisamment hydrophobes et les contre-ions.

Ces deux mécanismes sont schématisés sur la figure 30.

5.2.3 Choix de la phase mobile

Du double mécanisme précédent il résulte que la rétention des solutés dépend de leur degré d'ionisation, de la capacité disponible de l'échangeur dynamique qui fait intervenir elle-même la teneur en solvant organique, la nature et la concentration du contre-ion dans la phase éluante.

Ainsi la figure 31 montre les variations du facteur de capacité du cation 2, 4, 6-triméthylpyridinium en fonction de la fraction volumique d'acétonitrile et de la concentration du contre-ion, l'octanesulfonate, dans la phase mobile. On constate que :

- pour une teneur en acétonitrile fixée, la rétention du soluté croît avec la concentration du contre-ion dans la phase éluante : la capacité de l'échangeur d'ions dynamique croît du fait de l'augmentation du nombre de chaînes recouvertes par le contre-ion (cf. isothermes de distribution du contre-ion figure 29) ;
- pour une concentration du contre-ion fixée, la rétention diminue lorsque la teneur en acétonitrile dans la phase éluante augmente : la concentration du contre-ion en phase stationnaire diminue et partant le nombre de sites échangeurs d'ions et les effets hydrophobes du partage des paires d'ions solutés-contre-ions sont

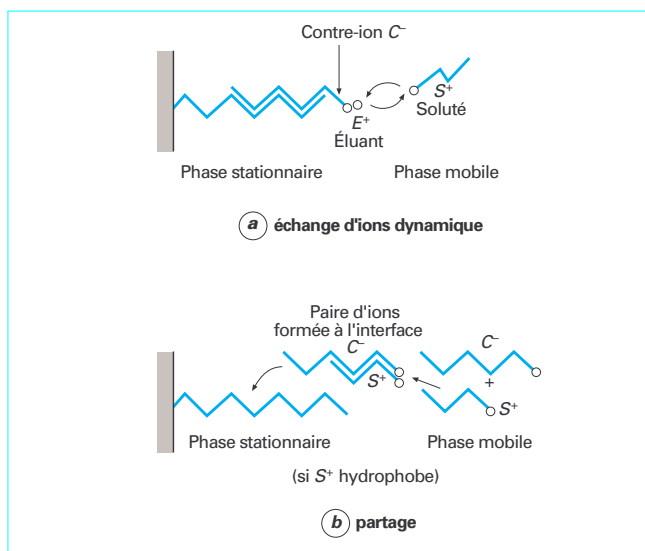


Figure 29 – Représentation des mécanismes de la chromatographie de paires d'ions

également diminués du fait de la diminution de la teneur en eau de la phase éluante.

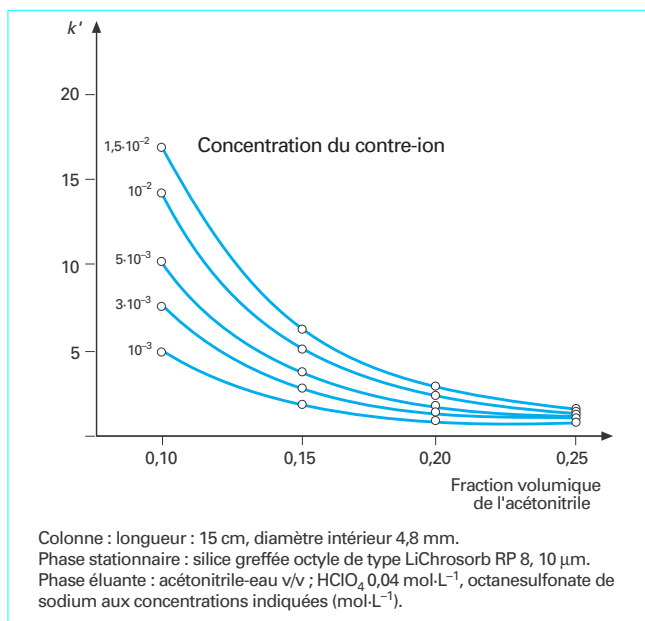


Figure 30 – Variation du facteur de capacité du cation 2, 4, 6-triméthylpyridinium en fonction de la fraction volumique de l'acétonitrile dans la phase éluante, d'après [43]

De même, la rétention des solutés augmente avec la longueur de la chaîne hydrocarbonée du contre-ion (augmentation du caractère hydrophobe de ce dernier, ce qui est favorable à sa fixation par la phase stationnaire alkyle et à la formation de paires d'ions).

Le tableau 10 rassemble les principaux contre-ions utilisés en chromatographie de paires d'ions.

Tableau 10 – Principaux contre-ions utilisés en chromatographie de paires d'ions	
Anioniques	Cationiques
Alkyl- et arylsulfonates pentanesulfonate hexanesulfonate octanesulfonate dodécanesulfonate camphosulfonate naphtalènesulfonate	Ammonium quaternaires tétraméthylammonium tétraéthylammonium tétra-butylammonium tétraheptylammonium cétyltriméthylammonium (cétrimide) palmityltriméthylammonium
Alkylsulfates hexylsulfate octylsulfate décylsulfate dodécylsulfate	Amines protonées octylammonium trioctylammonium
Anions inorganiques trifluoroacétate trichloroacétate phosphate perchlorate	

Comme en chromatographie d'échange d'ions, l'influence du pH de la phase éluante est importante pour les acides et les bases faibles car il régit leur degré d'ionisation. À titre d'exemple la figure 32 montre les variations de la rétention de deux acides aminés, la phénylalanine et l'histidine dont les propriétés acido-basiques sont différentes ainsi que leur caractère hydrophobe.

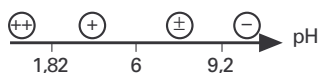
Nota : la mise en œuvre (déconseillée) d'un gradient de solvant en chromatographie de paires d'ions implique d'utiliser des phases mobiles isocapacitives en contre-ion, c'est-à-dire maintenant constante la concentration du contre-ion dans la phase stationnaire. Cette mise en œuvre ne peut guère se concevoir que sous la forme d'un *step gradient* où chaque phase éluante aura une concentration en contre-ion déduite du tracé de l'isotherme de distribution de ce dernier.

La phénylalanine a deux constantes d'acidité et peut exister sous les formes suivantes en fonction du pH :



Son indice de Rekker est 2,24, c'est une espèce hydrophobe ; sa rétention augmente fortement au-dessous de pH 3,5 par échange d'ions sur les chaînes alkyle recouvertes de l'anion dodécylsulfate et partage des paires d'ions hydrophobes.

L'histidine a trois constantes et quatre formes sont possibles en fonction du pH :



C'est une espèce hydrophile (indice de Rekker : - 0,23) ; sa rétention augmente au-dessous de pH 6, essentiellement par échange d'ions ; son caractère hydrophile fait que le partage reste peu important.

5.2.4 Applications

Les applications sont essentiellement consacrées aux séparations des solutés ionisés et ionisables (à ce titre, elles recouvrent celles de la chromatographie d'échange d'ions) seuls ou en présence de solutés moléculaires dans des mélanges complexes. À titre d'exemples,

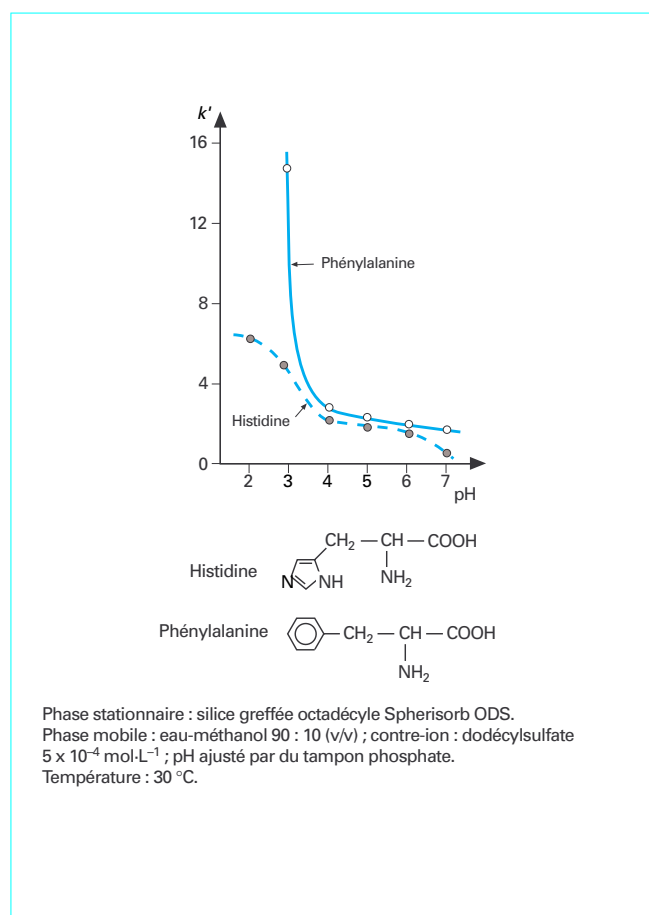


Figure 31 – Influence du pH sur la rétention de la phénylalanine et de l'histidine, d'après [43]

la figure 33 montre une séparation d'anions arsénés, organiques et inorganiques, utilisant comme contre-ion le cation tétra-butylammonium, et la figure 34 une séparation de composés pharmaceutiques. La figure 34a montre la séparation obtenue avec le pentanesulfonate comme contre-ion et un mélange équimolaire eau-méthanol. La figure 34b montre l'effet d'une modification de la teneur en eau de la phase éluante, et la figure 34c l'influence d'une augmentation de la longueur de la chaîne hydrocarbonée du contre-ion. Au pH de l'éluant, le soluté 1 est présent sous la forme anionique et subit le phénomène d'exclusion d'ions, son temps de rétention demeure invariant ; les solutés 2, 3, 4 et 6 sont présents à l'état de cations et sont séparés par chromatographie de paires d'ions, leur rétention augmente avec la teneur en eau de la phase éluante et avec la longueur de la chaîne du contre-ion.

Le soluté 5 (phénacétine) restant toujours sous forme moléculaire est retenu exclusivement par partage hydrophobe à la surface des chaînes alkyle non recouvertes par le contre-ion : sa rétention n'est sensible qu'aux proportions mutuelles eau-méthanol d'où l'inversion de l'ordre d'éluant des pics d'éluant 4 et 5 entre les chromatogrammes a et b d'une part et c d'autre part.

On trouvera dans [46] une revue sur les principales applications de la chromatographie de paires d'ions dans les domaines pharmaceutique et biologique.

