

Chromatographie planaire

par **Antoine M. SIOUFFI**

*Ingénieur de l'École Nationale Supérieure de Synthèse
Procédés et Ingénierie Chimiques d'Aix-Marseille (ENSSPIC AM)
Docteur ès Sciences
Professeur à l'Université Aix-Marseille 3*

Eric POSTAIRE

*Docteur ès Sciences
Pharmacien des Hôpitaux
Maître de Conférence Associé de l'Université Paris XI*

et **Dominique PRADEAU**

*Docteur ès Sciences
Pharmacien des Hôpitaux
Maître de Conférence Associé de l'Université Paris XI*

1. Processus chromatographique	P 1 475 - 2
1.1 Caractéristiques comparées de la chromatographie liquide sur colonne et de la chromatographie planaire.....	— 2
1.2 Domaine d'application de la chromatographie planaire.....	— 3
2. Mise en œuvre d'une chromatographie planaire	— 3
2.1 Géométrie de la couche de phase stationnaire.....	— 3
2.2 Dépôt de l'échantillon	— 3
2.3 Développement des plaques	— 4
2.4 Méthodes de développement en chromatographie sur couche mince ..	— 6
2.5 Systèmes à flux forcé.....	— 7
3. Grandeurs fondamentales en chromatographie planaire	— 9
3.1 Caractéristiques de rétention.....	— 9
3.2 Efficacité	— 10
4. Combinaisons phase stationnaire/phase mobile : mécanismes de rétention	— 14
4.1 Généralités	— 14
4.2 Chromatographie d'adsorption sur gel de silice.....	— 14
4.3 Chromatographie d'adsorption sur alumine.....	— 16
4.4 Chromatographie sur cellulose et dérivés.....	— 16
4.5 Chromatographie sur polyamide	— 17
4.6 Chromatographie sur silice greffée apolaire.....	— 17
4.7 Chromatographie sur phases greffées polaires.....	— 17
4.8 Chromatographie d'échange d'ions et d'appariement d'ions	— 18
4.9 Séparation d'énantiomères	— 18
4.10 Nature chimique des liants	— 18
4.11 Autochromatographie d'un mélange de solvants. Démixion.....	— 19
5. Analyse qualitative et quantitative des substances séparées	— 19
5.1 Généralités	— 19
5.2 Détection visuelle	— 20
5.3 Analyse quantitative par densitométrie.....	— 20
5.4 Formation de dérivés pré- ou postchromatographie	— 23
5.5 Courbes de calibrage.....	— 25
6. Conclusion	— 25
Pour en savoir plus	Doc. P 1 475

La chromatographie est une méthode de séparation des espèces moléculaires contenues dans un mélange parfois très complexe (pétrole, sang, parfum, etc.).

Elle met en jeu une phase stationnaire capable d'attirer les molécules et une phase mobile capable de les entraîner. La nature de la phase mobile, appelée aussi fluide vecteur, caractérise le type de chromatographie (gazeuse, liquide, supercritique). La phase stationnaire doit être confinée. Lorsque l'enceinte de confinement est un tube cylindrique, on parle de chromatographie sur colonne. En chromatographie planaire (CP), la phase stationnaire est déposée sur un support plan, la phase mobile est un liquide et la CP appartient donc au domaine de la chromatographie en phase liquide. En chromatographie sur colonne, le rapport longueur/diamètre est élevé alors qu'en CP c'est le rapport surface/épaisseur. Un cas particulier est constitué par la chromatographie sur baguettes cylindriques appelées **Chromarods**[®].

Notations et Symboles		
Symbole	Unité	Définition
A_s	cm^2	surface occupée sur l'adsorbant par une molécule
B_0	cm^2	perméabilité de la couche
C	$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	concentration du soluté
d_p	μm	diamètre des particules du milieu poreux
D	$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	coefficient de diffusion
e	cm	épaisseur de la couche
H (ou HEPT)	μm	hauteur équivalente à un plateau théorique
k	$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	constante de vitesse
k'		facteur de capacité
K		coefficient de distribution du soluté
L	cm	longueur de développement
N		nombre de plateaux théoriques (ou efficacité)
R_f		rapport frontal
R_s		résolution
u	$\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$	vitesse d'avancement du solvant
V_R	cm^3	volume de rétention
z	cm	distance de migration
α		sélectivité
γ	$\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$	tension superficielle du solvant
θ	$^\circ$	angle de mouillage
ε_T		porosité totale
η	$\text{Pa} \cdot \text{s}$	viscosité du solvant
σ^2		variance
λ		coefficient de tortuosité
ω	cm	largeur des pics à la base
v		vitesse réduite du soluté

indices : *f* front de solvant ; *m* phase mobile ; *s* phase stationnaire.

1. Processus chromatographique

1.1 Caractéristiques comparées de la chromatographie liquide sur colonne et de la chromatographie planaire

La partie la plus importante d'un chromatographe est l'ensemble phase stationnaire/phase mobile. Toute opération chromatographique comporte :

- la mise en mouvement de la phase mobile ;
- l'injection des solutés ;
- le processus chromatographique ;
- la détection des solutés.

En chromatographie liquide sur colonne à haute performance (CLHP), la phase mobile est pompée dans la colonne et l'opérateur est maître du débit ; l'injection est effectuée par une vanne à boucle sans interruption du débit de la pompe et les solutés sont injectés dans un système équilibré. Le processus chromatographique se déroule mais il n'est pas visible par l'opérateur. Les solutés séparés sortent de la colonne, ils sont élués et détectés en continu. L'appareillage peut être totalement automatisé.

Liste des principales abréviations	
CCM	Chromatographie sur couche mince
CLHP	Chromatographie liquide sur colonne à haute performance
CP	Chromatographie planaire
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
FID	Flame ionization detection
HPTLC	High performance thin layer chromatography
OPLC	Overpressured layer chromatography
OPMLC	Overpressured multi layer chromatography
TLC	Thin layer chromatography

Une chromatographie planaire peut se dérouler de deux façons selon que l'opérateur est maître ou non du débit de phase mobile.

■ Dans le cas le plus classique, appelé **chromatographie en couche mince (CCM)**, le dépôt des solutés s'effectue à la surface de la phase stationnaire. On peut donc parler d'une **injection latérale** à la différence de l'injection centrale réalisée sur colonne. Le dépôt est préalable au mouvement de la phase mobile qui s'effectue par capillarité, et une partie de la phase stationnaire, un côté de la surface plane, est en contact avec l'atmosphère ; on est donc en présence d'un **système à trois phases** du fait de la présence de cette phase gazeuse. Le processus chromatographique est visible et **peut être interrompu à tout instant par l'opérateur** s'il constate une anomalie. La différence la plus importante entre la CLHP et la CP est que, dans ce dernier cas, **les solutés ne sont pas élués** ; c'est l'opérateur qui arrête le processus. Le chromatogramme est ainsi préservé et la même phase stationnaire peut être utilisée pour une autre chromatographie avec un autre solvant après évaporation du premier. La détection ne se fait pas en continu et la plaque doit être transférée vers un détecteur après avoir été débarrassée du solvant. La préservation du soluté permet de procéder à plusieurs détections et même à des réactions successives, opération délicate à mettre en œuvre en CLHP. Il n'y a aucune possibilité d'automatisation totale.

■ Dans le cas de la **CP à flux forcé**, la phase gazeuse présente en CCM est totalement éliminée et le système est tout à fait analogue à une CLHP dont la colonne serait de forme parallélépipédique. On peut effectuer l'injection avant mouvement de la phase mobile comme en CCM ou lorsque le système est équilibré comme en CLHP. Il en est de même de la détection qui peut être effectuée en continu ou en discontinu. Le chromatogramme peut être préservé ou non à la volonté de l'opérateur. Celui-ci est maître du débit car le liquide est pompé dans la colonne. La grande différence, outre la forme de la colonne, réside dans l'injection latérale. Les détecteurs de CLHP peuvent être utilisés dans la CP à flux forcé.

1.2 Domaine d'application de la chromatographie planaire

Tous les solutés qui peuvent être chromatographiés en CLHP peuvent l'être en CP. La CCM a souvent été utilisée comme technique pilote dans la mise au point de systèmes chromatographiques CLHP. En mode classique, la CP n'atteint pas les efficacités obtenues à l'heure actuelle avec les colonnes remplies de très petites particules ou les colonnes capillaires utilisées en CLHP. La sélectivité peut être très grande car la CP se prête mieux à la modification de l'ensemble phase mobile/phase stationnaire que la CLHP. La chromatographie planaire seule permet la **multichromatographie**, c'est-à-dire la chromatographie simultanée de plusieurs échantillons (jusqu'à 15 ou 20). Le temps d'analyse peut être très court (parfois en moins d'une minute). La CP permet la détection postchromatographique par transformation chimique suivie d'un chauffage plus ou moins prolongé.

2. Mise en œuvre d'une chromatographie planaire

Nous distinguerons le cas du mouvement de la phase mobile par capillarité et le mouvement à flux forcé.

2.1 Géométrie de la couche de phase stationnaire

La chromatographie sur papier spécial (matière fibreuse ou adsorbante) qui peut être découpé avec des ciseaux à la dimension voulue n'est plus guère utilisée de nos jours que dans quelques cas particuliers comme la chromatographie des colorants.

En CCM, les plaques prêtes à l'emploi sont disponibles chez de nombreux fabricants. Elles sont constituées d'un support inerte rigide ou souple (plaque de verre, feuille d'aluminium, de polyamide, etc.) sur lequel la phase stationnaire est déposée sous forme d'une couche mince (épaisseur de 200 à 250 μm).

Seules sont disponibles des couches de particules solides agglomérées par un liant organique ou minéral qui sert également à assurer l'adhésion sur le support inerte. Il n'existe pas de plaques commerciales de phase stationnaire liquide déposée sur un support solide. Il appartient à l'utilisateur de les préparer le cas échéant. Avec des plaques prêtes à l'emploi, on ne peut réaliser que des chromatographies liquide/solide. Les dimensions habituelles de la surface de la couche sont :

$$\begin{array}{ll} 10 \times 5 \text{ cm}^2 (L \times \ell) & 10 \times 20 \text{ cm}^2 (L \times \ell) \\ 10 \times 10 \text{ cm}^2 & 20 \times 20 \text{ cm}^2 \end{array}$$

On appelle nanoplaques ou plaques HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography) des plaques de $10 \times 10 \text{ cm}^2$ ou de $10 \times 5 \text{ cm}^2$ dont le diamètre des particules est beaucoup plus restreint que celui des particules qui garnissent les autres plaques appelées plaques TLC.

Les supports chromatographiques en vrac peuvent être utilisés pour la fabrication artisanale de plaques par l'utilisateur. On trouvera dans des ouvrages spécialisés [1] [2] le protocole expérimental pour préparer les couches minces de phase stationnaire. La reproductibilité est très dépendante de l'habileté de l'expérimentateur et ne peut être comparée à celle des plaques prêtes à l'emploi. Cette opération est réservée à des cas particuliers, lorsque la séparation doit être réalisée sur une phase stationnaire peu commune qui n'est pas disponible sous forme de plaques prêtes à l'emploi.

Ces dernières peuvent être utilisées pour la CP à flux forcé moyennant une manipulation simple et rapide de préparation des bords de plaque.

Dans le cas de CP à flux forcé avec des appareils non commerciaux, des procédures de remplissage d'une colonne de section parallélépipédique ont été décrites [3] [4]. Dans le cas des plaques prêtes à l'emploi, on constate que le compactage des particules est bien réussi. Des mesures de perméabilité comparées avec celles des colonnes CLHP ont montré que les valeurs sont tout à fait comparables, c'est-à-dire 10^{-3} cm^2 (selon la loi de Darcy).

Un cas particulier est constitué par les baguettes *Chromarods*[®] (appareillage *latroscan*[®]). La couche n'est pas disposée sur une plaque mais sur la surface externe d'une baguette de 0,9 mm de diamètre et 152 mm de long. L'épaisseur de la couche est de 75 μm .

2.2 Dépôt de l'échantillon

Dans la CCM classique, la solution d'échantillon de substance à analyser est déposée à l'aide d'un capillaire ou d'une seringue à une petite distance (1 cm en général) de l'extrémité de la couche. Le volume déposé est très faible (1 à 5 μL) et il faut prendre garde à ne pas détériorer la couche de phase stationnaire avec l'extrémité de la seringue ou du capillaire.

La tache (ou spot) ainsi obtenue doit être aussi circulaire et petite que possible. Le dépôt idéal est de l'ordre de 0,5 à 5 µL en CCM, de 50 à 500 nL en HPTLC (nanoplaques). Les volumes transférables par de petits capillaires sont de 10 à 500 nL, ceux possibles avec les seringues vont de 10 nL à 100 µL. L'emploi d'aiguilles capillaires en silice fondue permet des dépôts d'un volume de 10 nL.

Le système *Transport*[®] est fondé sur l'évaporation des solutions à déposer dans une microcuvette. Lorsque la tache est grande, on constate une inhomogénéité du dépôt et un début de chromatographie circulaire (figure 1). Pratiquement, il faut effectuer le dépôt en solution dans un solvant dont la force éluante est beaucoup moins forte que celle du solvant de développement ; autrement dit lorsque la phase stationnaire est polaire, le dépôt doit être effectué dans le solvant le plus apolaire possible compatible avec la solubilité.

Des appareils automatiques de dépôt de l'échantillon ou applicateurs sont commercialement disponibles. Dans le *Nanomat*[®] de Camag, des pipettes de longueur calibrée en alliage Pt-Ir sont fixées verticalement dans l'appareillage et la pipette est abaissée vers la couche de phase par action d'un aimant. L'impact et le temps de contact peuvent être commandés. Les volumes déposés sont de 100 à 200 nL et la répétabilité du dépôt de l'ordre de 1 % (en masse). Avec le *Linomat*[®] (Camag), les dépôts ont la forme de traits parallèles au bord de la plaque. Une méthode de dépôt par pulvérisation est utilisée et un flux d'azote est employé dans ce but.

Dans le cas de très grandes séries, l'opération peut être totalement automatisée à l'aide d'un déposeur automatique d'échantillons capable de déposer de 100 nL à plusieurs µL avec une précision de 1 %.

Les dépôts en forme de traits peuvent être obtenus par l'emploi de **plaques à zone de concentration** (figure 2). Une couche de kieselguhr est juxtaposée à la couche de phase stationnaire sur un des côtés de la plaque. Cette couche de kieselguhr n'ayant aucune propriété de rétention, le soluté est entraîné par le solvant jusqu'à la couche où il se rassemble sous forme de traits. Des volumes très divers (0,5 à 500 µL) peuvent être déposés à la seringue ou avec le *Linomat*[®].

Dans le cas d'une CP à flux forcé, le dépôt de l'échantillon peut être réalisé de la même façon que précédemment ou au moyen d'une seringue (ou d'une vanne) de façon analogue à la CLHP grâce à l'injecteur prévu à cet effet (figure 10). Les principales caractéristiques concernant le dépôt de l'échantillon sont regroupées dans le tableau 1.

2.3 Développement des plaques

Dans une expérience de CCM type, la plaque est placée dans une cuve à développement contenant le solvant (ou le mélange de solvants) constituant la phase mobile.

2.3.1 Montée capillaire

La couche poreuse peut être assimilée à une multitude de petits capillaires interconnectés et le liquide monte sur la couche en remplissant d'abord les capillaires les plus petits. On constate expérimentalement que la relation entre la distance z_f parcourue par le front du solvant et le temps t est de la forme

$$z_f^2 = kt \tag{1}$$

La vitesse du front du solvant est donc :

$$u_f = \frac{dz_f}{dt} = \frac{k}{2z_f} \tag{2}$$

La constante k est la **constante de vitesse**, elle a été explicitée et s'écrit :

$$k = -2 b B_0 d_p (\gamma/\eta) \cos \theta \tag{3}$$

où b est la constante de proportionnalité entre la vitesse d'avancement du front du solvant dz_f/dt et la vitesse locale de phase mobile, b est en général de l'ordre de 0,8,

B_0 est la perméabilité de la couche,

d_p le diamètre des particules du milieu poreux,

γ la tension superficielle du solvant de viscosité η ,

θ est l'angle de mouillage.

La constante k dépend donc linéairement de d_p (alors qu'elle dépend de d_p^2 en CLHP) ; elle augmente ainsi avec la taille des particules et est très dépendante de la répartition granulométrique. Le choix des solvants est également déterminé par le rapport γ/η .

La vitesse de montée du front du solvant est donnée par :

$$u_f = \frac{2 b B_0}{\eta z_f} \left(\gamma \cos \theta - z_f d_p \frac{\rho g}{12} \right) \tag{4}$$

où ρ est la masse volumique du solvant et g l'accélération de la pesanteur.