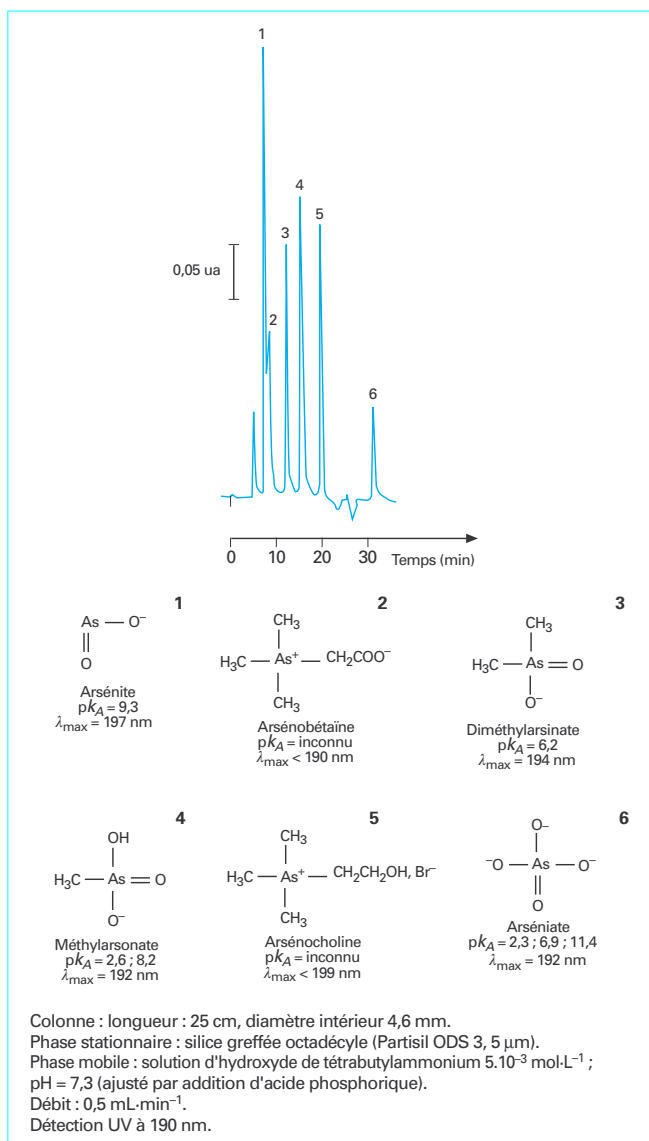


Figure 32 – Séparation d'anions arsénés par chromatographie de paires d'ions, d'après [44]

6. Séparation de solutés donneur ou accepteur de doublets électroniques

Les deux méthodes chromatographiques évoquées ici s'appliquent uniquement aux solutés capables de former des complexes :

- avec un cation métallique appartenant à la famille des éléments de transition, c'est l'échange de ligands (§ 6.1) ;
- avec un greffon organique apte à former un complexe accepteur-donneur d'électrons π , c'est le transfert de charges (§ 6.2).

6.1 Chromatographie d'échange de ligands

Le mécanisme de la séparation est fondé sur la réaction de formation de complexes entre un soluté donneur de doublets électroniques et un cation métallique présentant des orbitales vacantes facilement accessibles du point de vue énergétique.

Nota : on distingue la chromatographie par échange de ligands qui permet de séparer différents solutés basiques (ligands) en utilisant un seul cation métallique de la chromatographie d'échange de complexes utilisée pour séparer plusieurs cations métalliques, par exemple, les terres rares, par formation de complexes avec un seul ligand.

Les cations métalliques utilisés sont principalement ceux des métaux de transition : Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} qui donnent des complexes stables avec des ligands très variés.

On distingue, en chromatographie d'échange de ligands, les modes :

- *statique* : le cation métallique est fixé dans la phase stationnaire par des liaisons ioniques et (ou) covalentes ; les réactions de formation de complexes ont lieu dans la phase stationnaire ;
- *dynamique* : les réactions de formation de complexes ont lieu dans la phase mobile et la séparation est fondée sur les différences de distribution de ces complexes entre les phases mobile et stationnaire.

Nous décrivons principalement le mode statique qui a reçu le plus d'applications.

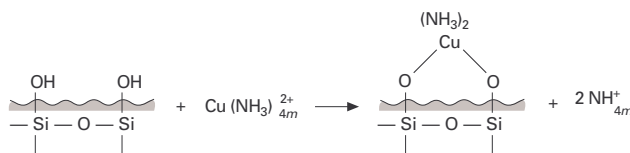
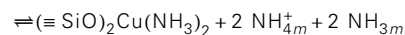
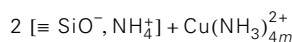
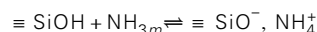
Nota : la chromatographie d'échange de ligands est aussi utilisée pour la séparation des énantiomères, par exemple avec une phase stationnaire comportant un carbone asymétrique et capable de former des complexes diastéréoisomères labiles avec un métal de transition comme le cuivre (II), voir [112].

6.1.1 Mode statique

L'ion cuivrique (le plus utilisé) peut être immobilisé au sein d'une phase stationnaire par fixation soit sur des résines échangeuses de cations, soit, de façon plus moderne, sur des silices.

En effet, un gel de silice fixe les ions Cu^{2+} en présence d'ammoniac selon la réaction :

Dans les conditions utilisées pour le « cuivrage » d'une colonne remplie de silice vierge, on peut écrire que l'équilibre est atteint en deux étapes :



La nature fortement covalente de la liaison silicate-cuivre a été mise en évidence par des mesures d'écho de spin électronique [47] et par les méthodes usuelles d'étude des équilibres [48].

Ces silices recouvertes de silicate de cupridiamine possèdent toutes les propriétés remarquables des gels de silice : granulométrie fine (3, 5, 10 μm) et homogène, excellente résistance à la pression, remplissage aisé des colonnes, prix peu élevé.

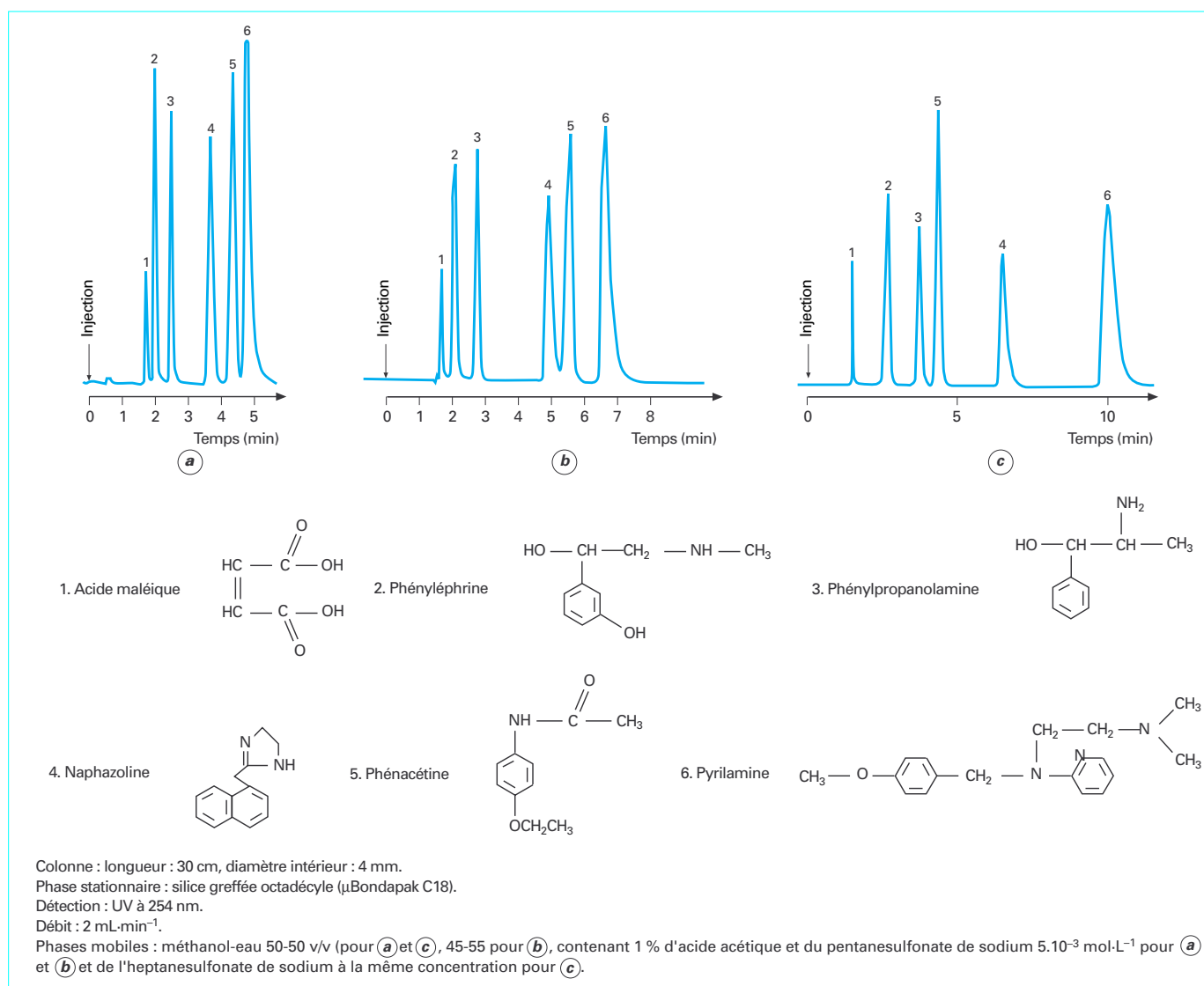
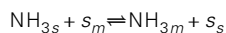


Figure 33 – Séparation par chromatographie de paires d'ions de composés d'intérêt pharmaceutique, d'après [45]

En présence d'un soluté *s* donneur de doublet, on a la réaction d'échange de ligands simple :



Les indices *m* et *s* désignent respectivement les phases stationnaire et mobile.

On montre que le coefficient de distribution du soluté est proportionnel à la concentration du cuivre en phase stationnaire (capacité disponible du support), à la constante d'échange de l'équilibre précédent et inversement proportionnel à la concentration de l'ammoniacque dans la phase mobile. À ce mode de rétention, il convient d'adjoindre, selon les propriétés des solutés, un mécanisme de partage hydrophile. En effet, les silices « cuivrées » possèdent un caractère encore plus hydrophile que les silices vierges en raison de la solvataion par l'eau des sites $(\equiv \text{SiO})_2 \text{Cu}(\text{NH}_3)_2$. En conséquence, la phase mobile utilisée est, en général, un mélange ternaire eau-acé-

tonitrile-ammoniacque (afin de conserver la stabilité de la phase stationnaire, il est conseillé de mettre en œuvre des phases éluantes contenant plus de 50 % d'eau en volume ou des solvants protiques tel le méthanol).

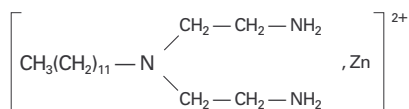
La rétention des solutés est alors la résultante des deux mécanismes précédents. La concentration d'ammoniacque et la fraction volumique d'eau de la phase mobile ont un effet très différent sur les facteurs de capacité des solutés selon leur appartenance aux quatre classes suivantes :

- solutés peu complexants et hydrophobes : les facteurs de capacité seront très faibles ;
- solutés peu complexants et hydrophiles : ils seront très sensibles aux variations de la teneur en eau ;
- solutés complexants et hydrophobes : ils seront très sensibles aux variations de la concentration en ammoniacque ;
- solutés complexants et hydrophiles : les facteurs de capacité seront élevés et varieront avec les deux paramètres.

Foucault et al. [49] ont montré comment la mise en œuvre de courbes isocapacitives permet le choix raisonné des conditions d'une séparation.

6.1.2 Mode dynamique

La phase mobile contient un complexe d'un métal de transition avec un ligand comportant une chaîne hydrophobe appropriée, par exemple le zinc (II)-*N*-dodécyldiéthylènetriamine [50] :



La phase stationnaire est une silice greffée alkyle capable de fixer le complexe précédent par interaction hydrophobe.

Les proportions du ligand hydrophobe et du zinc (II) doivent être telles que le zinc (II) conserve des sites de coordination libres ou occupés par des molécules de solvant faiblement liées (pas d'excès de ligand hydrophobe).

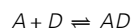
Une séparation chromatographique de solutés donnant des complexes avec le zinc (II) est possible en raison de leur distribution entre les sites de coordination du zinc (II) fixé par la phase stationnaire et du zinc (II) présent dans la phase mobile.

6.1.3 Applications

La figure 35 montre l'application de la chromatographie d'échange de ligands à la séparation des produits de dégradation enzymatique d'un pentapeptide, la méthionine-enképhaline (se reporter à la figure 20 pour la signification des codes à trois lettres). Cette méthode a permis de suivre en continu la cinétique de cette dégradation dans les extraits de cerveau de souris [51]. On trouvera d'autres exemples d'applications à l'analyse de peptides et d'hydrolysats de protéines dans [52] et [53].

6.2 Chromatographie par transfert de charges

Certains composés sont capables de transférer un électron à une autre entité moléculaire : on les appelle *donneurs* d'électrons *D* (on les désigne aussi sous le qualificatif de composés π acide, l'accepteur d'électrons étant appelé composé π basique). Les composés auxquels il est possible de transférer un électron sont dits *accepteurs* d'électrons *A*. On parle de complexes donneur-accepteur d'électrons (*DAE*) dont la formation peut être représentée par l'équilibre :



Il s'agit d'une réaction réversible, en général extrêmement rapide, qui peut être caractérisée par la constante d'équilibre de formation :

$$K_C^{AD} = \frac{|AD|}{|A||D|}$$

L'enthalpie de formation des complexes *DAE* est de l'ordre de quelques $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Il s'agit donc d'interactions faibles mais qui sont généralement très spécifiques. Dans certains cas, la même molécule

peut agir comme donneur ou accepteur d'électrons selon la nature de la molécule antagoniste.

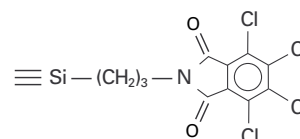
Les hydrocarbures aromatiques sont généralement des composés donneurs d'électrons dont le pouvoir donneur augmente avec le nombre de cycles aromatiques.

La présence de substituants donneurs d'électrons (alkyle, alkoxy, amine) accroît le caractère donneur. Inversement, la présence de substituants attracteurs d'électrons (NO_2 , Cl, Br, CN) diminue le caractère donneur des composés aromatiques.

La formation de complexes *DAE* peut être utilisée pour exercer une rétention en chromatographie en phase liquide. On parle de chromatographie donneur-accepteur d'électrons ou de chromatographie par transfert de charges.

Les complexes *DAE* peuvent être formés soit dans la phase mobile, soit dans la phase stationnaire. Toutefois, grâce aux possibilités offertes par le greffage, sur gel de silice, de groupements donneur ou accepteur d'électrons, la formation de complexes *DAE* dans la phase stationnaire est la méthode la plus utilisée à laquelle nous nous limiterons dans ce qui suit.

De nombreuses phases stationnaires ont été étudiées [54], toutefois les silices greffées accepteurs d'électrons sont les plus utilisées et, parmi celles-ci, la silice greffée tétrachlorophthalimidopropyle est commercialisée :



La rétention dépend de la stabilité du complexe *DAE* formé entre la phase stationnaire et le soluté.

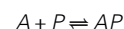
Les phases mobiles utilisées avec les silices accepteurs d'électrons sont, le plus souvent, du type *n*-hexane-dichlorométhane, chloroforme, éther de méthyltertiobutyle.

Trois équilibres peuvent donc être envisagés pour expliquer les variations de rétention des solutés avec la teneur de la phase mobile en modificateur polaire *P* :

— formation d'un complexe *DAE* entre les greffons libres *A* et le soluté *D* :



— interaction entre les greffons libres *A* et le modificateur polaire *P* :



— interaction entre les greffons solvatés par le modificateur polaire *P* et le soluté :

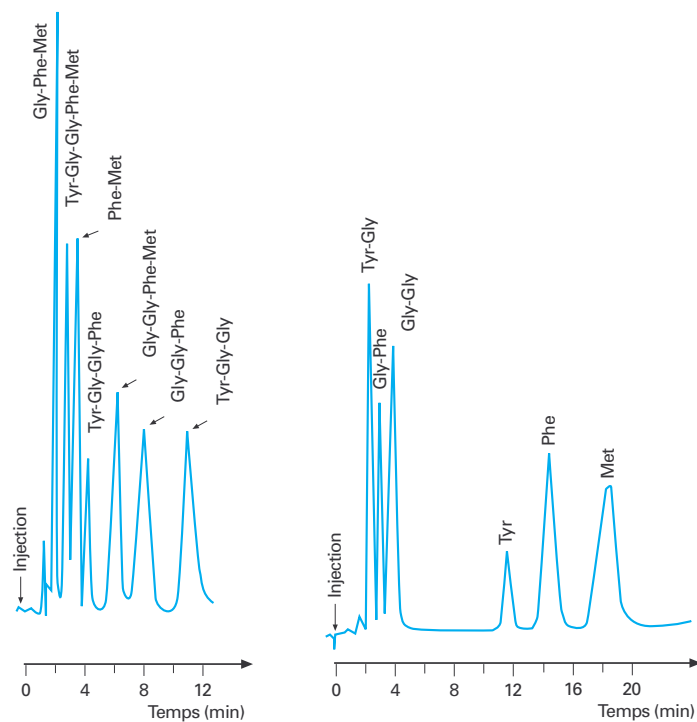


En fait, il a été montré, dans le cas des hydrocarbures aromatiques polynucléaires (HAP) [55], que les interactions soluté-greffon solvaté sont négligeables devant les interactions soluté-greffon libre. Pour un soluté donné, le facteur de capacité est ainsi proportionnel au rapport du nombre de greffons libres par unité de masse de phase stationnaire N' à la solubilité S_0 du soluté dans la phase mobile :

$$K' = Cte \cdot N' / S_0$$

N' est évidemment fonction de la nature du modificateur polaire et de sa teneur dans la phase mobile.

La nature des solutés joue un rôle important sur la rétention et a surtout été étudiée dans le cas des HAP. Le tableau 11 rassemble les valeurs des facteurs de capacité de quelques HAP sur une silice greffée tétrachlorophthalimidopropyle extrapolées pour l'isooctane pur.



Phase mobile : eau-acétonitrile
13 : 87 (v/v) contenant de
l'ammoniaque à la concentration
0,125 M
Débit : 1,5 mL·min⁻¹
Perte de charge : 50 bar
Détection : UV à 210 nm

a séparation des polypeptides

Phase mobile : eau-acétonitrile 70 : 30 (v/v)
contenant de l'ammoniaque à la
concentration 0,2 M
Débit : 1,5 mL·min⁻¹
Perte de charge : 100 bar
Détection : UV à 210 nm

b séparation des dipeptides et
des acides aminés

Colonne : longueur 20 cm ; diamètre intérieur : 4,8 mm.
Phase stationnaire : silice poreuse 5 µm type Partisil modifiée superficiellement par
formation de silicate de cuivre.
Nature des solutés : les codes à 3 lettres des acides aminés sont donnés sur la figure 19.

Figure 34 – Séparation des fragments de dégradation enzymatique de la méthionine-enképhaline par chromatographie d'échange de ligands en deux éluations isocratiques

Tableau 11 – Facteurs de capacité de quelques HAP sur silice greffée tétrachlorophthalimidopropyle extrapolés pour l'isooctane pur

Soluté	k'
Naphtalène	6,5
Fluoranthène	75,0
Benzo[b]fluoranthène	1 300
Benzo[k]fluoranthène.....	780
Benzo[a]pyrène	1 600
Indéno[1,2,3-cd]pyrène.....	2 100
Benzo[ghi]pérylène	2 600
Densité du greffage : 2,7 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$.	

On remarque les valeurs très importantes obtenues qui expliquent la rétention spécifique des HAP sur cette phase stationnaire en milieu apolaire [56]. La rétention augmente avec le nombre de noyaux aromatiques (densité des électrons π) mais elle dépend aussi de la disposition spatiale de ces noyaux. Un paramètre important est le rapport longueur/largeur L/l de l'hydrocarbure : plus ce rapport est grand, plus la rétention augmente.

Le tableau 12 rassemble l'influence des principaux paramètres caractéristiques du soluté sur la rétention.

Tableau 12 – Influence de paramètres structuraux caractéristiques sur la rétention des HAP [55]

Paramètre croissant	Rétention
Nombre et densité des électrons π	↗
Rapport L/l	↗
Nombre de cycles saturés	↘
Longueur des chaînes alkyle.....	→ ou ↘

Cette grande rétention des HAP dans des milieux apolaires permet d'extraire sélectivement ces composés dans des matrices complexes telles que les huiles moteurs, lubrifiantes, etc. On peut ainsi atteindre des concentrations minimales détectables comprises entre 50 ppt (1 ppt = 1 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$) et 5 ppb (1 ppb = 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) [57] [58].

7. Choix d'une méthode de séparation

7.1 Guide de sélection

Le choix d'une méthode de séparation constitue une étape essentielle dans la mise au point de toute analyse par CPL. Le fait, pour le chromatographe, de disposer aujourd'hui d'un vaste éventail de méthodes et, à l'intérieur de celles-ci, d'une large gamme de phases stationnaires, ne simplifie pas ce choix, alors même qu'il présente,

par ailleurs, l'avantage de permettre certaines séparations avec une sélectivité, et partant, une résolution rarement atteinte auparavant.

Le choix d'une méthode est largement tributaire de la nature de l'échantillon et de son degré de connaissance, mais conserve aussi une part certaine d'empirisme. Il n'est pas rare qu'une même séparation puisse être obtenue selon plusieurs voies. Le choix de telle ou telle méthode est fonction de nombreux facteurs comme la présence d'autres solutés, l'éventualité d'une étape préalable d'extraction, voire de préconcentration, le mode de détection, les données bibliographiques concernant des problèmes analogues, mais aussi les phases disponibles ou l'expérience du chromatographe. Tout au contraire, un problème de séparation d'énantiomères oriente prioritairement l'opérateur vers la mise en œuvre de phases chirales et le problème du choix de la phase stationnaire et de l'optimisation de la composition de la phase mobile assurant la meilleure sélectivité.

S'il n'existe pas de méthodologie infaillible, en particulier dans le cas de l'analyse d'un échantillon inconnu, différentes considérations peuvent utilement guider les essais expérimentaux (figure 36).

Nous les présenterons dans l'ordre du degré de connaissance croissant de l'échantillon.

7.1.1 Masse molaire (ou domaine de masses molaires)

Dans le cas de solutés de faibles masses molaires, inférieures à 200-300 g, la CPL ne s'impose souvent que si la chromatographie en phase gazeuse est soit en défaut, parce qu'il s'agit d'espèces trop peu volatiles ou thermolabiles, c'est-à-dire que l'on ne peut volatiliser sans décomposition à une température inférieure à 305 °C environ, soit de mise en œuvre délicate parce que nécessitant une dérivation préalable de l'échantillon.

Pour les grosses molécules, de masse molaire supérieure à 2 000-3 000 g environ, la chromatographie d'exclusion stérique [111], fondée sur la sélection par taille, est généralement la mieux adaptée. La présence de tel ou tel groupement fonctionnel différent dans la molécule risque d'être masquée à son environnement pour des raisons d'encombrement stérique. Bien que le principe de séparation reste fondamentalement le même – accès, selon la taille des molécules, à une fraction plus ou moins importante du volume poreux – l'usage fait que l'on distingue :

- la filtration sur gel (*gel filtration chromatography*, GFC) dans le cas des solutés hydrophiles, où l'on utilise une phase éluante aqueuse ;
- la perméation sur gel (*gel permeation chromatography*, GPC) pour les solutés lipophiles, insolubles dans l'eau, utilisant une phase éluante organique peu polaire.

L'avantage essentiel de la **chromatographie d'exclusion** tient à ce que *théoriquement* (en l'absence d'interactions spécifiques solutés-phase stationnaire) *tous* les constituants d'un échantillon sont élués de la colonne dans une plage de volume bien définie, comprise entre le volume d'exclusion totale et celui de perméation totale. Il en résulte que, dans le cas d'échantillons inconnus, la chromatographie sur une phase stationnaire à large distribution de pores (pour couvrir une gamme étendue de masses moléculaires) fournit directement, par des essais préliminaires, un « spectre de dimensions moléculaires » des composés. L'analyse des résultats permet ensuite soit de sélectionner une phase stationnaire couvrant un domaine de masses molaires mieux adapté, si par exemple tous les constituants ont une masse molaire élevée, soit, pour les mélanges plus complexes, de mettre en œuvre un fractionnement, dans l'optique d'une « chromatographie multidimensionnelle ». Ainsi, si le problème se pose de l'analyse d'additifs dans des polymères, la chromatographie d'exclusion permet, dans un premier temps, d'isoler ces additifs dans un état de dilution minimale, avant leur détermination par une autre méthode de la CPL.