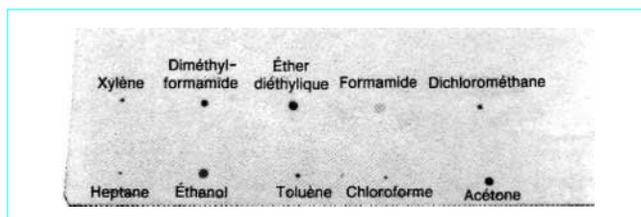


Figure 1 – Microchromatographie de spots déposés par des micropipettes de 1 µL sur une plaque HPTLC : mélange de colorants lipophiles dans différents solvants (doc. Merck)

Tableau 1 – Dépôt des échantillons : caractéristiques

Nature du solvant de dépôt	Utilisation du solvant ayant la force éluante la plus faible vis-à-vis de l'éluant utilisé : évite l'amorce de chromatographie lors du dépôt.
Positionnement du dépôt par rapport au niveau du solvant	1 cm pour plaque CCM 0,5 cm pour plaque HPTLC Cela conditionne la reproductibilité des rapports frontaux
Type de dépôt	<i>Dépôt en point</i> : — 0,5 à 5 µL pour plaque CCM — 50 à 500 nL pour plaque HPTLC <i>Dépôt en trait étroit</i> : pour toutes quantités et tous types de plaques
Choix du mode de dépôt	<i>Analyse qualitative</i> : un capillaire ou une microseringue. <i>Analyse quantitative</i> : amélioration de la reproductibilité, de la précision et de l'automatisation. Échantillonneur ↗ simple dépôt (existe pour 8 plaques à la fois) ↘ dépôts multiples automatiques avec une précision d'environ 1 % sur 5 nL

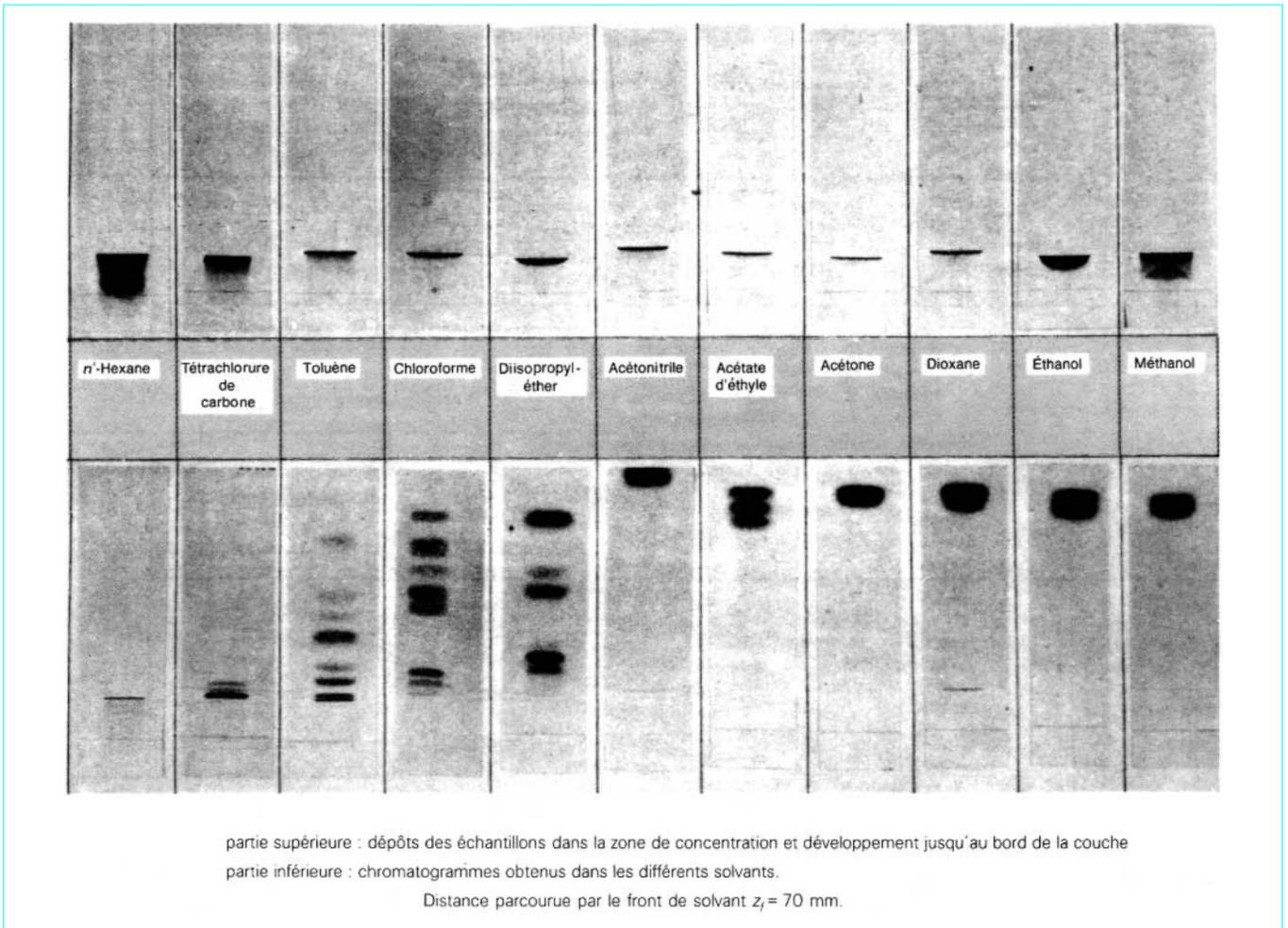


Figure 2 – Chromatographie dans différents solvants d'une solution de sept colorants lipophiles à 0,1 % déposés sur une plaque de gel de silice (Silicagel 60) avec zone de concentration et développés dans une cuve sans saturation [47]

Il est clair que, si la phase stationnaire n'est pas mouillée par le solvant, $\cos \theta = 0$ et il n'y a aucune montée capillaire. Dans de nombreux cas, l'angle de mouillage est nul ; c'est vrai pour les solvants organiques dans leur quasi-totalité, mais ce n'est plus vrai dans le cas de solvants aqueux ou très associés devant imprégner une phase stationnaire hydrophobe. Le choix du solvant devient alors plus restreint.

Par ailleurs, la vitesse du front du solvant est la seule observable mais elle est différente de la vitesse de l'ensemble du solvant. Le profil d'occupation de la couche n'est pas uniforme [5] du fait de la montée plus rapide dans les petits capillaires. La région proche du front du solvant n'est pas identique au reste de la plaque imprégnée et il faut éviter que des solutés y migrent.

La détermination de la constante de vitesse s'effectue par linéarisation :

$$2 \lg z_f = \lg k + \lg t \quad (5)$$

2.3.2 Influence de la phase gazeuse sur la vitesse de montée capillaire

On constate que la loi quadratique (1) n'est pas souvent respectée, en particulier lorsque la cuve de développement possède des dimensions beaucoup plus importantes que celles de la plaque.

Cela est dû au fait qu'une partie de la phase est en contact avec l'atmosphère de la cuve.

Lorsque le liquide monte par ascension capillaire, la surface de la plaque est mouillée et un flux d'évaporation se produit perpendiculairement à la direction de la migration du solvant. Inversement, la présence de solvant dans la cuve de développement entraîne la présence inévitable de vapeurs qui peuvent s'adsorber sur la couche poreuse sèche en remplissant l'espace intergranulaire ; le résultat est une imprégnation préalable de la couche, une accélération de la vitesse de montée du front du solvant. Les deux effets antagonistes (évaporation et adsorption) sont souvent concomitants et la situation classique est celle où le solvant se vaporise derrière le front et s'adsorbe sur la couche encore sèche (figure 3). L'équation générale [6] s'écrit :

$$z^2 = kt \left[1 + \frac{V_a - 2V_e}{2e\epsilon_{T(0)}} t \right] \quad (6)$$

expression dans laquelle V_a est la vitesse d'adsorption des vapeurs de solvant par unité de surface de la phase stationnaire ; V_e est la vitesse d'évaporation du solvant par unité de surface de plaque humide et e est l'épaisseur de la couche.

$\epsilon_{T(0)}$ est la porosité totale de la couche au temps $t = 0$, c'est-à-dire à l'instant de l'introduction de la plaque dans la cuve.

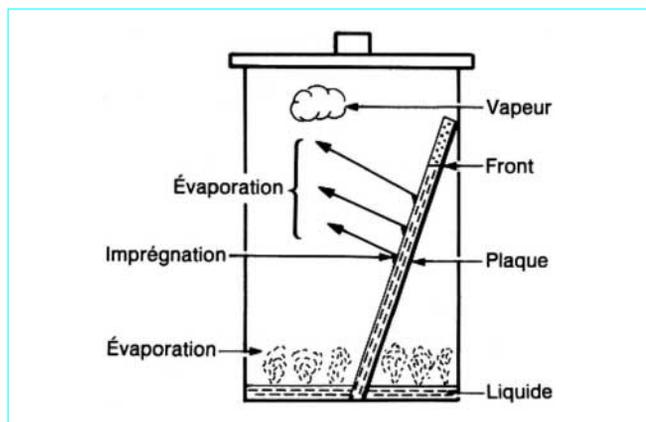


Figure 3 – Développement dans une cuve normale : importance de la phase vapeur

Les allures de la courbe $z = f(t)$ pour différentes situations sont données sur la figure 4. Elles expriment clairement qu'un phénomène prépondérant (adsorption ou évaporation) peut affecter énormément la vitesse de montée du front du solvant. En particulier, l'adsorption préférentielle du solvant le plus volatil dans le cas d'un mélange de solvants conduit au remplissage des pores avec un solvant différent de celui du développement, ce qui se traduit par une modification de la composition de la phase mobile [7]. Un moyen simple et pratique d'appréhender le phénomène prépondérant est de mesurer la vitesse de montée du solvant et de porter sur un graphe z^2/t en fonction de t (figure 5).

Un bon solvant conduit évidemment à une droite parallèle à l'axe des abscisses ; une pente positive ou négative indique si l'adsorption (qui augmente la vitesse) ou l'évaporation (qui la réduit) est le phénomène prépondérant et il faudra donc y remédier.

Conséquence pratique : il faut toujours mesurer le temps de montée du solvant pour savoir si celui-ci est bien reproductible.

Il existe de nombreuses techniques en CCM pour pallier cet inconvénient. L'une d'elles consiste à tapisser les parois de la cuve de papier filtre. Le solvant monte par capillarité et, au bout d'un certain temps, l'atmosphère de la cuve est saturée en solvant. Il faut mentionner que l'introduction de la plaque déséquilibre le système à moins qu'un montage identique à celui préconisé par Lamotte ne soit utilisé [8]. Lorsque l'on travaille en système non équilibré, c'est-à-dire que la cuve contient la quantité de solvant nécessaire et que la plaque CCM est immédiatement mise en place, les données de rétention observées sont différentes de celles obtenues en cuve saturée avec des vapeurs de solvant [9]. L'influence de la vapeur de solvant peut être étudiée de façon systématique avec une cuve *Vario KS*® (Camag).

2.4 Méthodes de développement en chromatographie sur couche mince

2.4.1 Développement linéaire

La grande majorité des analystes continue d'utiliser la montée capillaire, système dans lequel la plaque CCM est disposée verticalement dans une cuve adaptée aux dimensions des plaques. Pour éviter l'influence néfaste des vapeurs de solvant, des cuves sandwich peuvent être utilisées : une plaque de support inerte (verre ou tôle) est disposée à une petite distance de la couche de phase

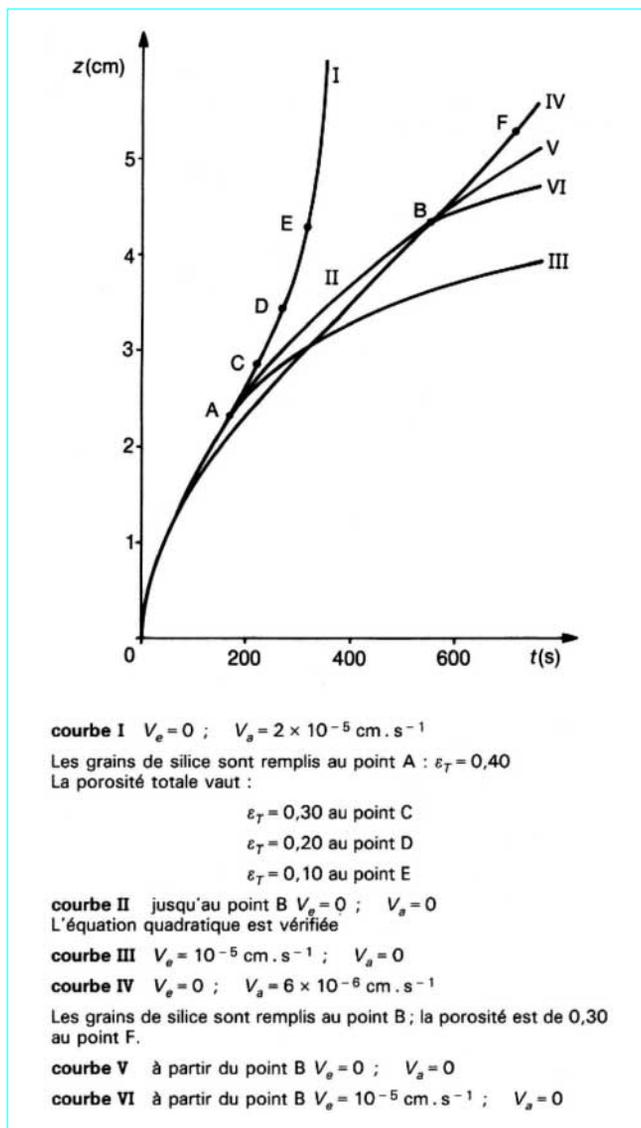


Figure 4 – Effets combinés de l'adsorption et de l'évaporation (d'après [6])

stationnaire (quelques millimètres). Les montées de solvant sont très reproductibles mais il faut prendre garde à la chaleur d'adsorption de solvants volatils qui peut se traduire par la formation de gouttelettes.

Une chambre de développement automatisée a été proposée dans laquelle un capteur optique à double faisceau est activé lorsque le front du solvant coupe le faisceau déclenchant automatiquement la montée de la plaque et sa mise hors solvant [10].

Une autre façon de procéder à un développement linéaire consiste à disposer la plaque horizontalement ; le solvant arrive de deux côtés opposés de la plaque par une fente capillaire. Le processus de développement s'arrête lorsque les deux fronts se rencontrent. L'avantage de ce système est de permettre une occupation totale de la couche d'adsorbant et de doubler le nombre d'échantillons que l'on peut analyser.

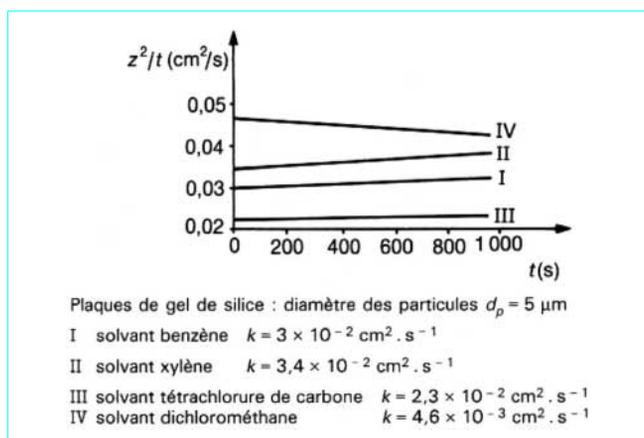


Figure 5 - Mise en évidence des phénomènes prépondérants d'adsorption et d'évaporation (d'après [6])

Les cuves de développement les plus communément utilisées en CP sont présentées sur la figure 6.

Une variante du développement linéaire est constituée par le développement multiple, dont la version la plus élaborée est le **développement multiple programmé** (PMD). Dans ce mode, la plaque disposée verticalement (ou inclinée à 45°) est développée plusieurs fois et, entre chaque développement, le solvant est évaporé avant de recommencer l'opération.

Dans l'**analyse à développements multiples** (AMD) [11], le système est complètement automatisé et l'évaporation du solvant est effectuée sous azote.

La plaque est développée plusieurs fois, dans la même direction, en augmentant à chaque étape la distance de migration, la force éluotrope du solvant diminuant conjointement au cours de l'analyse. Le principe de l'AMD est schématisé sur la figure 7.

2.4.2 Développement circulaire

Dans ce système, la phase stationnaire est disposée horizontalement, la phase mobile arrive au centre de la plaque et se distribue uniformément par capillarité, ce qui produit une tache circulaire qui s'agrandit si l'on continue l'alimentation en solvant.

Dans la chambre en U (Camag), la phase mobile est amenée sur la phase stationnaire à l'aide d'une seringue actionnée par un moteur pas à pas. Suivant le débit de sortie de solvant du capillaire, la taille de la gouttelette formée peut varier.

La valeur limite du débit peut être atteinte lorsque la gouttelette n'est plus maintenue par sa tension superficielle. Un système adéquat permet de faire circuler ou non les vapeurs de solvant, permettant de travailler dans des conditions de saturation ou d'insaturation (figure 8).

2.4.3 Développement anticirculaire

Dans ce procédé, le liquide vecteur se dirige de la périphérie vers le centre de la plaque. Pratiquement, un canal très étroit entoure la plaque, il est rempli de liquide et le transfert sur la couche est réalisé par capillarité. Dans ce système, la surface que doit mouiller la phase mobile diminue à mesure que celle-ci avance. Ce système, contrairement au précédent, permet une augmentation du nombre de dépôts sur la plaque et un passage plus aisé à la chromatographie préparative.

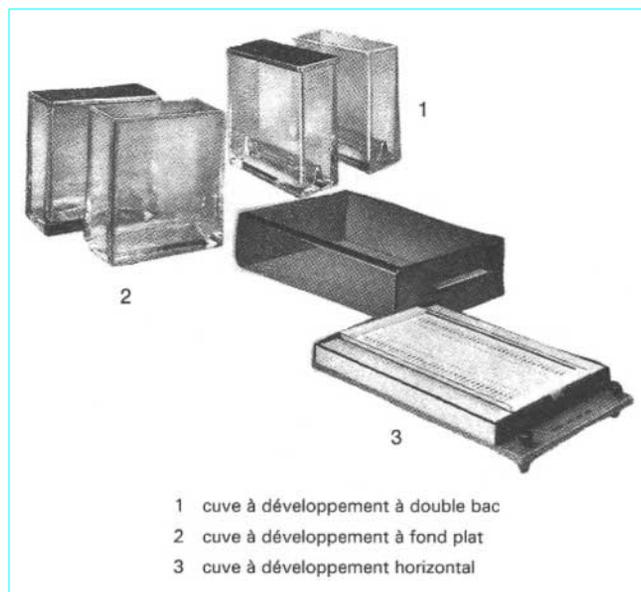


Figure 6 - Différents types de cuves

2.4.4 Système Soczewinski

Pour s'affranchir de la loi quadratique de développement et se rapprocher des conditions de la chromatographie sur colonne sans perdre la spécificité de la CCM, Soczewinski a imaginé un système dans lequel la plaque CCM est placée horizontalement dans un récipient rectangulaire formant un U [12]. La phase stationnaire est recouverte d'une plaque de verre dans laquelle sont percés deux petits trous. Le liquide éluant est placé dans un petit réservoir et un petit siphon capillaire réalise la jonction entre celui-ci et la couche. Une fois le siphon amorcé, le liquide se répand sur la couche ; il est égalisé par un distributeur et comme il ne peut aller vers le fond du U, il avance dans la couche. La plaque de verre ne recouvrant pas la totalité de la couche, le solvant peut être évaporé au fur et à mesure, ce qui permet d'assurer une vitesse linéaire du solvant à peu près constante. Le deuxième trou permet d'injecter les solutés dans un système équilibré.

2.5 Systèmes à flux forcé

L'opérateur cherche à s'affranchir de la capillarité et à se rendre maître de la vitesse de la phase mobile. Le but immédiat est le gain de temps et le but ultime d'arriver à un système quasi colonne.

2.5.1 Utilisation de la force centrifuge

Cette idée n'est pas nouvelle, mais elle a fait sa réapparition sous forme d'appareil élaboré et fiable *Rotachrom*®. Il en existe plusieurs versions.

Dans le mode le plus simple utilisé en préparatif et dérivé d'un appareil plus ancien (*Chromatotron*®), la plaque tourne autour d'un pivot central dans une enceinte. L'arrivée de solvant n'est pas effectuée au centre à cause du pivot mais à environ 1,5 cm du centre. L'enceinte n'est pas fermée et l'évaporation du solvant est considérable. Pour les besoins analytiques, on utilise une microchambre (MRPC : *Microchamber Rotation Planar Chromatography*)

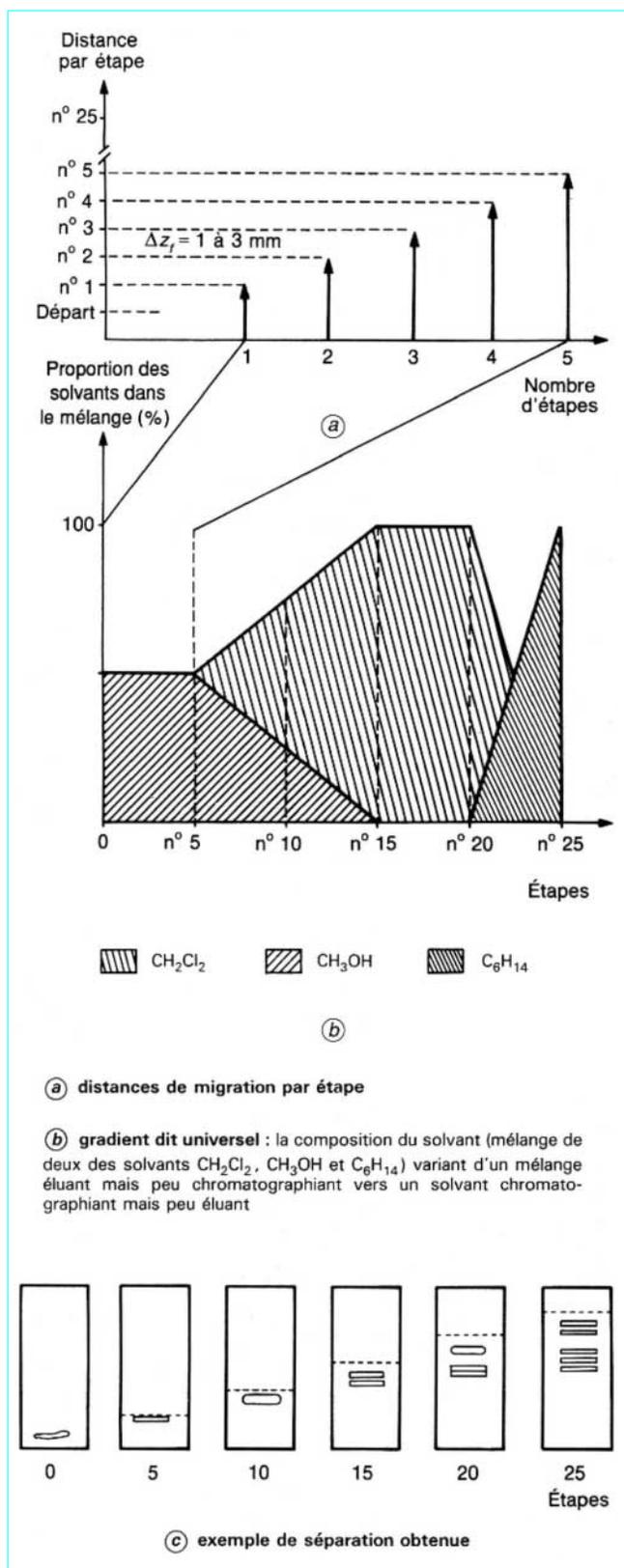


Figure 7 – Principe de l'analyse à développements multiples (doc. Camag)

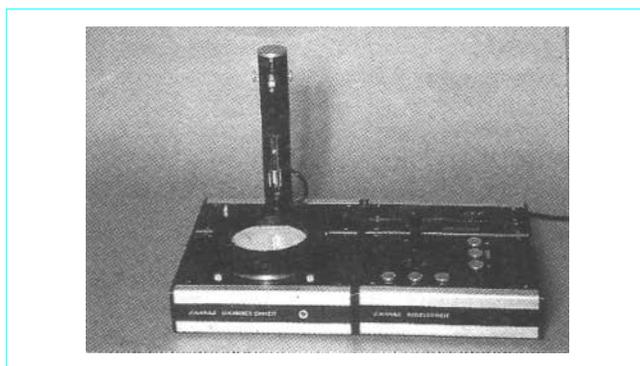


Figure 8 – Développement circulaire : chambre en U

dans laquelle la plaque est solidarisée et l'ensemble est mis en rotation. La chambre est fermée, la phase gazeuse au-dessus de la phase stationnaire est réduite et son volume peut être ajusté suivant les besoins de l'utilisateur.

Il s'agit donc d'un système saturé. Tous les types de plaques peuvent être utilisés et une préparation adéquate de la plaque permet de fonctionner en mode anticirculaire et même en mode linéaire.

Dans l'ultramicrochambre (URPC), il n'y a plus d'espace pour la vapeur de solvant car une plaque de caoutchouc est placée sous la couche de phase stationnaire. La vitesse de la phase mobile peut être modifiée (figure 9).

La migration du solvant est fonction de la vitesse de rotation et de l'alimentation de la phase stationnaire. La vitesse maximale autorisée est définie par la quantité de liquide qui peut alimenter la couche sans inonder la surface. À grande vitesse de rotation, la migration du solvant suit une loi du premier degré en développement linéaire, mais reste à peu près quadratique en développement circulaire.

2.5.2 Chromatographie sur couche mince pressurisée OPLC

Le terme général OPLC (*Overpressured Layer Chromatography*) est dû à Tyihak *et al.* qui ont, les premiers, placé une plaque de CCM dans une enceinte fermée sous pression [13]. La figure 10 montre le principe de fonctionnement d'un appareil commercial de ce type. La plaque est introduite dans l'appareil après un traitement convenable des bords de plaque et la phase stationnaire est recouverte d'une membrane flexible. Le couvercle de l'appareil refermé, une pression est appliquée sur la membrane. Dans le cas de l'appareil Chrompres® (Labor-MIM), la pression est assurée par pompage d'un volume d'eau ; la pression utilisée est de l'ordre de 1,2 à 2,5 MPa. La phase mobile est ensuite forcée à travers la phase de la couche mince comme en CLHP. L'homogénéité et la linéarité de l'écoulement du solvant sont assurées sur toute la largeur de la plaque par une rigole de distribution perpendiculaire au sens de migration. Le front du solvant avance à une vitesse qui est fonction du débit de la pompe et qui est choisie par l'opérateur.

La pression nécessaire pour garder constant le débit de phase mobile croît avec la distance de migration. Si une pompe à débit constant est utilisée pour un développement circulaire, la vitesse de migration du front n'est pas constante, car la surface à imprégner augmente beaucoup plus dans la direction de la migration.

Lorsqu'un liquide est forcé de passer dans une couche poreuse initialement sèche, l'air déplacé par le liquide forme un second front (front bêta). Ce front peut présenter un aspect chaotique, car il se produit des microbulles provenant de la dissolution de l'air dans le liquide. La zone comprise entre le front du solvant (front alpha) et le front bêta doit être évitée.

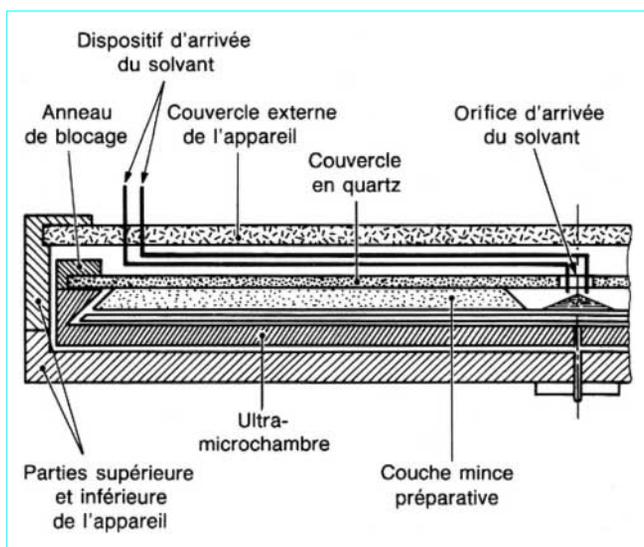


Figure 9 – Coupe d'une ultramicrochambre (URPC) [16]

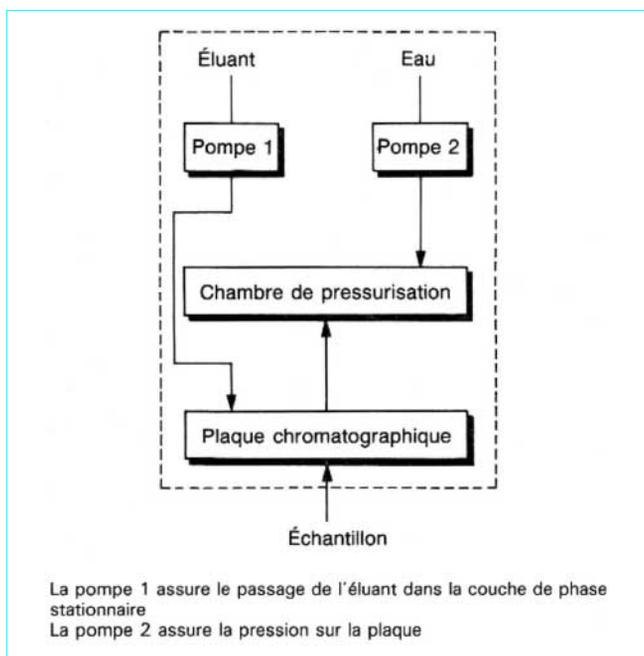


Figure 10 – Principe de fonctionnement de l'appareil Chrompres

L'emploi de pressions plus élevées (25 bar) permet l'utilisation de plaques de microparticules. Le débit peut donc être réglé de façon à obtenir une vitesse linéaire uniforme du liquide vecteur. Le système permet de travailler de multiples façons : les échantillons peuvent être déposés sur la plaque sèche, la plaque positionnée dans l'appareil, développée et la chromatographie arrêtée lorsqu'on le juge nécessaire. Il est aussi possible, après que le système a été équilibré, d'injecter les produits à analyser à l'aide d'une seringue par l'injecteur prévu à cet effet, et d'éluer les produits ; une rigole

placée à l'autre extrémité de la plaque permet de rassembler le solvant et de l'acheminer vers un détecteur analogue à un détecteur de CLHP et/ou un collecteur de fractions (ce qui évite tout grattage de plaque et permet, entre autres, un couplage à la spectrométrie de masse). L'appareil est donc propice à une détection en continu ou en discontinu au gré de l'utilisateur [14].

Par ailleurs, un développement continu peut être mis en œuvre pour obtenir une meilleure résolution lorsque l'éluant utilisé donne de faibles valeurs du rapport frontal R_f (§ 3.1) avec un bon pouvoir de résolution pour les constituants de l'échantillon ($R_f < 0,5$). Ainsi, les conditions opératoires utilisées en chromatographie liquide peuvent être transposées directement [15]. Seuls les paramètres opératoires doivent être optimisés [16] tels que le débit de l'éluant, la distance virtuelle de séparation parcourue qui peut dépasser 20 cm, la température de développement.

Enfin, une nouvelle version de l'OPLC utilisant deux, trois (ou plus) plaques chromatographiques au cours d'un seul développement a été proposée par Tyihak *et al.* [17]. Cette technique dénommée *Over-pressured Multi Layer Chromatography* (OPMLC) est très attractive en raison du nombre très important d'échantillons (50 à 100 au moins) qui peuvent être séparés en une seule migration, la reproductibilité des performances de résolution étant tout à fait identique pour l'ensemble des plaques chromatographiques.

2.5.3 Autres systèmes pressurisés

D'autres systèmes ont été décrits dans la littérature. Aucun n'est commercialisé à l'heure actuelle. Un appareil de dimensions beaucoup plus restreintes que le précédent utilise l'air sous pression au lieu de l'eau et a été prévu pour des arrivées orthogonales de liquide vecteur [3]. De très hautes pressions peuvent être envisagées mais l'appareil construit ne fonctionne qu'en mode circulaire [18]. Un système linéaire dont la géométrie de colonne ressemble à celle d'une colonne de fractionnement par champ de force a été décrit ; la grande originalité réside dans la détection électrochimique [4].

3. Grandeurs fondamentales en chromatographie planaire

3.1 Caractéristiques de rétention

Dans tout processus chromatographique, la phase mobile est animée d'une vitesse u ; les substances à séparer sont retenues par la phase stationnaire et cheminent à une vitesse inférieure à u .

En chromatographie en phase liquide sur colonne, le solvant percole à travers la colonne et :

$$u = \frac{4Q}{\pi d_c^2 \varepsilon_T} \quad (7)$$

expression dans laquelle Q est le débit affiché à la pompe, d_c le diamètre interne de la colonne et ε_T la porosité totale lorsque la colonne est remplie.

On peut aussi écrire :

$$u = B_0 \frac{d_p^2 \Delta P}{\eta L} \quad (8)$$

dans laquelle $\Delta P/L$ est le gradient de pression sur la colonne de longueur L , d_p le diamètre des particules du milieu poreux, η la viscosité du solvant et B_0 la perméabilité de la couche.

En CLHP, la vitesse de la phase mobile s'écrit :

$$u = \frac{L}{t_0} \quad (9)$$

et la vitesse d'une substance i à séparer :

$$u_i = \frac{L}{t_{R_i}} \quad (10)$$

t_0 est le temps de rétention du composé inerte, c'est-à-dire le soluté qui n'a pas d'affinité pour la phase stationnaire et t_{R_i} le temps de rétention du composé i .

t_0 doit être défini pour un soluté donné dans le cas d'un milieu poreux car la phase mobile peut se trouver à la fois dans l'espace intragranulaire et dans l'espace intergranulaire au sein desquelles les vitesses sont différentes. D'une façon pratique, on définit le **facteur de capacité** :

$$k' = \frac{t_{R_i} - t_0}{t_0} \quad (11)$$

En **chromatographie planaire à flux forcé** avec élution des composés, les substances sont caractérisées par la valeur du facteur de capacité. On prendra garde au fait que le facteur de capacité d'un système CP identique à un système CLHP n'est pas le même, puisque :

$$k' = K \frac{V_s}{V_m} \quad (12)$$

expression dans laquelle K est le coefficient de distribution du soluté et V_s/V_m , le rapport des volumes de phase stationnaire et de phase mobile. Ce dernier n'est pas forcément le même dans l'un et l'autre cas puisque la géométrie du système n'est pas identique.

En **CCM classique**, il n'y a pas élution, l'opérateur arrête le mouvement du solvant. Après un temps t_0 , le front du solvant a parcouru la distance z_f et la zone de soluté i la distance z_i . On appelle **rapport frontal** R_f la quantité z_i/z_f .

R_f est donc un nombre sans dimension comme k' , mais il ne peut être caractéristique de la substance que si les paramètres expérimentaux sont bien maîtrisés. R_f est compris entre 0 et 1 et l'on utilise quelquefois $hR_f = 100 R_f$, de même que :

$$R_M = \lg \left(\frac{1 - R_f}{R_f} \right)$$

Un calcul simple montre que :

$$k' = \frac{1 - R_f}{R_f} \quad (13)$$

si le rapport des volumes des phases en CP et en CCM est identique.

Un facteur ξ (de l'ordre de 1,1 à 1,2) peut être ajouté pour tenir compte du non-respect de la loi quadratique de montée du solvant :

$$R_M = \lg \left(\xi \frac{(1 - R_f)}{R_f} \right) \quad (14)$$

En chromatographie circulaire, on écrit :

$$R_{f\text{circ}} = \sqrt{R_{f\text{lin}}}$$

Cette relation n'est toutefois correcte que si le dépôt de l'échantillon est identique au point d'arrivée du solvant. Si r est la distance entre les deux, on écrit :

$$R_{f\text{circ}} = \sqrt{R_{f\text{lin}}(1 + 2r) + r^2 - r}$$

Dans le cas du développement anticirculaire, on écrit :

$$R_{f\text{lin}} = 1 - (1 - R_{f\text{anticirc}})^2$$

Dans tous les cas, la substance est détectée et l'on considère que la rétention de la substance est prise à la moyenne de la distribution. Dans une chromatographie bien conduite, la distribution du soluté suit une loi de Poisson à très faible dissymétrie assimilable à une loi gaussienne. L'enregistrement de la distribution est effectué par le détecteur (§ 5.3).

3.2 Efficacité

3.2.1 Hauteur équivalente à un plateau théorique

■ En **chromatographie à flux forcé**, l'équation de Van Deemter ou l'équation de Knox qui donne une expression de la hauteur équivalente à un plateau théorique est applicable :

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (15)$$

où H est la hauteur équivalente à un plateau théorique (ou HEPT), $H = L/N$,

L est la longueur de la colonne en cas d'élution ou la longueur du développement,

N est le nombre de plateaux théoriques ou efficacité,

les termes A , B et C sont liés respectivement à la diffusion tourbillonnaire, à la diffusion moléculaire et au transfert de masse. En pratique, on peut utiliser, comme en CLHP, l'équation de Knox écrite en nombres sans dimension sous la forme :

$$h = Av^{1/3} + \frac{B}{v} + Cv \quad (16)$$

où h est la hauteur réduite $h = H/d_p$,

v est la vitesse réduite $v = ud_p/D_m$,

D_m est le coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile.

En CP à flux forcé, la HEPT est indépendante de la distance de migration et l'efficacité la plus grande est obtenue avec des particules de granulométrie faible et de répartition très serrée.

Étant donné la forme des équations (15) ou (16), il existe une vitesse de phase mobile optimale qui correspond au minimum de la courbe de HEPT. Il a été observé expérimentalement que la valeur optimale décroît en fonction de la distance de migration et ne devient constante que pour des distances de migration supérieures à 25 cm, ce qui est rarement le cas en pratique. Des hauteurs de plateau de 8 μm ont été observées, ce qui correspond à environ 30 000 plateaux sur une distance de migration de 25 cm. Cela est tout à fait comparable à ce qui est observé en CLHP. Le problème de l'injection du soluté devient crucial, mais il peut être maîtrisé en utilisant la technique de compression de pic au moyen d'un solvant plus éluant. Les principales caractéristiques de l'OPLC sont rassemblées dans la figure 11.

■ En **CCM classique**, la vitesse du solvant n'est pas constante et la longueur de la colonne non plus. Si la distribution du soluté obéit à la loi de Gauss, on peut définir une hauteur locale H_ℓ de plateau théorique :

$$H_\ell = \frac{d\sigma^2}{dz} \quad (17)$$

où $d\sigma^2$ est l'accroissement de la variance,

dz est l'accroissement de la distance de migration.

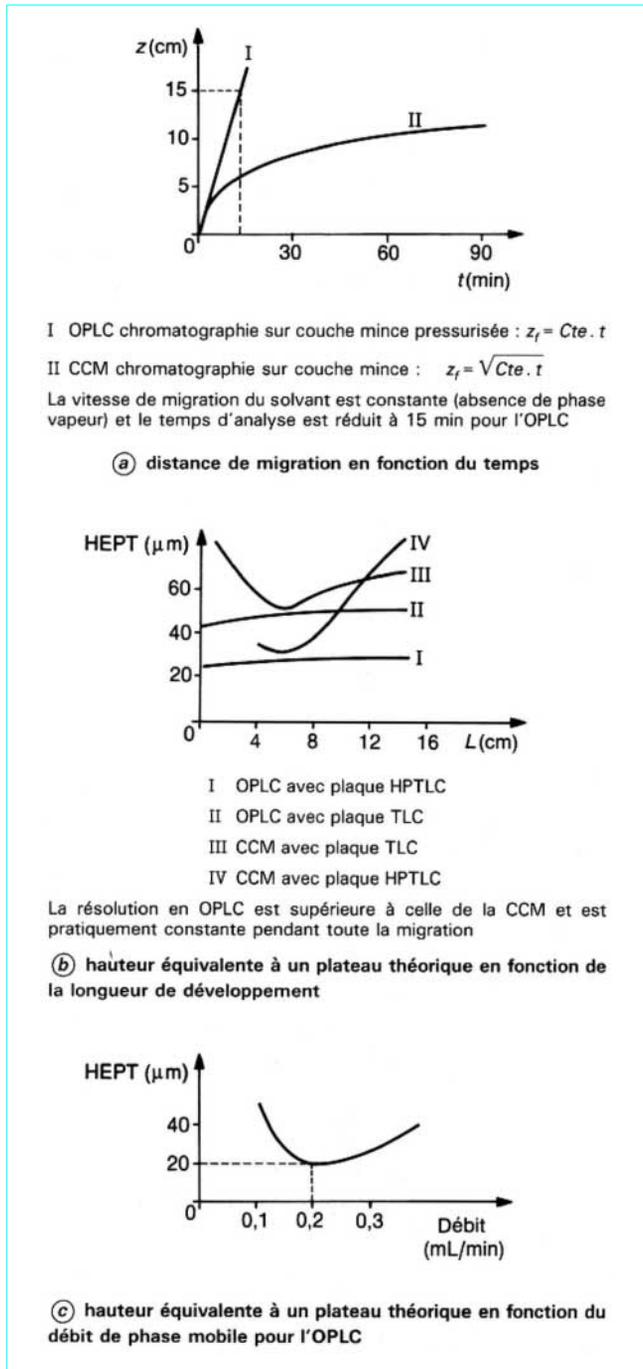


Figure 11 - Caractéristiques comparées de l'OPLC

La hauteur de plateau moyenne est définie par :

$$\bar{H} = \frac{\int_{z_0}^z H_\ell dz}{\int_{z_0}^z R_f dz} = \frac{\sigma^2}{(z - z_0)R_f} \quad (18)$$

où z_0 est la distance entre le spot et le niveau du liquide.