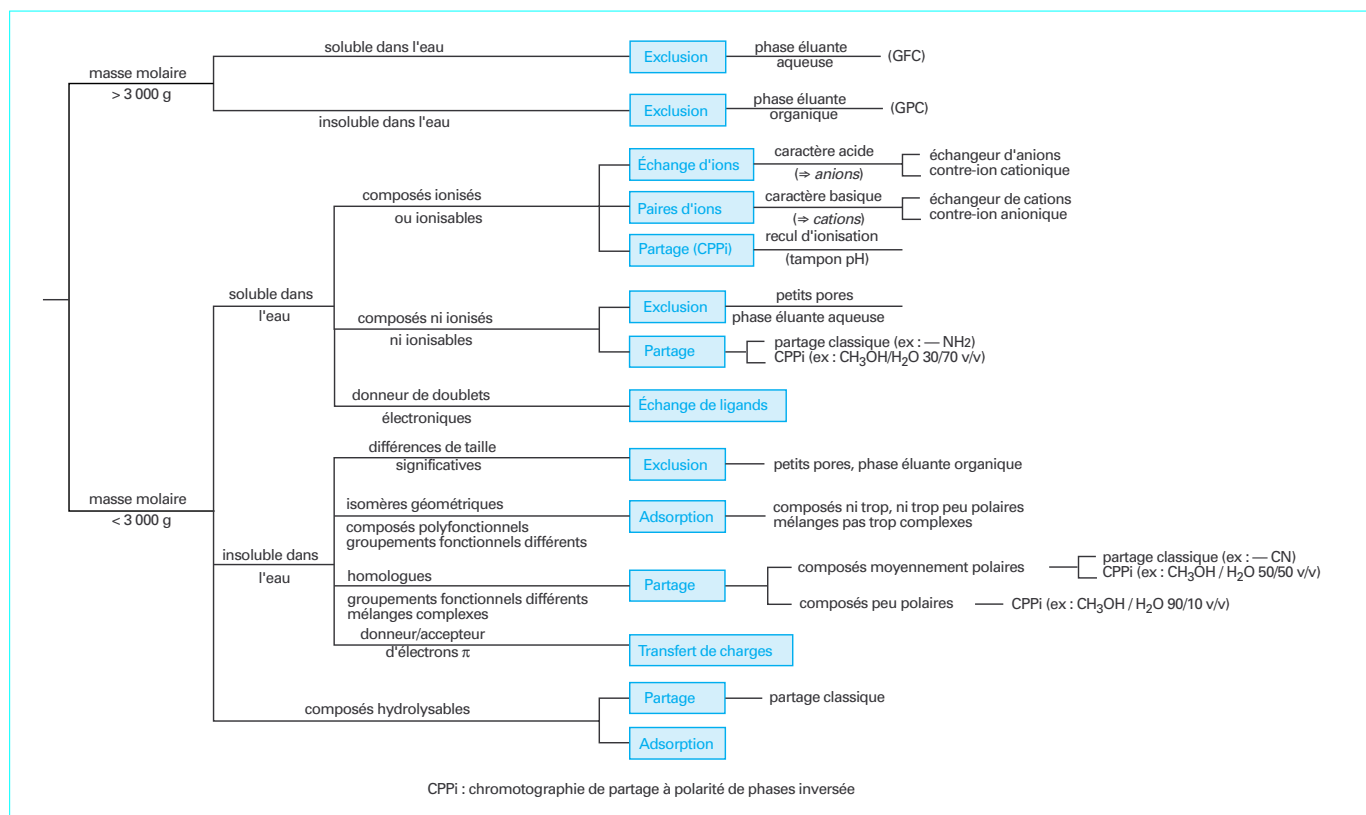


Figure 35 – Choix d'une méthode de séparation

Les autres composés, en particulier ceux de masses molaires inférieures à 3 000 g environ, sont justiciables des autres méthodes de la CPL, dites « interactives », et les caractéristiques de solubilité, en fournissant des indications sur la polarité des molécules, constituent la seconde étape du choix.

7.1.2 Solubilité et polarité

Les indications fournies par quelques tests de solubilité relèvent du principe « like dissolves like », selon lequel les solutés polaires sont solubles préférentiellement dans les solvants polaires et vice versa.

Les solutés fortement polaires sont solubles dans l'eau et la question se pose alors de leur caractère ionique, ou ionisable, éventuel. C'est pourquoi, pour les composés solubles dans l'eau, la mesure de la **conductivité électrique** de la solution doit être effectuée : seule la présence d'ions en solution confère un caractère conducteur. Le test de solubilité dans l'eau pure peut être complété par celui dans la solution d'un acide fort (HCl), puis d'une base forte (NaOH). Les solutés qui ne sont solubles qu'en milieu acide ou basique sont ionisables, conduisant respectivement à la formation de cations par fixation d'ions hydrogène (soluté dit à caractère base faible) et d'anions par perte d'ions hydrogène (soluté à caractère acide faible). Pour les solutés ionisés (électrolytes forts), la séparation sera obtenue soit par chromatographie d'échange d'ions, soit par chromatographie de paires d'ions : la nature des groupements fonctionnels de l'échangeur d'ions, dans le premier cas, du contre-ion dans le second, est régie par le signe des ions des solutés.

■ Pour les **solutés ionisables**, il y a plusieurs possibilités :

- privilégier la formation d'ions par un choix adéquat du pH de la phase mobile et mettre en œuvre l'une des deux techniques précédentes utilisant les interactions coulombiennes ;
- exploiter le caractère ionique partiel et rechercher la séparation par exclusion d'ions, fondée sur les forces de répulsion électrostatique entre entités de même signe ;
- provoquer un recul d'ionisation, là encore par un choix adéquat du pH de l'éluant et séparer les formes moléculaires non chargées, par exemple par chromatographie de partage à polarité de phases inversée ou encore par chromatographie d'adsorption en milieu non aqueux.

■ Les **composés solubles dans l'eau, donc polaires, mais ni ionisés, ni ionisables** pourront être séparés soit par chromatographie de partage classique, sur phase stationnaire polaire telle une silice greffée amino ou diol, soit par chromatographie de partage à polarité de phases inversée, sur silice greffée alkyle, utilisant une phase éluante riche en eau (par exemple CH₃OH/H₂O, 30/70 v/v).

■ Les **composés insolubles dans l'eau, mais solubles dans les solvants organiques**, présentant un caractère lipophile, représentent la majeure partie des séparations obtenues par chromatographie de partage et d'adsorption. Quelques tests simples de solubilité permettent d'orienter le choix d'une méthode : il s'agit de la solubilité dans un hydrocarbure aliphatique comme l'hexane (et éventuellement un hydrocarbure aromatique comme le benzène ou le toluène), dans un solvant chloré comme le dichlorométhane et un alcool aliphatique comme le 2-propanol (ou le méthanol).

■ Les **solutés insolubles dans l'eau et l'hexane, mais solubles dans le 2-propanol** présentent une certaine polarité et sont justiciables soit de la chromatographie de partage classique sur phase moyen-

nement polaire telle une silice greffée alkylnitrile, soit de la chromatographie de partage à polarité de phases inversée sur silice greffée alkyle, utilisant, par exemple, comme phase éluante un mélange $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$, 50/50 v/v.

■ La chromatographie d'adsorption pourra être envisagée pour les **solutés solubles dans le dichlorométhane**, de même que la chromatographie de partage à polarité de phases inversée en augmentant la teneur en solvant organique dans l'éluant. Cette dernière méthode s'impose pour les **solutés très peu polaires**, tels les hydrocarbures polyaromatiques, solubles principalement dans le toluène.

On notera, d'après ce qui précède, que la mise en œuvre d'un essai préliminaire sur silice greffée octyle ou octadécyle, avec gradient d'éluant linéaire de 20 à 100 % de méthanol (ou d'acétonitrile) dans le mélange CH_3OH (ou CH_3CN)– H_2O , peut fournir un « *spectre de polarité* » des constituants d'un échantillon inconnu, au même titre que le « *spectre de dimensions moléculaires* » en chromatographie d'exclusion stérique. De même, la multiplicité d'emplois d'une colonne de silice greffée alkyle ou de polymères organiques (chromatographie de paires d'ions, chromatographie d'espèces ionisables avec tampons de pH provoquant un recul d'ionisation, chromatographie de partage d'espèces très peu à moyennement polaires) justifie l'engouement pour ce type de phases stationnaires.

7.1.3 Structure chimique

C'est le guide le plus sûr et le seul à même d'orienter l'analyste vers des méthodes très spécifiques comme la chromatographie d'échanges de ligands, par transfert de charges, ou encore la chromatographie chirale.

La présence dans la molécule de certains groupements fonctionnels orientera les essais vers telle ou telle méthode. Ainsi, l'existence de fonctions ionisées ou ionisables conduit à envisager une méthode par échange d'ions ou formation de paires d'ions.

Les **composés donneurs de doublets électroniques**, à même de former des complexes avec les cations des métaux de transition, tels Cu^{2+} ou Zn^{2+} , sont justiciables de la chromatographie d'échange de ligands. De même, le caractère donneur d'électrons π des composés renfermant des noyaux aromatiques peut être mis à profit en chromatographie par transfert de charges avec la formation de complexes donneur-accepteur d'électrons π .

Les **solutés fortement polaires mais non ioniques** comme les sucres sont souvent séparés en partage classique, ou encore par partage par équilibre de Donnan (tableau 13).

La chromatographie d'adsorption est souvent la meilleure méthode de séparation d'**isomères de position** et de **composés polyfonctionnels**, pour peu que les groupements mis en jeu soient suffisamment polaires : l'adsorption d'une molécule de soluté sur l'adsorbant est fonction de la disposition spatiale des groupements fonctionnels par rapport aux sites actifs (adsorption plus ou moins fortement localisée). Elle est de même bien adaptée à la séparation de composés portant des **groupements fonctionnels différents**, à condition toutefois qu'ils ne soient ni trop (risque de rétention irréversible par échange de liaisons hydrogène), ni trop peu polaires. En revanche, c'est une méthode qui ne convient pas, compte tenu de la très faible énergie d'adsorption du groupement $-\text{CH}_2-$, à la séparation d'espèces ne différant que par le nombre ou la longueur des chaînes hydrocarbonées (analyse d'homologues).

La chromatographie de partage est, à cet égard, complémentaire de la chromatographie d'adsorption. Ainsi, dans le cas de l'**analyse d'homologues**, le nombre de groupements méthylène influe directement, les chaînes alkyle étant d'autant plus hydrophobes qu'elles sont plus longues, sur la lipophilie des solutés, d'où l'intérêt du partage à polarité de phases inversée.

L'analyse d'**espèces hydrolysables** constitue un cas particulier : la phase éluante ne devant pas contenir d'eau, seules sont possibles la chromatographie sur phase greffée polaire et l'adsorption.

La figure 36, qui reprend les considérations précédentes, constitue un guide de sélection.

7.2 Exemple : analyse des sucres

Comme nous l'avons déjà mentionné, il existe souvent plusieurs méthodes permettant de résoudre un problème de séparation ; ainsi l'analyse des sucres, composés fortement polaires mais non ioniques sauf en milieu très basique, peut être réalisée selon différentes voies (tableau 13). Chacune de celles-ci possède des avantages et des inconvénients : par exemple, la mise en œuvre de silice greffée aminopropyle peut conduire à la formation de bases de Schiff altérant la capacité de la colonne chromatographique mais, en revanche, la sélectivité est très élevée dans le cas des mono- et disaccharides. On trouvera, sur cet exemple, une discussion très détaillée dans [59].