En considérant que la plaque chromatographique possède les mêmes propriétés qu'une colonne de CLHP, que les coefficients de l'équation de Knox peuvent donc être utilisés, que le profil de concentration de la phase mobile est constant (ce qui exclut la zone près du front), on peut écrire :

$$\bar{H} = \int_{z_0}^{z=L} \frac{H_\ell dz}{L - z_0} \quad (19)$$

où L est la longueur du développement, analogue à la longueur de la colonne en CLHP [19].

La hauteur de plateau en fonction de la distance de développement est donnée par l'équation de Guiochon [20] :

$$H = \frac{B}{\gamma d_p} [L + z_0] + \frac{3}{2} \frac{A d_p^{5/3} \gamma^{1/3}}{(2D_m)^{1/3}} \cdot \frac{L^{2/3} - z_0^{2/3}}{L - z_0} + \frac{C \gamma d_p^3}{2D_m(L - z_0)} \ln L/z_0 \quad (20)$$

que l'on peut écrire sous la forme :

$$H = b(L + z_0) + \frac{a}{L - z_0} (L^{2/3} - z_0^{2/3}) + \frac{c}{(L - z_0)} \ln L/z_0 \quad (21)$$

avec $b = \frac{B}{\gamma d_p}$,

$$a = \frac{3}{2} A \frac{d_p^{5/3} \gamma^{1/3}}{(2D_m)^{1/3}},$$

$$c = \frac{C \gamma d_p^3}{2D_m}.$$

γ est un coefficient lié à la constante de vitesse k du solvant et à ses propriétés physiques,

A , B et C sont analogues aux coefficients des équations (15) et (16).

A est un coefficient de compacité tout à fait analogue à celui de la CLHP et sa valeur est de l'ordre de 1 pour les plaques prêtes à l'emploi disponibles commercialement,

le terme de diffusion B s'écrit :

$$B = 2 \left[\lambda_m D_m + \frac{(1 - R_f)}{R_f} \lambda_s D_s \right]$$

où λ_m et λ_s sont les coefficients de tortuosité dans la phase mobile et la phase stationnaire,

D_s est le coefficient de diffusion du soluté dans la phase stationnaire. Les études effectuées ont montré que le terme B était prépondérant lorsque des plaques de petites particules sont utilisées,

C est un terme de transfert de masse dont la valeur est analogue à celle observée en CLHP de 0,01 à 0,1.

3.2.2 Hauteur équivalente à un plateau théorique en fonction de la longueur de développement

À partir de l'équation (20), on peut tracer les courbes $H = f(L)$ en se fixant un diamètre de particules, une valeur des coefficients de diffusion, etc., comme il est présenté sur la figure 12.

La courbe $H = f(L)$ tracée pour des particules de $30 \mu\text{m}$ est particulièrement instructive, car elle montre que la meilleure efficacité est atteinte pour une distance de développement de 10 cm. Cela avait été constaté expérimentalement et, dans tous les manuels faisant allusion aux plaques en usage à la fin des années 80, il était indiqué que 10 cm était la distance de migration à utiliser. On constate que plus la granulométrie des particules est faible, plus la distance de migration fournissant la meilleure efficacité est petite. Autrement dit : les plaques constituées de petites particules doivent être développées sur de très courtes distances, les plaques de

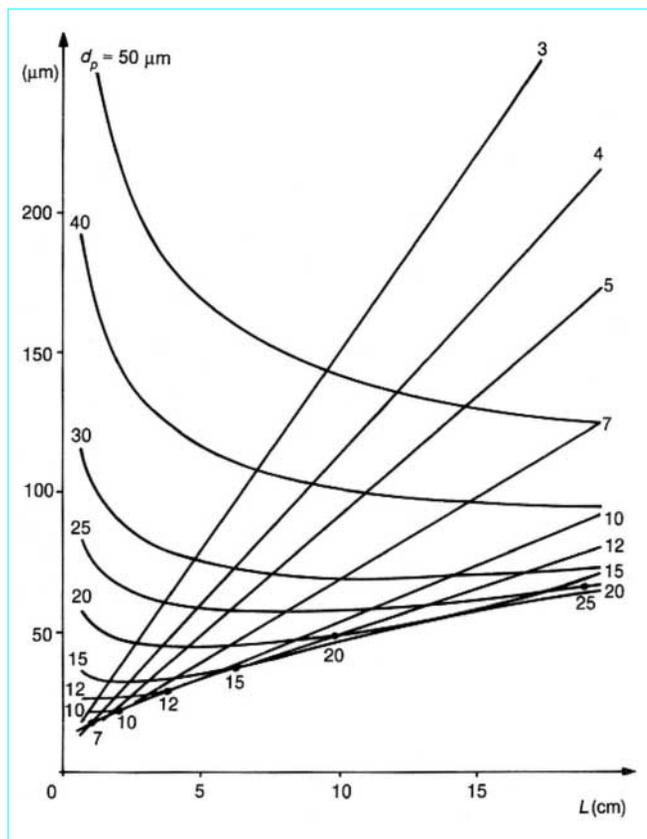


Figure 12 – Hauteur équivalente à un plateau théorique en fonction de la distance de développement [20]

grosses particules doivent être développées sur des distances plus longues. On voit clairement que, toutes choses étant égales par ailleurs, les plaques de particules plus grosses peuvent (dans certains cas) être plus efficaces que les plaques HPTLC (plaques de petites particules). Il faut toutefois être prudent car les courbes $H = f(L)$ font abstraction de la nature du détecteur qui peut être capable tout aussi bien de restituer la séparation que de la déformer. De même, on considère que la variance due à l'injection ne dépasse pas 10 % de la variance totale.

Le coefficient de diffusion étant le terme prépondérant, on voit clairement à partir de ces courbes que les solutés de coefficient de diffusion élevé sont mal séparés sur des couches de petites particules si l'on prolonge le développement. Par contre la situation est beaucoup plus favorable lorsqu'on utilise des particules de $d_p = 20 \mu\text{m}$ par exemple (figure 13). Il importe donc de choisir solvant, diamètre de particules et longueur du développement à partir de la nature des solutés à séparer.

3.2.3 Résolution et capacités en pics

Par définition, la résolution entre deux zones chromatographiques i et j de distribution gaussienne est donnée par [21] :

$$R_s = 2 \frac{(z_j - z_i)}{\omega_i + \omega_j} \quad (22)$$

où z_i et z_j étant les distances de migration, ω_i et ω_j les largeurs de pics à la base.

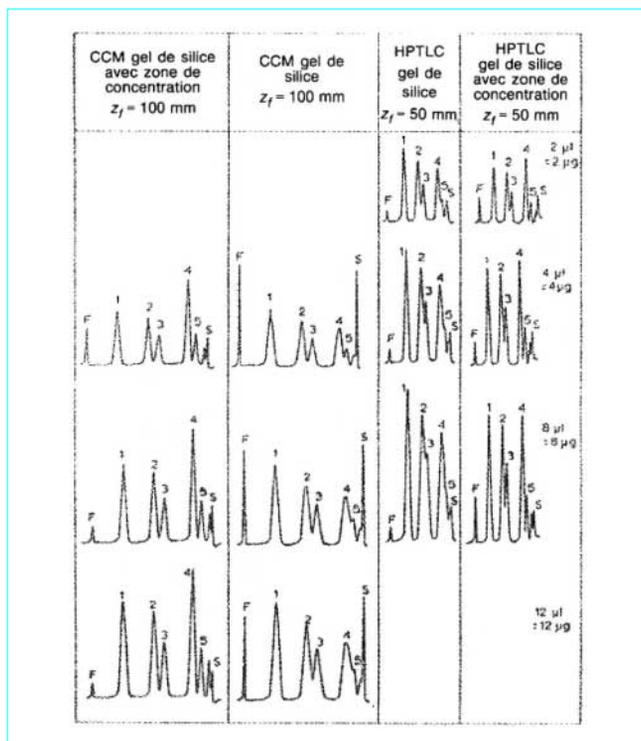


Figure 13 – Résolution et capacités en pics [47]

Par définition $z_i = R_{fi} L$.

Le nombre de plateaux pour une tache donnée s'exprime par :

$$N = \frac{R_{fi} L}{H} = \frac{16 (z_i)^2}{(\omega_i)^2} \quad (23)$$

en effet, pour une chromatographie quelconque, on a $H = \sigma^2/L$, et la résolution s'écrit :

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{\Delta R_f}{R_{fi}} \quad (24)$$

R_{fi} correspondant à la tache de plus grande mobilité.

Le nombre de plateaux étant proportionnel à R_f , il est pratique de définir une efficacité N' de la couche :

$$N = N' R_f$$

où N' est un coefficient de proportionnalité correspondant au nombre de plateaux hypothétique observés avec un soluté non retenu.

C'est la différence des coefficients de distribution $K = C_s/C_m$ du soluté entre la phase mobile et la phase stationnaire qui assure la séparation, donc :

$$\frac{K_j - K_i}{K_i} = \frac{\Delta K}{K_i} = \frac{\alpha - 1}{\alpha} \quad (25)$$

avec α facteur de sélectivité.

Si les deux taches ne sont pas très éloignées ($R_{fi} \approx R_{fj} \approx R_f$), on a :

$$\frac{\Delta K}{K_i} = \frac{\Delta R_f}{R_{fi}(1 - R_{fi})} = \frac{\Delta R_f}{(1 - R_f) R_f} \quad (26)$$

La combinaison des équations (24) et (26) permet d'écrire :

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{\Delta K}{K} (1 - R_f) \quad (27)$$

ou

$$R_s = \frac{\sqrt{N'}}{4} \frac{\Delta K}{K} (1 - R_f) \sqrt{R_f} \quad (28)$$

La variation de R_s en fonction de R_f montre que la courbe passe par un maximum pour $R_f = 0,33$ (figure 14).

Le nombre de plateaux nécessaires pour réaliser une séparation est donnée par la **relation de Purnell** :

$$N_{min} = 16 R_s \frac{\alpha^2}{(\alpha - 1)^2} \frac{1}{(1 - R_f)^2} \quad (29)$$

3.2.4 Sélection des conditions opératoires

Quel est le type de plaques (petites particules HPTLC ou particules plus grosses TLC) et la longueur du développement à utiliser pour obtenir la séparation désirée ?

En CLHP (et donc en CP à flux forcé), le nombre de plateaux nécessaires à la séparation peut être calculé par l'équation de Purnell (29) et $N_{min} = L/H$.

En CP ou CCM classique :

$$N_{min} = \frac{R_f L}{H} \quad (30)$$

Si le terme C de l'équation de Knox (16) est négligeable, on peut écrire en CP à flux forcé :

$$\begin{aligned} h &= Av^{1/3} + B/v \\ H &= bL + aL^{2/3} \end{aligned} \quad (31)$$

si z_0 est négligeable devant L ; (cela n'est pas exact lors de développements très courts mais est toujours exact avec des plaques à zone de concentration).

La longueur du développement et le diamètre des particules sont déterminés par l'intersection de la courbe $H = f(L)$ et de la droite passant par l'origine, de pente R_f/N_{min} . Si cette dernière n'a aucune intersection avec les courbes $H = f(L)$, la séparation n'est pas possible en CCM.

Exemple d'application : la séparation des chrysène, benzo (e) pyrène, benzo (a) pyrène exige 180 plateaux pour que l'on obtienne une résolution de 1 (R_f respectifs : 0,30 ; 0,23 et 0,20).

Les plaques de $d_p = 7 \mu\text{m}$ développées sur 2 cm seulement conviendront à la séparation avec un solvant acétonitrile ($\gamma = 70$ sur une plaque hydrophobe, coefficient de diffusion : $D_m = 5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$)

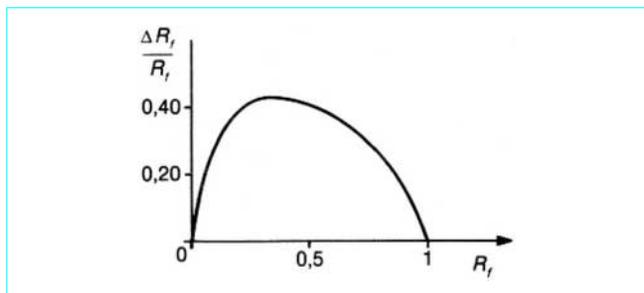


Figure 14 - Variation de la résolution entre deux composés en fonction de la rétention du composé le plus retenu dans le cas où $R_{f1} \approx R_{f2}$

La résolution en CP à flux forcé est définie comme précédemment. Étant donné que l'on peut considérer N comme constant, l'équation de Purnell est applicable :

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \frac{k'_j}{1 + k_j} \quad (32)$$

k'_j étant alors le facteur de capacité du soluté le plus retenu.

La **capacité en pics** est le nombre maximal de composants d'un mélange pouvant être séparés avec une résolution de 1, en comptant les pics à partir du composé non retenu. La capacité en pics excède les besoins de l'analyste dans les colonnes à très haute résolution, mais il n'en est pas de même en CP du fait des dimensions limitées de la plaque.

Si dn est le nombre de pics sur la distance dz et $4\sigma = \omega$ la largeur du pic gaussien, on a :

$$dn = \frac{dz}{4\sigma} \quad (33)$$

Guiochon [20] a tenu compte de la variation du nombre de plateaux avec la longueur du développement. Sachant que la variance observée σ^2 peut s'écrire :

$$\sigma^2 = \sigma_{inj}^2 + zH \quad (34)$$

somme de la variance due à l'injection σ_{inj}^2 et de celle due au processus chromatographique, la distance entre deux spots successifs p et $p + 1$ séparés avec une résolution de 1 est égale à $4\sigma_p$ diamètre du spot p :

$$\sum_{p=0}^n 4\sigma_p \leq L - z_0 \leq \sum_{p=0}^{n+1} 4\sigma_p \quad (35)$$

Le tableau 2 donne le résultat de ce calcul pour quelques longueurs de développement.

Une autre façon d'évaluer la capacité en pics est d'utiliser le nombre de séparation n_s dont l'expression est donnée par :

$$n_s = \lg(b_0/b_1) [\lg((L - b_1 + b_0)/(L + b_1 - b_0))] \quad (36)$$

b_0 et b_1 sont les largeurs des spots (pris à mi-hauteur sur le chromatogramme) de $R_f = 0$ et $R_f = 1$ obtenus par extrapolation à partir de valeurs intermédiaires. Le nombre de séparation obtenu par ce calcul est supérieur à la capacité réelle en pics.

3.2.5 Développement bidimensionnel suivant deux directions perpendiculaires

C'est une caractéristique tout à fait unique de la chromatographie planaire. Lorsqu'une migration a été réalisée et que l'échantillon de départ a été déposé à l'un des coins, le solvant peut être évaporé et la plaque placée dans une autre cuve contenant un solvant différent. Les solutés séparés dans le premier développement constituent autant de spots d'injection et les constituants non résolus par le premier solvant de développement peuvent être séparés par le second.

Tableau 2 - Calcul de la capacité en pics			
d_p (μm)	$L - z_0$ (cm)		
	2	5	10
5	16	20	21
10	13	19	24
20	9	14	19

avec $\gamma = 120$
 $D_m = 5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$

Il est clair que les deux systèmes chromatographiques doivent être aussi différents que possible, sinon les solutés se distribuent suivant une diagonale. Si n_1 est la capacité en pics obtenue lors du premier développement, n_2 la capacité en pics obtenue lors du deuxième développement, la capacité en pics observée doit en principe être :

$$^2n = n_1 n_2$$

ce qui surpasse de loin toutes les possibilités de colonnes de chromatographie gazeuse ou de colonnes de chromatographie liquide mises en série. En fait 2n est inférieur au produit $n_1 n_2$ pour deux raisons.

■ Lors du deuxième développement, le spot (qui a été chromatographié avec le premier solvant) possède une largeur caractérisée par σ qui est supérieure à l'écart-type d'injection de départ σ_{inj} .

Il s'ensuit que la capacité en spot dans le deuxième développement est inférieure à n^2 . Avec des plaques de petites particules, le processus diffusif est majoritaire, alors :

$$\sigma_1^2 = \sigma_{inj}^2 + 2 \lambda_1 D_{m1} t_1 = \sigma_{inj}^2 + \frac{2 \lambda_1 D_{m1} L_1^2}{k_1} \quad (37)$$

Dans cette équation, D_{m1} est le coefficient de diffusion dans la phase mobile, L_1 la longueur du premier développement réalisé dans le temps t_1 avec une constante de vitesse k_1 et λ_1 le coefficient de tortuosité.

■ Par ailleurs, durant le deuxième développement, les taches augmentent aussi en largeur et elles doivent donc être séparées avec une résolution supérieure à l'unité au début du second développement, pour que la résolution unité soit observée à la fin. Une partie de la résolution observée durant le premier développement est perdue dans le second. En tenant compte de tous ces facteurs, on écrit :

$$\sigma_2^2 = \sigma_{inj}^2 + R_{f1} L_1 H + \frac{2 \lambda_2 D_{m2} L_2^2}{k_2} \quad (38)$$

et
$$^2n = \left[\frac{L}{4 \sqrt{2 \lambda \left[\frac{D_{m1}}{k_1} + \frac{D_{m2}}{k_2} \right] L_2}} \right]^2 = \frac{d_p}{32 \lambda \left[\frac{D_{m1}}{\gamma_1} + \frac{D_{m2}}{\gamma_2} \right]} \quad (39)$$

Le tableau 3 donne quelques valeurs de 2n en fonction de la longueur de développement et du diamètre des particules.

Tableau 3 – Valeurs de 2n en fonction de la longueur de développement L et du diamètre des particules d_p			
L (cm)	d_p (μm)		
	5	7	10
2	144	144	110
3	196	196	169
5	225	256	240
7	256	289	289

En CP à flux forcé, le problème majeur est l'élimination du solvant de premier développement. Un rétrobalayage par de l'hélium peut être utilisé, mais cette solution n'est pas satisfaisante.

4. Combinaisons phase stationnaire/phase mobile : mécanismes de rétention

4.1 Généralités

Les molécules de soluté sont considérées comme immobiles lorsqu'elles sont dans la phase stationnaire, et en mouvement à la vitesse de la phase mobile lorsqu'elles sont dissoutes dans celle-ci.

Toutefois, la fixation sur la phase stationnaire (adsorption ou sorption) se réalise sans que la molécule de soluté perde son identité. Il y a formation d'une liaison faible. L'expression générale de l'équation différentielle de la chromatographie est :

$$\frac{\delta C_m}{\delta t} + \frac{u \delta C_m}{\delta z} + \varepsilon \frac{\delta C_s}{\delta t} - \varepsilon \frac{\delta^2 C_m}{\delta z^2} = 0 \quad (40)$$

où z est l'abscisse de la zone de produit,

C est la concentration du soluté à l'instant t dans la phase mobile C_m et dans la phase stationnaire C_s ,

u est la vitesse de la phase mobile,

$\varepsilon = \frac{1 - \varepsilon_T}{\varepsilon_T}$ ε_T est la porosité totale,

ε est le coefficient de dispersion qui est souvent assimilé au coefficient de diffusion D ; c'est le cas en particulier dans la phase stationnaire où l'on écrit :

$$\frac{\delta C_s}{\delta t} = D_s \frac{\delta^2 C_s}{\delta z^2} \quad (41)$$

Il est donc capital de connaître le coefficient de distribution du soluté entre les deux phases :

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

En chromatographie liquide/solide, la courbe C_s en fonction de C_m s'appelle une **isotherme**. Celle-ci peut avoir trois allures possibles : linéaire, convexe ou concave. Dans ces deux derniers cas, il existe toujours une partie linéaire aux faibles concentrations.