8. Optimisation

Dans la mise au point d'une séparation, il faut, certes, obtenir une résolution satisfaisante, mais aussi prendre en compte certaines contraintes pratiques telles la durée de la séparation, la perte de charge (généralement limitée vers 200 à 300 bar), la détectabilité (qui doit être aussi bonne que possible dans l'analyse de traces). Dès lors, une stratégie d'optimisation consiste à déterminer un point de fonctionnement expérimental constituant un compromis vis-à-vis de contraintes contradictoires (figure 37).

Ainsi, une augmentation de la longueur de la colonne pour accroître l'efficacité et partant la résolution de la séparation entraîne, toutes choses égales par ailleurs, une augmentation de la perte de charge, de la durée de l'analyse, de la dilution des solutés dans l'effluent. Néanmoins l'objectif prioritaire étant la qualité de la séparation, nous examinerons dans un premier temps l'optimisation de la résolution avant de traiter l'optimisation multiparamètre.

Tableau 13 – Principaux systèmes chromatographiques mis en œuvre pour la séparation des sucres, d'après [59]

Phase stationnaire	Phase éluante
Échangeur de cations (80-90 °C (sous forme Ba^{2+} , Pb^{2+} ...))	Eau
Silice greffée aminopropyle	Acétonitrile/eau
Silice imprégnée <i>in situ</i>	Acétonitrile/eau + 1 amine 0,01 à 0,1 %
Échangeurs d'anions	Eau + NaOH 0,15 mol·L ⁻¹
Silice greffée diol	Acétonitrile/eau
Silice greffée alkyle	Eau

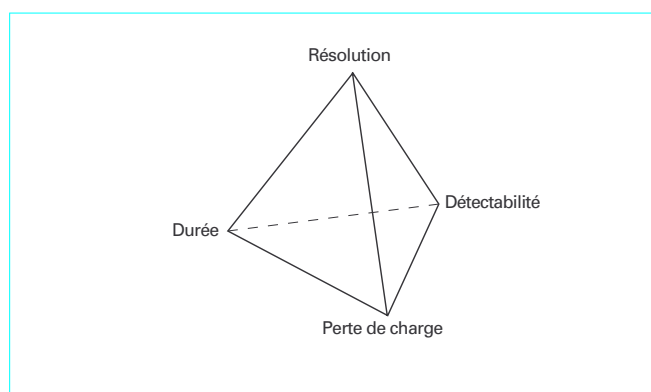


Figure 36 – Contraintes pour l'optimisation d'une méthode de séparation

α	N
1,01	234 250
1,02	60 000
1,03	27 160
1,05	10 160
1,1	2 790
1,2	830
1,5	210

8.1 Optimisation de la résolution

Reprenons l'équation établie précédemment (§ 1.4) d'évaluation de la résolution :

$$R_S = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_2}{1 + k'_2} \right) \sqrt{N_2} \quad (18)$$

I II III

l'indice 2 se rapportant au soluté le plus retenu.

Pour accroître R_S , on peut augmenter l'un quelconque des trois facteurs I (sélectivité), II (rétention des solutés), III (efficacité de la colonne).

Cependant l'ordre n'est pas indifférent, on optimisera d'abord la sélectivité, paramètre thermodynamique déterminant, puis la rétention des solutés et enfin l'efficacité de la colonne chromatographique (cinétique des échanges).

8.1.1 Sélectivité

La résolution augmente avec la sélectivité α qui mesure les différences de distribution des deux substances entre les deux phases.

Quelle que soit l'efficacité de la colonne, la séparation n'est possible que si α est différent de l'unité. Toutefois, les progrès récents en matière de phases stationnaires permettent de réaliser des séparations même pour des valeurs de α aussi faibles que 1,02.

La sélectivité α intervenant par l'intermédiaire du terme $(\alpha - 1)/\alpha$ dans l'expression de la résolution, de faibles variations de α au voisinage de l'unité entraînent de grands changements de la valeur du rapport $(\alpha - 1)/\alpha$. À titre d'exemple, le tableau 14 donne le nombre de plateaux nécessaires pour obtenir une résolution égale à 1 (soit une séparation à 2 % près) en fonction de la valeur de α et pour une valeur du facteur de capacité $k'_2 = 5$.

La sélectivité étant fonction des coefficients de distribution des constituants du mélange à analyser, elle peut être modifiée :

- en changeant la nature et la composition de la phase mobile (effets secondaires du solvant en chromatographie d'adsorption, polarité de l'éluant en chromatographie de partage, influence du pH en chromatographie d'échange d'ions, etc.) ;
- en changeant la nature de la phase stationnaire ;
- en modifiant la température.

La façon la plus courante d'optimiser la sélectivité consiste à faire varier la nature et la composition de la phase éluante en mettant à profit les propriétés spécifiques des trois classes de solvants données dans le paragraphe 3.

Différentes méthodes sont proposées afin d'aboutir aux plus grandes sélectivités avec un minimum d'essais :

- diagrammes en fenêtres ;
- bandes des valeurs critiques des facteurs de capacité ;
- triangle de sélectivité de Snyder.

Ces méthodes ont fait l'objet d'ouvrages spécialisés [60] [62].

8.1.1.1 Diagrammes en fenêtre

Cette technique permet d'optimiser un seul paramètre (pourcentage d'un solvant dans un mélange binaire, valeur du pH, de la température). Elle consiste à tracer les variations du facteur de capacité de tous les solutés en fonction du paramètre choisi, puis ensuite à calculer les variations de la sélectivité des couples les plus difficiles à séparer. Cette technique a été étendue à l'optimisation des mélanges ternaires ; on obtient alors non plus des courbes de réponse en sélectivité mais des surfaces [63].

8.1.1.2 Bandes des valeurs critiques des facteurs de capacité

Cette approche proposée par Colin *et al.* [64] est basée sur l'établissement de ce que les auteurs appellent les bandes critiques des valeurs des facteurs de capacité.

Si l'on connaît la loi de variation du facteur de capacité d'un soluté j en fonction de la composition de l'éluant, alors il est possible de calculer, d'après la relation de Purnell (18), les valeurs maximales du facteur de capacité du soluté i précédent assurant la résolution désirée. En supposant le nombre de plateaux N identique pour les solutés i et j , il vient :

$$\lg k'_i = \lg k'_j - \frac{4R_S}{2,3\sqrt{N}} \cdot \frac{1 + k'_j}{k'_j} \quad (19)$$

À titre d'exemple, en chromatographie de partage à polarité de phases inversée, le logarithme du facteur de capacité varie de façon linéaire en fonction de la composition de la phase éluante, de sorte que, en première approximation, les bandes critiques sont définies par deux droites parallèles (ce qui revient à admettre que le rapport $(1 + k'_j) / \sqrt{N} k'_j$ est constant quel que soit k'_j).

La figure 38 montre l'optimisation de la séparation de cinq solutés aromatiques par chromatographie de partage à polarité de phases inversée.

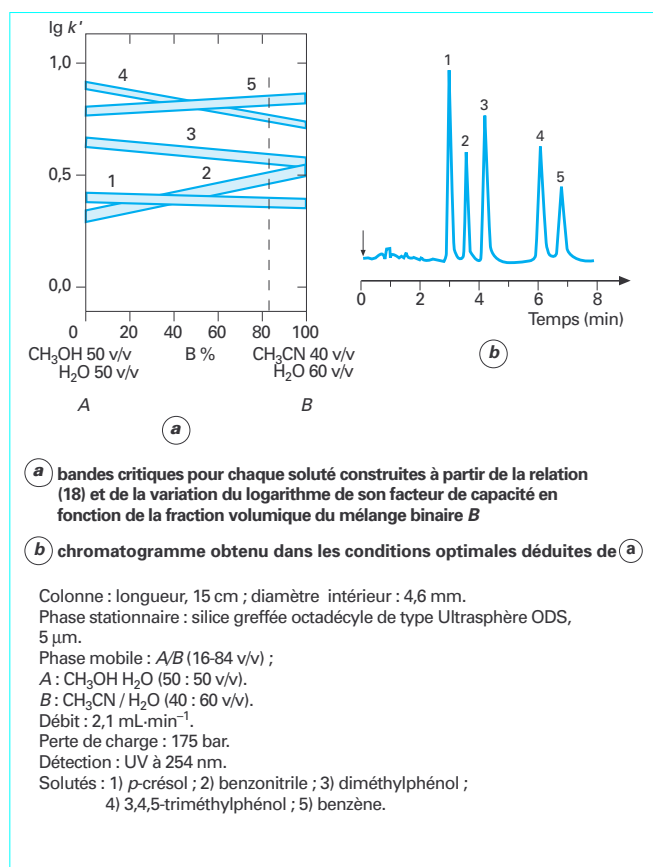


Figure 37 – Application de la méthode dite des bandes critiques des valeurs des facteurs de capacité à l'optimisation d'une phase éluante en chromatographie de partage à polarité de phases inversée, d'après [64]

Sur la figure 38a, les bandes critiques ont été tracées en fonction de la composition de la phase éluante (mélanges ternaires eau-méthanol-acétonitrile) et pour une résolution égale à 1,6. La figure 38b montre le chromatogramme obtenu pour le mélange ternaire optimal et, comme prévu, la résolution observée entre tous les pics adjacents est supérieure à 1,6. Les compositions de phase éluante correspondant à un chevauchement, même partiel, des bandes critiques conduisent à une résolution inférieure à la valeur choisie 1,6.

8.1.1.3 Triangle de sélectivité de Snyder

Cette méthode [65] [66] permet d'optimiser la composition d'une phase éluante constituée par un mélange ternaire de solvants

appartenant à trois groupes de sélectivité différents (§ 3). Les solvants sélectionnés en chromatographie d'adsorption et de partage classique d'une part, et en chromatographie de partage à polarité de phases inversée d'autre part, pour leurs propriétés spécifiques sont rassemblés dans la figure 5b. Ils sont toujours utilisés en mélange avec un solvant de base dépourvu de propriétés sélectives et dont le rôle est de fixer les facteurs de capacité des solutés dans une gamme convenable.

La recherche de la phase mobile optimale consiste à effectuer, dans un premier temps, sept essais soit manuellement, soit automatiquement avec des phases éluantes binaires, ternaires ou quaternaires conduisant sensiblement à la même durée d'analyse et dont les compositions sont représentées par les points numérotés de 1 à 7 sur la figure 39. Les chromatogrammes 1, 2 et 3 sont effectués avec des phases éluantes constituées par un mélange de chacun des solvants sélectionnés avec le solvant de base dans des proportions telles que la durée de la séparation soit sensiblement constante quelles que soient les résolutions. On réalise ensuite les chromatogrammes correspondant aux phases éluantes 4, 5 et 6 obtenues par le mélange équimolaire des mélanges binaires précédents pris deux à deux. Enfin le chromatogramme n° 7 correspond à un mélange quaternaire obtenu par le mélange équimolaire des mélanges binaires 1, 2 et 3. La phase mobile optimale peut ensuite être obtenue après estimation visuelle des résolutions correspondant aux 7 chromatogrammes tests, ce qui nécessite quelques essais complémentaires (souvent 2 ou 3) ou à l'aide d'une méthode informatisée utilisant une fonction de réponse chromatographique.

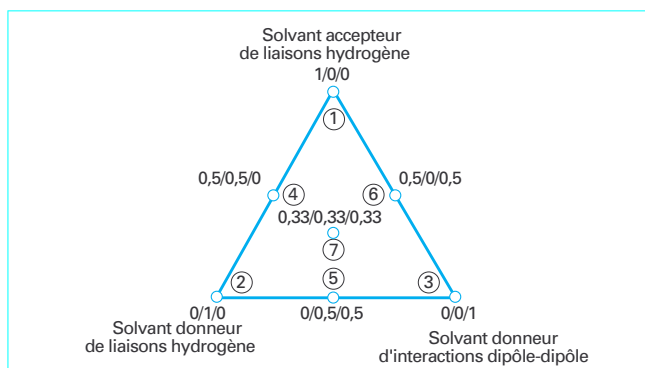


Figure 38 – Représentation des sept compositions de phase éluante permettant son optimisation

8.1.2 Facteur de capacité

Le second paramètre qui intervient dans l'expression de la résolution est le facteur de capacité k'_2 de la substance la plus retenue.