La figure 15 donne l'allure de la distribution du soluté dans les phases suivant l'allure de l'isotherme. On en déduit deux conséquences pratiques : suivant l'allure des isothermes, une diminution (ou une augmentation) de la rétention en fonction de la quantité de substance injectée est observée. De la forme des courbes peut être déduite l'évolution de la forme de la tache au cours du développement : à une isotherme concave correspond une tache à tête floue, à une isotherme convexe une tache suivie de traînées.

4.2 Chromatographie d'adsorption sur gel de silice

Un gel de silice est un agrégat de microparticules dont la surface est recouverte de groupements silanols (figure 16).

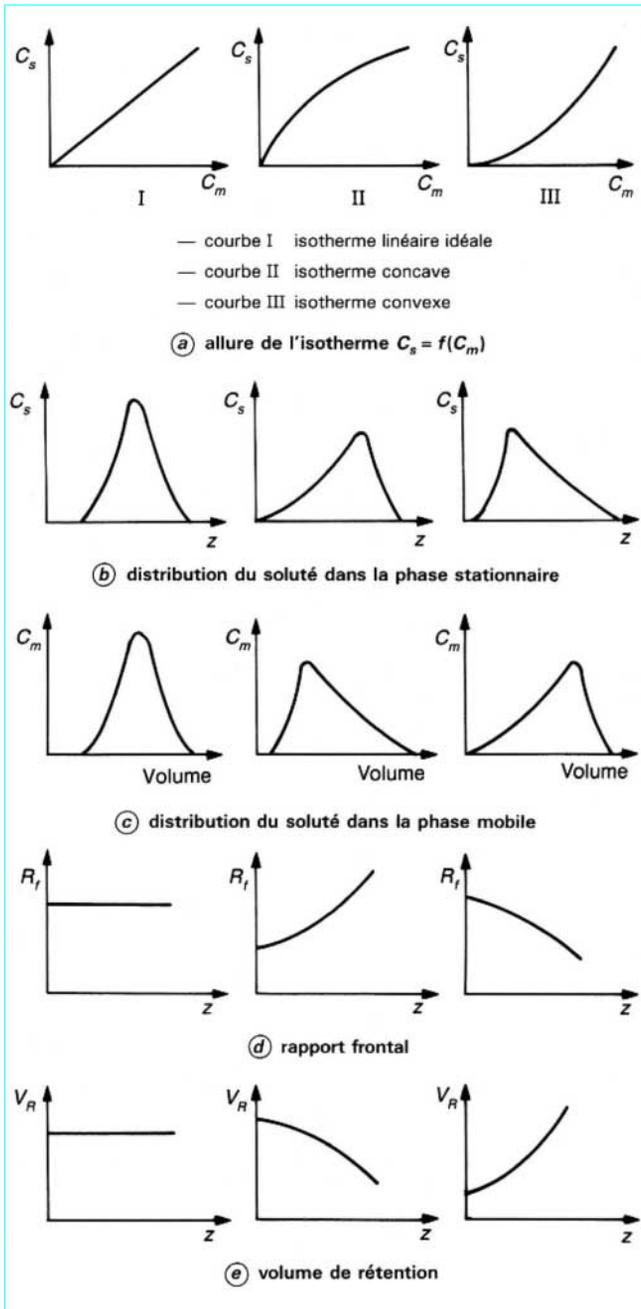


Figure 15 - Allure de la distribution du soluté dans les phases suivant l'allure de l'isotherme [48]

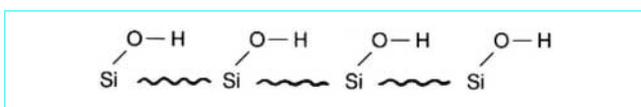
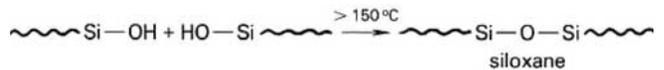


Figure 16 - Structure d'un gel de silice

Le gel de silice, comme tout adsorbant, est caractérisé par :

- la **granulométrie**, c'est-à-dire le diamètre moyen des particules: il existe des particules de toutes les tailles à partir de 3 µm ; les diamètres de particules les plus utilisés en CP sont à l'heure actuelle 5 µm (plaques HPTLC) et 11 µm (plaques TLC) ; plus la répartition granulométrique est étroite, meilleure est la compacité de la couche et meilleures sont les propriétés chromatographiques ;
- la **surface massique** exprimée en m²/g : plus celle-ci est élevée, plus la rétention est grande ;
- le **diamètre des pores** exprimé en angströms : en général, les gels de silice de CP sont des Si 60 ou Si 100 (c'est-à-dire 60 Å ou 100 Å) ; il existe toutefois d'autres diamètres de pores dans les catalogues des manufacturiers (jusqu'à 50 000 Å) ;
- la **morphologie**, c'est-à-dire la forme des particules : sphériques ou irrégulières ; ces dernières sont les plus utilisées ;
- la **nature hydroxylée** de la surface qui rend le gel de silice hygroscopique et permet à l'eau de se fixer (figure 17). La première couche d'eau se fixe par chimisorption et est souvent difficile à enlever, la deuxième couche d'eau est complètement éliminée par chauffage à l'étuve pendant une nuit à 110 °C, la dernière couche d'eau provient de l'humidité ambiante. Suivant la teneur en eau de l'adsorbant, celui-ci est plus ou moins « actif ». Il n'existe pas comme en CLHP de méthode de contrôle de l'activité. La méthode la plus utilisée consiste à travailler en atmosphère à humidité contrôlée et à vérifier le temps de montée de la phase mobile. Un chauffage prolongé à des températures supérieures à 150 °C altère la nature de l'adsorbant, car deux silanols opposés dans un pore étroit peuvent réagir suivant :



En CP à flux forcé, les procédures connues de contrôle de l'humidité du support par percolation d'un mélange de solvant sec et de solvant humide en proportions déterminées peuvent être mises en œuvre.

L'adsorption sur gel de silice est réalisée par interaction de type accepteur-donneur. Suivant la force et le nombre de liaisons hydrogène possibles entre le soluté et le solide, la rétention est plus ou moins forte. Le nombre de liaisons hydrogène est évidemment fonction de la surface de l'adsorbant et des possibilités du soluté.

L'ordre d'adsorption des groupements fonctionnels est le suivant :

- méthyl < fluoro < chloro < nitro < aldéhyde
< acétyle < hydroxy < cétone < amino < carboxyle

Pour que la molécule de soluté ait un rapport frontal non nul, il faut qu'elle soit entraînée par la phase mobile. Snyder a développé la théorie du déplacement :

$$(X)_m + n(M)_s \rightleftharpoons (X)_s + n(M)_m$$

Une molécule X de soluté dans le solvant doit déplacer n molécules M de solvant préalablement adsorbées. L'équation générale de la mobilité décrite par Snyder est :

$$R_M = \lg k' = \lg \left(\frac{V_a W}{V_m} \right) + \beta(S^\circ - \varepsilon^\circ A_s) + \Sigma \text{int. sec} \quad (42)$$

avec A_s surface occupée sur l'adsorbant par une molécule de solvant,

S° grandeur sans dimension directement liée à l'enthalpie d'adsorption du soluté,

V_a volume de la couche monomoléculaire de solvant adsorbé,

- V_m volume total de la phase mobile,
- W masse de l'adsorbant,
- β activité de l'adsorbant définie de façon empirique,
- ϵ^o énergie d'adsorption des molécules de solvant par unité de surface d'adsorbant,
- Σ int. sec. interactions secondaires, en particulier au sein de la phase mobile.

Il est donc évident qu'un solvant convenable doit pouvoir déplacer les solutés en ayant une affinité marquée pour la phase adsorbante. La mesure de cette affinité est donnée par ϵ^o qui est appelé la **force éluante** du solvant. On a classé les solvants suivant ϵ^o croissant en prenant pour base l'hexane dont la force éluante est arbitrairement fixée à 0 (pour la silice et pour l'alumine).

Le classement par ϵ^o croissants est appelé **série éluotrope**. Ainsi, la stratégie de sélection d'un solvant est fondée sur cette série éluotrope dans laquelle Snyder a classé plus de quatre-vingts solvants dans huit groupes selon leurs propriétés d'accepteur de protons, de donneur de protons et leurs interactions dipolaires [22]. À partir de ces huit groupes, vingt-sept solvants (tableau 4) habituellement utilisés en chromatographie plane ont été retenus par Nyiredy *et al.* [23] pour définir le système d'optimisation de phase mobile PRISMA.

Tableau 4 – Solvants utilisés pour l'optimisation en chromatographie plane classés selon leur force éluotrope

Groupe	Force éluotrope ϵ^o	Solvant
Base	≈ 0	<i>n</i> -hexane
I	2,1 2,4 2,7 2,8	<i>n</i> -butyléther éther de diisopropyle méthyl- <i>tert</i> -butyléther diéthyléther
II	3,9 3,9 4,0 4,3 5,1	<i>n</i> -butanol 2-propanol 1-propanol éthanol méthanol
III	4,0 5,3 5,5 6,4	tétrahydrofurane pyridine méthoxyéthanol diméthylformamide
IV	6,0 9,6	acide acétique formamide
V	3,1 3,5	dichlorométhane 1,1-dichloroéthane
VI	4,4 4,7 4,8 5,1 5,8	acétate d'éthyle méthyléthylcétone dioxanne acétone acétonitrile
VII	2,4 2,7	toluène benzène
VIII	4,1 10,2	chloroforme eau

L'adsorption d'un soluté peut être considérée en première approximation comme la somme des contributions de chaque groupement constituant la molécule :

$$S^o = \Sigma Q_i^o$$

où Q_i^o est l'adsorption d'un groupement donné (nitro, hydroxy, chloro, etc.).

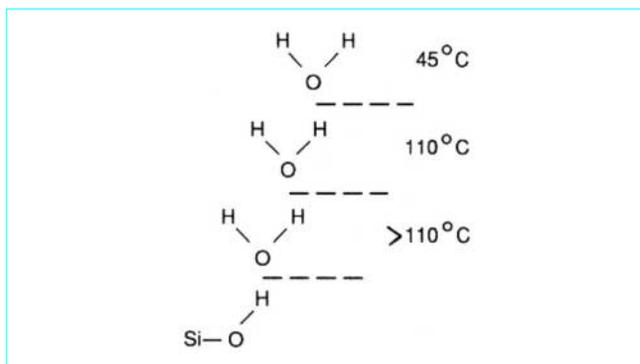
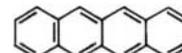


Figure 17 – Nature hydroxylée de la surface : température d'élimination des différentes couches d'eau

La règle d'additivité de Martin indique que, dans un système donné de deux phases, l'introduction d'un groupement i dans une molécule change la valeur de R_M d'une valeur constante dépendant de la nature et de la configuration stérique du groupement introduit mais pas du reste de la molécule.

Exemple : l'incrément d'adsorption de :



est de un noyau aromatique (ou 6 électrons π) par rapport à l'antracène ; si l'on connaît les R_M du naphthalène et de l'antracène, on peut calculer ΔR_M et par suite l'adsorption du tétracène, molécule qui a la même conformation.

Note : lorsque le pourcentage d'eau adsorbée sur le gel de silice devient très important ou lorsqu'une phase mobile aqueuse est utilisée, la théorie de l'adsorption n'est plus valable car le soluté ne peut plus accéder aux silanols. Il faut considérer que le soluté se partage entre deux liquides : une phase circulante et une phase stagnante.

4.3 Chromatographie d'adsorption sur alumine

L'alumine Al_2O_3 est également un adsorbant inorganique polaire hygroscopique. Il existe des alumines neutres, acides ou basiques suivant le pH de la suspension dans l'eau. La sélectivité de l'alumine vis-à-vis des grandes fonctions chimiques est assez semblable à celle de la silice, mais l'interaction avec le soluté s'effectue suivant un mécanisme acide-base de Lewis, ce qui amène des sélectivités tout à fait particulières.

Exemple : l'antracène et le phénanthrène sont séparés avec un facteur de sélectivité de 7,4 alors qu'il n'est que de 1,6 sur gel de silice.

Toutefois l'emploi de l'alumine a beaucoup décliné.

4.4 Chromatographie sur cellulose et dérivés

La cellulose pour chromatographie plane n'est utilisée qu'en CCM. La cellulose amorphe peut retenir l'eau tandis que la cellulose cristalline ne le peut pas. On suppose que l'eau retenue forme un gel et la rétention des solutés est déterminée par la possibilité de pénétrer dans le gel. Les plaques de cellulose sont utilisées dans l'analyse de substances très polaires (sucres, acides, phosphates). La cellulose microcristalline est capable de séparer des **énantiomères**.

4.5 Chromatographie sur polyamide

Ce support se comporte de façon différente suivant le solvant avec lequel il est en contact. Avec des solvants apolaires, il y a rétention par adsorption. Avec les solvants aqueux ou hydroorganiques, le mécanisme de rétention est celui d'un partage entre deux solvants.

Le tableau 5 regroupe les principes de rétention et domaines d'application des phases polaires.

Type de phase	Principe de rétention (1)	Domaine d'application
Gel de silice 60 Å	Adsorption Partage	Séparation des substances acides ou basiques
Gel d'alumine	Adsorption Partage	Séparation de composés basiques
Terre siliceuse de diatomées (kieselghur)	Adsorption Partage	Séparation de substances polaires
Cellulose	Partage	Séparation de molécules polaires (sucres, acides aminés)
Diéthylaminoéthyl-cellulose	Échange d'ions	Séparation de métabolites, catécholamines
Cellulose imprégnée de polyéthylèneimine	Échange d'ions	Séparation d'anions inorganiques [24]
<i>Polyamide 6</i> ou <i>11</i>	Partage	Séparation de phénols, flavonoïdes

(1) Le principe de rétention majoritaire apparaît en gras.

4.6 Chromatographie sur silice greffée apolaire

Ces supports résultent de la modification chimique de la surface du gel de silice par réaction avec un chloro ou un alcoxy silane (tableau 6). Le processus de greffage est absolument identique à celui décrit dans l'article *Chromatographie en phase liquide Théorie et méthodes de séparation* [P 1 455] et ce sont les mêmes particules qui sont employées sur les plaques à polarité de phase inversée prêtes à l'emploi, dites RP (*reverse phase*) ; on trouve donc des plaques *RP2*, *RP8*, *RP18* et aussi des plaques *C12*. Sur ces supports hydrophobes, les molécules très polaires et très hydrophiles sont peu ou pas retenues. Le développement (ou l'élution dans le cas de la CP à flux forcé) est assuré par un mélange eau-solvant organique. Les mélanges binaires eau-méthanol ou eau-acétonitrile sont les plus employés en CCM. Par contre, les solvants ternaires ou quaternaires (du type eau-méthanol-acétonitrile-tétrahydrofurane) ne sont employés qu'en CP à flux forcé.

Les grandes lignes de la rétention constatées en CLHP (linéarité de $\lg k'$ en fonction du nombre d'atomes de carbone dans une série homologue, linéarité de $\lg k'$ en fonction du pourcentage volumique d'eau sur une gamme d'environ 50 %) sont observées en CCM et en CP à flux forcé. Toutefois, la phase stationnaire n'est pas mouillable et $\cos \theta$ tend vers 0 lorsque le pourcentage d'eau dans la phase mobile augmente.

Pour pallier cet inconvénient, il existe des plaques résistant à l'eau dites WF dans lesquelles la modification de la surface du gel de silice a été contrôlée de façon à assurer une mouillabilité

Type de phase	Principe de rétention	Domaine d'application
Cellulose acétylée à 10, 20, 30, 40 %	Partage	peu employée
Silices greffées — gel de silice 60 Å silanisé — alkyle (C_2 , C_8 , C_{18}) — diphenyle	Partage	substances apolaires : acides gras, graisses, produits aromatiques et polycycliques substances polaires avec utilisation de l'appariement d'ions

complète quel que soit le solvant utilisé. Sur les plaques RP WF, la rétention est différente de celle observée avec les plaques RP. Dans le cas de la CP à flux forcé avec élution, les données de rétention ne sont stables qu'une fois le système parfaitement équilibré ; cela peut demander plusieurs dizaines de minutes.

Les avantages de la chromatographie planaire à polarité de phase inversée sont :

- l'élargissement du domaine de la CP aux substances polaires et apolaires ;

- l'existence d'une relation linéaire entre la force éluotrope et le rapport frontal dans de très larges proportions, ce qui n'est pas le cas avec la silice.

Les inconvénients sont l'absence de compatibilité avec des solvants trop aqueux en raison :

- de la présence de liants sensibles à une proportion d'eau importante ;

- du caractère très hydrophobe des phases C_2 , C_8 , C_{18} , qui est à l'origine d'une augmentation considérable de la durée de développement, ce qui en limite son emploi.

4.7 Chromatographie sur phases greffées polaires

Trois types de phases greffées sont utilisés de façon courante : les phases amino, cyano et diol (tableau 7). Là aussi, les supports sont absolument identiques à ceux de la CLHP. Il s'agit d'adsorbants polaires qui se rapprochent du gel de silice mais sont beaucoup moins *rétentifs* du fait de la partie alkyle et de la délocalisation de l'adsorption. La migration des solvants est rapide et ces plaques ne sont pas sensibles à l'humidité comme les supports inorganiques polaires. Les phases de ce type peuvent être employées soit avec des phases mobiles analogues à celles utilisées avec la silice mais de force éluante plus faible, soit avec des solvants aqueux car elles sont parfaitement mouillables. La phase amino possède des propriétés échangeuses d'ions.

Ces phases ont été mises en œuvre pour la séparation d'acides carboxyliques, de phénols, de bases pures et pyrimidiques, de nucléotides et d'acides sulfoniques ; ainsi la séparation sur 5 cm de l'adénosine triphosphate, l'adénosine diphosphate, le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, l'adénosine monophosphate et le nicotinamide adénine dinucléotide cyclique a été réalisée en utilisant une solution 0,2 M de NaCl dans un mélange éthanol-eau (30-70, v/v) comme éluant [25] ou encore la séparation de traces de glucose et de fructose sur 8 cm avec un mélange acétonitrile-eau (70-30, v/v) comme éluant [26]. Les phases cyano se sont révélées particulièrement efficaces pour séparer les amides et les stéroïdes [27].