Si k'_2 est nul, les deux solutés sortent simultanément de la colonne après écoulement du volume mort et la résolution est nulle. La résolution augmente en même temps que k'_2 , de moins en moins vite cependant puisque le terme $k'_2 / (1 + k'_2)$ tend rapidement vers 1, et l'on peut considérer que le gain en résolution devient négligeable au-delà d'une valeur de l'ordre de 5 à 10 du facteur de capacité. D'autre part, le temps d'analyse augmente, lui, beaucoup plus rapidement avec k'_2 puisque l'on a :

$$t_R = \frac{L}{u} (1 + k'_2)$$

Ainsi, lorsque le facteur de capacité passe de 5 à 10, la résolution n'augmente que de 9 % alors que le temps d'analyse augmente, lui, de 80 %.

Cet exemple illustre bien la nécessité de trouver un compromis entre l'obtention d'une bonne résolution, qui exige une forte rétention des composés, et d'une analyse rapide (≤ 10 min environ) qui exige précisément le contraire. Cela correspond à des valeurs de k' comprises entre 2 et 5 en général, ou entre 1 et 10 dans le cas de mélanges complexes.

Notons, d'autre part, que pour des valeurs très élevées de k' les pics d'éluion deviennent très larges, ce qui, outre l'inconvénient de la durée de l'analyse, peut rendre difficile la détection de ces composés.

Dans ce cas, on met en œuvre un gradient d'éluion de façon à ramener les facteurs de capacité des solutés à des valeurs convenables. On veillera cependant, dans l'évaluation de la durée de l'analyse, à tenir compte du temps nécessaire au retour à l'équilibre entre la phase stationnaire et la phase mobile à sa composition initiale.

8.1.3 Efficacité

Le nombre de plateaux théoriques de la colonne, N_2 , est le dernier paramètre intervenant dans l'expression (18) de la résolution. Bien que celle-ci ne soit proportionnelle qu'à la racine carrée du nombre de plateaux théoriques, c'est-à-dire que doubler N_2 ne multiplie R_S que par 1, 4, augmenter l'efficacité est souvent un moyen d'améliorer la résolution.

Accroître N_2 en augmentant la longueur de la colonne présente les inconvénients précédemment évoqués, en particulier d'accroître le temps de rétention ; on cherche donc à diminuer H , ce qui améliore l'efficacité sans augmenter pour autant la durée de l'analyse. En effet, la HEPT dépend de nombreux paramètres parmi lesquels on peut citer principalement :

- la granulométrie de la phase stationnaire ;
- la vitesse de la phase mobile.

8.1.3.1 Influence du diamètre des particules

Au voisinage de la vitesse réduite optimale, la hauteur de plateau réduite varie peu : $h \approx h_{\min}$; en première approximation, on peut considérer que la HEPT est proportionnelle au diamètre des particules dans cet intervalle :

$$H = h d_p \approx h_{\min} d_p$$

Pour les valeurs habituelles des coefficients A, B, C de l'équation de Knox (14), h_{\min} est voisin de 2,5 et par suite $H \approx 2,5 d_p$ pour des valeurs de v comprises entre 2 et 3.

L'obtention d'une grande efficacité associée à une faible durée d'analyse implique l'utilisation de particules de fine granulométrie : on utilise couramment des particules ayant un **diamètre nominal de 5 μm** .

Des colonnes remplies avec des particules de 3 μm sont disponibles commercialement et utilisées dans le cas de séparations difficiles ou très rapides (*High Speed Liquid Chromatography*).

8.1.3.2 Influence de la vitesse de la phase mobile

Nous avons vu précédemment (§ 2.3) que la hauteur de plateau réduite h passe par une valeur minimale qui peut être de l'ordre de 2,5 pour une vitesse réduite de phase mobile v voisine de 3 dans le cas d'une colonne convenablement remplie. En prenant $v_{\text{opt}} = 3$, il vient d'après la définition de v (§ 2.1.3) :

$$u_{\text{opt}} = \frac{3 D_m}{d_p}$$

Cette relation montre que la mise en œuvre de fines particules permet d'utiliser des grandes vitesses de phase mobile (donc de diminuer d'autant la durée de séparation) tout en conservant une efficacité maximale pour la granulométrie considérée, mais aux

dépens d'une augmentation importante de la perte de charge. D'autre part, on remarque l'intérêt, à force éluante égale, d'opérer avec la phase mobile ayant la plus faible viscosité (D_m est inversement proportionnel à la viscosité η), ce qui permet, toutes choses égales par ailleurs, de diminuer la durée de l'analyse.

8.2 Optimisation multiparamètre

L'optimisation d'une séparation chromatographique ne se limite pas à celle de la résolution ; d'autres critères doivent être pris en considération tels que la perte de charge et la durée de la séparation, le nombre de pics séparés et la détectabilité.

Toutefois, les paramètres chromatographiques influents ne sont pas indépendants. À titre d'exemple, la figure 40 montre les relations existant entre la perte de charge, la durée de l'analyse (exprimée sous la forme du temps de rétention nulle) et la longueur de la colonne chromatographique pour différentes granulométries de la phase stationnaire, lorsque la résolution recherchée exige 10 000 plateaux théoriques. La mise en œuvre de particules de 3 μm , dans les conditions optimales (droite horizontale en tireté), permet d'utiliser des colonnes courtes (< 10 cm) et, partant, d'améliorer la détectabilité tout en diminuant la durée des analyses (< 50 s).

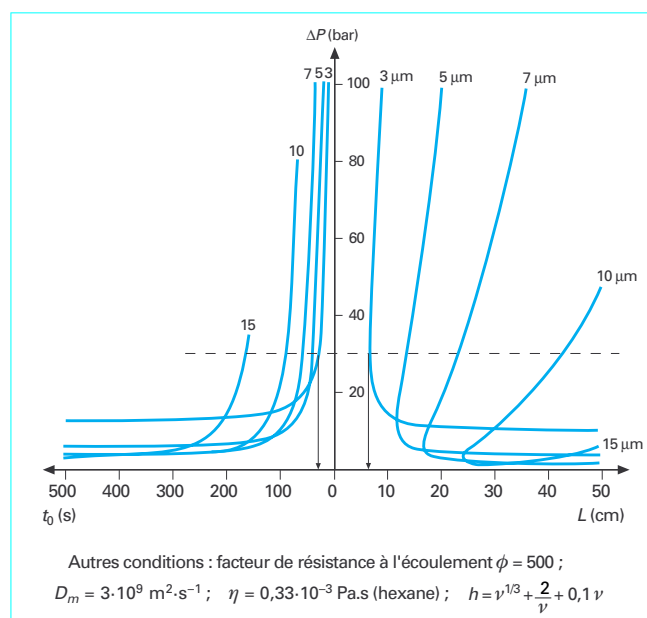


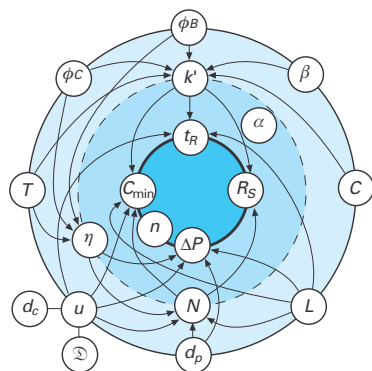
Figure 39 – Abaques donnant la perte de charge, la durée d'analyse et la longueur de la colonne pour différentes granulométries de la phase stationnaire lorsque le nombre de plateaux théoriques de la colonne est fixé à 10 000

On remarque que, dans ces conditions, la colonne génère 250 plateaux par seconde.

On conçoit qu'une optimisation multiparamètre présente alors un caractère complexe du fait du grand nombre et de l'interdépendance des paramètres expérimentaux [67].

La figure 41 représente les cinq critères impliqués dans la qualité d'une séparation (détectabilité, perte de charge, durée de la séparation, nombre de pics détectés et résolution) et les interactions entre les principaux paramètres chromatographiques. Par exemple, la

longueur L de la colonne influe directement sur la durée de la séparation, la perte de charge et la détectabilité et, indirectement, sur la résolution via l'efficacité. De même, cette dernière dépend de la longueur de la colonne, du diamètre des particules, de la vitesse linéaire et de la viscosité de la phase mobile. On conçoit la difficulté d'une telle optimisation, mais aussi tout l'intérêt que le chromatographe peut retirer de la prise en compte du plus grand nombre de facteurs.



Critères d'appréciation de la qualité chromatographique :
 t_R : durée de l'analyse
 R_S : résolution
 ΔP : perte de charge
 C_{min} : détectabilité (hauteur de pic)
 n : nombre de pics

Paramètres expérimentaux et grandeurs fondamentales :
 ϕ_B et ϕ_C : fraction volumique des solvants les plus éluants
 T : température
 u : vitesse de la phase mobile
 d_p : granulométrie du support
 L : longueur de la colonne
 β : état d'activation d'un adsorbant
 C : teneur en carbone ou concentration en contre-ion
 d_c : diamètre intérieur de la colonne
 \mathcal{D} : débit de la phase éluante
 k' : facteur de capacité
 N : efficacité de la colonne
 η : viscosité
 α : sélectivité

Figure 40 – Interactions entre les critères d'appréciation de la qualité d'une analyse chromatographique, les paramètres expérimentaux et les grandeurs fondamentales dérivées, d'après [67]

De nombreuses méthodes automatisées sont proposées pour aboutir aux conditions optimales et l'appréciation de la qualité d'une analyse utilise souvent un nombre sans dimension appelé « fonction de réponse chromatographique », lequel permet au chromatographe de privilégier certains critères, par exemple, le nombre de pics détectés dans le cas d'un mélange inconnu, la qualité et la durée de l'analyse dans le cas d'un mélange de solutés connus. Les techniques d'optimisation informatisée sont nombreuses [68] ; parmi les méthodologies utilisées, on peut citer les méthodes du Simplex, les plans factoriels et la méthode ORM (*Overlapping Resolution Map*).

8.2.1 Méthodes du Simplex

Un Simplex est une figure géométrique comportant un nombre de sommets (*vertices*) égal à $n + 1$, n étant le nombre de facteurs à optimiser [60] [68]. Pour deux facteurs indépendants, composition d'un mélange ternaire par exemple, il s'agit d'un triangle. La méthode consiste à effectuer un essai à chaque sommet du Simplex, à éliminer l'essai donnant le plus mauvais résultat et à remplacer le point correspondant par un point situé dans une direction opposée. On peut opérer soit à pas fixe, soit à pas variable, ce qui, en règle générale, conduit plus rapidement à la valeur optimale.

8.2.2 Plans factoriels

On recherche une modélisation mathématique à l'intérieur du domaine de variations des paramètres choisis à partir d'essais obtenus à différents niveaux, modifiés simultanément, des paramètres étudiés [69]. L'étude des surfaces d'isoréponse (lignes de niveau) permet de définir le ou les optimums.

8.2.3 Méthode ORM (*Overlapping Resolution Map*)

Cette méthode, contrairement aux autres, est limitée à l'optimisation de la séparation de mélanges connus, mais a l'avantage de prendre en compte les inversions éventuelles des pics d'éluion en fonction de la composition de la phase éluante [70].

La première étape consiste à étudier les variations de la résolution pour une paire de pics donnés au sein du diagramme triangulaire de sélectivité de Snyder, de façon à délimiter un « domaine interdit » à l'intérieur duquel la résolution est inférieure à celle choisie. Les étapes suivantes consistent à effectuer la même démarche pour toutes les autres paires de pics. Le domaine optimal correspond alors, s'il existe, à une partie du diagramme n'appartenant à aucune des zones interdites (figure 42).