Tableau 7 – Phases greffées polaires

Silices greffées	Principe de rétention	Domaine d'application
Aminopropyle	Adsorption Échange d'ions	Anions (phénols, nucléotides, acides sulfoniques, acides carboxyliques)
Cyanopropyle	Partage solvant aqueux Adsorption solvant organique	Amides Composés polaires
Glycéropropyle (silice diol)	Adsorption	Composés peu polaires

4.8 Chromatographie d'échange d'ions et d'appariement d'ions

Bien que le gel de silice soit un échangeur de cations faible, on ne l'utilise pas en tant qu'échangeur d'ions. La silice greffée amino est un échangeur d'anions faible mais suffisant ; $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$ en milieu faiblement acide (pH4) est protoné et donne

$\text{Si}-\text{R}-\text{NH}_3^+$. Cette propriété a été utilisée pour séparer des phosphates. L'affinité d'un soluté pour un échangeur d'ions est proportionnelle à sa charge. Pour qu'une chromatographie d'échange d'ions ait lieu, il faut que le soluté soit ionisé ; cela implique, dans la quasi-totalité des cas, l'emploi d'une solution aqueuse. Suivant le support employé, le mécanisme devient complexe, car il faut tenir compte des interactions hydrophobes possibles. La polyéthylèneimine (PEI) et la diéthylaminocellulose (DEAC) sont des échangeurs d'anions. Les plaques *Fixion*[®] sont constituées de résines de type polystyrène/divinylbenzène sous forme de sulfonate ou d'ammonium quaternaire.

Les agents d'appariement d'ions les plus courants sont les sulfates ou sulfonates d'une part, les ammoniums quaternaires de l'autre [28].

En CCM, le principal problème réside dans l'imprégnation de la phase stationnaire. En effet, ces agents d'appariement d'ions sont solubles dans l'eau et sont dissous dans une phase mobile hydroorganique ; cela implique automatiquement l'emploi d'une phase stationnaire greffée apolaire de type RP. Du fait de leur partie apolaire, les agents d'appariement sont retenus et l'imprégnation homogène de la plaque est quelquefois très longue. De nombreuses applications sont amenées à voir le jour, notamment en analyse médicale pour la séparation d'anions organiques. Un exemple récent des performances de la méthode a ainsi été présenté par Kovacs-Halady *et al.* pour la séparation de dérivés aminés de l'acide salicylique [29].

■ En CP à flux forcé, le problème est identique à celui de la CLHP et l'équilibre est long à atteindre. Des séparations fort intéressantes sont possibles, Szepesi *et al.* en ont défini les principales caractéristiques d'utilisation [30].

4.9 Séparation d'énantiomères

La cellulose et ses dérivés, en particulier le triacétate de cellulose, permettent d'obtenir de surprenantes sélectivités. Bien que ce soit la séparation d'antipodes optiques sur feuille de papier qui ait conduit Dalglish à postuler le mécanisme de reconnaissance chirale par interaction « trois points », le mécanisme de la séparation de composés chiraux sur cellulose reste assez mal connu.

Les **cyclodextrines** sont des molécules énantiométriques qui possèdent une structure en forme de tronc de cône dont le bord est constitué d'unités glycosidiques pouvant former des liaisons hydrogène. Deux possibilités sont offertes à l'utilisateur : employer des plaques de silice greffée cyclodextrine ou ajouter la cyclodextrine au solvant de manière analogue à ce qui se pratique en appariement d'ions.

Les sélecteurs chiraux de Pirkle [31] peuvent agir par interaction $\pi-\pi$. Ils ne sont pas encore très employés en CP. La séparation des deux énantiomères d'un alcool aromatique a été réalisée au moyen d'un accepteur π : la (*R*) *N*-(3,5-dinitrobenzoyl) phénylglycine ioniquement liée à une silice greffée amino [32].

Outre les cyclodextrines, le principe le plus employé en CP est l'échange de ligands. La séparation des énantiomères est réalisée par formation d'un complexe du cuivre avec l'entité sélecteur chiralénantiomère (figure 18). La différence de constante de stabilité permet la séparation.

Exemple : un dérivé de l'hydroxyproline est utilisé comme sélecteur chiral et forme un complexe avec le cuivre. Celui-ci est adsorbé sur une couche de gel de silice greffé alkyle ou greffé par l'intermédiaire d'une silice amino. Un des énantiomères de l'acide aminé à séparer est adsorbé préférentiellement. Les sélectivités obtenues sont très grandes.

Les principes de rétention des principales phases utilisées de nos jours sont présentés dans le tableau 8.

Tableau 8 – Phases chirales

Phase	Principe de rétention
Gel de silice greffée (<i>RP 18</i>) imprégnée avec un sélecteur chiral et des ions cuivriques (existe aussi avec silices aminées).	Échange de ligands
Silice imprégnée de cyclodextrines	Cavités à spécificité chirale
Cellulose modifiée (enchaînement β -D-glucose) non commercialisée	Cavités à spécificité chirale

Le nombre d'applications ne cesse de croître : si les aminoacides ont été les premiers éprouvés par cette technique [34], de nombreuses substances pharmacologiquement actives ont fait l'objet de travaux [35], compte tenu de l'importance que revêt la chiralité pour ce type de substances.

Ces phases stationnaires chirales, outre leur coût élevé, présentent l'inconvénient de ne pas être universellement adaptées à la séparation de tous les énantiomères. C'est ainsi que l'utilisation de réactifs chiraux dans la phase mobile a été envisagée comme cela est déjà le cas en CLHP. Nishi *et al.* ont étudié l'applicabilité d'un nouveau réactif chiral, le chlorure de l'acide (*L*)-1 (2-naphtylsulfonyl) pyrrolidine 2-carboxylique à la séparation en phase normale (CCM et CLHP) d'énantiomères d'acides aminés [36].

4.10 Nature chimique des liants

Des liants de différentes natures sont utilisés pour fixer la couche d'adsorbant sur la plaque chromatographique en CCM classique et haute performance (HPTLC). Les qualités requises pour qu'un liant puisse être au mieux compatible avec le procédé chromatographique sont :

- la résistance aux réactifs usuels de la chromatographie planaire ;
- une relative inertie.

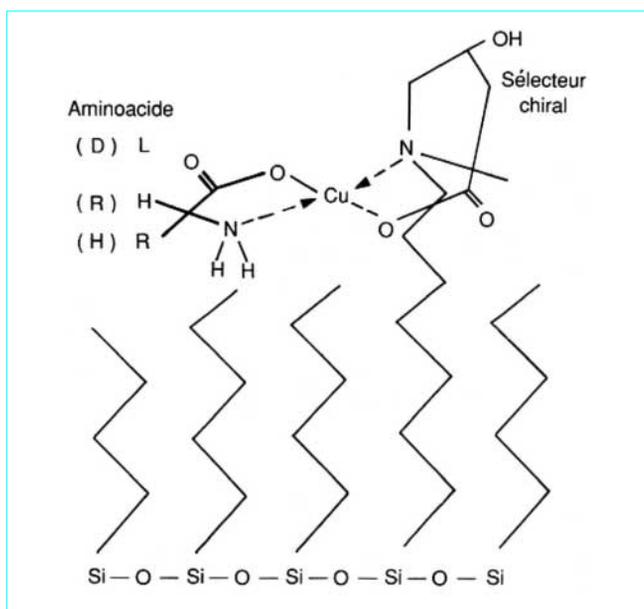


Figure 18 - Formation d'un complexe entre le cuivre, un aminoacide et un sélecteur chiral [49]

Une partie des liants autrefois utilisés (tels que agar-agar, amidon, alcool polyvinylique, acétate polyvinylique) pouvaient être attaqués par des réactifs agressifs et étaient partiellement dissous dans des systèmes chromatographiques contenant de l'eau en grande quantité ; pour ces raisons, leur utilisation est aujourd'hui abandonnée. Ils ont laissé la place à des liants polymériques inertes organiques ou inorganiques qui présentent l'avantage d'être parfaitement stables vis-à-vis des systèmes aqueux et des solvants organiques et partiellement résistants aux différents réactifs chimiques. Les plus utilisés sont :

- des polymères, à haut degré de polymérisation, d'acide acrylique ou d'acide méthacrylique ou de leurs sels ;
- des copolymères d'éthylène et d'acide maléique ou de leurs sels ;
- des polyacrylamides et/ou polyméthacrylamides et leurs dérivés ;
- des silicates.

Bien que présentant des caractéristiques de résistance bien meilleures que les premiers, ils ne sont cependant pas sans présenter quelques inconvénients :

- des réactifs très agressifs (tels que l'acide sulfurique) peuvent les attaquer (plus particulièrement à haute température) ;
- ils réagissent avec des réactifs de dérivation d'usage courant (tels que la ninhydrine) entraînant des interférences non négligeables lors d'une évaluation quantitative.

Ces deux principaux désavantages font que les plaques idéales seraient dépourvues de liant. Une telle tentative a été entreprise avec les plaques *Empore*[®] (3M) qui se présentent sous forme de feuilles, sans support de verre ou d'aluminium et sans liant. Elles se composent d'une couche adsorbante ($90 \pm 2\%$, m/m) emprisonnée dans une trame de poly (tétrafluoroéthylène). Des progrès technologiques sont encore nécessaires pour qu'elles puissent prétendre à des caractéristiques de rétention identiques aux plaques avec liant du commerce [33] mais une seconde génération de plaques souples a déjà vu le jour et il est facile d'imaginer que, très bientôt les caractéristiques analytiques de ces plaques soient équivalentes à celles des plaques rigides classiques.

4.11 Autochromatographie d'un mélange de solvants. Démixion

L'utilisation d'un solvant unique ne permet pas toujours d'ajuster les rapports frontaux dans la zone désirée. La force éluante d'un mélange binaire *A* et *B* n'est pas facile à déterminer rapidement ; elle est donnée par :

$$\varepsilon_{AB}^{\circ} = \varepsilon_A^{\circ} + \frac{\lg(N_B 10^{\beta n_B (\varepsilon_B^{\circ} - \varepsilon_A^{\circ})} + N_B)}{\beta n_B} \quad (43)$$

où n_B est la surface moléculaire effective de *B* adsorbé (c'est la valeur de A_s de *B*),

N_B est la fraction molaire de *B* dans le mélange binaire,

β est l'activité de l'adsorbant,

$\varepsilon_A^{\circ}, \varepsilon_B^{\circ}$ sont les forces éluantes de *A* et *B*.

Un mélange binaire permet de mieux ajuster la sélectivité, mais la différence entre les valeurs de ε° entraîne la formation de deux fronts. Le solvant ayant la plus faible force éluante a le moins d'affinité pour la phase stationnaire et il chemine plus vite que le second. La composition réelle du solvant de migration peut être très éloignée de celle de la cuve.

Le rapport frontal du second front dépend évidemment de la différence des forces éluantes des solvants constituant le mélange ; il est plus élevé pour des solvants de grande surface moléculaire et il est également plus élevé pour des adsorbants de faible surface spécifique. Dans un mélange de *A* et *B*, la théorie de Snyder prévoit que :

$$\lg(k'_A/k'_B) = \beta A_s (\varepsilon_B^{\circ} - \varepsilon_A^{\circ})$$

A_s étant la surface occupée par une molécule adsorbée,

k'_A et k'_B étant les facteurs de capacité observés dans les solvants purs *A* et *B* et :

$$R_{Mx} = Cte - \lg[B]$$

R_{Mx} étant la R_M du soluté *X*.

Autrement dit, la rétention d'un soluté *X* dans un mélange constitué d'un diluant et d'une fraction volumique d'un solvant de force éluante beaucoup plus grande varie linéairement avec le logarithme de la concentration de ce dernier. Cela a été observé expérimentalement dans un très grand nombre de cas.

5. Analyse qualitative et quantitative des substances séparées

5.1 Généralités

En chromatographie planaire classique, la détection des substances est une opération distincte de la chromatographie et elle s'effectue sur une couche débarrassée du solvant de développement : c'est une détection en discontinu. En chromatographie planaire à flux forcé, on peut procéder de la même façon, mais il est également possible de réaliser une détection en continu au moyen d'un détecteur semblable à ceux utilisés en CLHP. En détection en discontinu, la méthode générale consiste à comparer les régions de la couche où il n'y a pas d'échantillon aux régions dans lesquelles l'échantillon est présent. Lorsque suffisamment de substance peut être récupérée pour procéder à une identification par une méthode spectrale, la plaque est grattée à l'endroit où la substance a été localisée, la phase stationnaire est séparée du soluté et il ne reste plus qu'à réaliser la spectrométrie (infrarouge, de masse, etc.).

5.2 Détection visuelle

Destinée à l'analyse qualitative, elle est très pratiquée dans l'analyse de stupéfiants par exemple. Dans tous les cas, la plaque est éclairée par une source convenable :

- la lumière blanche permet de repérer les substances colorées ;
- la lumière ultraviolette permet de voir les substances fluorescentes lorsqu'elles sont éclairées à ces longueurs d'onde.

Pour faciliter la détection, les fabricants de plaques CCM mélangent un indicateur fluorescent à la couche d'adsorbant ; ce peut être un sel inorganique qui donne à la plaque une couleur jaune (acétate d'uranyle) ou vert jaune (silicate de zinc). Le plus employé est un sulfure mixte de zinc et de cadmium fluorescent à 254 nm d'où l'appellation *F 254*.

Les sels organiques sont fluorescents à 366 nm en général ; les plus employés sont le 5,8,10-trisulfonate de 3-hydroxypyrrène (sel de sodium), la rhodamine B, la 2,7-dichlorofluorescéine et des dérivés du stilbène.

Dans le cas des phases greffées, un sel de tungstène et de sodium est utilisé. Les composés apparaissent sous forme de taches sombres sur fond lumineux et il s'agit d'une diminution de fluorescence mais pas d'une extinction. La pulvérisation d'un réactif sur la plaque s'apparente à la détection postchromatographique par formation de dérivés et sera traitée au paragraphe 5.4.

5.3 Analyse quantitative par densitométrie

5.3.1 Considérations théoriques

Quand une lumière monochromatique arrive sur un milieu opaque, une partie est réfléchie de façon spéculaire (comme par un miroir), une partie est absorbée par le milieu et dissipée sous forme de chaleur et le reste est réfléchi et transmis de façon diffuse par le milieu. C'est cette dernière partie qui intéresse le chromatographe. La propagation de la lumière à l'intérieur d'un milieu opaque granulaire est un processus très complexe qui ne peut être formulé par des équations ayant une solution analytique. Des simplifications sont nécessaires et le modèle généralement accepté est celui décrit par Kubelka et Munk [38]. Soit e l'épaisseur de la couche et dx une portion infinitésimale dans laquelle la lumière se propage. Les flux de lumière dans la couche dx correspondent à la lumière transmise I_t et à la lumière réfléchie I_r . L'intensité de la lumière transmise décroît du fait de l'absorption et de la dispersion et s'accroît du fait de la dispersion de la lumière cheminant en sens opposé. On peut alors écrire :

$$-\frac{dI_t}{dx} = -(\mathcal{H} + \mathcal{S})I_t + \mathcal{S}I_r \quad \text{et} \quad \frac{dI_r}{dx} = -(\mathcal{H} + \mathcal{S})I_r + \mathcal{S}I_t \quad (44)$$

où \mathcal{S} est le coefficient de diffraction par unité d'épaisseur et \mathcal{H} le coefficient d'absorption par unité d'épaisseur.

Kubelka et Munk ont proposé une solution à ces deux équations :

$$\frac{\mathcal{H}}{\mathcal{S}} = \frac{(1 - R_\omega)^2}{2R_\omega} \quad (45)$$

expression dans laquelle R_ω est la réflectance d'une couche opaque d'épaisseur infinie.

On peut considérer que le coefficient de diffraction ne varie pas lorsque le soluté est adsorbé sur la couche et :

$$\frac{(1 - R_\omega)^2}{2R_\omega} = \frac{2,303}{\mathcal{S}} \varepsilon C \quad (46)$$

où ε est le coefficient d'absorption molaire de l'échantillon et C la concentration molaire.

Dans le cas d'une couche d'épaisseur finie e , les équations proposées par Kubelka et Munk sont les suivantes :

$$\left. \begin{aligned} I_r &= \frac{\sinh(b\mathcal{S}e)}{a \sinh(b\mathcal{S}e) + b \cosh(b\mathcal{S}e)} \\ I_t &= \frac{b}{a \sinh(b\mathcal{S}e) + b \cosh(b\mathcal{S}e)} \end{aligned} \right\} \quad (47)$$

expressions dans lesquelles :

$$a = \frac{\mathcal{S} + \mathcal{H}}{\mathcal{S}} \quad \text{et} \quad b = a^2 - 1$$

La théorie de Kubelka et Munk postule que l'échantillon est distribué de façon homogène dans la zone d'adsorbant où il se trouve. À l'heure actuelle, aucun autre modèle mathématique n'est supérieur à celui élaboré par Kubelka et Munk.

Les molécules susceptibles d'émettre une fluorescence le peuvent par absorption d'un quantum énergétique suivi d'un passage à un état excité. Ce dernier peut être un état singulet ou un état triplet. Le retour à l'état fondamental s'accompagne d'une émission de lumière. Les molécules fluorescentes absorbent généralement dans l'ultraviolet et le spectre de fluorescence est décalé vers les plus grandes longueurs d'onde. Pour obtenir le meilleur rendement de fluorescence, il faut sélectionner une longueur d'onde d'excitation et une longueur d'onde d'émission. Dans le cas idéal, elles correspondent aux maximums d'absorption et d'émission.

Soit I_0 l'intensité de la lumière incidente et I l'intensité de la lumière ayant traversé la couche opaque de phase stationnaire. L'intensité de la lumière transmise est donnée par la loi de Beer-Lambert :

$$I = I_0 \exp(-\varepsilon e C)$$

où ε est le coefficient d'adsorption molaire,

C la concentration molaire de substance,

e l'épaisseur de la couche.

Seule une fraction de lumière absorbée est réémise du fait de la perte d'énergie due à l'adsorbant. En appelant Φ le rendement quantique, l'intensité de la fluorescence émise est :

$$I_{fluor} = \Phi I_0 (1 - e^{-\varepsilon e C})$$

Quand l'absorbance de l'échantillon est faible, on peut faire l'approximation :

$$e^{-\varepsilon e C} \approx 1 - \varepsilon e C$$

et

$$I_{fluor} \approx \Phi I_0 \varepsilon e C$$

Cette relation montre la linéarité entre l'intensité du signal de fluorescence et la quantité d'échantillon.

5.3.2 Instrumentation

La figure 19 présente un montage d'un photodensitomètre scanner.

5.3.2.1 Sources lumineuses

Pour couvrir la gamme de 200 à 800 nm, deux sortes de lampes sont utilisées : celles qui émettent un spectre continu et celles qui émettent un spectre de raies.

Dans la première catégorie, les lampes à halogène ou à tungstène sont les plus utilisées pour le visible (400 à 800 nm) et les lampes à deutérium pour le domaine UV (200 à 400 nm). Les lampes au xénon possèdent un maximum d'énergie vers 550 nm.

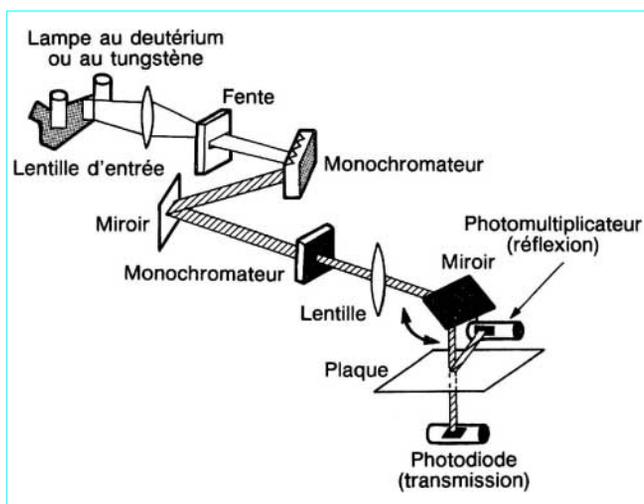


Figure 19 – Photodensitomètre scanner

Dans la deuxième catégorie, les **lampes à vapeur de mercure** sont pratiquement les seules utilisées. Les lampes à basse pression émettent à 254 nm, les lampes à haute pression émettent des raies dans l'UV et le visible (313 et 436 nm). Les sources lasers sont apparues dans un passé récent dans les densitomètres utilisés pour l'électrophorèse. Le faisceau laser possède l'avantage d'être très fin (quelques micromètres de diamètre), ce qui est particulièrement utile en électrophorèse bidimensionnelle. Les sources lasers peuvent être employées pour des mesures de fluorescence mais leur emploi en CP reste limité pour plusieurs raisons : prix de l'appareillage (mais cela n'est pas rédhibitoire) et surtout nombre limité de longueurs d'onde réellement utiles et décomposition possible de l'échantillon sous l'effet de la très haute énergie.

La sélection de la longueur d'onde appropriée est réalisée la plupart du temps à l'aide de filtres. En fluorescence, un monochromateur peut aussi être utilisé ; un filtre est placé entre le détecteur et la plaque pour éliminer les longueurs d'onde indésirables. Les réseaux holographiques concaves à 1 200 traits/mm équipent maintenant la quasi-totalité des appareils.

5.3.2.2 Détecteurs

Ce sont des cellules photoélectriques ou des photomultiplicateurs. Le rayonnement incident frappe une plaque métallique chargée négativement qui émet alors des électrons. Dans les photomultiplicateurs, les électrons sont émis dans une enceinte sous vide et multipliés par un certain nombre de dynodes (8 à 10), ce qui augmente le courant photoélectrique d'un facteur 10^6 à 10^8 . La longueur d'onde de la lumière incidente doit être inférieure à la longueur d'onde limite provoquant l'émission. Les photomultiplicateurs ont souvent une réponse maximale vers 380 nm.

5.3.3 Mise en œuvre de la mesure densitométrique

Trois modes sont utilisés :

- la mesure par transmission ;
- la mesure par réflexion ;
- la mesure par réflexion et transmission simultanées.

Dans tous les cas, on peut utiliser un montage monofaisceau ou un montage double faisceau.

■ En **transmission**, le support de la couche doit être transparent (ou avoir une certaine transparence).

Le photomultiplicateur mesure l'intensité de la lumière transmise. Le montage monofaisceau est le plus courant. Le rapport signal/bruit dépend de la qualité de compactage de la couche d'adsorbant.

■ En **réflexion**, il existe deux types de géométries, l'illumination à 45° et l'observation à 90° ou l'inverse. C'est le mode de mesure le plus répandu car le rapport signal/bruit est meilleur qu'en transmission et les irrégularités de la couche n'entraînent pas trop de perturbations. Cependant la fraction du soluté qui est adsorbée à la surface de la couche intervient seule dans la mesure. Celle-ci est donc perturbée si le soluté pénètre bien dans la couche et le signal obtenu est moins important qu'en transmission. Dans la plupart des cas, la plaque défile devant le spot mais il existe un appareil (Shimadzu) dans lequel la plaque se déplace dans la direction x d'abord puis dans la direction y , chaque déplacement étant incrémenté d'une très petite longueur, ce qui a donné le nom de zigzag à ce type de mesure.

■ Dans la **réflexion et la transmission simultanées**, les deux signaux sont additionnés. La ligne de base est meilleure ainsi que la limite de détection.

Dans tous les cas, le montage monofaisceau est le plus simple et donne de bons résultats. Toutefois le montage double faisceau permet d'obtenir une meilleure ligne de base. La même lumière venant de la source est divisée en deux faisceaux dont l'un illumine la partie de la plaque renfermant les échantillons et l'autre l'espace blanc entre les dépôts. Les deux faisceaux sont traités de façon à ce que la différence soit enregistrée. Les difficultés inhérentes aux fluctuations de la source sont éliminées, mais la qualité des plaques doit être irréprochable.

Pour s'affranchir des contaminants éventuels de la plaque, on peut utiliser, en montage monofaisceau, une méthode de correction du bruit de fond par emploi de deux longueurs d'onde : les fluctuations engendrées par la dispersion de la lumière à la longueur d'onde λ_1 sont compensées par la soustraction des fluctuations à une autre longueur d'onde λ_2 , longueur d'onde à laquelle le soluté n'absorbe pas. Les deux rayons sont partagés par un chopper et combinés de façon à ce que la différence soit enregistrée. Comme le coefficient de dispersion est fonction de la longueur d'onde, l'idéal serait que λ_1 et λ_2 soient voisines.

Différentes méthodes de lecture du spot chromatographique sont possibles, elles sont schématisées sur la figure 20.

5.3.4 Paramètres du signal

Comme dans tout type de chromatographie, le signal est obtenu sous forme d'un pic dont l'aire est :

$$A = \int_{t_0}^{t_1} \Phi dt$$

avec Φ flux reçu par le détecteur.

Sa variance est la somme de toutes les contributions :

$$\sigma_{tot}^2 = \sigma_{chrom}^2 + \sigma_{inj}^2 + \sigma_{det}^2$$

avec σ_{chrom} écart-type lié au processus chromatographique,
 σ_{inj} écart-type lié à l'injection du soluté,
 σ_{det} écart-type lié au système de détection.

Le signal dépend :

- de la qualité de compactage de l'adsorbant, de la forme et de la taille des particules ; la réponse des plaques dites HPTLC est supérieure à la réponse des plaques TLC ;
- de la méthode choisie (UV, visible ou fluorescence) ;

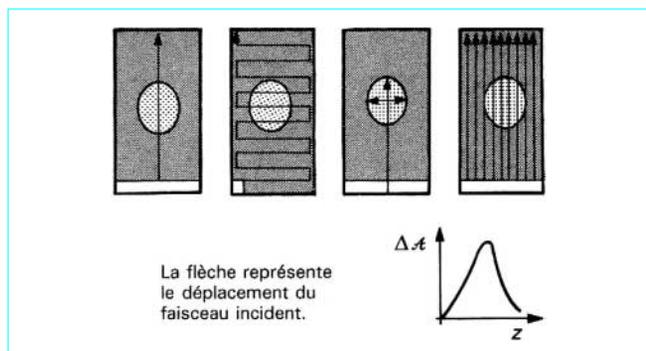


Figure 20 – Différentes méthodes de lecture du spot

- du mode choisi (transmission ou réflexion) ;
- du sens de balayage ; en général, il se réalise dans le sens du développement mais il peut être préférable de balayer dans le sens perpendiculaire si les rapports frontaux sont bien reproductibles et si l'on veut s'affranchir de traînées ;
- de la vitesse de défilement de la plaque : celle-ci doit être suffisamment lente si le développement est effectué sur une courte distance ; 10 mm/min est un bon choix ;
- des dimensions de la fente : plus les dimensions de la fente sont restreintes, meilleure est la sensibilité, mais l'alignement sur le maximum de concentration de l'échantillon est plus difficile ; en fluorescence, le signal augmente avec la largeur de fente jusqu'à ce que la surface illuminée soit identique à celle de la tache d'échantillon ;
- de la constante de temps du détecteur et éventuellement de celle de l'enregistreur.

Il n'existe pas de protocole opératoire de comparaison des performances des densitomètres disponibles sur le marché. Des chromatogrammes tests ou des tracés noirs sur fond blanc peuvent être utilisés. La résolution spatiale des appareils actuels est de l'ordre de 200 μm.

À titre indicatif, quelques quantités limites détectées de substances pharmacologiquement actives sont présentées dans le tableau 9 ; elles permettent de se rendre compte de la grande sensibilité de la détection fluorimétrique qui permet de détecter 1 ng de quinine déposée.

5.3.5 Détection par ionisation de flamme

Nota : le lecteur pourra se reporter en [Doc. P 1 475] à la référence [39].

Ce mode n'est utilisable qu'avec les baguettes de type *Chromarod*®. L'appareillage est commercialisé sous le nom *latroscan*® (figure 21). Une fois la chromatographie terminée et le solvant évaporé, les baguettes sont animées d'un mouvement uniforme qui les fait passer dans la flamme d'un détecteur FID (*Flame Ionisation Detection*) analogue à celui utilisé en chromatographie en phase gazeuse. Le brûleur est au pôle négatif, l'électrode de collecte au pôle positif, une flamme extrêmement fine d'environ 1 000 °C et une électrode tubulaire haute performance permettent d'obtenir des limites de détection comparables à la CPG. Le domaine de linéarité est de 5 ng à 30 μg pour un temps de mesure de 25 s par échantillon. Une option thermo-ionique est disponible pour analyser les solutés azotés.

Cet appareillage est particulièrement bien adapté à l'analyse des solutés lipidiques et des composés de masse moléculaire élevée ne possédant pas de chromophores. Il est très largement utilisé dans l'industrie chimique pour séparer et quantifier des substances difficiles à chromatographier en CLHP ou en CPG (polymères, bitumes et huiles lourdes, corps gras de toutes natures, détergents, agents de surface, pommades, additifs, polluants, etc.). La FID, par son large champ d'application et son détecteur « universel » permet de

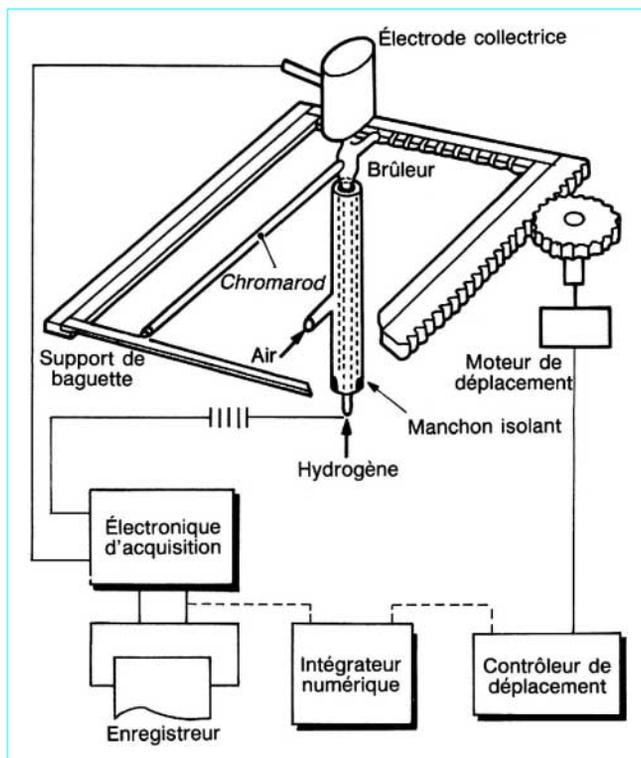


Figure 21 – Principe de la détection et de la mesure par le *latroscan TH-10*

quantifier avec précision, sensibilité et reproductibilité tout composé non repérable avec les détecteurs les plus communément utilisés : UV, visible, IR, fluorescence, radioactivité, etc.

5.3.6 Mesures de solutés radioactifs

En autoradiographie, les différentes intensités sont mesurées à l'aide d'un photodensitomètre. À l'heure actuelle, le système compte le taux de radiations émises avec un compteur. Celui-ci est rempli d'un mélange argon-méthane qui est ionisé par le rayonnement β ou γ des composés radioactifs qui ont été chromatographiés.

Les molécules ionisées entrent en collision avec une anode filiforme et la position de la collision est repérée grâce à un autre fil (*delay line*). L'information est numérisée et stockée dans la mémoire d'un microordinateur puis, après traitement, est visualisée sur une console vidéo. La résolution spatiale n'est pas très grande du fait des dimensions de la fenêtre (250 mm de long, 15 mm de large) ; elle est de l'ordre du millimètre avec les solutés contenant du carbone 14.

5.3.7 Analyse d'image : vidéodensitométrie

C'est une technique récente. L'équipement nécessaire comprend une source lumineuse équipée de ses périphériques optiques (lentilles, filtres, monochromateurs), un tube Vidicon ou Plumbicon et un ordinateur. La plaque est éclairée par la source lumineuse. Le tube Vidicon ou Plumbicon est une batterie de détecteurs unitaires balayés par un faisceau d'électrons. Ces éléments unitaires sont déchargés par le flux d'électrons et le signal est numérisé pour l'analyse par l'ordinateur. Les détecteurs élémentaires ou pixels (*picture elements*) sont disposés en grille (512 × 512 en général). Les images obtenues sont transformées par l'ordinateur en résultats chromatographiques.

Tableau 9 – Quantités limites détectées de quelques substances intéressant le domaine pharmaceutique

Substances	Longueur d'onde d'absorption (nm)	Quantité limite détectée en absorption (µg)	Mesure de l'intensité de fluorescence		Quantité limite détectée en fluorescence (ng)
			excitation (nm)	mesures (nm)	
Quinine	300	0,10	365	450	1
Quinidine					
Cinchonine	288	0,10	313	410	5
Cinchonidine					
Levonorgestrel	248	0,10	365	485	12
Éthinylœstradiol	530	0,175		560	25

Une comparaison entre l'analyse d'image et la photodensitométrie a été réalisée récemment et a montré les avantages du photodensitomètre. Toutefois, il paraît évident que l'analyse d'image est supérieure lorsque l'on désire obtenir un chromatogramme tridimensionnel. Il n'y a pas de mouvement de la plaque. Le temps d'examen est de 50 s, le temps de calcul de quelques minutes. L'inconvénient réside dans la gamme de linéarité des courbes de calibrage qui est beaucoup plus restreinte que dans le cas des photodensitomètres. Il s'agit toutefois d'une technologie d'avenir.

5.3.8 Couplages

À la différence de la chromatographie en phase gazeuse et, dans une moindre mesure, de la chromatographie en phase liquide, l'interfaçage d'une technique spectroscopique avec la chromatographie planaire n'est pas très courant.

■ Spectroscopie d'absorption moléculaire dans l'ultraviolet et le visible

Le spectre d'absorption du soluté peut être obtenu à partir des densitomètres. Comme le soluté est adsorbé, la résolution spectrale n'est pas excellente et la qualité du spectre obtenu est loin de celle du spectre en solution. Celui-ci peut être enregistré en contrôlant le défilement du monochromateur par un microprocesseur. Malheureusement, le temps nécessaire est relativement important et il est beaucoup plus pratique de sélectionner des longueurs d'onde caractéristiques et d'examiner avec soin les rapports de densité optique. Cela est extrêmement utile en fluorescence, où l'on peut examiner le rapport de l'intensité émise à une longueur d'onde d'excitation donnée et une longueur d'émission donnée. L'analyse de **polluants de type hydrocarbures aromatiques** est grandement facilitée par cette technique.

■ Spectroscopie d'absorption moléculaire dans l'infrarouge

La technique la plus utilisée consiste à séparer le soluté de la phase stationnaire et des systèmes comme l'*Eluchrom*[®] sont commercialement disponibles. L'échantillon débarrassé du solvant est pastillé avec du bromure de potassium et placé sur le trajet du faisceau IR d'un spectrophotomètre classique. Un système commercial est disponible pour réaliser des mesures par réflectance diffuse avec transformée de Fourier. Deux plaques doivent être utilisées dont l'une sert de blanc et le spectre de celle-ci est soustrait du spectre de la plaque contenant l'échantillon. 1 µg de substance est nécessaire, mais certaines régions (3 700 à 3 100 et 1 650 à 800 cm⁻¹) sont opaques du fait de l'absorption du gel de silice.

Dans le système *Chromalect*[®], des coupelles sont disposées sur une languette métallique. Celle-ci est placée perpendiculairement à la direction du développement. Avec un solvant de force éluante très grande, les solutés sont transférés dans la coupelle (celle-ci est

équipée d'une mèche pour faciliter le transfert) puis mélangés avec du bromure de potassium et le spectre IR est enregistré.

■ Spectrométrie de masse

Une méthode très simple consiste à recouvrir une sonde FAB (*Fast Atom Bombardment*) d'un ruban adhésif et à appliquer celui-ci sur la tache d'échantillon. Le tout est retiré et quelques microlitres de solvant et de matrice pour FAB sont ajoutés. La sonde est introduite directement dans le spectromètre de masse.

Le couplage CP/SM le plus performant est dû à Ramaley [40]. La plaque défile devant une source d'énergie propre à désorber le produit (laser à CO₂ ou filament de tungstène incandescent). Le gaz d'ionisation chimique balaye les solutés désorbés et les envoie dans la source d'un quadripole. 1 mg de substance peut être désorbé, mais les composés polaires ou de masses moléculaires élevées sont mal désorbés. Par contre, les **lipides** sont très bien analysés à condition que la masse moléculaire ne soit pas supérieure à 300.

La spectrométrie de masse d'ions secondaires permet d'obtenir des spectres de masse sans gratter les produits de la plaque. La plaque soigneusement séchée passe devant un faisceau d'ions, le faisceau primaire (argon ou césium) entre en collision avec les atomes ou les molécules de la surface de la plaque. Les ions intéressants possédant un nombre pair d'électrons sont envoyés dans le spectromètre de masse. En imprégnant l'adsorbant avec un liquide de viscosité élevée (glycérol), on peut faire fondre la matrice aux alentours du point d'impact, ce qui amène une plus grande extraction de molécules et une meilleure sensibilité. Un appareil commercial est disponible.

5.4 Formation de dérivés pré- ou postchromatographie

Lorsque le soluté ne possède aucun groupement chromophore susceptible de permettre une détection spectrophotométrique, il faut transformer le soluté avec un réactif spécifique.

■ Cela peut être réalisé **avant chromatographie** [41] ; dans ce cas, la réaction doit donner des produits stables et si possible un seul produit avec un rendement très élevé. De plus, il ne doit y avoir aucune interférence chromatographique entre le réactif et le dérivé formé. Les réactions utilisées sont :

— l'oxydation ou la réduction au moyen de l'eau oxygénée, le periodate de sodium, l'acide chromique, l'iode ou le chlorure de palladium, le borohydrure de sodium, etc. ;

— l'hydrolyse, qui peut être une hydrolyse chimique ou enzymatique ; les plaques à zone de concentration se prêtent bien à cette dernière technique ;

- l'halogénéation par des vapeurs d'iode ou de chlore, qui se prête bien à la visualisation de molécules insaturées ;
- les nitrations et les diazotations qui forment des produits colorés : la réduction des arylamines primaires suivie par la diazotation et le couplage avec les phénols donne des colorants azoïques ;
- l'estérification, qui est employée pour les acides ou les alcools gras ;
- la dansylation ou la dabsylation, qui permet d'obtenir des dérivés hautement fluorescents.

Le tableau 10 regroupe un grand nombre d'applications de cette technique préchromatographique.

■ La formation de dérivés **après chromatographie** est très répandue. La technique la plus commune consiste à projeter un **aérosol** sur la plaque séchée et débarrassée de solvant. Il faut prendre garde à la bonne distribution du réactif sur la surface de la couche : « vaporiser est un art » [42]. Cela est particulièrement important lors de l'emploi de phases stationnaires greffées alkyles.

D'autres techniques sont l'**imprégnation** (telle que la dérivation sous pression : DSP) [43] et le **trempage** dans une solution de réactif [44] ; le solvant doit être choisi de façon à ne provoquer aucune altération du chromatogramme.

Une des réactions les plus communément employées avec les substances organiques riches en carbone est le charbonnement soit en pulvérisant un mélange sulfochromique et en chauffant ensuite à 150 °C, soit en utilisant un sel de cuivre ou de sulfate d'ammonium.