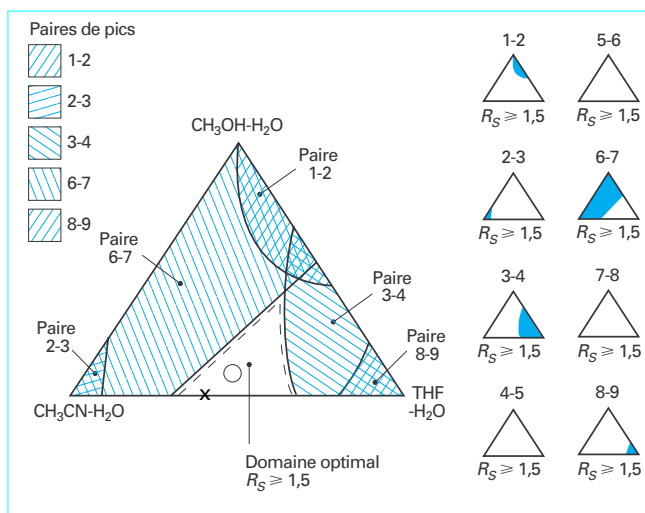


Figure 41 – Différentes étapes de la méthode ORM pour la résolution d'un mélange contenant neuf constituants, d'après [70]

9. Analyse quantitative

L'obtention de résultats reproductibles et significatifs exige à la fois une parfaite stabilité des conditions opératoires et la représentativité de l'échantillon quant au problème de l'analyse posé.

La plupart des détecteurs (absorptiométriques, fluorimétriques, électrochimiques, etc.) utilisés en CPL sont des détecteurs différentiels qui mesurent la variation de grandeurs proportionnelles à la concentration du soluté dans l'effluent ; on obtient des pics dont l'aire est liée à la quantité de soluté ayant traversé le détecteur par la relation :

$$m_i = K_i A_i$$

avec m_i masse de substance i ayant traversé le détecteur,
 A_i aire du pic correspondant,
 K_i facteur de proportionnalité ou coefficient de réponse.

L'analyse quantitative se ramène donc à la mesure des deux grandeurs A_i et K_i .

9.1 Mesure de l'aire d'un pic

En toute rigueur, la détermination de l'aire d'un pic ne peut être effectuée, surtout si celui-ci n'est pas parfaitement symétrique, qu'à l'aide d'un intégrateur électronique.

Le fonctionnement du dispositif de comptage est mis en marche au début du pic et s'arrête en fin de celui-ci, qu'il fonctionne en détection de seuil (le compteur se met en marche dès que le signal dépasse une valeur fixée par l'opérateur), ou en détection de pente (le compteur se met en marche quand la dérivée du signal devient supérieure à une valeur fixée), ou encore les deux simultanément.

Ces intégrateurs ont une vitesse de réponse très élevée et une étendue de mesure importante ; de ce fait, il est possible d'effectuer en une seule fois les comptages des constituants élués minoritaires et majoritaires, sans utiliser de commutateur de sensibilité (à condition, toutefois, que l'on soit dans le domaine de réponse linéaire du détecteur).

La méthode par détection de pente, très intéressante, sous réserve que sa sensibilité soit bien adaptée à la séparation considérée, est à la base d'appareils très performants.

Un autre avantage de l'intégration électronique est la détermination du sommet du pic (au moment où la pente s'annule) utilisée pour mesurer sa hauteur, le nombre de plateaux théoriques et le temps de rétention de la substance élue.

La majorité des intégrateurs ont la possibilité d'intégrer ou de ne pas intégrer à l'intérieur d'une « fenêtre temps » programmable, de reconnaître les pics négatifs (détection réfractométrique et indirecte) et de retraiter les chromatogrammes préalablement mémorisés avec modification des seuils et visualisation de la ligne de base utilisée pour l'intégration des pics d'élué [71] [72].

Le principe de fonctionnement des intégrateurs, le rôle des différents paramètres d'intégration, de même que les sources d'erreur possibles sont décrits en détail dans [73].

9.2 Mesure des coefficients de réponse

La mesure des coefficients de réponse peut être effectuée de deux manières :

— soit par une mesure absolue, par étalonnage direct (mesure de l'aire du pic obtenu par injection d'une masse connue de soluté) ;

— soit par une mesure relative, en rapportant l'aire du pic du soluté à celle d'un composé de référence à partir d'un mélange de composition connue.

Il est très difficile d'introduire sur une colonne une masse exactement connue d'un échantillon ; l'injection avec une seringue ou une vanne à boucle permet d'obtenir une bonne reproductibilité, mais le volume injecté n'est pas connu avec assez de précision pour permettre un étalonnage absolu. Aussi, sauf pour l'analyse des traces, est-il préférable d'utiliser une méthode relative. On procède dans ce cas à l'analyse d'un mélange étalon de composition voisine de celle du mélange à analyser. On définit, pour chaque constituant i , un coefficient de réponse relatif $K_{i(r)}$, rapporté au composé de référence r , défini par la relation :

$$K_{i(r)} = \frac{A_i}{A_r} \cdot \frac{\tau_r}{\tau_i} \cdot K_r$$

avec A_r et A_i aires des pics du composé de référence et du constituant i ,
 τ_r et τ_i teneurs respectives dans le mélange étalon,
 K_r coefficient de réponse affecté au composé de référence (on prend souvent $K_r = 1$). Ce dernier peut être soit l'un des constituants du mélange à analyser soit un étalon interne. Il n'est plus nécessaire de connaître la quantité injectée.

9.3 Détermination des concentrations

L'analyse quantitative en CPL est essentiellement une méthode comparative, aussi existe-t-il plusieurs méthodes pour déterminer les concentrations : toutes sont basées sur la relation reliant l'aire A_i du pic i élué à la masse $m_i = K_i A_i$, et impliquent la détermination de l'aire des pics. Mais elles se différencient par l'emploi de coefficients de proportionnalité ou de facteurs de réponse intrinsèques ou relatifs.

Comme en chromatographie en phase gazeuse, on distingue quatre méthodes principales :

— la normalisation interne où l'on compare les aires des pics d'élué au cours d'une même injection ;

— l'étalonnage externe (ou méthode des injections comparées) où l'on compare, sur deux chromatogrammes, l'aire du pic d'élué de la substance de référence à celle du produit à analyser ;

— l'étalonnage interne où l'on compare les aires des pics de la substance de référence et du produit à analyser à la surface du pic d'élué d'un produit témoin appelé « étalon interne » ajouté lors de l'analyse et de l'étalonnage ;

— l'étalonnage en différé où l'on injecte, après l'échantillon à analyser, une quantité connue d'un étalon de telle sorte qu'il n'y ait aucune interférence entre le pic d'élué de celui-ci et ceux des constituants de l'échantillon.

9.3.1 Normalisation interne

Dans cette méthode, on admet que tous les solutés sont élués de la colonne, détectés, et que l'on connaît leurs coefficients de réponse respectifs dans les conditions considérées. Pour chaque soluté :

$$m_i = K_i A_i$$

On en déduit la teneur pondérale (en %) :

$$m_i = \frac{K_i A_i}{\sum_j K_j A_j} \cdot 100$$

Cette méthode implique toutefois que tous les composés du mélange soient élués avec une résolution satisfaisante et dans un temps acceptable, qu'ils aient été détectés et que leurs coefficients de réponse aient été déterminés dans les mêmes conditions que l'analyse. Il est donc impossible d'utiliser la normalisation interne pour l'analyse d'un mélange inconnu.

9.3.2 Étalonnage externe ou méthode des injections comparées

L'étalonnage externe est basé sur la comparaison de deux chromatogrammes (étalonnage et analyse, ou de deux séries de chromatogrammes effectués successivement dans des conditions chromatographiques invariantes, qui maintiennent bien constant le coefficient de proportionnalité K_i de la relation : $m_i = K_i A_i$.

■ Chromatogramme de référence

On réalise l'injection d'un volume reproductible d'une solution étalon R contenant une masse m_R du composé à doser de teneur connue τ_R . On mesure un pic d'aire A_R :

$$m_R \tau_R = K A_R$$

■ Chromatogramme d'analyse

On injecte un volume rigoureusement identique à l'injection précédente de la solution à doser D contenant une masse m_E de l'échantillon de teneur inconnue τ_D en soluté à doser. Le pic élué a une aire A_D :

$$m_E \tau_D = K A_D$$

Des deux relations précédentes, il vient :

$$\tau_D = \tau_R \cdot \frac{A_D m_R}{A_R m_E}$$

La précision des résultats dépend :

- des pesées de la substance de référence et de l'échantillon ;
- des dilutions ;
- de la reproductibilité du volume de l'injection ;

mais ne dépend pas de la détermination préalable de K ; l'avantage de la méthode est que le volume de l'injection n'a pas une grande importance à condition qu'il demeure constant lors de l'étalonnage et de l'analyse ; c'est pourquoi on préfère le remplissage total des boucles d'injection.

En revanche, sa difficulté réside dans le fait qu'il est important que les conditions chromatographiques restent strictement invariantes pendant l'étalonnage et l'analyse (ou les étalonnages et les analyses successifs si l'on recherche une précision meilleure par exploitation statistique de séries d'essais).

9.3.3 Étalonnage interne

Cette méthode permet de s'affranchir de l'erreur commise sur le volume injecté. On ajoute à la solution de référence et à la solution à analyser un même constituant I (étalon interne) qui n'interfère avec aucun des constituants présents dans l'échantillon et on se fonde sur l'invariance du rapport des coefficients de proportionnalité observés sur les deux chromatogrammes (détermination et étalonnage).

■ Chromatogramme d'analyse

La solution contient des masses connues avec précision du produit à déterminer et de l'étalon interne.

On fait une injection de volume approximativement connu de cette solution, qui fournit un chromatogramme sur lequel on détermine les aires des pics correspondant à l'étalon interne et au produit à analyser.

Soit :

- m_E la masse de l'échantillon contenant le soluté D de titre τ_D ,
- m_I celle de l'étalon interne,
- A_D l'aire du pic du soluté D ,
- A_I celle du pic de I ,
- K_D le coefficient de proportionnalité de la substance D ,
- K_I celui de l'étalon interne I .

on peut écrire les relations suivantes :

$$m_E \tau_D = K_D A_D$$

$$m_I = K_I A_I$$

d'où :

$$\tau_D = \frac{K_D}{K_I} \cdot \frac{A_D}{A_I} \cdot \frac{m_I}{m_E}$$

■ Chromatogramme d'étalonnage

On opère de même sur une solution d'étalonnage contenant des masses connues avec précision de substance de référence et de l'étalon interne (et où les dilutions sont analogues aux dilutions de la solution à analyser).

On fait alors une injection de volume approximativement connu de cette solution d'étalonnage : elle fournit un chromatogramme sur lequel on détermine les aires des pics correspondant à l'étalon interne et à la substance de référence.