Des dérivés fluorescents sont obtenus par exposition aux vapeurs d'ammoniac. Dans le cas de la fluorescence, une liste des réactifs pouvant générer des produits fluorescents a été récemment publiée [45]. Il faut mentionner que le trempage de la plaque dans la paraffine permet d'exalter le signal de fluorescence (jusqu'à 100 fois).

Tableau 10 – Sélection de procédés de formation de dérivés préchromatographiques

Réactifs	Applications	Conditions opératoires
OXYDATION et RÉDUCTION		
Peroxyde d'hydrogène Periodate de sodium Acide chromique	Phénothiazines Anthocyanes 17-hydroxycorticostéroïdes Alcaloïdes	Solution H ₂ O ₂ à 10-20 %, chauffage à 60°C Solution H ₂ O ₂ à 3 % Solution NaIO ₄ à 10 %, chauffage à 50 °C Solution acide chromique à 10 % dans l'acide acétique
Iode Chlorure de palladium	Hydrocarbures aromatiques polycycliques Acides gras	Chambre à iode Solution colloïdale de palladium, chauffage à 80 °C, 60 min
Borohydrure de sodium	Stéroïdes	Solution NaBH ₄ à 10 % dans l'éthanol + NaOH 0,1 N 1 : 1
HYDROLYSE		
Acide chlorhydrique Acide phosphorique Hydroxyde de potassium éthanolique Hydroxyde de sodium méthanolique Phosphate diesterase Phospholipase C	Flavonoïdes, coumarines Époxyde Acétate de lupéol Phénylurées Cytidine diphosphate glucose Phosphatidylcholine	Solution HCl à 10 % dans l'éthanol Solution H ₃ PO ₄ à 10 % Solution KOH à 7 % dans l'éthanol Solution NaOH à 7 % dans le méthanol
HALOGÉNATION		
Chlore Brome	Cholestérol Cholestérol Phénylbutazone Fluorescéine	Vapeurs de Cl ₂ Vapeurs de Br ₂ Br ₂ à 0,1 % dans le chloroforme Br ₂ à 0,1 % dans le chloroforme
Iode	Pyridine, isoquinoléine	Vapeurs de I ₂
NITRATIONS et DIAZOTATIONS		
Acide nitrique NaNO ₂ + α naphтол	Hydrocarbures aromatiques polycycliques Estrogènes	HNO ₃ concentré
ESTÉRIFICATION et ÉTHERIFICATION		
Anhydride trifluoroacétique Acide acétique Diazométhane Hydroxyde de potassium méthanolique Bromure de bromo-4 phénacyle	Stéroïdes, sapogénine, aflatoxines Alcools Acides organophosphorés Phospholipides, acides gras libres Acide sorbique, acide benzoïque	Dépôt d'une goutte d'anhydride trifluoroacétique sur l'échantillon Solution KOH à 12 % dans le méthanol
DANSYLATION		
Chlorure de dansyle Semi-piperazide de dansyle	Carbamates, phénylurées, morphiniques, β bloquants Acides gras (C ₆ à C ₂₄)	Traitement pendant 20 à 40 min par la soude, dépôt sur la couche et ajout de chlorure de dansyle à 0,2 %, réaction 60 min à l'obscurité

L'utilisation d'une **solution éluante** dans laquelle est dissous le réactif est beaucoup plus délicate ; citons la ninhydrine pour la détection des acides aminés, la fluoescamine pour les amines biogéniques [45].

Le réactif peut être présent dans la **phase stationnaire**. Cela ne doit pas être confondu avec l'indicateur de fluorescence des plaques. Un sel de zirconium par exemple permet la détection de certains œstrogènes.

La figure 22 présente de façon schématique les principaux modes de formation de dérivés utilisés en chromatographie planaire.

5.5 Courbes de calibrage

Elles sont tracées très simplement en portant sur un graphe la réponse du détecteur en fonction de la quantité ou de la concentration injectée. En ultraviolet, visible ou fluorescence, du fait de la loi de Beer, toutes les courbes présentent une partie droite aux faibles concentrations puis s'incurvent plus ou moins fortement avant d'arriver à un plateau, qui indique que le détecteur est saturé. Cela est valable aussi bien en CCM qu'en CP à flux forcé avec élution. En toute rigueur, il faut enregistrer l'aire sous le pic, mais la hauteur de pic peut être amplement suffisante dans le cas de substances bien résolues [46].

La linéarisation de la courbe de calibrage doit être effectuée par régression. Chaque soluté possède sa propre courbe de calibrage.

Une relation de type $y = Ax + B$ (avec y réponse du détecteur et x concentration du soluté) est très souvent utilisée mais elle n'est valable que pour de très faibles concentrations, ce qui suppose que l'on minimise toute erreur sur le volume injecté.

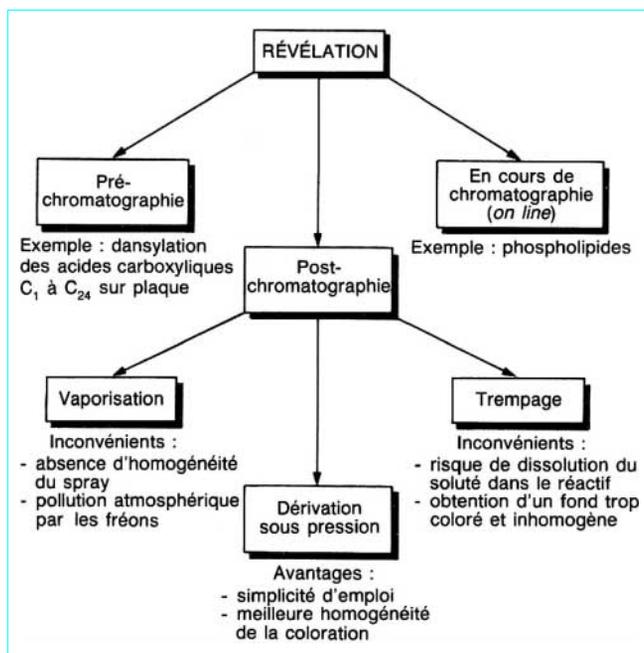


Figure 22 – Principaux modes de formation de dérivés en chromatographie planaire

La relation $\lg y = A \lg x + B$ est applicable sur une grande gamme de concentrations. À l'expérience, c'est la droite de régression la plus fiable.

L'emploi des inverses $1/y = A/x + B$ est conseillé lorsque la courbe $y = f(x)$ est très fortement incurvée.

Enfin, dans quelques cas particuliers, $\sqrt{y} = A \lg x + B$ peut se révéler utile. Il faut se souvenir que chaque détecteur possède une gamme dans laquelle les conditions opératoires sont maximales.

6. Conclusion

Pour conclure et s'il fallait imaginer quelle pourrait être la chromatographie planaire de l'an 2000, on peut croire qu'il demeure encore de nombreuses étapes à franchir, mais les grands axes sont aujourd'hui ébauchés.

■ Dépôt

L'automatisation totale de cette étape, incluant une éventuelle préparation de l'échantillon (pesée, extraction...) est en voie d'être achevée.

■ Phases adsorbantes

De nombreux efforts concernant la compatibilité avec les phases éluantes, la structure du milieu poreux, la présence d'additifs dans la couche adsorbante sont encore à faire. Il ne fait pas de doute que de nouvelles technologies vont permettre l'apparition sur le marché de générations originales de plaques : les plaques souples et les couches plus fines en sont une des approches les plus réalistes.

■ Développement

L'analyse multicouche (*multi-layer*) en flux forcé offre les perspectives de développement les plus intéressantes.

■ Formation de dérivés

L'ère de la révélation à visée qualitative (*spray*) commence à laisser le pas à de nouveaux procédés de dérivation offrant des caractéristiques se prêtant à l'analyse quantitative et permettant l'utilisation de nouveaux réactifs.

■ Détection

La compatibilité à de nombreuses méthodes de couplage, les procédés originaux comme l'analyse d'images sont autant d'atouts supplémentaires pour l'analyste, qui s'ajoutent aux avantages considérables de la CP. L'analyste dispose du chromatogramme sur la plaque et il peut utiliser de multiples procédés de détection. En particulier, il peut retraiter les solutés, c'est-à-dire changer de méthode de détection (UV → fluorescence par exemple). Il s'agit là (avec la possibilité d'analyse simultanée de plusieurs échantillons) de l'atout majeur de la CP, car aucune autre technique chromatographique ne le permet.

Ainsi, bien plus qu'une méthode concurrente des autres techniques chromatographiques, la chromatographie planaire doit être considérée comme une méthode à part entière, complémentaire aux autres. De l'avantage d'une méthode en discontinu (*off-line*) offrant un grand nombre d'alternatives, elle évolue également vers une procédure possible en continu (*on-line*), où la plaque chromatographique peut alors être considérée comme une colonne plate à usage unique.

Chromatographie planaire

par **Antoine M. SIOUFFI**

*Ingénieur de l'École Nationale Supérieure de Synthèse
Procédés et Ingénierie Chimiques d'Aix-Marseille (ENSSPIC AM)
Docteur ès Sciences
Professeur à l'Université Aix-Marseille 3*

Eric POSTAIRE

*Docteur ès Sciences
Pharmacien des Hôpitaux
Maître de Conférence Associé de l'Université Paris XI*

et **Dominique PRADEAU**

*Docteur ès Sciences
Pharmacien des Hôpitaux
Maître de Conférence Associé de l'Université Paris XI*

Bibliographie

- [1] STAHL (E.). – *Dünnschicht-Chromatographie. Ein Laboratoriumshandbuch.* Springer-Verlag, Berlin (1962).
- [2] RANDEATH (K.). – *Chromatographie sur couches minces.* Gauthier-Villars, Paris (1971).
- [3] GUIOCHON (G.), GONNORD (M.F.), ZAKARIA (M.), BEAVER (L.) et SIOUFFI (A.M.). – *Chromatography with a two dimensional column.* *Chromatographia*, 17, 121-126 (1983).
- [4] RIGHEZZA (M.) et SIOUFFI (A.M.). – *Planar chromatography with rectangular packed capillary columns and electrochemical detection.* *J. Planar Chromatogr.*, 1, 293-298 (1988).
- [5] RUOFF (A.L.), GIDDINGS (J.C.), STEWART (G.H.) et SHIN (H.K.). – *Diffusion of liquids in unsaturated paper.* *J. Chromatogr.*, 3, 438-445 (1960).
- [6] GUIOCHON (G.) et SIOUFFI (A.M.). – *Study of the performances of thin layer chromatography. III. Flow velocity of the mobile phase.* *J. Chromatogr. Sci.*, 16, 598-609 (1978).
- [7] GEISS (F.). – *The role of the vapor phase in Planar Chromatography.* *J. Planar Chromatogr.*, 1, 102-115 (1988).
- [8] LAMOTTE (A.). – *Chromatographie en couche mince.* *Spectra* 2000, 25, 16-21 (1975).
- [9] KANANEN (G.), SUNSHINE (I.) et MONFORTE (J.). – *A comparison of thin layer chromatographic adsorbents and developing units.* *J. Chromatogr.*, 52, 292-297 (1970).
- [10] OMORI (T.). – *Automated developing chamber for thin layer chromatography with double beam optical sensor.* *J. Planar Chromatogr.*, 1, 66-69 (1988).
- [11] BURGER (K.). – *TLC-PDM Thin layer chromatography with gradient elution in comparison to liquid chromatography.* *Fresenius-Z. Anal. Chem.*, 318, 228 (1984).
- [12] SOCZEWSKI (E.) et WAWRZYNUWICZ (T.). – *A sandwich tank for continuous quasi column development of precoated HPTLC plates.* *Chromatographia*, 11, 466-470 (1978).
- [13] TYIHAK (E.), MINCSOVICS (E.) et KALASZ (H.). – *New planar liquid chromatographic technique : over pressured thin-layer chromatography.* *J. Chromatogr.*, 174, 75-81 (1979).
- [14] MINCSOVICS (E.), TYIHAK (E.) et SIOUFFI (A.M.). – *Comparison of off-line and on-line over-pressured layer chromatography (OPLC).* *J. Planar Chromatogr.*, 1, 141-145 (1988).
- [15] DÉTOLLE (S.), POSTAIRE (E.), PROGNON (P.), MONTAGNIER (C.) et PRADEAU (D.). – *Quantitative Over Pressure Layer Chromatography of Quinine, Quinidine and Hydroquinidine in biomedical analysis.* *J. Liq. Chromatogr.*, 13, 1991-2000 (1990).
- [16] TYIHAK (E.), MINCSOVICS (E.), KALASZ (H.) et NAGY (J.). – *Optimization of operating parameters in overpressured thin-layer chromatography.* *J. Chromatogr.*, 211, 45-51 (1981).
- [17] TYIHAK (E.), MINCSOVICS (E.) et SZEKELY (T.J.). – *Overpressured multi-layer Chromatography.* *J. Chromatogr.*, 471, 375-387 (1989).
- [18] KAISER (R.). – *High Pressure circular chromatography.* *Planar Chromatography*, 1, R.E. Kaiser. Ed. Huethig., Herdelberg (1988).
- [19] POOLE (C.F.). – *Band Broadening and the plate height equation in Thin Layer Chromatography.* *J. Planar Chromatogr.*, 1, 373-376 (1988).
- [20] GUIOCHON (G.), BRESSOLLE (F.) et SIOUFFI (A.M.). – *Study of the performances of thin layer chromatography in optimization of experimental conditions.* *J. Chromatogr. Sci.*, 17, 368-386 (1979).
- [21] POOLE (C.F.) et POOLE (S.K.). – *Resolution and capacity in planar chromatography.* *J. Planar Chromatogr.*, 2, 109, 165-168.
- [22] SNYDER (L.R.). – *Classification of the solvent properties of common liquids.* *J. Chromatogr. Sci.*, 16, 223-234 (1978).
- [23] NYIREDY (Sz.), DALLENBACH-TÖLKE (K.) et STICHER (O.). – *The « PRISMA » optimization system in planar chromatography.* *J. Planar Chromatogr.*, 1, 336-342 (1988).
- [24] SHIMIZU (T.), HIRATA (H.) et NAKAJIMA (K.). – *Thin-layer chromatography of inorganic ions on polyethyleneimine cellulose in mixed sulfuric acid solvent media.* *Chromatographia*, 28, 620-622 (1989).
- [25] JOST (W.) et HAUCK (H.E.). – *HPTLC pre-coated plates with amino modification and some of their applications.* *J. Chromatogr.*, 261, 235-244 (1983).
- [26] KLAUS (R.), FISCHER (W.) et HAUCK (H.E.). – *Use of a new adsorbent in the separation and detection of glucose and fructose by HPTLC.* *Chromatographia*, 28, 364-366 (1989).
- [27] OKAMOTO (M.) et OHTA (M.). – *Behaviour of synthetic corticoids in ointment on 3-cyanopropyltrichlorosilane in HPTLC.* *J. Chromatogr.*, 369, 403-407 (1986).
- [28] TOMKINSON (G.P.), WILSON (I.D.) et RUANE (R.J.). – *Reversed-phase ion-pair high performance thin-layer chromatography of acids on C-2 bonded silica gel.* R.E. Kaiser Instrumental Thin-Layer Chromatography/Planar Chromatography, 229-232 (1989).
- [29] KOVACS-HALADY (K.) et BARNA-KATONA (K.). – *A reversed-phase ion-pair thin layer chromatographic study of several amino- and nitrosalicylic acids.* *J. Planar Chromatogr.*, 2, 133-137, (1989).
- [30] SZEPESI (G.), VEGH (Z.), GYULDY (Zs.) et GAZDAG (M.). – *Optimization of reversed-phase ion-pair chromatography by over pressurized thin-layer chromatography.* *J. Chromatogr.*, 290, 127-134 (1984).
- [31] PIRKLE (W.H.), FINN (J.M.), HAMPER (B.C.), SCHREINER (J.) et PRIBISH (J.R.). – ACS Symposium series. N° 185. *Asymmetric reactions and processes in chemistry.* E.L. Illiel et S. Otsuka, edit. American Chemical Society. Washington D.C. 245-260 (1982).
- [32] WAINER (I.W.), BRUNNER (C.A.) et DOYLE (T.D.). – *Direct resolution of enantiomers via thin layer chromatography using a chiral adsorbent.* *J. Chromatogr.*, 264, 154 (1983).
- [33] MACK (M.) et HAUCK (H.E.). – *Separation of enantiomers by thin layer chromatography.* *J. Planar Chromatogr.*, 2, 190-193 (1989).

- [34] BRINKMAN (U.A.Th.) et KAMMINGA (D.). – *Rapid separation of enantiomers by thin-layer chromatography on a chiral stationary phase*. J. Chromatogr., 330, 75-378 (1985).
- [35] WALL (P.E.). – *Preparation and application of HPTLC plates for enantiomers separation*. J. Planar Chromatogr., 2, 228-232 (1989).
- [36] NISHI (H.), ISHÛ (K.), TAKU (K.), SHIMIZU (R.) et TSUMAGARI (N.). – *New chiral derivatization reagent for the resolution of amino acids as diastereoisomers by TLC and HPLC*. Chromatographia, 27, 301-305 (1989).
- [37] POOLE (S.K.) et POOLE (C.F.). – *Evaluation of the separation performance of empore thin layer chromatography sheets*. J. Planar Chromatogr., 2, 478-481 (1989).
- [38] KUBELKA (P.) et MUNK (F.Z.). – *Techn. Physik*. 12, 593 (1931).
- [39] RANNY (M.). – *Thin-Layer Chromatography with Flame ionization detection*. D. Reidel. Publishing company. Dordrecht, Holland (1987).
- [40] RAMALEY (L.), VAUGHAN (M.A.) et JAMIESON (W.D.). – *Characteristics of a thin layer chromatogram scanner mass spectrometer system*. Anal Chem., 57, 353-358 (1985).
- [41] JORK (H.), FUNK (W.), FISHER (W.) et WIMMER (H.). – *In situ prechromatographic derivatization*. J. Planar Chromatogr., 1, 280-292 (1988).
- [42] KREUZIG (F.). – *Derivatization of substances, separated on thin-layer plates, by means of an automatic spraying device*. Chromatographia, 13, 238-240 (1980).
- [43] POSTAIRE (E.), SARBACH (C.), DELVORDRE (P.) et REGNAULT (C.). – *A new system of derivatization in Planar Chromatography: The Over-Pressure derivatization*. J. Planar Chromatogr., 3, 247-251 (1990).
- [44] VASKOVSKY (V.E.). – *An universal reagent for phospholipid analysis*. J. Chromatogr., 114, 129-141 (1975).
- [45] JORK (H.) et WIMMER (H.). – *Quantitative Auswertung von Dünnsicht chromatogrammen*. Band 1, IV-14.
- [46] POOLE (C.F.), POOLE (S.K.), DEAN (T.A.) et CHIRCO (N.M.). – *Sample requirements for quantitation in Thin-Layer Chromatography*. J. Planar Chromatogr., 2, 180-189 (1989).
- [47] HALPAAD (H.). – dans *Advances in chromatography*, Elsevier (1977).
- [48] *Chromatography*. Heftmann (E.). Éditeur 1979, J. Wiley.
- [49] MACK (M.), HANCK (H.E.) et HERBERT (H.). – *J. Planar Chromatogr.* 1, 304 (1988).

Fabricants

Plaques prêtes à l'emploi

Merck
 Macherey Nagel
 3M
 Whatman
 Analtech

Appareillages de chromatographie planaire

Camag
 Desaga
 LIM (ex Labor MIN)
 Radiomatic
 Schimadzu