En connaissant dans cet étalonnage :

- m_R la masse de D (substance de référence) de titre τ_R connu,
- m'_I celle de l'étalon interne,
- A_R l'aire du pic de la référence,
- A'_I celle du pic de I .

on a :

$$m_R \tau_R = K_D A_R$$

$$m'_I = K_I A'_I$$

d'où :

$$\frac{K_D}{K_I} = \frac{m_R}{m'_I} \cdot \tau_R \cdot \frac{A'_I}{A_R}$$

■ Calcul de la teneur τ_D du produit D dans l'échantillon

En reportant la valeur du rapport K_D/K_I dans l'expression de τ_D , il vient :

$$\tau_D = \frac{A_D}{A_I} \cdot \frac{A'_I}{A_R} \cdot \frac{m_I}{m_E} \cdot \frac{m_R}{m'_I} \cdot \tau_R$$

— la précision de cette méthode dépend uniquement de celle des pesées ; elle ne dépend pas (à la différence de la méthode par étalonnage externe) de la précision des dilutions ni du volume injecté. Elle ne nécessite pas la détermination préalable des coefficients de proportionnalité ;

— en revanche, l'étalon interne doit satisfaire aux contraintes suivantes. Il faut :

- qu'il soit d'une pureté connue et chimiquement inerte avec les solutés et la phase éluante ;
- qu'il ait un temps de rétention différent de tous les constituants de l'échantillon, mais le plus proche possible de la substance à déterminer ;
- que son coefficient de réponse pour le détecteur utilisé soit du même ordre de grandeur que celui du produit à déterminer ;
- qu'il ne soit pas présent comme impureté dans l'échantillon ;
- qu'il soit ajouté à une concentration qui donne une aire de pic sensiblement équivalente à celle du produit à déterminer.

On trouvera une discussion des avantages comparés des étalonnages externe et interne dans [74].

9.3.4 Étalonnage différé

Pour pallier les difficultés de mise en œuvre de l'étalonnage interne en CPL, une méthode dite de l'étalon différé a été décrite [75] [76] qui consiste en l'injection en différé d'un produit pur dans chaque séquence analytique. Cette injection est différée par rapport à celle de l'échantillon de manière que le pic correspondant n'interfère pas avec ceux des constituants du mélange. L'étalon différé peut alors être l'un de ces derniers.

9.4 Précautions opératoires et problèmes liés à la chromatographie en phase liquide

Nous supposons, dans ce paragraphe, que tous les paramètres de l'analyse qualitative par chromatographie en phase liquide ont été optimisés, avant de rappeler les conditions d'utilisation de cette technique à des fins d'analyse quantitative.

En effet, pour être exploitées quantitativement, les réponses obtenues doivent être :

- mesurables ;
- répétables ;
- proportionnelles aux quantités injectées.

Nous allons préciser l'influence que peut avoir le choix des conditions opératoires (types d'éluant, d'injection, de détection, etc.) sur la qualité des réponses.

9.4.1 Mise en solution de l'échantillon

En CPL, on travaille généralement sur des solutions très diluées d'échantillons ; aussi convient-il de vérifier avec soin que la solution injectée satisfait aux conditions suivantes :

- le solvant assure la solubilisation totale de l'échantillon ;
- la solution obtenue doit être limpide — fût-ce après filtration — et le rester pendant toute la durée de son utilisation.

Il n'est pas toujours aisé de prévoir le comportement de solutions contenant des substances parfois mal identifiées, c'est pourquoi la vérification de la stabilité des solutions d'échantillons est une nécessité quotidienne :

- la solution ne doit pas donner lieu à des réactions secondaires de dégradation, avec les phases stationnaire et éluante ;
- le solvant de dilution doit être compatible avec le système phase stationnaire/éluant assurant la séparation, et avec la détection par sa nature et par la concentration de la solution injectée (à adapter, dans la mesure du possible, à la sensibilité de la détection mise en œuvre).

9.4.2 Choix du type d'éluant

Pour obtenir des résultats précis et reproductibles, l'éluant en régime isocratique est toujours préférable à l'éluant gradué pour des raisons déjà évoquées (dérive de la ligne de base, pics parasites, nécessité de rééquilibrer la phase stationnaire...).

9.4.3 Choix du type d'injection

Les injections automatisées sont, de façon générale, plus reproductibles que les injections manuelles.

9.4.4 Stabilité des conditions expérimentales

Toute variation du débit ou de la composition de la phase éluante entraîne une modification de la forme ou de la position du pic d'éluant enregistré sur le chromatogramme.

■ Influence du débit

La plupart des détecteurs utilisés en CPL sont des détecteurs différentiels qui mesurent des variations de grandeurs proportionnelles à la concentration du soluté dans l'effluent. Il existe une relation entre l'aire enregistrée A et le débit de l'effluent \mathcal{D} :

$$A \cdot \mathcal{D} = m \cdot K = Cte$$

avec m masse de soluté injectée,
 K coefficient de réponse du détecteur.

Toute variation du débit entraîne, toutes choses égales par ailleurs, une modification de l'aire enregistrée. Il est donc impératif de stabiliser parfaitement le débit de l'éluant pendant les analyses pour pouvoir baser les déterminations quantitatives sur l'aire des pics d'éluant.

Si le débit de l'effluent ne peut être stabilisé, il est alors préférable de mesurer la hauteur du pic d'éluant plutôt que sa surface.

En effet, la hauteur d'un pic d'éluant correspond à la concentration maximale C_{\max} du soluté : celle-ci est donnée par la relation :

$$C_{\max} = \frac{m}{V_R N} \sqrt{\frac{N}{2\pi}}$$

avec m masse de soluté injectée,
 V_R volume de rétention du soluté,
 N nombre de plateaux théoriques contenus dans la colonne chromatographique.

Le volume de rétention V_R étant indépendant du débit de la phase éluante, seul le nombre de plateaux N contenus dans la colonne varie ; mais C_{\max} ne varie que comme $N^{1/2}$. De plus, si l'on choisit un débit de phase éluante correspondant à une vitesse réduite voisine de la vitesse optimale, les fluctuations du débit n'entraînent qu'une variation négligeable de la hauteur de plateau théorique et par là du nombre de plateaux N .

■ Influence de la composition de la phase mobile

Si la composition de la phase mobile varie, en raison par exemple de la volatilité d'un des solvants ou de la non-reproductibilité d'un gradient d'éluant, le facteur de capacité des solutés varie et par là les caractéristiques de la séparation. Dans ces conditions, il est préférable de mesurer l'aire du pic d'éluant, qui est sensiblement indépendante des fluctuations de la composition de la phase éluante, plutôt que sa hauteur qui varie avec celles-ci.

9.4.5 Caractéristiques du détecteur

Les conditions de la détection sont sûrement un des points les plus critiques de l'analyse quantitative en chromatographie en phase liquide.

Avant tout traitement du signal, il faut s'assurer :

- de la compatibilité du détecteur avec les conditions opératoires et la nature du soluté ;
- de la linéarité de sa réponse ;
- de la stabilité de sa ligne de base ;
- de sa sensibilité qui doit être compatible avec la mesure des concentrations envisagées.

Par ailleurs, il est important d'estimer les perturbations entraînées par les variations de la température de la phase mobile, les pulsations éventuelles du système de pompage, etc., et de se rappeler

que, sans précautions particulières, les intégrateurs électroniques retranchent l'aire des pics négatifs.

Enfin, mentionnons que la détection par absorptiométrie dans l'ultraviolet nécessite souvent quelques précautions particulières :

- le grand domaine de variation des facteurs d'absorption (de 1 à $10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) selon la nature des solutés à déterminer et la longueur d'onde de détection exige, d'une part, un étalonnage pour chaque soluté et, d'autre part, d'adapter la concentration de la solution à doser et le volume injecté au domaine de linéarité du détecteur qui est toujours plus restreint que le domaine global de détection ; on admet souvent que le domaine de linéarité usuel des spectrophotomètres ne dépasse pas 0,6 à 0,7 unité d'absorbance alors que le domaine de détection peut s'étendre jusqu'à 2 unités d'absorbance, voire plus ;

- la loi de Lambert-Beer n'est valable que pour un rayonnement monochromatique ; or de nombreux spectrophotomètres ont une largeur de bande passante, non réglable, comprise entre 5 et 8 nm. Cela peut occasionner, selon la position du créneau de longueurs d'onde sur le spectre d'absorption du soluté, une déviation par rapport à la linéarité, même pour des faibles valeurs de l'absorbance.

Par ailleurs, on doit tenir compte, pour la définition du domaine de linéarité, de l'absorbance de la phase éluante à la longueur d'onde de détection du soluté considéré (en raison de l'additivité des absorbances, le domaine de linéarité peut se trouver diminué par l'absorbance de la phase éluante et ce, en dépit du réglage du zéro optique).

9.5 Précision des analyses en CPL

La précision des analyses que l'on peut attendre d'une pratique courante de la CPL a été évaluée à partir de divers circuits interlaboratoires [77] [84].

Rappelons que la notion de précision d'une analyse recouvre en fait deux aspects complémentaires (figure 43) :

- la justesse ou exactitude (*accuracy*) caractéristique de l'écart entre la valeur vraie x_0 et la valeur moyenne proposée (ou espérance mathématique EX de la distribution des résultats) ; ainsi, une méthode juste doit présenter une absence de biais ($x_0 - EX$) ;

- la dispersion des résultats autour de leur valeur moyenne, caractérisée par l'écart-type de la distribution σ , ou encore par le coefficient de variation (CV), écart-type relatif exprimé en %.

Notons que, pour ce qui concerne la dispersion, il est d'usage de distinguer répétabilité, pour une même série d'essais (opérateur, appareillage, ... identiques) et reproductibilité (opérateurs et appareillages appartenant à des laboratoires différents). Seule la mise en place de circuits interlaboratoires permet, par suite, d'aborder le second aspect.

De ces circuits il ressort une nette amélioration de la précision résultant des progrès technologiques (figure 43). L'écart-type relatif de reproductibilité est souvent compris entre 2 et 5 % sauf dans le cas de l'analyse de traces où il peut atteindre 75 % pour des concentrations aussi faibles que $0,05 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ [80].

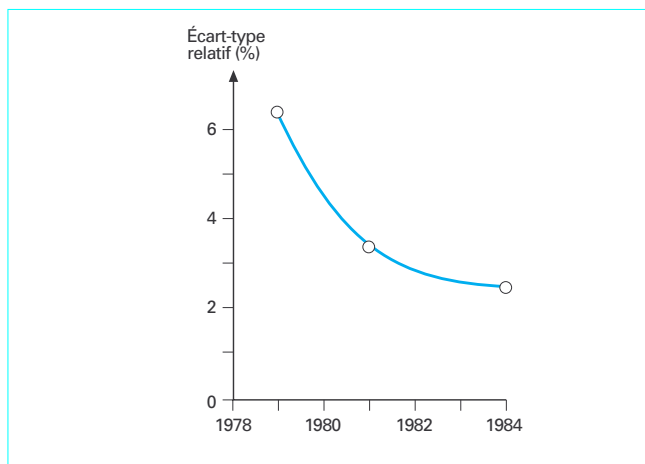


Figure 43 - Variation de la précision des analyses de l'acétophénone à une teneur de $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ par CPL au cours de circuits interlaboratoires successifs [80]

Par ailleurs, la mesure des aires donne toujours des résultats de meilleure qualité que la mesure des hauteurs de pics sauf dans le cas de l'analyse de traces.

En ce qui concerne les méthodes d'étalonnage, il est difficile de tirer une conclusion générale quant aux avantages comparés des étalonnages externe et interne [74] [82].

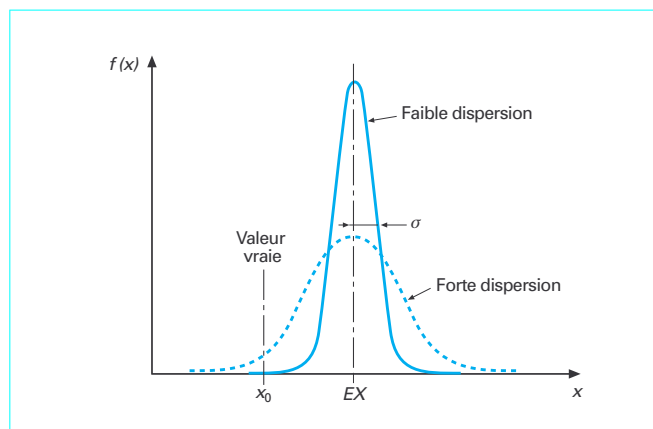


Figure 42 - Distribution des résultats expérimentaux : caractéristiques de dispersion et de justesse